

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA – MESTRADO
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: CLÍNICA INTEGRADA

DANIELA HULLER

**CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO,
ANTIMICROBIANO E ANTI-INFLAMATÓRIO DE NANOPARTÍCULAS DE OURO**

PONTA GROSSA

2018

DANIELA HULLER

**CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO,
ANTIMICROBIANO E ANTI-INFLAMATÓRIO DE NANOPARTÍCULAS DE OURO**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre na Universidade Estadual de Ponta Grossa, no curso de Mestrado em Odontologia – Área de concentração em Clínica Integrada. Linha de pesquisa: Etiologia, diagnóstico e tratamento das doenças bucais.

Orientador: Prof. Dr. Michel Fleith Otuki.

Co-orientador: Prof. Dr. Fábio André dos Santos.

PONTA GROSSA

2018

Ficha Catalográfica
Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG

H913 Huller, Daniela
Caracterização e avaliação do potencial citotóxico, antimicrobiano e anti-inflamatório de nanopartículas de ouro/ Daniela Huller. Ponta Grossa, 2018. 114f.

Dissertação (Mestrado em Odontologia - Área de Concentração: Clínica Integrada), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Michel Fleith Otuki.

Coorientador: Prof. Dr. Fábio André dos Santos.

1.Nanopartículas. 2.Técnicas de cultura de células. 3.Testes de toxicidade.

I.Otuki, Michel Fleith. II. Santos, Fábio André dos. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Mestrado em Odontologia. IV. T.

CDD: 617.6

DANIELA HULLER

Carecterização e avaliação do potencial citotóxico, antimicrobiano e anti-inflamatório de nanopartículas de ouro.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação Stricto sensu em Odontologia da Universidade Estadual de Ponta Grossa, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Odontologia, área de concentração em Clínica Integrada, linha de pesquisa de Etiologia, Diagnóstico e Tratamento das doenças bucais.

Ponta Grossa, 22 de fevereiro de 2018.



Prof. Dr. Humberto Osvaldo Schwartz Filho
Universidade Federal do Paraná



Prof. Dr. Vanessa Migliorini Urban
Universidade Estadual de Ponta Grossa



Prof. Dr. Michel Fleith Otuki
Universidade Federal do Paraná

DADOS CURRICULARES

DANIELA HULLER

NASCIMENTO	26.10.1991 Blumenau – Santa Catarina – Brasil
FILIAÇÃO	Sonia Murakami Huller Gilberto Huller
2010 - 2014	Curso de Graduação em Odontologia. Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) – Ponta Grossa – Paraná
2015 - 2016	Curso de aperfeiçoamento em Cirurgia Oral Menor. Faculdade São Leopoldo Mandic (SLMANDIC) – Curitiba – Paraná
2016 - 2018	Curso de Pós-Graduação. Nível de Mestrado em Odontologia, área de concentração em Clínica Integrada. Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) – Ponta Grossa – Paraná

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por dar-me força, serenidade e perseverança para realização e conclusão deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Odontologia da Universidade Estadual de Ponta Grossa pela oportunidade de cursar o Mestrado.

Ao Prof. Dr. Michel Fleith Otuki, pela contribuição de seus conhecimentos e sugestões na orientação desta dissertação.

Aos Professores Dr. Fábio André dos Santos e Dr. Luís Antônio Esmerino, pela colaboração de informações, conhecimentos e sugestões que auxiliaram na concretização deste estudo.

À Mariane Aparecida Savi Sanson, colega de pesquisa, pelos ensinamentos, paciência, apoio, incentivo e dedicação na elaboração deste trabalho.

À Gustavo Simão Moraes, colega de mestrado, pela amizade e por todos os momentos que compartilhamos durante esses dois anos.

Ao Grupo de Fenômenos Fototérmicos em Fluidos Complexos do Departamento de física da UEPG por toda a ajuda.

À Rubens Gomes Júnior, colega de cultivo de células, pela amizade e contribuição no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Complexo de Laboratórios Multiusuários (C-LABMU) da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pelo apoio técnico.

E, finalmente, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior (CAPES) do Ministério da Educação e Cultura, pelo apoio financeiro.

Muito obrigada!

RESUMO

HULLER, D. **Caracterização e avaliação do potencial citotóxico, antimicrobiano e anti-inflamatório de nanopartículas de ouro.** [Dissertação] Mestrado em Clínica Integrada. Ponta Grossa: Universidade Estadual de Ponta Grossa, 2018.

A utilização do ouro na forma nanoparticulada vem sendo uma forma promissora alternativa para o tratamento de condições inflamatórias. Devido as suas propriedades anti-inflamatórias se justifica a possibilidade do emprego das nanopartículas de ouro (AuNPs) no tratamento de inflamações pulpares. Entretanto, para utilização na Odontologia, pouco se sabe sobre o efeito real das AuNPs sobre a polpa dental e seus componentes celulares. Os objetivos deste trabalho foram: caracterizar as nanopartículas de ouro sintetizadas, avaliar seu potencial citotóxico, atividade antimicrobiana e anti-inflamatória. Para a caracterização, foram realizados testes de espectroscopia de absorção no ultravioleta-visível (UV-VIS), microscopia eletrônica de varredura (FEG-SEM) e potencial Zeta. O potencial citotóxico foi avaliado em cultura de células indiferenciadas da polpa dental humana. Os grupos experimentais avaliados foram: nanopartículas de ouro reduzidas com citrato de sódio (Au@CS); nanopartículas de ouro revestidas com polivinilpirrolidona (Au@CS+PVP), ambas em diferentes concentrações (100; 50; 25; 12,5; 6,25 e 3,12 µg/mL); citrato de sódio (agente redutor e surfactante) e PVP (agente estabilizante). Para avaliar o potencial citotóxico, foram analisados parâmetros de viabilidade, morfologia e potencial de reparo celular. A capacidade antimicrobiana foi analisada através dos testes de difusão em ágar e microdiluição. O potencial anti-inflamatório foi avaliado através do efeito das AuNPs na liberação de mediadores inflamatórios (TNF- α) em macrófagos. Os dados para as variáveis quantitativas paramétricas foram analisados usando a análise de variância de uma via (ANOVA), e aplicado pós-teste de Tukey. Os dados quantitativos não paramétricos e qualitativos ordinais foram analisados usando a análise de Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn. Significância estatística foi estabelecida em $p < 0,05$. Os resultados mostraram que as dispersões coloidais de nanopartículas sintetizadas possuem formato esférico, diâmetro médio aproximado de 20 nm e são altamente estáveis. Os grupos Au@CS e Au@CS+PVP, nas concentrações analisadas, não apresentaram potencial citotóxico para as células indiferenciadas da polpa dental humana, sem redução da viabilidade celular e alteração morfológica para os períodos analisados. As nanopartículas não interferiram na proliferação e migração celular, mas apresentaram aumento na quantidade de proteínas para as menores concentrações de Au@CS+PVP. As nanopartículas de ouro nas concentrações testadas não apresentaram halos de inibição ou redução do crescimento microbiano de maneira expressiva. As Au@CS demonstraram potencial anti-inflamatório em sua maior concentração avaliada (100 µg/mL) e as Au@CS+PVP nas duas maiores concentrações (50 e 100 µg/mL). Os resultados obtidos sugerem que, nas condições experimentais do trabalho aqui apresentado, as Au@CS e Au@CS+PVP não foram citotóxicas e apresentam potencial anti-inflamatório discreto. As Au@CS não apresentam potencial antimicrobiano.

Palavras-chave*: nanopartículas; técnicas de cultura de células; testes de toxicidade.

*Em acordo com os Descritores em Ciências da Saúde (DeCS) disponível no domínio <http://decs.bvs.br>

ABSTRACT

HULLER, D. **Characterization and evaluation of the cytotoxic, antimicrobial and anti-inflammatory potential of gold nanoparticles.** [Dissertação] Mestrado em Clínica Integrada. Ponta Grossa: Universidade Estadual de Ponta Grossa, 2018.

The use of gold in nanoparticulate form has been an promising alternative way to treat inflammatory conditions. Due to its anti-inflammatory properties, the possibility of the use of gold nanoparticles (AuNPs) in the treatment of pulpal inflammation is justified. However, for use in dentistry, little is known about the actual effect of AuNPs on dental pulp and its cellular components. The objectives of this study were: to characterize the synthesized gold nanoparticles, to evaluate their cytotoxic potential, antimicrobial and anti-inflammatory activity. For the characterization, were performed ultraviolet-visible absorption spectroscopy (UV-VIS), Scanning Electron Microscopy (FEG-SEM) and Zeta potential. The cytotoxic potential was evaluated in culture of undifferentiated cells of the human dental pulp. The experimental groups evaluated were: gold nanoparticles reduced with sodium citrate (Au@CS); gold nanoparticles coated with polyvinylpyrrolidone (Au@CS+PVP), both at different concentrations (100; 50; 25; 12,5; 6,25 and 3,12 $\mu\text{g/mL}$); sodium citrate (reducing agent and surfactant) and PVP (stabilizing agent). To evaluate the cytotoxic potential, parameters of viability, morphology and cell repair potential were analyzed. The antimicrobial capacity was analyzed through agar diffusion test and microdilution. The anti-inflammatory potential was evaluated through the effect of AuNPs on the release of inflammatory mediators (TNF- α) in macrophages. Data for the parametric quantitative variables were analyzed using one-way variance analysis (ANOVA) and Tukey's post-test. Non-parametric quantitative data and ordinal qualitative data were analyzed using Kruskal-Wallis analysis with Dunn's post-test. Statistical significance was set at $p < 0,05$. The results showed that the colloidal dispersions of synthesized nanoparticles have a spherical shape, average diameter of approximately 20 nm and are highly stable. The groups Au@CS and Au@CS+PVP, in the evaluated concentrations, showed no cytotoxic potential for the undifferentiated cells of the human dental pulp, with no reduction of cell viability and morphological alteration for the analyzed periods. The nanoparticles did not interfere in cell proliferation and migration, but showed an increase in the amount of proteins for the lowest concentrations of Au@CS+PVP. Nanoparticles of gold at the concentrations evaluated did not present halos of inhibition or reduction of microbial growth in an expressive way. Au@CS showed anti-inflammatory potential at its highest concentration (100 $\mu\text{g/mL}$) and Au@CS+PVP at the two highest concentrations (50 and 100 $\mu\text{g/mL}$). The results suggest that, in the experimental conditions of the study presented here, Au@CS and Au@CS+PVP were not cytotoxic and have a discrete anti-inflammatory potential. Au@CS did not present antimicrobial potential.

Keywords*: nanoparticles; cell culture techniques; toxicity tests.

*Em acordo com os Descritores em Ciências da Saúde (DeCS) disponível no domínio <http://decs.bvs.br>

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 – Síntese das nanopartículas de ouro	39
Figura 02 – Diluição seriada das dispersões de nanopartículas de ouro	43
Figura 03 – Proliferação celular no decorrer do tempo	45
Figura 04 – Representação esquemática da obtenção da cultura celular.....	46
Figura 05 – Aplicação dos tratamentos para os testes de viabilidade	49
Figura 06 – Representação esquemática do ensaio do MTT	51
Figura 07 – Representação esquemática do ensaio do Azul de Tripán	53
Figura 08 – Representação esquemática do ensaio de análise morfológica.....	55
Figura 09 – Representação esquemática do ensaio de “ <i>Scratch</i> ”	57
Figura 10 – Teste de quantificação de proteínas totais.....	59
Figura 11 – Contagem das colônias – UFC/mL	62
Figura 12 – Etapas do teste de difusão em disco.....	64
Figura 13 – Etapas do teste de difusão em cavidade	65
Figura 14 – Plaqueamento do teste de microdiluição em caldo	67
Figura 15 – Plaqueamento do ensaio de ELISA.....	68
Figura 16 – Representação esquemática do ensaio de ELISA	69
Figura 17 – Comprimentos de onda da máxima absorção (Au@CS e Au@CS+PVP)	71
Figura 18 – Caracterização morfológica das nanopartículas através de FEG–SEM.....	72
Figura 19 – Viabilidade celular pelo método do MTT em 24 horas	73
Figura 20 – Viabilidade celular pelo método do MTT em 48 horas	74
Figura 21 – Viabilidade celular pelo método de exclusão do Azul de Tripán em 24 horas....	75
Figura 22 – Viabilidade celular pelo método de exclusão do Azul de Tripán em 48 horas....	75
Figura 23 – Graus de alterações morfológicas em 24 horas.....	81
Figura 24 – Graus de alterações morfológicas em 48 horas.....	81
Figura 25 – Ensaio de “ <i>Scratch</i> ” em 24 horas.....	82
Figura 26 – Ensaio de “ <i>Scratch</i> ” em 48 horas.....	83
Figura 27 – Ensaio de “ <i>Scratch</i> ” em 72 horas.....	83
Figura 28 – Ensaio de “ <i>Scratch</i> ” em 96 horas.....	84
Figura 29 – Curva padrão para a quantificação de proteínas pelo método de Bradford	89
Figura 30 – Quantificação de proteínas totais pelo Método de Bradford.....	90
Figura 31 – Halos de inibição – Teste de Difusão em disco	92
Figura 32 – Halos de inibição – Teste de Difusão em cavidade	94

Figura 33 – Microdiluição em caldo – <i>S. aureus</i>	95
Figura 34 – Microdiluição em caldo – <i>P. aeruginosa</i>	95
Figura 35 – Microdiluição em caldo – <i>E. coli</i>	96
Figura 36 – Microdiluição em caldo – <i>C. albicans</i>	96
Figura 37 – Teste de microdiluição em caldo – corantes TTC e XTT.....	97
Figura 38 – Ensaio de Elisa.....	97

LISTA DE QUADROS

Quadro 01 – Descrição das alterações morfológicas para cada grau de reatividade.....	55
Quadro 02 – Morfologia celular após 24 horas.....	77
Quadro 03 – Morfologia celular após 48 horas.....	79
Quadro 04 – Comportamento migratório – Controle.....	84
Quadro 05 – Comportamento migratório – Au@CS.....	85
Quadro 06 – Comportamento migratório – Au@CS+PVP.....	87
Quadro 07 – Teste de Difusão em disco.....	91
Quadro 08 – Teste de Difusão em cavidade.....	93

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 – Valores de referência para o potencial Zeta.....	42
Tabela 02 – Grupos experimentais para os testes em cultura de células	44
Tabela 03 – Padronização da concentração de microrganismos - UFC/mL.....	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	Coleção de tipos de cultura americana, do inglês <i>American Type Culture Collection</i>
AuNPs	Nanopartículas de ouro
BSA	Albumina sérica bovina, do inglês <i>Bovine Serum Albumin</i>
CIM	Concentração inibitória mínima
CLSI	Instituto de Normas Clínicas e de Laboratório, do inglês <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CO ₂	Dióxido de carbono
CPO-D	Dentes cariados, perdidos e obturados
DMEM	Meio Eagle Modificado por Dulbecco, do inglês <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
E.P.M.	Erro padrão da média
EUA	Estados Unidos da América
FDA	Do inglês <i>Food and Drug Administration</i>
HAuCl ₄	Ácido tetracloroáurico ou cloreto de ouro
IL-1 β	Interleucina-1 beta
LPS	Lipopolissacarídeo
FEG-SEM	Microscopia eletrônica de varredura com fonte de emissão de campo, do inglês <i>Field Emission Scanning Electron Microscope</i>
MH	Mueller-Hinton
MHG	Mueller-Hinton acrescido de glicose
MMPs	Metaloproteinases
MO	Microrganismo
MTT	Brometo de [3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
NF- κ B	Fator Nuclear <i>kappaB</i> , do inglês <i>Nuclear Factor kappaB</i>
NP	Nanopartículas
PBS	Tampão fosfato-salino, do inglês <i>Phosphate Buffered Saline</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
PMSF	Fluoreto de fenil metil sulfonil, do inglês <i>Phenyl methyl sulphenyl fluoride</i>
PVP	Polivinilpirrolidona

SFB	Soro Fetal Bovino
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TTC	Cloreto de 2,3,5 trifeniltetrazólio
UFC	Unidades formadoras de colônias
UV-VIS	Espectroscopia no Ultravioleta-visível
VN	Vermelho Neutro
XTT	2,3-Bis-(2-Methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
=	Igual
<	Menor que
>	Maior que
±	Mais ou menos
®	Marca registrada (Brasil)
°C	Grau Celsius
Au	Ouro
g	Gramma
h	Hora
L	Litro
mg	Miligramma
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
mV	Milivolt
ng	Nanogramma
nm	Nanômetro
rpm	Rotações por minuto
µg	Microgramma
µL	Microlitro
µm	Micrômetro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	21
2.1 NANOTECNOLOGIA	21
2.2 NANOMATERIAIS	21
2.3 APLICAÇÕES DA NANOTECNOLOGIA	22
2.3.1 Nanotecnologia na Odontologia	23
2.4 NANOTOXICOLOGIA.....	25
2.5 NANOPARTÍCULAS DE OURO	25
2.5.1 Síntese e revestimento das nanopartículas de ouro.....	26
2.5.2 Propriedades das nanopartículas de ouro.....	27
2.5.2.1 Propriedades físicas e químicas das nanopartículas de ouro.....	27
2.5.2.2 Propriedades biológicas das nanopartículas de ouro.....	28
2.5.3 Aplicações biológicas das nanopartículas de ouro	29
2.5.3.1 Carreamento de medicamentos	30
2.5.3.2 Carreamento de biomoléculas	30
2.5.3.3 Terapia por foto-hipertermia	31
2.5.4 Aplicações microbiológicas das nanopartículas de ouro	32
2.5.4.1 Carreamento de agentes antimicrobianos.....	32
2.5.4.2 Melhoramento de terapias fotodinâmicas.....	33
2.5.4.3 Destruição hipertérmica de bactérias	33
2.5.5 Biocompatibilidade das nanopartículas de ouro	34
3 OBJETIVOS	38
3.1 OBJETIVO GERAL	38
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	38
4 MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1 SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO.....	39
4.2 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO	40
4.3 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO	40
4.3.1 Espectroscopia de absorção no ultravioleta–visível (UV–VIS)	40
4.3.2 Microscopia eletrônica (FEG–SEM).....	41
4.3.3 Potencial Zeta	42
4.4 AVALIAÇÃO DO PERFIL CITOTÓXICO	42

4.4.1 Grupos experimentais	43
4.4.2 Obtenção da cultura celular	44
4.4.3 Cultivo de células indiferenciadas da polpa dental humana.....	47
4.4.3.1 Troca do meio de cultivo.....	47
4.4.3.2 Passagem celular	47
4.4.3.3 Congelamento celular.....	47
4.4.3.4 Descongelamento celular	48
4.4.3.5 Quantificação celular.....	48
4.4.4 Avaliação do efeito das nanopartículas de ouro na viabilidade celular.....	49
4.4.4.1 Ensaio do <i>Thyazolyl Blue Tetrazolium Bromide</i> (MTT).....	50
4.4.4.2 Ensaio de exclusão do Azul de Tripán	52
4.4.5 Avaliação do efeito das nanopartículas de ouro na morfologia celular.....	54
4.4.6 Avaliação do efeito das nanopartículas no potencial de reparo celular.....	55
4.4.6.1 Ensaio de “ <i>Scratch</i> ”.....	56
4.4.6.2 Ensaio de quantificação de proteínas totais.....	58
4.5 AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES ANTIMICROBIANAS.....	60
4.5.1 Cepas de referência.....	60
4.5.2 Preparo dos reagentes para os testes microbiológicos	60
4.5.2.1 Meio Mueller–Hinton – Ágar.....	60
4.5.2.2 Meio Mueller–Hinton – Caldo	61
4.5.3 Controle de turbidez para o preparo do inóculo	61
4.5.4 Teste de Difusão em disco.....	63
4.5.5 Teste de Difusão em cavidade	65
4.5.6 Teste de Microdiluição	66
4.6 AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES ANTI-INFLAMATÓRIAS.....	67
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	70
5 RESULTADOS	71
5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO	71
5.1.1 Espectroscopia de absorção no ultravioleta – visível (UV–VIS)	71
5.1.2 Microscopia eletrônica (FEG–SEM)	71
5.1.3 Potencial Zeta	72
5.2 AVALIAÇÃO DO PERFIL CITOTÓXICO	72
5.2.1 Avaliação do efeito das nanopartículas de ouro na viabilidade celular.....	72

5.2.1.1	Ensaio do <i>Thyazolyl Blue Tetrazolium Bromide</i> (MTT)	73
5.2.1.2	Ensaio de exclusão do Azul de Tripan	74
5.2.2	Avaliação do efeito das nanopartículas de ouro na morfologia celular	76
5.2.2.1	Microscopia óptica de campo claro	76
5.2.3	Avaliação do efeito das nanopartículas no potencial de reparo celular	82
5.2.3.1	Ensaio de “ <i>Scratch</i> ”	82
5.2.3.2	Ensaio de quantificação de proteínas totais	89
5.3	AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES ANTIMICROBIANAS	90
5.3.1	Teste de Difusão em disco	90
5.3.2	Teste de Difusão em cavidade	92
5.3.3	Teste de Microdiluição	94
5.4	AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES ANTI-INFLAMATÓRIAS	97
6	DISCUSSÃO	98
7	CONCLUSÃO	104
	REFERÊNCIAS	105
	ANEXO A – Termo de Doação de Dentes para a Pesquisa	113

1 INTRODUÇÃO

A doença cárie ainda representa um relevante problema de saúde bucal, conforme evidenciado no último levantamento epidemiológico nacional. Segundo o SB Brasil 2010, o índice CPO-D, que expressa a experiência de cárie dos indivíduos através da soma dos dentes cariados, perdidos e obturados/restaurados, indica valores de 16,75 dentes afetados pela doença para a faixa etária entre 35 e 44 anos, chegando a 27,53 dos dentes afetados na população entre 65 e 74 anos (BRASIL, 2012).

O tratamento das lesões cariosas, em especial, nas abordagens de lesões profundas, é um campo repleto de dilemas, pois além do desafio microbiológico, no decorrer dos procedimentos restauradores, a remoção do tecido cariado pode resultar em exposição pulpar, tornando o prognóstico do dente menos previsível (BARTHEL *et al.*, 2000).

A polpa dentária, como qualquer outro tecido conjuntivo, responde à agressão tanto biológica, ocasionada pela microbiota da lesão cariada, quanto física, ocasionada durante o tratamento restaurador, com um processo de inflamação, a fim de eliminar os agentes patogênicos e permitir o reparo (SILVA *et al.*, 2009). Deste ponto de vista, é desejável manter a vitalidade pulpar tanto tempo quanto possível.

Com esse objetivo, o capeamento pulpar direto é sugerido como tratamento de escolha para proteção do complexo dentina-polpa pós-exposição pulpar (BARTHEL *et al.*, 2000). Essa proteção consiste na aplicação de uma ou mais camadas de material específico entre o material restaurador e tecido pulpar para evitar: 1) a toxicidade dos materiais restauradores e 2) a penetração de bactérias (MODENA *et al.*, 2009). Não existe um consenso na literatura sobre a taxa de sucesso desse tratamento, devido as diferenças nos períodos de observação, nos critérios de avaliação e do estado pulpar antes do capeamento (BARTHEL *et al.*, 2000).

Existe uma grande quantidade de materiais que podem ser utilizados pelo cirurgião dentista no capeamento pulpar, como o agregado trióxido mineral, hidróxido de cálcio, produtos à base de cimentos ionoméricos e sistemas adesivos, porém esses materiais nem sempre conseguem promover satisfatoriamente a reparação dos tecidos (MENTE *et al.*, 2010; MODENA *et al.*, 2009).

Além disso, como o material é aplicado em contato direto com o tecido pulpar, a ausência de toxicidade do agente de proteção também é de grande importância. Um grande número de materiais dentários apresentam efeitos citotóxicos quando aplicados perto ou

diretamente sobre a polpa, e poucos estimulam a reparação da polpa com formação de uma barreira dentinária (MODENA *et al.*, 2009).

As nanopartículas têm um campo de aplicabilidade muito versátil, em especial, no campo das ciências biológicas são utilizadas no carreamento de medicamentos, como biossensores, ferramentas de diagnóstico e terapêutica para melhor compreender, detectar e tratar doenças (KONG *et al.*, 2011; LEWINSKI; COLVIN; DREZEK, 2008). Estudos recentes demonstraram resultados promissores a respeito da aplicação de nanopartículas em materiais odontológicos, por apresentarem diversas propriedades físico-químicas únicas em decorrência de seu tamanho (HASHIMOTO *et al.*, 2015; OSORIO *et al.*, 2014). Entre elas, as nanopartículas de ouro (AuNPs) merecem destaque por ser uma possibilidade atraente na incorporação em materiais dentários (HASHIMOTO *et al.*, 2015).

Estudos apontam que as nanopartículas de ouro podem influenciar na regulação da resposta inflamatória (JEON; BYUN; JUE, 2003; MA *et al.*, 2010), apresentando uma ação anti-inflamatória devido a sua capacidade de inibir a expressão do NF- κ B e consequentemente seus efeitos na inflamação, ocasionando a redução na produção de citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 β e TNF- α (JEON; BYUN; JUE, 2003; NORTON, 2008).

Devido a essa propriedade, justifica-se a possibilidade do emprego das AuNPs no tratamento de doenças inflamatórias, em especial na Odontologia no tratamento de inflamações pulpares como um material de proteção do complexo dentino-pulpar. A polpa dental diante de um fator agressor responde através de fenômenos vasculares, porém, em virtude da mesma estar circunscrita por paredes dentinárias rígidas quando ocorre o aumento de volume desse tecido, dificulta a circulação sanguínea local podendo levar a necrose (LEONARDI *et al.*, 2011). Desta forma, é importante regular o processo inflamatório local eficientemente.

Outro aspecto importante é a compatibilidade biológica dos materiais dentários utilizados para proteção do complexo dentino-pulpar para evitar ou limitar a irritação e degeneração dos tecidos, especialmente quando o material será aplicado diretamente sobre o local de atuação (MODENA *et al.*, 2009).

Contudo, para utilização na Odontologia, pouco se sabe sobre o efeito real das AuNPs sobre a polpa dental e seus componentes celulares. Ainda não foram conduzidos estudos a respeito da aplicação de AuNPs especificamente no tratamento de inflamações pulpares. Embora as nanopartículas de ouro tenham sido empregadas com sucesso em experimentos *in vitro* (AHN *et al.*, 2018; SUMBAYEV *et al.*, 2013) e *in vivo* (AHMAD *et al.*,

2017; OMLOR *et al.*, 2017; PAULA *et al.*, 2015; SUMBAYEV *et al.*, 2013), os seus efeitos tóxicos ainda não estão completamente elucidados (STEFAN *et al.*, 2013). Com o rápido crescimento do interesse nas nanopartículas, assim como o aumento da sua utilização, juntamente com novas possibilidades de aplicações, é importante ressaltar que o conhecimento sobre seus efeitos e riscos à saúde ainda são limitados (KONG *et al.*, 2011; LEWINSKI; COLVIN; DREZEK, 2008).

Consta na literatura que o efeito tóxico das nanopartículas é altamente dependente do tipo de células com as quais as AuNPs entram em contato, assim, o tipo celular deve ser selecionado com base no órgão alvo da utilização das nanopartículas no organismo (KONG *et al.*, 2011). Portanto, a seleção do tipo celular apropriado com base na aplicação do nanomaterial é um fator importante que deve ser considerado em ensaios de citotoxicidade.

Além do potencial citotóxico, é interessante que o material utilizado na proteção do complexo dentino-pulpar apresente propriedades que auxiliem o reparo, uma vez que polpas pré-danificadas, por exemplo por lesões de cárie, podem estar enfraquecidas incapacitando os mecanismos de defesa durante a exposição (BARTHEL *et al.*, 2000).

No tratamento de lesões de cárie profunda, é razoável considerar a possibilidade das bactérias permanecerem nos túbulos dentinários da dentina clinicamente sadia (BARTHEL *et al.*, 2000; HOSHINO *et al.*, 1992). Para eliminar estas bactérias, materiais de proteção do complexo dentino-pulpar com efeito antimicrobiano podem ser úteis.

Entretanto, existem desafios fundamentais na utilização das AuNPs que consistem em preparar nanomateriais estáveis, tanto com relação ao tamanho quanto à forma de suas partículas e que possam ser manipulados sem perder suas características (KUMAR *et al.*, 2007).

O método clássico de síntese através da redução com citrato de sódio tem sido amplamente utilizado para a geração de nanopartículas de ouro (KUMAR *et al.*, 2007; TURKEVICH; STEVENSON; HILLIER, 1951). No entanto, a síntese de nanopartículas baseada em água promove interações iônicas, resultando em perda de estabilidade ao longo do tempo. Com intuito de aumentar a estabilidade e biodisponibilidade das AuNPs agentes estabilizantes são adicionados após a síntese, entre eles, a polivinilpirrolidona (PVP) (KUMAR *et al.*, 2007).

Estudos realizados com nanopartículas de ouro estabilizadas com PVP mostram efeitos positivos na estabilidade da dispersão, evitando a agregação das nanopartículas. Desta forma, é uma opção promissora por potencialmente ocasionar maior biodisponibilidade, dada

a persistência das nanopartículas sem agregação, facilitando a penetração das mesmas nas membranas biológicas muito mais efetivamente (HITCHMAN *et al.*, 2013).

Frente ao exposto e à escassez de estudos, torna-se relevante compreender as propriedades das nanopartículas de ouro com diferentes revestimentos de superfície para possíveis aplicações em Odontologia, em especial, sua ação antimicrobiana, anti-inflamatória e seu efeito citotóxico sobre células da polpa dental humana.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 NANOTECNOLOGIA

O conceito de “nanômetro” foi proposto pela primeira vez por Richard Zsigmondy, ganhador do Prêmio Nobel de Química em 1925, utilizando o termo nanômetro explicitamente para caracterizar o tamanho de partículas (HULLA; SAHU; HAYES, 2015).

Em 1959, o físico norte-americano Richard Feynman no seu trabalho intitulado “*There’s plenty of Room at the Bottom*” introduziu pela primeira vez o conceito de manipulação da matéria em nível atômico, sendo considerado o pai da nanotecnologia moderna (HULLA; SAHU; HAYES, 2015; KHURSHID *et al.*, 2015).

O termo “nanotecnologia” foi utilizado pela primeira vez em 1974, proferido pelo professor Norio Taniguchi, para descrever o processamento, separação, consolidação e deformação de materiais por um átomo ou uma molécula (HULLA; SAHU; HAYES, 2015). A idéia de nanotecnologia foi aprofundada e promovida por Eric Drexler em seu livro intitulado “*Engines of Creation-The Coming Era of Nanotechnology*” na década de 80 (KHURSHID *et al.*, 2015).

A definição universal do termo “nanotecnologia” ainda não foi estabelecida, uma vez que as definições existentes variam dependendo do uso pretendido (LAINOVIĆ; BLAZIC; POTRAN, 2012). Entretanto, a nanotecnologia envolve a aplicação, produção e processamento de materiais na escala de comprimento nanométrica (10^{-9} m = 1 nm) (SANGUANSRI; AUGUSTIN, 2006).

No início deste século houve um crescente interesse pelos campos emergentes da nanociência e da nanotecnologia, sendo uma das áreas mais populares da pesquisa atual (HULLA; SAHU; HAYES, 2015; KHURSHID *et al.*, 2015).

2.2 NANOMATERIAIS

Os nanomateriais são materiais com componentes inferiores a 100 nanômetros em pelo menos uma dimensão (ABOU NEEL *et al.*, 2015; BHARDWAJ *et al.*, 2014; BORM *et al.*, 2006). Geralmente consistem em átomos metálicos, não metálicos ou uma mistura entre eles, comumente designados por partículas metálicas, orgânicas ou semicondutoras (híbridas), respectivamente (KIM; RUTKA; CHAN, 2010).

As propriedades dos materiais em nanoescala podem diferir profundamente daquelas do mesmo material em uma escala maior (CHANG *et al.*, 2015; LAINOVIĆ; BLAZIC; POTRAN, 2012). Desta forma, os nanomateriais apresentam propriedades únicas, as quais

estão relacionadas principalmente ao aumento da área de superfície de contato e ao comportamento eletrônico (KANAPARTHY; KANAPARTHY, 2011; KIM; RUTKA; CHAN, 2010).

Uma característica comum de todos os nanomateriais é a sua grande proporção de área superficial de contato por unidade de massa, muito maior do que em partículas macroscópicas (ABOU NEEL *et al.*, 2015; BHARDWAJ *et al.*, 2014; KANAPARTHY; KANAPARTHY, 2011; KIM; RUTKA; CHAN, 2010). Essa característica garante a esses materiais o atributo de bons agentes carreadores, uma vez que sua superfície pode interagir com um maior número de moléculas (KIM; RUTKA; CHAN, 2010). A medida que as partículas se tornam menores, a proporção de átomos encontrados na superfície aumenta em relação à proporção dentro do seu volume. Isto as torna mais reativas. A alta energia de superfície também pode fazer com que as nanopartículas interajam fortemente e se aglomerem (BORM *et al.*, 2006).

Em relação ao comportamento dos elétrons, os elétrons possuem duas propriedades importantes: rotação e a capacidade de se mover entre níveis de energia específicos. Quando as rotações dos elétrons se encontram alinhadas na mesma direção, o que é dependente do tamanho da partícula, o campo magnético se torna aditivo. Uma vez que a força do campo magnético de um material é a soma dos campos magnéticos de elétrons individuais, as nanopartículas possuem um campo magnético maior em comparação com o de partículas maiores. Além disso, depois de absorver energia, os elétrons podem gerar luz ou calor quando se movem entre diferentes níveis de energia, desta forma os sinais magnéticos e ópticos dos nanomateriais tendem a ser mais fortes do que seus equivalentes moleculares tradicionais porque um maior número de elétrons estão envolvidos (KIM; RUTKA; CHAN, 2010).

As propriedades únicas dos nanomateriais dependentes do seu tamanho reduzido possibilitam suas aplicações em diversas áreas (BORM *et al.*, 2006).

2.3 APLICAÇÕES DA NANOTECNOLOGIA

Com a aplicação de inovações nanotecnológicas a nível biológico, uma nova área de estudos tem sido intensamente explorada, a nanomedicina. Muitas doenças originam de alterações nos processos biológicos em escala molecular e muitos agentes infecciosos podem estar localizados nos sistemas biológicos protegidos por barreiras de tamanho nanométrico (KIM; RUTKA; CHAN, 2010). Devido a isso, as nanopartículas podem potencialmente

atravessar as barreiras naturais e interagir com biomoléculas no sangue ou dentro dos órgãos, tecidos e células (CHANG *et al.*, 2015).

O campo da nanomedicina visa utilizar as propriedades e características físico-químicas dos nanomateriais para: 1) o diagnóstico e 2) o tratamento de doenças (FERNANDEZ CABADA *et al.*, 2012; GOMEZ-GALLEGO; URCUQUI-INCHIMA; HERNANDEZ, 2016; KIM; RUTKA; CHAN, 2010).

1) Nanomateriais podem ser projetados para se direcionarem aos tumores *in vivo*, atuarem como agentes de contraste para diagnóstico por imagem e na detecção de células cancerígenas circulantes (HULLA; SAHU; HAYES, 2015; KIM; RUTKA; CHAN, 2010).

2) As nanopartículas com efeitos imunossupressores podem ser utilizadas como agentes terapêuticos anti-inflamatórios ou para tratar as doenças autoimunes (GOMEZ-GALLEGO; URCUQUI-INCHIMA; HERNANDEZ, 2016; HULLA; SAHU; HAYES, 2015). O sistema imunológico é responsável por defender o corpo contra organismos patogênicos e outros agentes estranhos, como as nanopartículas, que podem ser reconhecidas por esse sistema, interagir com ele e modular sua função induzindo efeitos imunoestimuladores ou imunossupressores (GOMEZ-GALLEGO; URCUQUI-INCHIMA; HERNANDEZ, 2016).

2.3.1 Nanotecnologia na Odontologia

Nanomateriais também foram desenvolvidos para uma variedade de aplicações na Odontologia (KHURSHID *et al.*, 2015). A nanotecnologia oferece uma ampla gama de inovações e melhorias nas áreas de prevenção e tratamento das doenças bucais (LAINOVIĆ; BLAZIC; POTRAN, 2012).

O objetivo da Odontologia moderna é prevenir em vez de tratar as doenças bucais dependentes do biofilme. A nanotecnologia oferece novas abordagens para terapias preventivas em doenças bucais, particularmente cáries dentárias e doenças periodontais (ABOU NEEL *et al.*, 2015).

A cárie dentária é uma das doenças destrutivas mais prevalentes que afetam as estruturas dentárias. É causada por bactérias, presentes em agregados bacterianos unidos as superfícies dentárias na forma de biofilmes orais, que através da produção de ácidos levam a desmineralização das estruturas dentárias pela perda de cálcio e fósforo (ABOU NEEL *et al.*, 2015; GAO *et al.*, 2016). O controle da cárie dentária pode, portanto, ser obtido: 1) através da

inibição da ação bacteriana, 2) reversão do processo de desmineralização e 3) promoção da remineralização.

1) Na tentativa de inibir o crescimento bacteriano, várias nanopartículas têm sido incorporadas em materiais dentários. Morones *et al.* (2005) estudaram o efeito de nanopartículas de prata na faixa de 1-100 nm em bactérias gram-negativas, mostrando que as nanopartículas principalmente na faixa de 1-10 nm anexadas à superfície da membrana celular perturbam drasticamente sua permeabilidade e são capazes de penetrar dentro das bactérias, causando danos irreversíveis. Kasraei *et al.* (2014) mostraram que resinas compostas contendo 1% de nanopartículas de prata e óxido de zinco possuem propriedades antibacterianas em *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus*.

2) Na reversão do processo de desmineralização, nanopartículas estão sendo desenvolvidas para atuar como um veículo de entrega para liberação lenta e contínua de altas concentrações de íons de cálcio para os fluidos orais circundantes (saliva e placa dental) (ABOU NEEL *et al.*, 2015). Nakashima *et al.* (2009) utilizaram um dentifrício contendo nanopartículas de carbonato de cálcio para remineralizar lesões de esmalte incipientes e devido às suas propriedades únicas, as nanopartículas ficam retidas nas superfícies bucais liberando íons cálcio nos fluidos orais.

3) Uma vez que cálcio e fosfato são pré-requisitos para a remineralização, várias nanopartículas estão sendo incorporadas em materiais dentários para liberação de cálcio e fosfato (ABOU NEEL *et al.*, 2015). Xu; Weir e Sun (2009) desenvolveram um material composto a base de tetracálcio fosfato (TTCP) para ser resistente ao estresse e aumentar a liberação de íons cálcio e fosfato ao pH cariogênico.

Nanopartículas, como as nanopartículas de ouro, também são atrativas para a utilização em materiais dentários, devido a sua habilidade de inibir MMP-8 e MMP-9 mesmo em baixas concentrações, essa característica é importante pois a presença de metaloproteinases (MMPs) na interface adesiva de restaurações provoca a hidrólise de fibrinas de colágeno sendo a principal causa da degradação de materiais adesivos que pode levar a cáries secundárias (ABOU NEEL *et al.*, 2015).

Na doença periodontal, a nanotecnologia tem sido utilizada para remover continuamente os resíduos orgânicos, inibir o crescimento bacteriano e evitar o acúmulo de cálculos dentários (ABOU NEEL *et al.*, 2015).

Entre as possíveis aplicações na Odontologia, a nanotecnologia pode ser utilizada no tratamento de hipersensibilidade dentinária. Segundo Kanaparthi e Kanaparthi (2011) os

nanomateriais levariam a oclusão precisa e seletiva dos túbulos dentinários, utilizando materiais orgânicos locais, oferecendo aos pacientes um tratamento rápido e permanente.

Os benefícios potenciais da nanotecnologia são diversos. No entanto, devido à extensa exposição humana às nanopartículas, existe uma preocupação significativa com os potenciais riscos para a saúde e o meio ambiente (HULLA; SAHU; HAYES, 2015; LAINOVIĆ; BLAZIC; POTRAN, 2012). Essas preocupações levaram ao surgimento de disciplinas científicas adicionais, como a nanotoxicologia (HULLA; SAHU; HAYES, 2015).

2.4 NANOTOXICOLOGIA

A nanotoxicologia, importante emergente dentro da nanociência, se refere ao estudo da interação entre as nanoestruturas e os sistemas biológicos, com ênfase na elucidação da relação entre as propriedades físicas e químicas (tamanho, forma, modificação de superfície) das nanopartículas com a indução de respostas tóxicas biológicas (FORBE; GARCÍA; GONZALEZ, 2011; JIA *et al.*, 2017). No entanto, devido à falta de dados de toxicidade, o potencial das nanopartículas em afetar a saúde humana continua a ser uma preocupação importante (HULLA; SAHU; HAYES, 2015).

Embora em geral sejam bem descritos os efeitos benéficos da nanotecnologia, os efeitos potenciais toxicológicos e o impacto das nanopartículas receberam pouca atenção até o presente momento (WARHEIT *et al.*, 2008). Apesar dos conhecimentos científicos adquiridos nos últimos anos em nanotoxicologia, ainda não é possível antecipar com precisão o comportamento e a biocinética das nanopartículas (FORBE; GARCÍA; GONZALEZ, 2011).

O efeito toxicológico relatado das nanopartículas estão relacionados principalmente as propriedades de superfície (particularmente a carga da partícula) e a geração de radicais livres, resultantes das interações das partículas com as células (WARHEIT *et al.*, 2008).

2.5 NANOPARTÍCULAS DE OURO

O interesse no campo da nanotecnologia aumentou bastante na última década, com um foco particular nas nanopartículas de ouro (AuNPs). Essas partículas são tipicamente definidas como estruturas de ouro com dimensões menores que 100 nm (SCHUEMANN *et al.*, 2016). As nanopartículas de ouro atraem um enorme interesse científico e tecnológico devido à relativa facilidade de síntese, estabilidade química e propriedades únicas (ALKILANY; MURPHY, 2010).

2.5.1 Síntese e revestimento das nanopartículas de ouro

As nanopartículas de ouro em diferentes tamanhos são sintetizadas pela redução de sais de ouro na presença de agentes estabilizadores (GHOSH *et al.*, 2008). Um dos métodos mais comuns para a síntese de AuNPs baseia-se na redução e estabilização por citrato de sódio, denominado método de Turkevich. Através desta técnica os ânions de citrato reduzem os íons de ouro para átomos e estabilizam as AuNPs (PARK; SHUMAKER-PARRY, 2014).

A superfície dos nanomateriais podem ser revestidas com agentes estabilizadores, que previnem a agregação das partículas, ou com polímeros para melhorar a biocompatibilidade e interação com moléculas biológicas (KIM; RUTKA; CHAN, 2010). A utilização de agentes estabilizadores que previnem a agregação das nanopartículas tem por objetivo aumentar a biodisponibilidade das nanopartículas, para que as mesmas atravessem as membranas biológicas muito mais efetivamente (HITCHMAN *et al.*, 2013).

A aplicação de nanopartículas de ouro para fins terapêuticos ou de diagnóstico envolvem frequentemente a funcionalização dos nanomateriais com biomoléculas específicas, tais como peptídeos ou grupos químicos, para melhorar sua biocompatibilidade e atingir propósitos específicos, tais como entrega direcionada de fármacos ou ácidos nucleicos (JIA *et al.*, 2017).

Os esforços para aumentar a bioestabilidade das nanopartículas se centraram em grande parte no revestimento delas com uma camada de polietilenoglicol (PEG) para fornecer uma camada hidrofílica em torno das nanopartículas que dificulta a agregação e evita o reconhecimento pelos macrófagos como objetos estranhos (KHAN *et al.*, 2013; SCHUEMANN *et al.*, 2016). Entretanto, outras substâncias podem ser utilizadas.

A polivinilpirrolidona (PVP) é uma molécula flexível e altamente solúvel em água. Possui estrutura anfipática que permite que o PVP interaja com nanomateriais e altere suas propriedades superficiais. A polivinilpirrolidona é um polímero aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) amplamente utilizado em aplicações farmacêuticas, produtos pessoais e cosméticos. As AuNPs com PVP exibem estabilidade a longo prazo em PBS (maior de 3 meses), independentemente do seu tamanho e possuem ligação insignificante com proteínas do meio (HEO *et al.*, 2015).

Os tipos de moléculas dos reagentes, as temperaturas de reação e saturação do solvente utilizados durante a síntese irão determinar o tamanho e formato final das nanopartículas, que por sua vez interferem nas propriedades físicas dos nanomateriais

(KANAPARTHY; KANAPARTHY, 2011; KIM; RUTKA; CHAN, 2010; LANGILLE *et al.*, 2012).

2.5.2 Propriedades das nanopartículas de ouro

Os nanomateriais exibem propriedades estruturais e funcionais excepcionais (KWIZERA *et al.*, 2017). Em nanoescala, as propriedades físicas, químicas e biológicas diferem fundamentalmente e muitas vezes inesperadamente de seus correspondentes em volume (BHATTACHARYA; MUKHERJEE, 2008; KWIZERA *et al.*, 2017).

2.5.2.1 Propriedades físicas e químicas das nanopartículas de ouro

Aspectos como tamanho, formato e carga superficial das nanopartículas interferem nas suas propriedades funcionais, sendo determinantes importantes da concentração de nanopartículas intracelular. Entretanto, uma maior absorção das nanopartículas de ouro pelas células pode gerar maior citotoxicidade (JIA *et al.*, 2017).

Com relação ao tamanho, estudos demonstraram que existe um diâmetro ótimo na faixa de 10 a 50 nm que favorece a internalização das nanopartículas, mas o valor exato parece ser dependente do revestimento e da linhagem celular (SCHUEMANN *et al.*, 2016). O suposto mecanismo de dependência do tamanho para internalização é explicado através da necessidade de energia termodinâmica (elástica) para flexão da membrana celular e envolvimento das partículas menores durante a endocitose e a necessidade de receptores de transporte para auxiliar a endocitose de partículas maiores (GAO; SHI; FREUND, 2005).

O formato das partículas também influencia a quantidade de internalização de duas maneiras: 1) aumentando a área de superfície total disponível para anexar e interagir com as células e 2) alterando a curvatura local para ajustar os contornos das membranas celulares (SCHUEMANN *et al.*, 2016).

A carga de superfície das nanopartículas carregadas positivamente são mais facilmente transportadas para o interior das células por causa da interação eletrostática com a membrana celular carregada negativamente e, em seguida, resultam na ruptura das membranas celulares. Desta forma, as nanopartículas carregadas positivamente despolarizam a membrana na maior parte das vezes, enquanto que nanopartículas com cargas aniônicas possuem efeito insignificante, possuindo menor efeito citotóxico (JIA *et al.*, 2017).

As propriedades ópticas do ouro e muitas outras nanopartículas inorgânicas diferem significativamente das correspondentes aos materiais em escala macroscópica (BLAKEY; MERICAN; THURECHT, 2013). Enquanto o ouro é dourado, as nanopartículas de ouro podem apresentar tons de vermelho, azul, verde ou marrom, os quais podem ser controlados com o tamanho e a forma das nanopartículas (ALKILANY; MURPHY, 2010; BHATTACHARYA; MUKHERJEE, 2008). Essas cores surgem como resultado da interação dos elétrons das nanopartículas metálicas com o campo elétrico da luz incidente (ALKILANY; MURPHY, 2010).

As propriedades ópticas são derivadas da superfície de *plasmon* ressonante (SPR) das AuNPs, que corresponde a oscilação coletiva dos elétrons em ressonância com a frequência do campo elétrico incidente (BLAKEY; MERICAN; THURECHT, 2013; FERNANDEZ CABADA *et al.*, 2012). A frequência de ressonância é altamente dependente de uma série de fatores: constante dielétrica do meio, tamanho, forma, estrutura e composição da partícula (ALKILANY; MURPHY, 2010; FERNANDEZ CABADA *et al.*, 2012).

2.5.2.2 Propriedades biológicas das nanopartículas de ouro

Compostos de ouro apresentam uma importante ação anti-inflamatória, devido a sua capacidade de inibir a ativação do Fator Nuclear – κ B (NF- κ B) e conseqüentemente seus efeitos na inflamação (MA *et al.*, 2010).

Em células não estimuladas, o NF- κ B está localizado no citoplasma celular em interação com proteínas inibitórias chamadas I κ B (I κ B α e β) (BARNES; KARIN, 1997; JEON; BYUN; JUE, 2003). O NF- κ B é ativado em resposta a muitos sinais, incluindo citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 e TNF, LPS bacteriano, vírus, luz ultravioleta e agentes oxidantes (BARNES; KARIN, 1997).

Após a estimulação celular, ocorre a liberação do NF- κ B das proteínas I κ B, resultando na passagem do NF- κ B do citoplasma para o núcleo, onde se liga a sequências específicas nos genes alvo e regulam a sua transcrição. Desta forma, o fator de transcrição NF- κ B leva à expressão coordenada de muitos genes que codificam proteínas envolvidas na síntese de diversos mediadores da resposta inflamatória, como a produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β e TNF- α), colaborando para a amplificação e perpetuação da resposta inflamatória (BARNES; KARIN, 1997; KARIN, 1999).

Posteriormente, a translocação nuclear do NF- κ B foi identificada como sendo dependente da degradação induzida pela enzima I κ B quinase, liberando o NF- κ B das

proteínas inibitórias I κ B (KARIN, 1999). Os compostos de ouro demonstram inibição da ativação do NF- κ B ao bloquear a atividade da enzima I κ B quinase e conseqüentemente não possibilitando que o fator de transcrição NF- κ B migre para o núcleo celular (JEON; BYUN; JUE, 2003).

A atividade anti-inflamatória das nanopartículas de ouro também está associada com sua habilidade de interação extracelular com a interleucina-1 beta (IL-1 β). As moléculas de IL-1 β se agregam ao redor das AuNPs, reduzindo o número de moléculas disponíveis de IL-1 β para interagir com o receptor celular de interleucina, diminuindo então significativamente as propriedades inflamatórias dessa citocina (SUMBAYEV *et al.*, 2013).

As propriedades únicas das AuNPs podem ser aproveitadas para estratégias de aplicações biomédicas de diagnóstico e tratamento (BLAKEY; MERICAN; THURECHT, 2013).

2.5.3 Aplicações biológicas das nanopartículas de ouro

Entre os atuais biomateriais nanométricos desenvolvidos, as nanopartículas de ouro foram reconhecidas como materiais promissores para aplicações nas áreas de diagnóstico e tratamento de doenças, através de sistemas de carregamento de drogas, carregamento de biomoléculas e terapia hipertérmica (FERNANDEZ CABADA *et al.*, 2012).

Na área do diagnóstico, estudos com nanopartículas estão sendo realizados para auxiliar o diagnóstico de câncer bucal (KANAPARTHY; KANAPARTHY, 2011). O elemento ouro exibe uma forte absorção de raios-X e pode ser usado como um agente de contraste na forma de nanopartículas de ouro, atuando como um meio de diagnóstico por imagem (ABOU NEEL *et al.*, 2015).

As AuNPs também oferecem potencial de benefício terapêutico no tratamento do câncer em combinação com radiação ionizante (BUTTERWORTH *et al.*, 2012; FERNANDEZ CABADA *et al.*, 2012). Um desafio da radioterapia é que as doses elevadas de raios-X em condições terapêuticas danificam as células normais. Ao direcionar uma grande quantidade de nanopartículas de ouro em células cancerosas, após a irradiação de raios-X as AuNPs conduzem à formação de radicais livres que danificam o DNA de células cancerosas adjacentes, conseqüentemente a dose total de raios-X necessária para causar danos no DNA e morte celular pode ser reduzida (ZHANG *et al.*, 2015).

2.5.3.1 Carreamento de medicamentos

As terapias baseadas na aplicação e entrega de medicamentos ainda possuem muitos desafios. A membrana plasmática celular atua como um obstáculo à transferência dos medicamentos para o interior das células (PARK; TSUTSUMI; MIHARA, 2013). Outra desvantagem de terapias baseadas em fármacos, particularmente quando administrada por via oral ou intravenosa, é que o composto não se localiza no local alvo mas está amplamente disperso pelo organismo (PISSUWAN; VALENZUELA; CORTIE, 2006).

Recentemente muitos estudos têm sido realizados para o desenvolvimento de sistemas de carreamento de fármacos, que possuem aplicações promissoras (PARK; TSUTSUMI; MIHARA, 2013). Os sistemas de carreamento de medicamentos fornecem atributos positivos ao medicamento "livre", melhorando a solubilidade, farmacocinética, estabilidade e biodistribuição (GHOSH *et al.*, 2008).

A utilização das nanopartículas de ouro para o carreamento de drogas, têm sido pesquisado, devido a sua estabilidade, baixa toxicidade inerente, versatilidade funcional e liberação controlada do medicamento (KIM; GHOSH; ROTELLO, 2009). Desta forma, as nanopartículas podem tornar-se "reservatórios de fármacos" para liberação controlada e prolongada para manter o nível do medicamento dentro da janela terapêutica (GHOSH *et al.*, 2008). Além disso, as nanopartículas de ouro possuem alto índice de área de superfície por volume e, como resultado, possuem uma alta quantidade de sítios de ligação para fins de direcionamento às células alvo ou carreamento de drogas (KIM; GHOSH; ROTELLO, 2009).

Tanto o transporte como a liberação dos fármacos desempenham papéis críticos nos sistemas de carreamento efetivos (KIM; GHOSH; ROTELLO, 2009). Os tratamentos baseados em nanopartículas podem auxiliar a entrega do agente terapêutico de maneira passiva, através do aumento de permeabilidade dos tecidos alterados, ou ativa, através da ligação com um anticorpo ou outro composto com afinidade para o alvo desejado. Uma vez concentrada no local alvo, o agente terapêutico é liberado em resposta à estímulos internos ou externos (PISSUWAN; VALENZUELA; CORTIE, 2006).

2.5.3.2 Carreamento de biomoléculas

Uma compreensão crescente dos genes envolvidos em doenças genéticas deu origem a pesquisas sobre possíveis tratamentos. O uso prático desse conhecimento depende da capacidade de manipular e substituir os genes defeituosos ou inserir outros que codifiquem a

proteína correta (THOMAS; KLIBANOV, 2003). A "terapia genética" é um termo amplo que abrange qualquer estratégia para tratar ou controlar uma doença genética através da introdução de um gene exógeno, segmentos de genes ou oligonucleotídeos nas células afetadas (PISSUWAN; NIIDOME; CORTIE, 2011; THOMAS; KLIBANOV, 2003).

Um veículo de entrega (vetor), de origem viral ou não viral, deve ser utilizado para transportar o gene estranho para a célula alvo (THOMAS; KLIBANOV, 2003). Os vetores virais, apresentam vantagens, como a fácil integração do gene de interesse ao hospedeiro e a alta probabilidade de sua expressão a longo prazo, entretanto, sua utilização traz preocupações de segurança biológica. Os vetores não virais, embora menos eficientes na introdução e manutenção da expressão de genes estranhos, possuem vantagens por não serem patogênicos ou imunogênicos (PISSUWAN; NIIDOME; CORTIE, 2011; THOMAS; KLIBANOV, 2003).

Os veículos de entrega efetivos precisam fornecer proteção eficiente do ácido nucléico da degradação por nucleases, conectar-se à superfície da célula alvo, ser internalizado, escapar dos endossomos e liberar o ácido nucléico em sua forma funcional no núcleo para transcrição (THOMAS; KLIBANOV, 2003). O tamanho e a funcionalidade ajustáveis tornam as nanopartículas de ouro úteis para o reconhecimento eficiente e a entrega de biomoléculas (GHOSH *et al.*, 2008).

As nanopartículas de ouro são capazes de carrear grandes biomoléculas, sem se restringir apenas como carreadoras de pequenas moléculas (GHOSH *et al.*, 2008). As AuNPs mostraram sucesso na entrega de peptídeos, proteínas ou ácidos nucléicos, como DNA ou RNA, sendo candidatas atraentes para a entrega de genes (PISSUWAN; NIIDOME; CORTIE, 2011). Devido as suas propriedades, as nanopartículas de ouro fornecem uma alta relação área de superfície/volume, maximizando a sua capacidade como vetor (GHOSH *et al.*, 2008).

2.5.3.3 Terapia por foto-hipertermia

A aplicação local de calor é um conceito bem conhecido em medicina terapêutica que tem sido explorado extensivamente para o tratamento do câncer e outras condições (PISSUWAN; VALENZUELA; CORTIE, 2006). A hipertermia causa danos irreversíveis nas células por desnaturação de proteínas, o que afeta a estrutura da membrana celular. No entanto, o uso de fontes de aquecimento convencionalmente empregadas para hipertermia é limitado por causa do dano que causam aos tecidos saudáveis circundantes (FERNANDEZ CABADA *et al.*, 2012).

O efeito de ressonância de *plasmon* faz com que as nanopartículas de ouro absorvam fortemente a luz incidida convertendo a luz absorvida em calor, resultando em um aumento de temperatura altamente localizado, que é explorado nos vários usos terapêuticos térmicos propostos para as nanopartículas de ouro (PISSUWAN; VALENZUELA; CORTIE, 2006).

2.5.4 Aplicações microbiológicas das nanopartículas de ouro

A resistência bacteriana aos antibióticos disponíveis é um assunto de imenso interesse devido ao desenvolvimento de cepas resistentes (GRACE; PANDIAN, 2007; PISSUWAN *et al.*, 2010). Métodos aprimorados para identificar e tratar cepas bacterianas patogênicas rapidamente serão de enorme benefício para a saúde pública (PISSUWAN *et al.*, 2010).

As nanopartículas de ouro não só possuem um tamanho pequeno (aproximadamente 10^3 vezes menores do que uma bactéria), mas também fornecem uma aplicação versátil para uma variedade de tecnologias antibacterianas emergentes, nas quais as propriedades ópticas únicas, a estabilidade química e a capacidade das nanopartículas de ouro serem conjugadas com uma grande variedade de moléculas podem ser exploradas (GU *et al.*, 2003; PISSUWAN *et al.*, 2010).

As nanopartículas de ouro podem ser utilizadas para melhorar a sensibilidade e/ou a velocidade das técnicas para detectar ou diagnosticar bactérias, no carreamento de agentes antimicrobianos, em terapias fotodinâmicas e na terapia hipertérmica (PISSUWAN *et al.*, 2010).

2.5.4.1 Carreamento de agentes antimicrobianos

No contexto de possíveis aplicações terapêuticas, as nanopartículas de ouro estão sendo utilizadas na forma de conjugados com agentes antimicrobianos. Na maioria dos casos, essas interações resultaram em ação antimicrobiana melhorada quando comparados aos fármacos não conjugados. Os mecanismos subjacentes a essas melhorias não são completamente compreendidos, mas podem resultar da ligação e penetração dos conjugados AuNPs-antimicrobianos na célula alvo (PISSUWAN *et al.*, 2010).

Os principais argumentos para o uso de nanopartículas na entrega de agentes antimicrobianos são que a estabilidade, seletividade ou funcionalidade da molécula antimicrobiana é melhorada pela sua ligação à nanopartícula. O maior efeito antibacteriano dos conjugados de AuNPs foi atribuído à sua capacidade de se ligar e/ou penetrar na parede

celular e, ao fazê-lo, são capazes de fornecer um grande número de moléculas de antibiótico em um volume altamente localizado (PISSUWAN *et al.*, 2010).

Grace e Pandian (2007) avaliaram uma combinação de antibióticos e nanopartículas de ouro, os resultados mostraram uma eficiência antibacteriana profunda contra várias cepas de bactérias Gram positivas e Gram negativas como *S. aureus*, *M. luteus*, *E. Coli* e *P. aeruginosa*. Desta forma, o mecanismo de liberação dos antibióticos foi alterado (favoravelmente) pela presença das nanopartículas, para obter uma maior eficiência.

Saha *et al.* (2007) avaliaram a eficácia bactericida de nanopartículas de ouro conjugadas com ampicilina, estreptomicina e canamicina. As nanopartículas de ouro foram conjugadas com os antibióticos durante a síntese das nanopartículas. Neste estudo, os autores compararam a eficiência e estabilidade dos antibióticos conjugados em relação às suas formas livres *in vitro*. Os resultados indicaram que os antibióticos conjugados com AuNPs são mais eficientes e apresentaram maior estabilidade.

2.5.4.2 Melhoramento de terapias fotodinâmicas

A terapia fotodinâmica refere-se ao uso de agentes ativados pela luz para destruir organismos patogênicos. Usando essa abordagem, os agentes interagem com a luz e com moléculas de oxigênio do ambiente para produzir espécies reativas de oxigênio singlete, que por sua vez pode ser usado para destruir os microrganismos alvo por oxidação. No entanto, o oxigênio reativo pode causar danos não intencionais significativos a qualquer tecido saudável no caminho do feixe de luz. Além disso, a difusão dos agentes para regiões não visadas do corpo pode causar fototoxicidade sistêmica. As AuNPs foram consideradas como estabilizadores para fotossensibilizadores antimicrobianos (PISSUWAN *et al.*, 2010).

2.5.4.3 Destruição hipertérmica de bactérias

Uma vez que as nanopartículas de ouro se ligam ao seu alvo, a irradiação a laser pode então ser direcionada para a região localizada da infecção e em uma frequência, fluência e potência escolhida para fornecer danos mínimos ao tecido interveniente e excitação máxima da superfície de *plasmon* ressonante, resultando em aumento de temperatura altamente localizado (PISSUWAN *et al.*, 2010). Desta forma, quando as nanopartículas seletivamente ligadas as bactérias são irradiadas, elas absorvem energia, que é rapidamente transferida através de calor e eventualmente leva a danos irreparáveis à bactéria (ZHAROV *et al.*, 2006).

2.5.5 Biocompatibilidade das nanopartículas de ouro

O ouro é altamente não-reativo e quimicamente inerte por natureza, sendo considerado como não tóxico (JIA *et al.*, 2017). A promessa da utilização das nanopartículas de ouro para diferentes aplicações biológicas levou a um forte interesse em estudar seus possíveis efeitos deletérios nos sistemas biológicos (KHAN *et al.*, 2013). Embora a maioria das evidências sugira que as nanopartículas de ouro coloidais são quimicamente inertes *in vivo*, a questão não é definitivamente resolvida e requer estudo adicional (PISSUWAN; VALENZUELA; CORTIE, 2006).

O levantamento bibliográfico deste estudo foi realizado nas bases de dados *PubMed* e *ScienceDirect*, utilizando as seguintes palavras-chave: (((*Cells, Cultured*) OR *Cell Culture Techniques*)) AND ("*Gold nanoparticle*") AND ((*Metal Nanoparticles/toxicity*) OR *Gold Compounds/toxicity*). Foram selecionados os trabalhos que avaliaram o perfil citotóxico das nanopartículas que mais se adequaram ao tema deste estudo.

Bhamidipati e Fabris (2017) realizaram um estudo multiparamétrico *in vitro* para examinar a citotoxicidade e a absorção de nanopartículas de ouro. A citotoxicidade foi avaliada pela incubação das células com três tipos de morfologias diferentes de AuNPs (nanoesferas, nanobastões e nanoestrelas), cada uma com três revestimentos de superfície diferentes: brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB), polietilenoglicol (PEG) e albumina do soro humano (HSA). Os resultados mostraram que o revestimento de superfície das nanopartículas tiveram efeitos predominantes sobre a citotoxicidade. As partículas revestidas com CTAB foram as mais tóxicas para as células e as revestidas com PEG as menos tóxicas. A morfologia e o tamanho das nanopartículas apenas afetaram ligeiramente a viabilidade celular.

Lee *et al.* (2016) avaliaram a citotoxicidade *in vitro* de dois tamanhos de nanopartículas de ouro (5 e 100 nm). As células utilizadas foram células progenitoras neurais (NPCs) obtidas a partir da medula espinhal de um único feto humano de cinco semanas após um aborto eletivo. A viabilidade e o crescimento celular foram avaliados através do ensaio do MTT e por contagem das células após 18 horas de contato com as AuNPs. Os resultados indicaram que o grupo de AuNPs de 5 nm foi mais tóxico para as células do que o grupo de AuNPs de 100 nm, correlacionando a toxicidade das AuNPs com seu tamanho.

Leite *et al.* (2015) descrevem o impacto da interação de nanopartículas de ouro revestidas com polietilenoglicol (PEG) em células C2C12 de músculo esquelético sobre a

viabilidade celular, função mitocondrial, níveis de citocinas e susceptibilidade à apoptose. Os métodos para análise de citotoxicidade mostraram que as AuNPs revestidas com PEG não afetaram a viabilidade celular (MTT), mas os níveis intracelulares de ATP e o potencial da membrana mitocondrial aumentaram. De fato, a análise das citocinas revelou um aumento acentuado dos níveis de IFN- γ e TGF- β 1 após o tratamento, sugerindo que o processo de fenótipos inflamatórios foi ativado. No total, esses resultados apresentam evidências de que as AuNPs revestidas com PEG afetam a susceptibilidade à apoptose das células musculares.

De *et al.* (2014) avaliaram nanopartículas de ouro funcionalizadas por surfactantes não iônicos (Tween 20 e Tween 40) utilizados em formulações farmacêuticas. A citotoxicidade das nanopartículas de ouro em diferentes concentrações (0–10 μ M) foi avaliada em células de linhagem HeLa, através do teste de exclusão do Azul de Tripán. A morfologia celular foi analisada através de microscopia óptica, após contato direto das células com as nanopartículas. Os resultados indicaram que dentro da faixa de concentrações das AuNPs utilizadas não houve citotoxicidade. A exposição das células HeLa a diferentes concentrações das AuNPs durante 24 horas não ocasionou mudanças visíveis na morfologia das células.

Chuang *et al.* (2013) avaliaram os efeitos citotóxicos de três diferentes tamanhos de nanopartículas de ouro (10 nm \times 39 nm, 10 nm \times 41 nm, 10 nm \times 45 nm) através de ensaios *in vitro* tradicionais de viabilidade. As linhagens celulares utilizadas foram: AGS (células de adenocarcinoma gástrico humano), A549 (células de adenocarcinoma de pulmão humano), NIH-3T3 (fibroblasto embrionário de camundongo), PK-15 (células do rim de suínos), Vero (células do rim de macacos Africano) e MRC5 (tecido pulmonar humano normal). Entre as seis linhagens celulares utilizadas, as nanopartículas de ouro induziram uma supressão do crescimento celular dependente da dose com diferentes níveis de severidade e o efeito supressivo das nanopartículas de ouro foi indiretamente associado aos seus tamanhos e internalização celular. O tamanho das nanopartículas de ouro de 10 nm \times 41 nm, exibiu menor citotoxicidade em relação às células AGS em comparação com os outros dois tamanhos. Nas células NIH-3T3, as nanopartículas de ouro não causaram citotoxicidade imediata, mas induziram uma supressão dose dependente lenta e gradual do crescimento celular. Nas células Vero, as nanopartículas de ouro em concentrações de 180 ng/mL e acima induziram um efeito supressor relativamente rápido e sustentado no crescimento celular. Incubação das células A549, com nanopartículas de ouro de 10 nm \times 45 nm a uma concentração de 72 ng/mL significativamente atenuou o crescimento celular, enquanto as nanopartículas de ouro de 10 nm \times 39 nm tiveram menor efeito de supressão de crescimento

nas célula A549. Curiosamente, as nanopartículas de ouro de 10 nm × 41 nm produziram uma diminuição dose-dependente, gradual e estável da taxa de crescimento celular em todas as concentrações sem supressão total do crescimento celular, mesmo em concentrações tão altas quanto 720 ng/mL. Com altas concentrações de nanopartículas de ouro (360 e 720 ng / mL), a supressão do crescimento das células MRC-5 foi rápida e profunda.

Coradeghini *et al.* (2013) investigaram os efeitos das AuNPs *in vitro* em fibroblastos Balb/3T3. As células permaneceram em contato com as AuNPs estabilizadas por citrato de 5 e 15 nm durante 72 horas. Os resultados revelaram efeitos citotóxicos apenas para as AuNPs de 5 nm em concentrações maiores que 50 µM medido pela eficiência de formação de colônias e ensaio de exclusão do Azul de Tripán. Não foram encontrados efeitos citotóxicos nas células expostas as AuNPs de 15 nm. Embora as diferenças nos tamanhos das duas AuNPs testadas sejam muito pequenas, a resposta biológica geral foi significativamente diferente.

Das *et al.* (2012) avaliaram a toxicidade (*in vitro* e *in vivo*) de três AuNPs esféricas solúveis em água, com tamanho quase semelhante, entretanto as superfícies foram modificadas com três materiais de revestimento diferentes: ácido aspártico (GNPA), citrato trissódico dihidrato (GNPC) e albumina do soro bovino (GNPB). O tamanho médio das nanopartículas de GNPA, GNPC e GNPB foi de 15-20 nm. A citotoxicidade destas formulações de nanopartículas foi determinada *in vitro* em linhagem celular de fibroblastos humanos (MRC-5) e a toxicidade aguda foi realizada em modelo animal (camundongos). Todos as nanopartículas de ouro não foram tóxicas para as células MRC-5. O GNPC apresentou pequenas respostas hepatotóxicas e nefrotóxicas. A hepatotoxicidade também foi evidente para o tratamento com GNPA. Os resultados obtidos apontaram uma correlação entre o material de revestimento e a toxicidade das nanopartículas. O GNPB foi considerado o mais biocompatível entre as três AuNPs testadas.

Coulter *et al.* (2012) avaliaram a citotoxicidade de nanopartículas de ouro esféricas de 1,9 nm através do ensaio de MTT em células de câncer de próstata humano (DU145), células de câncer da mama (MDA-MB-231) e células epiteliais do pulmão (L132). Foram avaliadas várias concentrações de nanopartículas de ouro variando de 10 µg/mL a 2 mg/mL. Foi observada uma redução dose-dependente na viabilidade celular nas linhagens celulares DU145 e MDA-MB-231. As células L132 foram mais resistentes às nanopartículas de ouro de 1,9 nm.

Cho *et al.* (2009) realizaram um estudo de toxicidade *in vivo* usando nanopartículas de ouro de 13 nm de diâmetro revestidas com PEG. Os resultados mostraram que as

nanopartículas de ouro revestidas com PEG de 13 nm induziram inflamação aguda e apoptose no fígado. As nanopartículas foram observadas no fígado e no baço por até 7 dias após a injeção e possuem um longo tempo de circulação sanguínea, cerca de 30 horas. Além disso, a microscopia eletrônica de transmissão mostrou que numerosas vesículas citoplasmáticas e lisossomos em macrófagos no fígado e no baço continham as nanopartículas de ouro revestidas com PEG.

Com base no levantamento realizado, os principais fatores determinantes para modificar a biodistribuição, a toxicidade e a biocompatibilidade das nanopartículas de ouro incluem o tamanho, a forma, a carga e as modificações de superfície, que são dependentes do método de síntese utilizado (KHAN *et al.*, 2013). Atualmente, há poucos dados para determinar qual tipo de efeitos são esperados para cada tipo de nanopartícula, sendo necessário a realização de pesquisas adicionais (FORBE; GARCÍA; GONZALEZ, 2011).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial citotóxico, antimicrobiano e anti-inflamatório de nanopartículas de ouro.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Caracterizar as nanopartículas de ouro através de espectroscopia de absorção no ultravioleta–visível, microscopia eletrônica de varredura e potencial Zeta;
- II. Verificar o potencial citotóxico das nanopartículas de ouro, com e sem estabilização por polivinilpirrolidona, através de análises *in vitro* em cultura de células indiferenciadas da polpa dental humana;
- III. Verificar o efeito do tratamento com as nanopartículas de ouro na viabilidade celular através dos ensaios do *Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide* (MTT) e exclusão do Azul de Tripán;
- IV. Verificar o efeito do tratamento com as nanopartículas de ouro na morfologia celular através de microscopia óptica;
- V. Verificar o efeito do tratamento com as nanopartículas de ouro no potencial de reparo celular através dos ensaios de “*Scratch*” e quantificação de proteínas totais;
- VI. Analisar as propriedades antimicrobianas das nanopartículas de ouro através dos testes de difusão em ágar (disco e cavidade) e microdiluição em caldo;
- VII. Avaliar o efeito das nanopartículas de ouro na liberação do mediador inflamatório fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) em macrófagos J774 estimulados por lipopolissacarídeo (LPS).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO

As nanopartículas de ouro (AuNPs) foram sintetizadas na Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), em Ponta Grossa (Paraná), em colaboração com o Grupo de Fenômenos Fototérmicos em Fluidos Complexos do Departamento de Física da UEPG, adaptando o método de Turkevich descrito na literatura. Turkevich; Stevenson e Hillier (1951) foram os primeiros a sintetizar AuNPs no tamanho médio de 20 nanômetros (nm) através da redução do ácido tetracloroáurico com citrato de sódio.

O processo de síntese das nanopartículas foi realizado a partir da redução química do precursor metálico ácido tetracloroáurico (Sigma–Aldrich®, Missouri, EUA) com citrato de sódio dihidratado (Sigma–Aldrich®, Missouri, EUA). Inicialmente, 20 mL da solução de 1 mM de ácido tetracloroáurico (HAuCl_4) foram aquecidos até 90°C sob agitação constante. Posteriormente, 2 mL de uma solução de 0,5% em massa de citrato de sódio dihidratado ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) foram rapidamente adicionados e o sistema mantido à 90°C sob agitação constante. Depois de cinco minutos, a dispersão coloidal preparada apresentou coloração final vermelho rubi, como apresentado na Figura 01.

Figura 01 – Síntese das nanopartículas de ouro



Fonte: A autora.

Imediatamente após o término da síntese das nanopartículas de ouro reduzidas com citrato de sódio, a dispersão foi purificada através de centrifugação (13000 rpm por 15

minutos) e o *pellet* ressuspenso em água ultrapura no volume original, sendo desta forma obtida a dispersão de Au@CS utilizada nos testes.

Posteriormente, para o preparo da dispersão de nanopartículas de ouro estabilizadas com polivinilpirrolidona (Au@CS+PVP) foram adicionados em 10 mL da dispersão de Au@CS previamente preparada 0,5 gramas de polivinilpirrolidona ($C_6H_9NO_3$) 25 g/M. A dispersão final foi sonicada por 30 minutos.

Para garantir a esterilidade, as dispersões foram filtradas em filtros de seringa (Kasvi®, Curitiba, Brasil) descartáveis estéreis com membrana de 0,22 μm (tamanho dos poros).

4.2 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO

A determinação da concentração da dispersão de nanopartículas de ouro sintetizada foi obtida através da média do peso das Au@CS após o processo de purificação através de secagem em dessecador a vácuo. Primeiramente, obteve-se o peso de cada recipiente onde posteriormente foram adicionados 1 mL de Au@CS e estes mantidos em dessecador a vácuo para completa secagem do conteúdo. O peso dos recipientes foi subtraído do peso final da amostra. O processo foi realizado em triplicata. A concentração obtida para a dispersão de nanopartículas de ouro sintetizada foi de 1500 $\mu g/mL$.

4.3 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO

Após a síntese, as amostras foram encaminhadas para caracterização através de espectroscopia de absorção no ultravioleta–visível (UV–VIS), microscopia eletrônica de varredura (FEG–SEM) e potencial Zeta para confirmar se as nanopartículas sintetizadas apresentavam o formato esférico e o diâmetro médio de 20 nm como proposto pelo método de síntese.

4.3.1 Espectroscopia de absorção no ultravioleta–visível (UV–VIS)

Após a síntese, as dispersões de Au@CS e Au@CS+PVP foram caracterizadas empregando-se a técnica de espectroscopia de absorção no ultravioleta–visível, no Complexo de Laboratórios Multiusuários da Universidade Estadual de Ponta Grossa, através do equipamento espectrômetro, modelo Cary 50 (Varian®, Califórnia, EUA).

A espectroscopia de absorção UV–VIS é o método mais utilizado para caracterizar as propriedades ópticas das nanopartículas (PHILIP, 2008). O ouro em nanoescala pode apresentar variações de coloração (ALKILANY; MURPHY, 2010). As dispersões de nanopartículas de ouro esféricas têm uma cor vermelha distinta, que surge de suas pequenas dimensões (PHILIP, 2008).

A espectroscopia é utilizada para medir a quantidade de luz absorvida de um feixe de luz que passa através da amostra, em determinado intervalo de comprimento de onda. O comprimento de onda da máxima absorção da amostra pode ser relacionado ao diâmetro das nanopartículas de ouro através da literatura (PHILIP, 2008).

Para a espectroscopia de absorção UV–VIS, as dispersões de nanopartículas foram previamente sonicadas por 10 minutos e em seguida diluídas em água ultrapura (1:5), adicionando 3200 μL de água ultrapura em 800 μL das dispersões de nanopartículas. A caracterização foi realizada em temperatura ambiente utilizando uma cubeta de quartzo. Os comprimentos de onda selecionados para incidir na amostra foram de 400 – 800 nm. Os espectros eletrônicos das dispersões foram obtidos no dia da síntese e após dois meses, com o objetivo de revelar alterações no comprimento de onda da máxima absorção. Os comprimentos de onda da máxima absorção obtidos foram relacionados ao diâmetro das partículas através de comparação com a literatura.

4.3.2 Microscopia eletrônica (FEG–SEM)

Para caracterização morfológica das nanopartículas, foram obtidas imagens das dispersões de Au@CS e Au@CS+PVP por microscopia eletrônica de varredura com fonte de emissão de campo (FEG–SEM) com o microscópio modelo Mira 3 (Tescan®, Brno, República Checa). O teste de caracterização foi realizado no Complexo de Laboratórios Multiusuários da Universidade Estadual de Ponta Grossa (C–LABMU) a fim de verificar o formato e o tamanho médio das nanopartículas empregadas nos experimentos do presente estudo.

Os porta–amostras foram previamente limpos com acetona para remoção de impurezas e irregularidades. As dispersões de nanopartículas foram sonicadas por 10 minutos e em seguida transferidos 10 μL para cada porta–amostra. As amostras foram acondicionadas em estufa para secagem, onde foram mantidas cobertas para evitar deposição de resíduos nas suas superfícies. As amostras não foram submetidas ao processo de recobrimento com liga de ouro–paládio previamente às análises.

4.3.3 Potencial Zeta

O potencial Zeta mede o potencial efetivo em torno de uma partícula. Para obtenção do potencial Zeta, a amostra é colocada em uma câmara contendo dois eletrodos e um campo elétrico é aplicado, fazendo com que as nanopartículas carregadas migrem para o eletrodo correspondente com uma velocidade proporcional ao seu potencial Zeta (SMITH *et al.*, 2017). O valor do potencial Zeta de uma nanopartícula é um parâmetro útil para verificar a estabilidade da dispersão coloidal, sendo consideradas altamente estáveis as que apresentam valores superiores a +30 mV ou inferiores a -30 mV (BHATTACHARJEE, 2016). Os valores de referência do potencial Zeta podem ser observados na Tabela 01.

Tabela 01 – Valores de referência para o potencial Zeta

Valores de potencial Zeta (mV)	Grau de estabilidade
0 – 10	Altamente instáveis
0 – -10	Altamente instáveis
10 – 20	Relativamente estáveis
-10 – -20	Relativamente estáveis
20 – 30	Moderadamente estáveis
-20 – -30	Moderadamente estáveis
> 30 mV	Altamente estáveis
< -30 mV	Altamente estáveis

Fonte: Adaptado de BHATTACHARJEE, Sourav. DLS and zeta potential: What they are and what they are not? **Journal of Controlled Release**, v. 235, n. 1, p. 337–351, 2016.

Os valores de potencial Zeta para as nanopartículas nas dispersões coloidais foram obtidos no equipamento Zetasizer Nanoseries ZS90 (Malvern Instruments®, Malvern, Reino Unido) no Complexo de Laboratórios Multiusuários da Universidade Estadual de Ponta Grossa, a fim de verificar a estabilidade e carga elétrica de superfície das nanopartículas empregadas nos experimentos do presente estudo. Para a realização das análises, as Au@CS e Au@CS+PVP foram previamente sonicadas por 10 minutos e 800 µL das dispersões foram diluídos em 3200 µL de água ultrapura.

4.4 AVALIAÇÃO DO PERFIL CITOTÓXICO

A avaliação do perfil citotóxico das nanopartículas de ouro foi realizado em modelo de cultura celular proveniente da polpa dental humana, visando a possível aplicação das

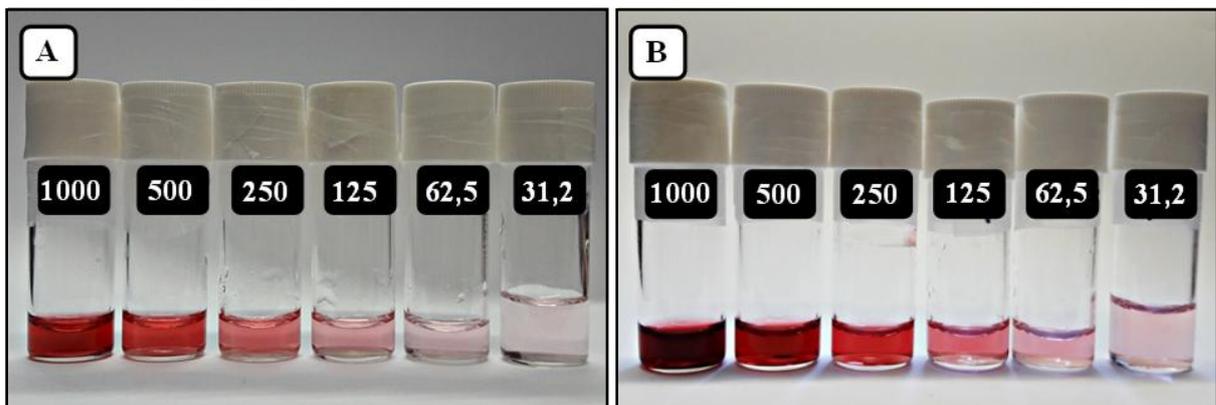
AuNPs como material de proteção do complexo dentino–pulpar devido às suas propriedades anti–inflamatórias.

Para verificar o efeito das Au@CS e Au@CS+PVP na viabilidade celular, foram realizados os testes do brometo de 3–(4,5 dimetiliazol–2–il)–2,5–difeniltetrazólio (MTT) e exclusão do Azul de Tripán. Para verificar os efeitos na morfologia celular, foram realizadas análises em microscópio óptico invertido. Para analisar os efeitos sobre o potencial de reparo celular, foram analisadas a proliferação e migração celular, através do ensaio de “*Scratch*” e ativação celular, através do ensaio de quantificação de proteínas totais.

4.4.1 Grupos experimentais

As concentrações de nanopartículas de ouro (Au@CS e Au@CS+PVP) utilizadas nos testes foram preparadas através de diluições seriadas em água destilada estéril. Devido ao fato dos tratamentos serem diluídos pelo meio de cultivo na realização dos ensaios, todos os tratamentos foram preparados dez vezes mais concentrados, conforme apresentado na Figura 02. Após a aplicação dos tratamentos nos poços, as concentrações finais de nanopartículas de ouro testadas foram: 100; 50; 25; 12,5; 6,25 e 3,12 $\mu\text{g/mL}$. Previamente à realização de todas as análises, as Au@CS e Au@CS+PVP foram sonicadas por 10 minutos.

Figura 02 – Diluição seriada das dispersões de nanopartículas de ouro



Fonte: A autora.

Notas: Concentrações de 1000; 500; 205; 125; 62,5 e 31,2 $\mu\text{g/mL}$. Em (A) dispersões de nanopartículas de ouro sem PVP (Au@CS). Em (B) dispersões de nanopartículas de ouro estabilizadas por PVP (Au@CS+PVP).

Células que receberam apenas meio de cultivo DMEM a 1% SFB, sem nenhum tratamento, foram utilizadas como controle negativo de citotoxicidade (CN). Além das

nanopartículas de ouro em diferentes concentrações, foram testados o citrato de sódio (agente redutor das Au@CS) na concentração final de 10 mg/mL e polivinilpirrolidona – PVP (agente estabilizante das Au@CS+PVP) na concentração final de 50 mg/mL, ambas as concentrações utilizadas na síntese e revestimento das nanopartículas. Os grupos experimentais são apresentados na Tabela 02.

Tabela 02 – Grupos experimentais para os testes em cultura de células

Grupos	Concentrações finais dos tratamentos	Citotoxicidade
Au@CS	100; 50; 25; 12,5; 6,25 e 3,12 µg/mL	Em estudo
Au@CS+PVP	100; 50; 25; 12,5; 6,25 e 3,12 µg/mL	Em estudo
Citrato	Agente redutor – 10 mg/mL	Em estudo
PVP	Agente estabilizante – 50 mg/mL	Em estudo
CN	Apenas DMEM	Negativa

Fonte: A autora.

4.4.2 Obtenção da cultura celular

O processo de coleta dos dentes e a obtenção do cultivo celular seguiram protocolos descritos anteriormente na literatura com pequenas modificações (HUANG *et al.*, 2006; PATEL *et al.*, 2003).

Foram utilizados vinte dentes humanos, terceiros molares superiores, com raízes completamente formadas, extraídos sem odontossecção. Todos os dentes estavam sem lesões cariosas ou restaurações. Os dentes foram extraídos, durante as clínicas da disciplina de Cirurgia II da UEPG, por indicação terapêutica (não vinculada com esta pesquisa). Os pacientes foram esclarecidos sobre os objetivos do presente estudo e assinaram um Termo de Doação de Dentes para a Pesquisa (ANEXO A).

Imediatamente após a exodontia, cada dente foi lavado com solução de gluconato de clorexidina a 0,12% e acondicionado individualmente em um tubo tipo Falcon de 50 mL (Kasvi®, Curitiba, Brasil), contendo 10 mL de meio de transporte composto por 3% de Penicilina 10000 U/mL e Estreptomicina 10000 µg/mL (Gibco®, Maryland, EUA) e 97% de tampão fosfato-salino (PBS – Ensure®, Darmstadt, Alemanha). Em seguida, os dentes foram transportados para o laboratório de cultivo celular da UEPG.

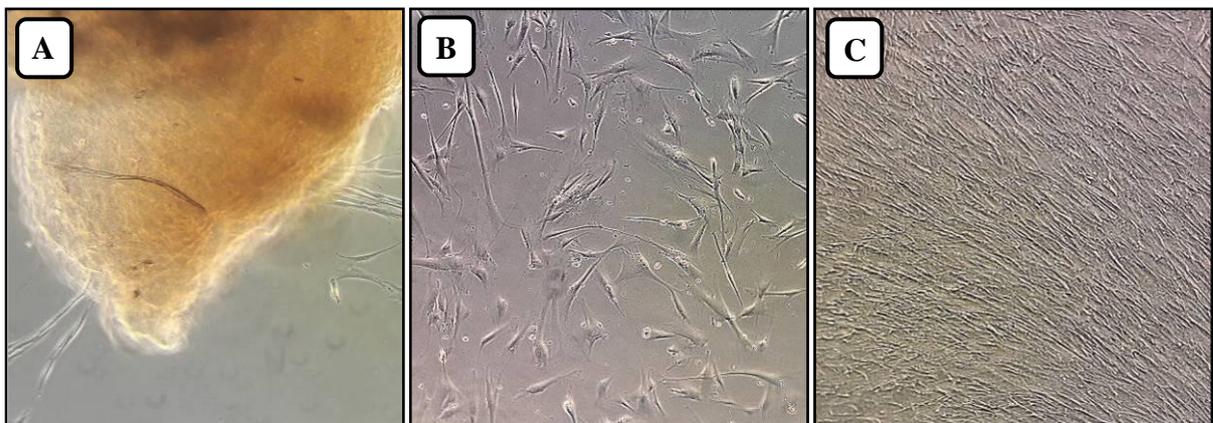
O material pulpar foi obtido imediatamente após a exodontia. Cada dente foi retirado do tubo tipo Falcon e sua superfície externa raspada com curetas periodontais estéreis. Em

seguida, os dentes foram submetidos à imersão parcial em solução de gluconato de clorexidina 0,12% por cinco minutos de modo a evitar o contato da solução antisséptica com a porção apical da raiz. Os dentes foram enrolados em gaze e quebrados utilizando um utensílio metálico previamente esterilizado.

Todos os procedimentos seguintes e ensaios foram realizados em fluxo laminar, sob condições estéreis. O material pulpar foi então removido com o auxílio de uma pinça e utilizando uma seringa descartável, a polpa foi lavada com PBS para remover fragmentos de dentina. O tecido pulpar foi cortado em pequenos fragmentos (1–2 mm) utilizando uma tesoura, para desagregação mecânica das células. Os fragmentos foram colocados em garrafas de cultivo celular de 25 cm² (Kasvi®, Curitiba, Brasil) com meio de cultura Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM – Sigma-Aldrich®, Missouri, EUA) suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB – Gibco®, Maryland, EUA). Foram realizados movimentos leves para espalhar os fragmentos nas garrafas e estas mantidas em posição vertical por 10 minutos. Posteriormente, as garrafas foram armazenadas em incubadora a 37°C e 5% de CO₂ (MCO – 19AIC, Sanyo®, Osaka, Japão).

Aproximadamente após 15 dias dos tecidos pulpares em cultivo, foram observadas as primeiras células ao redor dos fragmentos. Com aproximadamente 30 dias, as células atingiam 70% de confluência e, em média, com 45 dias atingiam 100% de confluência, como apresentado na Figura 03. Os tecidos pulpares que não apresentaram células após 15 dias em cultura ou que contaminaram foram descartados. Uma vez observado o crescimento celular ao redor dos fragmentos de tecidos, em microscópio óptico invertido, estes foram removidos.

Figura 03 – Proliferação celular no decorrer do tempo



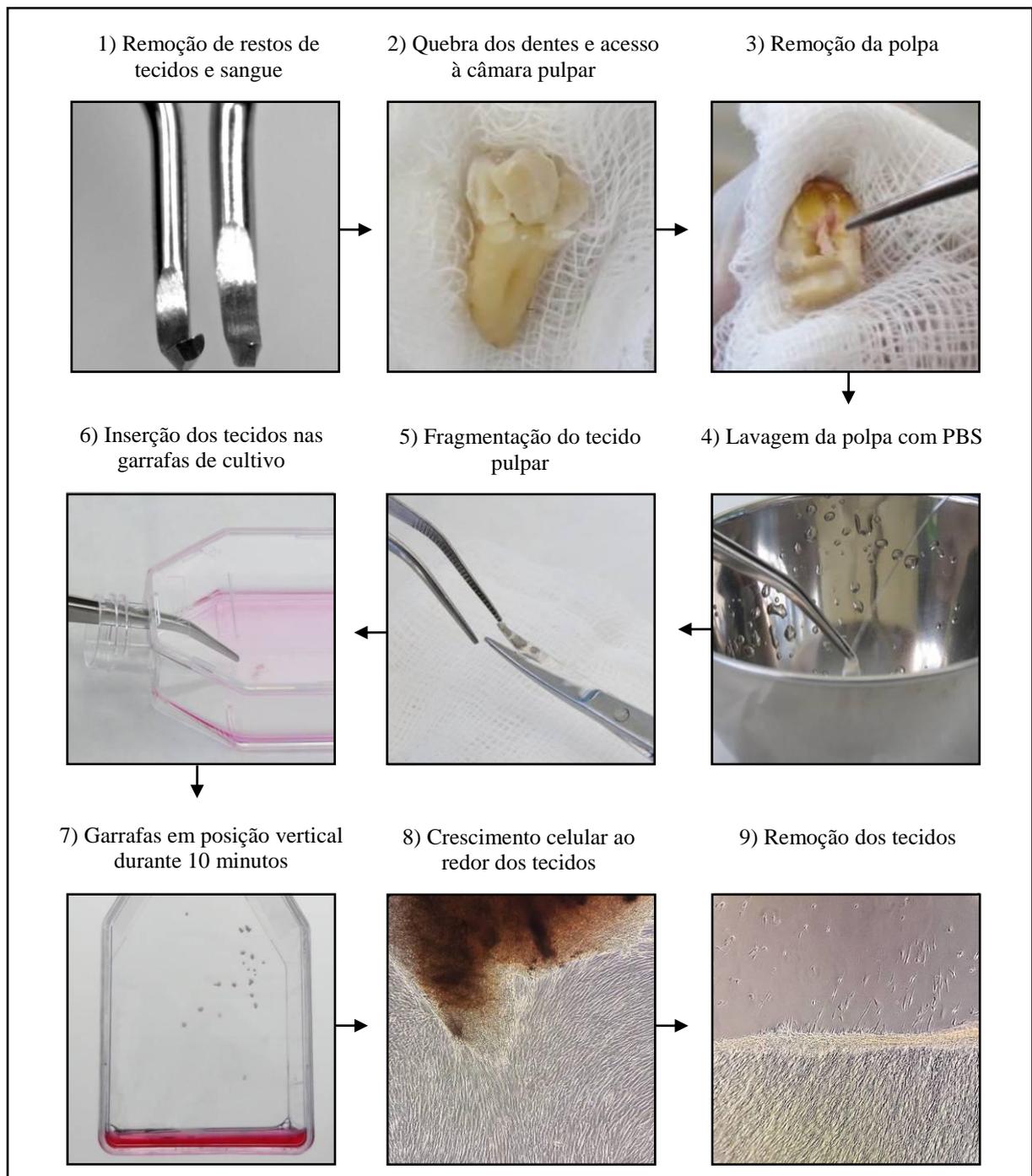
Fonte: A autora.

Notas: Em (A) material pulpar em cultivo por 15 dias. (B) Células em cultivo por 30 dias. (C) Células em cultivo por 45 dias. Aumento de 100×.

As células cultivadas apresentaram características morfológicas semelhantes às de linhagens de fibroblastos em cultura. Entretanto, nenhum teste foi realizado com o intuito de identificá-las, sendo assim, elas foram denominadas como células indiferenciadas da polpa dental humana.

O processo de obtenção da cultura celular é apresentado na Figura 04.

Figura 04 – Representação esquemática da obtenção da cultura celular



Fonte: A autora.

4.4.3 Cultivo de células indiferenciadas da polpa dental humana

4.4.3.1 Troca do meio de cultivo

As células indiferenciadas da polpa dental humana foram cultivadas em meio de cultura DMEM suplementado com 20% de SFB e 1% de Penicilina (10000 U/mL)/Estreptomicina (10000 µg/mL) em garrafas de cultivo celular de 25cm² ou 75cm² (conforme o aumento do número de células), mantidas em incubadora a 37°C e 5% de CO₂.

Para realizar a troca do meio de cultivo, o meio antigo foi descartado e as garrafas lavadas com 5 ou 10 mL de PBS estéril (conforme a garrafa de cultivo utilizada), seguido por descarte do mesmo e adição de novo meio (5 ou 10 mL). O meio de cultivo foi trocado a cada três dias.

4.4.3.2 Passagem celular

Assim que as células atingiam 70% de confluência nas garrafas de cultivo, foram realizadas passagens para o subcultivo (expansão celular). Para realizar as passagens, as garrafas de cultivo foram lavadas com solução de PBS estéril, seguido por descarte do mesmo. Foram então adicionados 2 ou 5 mL de tripsina 0,5% – EDTA 0,02% (Sigma-Aldrich®, Missouri, EUA), conforme a garrafa de cultivo utilizada, para o desprendimento das células. As garrafas foram então incubadas durante 5 minutos a 37°C e 5% de CO₂. Após este período, as garrafas foram levadas ao microscópio óptico invertido, modelo AxioVert (ZEISS®, Oberkochen, Alemanha), com o objetivo de observar a desagregação celular, na qual as células perdem seus prolongamentos e adesão, apresentando formato arredondado. Após as células desaderirem do fundo das garrafas, foi adicionado igual volume de DMEM a 20% de SFB para inativar a tripsina. As células foram então centrifugadas a 1200 rpm por 10 minutos em tubos tipo Falcon de 15 mL (Kasvi®, Curitiba, Brasil), o sobrenadante descartado, o *pellet* de células formado ressuspendido em 1 mL de meio DMEM a 20% de SFB e transferido para garrafas de cultura de 75 cm² (Kasvi®, Curitiba, Brasil). Para a realização dos testes, foram utilizadas células entre a 2^a e 4^a passagem.

4.4.3.3 Congelamento celular

As células que não foram utilizadas para os experimentos foram congeladas em tubos criogênicos (Kasvi®, Curitiba, Brasil) e armazenadas a -80°C para experimentos futuros. Para

o congelamento, as garrafas foram lavadas com PBS, as células desaderidas por ação da tripsina e centrifugadas a 1200 rpm por 10 min. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* celular ressuspendido em 1 mL de DMEM a 40% de SFB e 10% de dimetilsulfóxido (DMSO – crioprotetor). O processo de congelamento foi realizado de maneira lenta, primeiramente armazenando os criotubos a -20°C por 2 horas e então estes foram transferidos para o freezer -80°C.

4.4.3.4 Descongelamento celular

O processo de descongelamento foi realizado de forma rápida. Os tubos criogênicos foram removidos do freezer -80°C e imediatamente colocados em água a 37°C. As células foram então transferidas para tubos tipo Falcon com 4 mL de DMEM e centrifugadas para remoção do DMSO do meio. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* celular ressuspendido e transferido para garrafas de cultivo contendo DMEM a 20% de SFB.

4.4.3.5 Quantificação celular

Ao início de cada experimento, foi realizada a contagem das células em câmara hemocitométrica de Neubauer em microscópio óptico invertido, para ajuste da quantidade de células por poço. Para o procedimento de quantificação, após as células desaderirem da garrafa (tripsina – EDTA), a suspensão celular foi centrifugada (1200 rpm por 10 minutos), o sobrenadante descartado e o *pellet* celular ressuspendido em 1 mL de DMEM a 1% de SFB. Em seguida, uma alíquota de 10 µL da suspensão celular foi adicionada em 10 µL da solução de Azul de Tripán 0,4% em PBS (fator de diluição 2). Dependendo da quantidade de células necessárias para cada experimento, o fator de diluição foi alterado. Após 5 minutos, 10 µL dessa suspensão foram transferidos para a câmara de Neubauer onde foi realizada a contagem das células nos cinco quadrantes. Em seguida, a quantificação do número de células presentes na suspensão de 1 mL foi obtida aplicando a fórmula:

$$\text{Quantidade de células/mL} = n \times \text{Fator de diluição} \times 10^4 \quad (1)$$

Onde *n* corresponde à média do número de células contadas nos cinco quadrantes da câmara de Neubauer. A partir desta suspensão, foi ajustada a proporção de células necessárias para cada teste (1×10^4 ou 1×10^5 células/poço).

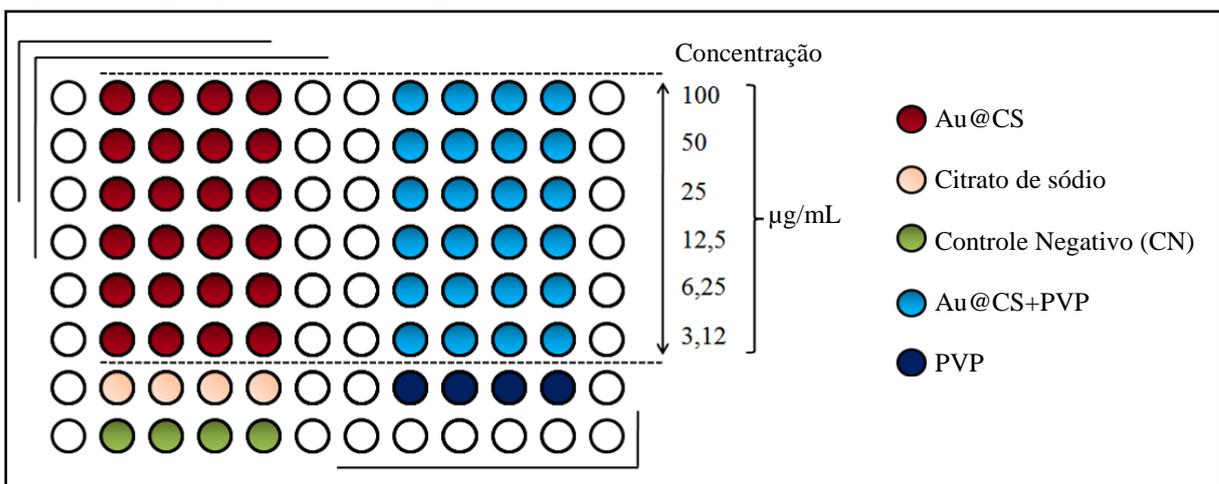
4.4.4 Avaliação do efeito das nanopartículas de ouro na viabilidade celular

A viabilidade celular foi avaliada pelos métodos do MTT e exclusão do Azul de Tripán para determinação da citotoxicidade das nanopartículas de ouro em diferentes concentrações. Os testes de viabilidade celular realizados estão de acordo com as normas do documento ISO 10993-5 (2009).

Para os experimentos de viabilidade celular, as células indiferenciadas da polpa dental humana foram plaqueadas em placas de 96 poços (Kasvi®, Curitiba, Brasil) na concentração de 1×10^4 células/poço com meio DMEM suplementado com 1% de SFB. As placas foram mantidas durante 48 horas em incubadora a 37°C e 5% de CO₂.

Após incubação das placas para fixação das células nos poços e formação de uma monocamada semi-confluyente, o meio de cultivo foi removido e os tratamentos aplicados (conforme os grupos experimentais descritos no item 4.4.1) em quadruplicata, como apresentado na Figura 05. Foram aplicados 20 µL de cada tratamento em 180 µL de DMEM a 1% de SFB por poço, com exceção do grupo CN onde foram adicionados 180 µL de meio DMEM a 1% de SFB e 20 µL de água destilada estéril. Após os períodos de 24 e 48 horas do tratamento em contato direto com as células, em incubadora a 37°C e 5% de CO₂, as análises foram realizadas.

Figura 05 – Aplicação dos tratamentos para os testes de viabilidade



Fonte: A autora.

Notas: Esquema da placa de 96 poços. Os poços representados na cor vermelha e azul-claro correspondem, respectivamente, aos grupos Au@CS e Au@CS+PVP nas concentrações de 100; 50; 25; 12,5; 6,25 e 3,12 µg/mL. Os poços em cor-de-rosa correspondem ao grupo Citrato (células expostas a citrato de sódio na concentração de 10 mg/mL). Os poços em azul-escuro correspondem ao grupo PVP (células expostas a polivinilpirrolidona na concentração de 50 mg/mL). Os poços em verde correspondem ao grupo Controle Negativo (apenas contêm meio DMEM + 1×10^4 células/poço).

4.4.4.1 Ensaio do *Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide* (MTT)

O efeito das nanopartículas de ouro na viabilidade de células indiferenciadas da polpa dental humana foi avaliado através do ensaio do *Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide* (MTT).

O ensaio do MTT é baseado na medida da viabilidade das células através da atividade enzimática. Trata-se de um método colorimétrico que verifica a atividade da enzima desidrogenase mitocondrial, presente em células viáveis, em reduzir o corante brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio produzindo cristais de formazan insolúveis em água, passando da coloração amarela para púrpura. Ao adicionar o agente solubilizante (dimetilsulfóxido ou etanol), ocorre a ruptura das membranas celulares liberando o formazan para análise através de espectrofotometria (570 nm). Desta forma, a quantidade de formazan produzida é proporcional ao número de células viáveis em cultura (MOSMANN, 1983).

O ensaio foi realizado após 24 e 48 horas de contato direto dos tratamentos com as células. Após o período determinado, o sobrenadante dos poços foi removido, os poços foram lavados com PBS (200 µL) e 200 µL da solução de MTT (Sigma-Aldrich®, Missouri, EUA) a 0,5 mg/mL foram aplicados. As placas foram mantidas por 3 horas em incubadora a 37°C e 5% de CO₂. Em seguida, o conteúdo da placa foi descartado invertendo-a e foram adicionados 200 µL de DMSO (Sigma-Aldrich®, Missouri, EUA) em cada poço. A placa foi mantida em agitador de placas por 10 minutos, o conteúdo de cada poço transferido para uma nova placa de 96 poços e a leitura da absorvância realizada por espectroscopia em leitora de microplacas (BioTek®, Vermont, EUA) no comprimento de onda de 570 nm. Os experimentos foram repetidos 2 vezes (tempos independentes) e realizados em quadruplicata.

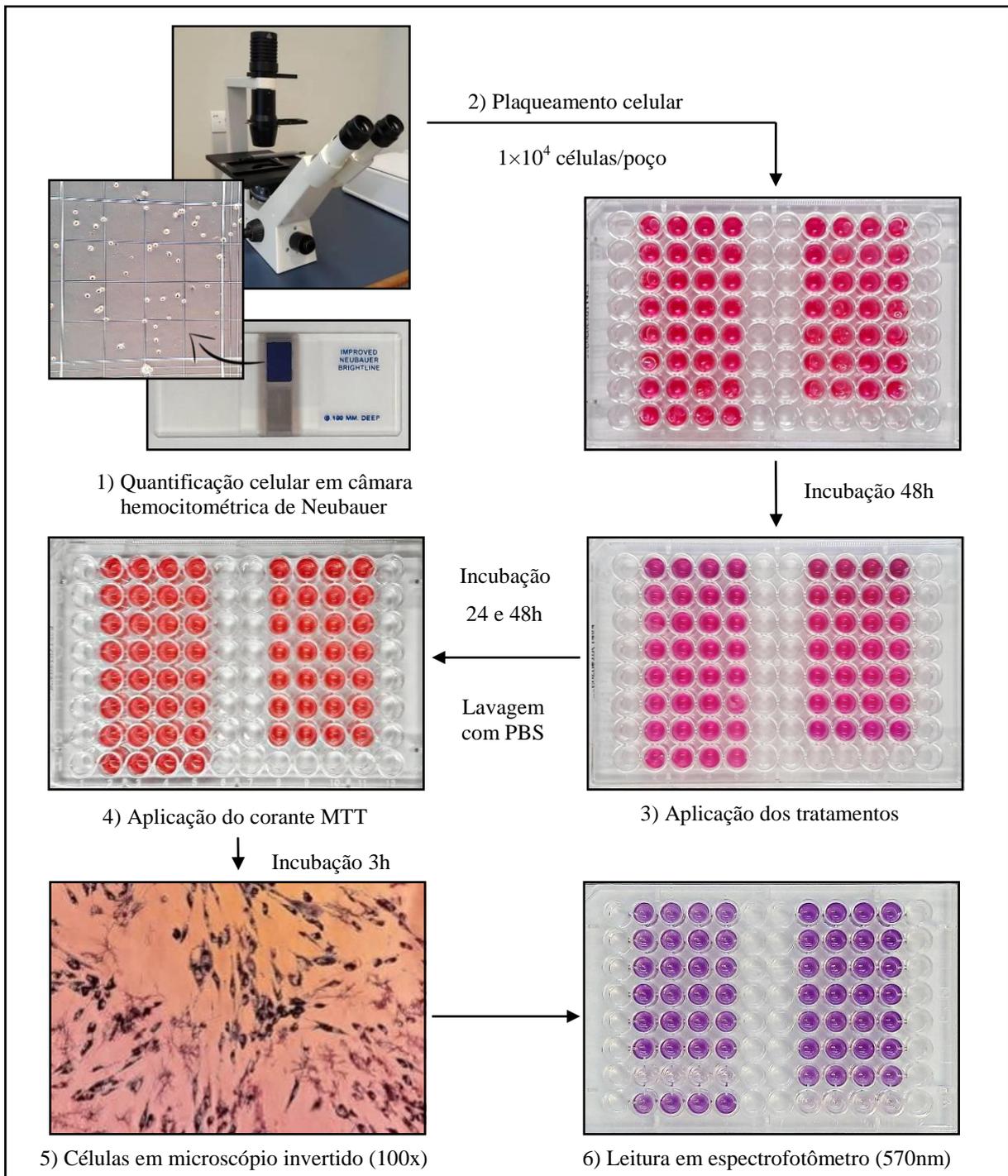
A redução do número de células vivas tem como resultado a diminuição da quantidade de formazan produzida observada pela densidade óptica em 570 nm. Para calcular a redução da viabilidade celular em comparação com o controle (CN – células que recebem apenas DMEM a 1% de SFB), a seguinte fórmula foi utilizada:

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = \frac{100 \times \text{OD}_{570}}{\text{OD}_{570\text{CN}}} \quad (2)$$

Onde **OD₅₇₀** são os valores de densidade óptica obtidos para cada grupo testado e **OD_{570CN}** é a média dos valores de densidade óptica obtidos para o grupo controle (CN).

Quanto mais baixo o valor de viabilidade (%), maior o potencial citotóxico do tratamento. As etapas do ensaio colorimétrico do MTT podem ser visualizadas na Figura 06.

Figura 06 – Representação esquemática do ensaio do MTT



Fonte: A autora.

4.4.4.2 Ensaio de exclusão do Azul de Tripan

O efeito das nanopartículas de ouro na viabilidade de células indiferenciadas da polpa dental humana foi avaliado através do ensaio de exclusão do Azul de Tripan. Esse método baseia-se na observação de que células viáveis são impermeáveis ao referido corante, ao passo que as células não viáveis apresentam permeabilidade, sendo coradas em azul.

O ensaio foi realizado após 24 e 48 horas de contato direto dos tratamentos com as células. Após o período determinado, o meio foi removido dos poços, sendo estes lavados com PBS (200 µL). As células foram desaderidas dos poços com a aplicação de 100 µL de solução de tripsina – EDTA (0,5% – 0,02%) por 5 minutos, seguido da adição de igual volume de DMEM a 20% de SFB para inativação da tripsina. Uma alíquota de 10 µL de cada poço foi adicionada a 10 µL do corante Azul de Tripan a 0,4%. A solução foi homogeneizada (5 minutos) e 10 µL transferidos para a câmara hemocitométrica de Neubauer para contagem celular através de visualização em microscópio óptico invertido, modelo AxioVert (ZEISS®, Oberkochen, Alemanha).

A contagem das células foi realizada em quatro quadrantes diferentes da câmara de Neubauer e a média de células viáveis e mortas foi obtida para cada poço. As formas viáveis permaneceram translúcidas devido a integridade da membrana celular que impede a penetração do corante, e as células inviáveis foram coradas em azul pela penetração do corante através da membrana celular danificada.

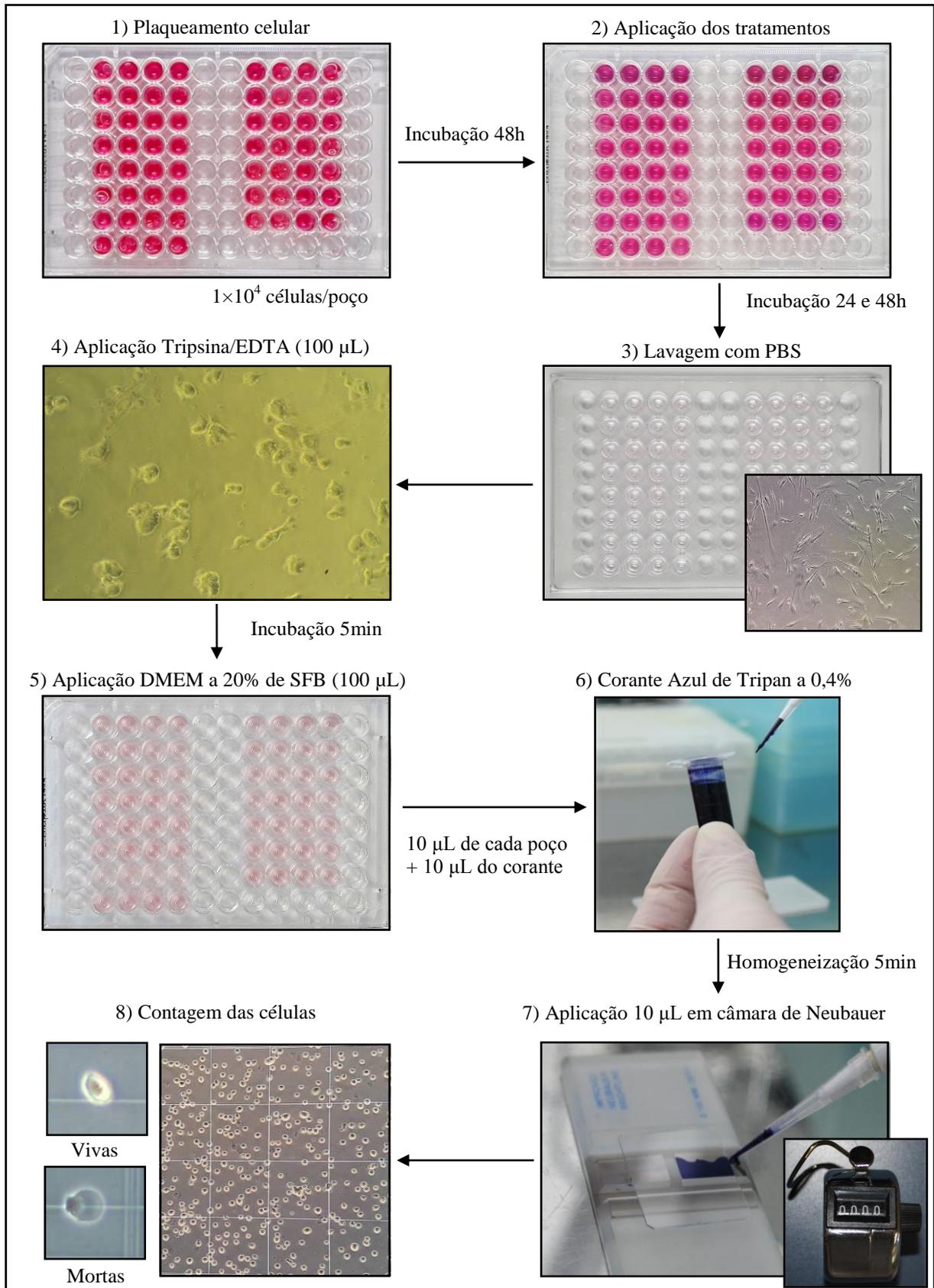
Para o cálculo da viabilidade celular (%), a seguinte fórmula foi aplicada a cada poço contado:

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de células viáveis (média dos quadrantes)} \times 100}{\text{total de células contadas (média dos quadrantes)}} \quad (3)$$

Os dados obtidos foram expressos como porcentagem do total de células viáveis em comparação ao grupo controle (CN) que não recebeu qualquer tipo de tratamento, sendo considerada nesses poços como 100% de viabilidade celular.

Os experimentos foram repetidos 2 vezes (tempos independentes) e realizados em quadruplicata. As etapas representativas do ensaio de exclusão do corante Azul de Tripan podem ser visualizadas na Figura 07.

Figura 07 – Representação esquemática do ensaio do Azul de Tripán



Fonte: A autora.

4.4.5 Avaliação do efeito das nanopartículas de ouro na morfologia celular

O efeito das nanopartículas de ouro na morfologia das células indiferenciadas da polpa dental humana foi analisado através da captura de imagens em microscópio óptico invertido (microscopia óptica de campo claro).

As nanopartículas de ouro, sem e com estabilização por polivinilpirrolidona (Au@CS e Au@CS+PVP), foram analisadas nas concentrações finais de 100; 50; 25; 12,5; 6,25 e 3,12 $\mu\text{g/mL}$. Células que receberam apenas meio de cultivo DMEM a 1% SFB, sem nenhum tratamento, foram utilizadas como padrão morfológico de normalidade. Além das nanopartículas de ouro em diferentes concentrações, foram analisados o efeito do citrato de sódio (agente redutor das Au@CS) na concentração final de 10 mg/mL e do PVP (agente estabilizante das Au@CS+PVP) na concentração final de 50 mg/mL , ambas concentrações utilizadas na síntese e revestimento das nanopartículas (conforme os grupos experimentais descritos no item 4.4.1). Após os períodos de 24 e 48 horas dos tratamentos em contato direto com as células, em incubadora a 37°C e 5% de CO_2 , as análises foram realizadas.

Para a realização da análise morfológica em microscópio óptico invertido, as células indiferenciadas da polpa dental humana foram contadas em câmara de Neubauer e plaqueadas na proporção de 1×10^4 células/poço em placas de 96 poços com DMEM a 1% de SFB. Após incubação das placas por 48 horas, o meio de cultivo DMEM foi removido e 20 μL dos tratamentos foram aplicados em 180 μL de DMEM a 1% SFB.

Após a incubação das células em contato direto com os tratamentos pelo período determinado (24 e 48 horas), foram realizadas as capturas de imagens em microscópio óptico invertido (aumento de 200 \times), modelo AxioVert (ZEISS®, Oberkochen, Alemanha), acoplado com uma câmera digital. As imagens foram capturadas nas áreas centrais de cada poço. Os experimentos foram repetidos 2 vezes (tempos independentes) e realizados em quadruplicata.

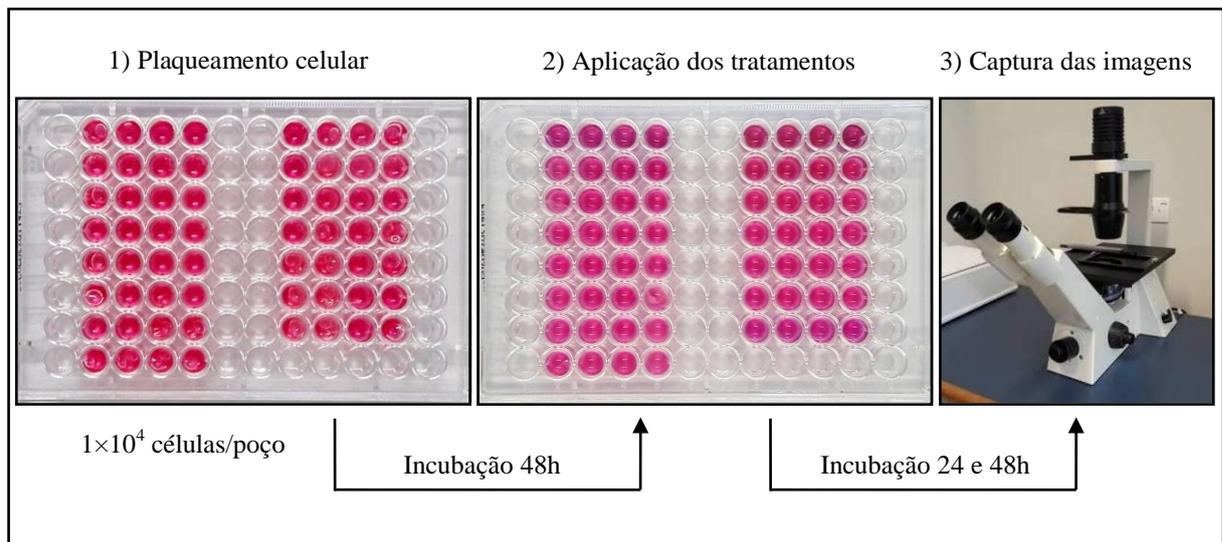
As células foram analisadas através de parâmetros qualitativos para determinação da citotoxicidade. A avaliação qualitativa foi feita por meio da análise das imagens obtidas por avaliador simples-cego, sendo consideradas como alterações morfológicas (indicativas de citotoxicidade): o arredondamento, destacamento, ruptura da integridade da membrana, inibição do crescimento e lise celular. Baseado nas alterações encontradas, foram atribuídos graus de reatividade (presença e severidade de citotoxicidade), em escala crescente de 0 a 4 (nenhum, muito leve, leve, moderado e severo, respectivamente), como apresentado no Quadro 01.

Quadro 01 – Descrição das alterações morfológicas para cada grau de reatividade

Grau de reatividade		Descrição das alterações morfológicas
0	Nenhum	As células apresentam grânulos intracitoplasmáticos discretos, sem lise celular e sem redução do crescimento.
1	Muito leve	Até 20% das células apresentam aspecto arredondado ou mostram alterações na morfologia.
2	Leve	Até 50% das células apresentam aspecto arredondado ou mostram alterações na morfologia.
3	Moderado	Até 70% das células apresentam aspecto arredondado ou mostram alterações na morfologia.
4	Severo	Destruição quase completa ou completa das camadas celulares.

Fonte: INTERNATIONAL ORGANIZATION for STANDARDIZATION. ISO 10993-5. **Biological evaluation of medical devices – Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity**, v. 3, p. 1–42, 2009.

As etapas representativas do ensaio de análise morfológica através de microscopia óptica em campo claro podem ser visualizadas na Figura 08.

Figura 08 – Representação esquemática do ensaio de análise morfológica

Fonte: A autora.

4.4.6 Avaliação do efeito das nanopartículas no potencial de reparo celular

Para analisar o efeito das nanopartículas de ouro sobre o potencial de reparo das células indiferenciadas da polpa dental humana, foram analisadas a proliferação e migração

celular, através do teste de “*Scratch*” e ativação celular, através do ensaio de quantificação de proteínas totais.

4.4.6.1 Ensaio de “*Scratch*”

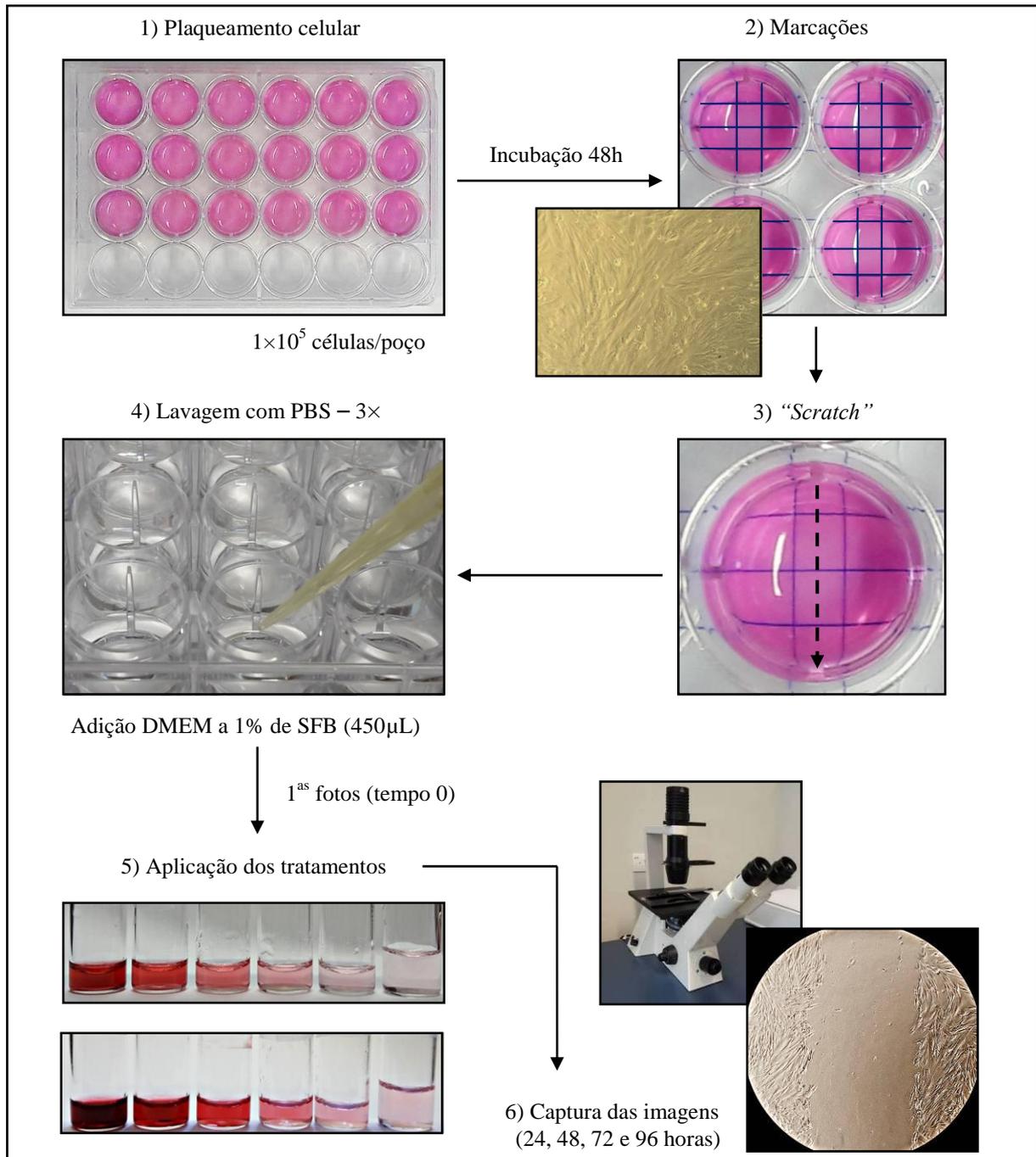
O ensaio de “*Scratch*” tem por finalidade verificar e medir a proliferação e migração celular *in vitro*. Este ensaio, segundo os autores que o descreveram, tem aspectos semelhantes ao processo de reparo *in vivo* (LIANG; PARK; GUAN, 2007).

Este método baseia-se na observação de que, após a criação de uma lacuna artificial, denominada “*Scratch*”, em uma monocamada de células confluentes, as células na extremidade do intervalo recém-criado irão migrar e proliferar para a abertura para fechar o “*Scratch*” até que novos contatos célula-célula sejam estabelecidos. As etapas básicas envolvem a criação de um “*Scratch*” em uma monocamada de células, a captura de imagens em intervalos regulares e a comparação das imagens para determinar a taxa de migração e proliferação celular (LIANG; PARK; GUAN, 2007).

As células indiferenciadas da polpa dental humana foram plaqueadas na proporção de 1×10^5 células/poço em placas de 24 poços em meio DMEM a 1% de SFB. Após incubação das placas a 37°C e 5% de CO₂ por 48 horas, foi obtida uma monocamada de células confluentes. Para que as imagens do “*Scratch*” fossem obtidas sempre na mesma região, o meio de cultivo foi removido e foram realizadas marcações nas placas. O risco “*Scratch*” foi então realizado para remover uma fina camada de células com auxílio de uma ponteira tipo Gilson de 200 µL (Axygen®, Nova York, EUA) em um único movimento nos quadrantes centrais marcados em cada poço. Os poços foram lavados 3 vezes com PBS para remoção das células desaderidas e adicionado DMEM a 1% de SFB (450µL). Foram então realizadas as primeiras imagens (tempo 0) em microscópio óptico invertido. As imagens foram capturadas com uma câmera digital acoplada ao microscópio, em um aumento final de 100×. Em seguida, foram adicionados 50 µL dos tratamentos em triplicata e as placas mantidas em incubadora a 37°C e 5% de CO₂. As nanopartículas de ouro, sem e com estabilização por polivinilpirrolidona (Au@CS e Au@CS+PVP), foram analisadas nas concentrações finais de 100; 50; 25; 12,5; 6,25 e 3,12 µg/mL. Células que receberam apenas meio de cultivo DMEM a 1% SFB, sem nenhum tratamento, foram utilizadas como padrão de normalidade e receberam 50 µL de água destilada estéril. Foram obtidas imagens em intervalos regulares (24, 48, 72 e 96 horas), em um aumento de 100×. Os experimentos foram repetidos 2 vezes (tempos independentes) e realizados em triplicata.

As áreas do “*Scratch*” foram mensuradas nas imagens com o software ImageJ 1.51s (National Institutes of Health, Maryland, EUA) e, em seguida, atribuídos valores percentuais relativos às taxas de migração e proliferação, em relação ao tempo 0 (% de fechamento). As etapas representativas do ensaio de “*Scratch*” podem ser visualizadas na Figura 09.

Figura 09 – Representação esquemática do ensaio de “*Scratch*”



Fonte: A autora.

4.4.6.2 Ensaio de quantificação de proteínas totais

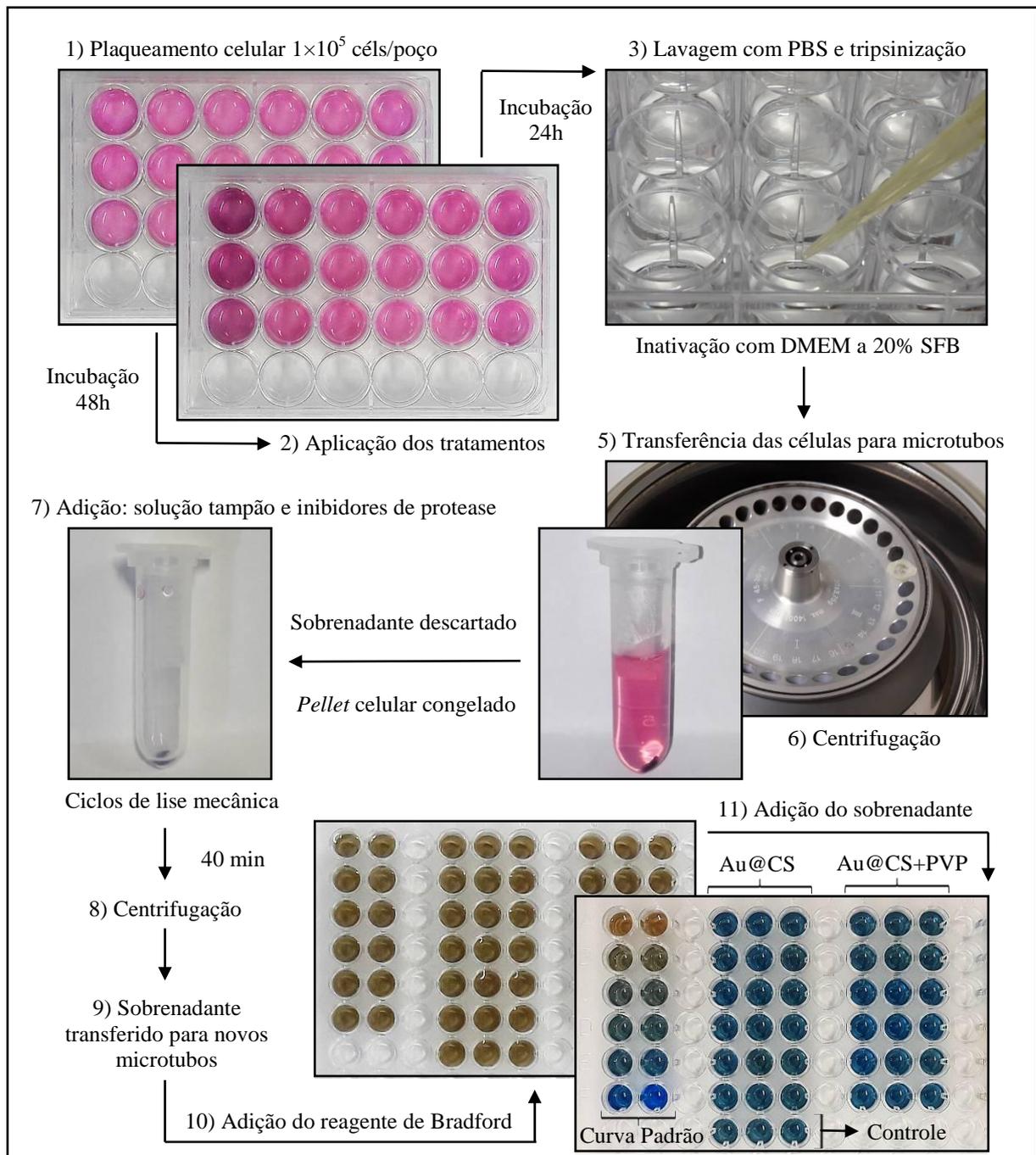
Para verificar o efeito das nanopartículas na ativação celular, foi realizado o ensaio de quantificação de proteínas totais. A quantificação de proteínas totais foi calculada pelo método de Bradford, que é uma técnica colorimétrica para quantificação de proteínas que utiliza o corante *Coomassie brilliant blue* G-250. A interação entre o corante e as moléculas de proteínas causa uma visível mudança de coloração, de castanho para tons de azul, de acordo com a concentração da proteína e conseqüentemente causa uma mudança na máxima absorção do corante em, aproximadamente, 2 minutos com estabilidade de cor por 1 hora (BRADFORD, 1976). A interpolação dos resultados das amostras com uma curva padrão, com valores de concentrações de proteínas conhecidos (albumina sérica bovina – BSA), permite a determinação da concentração de proteínas totais das amostras em estudo.

As células foram plaqueadas na proporção de 1×10^5 células/poço em placa de 24 poços (em volume final de 500 μ L). Após 48 horas, foram adicionados aos poços 50 μ L das dispersões de Au@CS e Au@CS+PVP nas concentrações de 100; 50; 25; 12,5; 6,25 e 3,12 μ g/mL em triplicata. Células que receberam apenas meio de cultivo DMEM a 1% SFB, sem nenhuma aplicação de tratamento (50 μ L de água destilada), foram utilizadas como controle. Após o período de 24 horas, os poços foram lavados com PBS. Em seguida, as células foram desaderidas dos poços com a aplicação de 200 μ L de solução de Tripsina – EDTA por 5 minutos, seguidos pela adição de igual volume de DMEM a 20% de SFB para inativação da tripsina. As células foram transferidas para microtubos (Eppendorf®, Hamburgo, Alemanha) de 1,5 mL e estes centrifugados a 3000 rpm por 3 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* celular congelado a -20°C . Em seguida, foi adicionada em cada microtubo uma solução tampão de lise celular (o triplo do volume da amostra) com inibidores de protease (fenantrolina, EDTA e PMSF), por 40 minutos. Durante o período de lise, foram realizados ciclos de lise mecânica através de homogeneização utilizando uma micropipeta. Os microtubos foram mantidos durante todo o período em gelo. Após o período de lise, os microtubos foram centrifugados por 15 minutos a 13000 rpm em 4°C . O sobrenadante contendo as proteínas foi transferido para novos microtubos e o *pellet* descartado. Foram adicionados 200 μ L do reagente de Bradford (Sigma–Aldrich®, Missouri, EUA) na placa de 96 poços. Em seguida, foi adicionado 1 μ L de cada sobrenadante por poço. O teste foi realizado em triplicata, como apresentado na Figura 10.

Para realização da curva padrão, foram adicionados 1; 2; 3; 4 e 5 μL de albumina sérica bovina (BSA) em 200 μL do reagente de Bradford. A concentração de BSA corresponde a 1,04 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

Após 15 minutos, a leitura da placa foi realizada a 570 nm em espectrofotômetro (BioTek®, Vermont, EUA). Os resultados foram interpolados com a curva padrão de albumina sérica bovina.

Figura 10 – Teste de quantificação de proteínas totais



Fonte: A autora.

4.5 AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES ANTIMICROBIANAS

Para avaliar as propriedades antimicrobianas das Au@CS, foram realizados os seguintes testes microbiológicos: difusão em ágar (técnica do disco e cavidade) e microdiluição em caldo.

As concentrações das nanopartículas de ouro utilizadas foram de 100; 50; 25; 12,5; 6,25 e 3,12 µg/mL ajustadas para cada teste. Previamente à realização de cada teste, foi realizado um controle de esterilidade das nanopartículas de ouro, no qual foram semeados 50 µL da dispersão de Au@CS em placas de ágar sangue e estas incubadas em estufa bacteriológica a 35°C. Após 24 horas, as placas foram analisadas e verificada a ausência de crescimento microbiano.

4.5.1 Cepas de referência

Para o presente estudo foram utilizadas cepas da *American Type Culture Collection* (ATCC): *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (microrganismo gram-positivo), *Escherichia coli* ATCC 25922 (microrganismo gram-negativo), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (microrganismo gram-negativo) e *Candida albicans* ATCC 10231 (levedura). As cepas de referência já possuem suas características fenotípicas conhecidas, ou seja, sua identificação e perfil de sensibilidade já foram determinados.

Previamente à execução dos testes, as cepas foram repicadas em ágar Mueller-Hinton e incubadas por 24 horas em estufa bacteriológica a 35°C, com exceção da cepa de *C. albicans*, para a qual foi utilizado ágar Mueller-Hinton acrescido de 2% de glicose.

4.5.2 Preparo dos reagentes para os testes microbiológicos

4.5.2.1 Meio Mueller-Hinton – Ágar

O meio ágar Mueller-Hinton (MH) foi utilizado nos testes de difusão em disco e em cavidade para as bactérias *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa*, assim como, para a contagem de colônias na padronização da concentração dos microrganismos. Para a levedura *C. albicans*, foi utilizado ágar Mueller-Hinton acrescido de 2% de glicose (MHG).

O ágar Mueller-Hinton foi preparado a partir de uma base desidratada (Kasvi®, Curitiba, Brasil) disponível comercialmente conforme as instruções do fabricante (36 gramas

em 1000 mL de água ultrapura). Para o preparo do ágar para a cepa de *C. albicans*, foi acrescentado ao meio 2% de glicose. Os meios foram aquecidos para completa dissolução do pó e esterilizados em autoclave durante 40 minutos a 120°C e 1T (atmosfera de pressão). Imediatamente após terminar o ciclo da autoclave, os frascos foram colocados para resfriar em banho-maria entre 45–50°C. Posteriormente, os meios recém preparados foram distribuídos em placas de *Petri* de fundo chato descartáveis (Kasvi®, Curitiba, Brasil), em uma superfície horizontal, para garantir uma profundidade uniforme de aproximadamente 4 mm, correspondente a 25 mL, para placas com diâmetro de 100 mm. Após esfriar em temperatura ambiente, as placas foram armazenadas em geladeira (2–8°C) embrulhadas em plásticos, para minimizar o ressecamento do ágar. Uma amostra de cada lote de placas foi examinada para confirmar sua esterilidade, mediante incubação em estufa bacteriológica a 35°C, durante 24 horas.

4.5.2.2 Meio Mueller–Hinton – Caldo

O meio caldo Mueller–Hinton (MH) foi utilizado nos testes de microdiluição para as bactérias *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa*. Para a levedura *C. albicans*, foi utilizado caldo Mueller-Hinton acrescido de 2% de glicose (MHG).

O caldo Mueller–Hinton foi preparado a partir de uma base desidratada (Kasvi®, Curitiba, Brasil) disponível comercialmente conforme as instruções do fabricante (21 gramas em 1000 mL de água ultrapura). Para o preparo do caldo para a cepa de *C. albicans*, foi acrescentado ao meio 2% de glicose. Os meios foram aquecidos para completa dissolução do pó e esterilizados em autoclave durante 40 minutos a 120°C e 1T (atmosfera de pressão). Após esfriar à temperatura ambiente, foram armazenados em geladeira (2–8°C). Uma amostra de cada frasco foi aliqotada (5 mL) em tubos tipo Falcon para confirmar sua esterilidade, mediante incubação em estufa bacteriológica a 35°C, durante 24 horas.

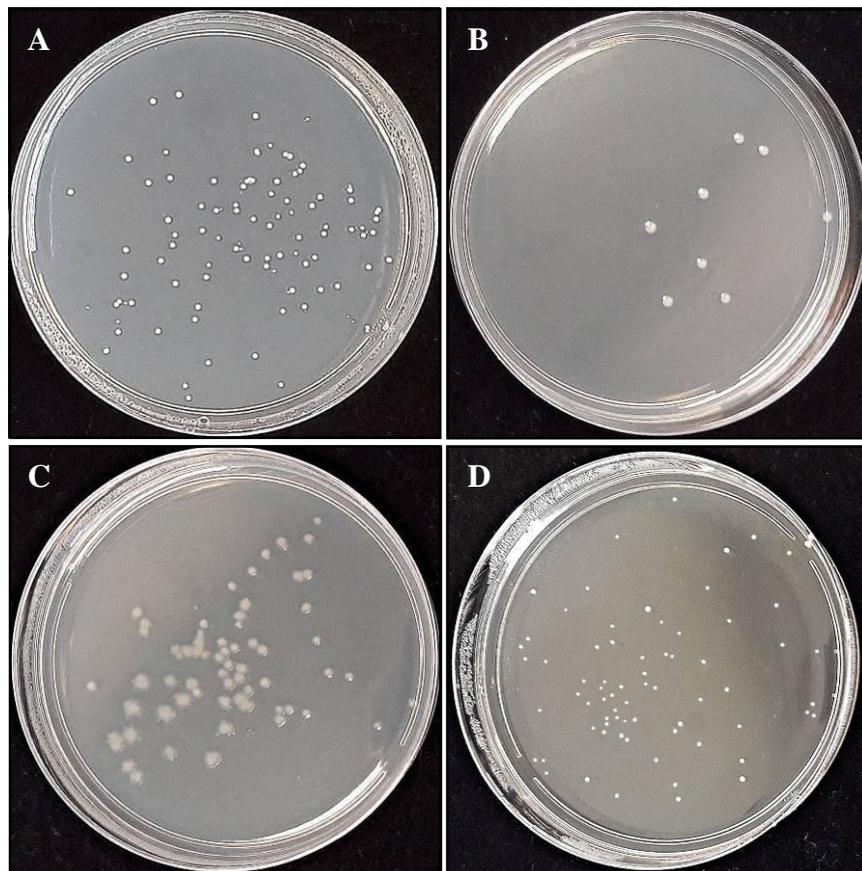
4.5.3 Controle de turbidez para o preparo do inóculo

Para padronizar a densidade do inóculo para os testes microbiológicos, utilizou-se por comparação visual uma solução padrão de 0,5 da escala de McFarland, valor correspondente a $1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colônias por mL (UFC/mL) para as bactérias e $1,5 \times 10^6$ UFC/mL para a levedura.

As suspensões microbianas iniciais foram obtidas a partir de culturas de trabalho repicadas em ágar 24 horas antes da realização dos experimentos. Para o preparo do inóculo, as colônias foram transferidas com uma alça de platina das placas de *Petri* para tubos de ensaio contendo solução salina estéril até alcançar a turbidez padrão. Para os ensaios de difusão em ágar, a suspensão inicial foi utilizada diretamente ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL para as bactérias e $1,5 \times 10^6$ UFC/mL para a levedura), entretanto, para os ensaios de microdiluição foi realizada uma diluição (1:10) em caldo Mueller–Hinton, obtendo-se uma suspensão de $1,5 \times 10^7$ UFC/mL para as bactérias e $1,5 \times 10^5$ UFC/mL para a levedura.

Para confirmar a concentração de microrganismos, as suspensões iniciais foram sequencialmente diluídas (1:10) em PBS estéril e semeadas (50 μ L) em ágar MH ou MHG, cada diluição foi semeada em triplicata. As placas foram mantidas em estufa bacteriológica a 35°C durante 24 horas para o crescimento dos microrganismos e as colônias foram contadas, como apresentado na Figura 11. Esse processo foi repetido para cada teste.

Figura 11 – Contagem das colônias – UFC/mL



Fonte: A autora.

Notas: (A) *S. aureus*. (B) *E. coli*. (C) *P. aeruginosa*. (D) *C. albicans*.

A relação UFC/mL foi determinada aplicando a fórmula:

$$\text{UFC/mL} = \frac{n^{\circ} \text{ médio de colônias} \times 10^n}{q} \quad (4)$$

Onde n representa o fator de diluição e q a quantidade da suspensão semeada em mL. A média das três placas foi utilizada como valor final de contagem (n° médio de colônias). Uma exemplificação dos valores obtidos são mostrados na Tabela 03.

Tabela 03 – Padronização da concentração de microrganismos - UFC/mL

Microrganismo	Fator de diluição	Média das colônias	UFC/mL
<i>S. aureus</i>	5x	79	$1,58 \times 10^8$
<i>E. coli</i>	6x	8	$1,6 \times 10^8$
<i>P. aeruginosa</i>	5x	72	$1,44 \times 10^8$
<i>C. albicans</i>	3x	69	$1,38 \times 10^6$

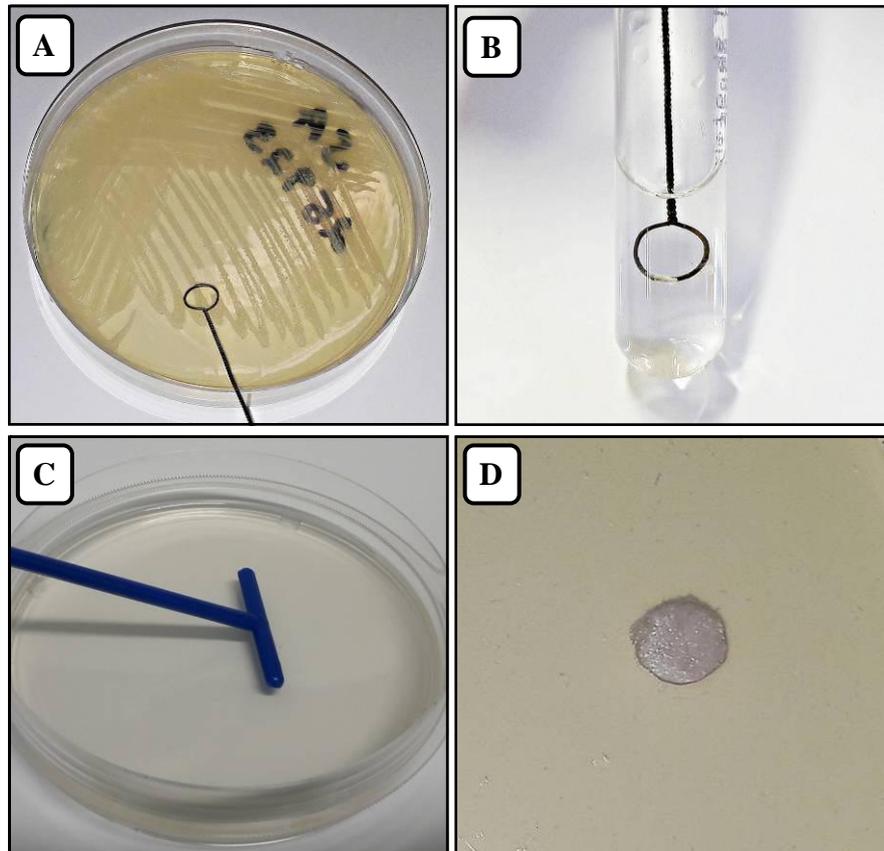
Fonte: A autora.

4.5.4 Teste de Difusão em disco

O teste de disco–difusão em ágar foi executado de acordo com o método descrito por Bauer *et al.* (1966), com pequenas modificações.

O inóculo foi preparado conforme descrito anteriormente no item 4.5.3. Desta suspensão foram pipetados 100µL e semeados de maneira uniforme com espalhadores de células descartáveis estéreis nas placas de *Petri* contendo ágar Mueller–Hinton (MH) para as bactérias e ágar Mueller–Hinton acrescido de 2% de glicose (MHG) para a levedura. A suspensão microbiana foi pipetada até 15 minutos após o ajuste da turbidez da suspensão de inóculo. A superfície da placa foi inoculada esfregando o espalhador de células em toda a superfície do ágar, repetindo o procedimento três vezes, girando a placa aproximadamente 60° cada vez, a fim de assegurar a distribuição uniforme do inóculo. Como passo final, o espalhador foi passado na margem da placa de ágar. Os tratamentos foram aplicados (20 µL) em discos de feltro de 5 mm de diâmetro e após secagem foram colocados na superfície das placas semeadas, conforme a Figura 12. Os experimentos foram realizados 3 vezes (tempos independentes) em triplicata.

Figura 12 – Etapas do teste de difusão em disco



Fonte: A autora.

Notas: As colônias foram transferidas com uma alça de platina (A) para um tubo de ensaio contendo solução salina (B) até alcançar a turbidez padrão. A superfície da placa foi inoculada com os microrganismos (C) e os tratamentos aplicados em discos de feltro (D) depositados sobre o ágar.

As dispersões de nanopartículas testadas foram ajustadas para ficar 100; 50; 25; 12,5; 6,25 e 3,12 μg em 20 μL para o teste de difusão em disco (quantidade presente em cada disco). Cada disco foi pressionado de encontro à placa, de maneira a assegurar contato completo com a superfície de ágar. Foram colocados no máximo três discos por placa. As placas foram invertidas e colocadas em estufa bacteriológica a 35°C. Durante a incubação, o tratamento se difunde pelo meio sólido, formando um gradiente decrescente de concentração em torno do disco. Se o microrganismo for sensível ao tratamento, o seu crescimento será inibido onde o tratamento estiver presente em concentração adequada, formando-se então, um halo de inibição do crescimento (NCCLS, 2003b).

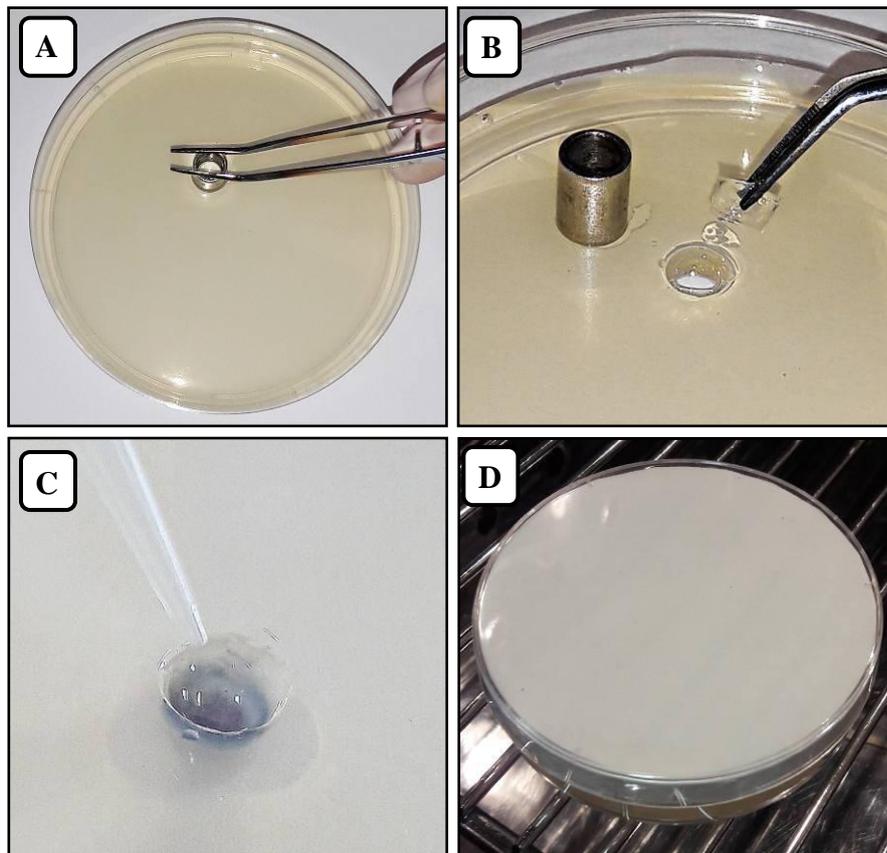
Após 24 horas de incubação, cada placa foi examinada e os diâmetros totais dos halos de inibição foram mensurados. Os halos foram medidos em milímetros (mm) através de um paquímetro digital, incluindo o diâmetro do disco. Como controle, foi utilizado digluconato de clorexidina 2%.

4.5.5 Teste de Difusão em cavidade

Foram utilizados os mesmos microrganismos do teste de disco-difusão e as concentrações de Au@CS ajustadas. O inóculo foi preparado e semeado nas placas da mesma maneira que no item anterior.

Nas placas semeadas, foram realizadas perfurações de 7 mm de diâmetro deixando um espaço para aplicação de 50 μL das dispersões de nanopartículas de ouro. As dispersões de nanopartículas testadas foram ajustadas para ficar 100; 50; 25; 12,5; 6,25 e 3,12 μg em 50 μL (quantidade presente em cada cavidade). Os tratamentos foram aplicados em cada cavidade, sendo que foram realizadas no máximo três cavidades por placa. As placas foram incubadas recobertas com papel filtro em estufa bacteriológica a 35°C durante 24 horas, conforme mostrado na Figura 13.

Figura 13 – Etapas do teste de difusão em cavidade



Fonte: A autora.

Notas: Realização das perfurações de 7 mm de diâmetro (A e B) deixando um espaço para aplicação de 50 μL das dispersões de nanopartículas de ouro (C). Incubação em estufa bacteriológica recoberta com papel filtro (D).

Após 24 horas de incubação, cada placa foi examinada e os diâmetros totais dos halos de inibição foram mensurados. Os halos foram medidos em milímetros (mm) usando um paquímetro digital, incluindo o diâmetro da cavidade. Como controle, foi utilizado digluconato de clorexidina 2%. Os experimentos foram realizados 3 vezes (tempos independentes) em triplicata.

4.5.6 Teste de Microdiluição

A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada pela técnica de microdiluição em caldo executada de acordo com o documento NCCLS, com pequenas modificações (NCCLS, 2003a). Neste método, foram utilizadas placas de microdiluição com 96 poços de fundo redondo.

Inicialmente, foram preparadas as dispersões de nanopartículas de ouro 10× mais concentradas, de tal forma que as concentrações finais nos poços foram de 100; 50; 25; 12,5; 6,25 e 3,12 µg/mL. A suspensão bacteriana foi preparada de acordo com o item 4.5.3. Esta suspensão foi diluída em caldo MH ou MHG (1:10), de modo que a concentração de bactérias ficou próxima a $1,5 \times 10^7$ UFC/mL e $1,5 \times 10^5$ UFC/mL para a levedura.

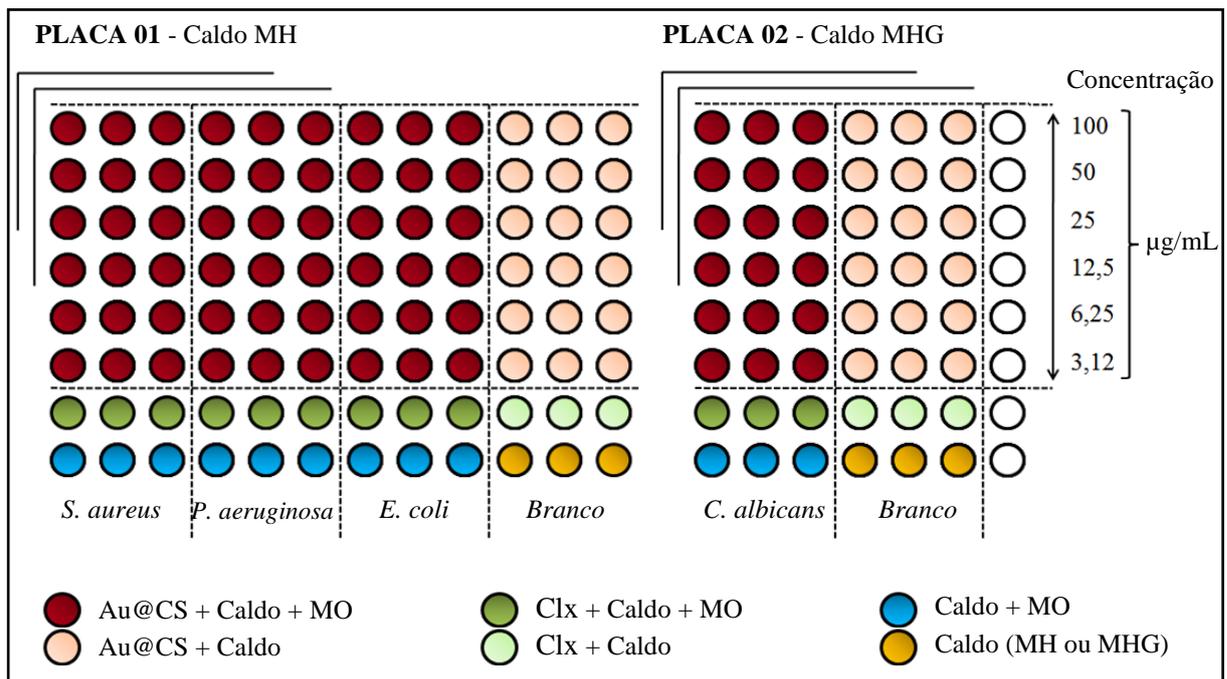
No preparo das microplacas, foram adicionados 20 µL de cada diluição de Au@CS e 10 µL de inóculo (MO) em 170 µL de caldo Mueller–Hinton acrescido ou não de glicose 2% (MH ou MHG), totalizando 200 µL de volume por poço. Como controle negativo, foi utilizado o digluconato de clorexidina 2% (Clx). Como controle positivo, foi utilizado o controle dos crescimentos bacterianos (apenas o microrganismo em meio de cultivo sem nenhum tratamento). Também foram realizados os controles dos meios de cultura (apenas MH ou MHG) e o controle dos tratamentos (apenas os tratamentos em meio de cultivo sem nenhum microrganismo), denominados de brancos.

Após 18 horas de incubação em estufa bacteriológica a 35°C, foram realizadas as leituras em espectrofotômetro (BioTek®, Vermont, EUA) com comprimento de onda de 450 nm. A presença de turbidez é indicativa de crescimento bacteriano e a ausência de turbidez é indicativa de eficácia do tratamento. Em seguida, foram adicionados 50 µL de solução de TTC (cloreto de 2,3,5 trifeniltetrazólio) a 0,2% para as bactérias e solução de XTT (2,3-Bis-(2-Methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide) para a levedura. Após duas horas em estufa bacteriológica a 35°C, foram realizadas novas leituras em espectrômetro (BioTek®, Vermont, EUA) com comprimento de onda de 450 nm.

Após obter os valores de absorvância, foi calculado o crescimento dos microrganismos que receberam os diferentes tratamentos em comparação com o controle. Os poços que recebem apenas meio de cultivo com os microrganismos foram considerados como 100% de crescimento microbiano.

A Figura 14 mostra esquematicamente o plaqueamento do teste de microdiluição em caldo. Os experimentos foram realizados 2 vezes (tempos independentes) em triplicata.

Figura 14 – Plaqueamento do teste de microdiluição em caldo



Fonte: A autora.

4.6 AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES ANTI-INFLAMATÓRIAS

A avaliação da atividade anti-inflamatória foi analisada através da quantificação dos níveis da citocina fator de necrose tumoral (TNF- α) em sobrenadante de macrófagos J774 estimulados com lipopolissacarídeo (LPS) e tratados com nanopartículas de ouro (Au@CS e Au@CS+PVP).

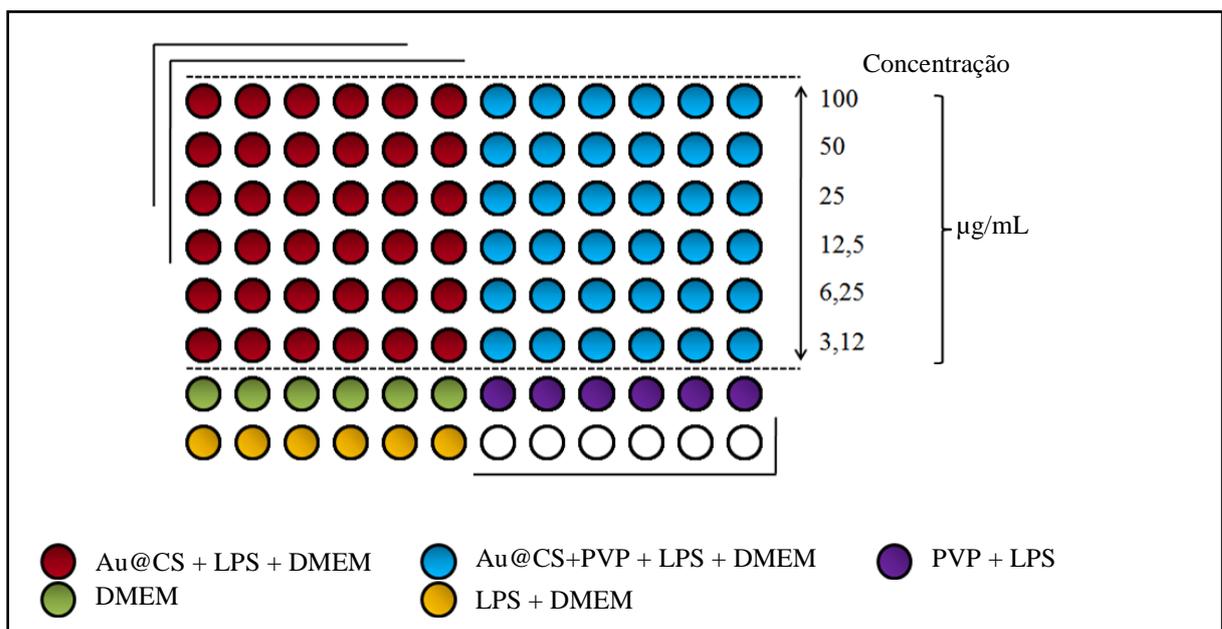
Previamente à realização da quantificação dos níveis de citocinas, foi verificada qual concentração de LPS promove maior liberação da mesma. Os macrófagos J774 cultivados foram plaqueados na proporção de 1×10^5 células/poço em placas de 96 poços em DMEM incompleto (sem adição de SFB). Após 24 horas em incubadora a 37°C e 5% de CO₂, o meio de cultura foi removido e adicionado DMEM incompleto com LPS nas concentrações de 500, 250 e 100 ng/mL, em triplicata. Após a sensibilização com LPS (24 horas em incubadora a 37°C e 5% de CO₂), a liberação de TNF- α pelos macrófagos foi avaliada por meio do método

de ELISA segundo a técnica descrita por Brunius *et al.* (2005) por meio de um kit ELISA (eBioscience™, EUA) conforme instruções do fabricante. A concentração de 500 ng/mL foi utilizada para realização do teste definitivo realizado na sequência.

Os macrófagos J774 foram plaqueados na proporção de 1×10^5 células/poço em placas de 24 poços em DMEM incompleto. Após 24 horas em incubadora a 37°C e 5% de CO₂, o meio de cultura foi removido e adicionado DMEM incompleto com LPS (500 ng/mL) juntamente com os tratamentos por 24 horas. Os tratamentos consistem em: Au@CS e Au@CS+PVP (concentrações de 100; 50; 25; 12,5; 6,25 e 3,12 µg/mL) e PVP (50 mg/mL). Como controle, foram utilizados o sobrenadante de células que receberam apenas DMEM e DMEM + LPS.

Após 24 horas de exposição, 100 µL do sobrenadante de cada poço foram transferidos para uma placa de 96 poços previamente sensibilizada com o anticorpo de captura para quantificação de citocinas através da metodologia de ELISA. Todas as etapas foram realizadas de acordo com o manual do fabricante. A leitura da absorvância foi realizada por espectroscopia em leitora de microplacas (BioTek®, Vermont, EUA) no comprimento de onda de 450 nm. A quantidade de TNF- α presente no sobrenadante de cada amostra foi comparada ao grupo DMEM+LPS, sendo considerada nesses poços como 100% de liberação de TNF- α . Os experimentos foram realizados 2 vezes (tempos independentes) em sextuplicata. A representação do plaqueamento pode ser verificada na Figura 15.

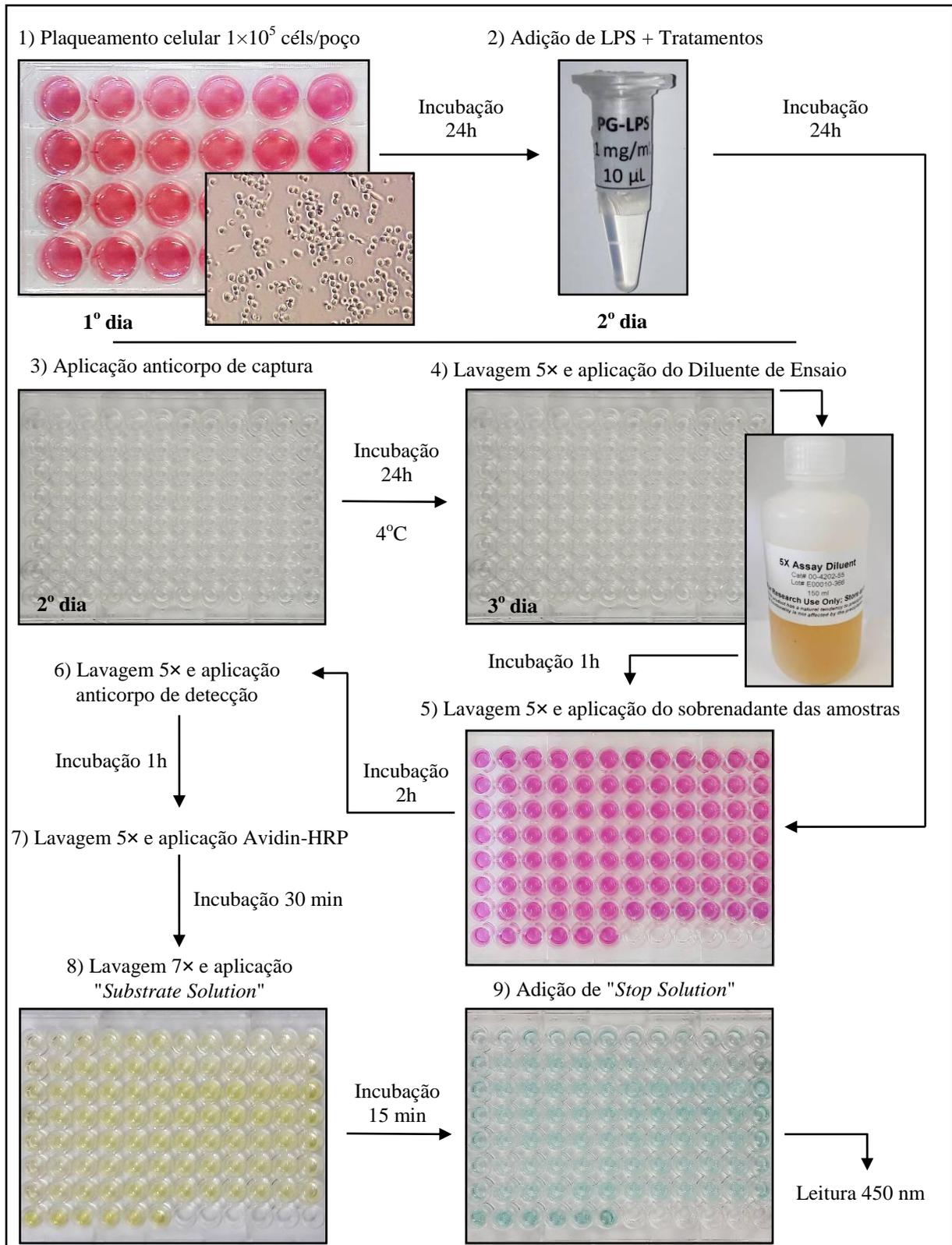
Figura 15 – Plaqueamento do ensaio de ELISA



Fonte: A autora.

A Figura 16 mostra esquematicamente o ensaio de quantificação de citocinas.

Figura 16 – Representação esquemática do ensaio de ELISA



Fonte: A autora.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados para as variáveis quantitativas, obtidas com os testes do MTT, Azul de Tripán, “*Scratch*”, proteínas totais, Elisa e microdiluição foram analisados usando a Análise de Variância de uma via (ANOVA), e aplicado pós-teste de Tukey quando foi encontrada diferença significativa entre os grupos, sempre após ser verificada a normalidade dos dados com o teste de Shapiro-Wilk. Os dados qualitativos ordinais definidos pelos escores de grau de reatividade (0: nenhuma alteração; 1: alterações muito leves; 2: alterações leves; 3: moderadas e 4: severas) obtidos com a análise morfológica (microscopia óptica) foram comparados com o modelo não paramétrico de Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn. Os dados quantitativos não paramétricos obtidos pelos diâmetros dos halos de inibição foram comparados com o modelo de Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn. As variáveis quantitativas foram expressas com média \pm E.P.M. com intervalo de confiança de 95%, já as variáveis qualitativas com a mediana e intervalo interquartilítico. O nível de significância adotado foi de 5%, sendo que $p < 0,05$ foram considerados significantes. As análises foram realizadas em software estatístico GraphPad 6.0 (Prism®, Califórnia, EUA).

5 RESULTADOS

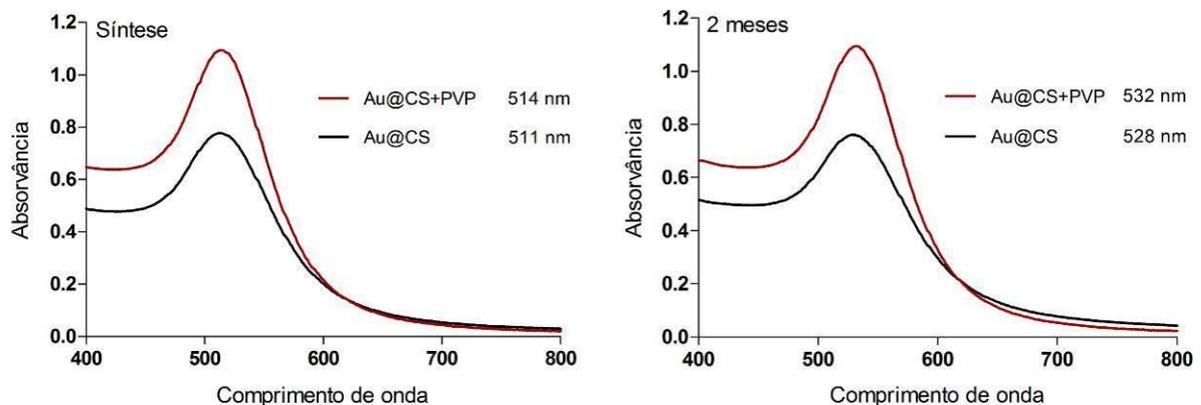
5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO

5.1.1 Espectroscopia de absorção no ultravioleta – visível (UV–VIS)

As intensidades de luz absorvidas nos comprimentos de onda na região do ultravioleta–visível para as dispersões de Au@CS e Au@CS+PVP nos períodos avaliados podem ser verificadas na Figura 17.

A caracterização foi realizada em dois momentos distintos: no dia da síntese e após dois meses. A dispersão de Au@CS nos períodos selecionados apresentou bandas únicas bem definidas, onde a máxima absorção ocorreu nos comprimentos de onda de 511 nm e 528 nm, respectivamente. A dispersão de Au@CS+PVP nos períodos selecionados também apresentou bandas únicas bem definidas, onde a máxima absorção ocorreu nos comprimentos de onda de 514 nm e 532 nm, respectivamente.

Figura 17 – Comprimentos de onda da máxima absorção (Au@CS e Au@CS+PVP)



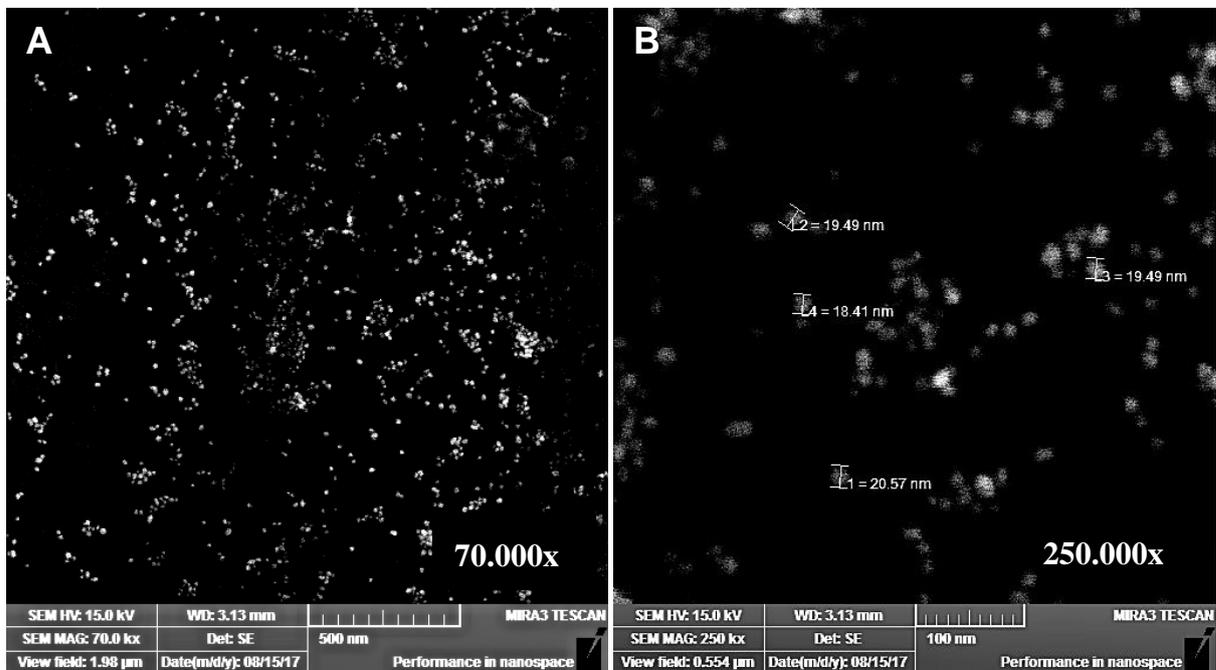
Fonte: A autora.

5.1.2 Microscopia eletrônica (FEG–SEM)

A caracterização morfológica das nanopartículas foi realizada através de imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura com fonte de emissão de campo (FEG–SEM). O formato e o diâmetro aproximado das nanopartículas podem ser visualizados na Figura 18. Nas capturas de imagens obtidas por FEG–SEM, as Au@CS apresentaram formato esférico e diâmetro médio aproximado de 20 nm como proposto pelo método de síntese (TURKEVICH;

STEVENSON; HILLIER, 1951). Não foi possível visualizar as Au@CS+PVP através desta técnica.

Figura 18 – Caracterização morfológica das nanopartículas através de FEG-SEM



Fonte: A autora.

Escalas: Nanopartículas de ouro (Au@CS) preparadas em dispersão aquosa. (A) Barra de escala equivalente a 500 nm. (B) Barra de escala equivalente a 100 nm.

5.1.3 Potencial Zeta

As medidas de potencial Zeta demonstraram perfil aniônico para as dispersões coloidais de Au@CS e Au@CS+PVP sintetizadas, determinando o valor de -30,2 e -30,4 mV respectivamente.

Os testes realizados para a caracterização das nanopartículas foram importantes para assegurar que as dispersões sintetizadas apresentavam propriedades e dimensões adequadas, tornando-as, desta forma, aptas para serem utilizadas, estabelecendo-se assim um método padrão para síntese de nanopartículas de ouro utilizadas neste estudo.

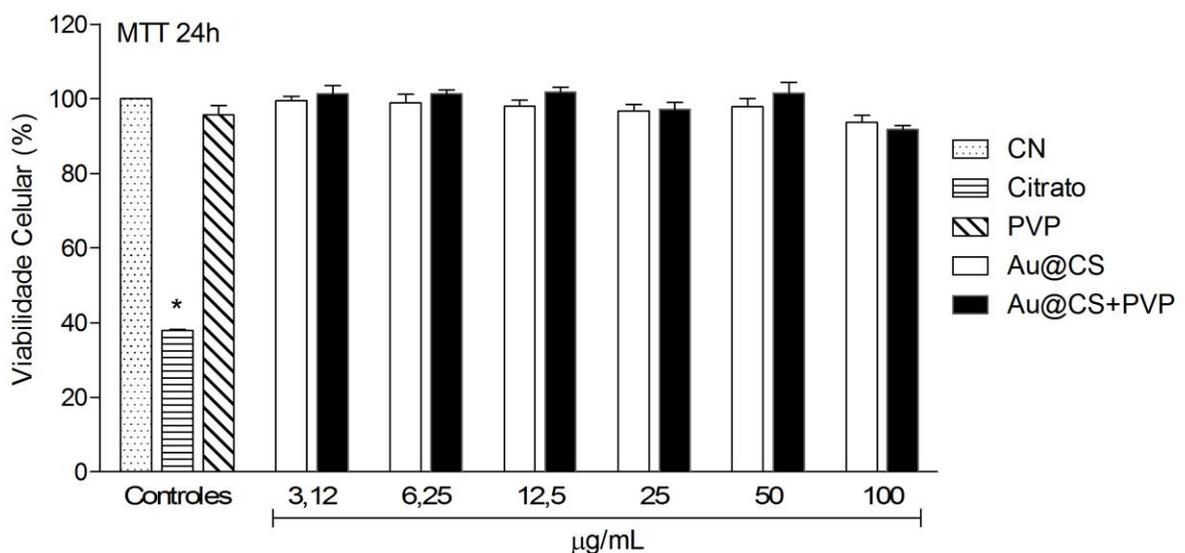
5.2 AVALIAÇÃO DO PERFIL CITOTÓXICO

5.2.1 Avaliação do efeito das nanopartículas de ouro na viabilidade celular

5.2.1.1 Ensaio do *Thyazolyl Blue Tetrazolium Bromide* (MTT)

Os resultados obtidos pela metodologia do MTT no período de 24 horas indicaram uma redução na viabilidade celular ($p=0,0001$) somente para o grupo Citrato ($62 \pm 1\%$). Houve diferença estatisticamente significativa ($p>0,05$) entre os valores de Au@CS+PVP, nas concentrações de 3,12; 6,25; 12,5 e 50 $\mu\text{g/mL}$ em comparação com a concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$. Os resultados obtidos para o ensaio do MTT em 24 horas podem ser verificados na Figura 19.

Figura 19 – Viabilidade celular pelo método do MTT em 24 horas

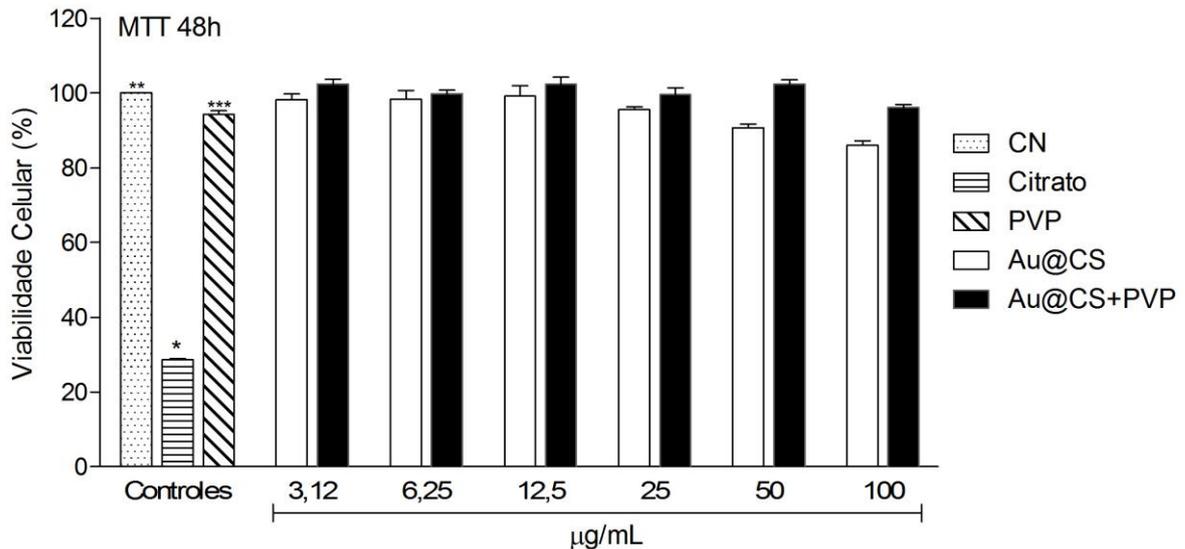


Fonte: A autora.

Notas: Viabilidade celular pelo método do MTT no período de 24 horas de incubação com as Au@CS e Au@CS+PVP, nas concentrações de 100; 50; 25; 12,5; 6,25 e 3,12 $\mu\text{g/mL}$. Os dados foram analisados pela análise de variância de uma via (ANOVA) seguido pelo teste de Tukey. Dados expressos em média da % de viabilidade celular ($n=8$) \pm E.P.M. * $p<0,0001$ com todos os grupos.

No período de 48 horas, mostraram redução da viabilidade celular ($p<0,05$) os grupos: Citrato, Au@CS de 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$. O grupo Citrato foi capaz de reduzir a viabilidade celular em $71 \pm 1\%$, o grupo Au@CS de 50 $\mu\text{g/mL}$ em $9 \pm 3\%$ e as Au@CS de 100 $\mu\text{g/mL}$ em $14 \pm 3\%$. A comparação dos valores entre Au@CS e Au@CS+PVP mostrou diferenças significativas ($p<0,05$) para as concentrações de 100 e 50 $\mu\text{g/mL}$. Os resultados obtidos para o ensaio do MTT em 48 horas podem ser verificados na Figura 20.

Figura 20 – Viabilidade celular pelo método do MTT em 48 horas



Fonte: A autora.

Notas: Viabilidade celular pelo método do MTT no período de 48 horas de incubação com as Au@CS e Au@CS+PVP, nas concentrações de 100; 50; 25; 12,5; 6,25 e 3,12 µg/mL. Os dados foram analisados pela análise de variância de uma via (ANOVA) seguido pelo teste de Tukey. Dados expressos em média da % de viabilidade celular (n=8) ± E.P.M. *p<0,0001 com todos os grupos. **p=0,0002 com Au@CS 50 e p=0,0001 com Au@CS 100. ***p=0,0011 com Au@CS 100; p=0,0016 com Au@CS + PVP 3,12; p=0,0018 com Au@CS + PVP 12,5; p=0,0016 com Au@CS + PVP 50.

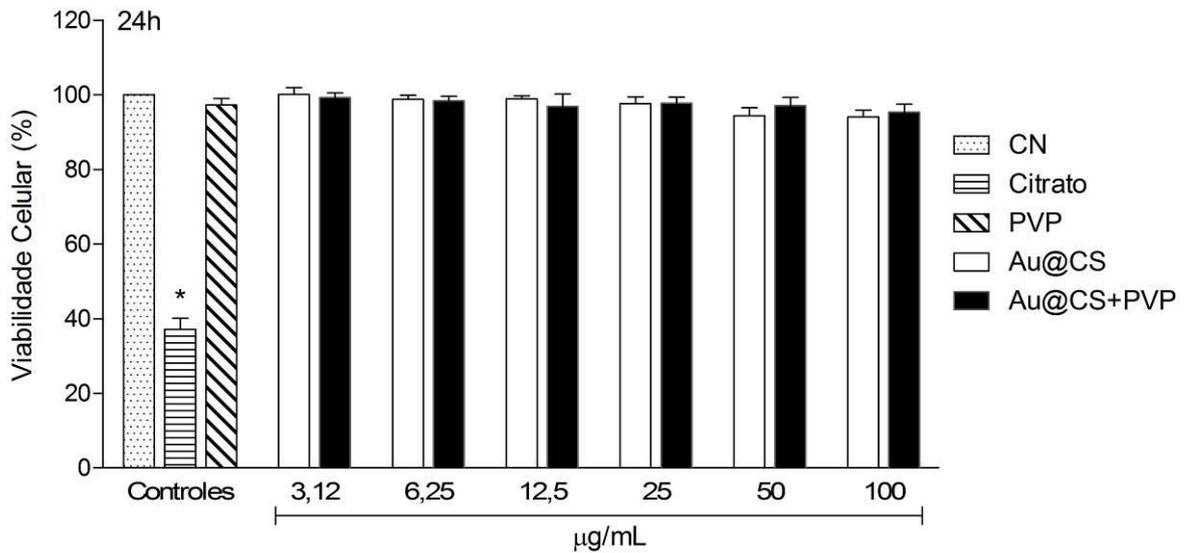
5.2.1.2 Ensaio de exclusão do Azul de Tripán

No teste de exclusão do Azul de Tripán após 24 horas de incubação das células com os tratamentos, ocorreu uma diminuição na viabilidade celular ($p < 0,05$) para o grupo Citrato ($63 \pm 8\%$). Não foi verificada redução da viabilidade para os grupos Au@CS e Au@CS+PVP. Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os valores de Au@CS e Au@CS+PVP, nas diferentes concentrações.

No período de 48 horas, uma diminuição da viabilidade celular ($p < 0,05$) foi observada para os grupos: Citrato, Au@CS de 50 e 100 µg/mL. O grupo Citrato foi capaz de reduzir a viabilidade celular em $52 \pm 4\%$, o grupo Au@CS de 50 µg/mL em $7 \pm 7\%$ e as Au@CS de 100 µg/mL em $10 \pm 3\%$. A comparação dos valores entre Au@CS e Au@CS+PVP não mostrou diferenças significativas ($p > 0,05$) nas diferentes concentrações.

Os resultados obtidos para o ensaio de exclusão do Azul de Tripán em 24 e 48 horas podem ser verificados nas Figuras 21 e 22, respectivamente.

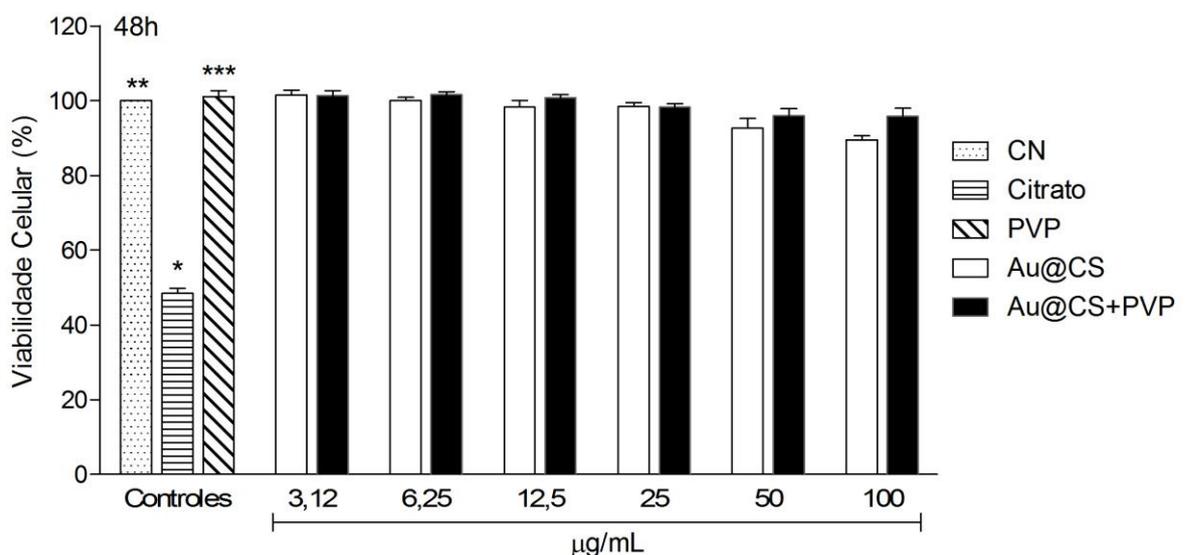
Figura 21 – Viabilidade celular pelo método de exclusão do Azul de Tripán em 24 horas



Fonte: A autora.

Notas: Viabilidade celular pelo teste de exclusão do Azul de Tripán no período de 24 horas de incubação com as Au@CS e Au@CS+PVP, nas concentrações de 100; 50; 25; 12,5; 6,25 e 3,12 µg/mL. Os dados foram analisados pela análise de variância de uma via (ANOVA) seguido pelo teste de Tukey. Dados expressos em média da % de viabilidade celular (n=8) ± E.P.M. *p<0,0001 com todos os grupos.

Figura 22 – Viabilidade celular pelo método de exclusão do Azul de Tripán em 48 horas



Fonte: A autora.

Notas: Viabilidade celular pelo teste de exclusão do Azul de Tripán no período de 48 horas de incubação com as Au@CS e Au@CS+PVP, nas concentrações de 100; 50; 25; 12,5; 6,25 e 3,12 µg/mL. Os dados foram analisados pela análise de variância de uma via (ANOVA) seguido pelo teste de Tukey. Dados expressos em média da % de viabilidade celular (n=8) ± E.P.M. *p<0,0001 com todos os grupos. **p=0,0309 com Au@CS 50 e p=0,0001 com Au@CS 100. ***p=0,0056 com Au@CS 50 e p<0,0001 com Au@CS 100.

5.2.2 Avaliação do efeito das nanopartículas de ouro na morfologia celular

O efeito das nanopartículas de ouro na morfologia das células indiferenciadas da polpa dental humana foi avaliado através de imagens obtidas em microscópio óptico invertido.

5.2.2.1 Microscopia óptica de campo claro

O potencial de citotoxicidade das Au@CS e Au@CS+PVP foi analisado por contato direto com as células indiferenciadas da polpa dental humana por 24 e 48 horas e registrado através de imagens realizadas em microscópio óptico invertido para análise da morfologia celular. As imagens obtidas para os períodos de 24 e 48 horas podem ser verificadas nos Quadros 02 e 03, respectivamente.

O controle (CN) que não recebeu nenhum tratamento foi utilizado como padrão morfológico de viabilidade. As células do controle encontravam-se viáveis, aderidas, com integridade de membrana, homogeneidade de citoplasma e com formato alongado em monocamada.

Os grupos tratados com citrato de sódio em ambos os períodos analisados mostraram grau severo de citotoxicidade, com destruição completa das camadas celulares. Por outro lado, os grupos tratados com PVP em ambos os períodos analisados não mostraram nenhum sinal de alteração morfológica.

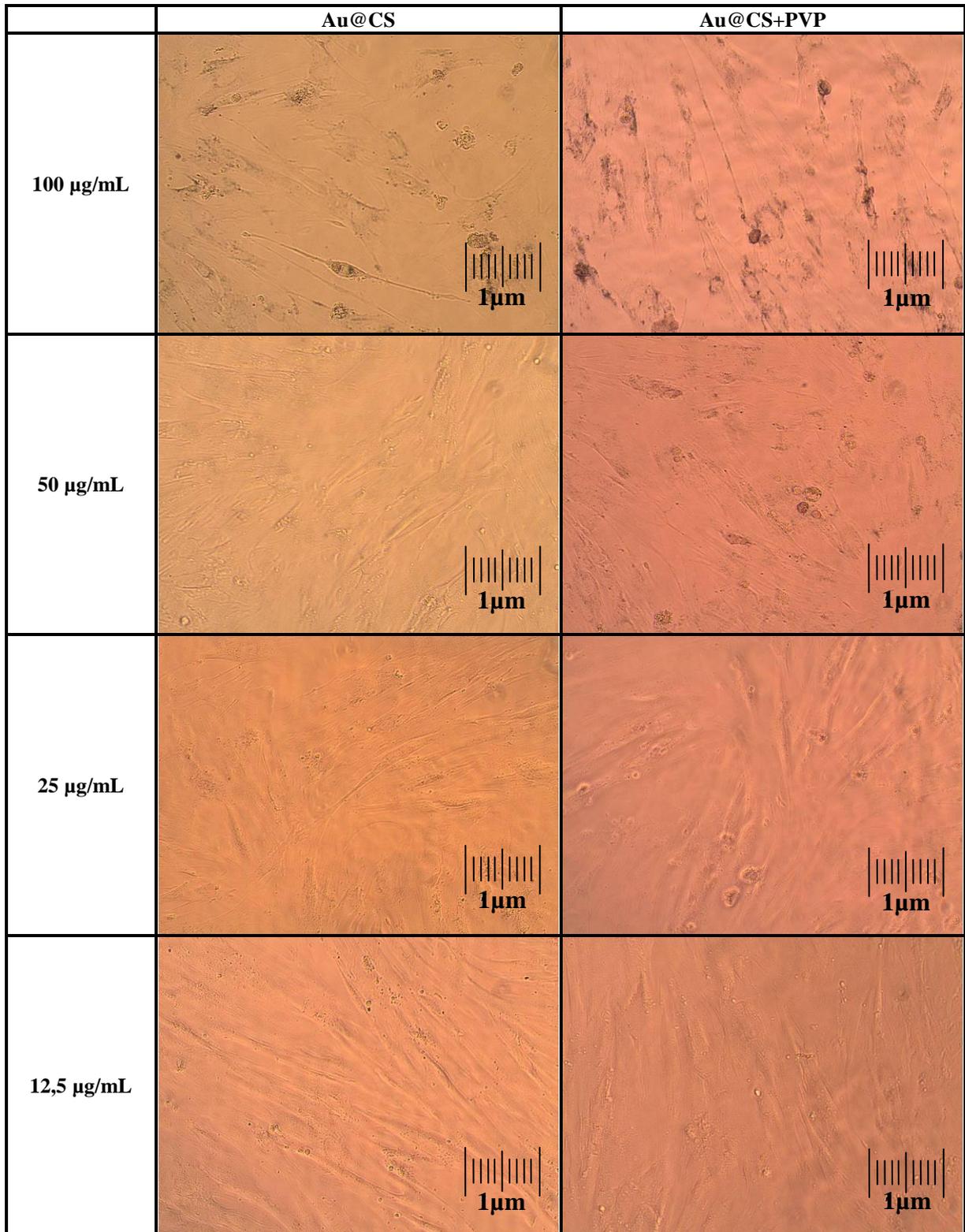
As células em contato com as Au@CS e Au@CS+PVP de 3,12; 6,25; 12,5 e 25 µg/mL, em ambos os períodos analisados, não apresentaram nenhum sinal de alteração morfológica.

As células em contato com as Au@CS de 50 µg/mL, em 24 horas, demonstraram prevalência do grau 0, porém, em 48 horas apresentaram prevalência do grau 1 (alterações muito leves de citotoxicidade), com até 20% das células com aspecto arredondado. As Au@CS+PVP de 50 µg/mL, em ambos os períodos, mostraram prevalência do grau 0 (nenhuma alteração da morfologia).

As células em contato direto com as Au@CS de 100 µg/mL, em ambos os períodos, mostraram prevalência do grau 1. As Au@CS+PVP de 100 µg/mL, em ambos os períodos, mostraram prevalência do grau 0 (nenhuma alteração da morfologia).

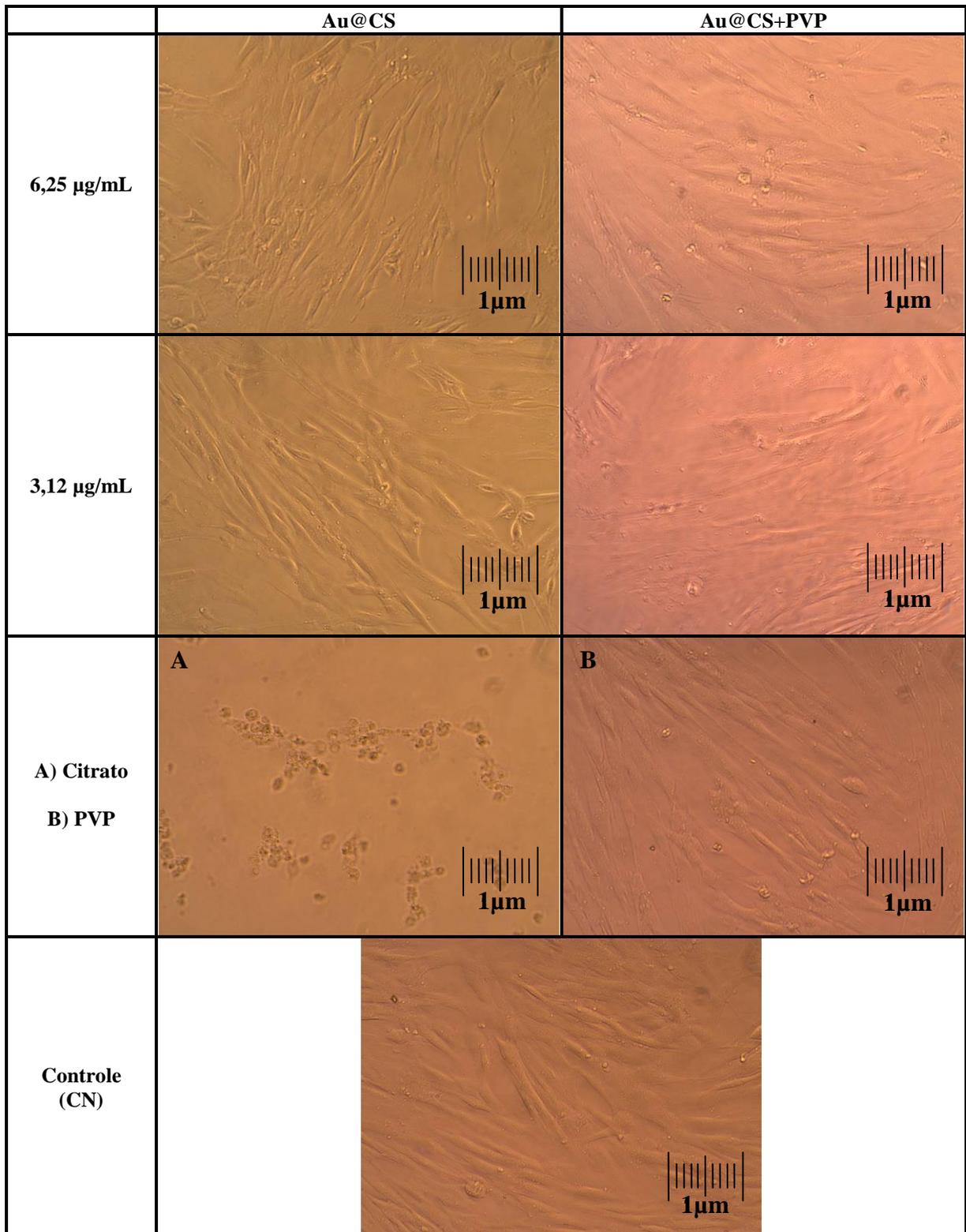
Quadro 02 – Morfologia celular após 24 horas

(continua)



Quadro 02 – Morfologia celular após 24 horas

(conclusão)

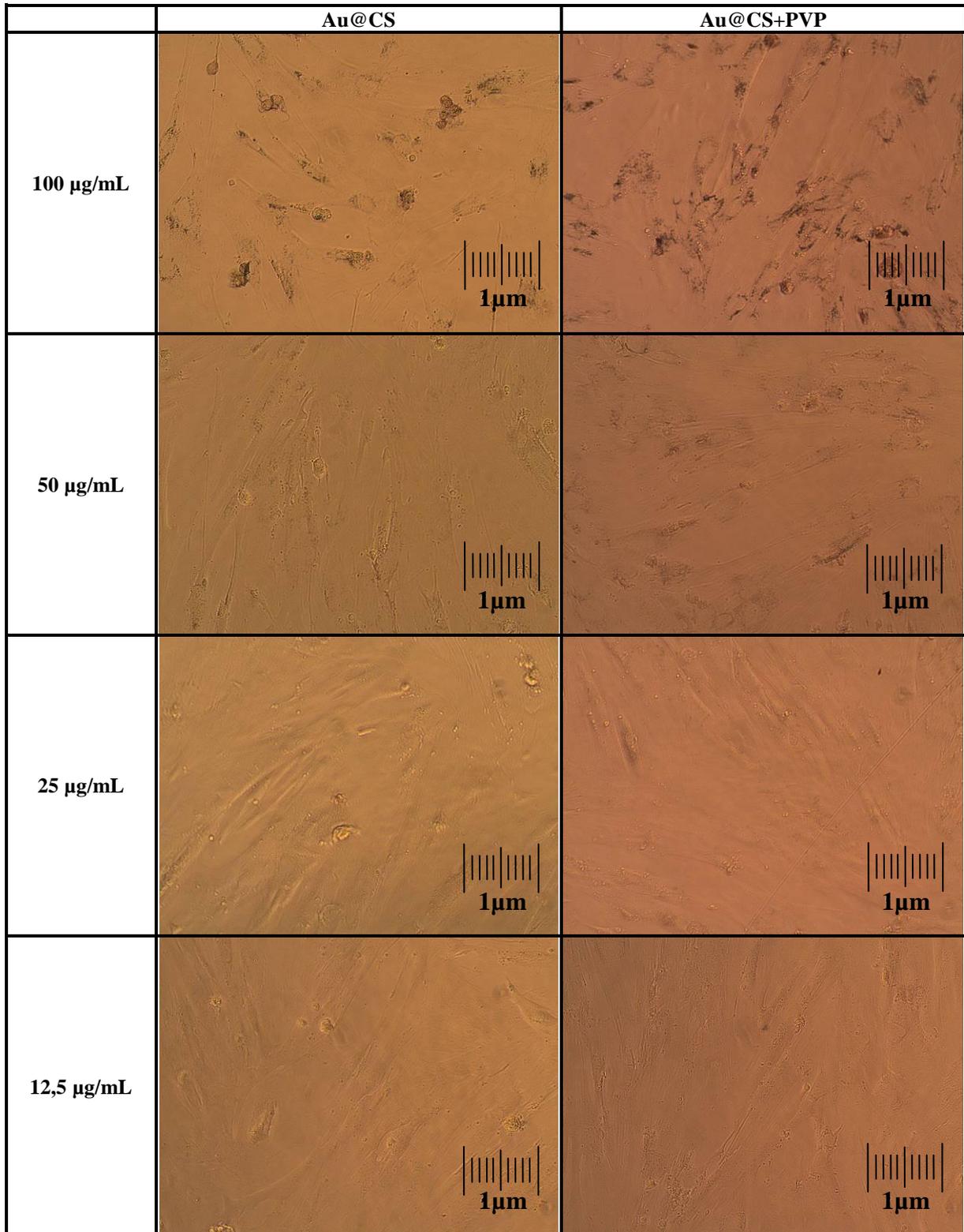


Fonte: A autora.

Notas: Aumento de 200x em microscópio óptico invertido.

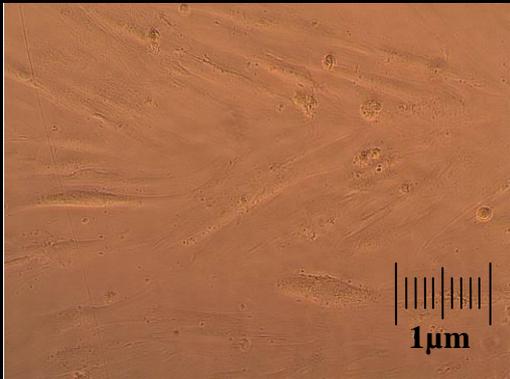
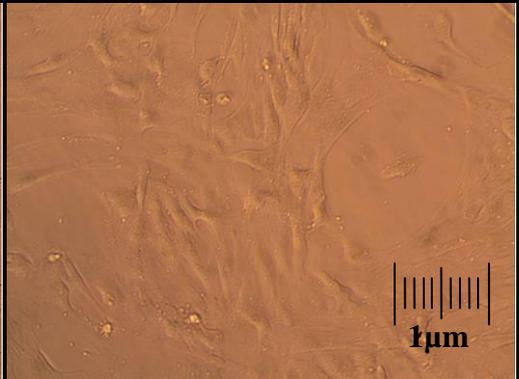
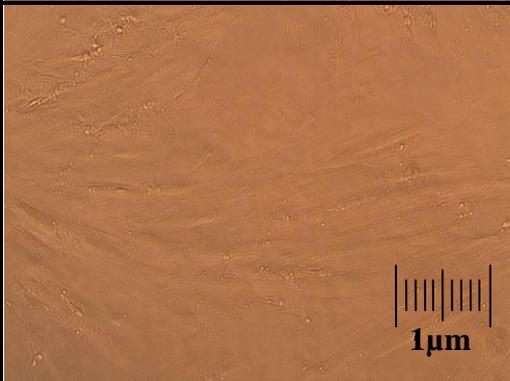
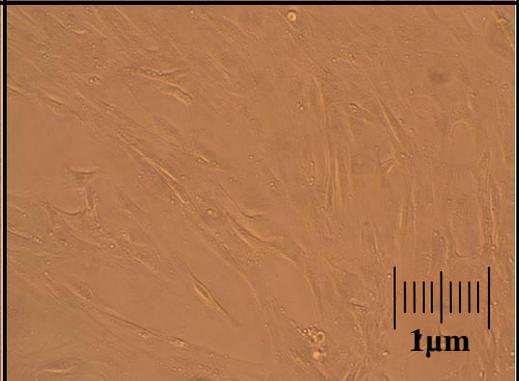
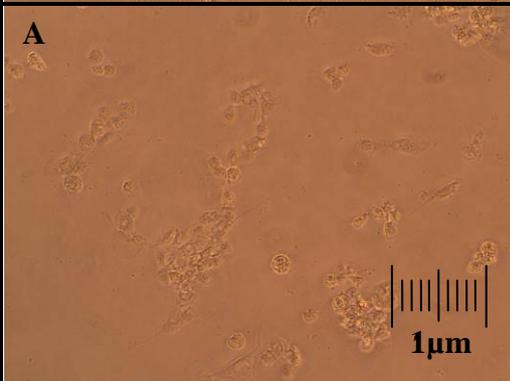
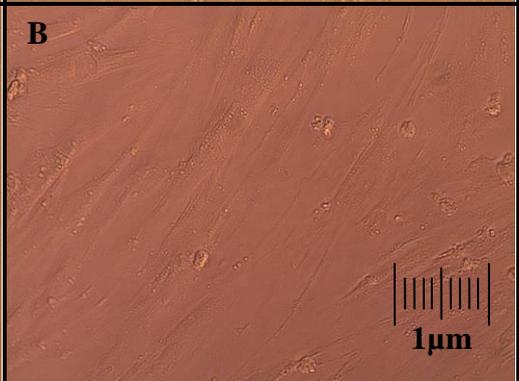
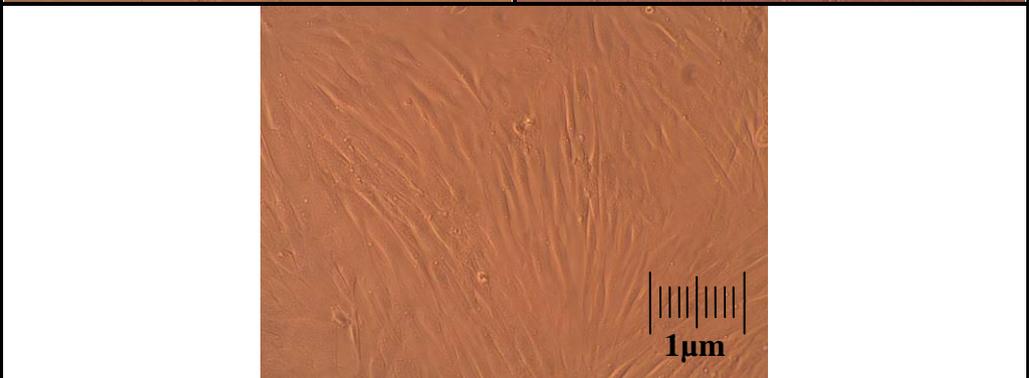
Quadro 03 – Morfologia celular após 48 horas

(continua)



Quadro 03 – Morfologia celular após 48 horas

(conclusão)

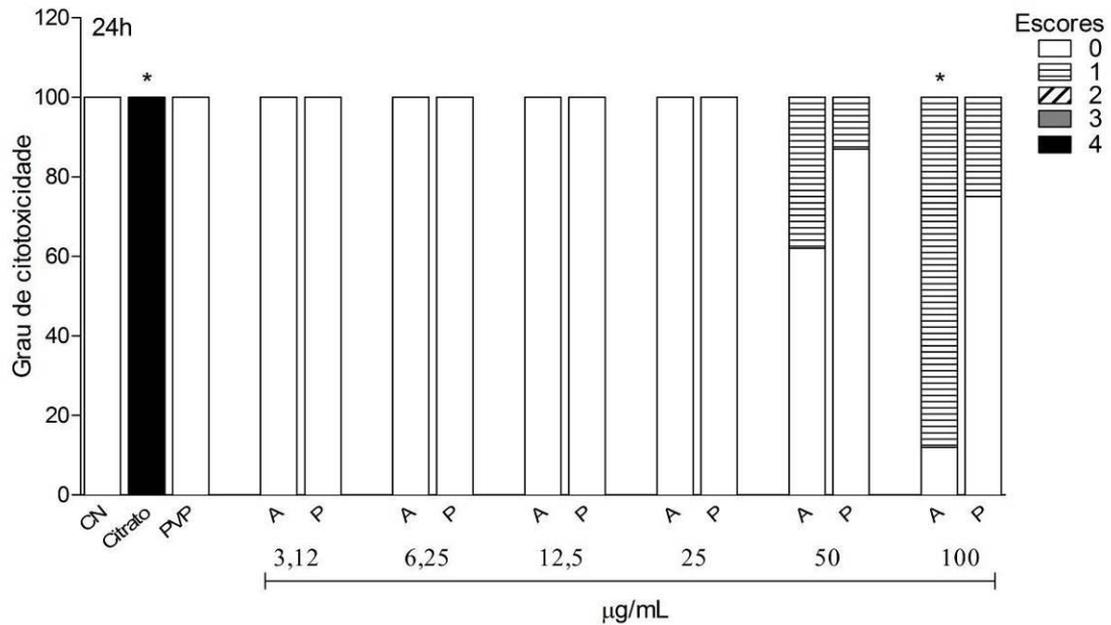
	Au@CS	Au@CS+PVP
6,25 µg/mL		
3,12 µg/mL		
A) Citrato B) PVP	A 	B 
Controle (CN)		

Fonte: A autora.

Notas: Aumento de 200x em microscópio óptico invertido.

Os resultados obtidos para a análise morfológica em 24 e 48 horas podem ser visualizados nas Figuras 23 e 24, respectivamente.

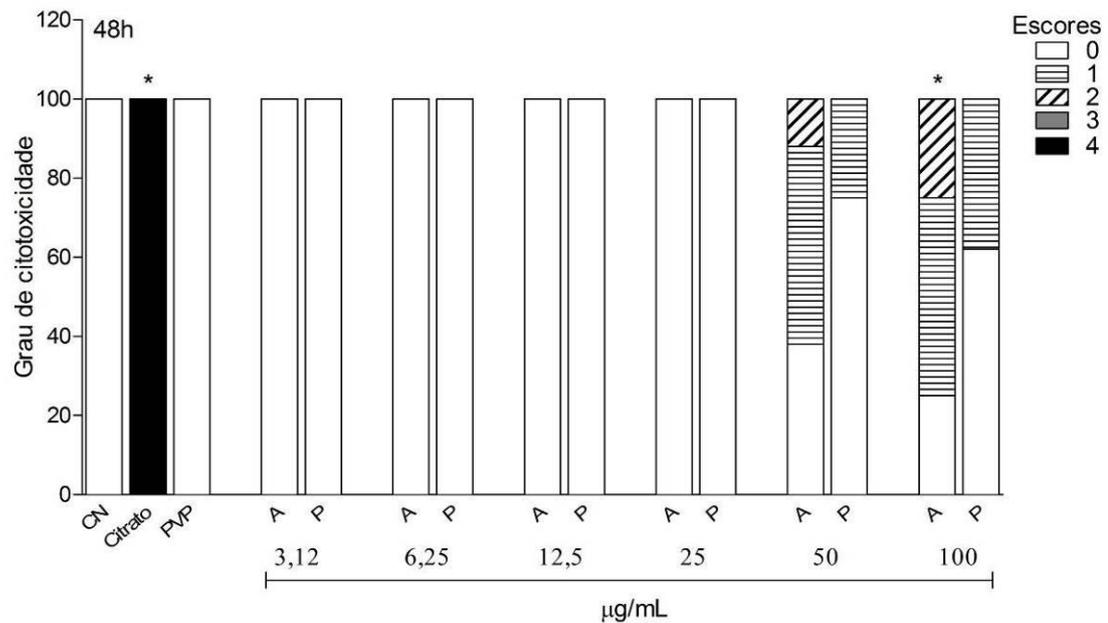
Figura 23 – Graus de alterações morfológicas em 24 horas



Fonte: A autora.

Notas: Distribuições da frequência percentual dos escores de alterações morfológicas em 24h (n=8). A = Grupo Au@CS e P = Grupo Au@CS+PVP. Escore 0 – Nenhuma alteração morfológica; Escore 1 – Muito leve; Escore 2 – Leve; Escore 3 – Moderada; Escore 4 – Severa. Teste de Kruskal–Wallis com pós teste de Dunn. * quando $p < 0,05$ em comparação ao grupo controle (CN).

Figura 24 – Graus de alterações morfológicas em 48 horas



Fonte: A autora.

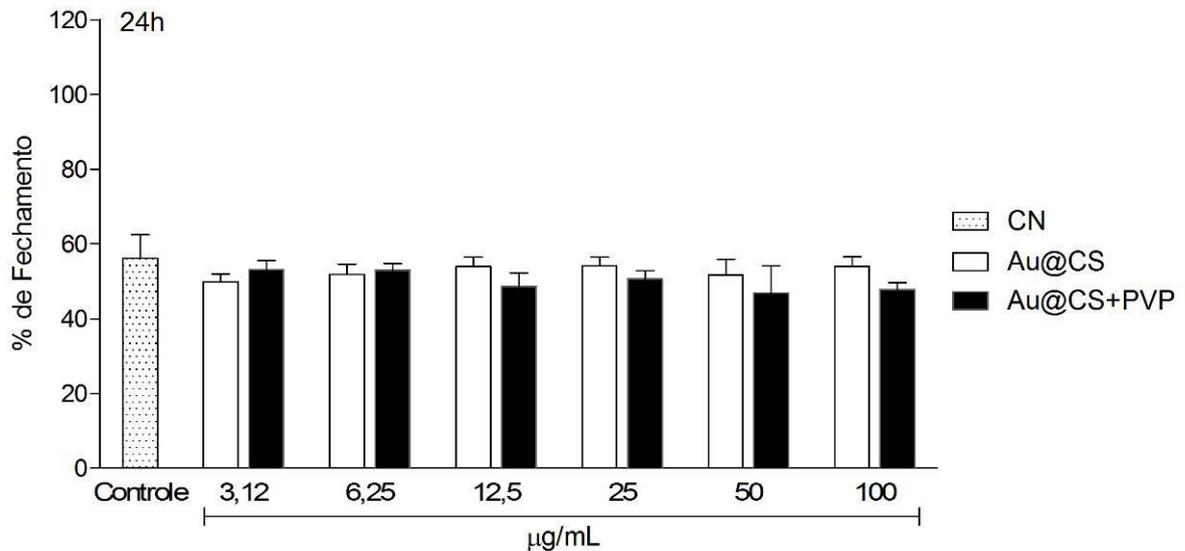
Notas: Distribuições da frequência percentual dos escores de alterações morfológicas em 48h (n=8). A = Grupo Au@CS e P = Grupo Au@CS+PVP. Teste de Kruskal–Wallis com pós teste de Dunn. * quando $p < 0,05$ em comparação ao grupo controle (CN).

5.2.3 Avaliação do efeito das nanopartículas no potencial de reparo celular

5.2.3.1 Ensaio de “Scratch”

Os índices médios de migração e proliferação celular (% de fechamento) dos grupos Au@CS e Au@CS+PVP, nos diferentes tempos experimentais (24, 48, 72 e 96 horas), são apresentados nas Figuras 25, 26, 27 e 28. Nos períodos analisados, não houve diferença significativa entre os grupos, onde todos os grupos apresentaram índice de migração e proliferação celular similar ao grupo CN (células que não receberam nenhum tratamento). Nenhum tratamento interferiu negativamente com a proliferação e migração celular. Houve o fechamento do “Scratch” para todos os grupos no último período avaliado.

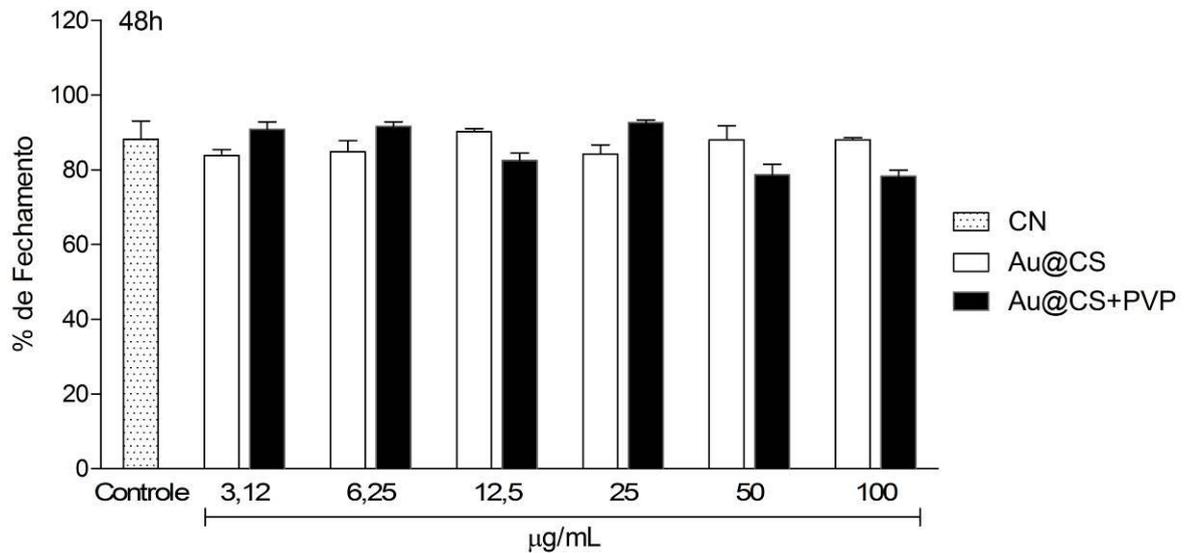
Figura 25 – Ensaio de “Scratch” em 24 horas



Fonte: A autora.

Notas: Migração e proliferação celular pelo ensaio de “Scratch” no período de 24 horas de incubação com as Au@CS e Au@CS+PVP, nas concentrações de 100; 50; 25; 12,5; 6,25 e 3,12 µg/mL. Os dados foram analisados pela análise de variância de uma via (ANOVA) seguido pelo teste de Tukey. Dados expressos em média da % de fechamento do “Scratch” (n=6) ± E.P.M. * quando $p < 0,05$ em comparação ao grupo controle (CN).

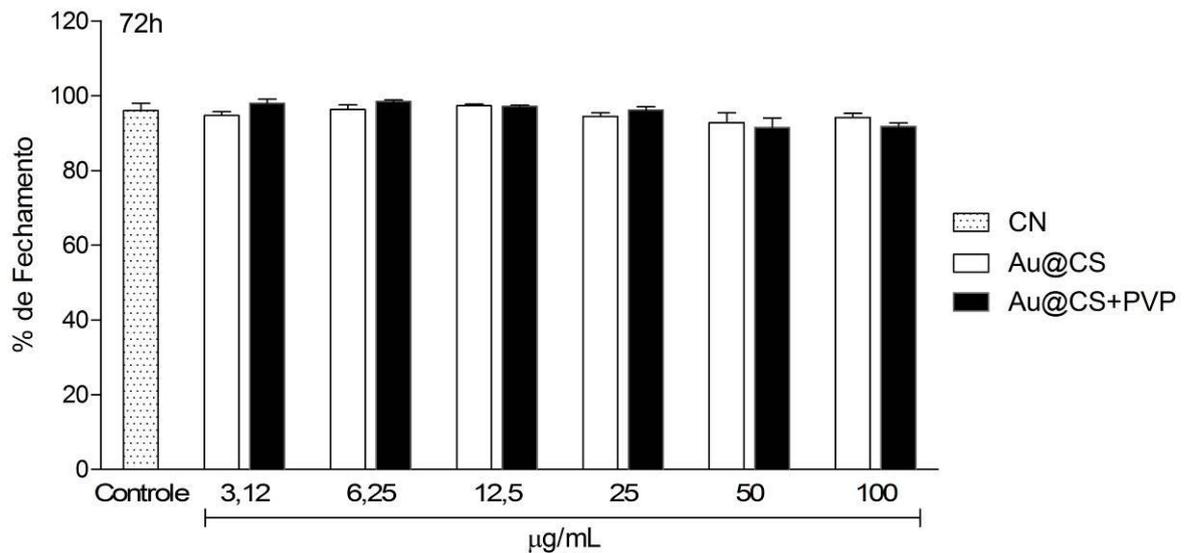
Figura 26 – Ensaio de “*Scratch*” em 48 horas



Fonte: A autora.

Notas: Migração e proliferação celular pelo ensaio de “*Scratch*” no período de 48 horas de incubação com as Au@CS e Au@CS+PVP, nas concentrações de 100; 50; 25; 12,5; 6,25 e 3,12 µg/mL. Os dados foram analisados pela análise de variância de uma via (ANOVA) seguido pelo teste de Tukey. Dados expressos em média da % de fechamento do “*Scratch*” (n=6) ± E.P.M. * quando $p < 0,05$ em comparação ao grupo controle (CN).

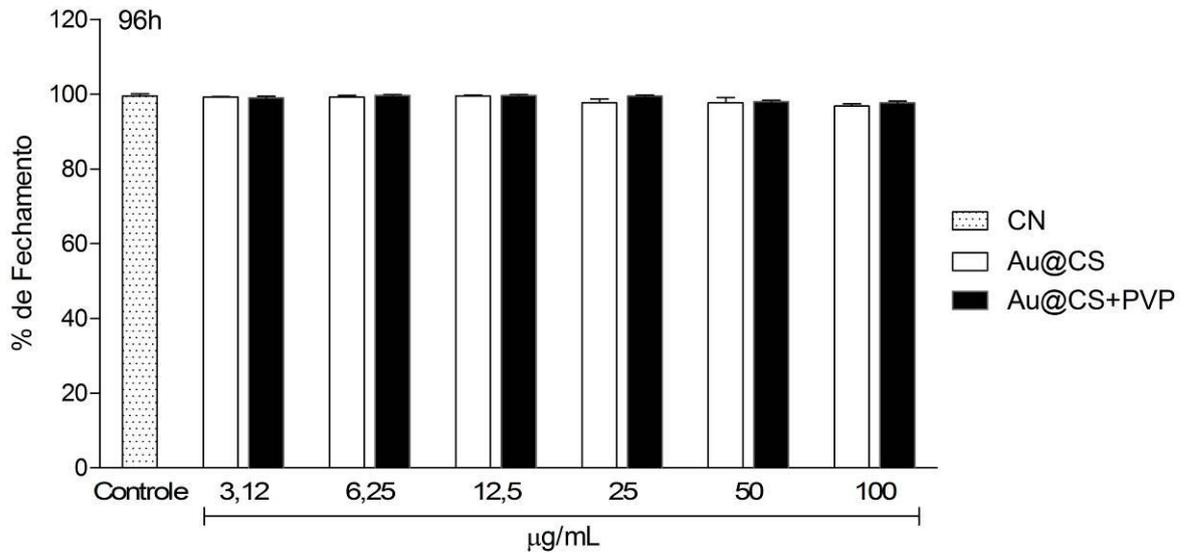
Figura 27 – Ensaio de “*Scratch*” em 72 horas



Fonte: A autora.

Notas: Migração e proliferação celular pelo ensaio de “*Scratch*” no período de 72 horas de incubação com as Au@CS e Au@CS+PVP, nas concentrações de 100; 50; 25; 12,5; 6,25 e 3,12 µg/mL. Os dados foram analisados pela análise de variância de uma via (ANOVA) seguido pelo teste de Tukey. Dados expressos em média da % de fechamento do “*Scratch*” (n=6) ± E.P.M. * quando $p < 0,05$ em comparação ao grupo controle (CN).

Figura 28 – Ensaio de “*Scratch*” em 96 horas

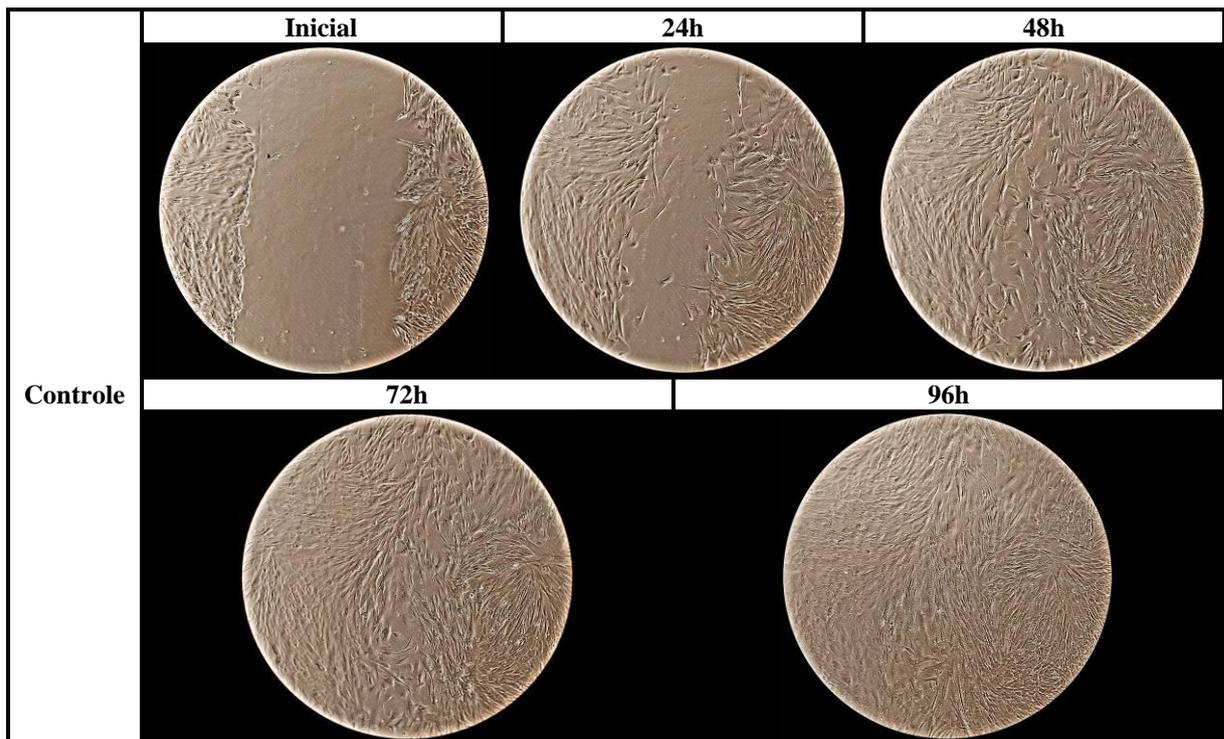


Fonte: A autora.

Notas: Migração e proliferação celular pelo ensaio de “*Scratch*” no período de 96 horas de incubação com as Au@CS e Au@CS+PVP, nas concentrações de 100; 50; 25; 12,5; 6,25 e 3,12 µg/mL. Os dados foram analisados pela análise de variância de uma via (ANOVA) seguido pelo teste de Tukey. Dados expressos em média da % de fechamento do “*Scratch*” (n=6) ± E.P.M. * quando $p < 0,05$ em comparação ao grupo controle (CN).

Os Quadros 04, 05 e 06 ilustram o comportamento migratório dos grupos experimentais nos tempos de 0, 24, 48, 72 e 96 horas.

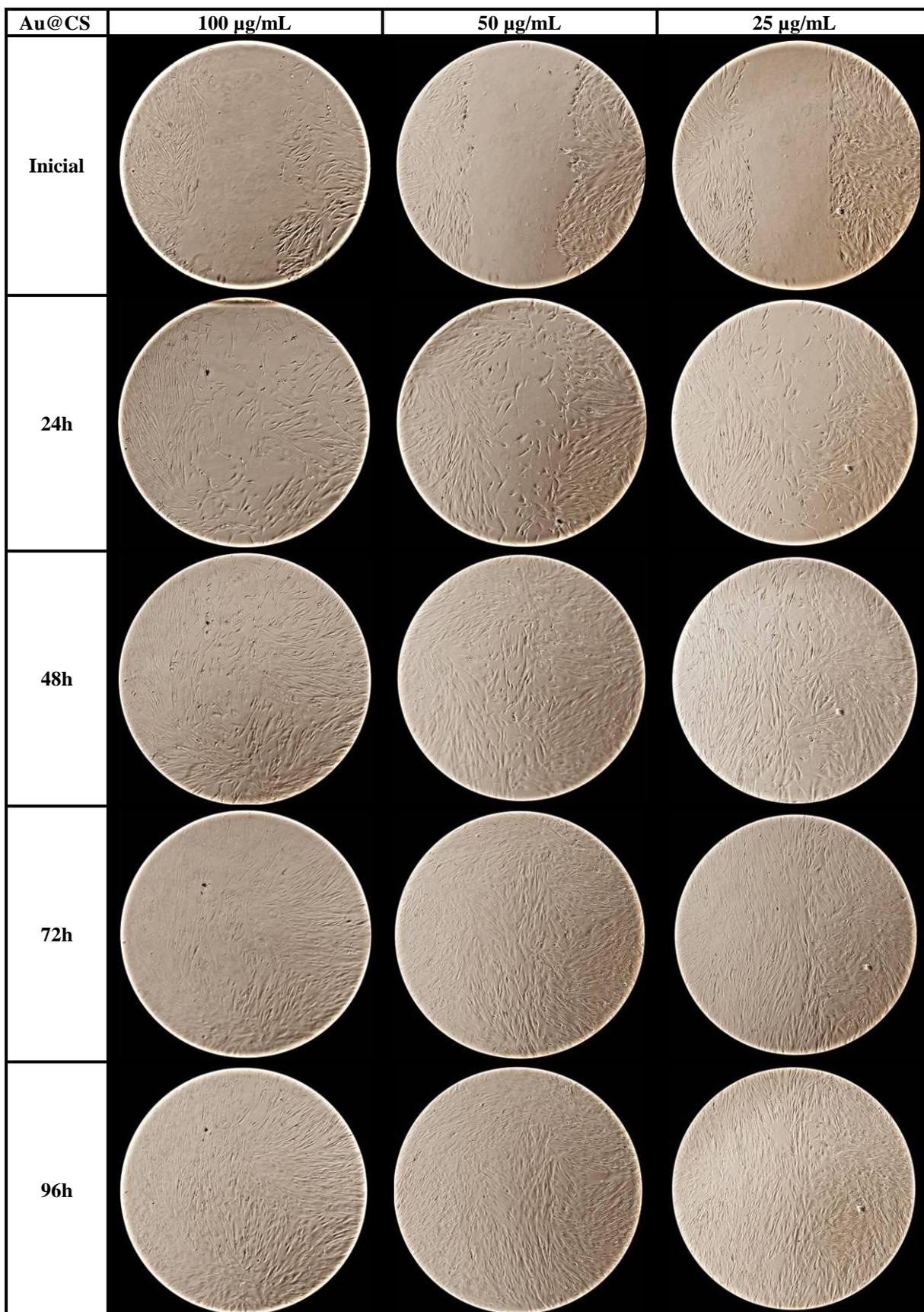
Quadro 04 – Comportamento migratório – Controle



Fonte: A autora.

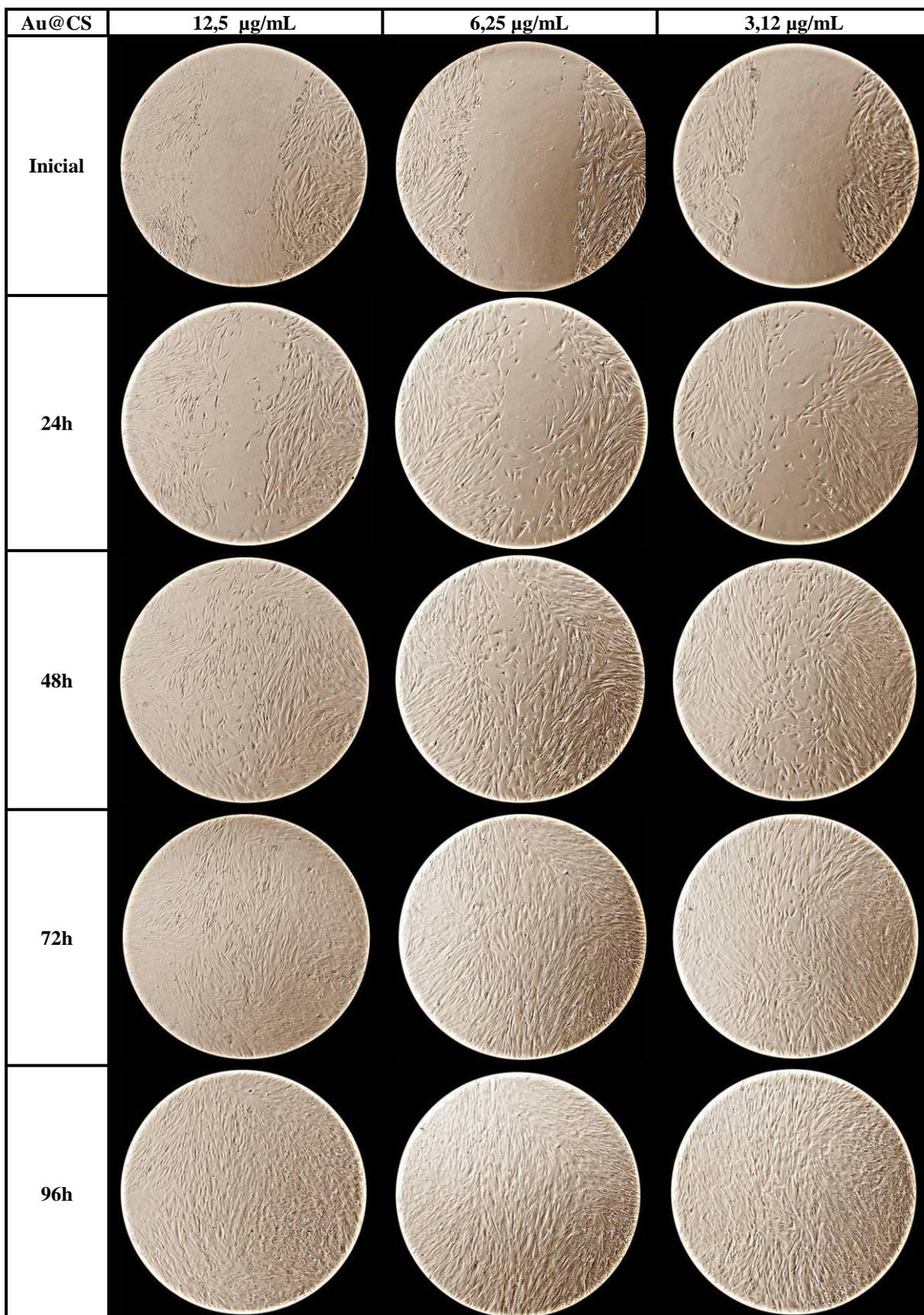
Quadro 05 – Comportamento migratório – Au@CS

(continua)



Quadro 05 – Comportamento migratório – Au@CS

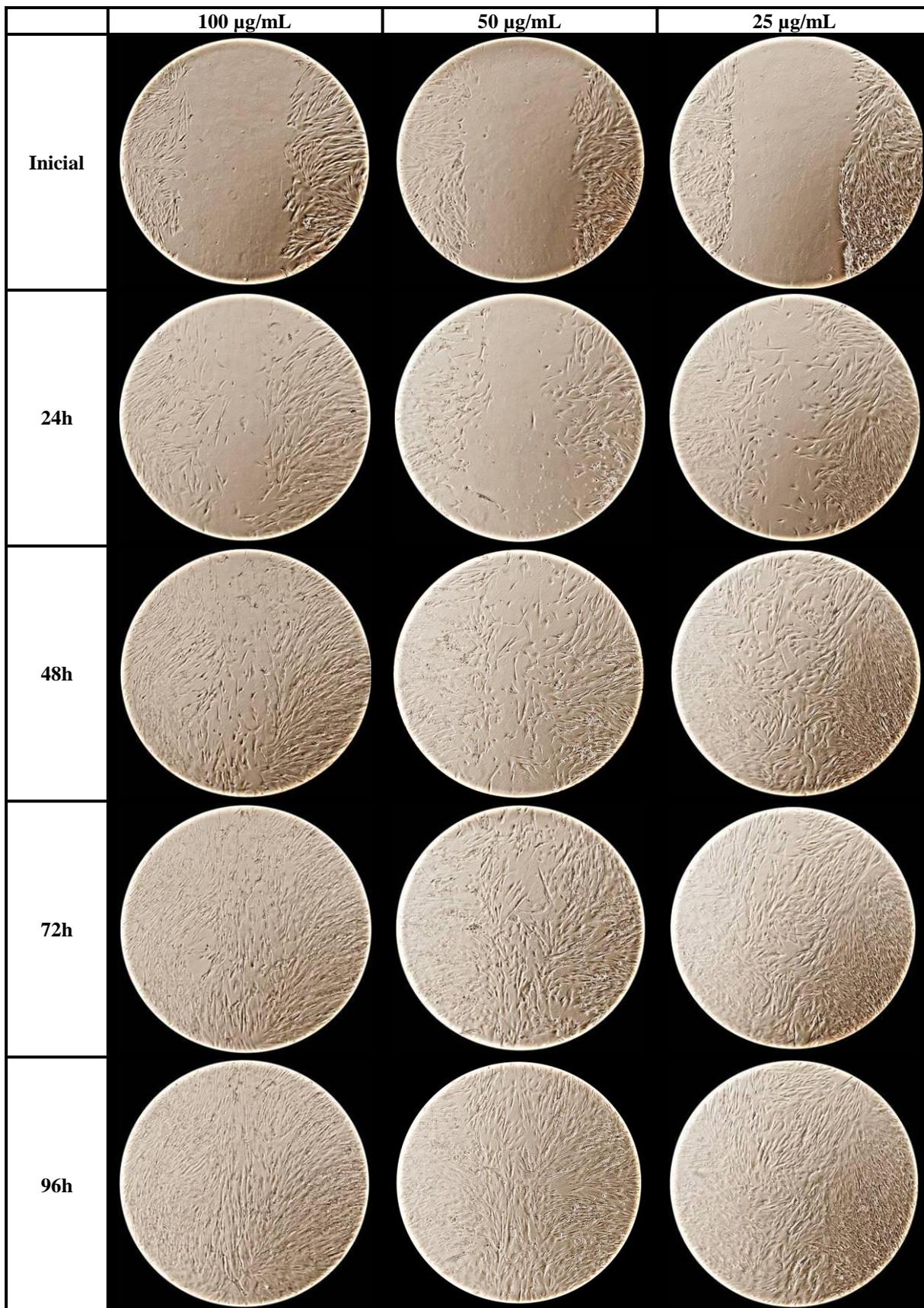
(conclusão)



Fonte: A autora.

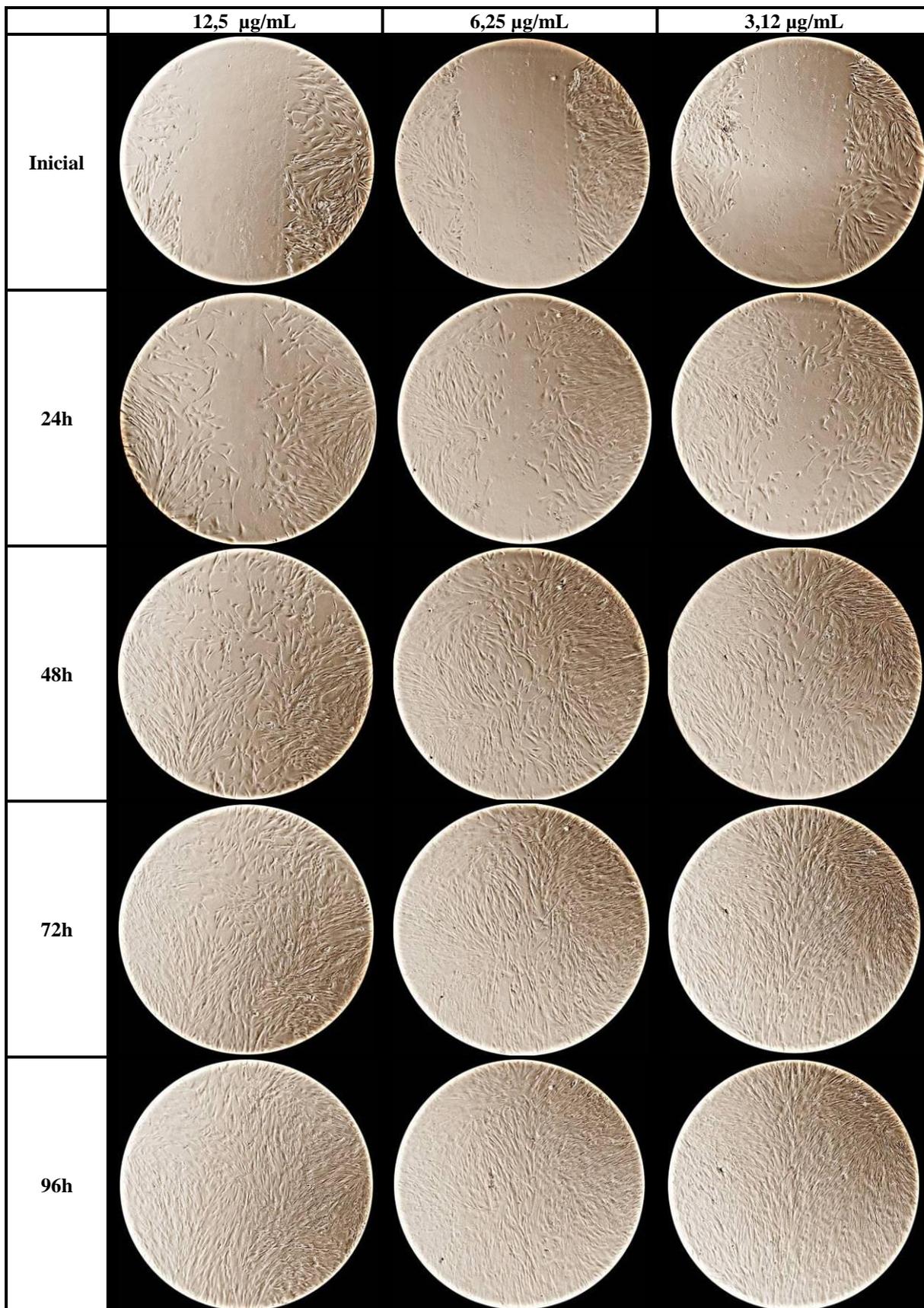
Quadro 06 – Comportamento migratório – Au@CS+PVP

(continua)



Quadro 06 – Comportamento migratório – Au@CS+PVP

(conclusão)

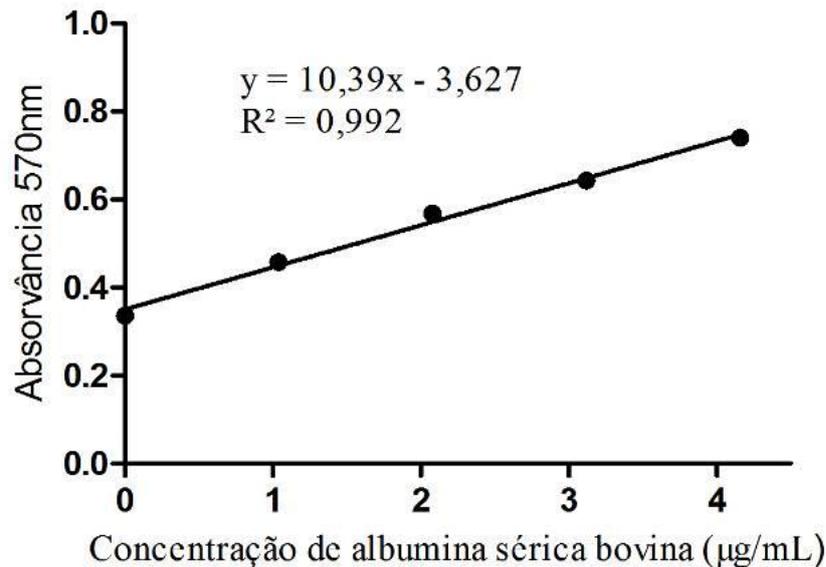


Fonte: A autora.

5.2.3.2 Ensaio de quantificação de proteínas totais

Os resultados obtidos para a curva padrão de albumina sérica bovina (BSA) podem ser visualizados na Figura 29.

Figura 29 – Curva padrão para a quantificação de proteínas pelo método de Bradford



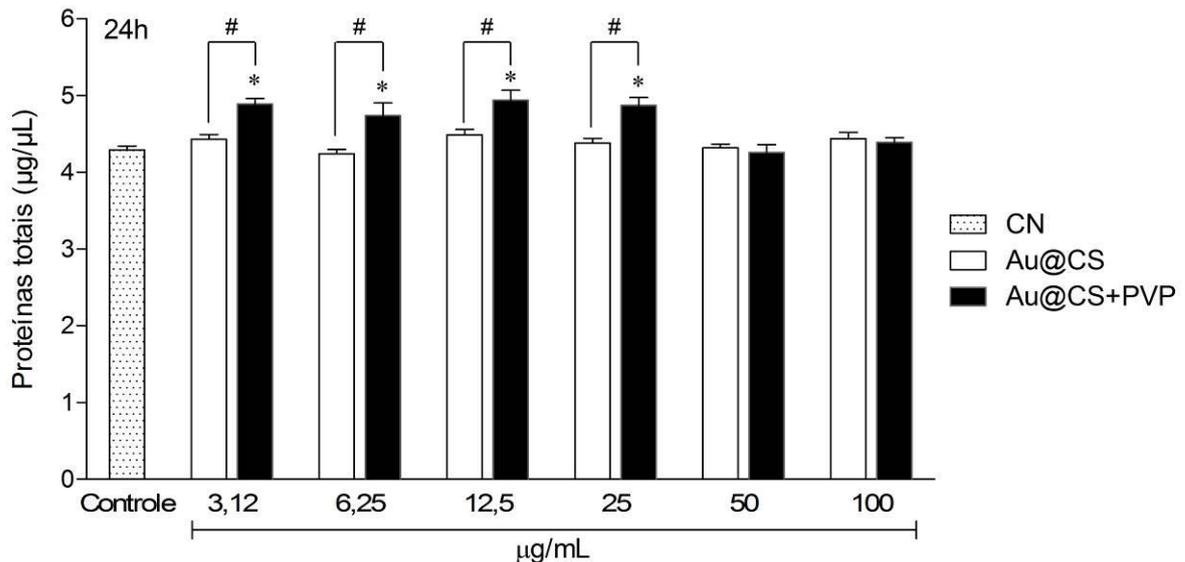
Fonte: A autora.

Conforme pode ser observado, a correlação entre absorvância a 570 nm e concentração de albumina sérica bovina se mostrou linear para concentrações de albumina variando entre 1,04 e 4,16 µg/mL.

Os resultados obtidos para as Au@CS e Au@CS+PVP no ensaio de quantificação de proteínas totais foram comparados com a curva padrão de albumina sérica bovina (BSA) e podem ser verificados na Figura 30.

No teste de quantificação de proteínas totais após 24h de incubação das células com os tratamentos, ocorreu um aumento na quantidade de proteínas ($p < 0,05$) para os grupos de Au@CS+PVP nas concentrações de 3,12; 6,25; 12,5 e 25 µg/mL quando comparados ao grupo controle. O grupo Au@CS+PVP de 3,12 µg/mL foi capaz de aumentar a quantidade de proteínas em $14 \pm 3\%$, o grupo Au@CS+PVP de 6,25 µg/mL em $11 \pm 7\%$, Au@CS+PVP de 12,5 µg/mL em $15 \pm 5\%$ e as Au@CS+PVP de 25 µg/mL em $13 \pm 4\%$. A comparação dos valores entre Au@CS e Au@CS+PVP mostrou diferenças significativas ($p < 0,05$) para as concentrações de 3,12; 6,25; 12,5 e 25 µg/mL.

Figura 30 – Quantificação de proteínas totais pelo Método de Bradford



Fonte: A autora.

Notas: Concentração de proteínas totais de células indiferenciadas da polpa dental humana pelo Método de Bradford no período de 24 horas de incubação com as Au@CS e Au@CS+PVP, nas concentrações de 100; 50; 25; 12,5; 6,25 e 3,12 µg/mL. Os dados foram analisados pela análise de variância de uma via (ANOVA) seguido pelo teste de Tukey. Dados expressos em concentração de proteínas totais em µg/µL (n=3) ± E.P.M. * quando $p < 0,05$ em comparação ao grupo controle (CN). # quando $p < 0,05$ intergrupos.

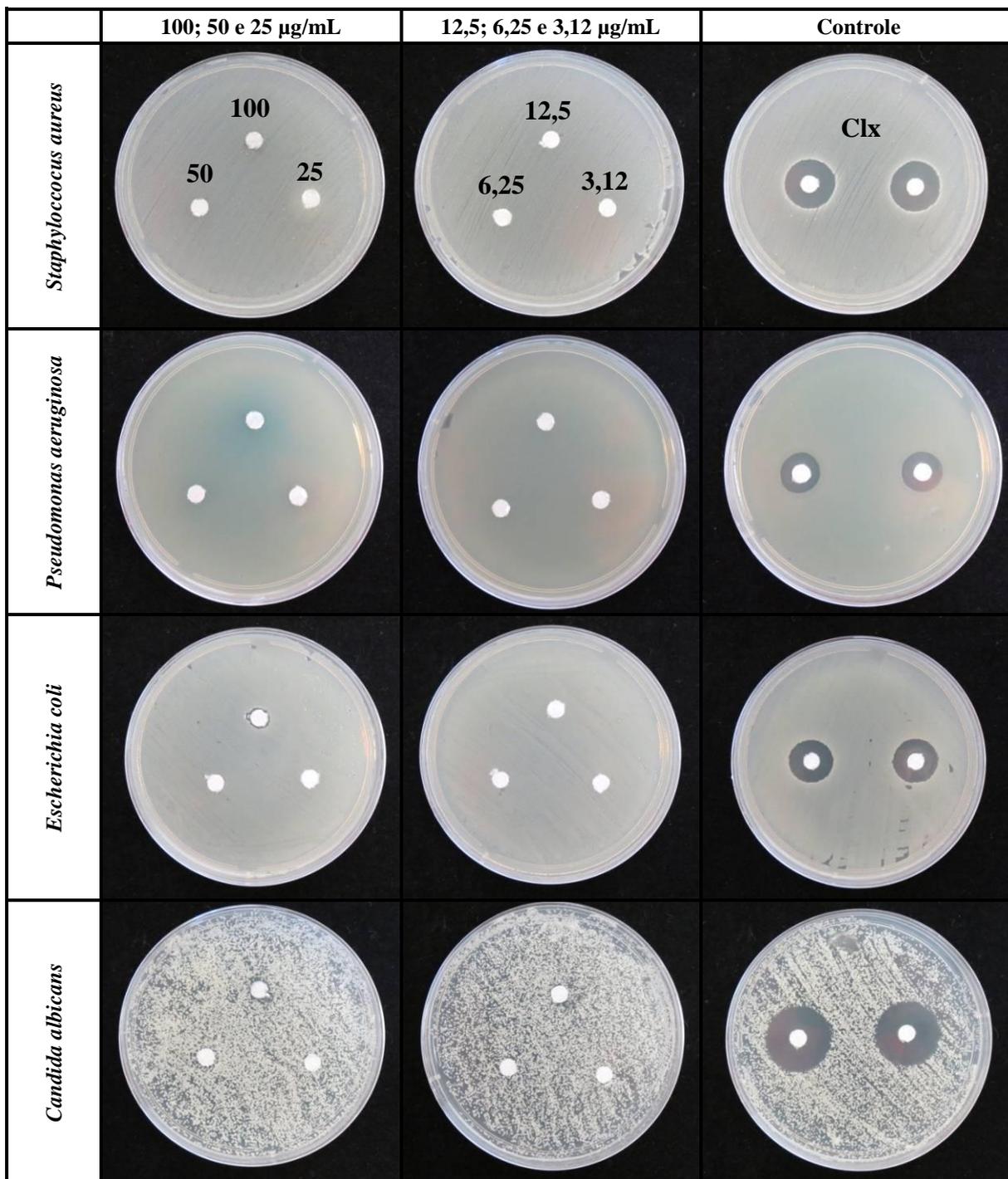
5.3 AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES ANTIMICROBIANAS

O efeito antimicrobiano das nanopartículas de ouro (Au@CS – 100; 50; 25; 12,5; 6,25 e 3,12 µg/mL) foi avaliado através dos testes de difusão em ágar (disco e cavidade) e microdiluição em caldo.

5.3.1 Teste de Difusão em disco

Para o teste de difusão em disco, as placas foram satisfatoriamente semeadas apresentando um tapete confluyente de crescimento microbiano e os halos de inibição resultantes apresentavam-se uniformemente circulares, como pode ser observado no Quadro 07.

Quadro 07 – Teste de Difusão em disco

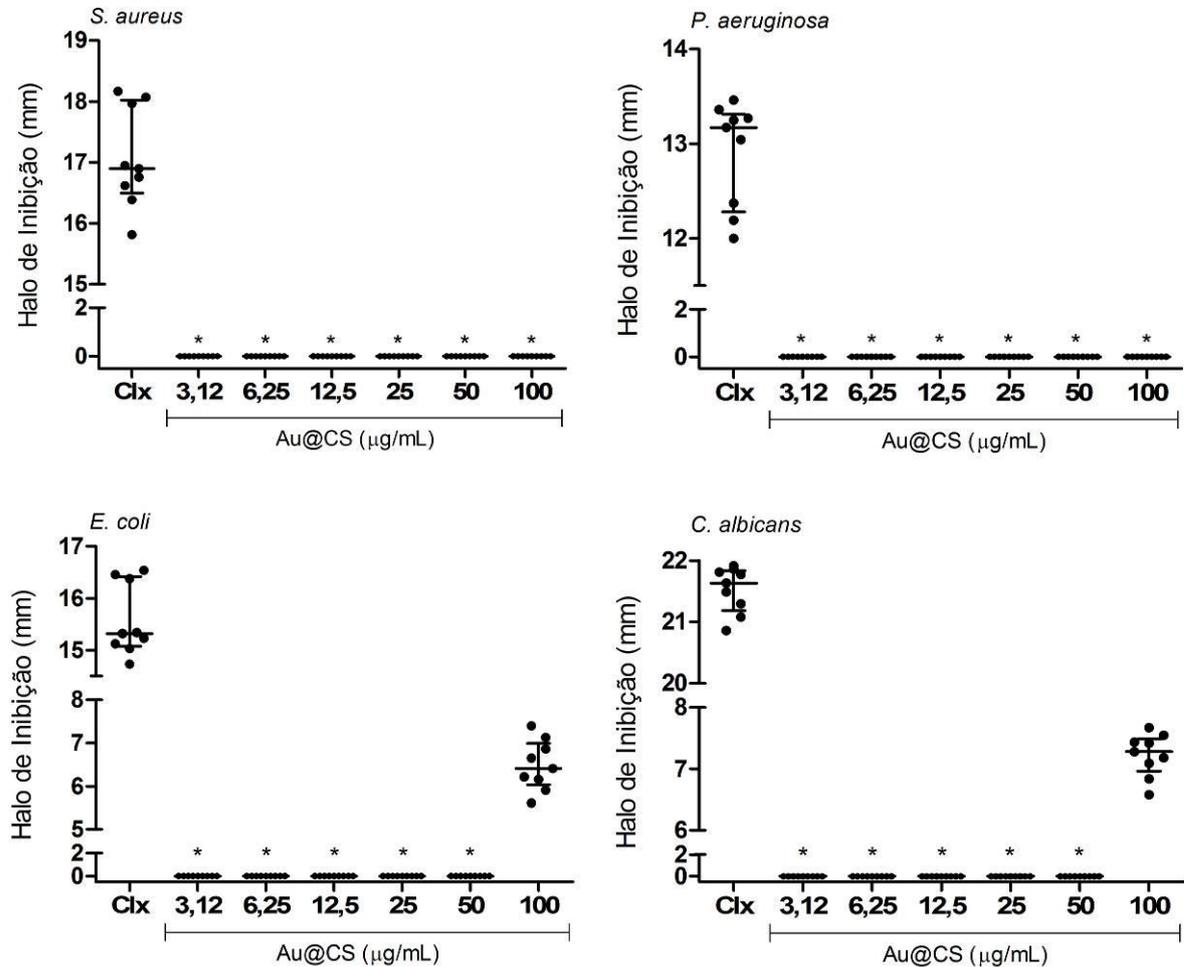


Fonte: A autora.

No teste de difusão em disco após 24 horas de incubação das placas a 35°C, foram observados halos de inibição para as Au@CS na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ para as cepas de *Escherichia coli* e *Candida albicans*. Os valores dos halos de inibição medidos para

Escherichia coli variaram entre 5,61 – 7,40 mm e os valores medidos para *Candida albicans* variaram entre 6,58 – 7,67 mm como apresentado na Figura 31.

Figura 31 – Halos de inibição – Teste de Difusão em disco



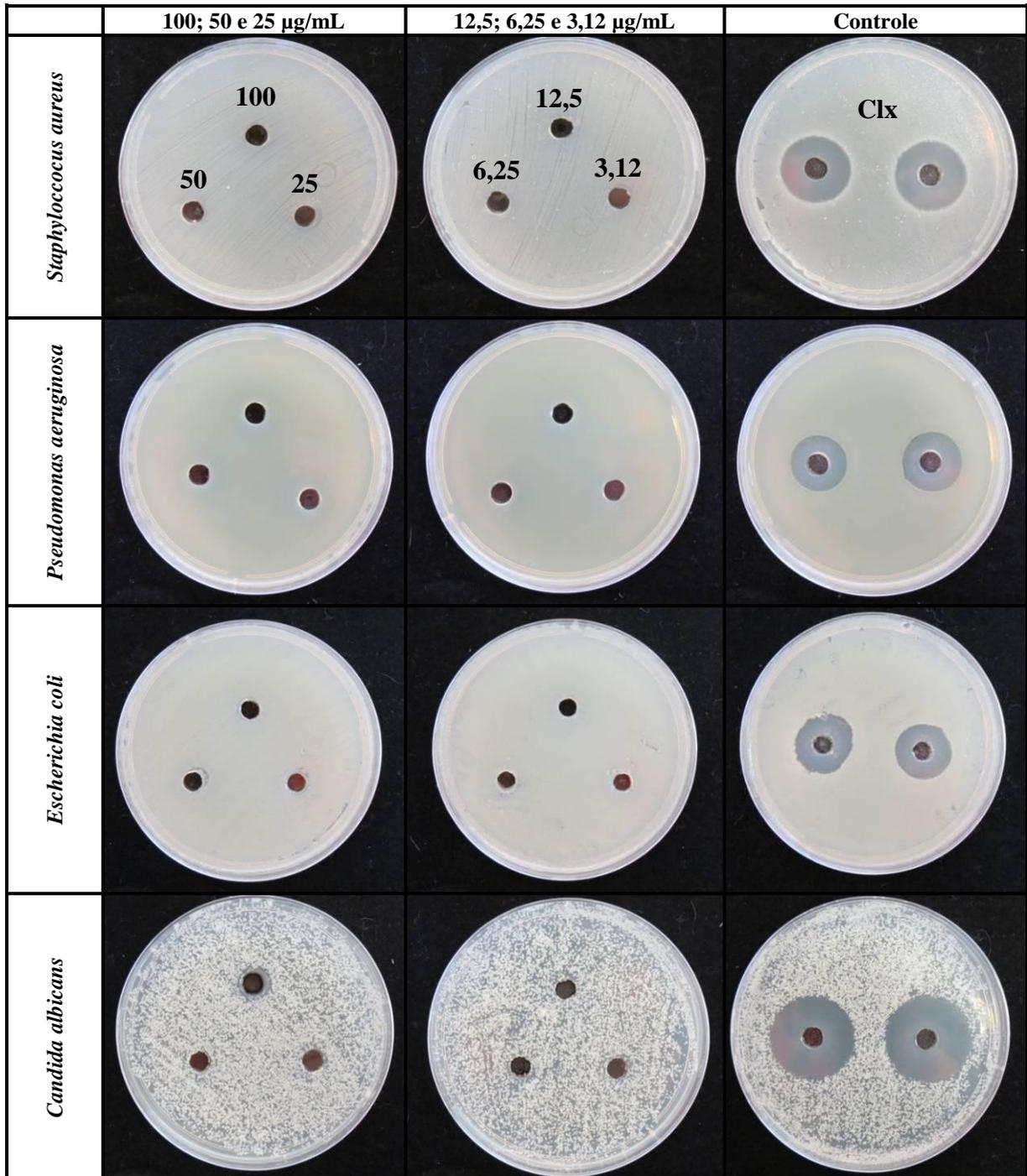
Fonte: A autora.

Notas: Halos de inibição do crescimento microbiano em mm (*S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* e *C. albicans*) obtidos com nanopartículas de ouro nas concentrações de 100; 50; 25; 12,5; 6,25 e 3,12 µg/mL. Pontos representam os elementos amostrais e linhas a mediana e intervalo interquartilico (n=9). Teste de Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn. * quando $p < 0,05$ em comparação ao grupo controle (Clx).

5.3.2 Teste de Difusão em cavidade

Para o teste de difusão em cavidade, as placas foram satisfatoriamente semeadas apresentando um tapete confluyente de crescimento microbiano e os halos de inibição resultantes apresentavam-se uniformemente circulares, como pode ser observado no Quadro 08.

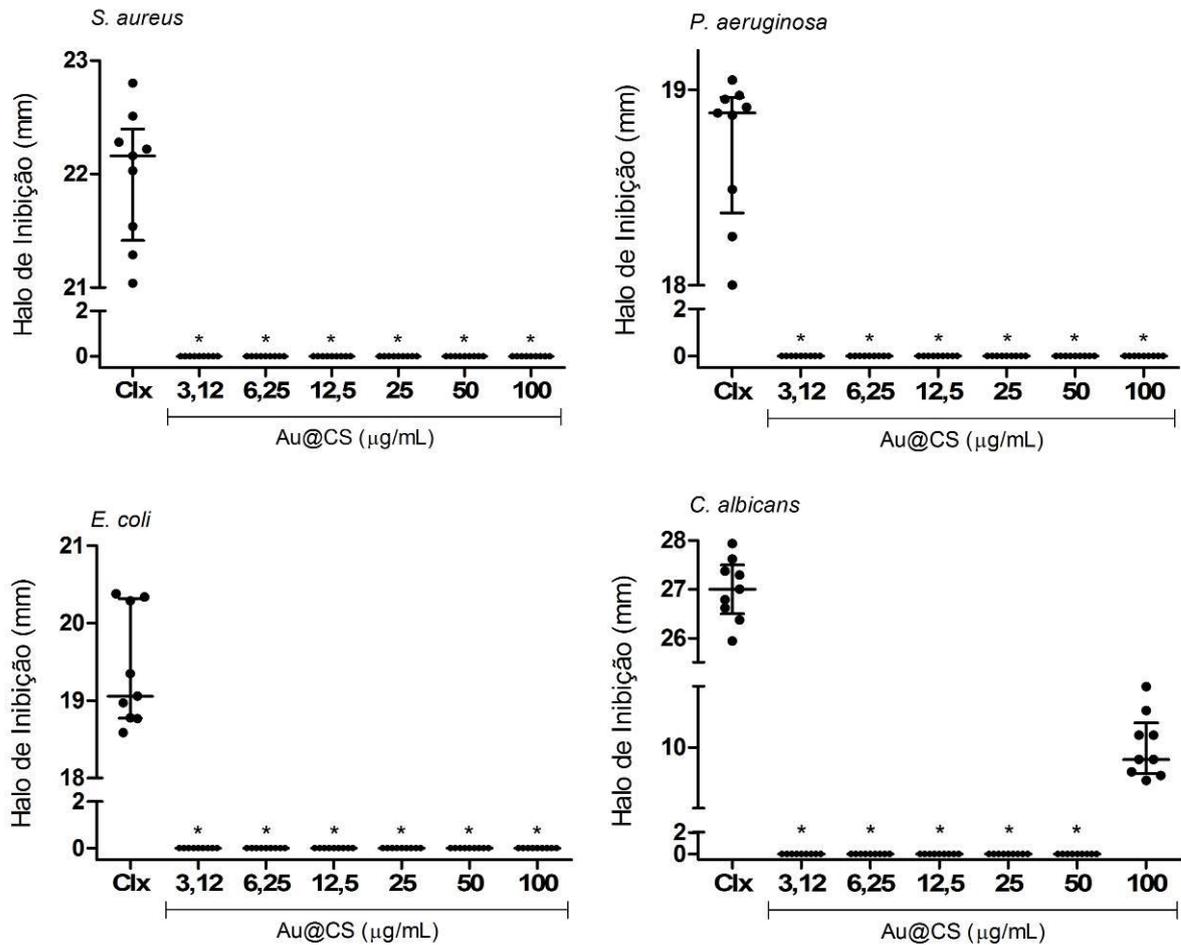
Quadro 08 – Teste de Difusão em cavidade



Fonte: A autora.

No teste de difusão em cavidade após 24 horas de incubação das placas a 35°C, foram observados halos de inibição para as Au@CS na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ para a cepa de *Candida albicans*. Os valores dos halos de inibição medidos variaram entre 9,73 – 10,5 mm como apresentado na Figura 32.

Figura 32 – Halos de inibição – Teste de Difusão em cavidade



Fonte: A autora.

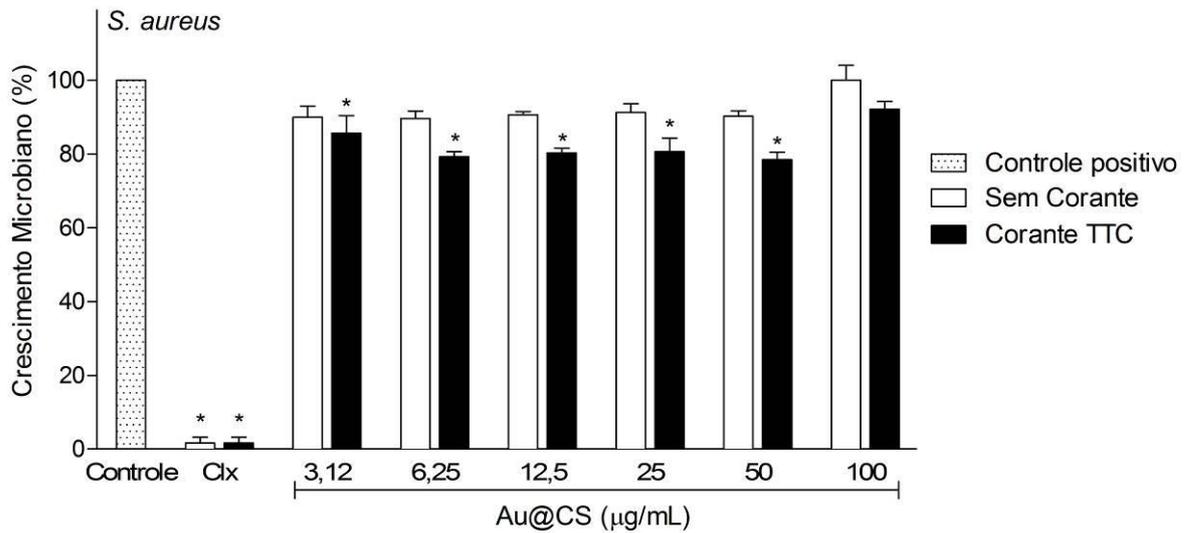
Notas: Halos de inibição do crescimento microbiano em mm (*S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* e *C. albicans*) obtidos com nanopartículas de ouro nas concentrações de 100; 50; 25; 12,5; 6,25 e 3,12 µg/mL. Pontos representam os elementos amostrais e linhas a mediana e intervalo interquartilico (n=9). Teste de Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn. * quando $p < 0,05$ em comparação ao grupo controle (Clx).

5.3.3 Teste de Microdiluição

Os resultados obtidos em espectrofotômetro (450 nm) para o teste de microdiluição em caldo para os microrganismos *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* e *C. albicans* podem ser observados nas Figuras 33, 34, 35 e 36, respectivamente.

Após a aplicação dos corantes TTC (cloreto de 2,3,5 trifeniltetrazólio) para as bactérias e XTT (2,3-Bis-(2-Methoxy-4-nitro-5-sulfofenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide) para a levedura, os poços nos quais ocorreram crescimento microbiano coraram de vermelho (TTC) e laranja (XTT), os poços nos quais não ocorreram crescimento microbiano permaneceram incolores, como pode ser visualizado na Figura 37.

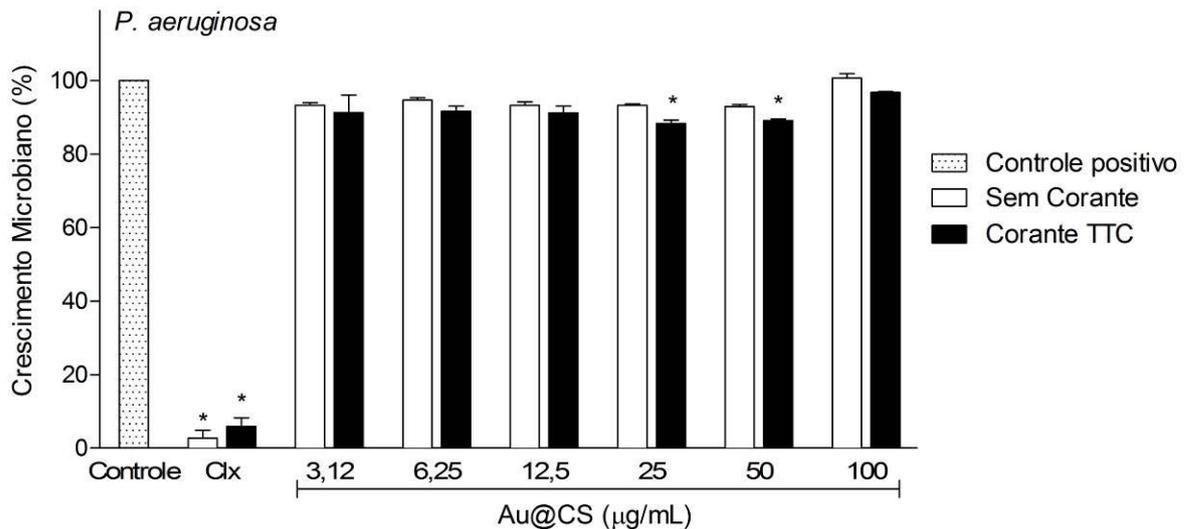
Figura 33 – Microdiluição em caldo – *S. aureus*



Fonte: A autora.

Notas: Crescimento microbiano pelo método de microdiluição em caldo no período de 24 horas de incubação com as Au@CS, nas concentrações de 100; 50; 25; 12,5; 6,25 e 3,12 µg/mL. Os dados foram analisados pela análise de variância de uma via (ANOVA) seguido pelo teste de Tukey. Dados expressos em média da % de crescimento microbiano (n=6) ± E.P.M. * quando $p < 0,05$ em comparação ao grupo controle positivo (crescimento bacteriano sem tratamento).

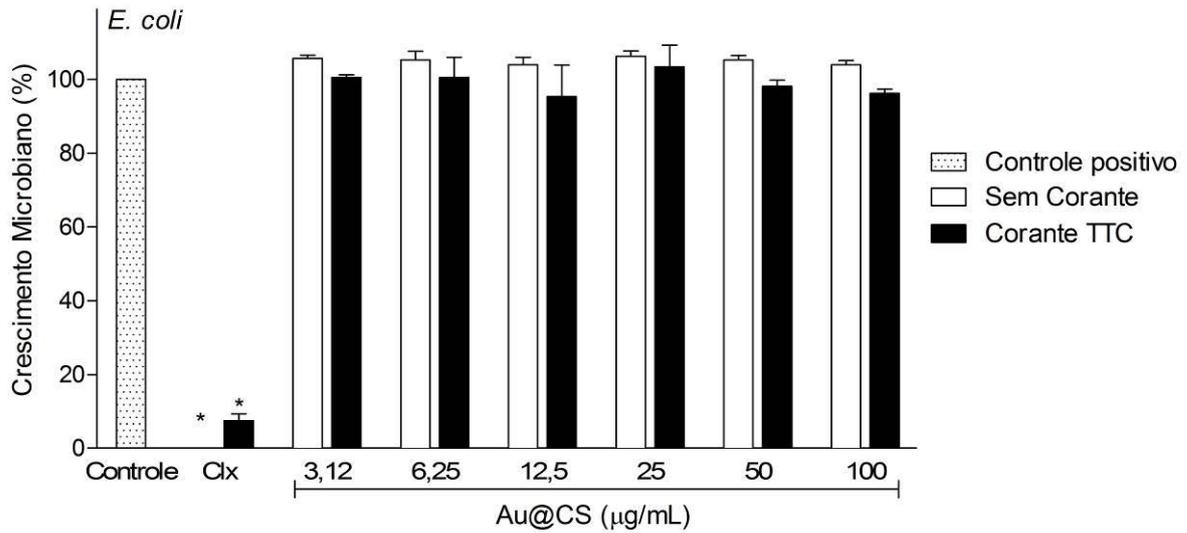
Figura 34 – Microdiluição em caldo – *P. aeruginosa*



Fonte: A autora.

Notas: Crescimento microbiano pelo método de microdiluição em caldo no período de 24 horas de incubação com as Au@CS, nas concentrações de 100; 50; 25; 12,5; 6,25 e 3,12 µg/mL. Os dados foram analisados pela análise de variância de uma via (ANOVA) seguido pelo teste de Tukey. Dados expressos em média da % de crescimento microbiano (n=6) ± E.P.M. * quando $p < 0,05$ em comparação ao grupo controle positivo (crescimento bacteriano sem tratamento).

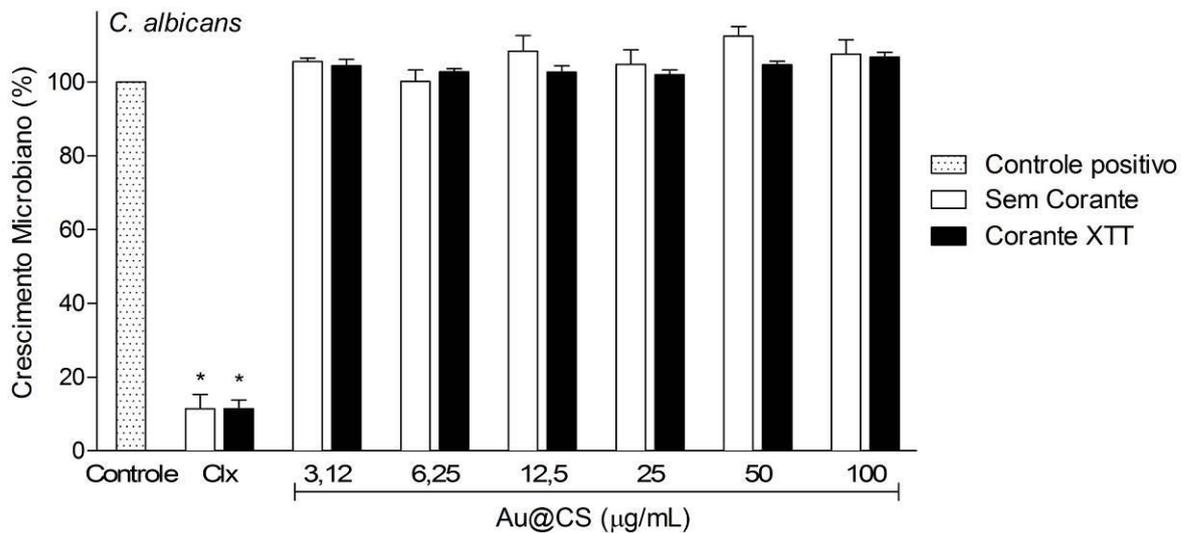
Figura 35 – Microdiluição em caldo – *E. coli*



Fonte: A autora.

Notas: Crescimento microbiano pelo método de microdiluição em caldo no período de 24 horas de incubação com as Au@CS, nas concentrações de 100; 50; 25; 12,5; 6,25 e 3,12 µg/mL. Os dados foram analisados pela análise de variância de uma via (ANOVA) seguido pelo teste de Tukey. Dados expressos em média da % de crescimento microbiano (n=6) ± E.P.M. * quando $p < 0,05$ em comparação ao grupo controle positivo (crescimento bacteriano sem tratamento).

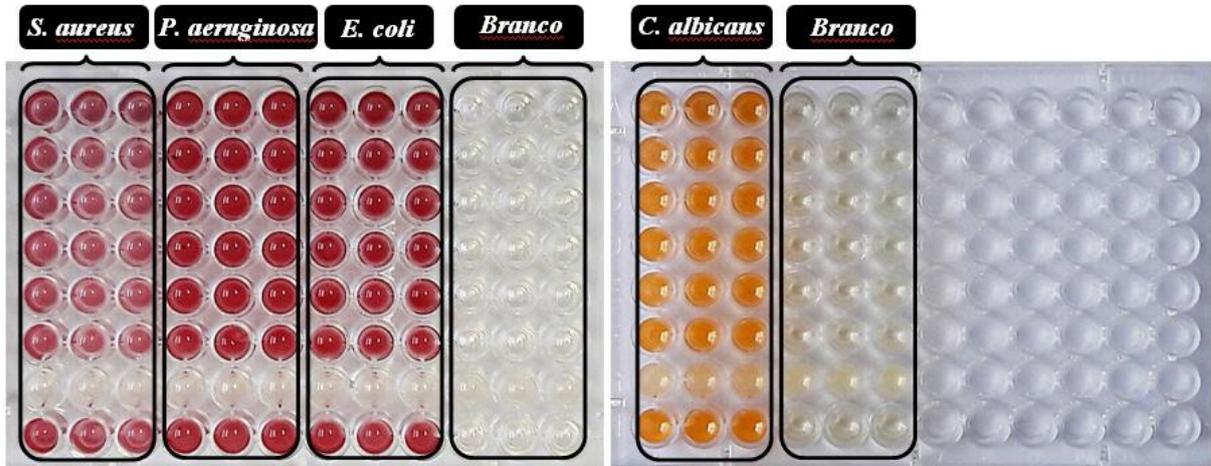
Figura 36 – Microdiluição em caldo – *C. albicans*



Fonte: A autora.

Notas: Crescimento microbiano pelo método de microdiluição em caldo no período de 24 horas de incubação com as Au@CS, nas concentrações de 100; 50; 25; 12,5; 6,25 e 3,12 µg/mL. Os dados foram analisados pela análise de variância de uma via (ANOVA) seguido pelo teste de Tukey. Dados expressos em média da % de crescimento microbiano (n=6) ± E.P.M. * quando $p < 0,05$ em comparação ao grupo controle positivo (crescimento microbiano sem tratamento).

Figura 37 – Teste de microdiluição em caldo – corantes TTC e XTT



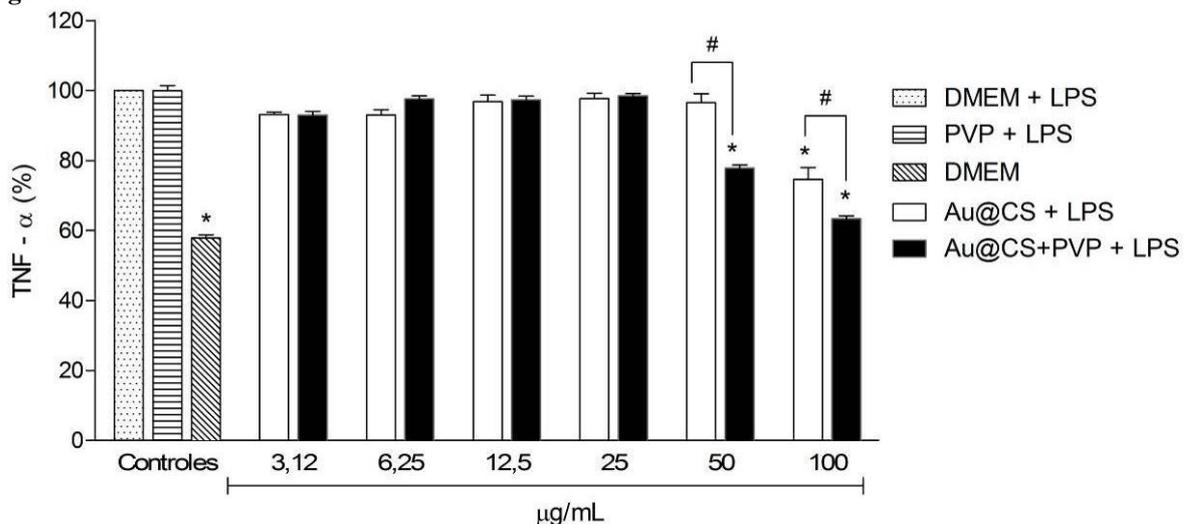
Fonte: A autora.

Notas: Plaqueamento segundo a Figura 14.

5.4 AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES ANTI-INFLAMATÓRIAS

A estimulação dos macrófagos J774 com LPS causou aumento significativo ($p < 0,05$) no nível de TNF- α no sobrenadante das células em cultura (grupo DMEM “versus” DMEM+LPS). O aumento no nível de TNF- α no sobrenadante das células foi inibido pela adição das Au@CS na concentração de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($p < 0,05$), sendo capaz de inibir em $25 \pm 12\%$ a liberação da citocina. A adição das Au@CS+PVP nas concentrações de 50 e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, foi capaz de inibir a liberação da citocina em $22 \pm 3\%$ e $37 \pm 3\%$, respectivamente. Os resultados obtidos podem ser verificados na Figura 38.

Figura 38 – Ensaio de Elisa



Fonte: A autora.

Notas: Liberação de TNF- α no período de 24 horas de incubação com as Au@CS e Au@CS+PVP. Os dados foram analisados pela análise de variância de uma via (ANOVA) seguido pelo teste de Tukey. Dados expressos em média da % de liberação de citocinas ($n=12$) \pm E.P.M. * quando $p < 0,05$ em comparação ao grupo DMEM+LPS. # quando $p < 0,05$ intergrupos.

6 DISCUSSÃO

Testes de caracterização

As bandas de absorção obtidas através da espectroscopia de absorção no ultravioleta–visível (UV–VIS) estão relacionadas ao diâmetro e formato das nanopartículas (PHILIP, 2008). Os espectros de máxima absorção ocorreram nos comprimentos de onda de 511–528 nm para as Au@CS e 514–532 nm para as Au@CS+PVP, apresentando bandas únicas e bem definidas. Tais resultados podem ser comparados com estudos prévios na literatura (ALKILANY; MURPHY, 2010; ESFAHANI *et al.*, 2017; ZUBER *et al.*, 2016), que indicam que os espectros de absorção obtidos são condizentes com nanopartículas de ouro esféricas de diâmetro médio aproximado de 20 nm.

A máxima absorção em comprimentos de onda na faixa aproximada de 519 nm é característica de nanopartículas de ouro com diâmetro médio aproximado de 20 nm (ZUBER *et al.*, 2016). Segundo estudo realizado por Esfahani *et al.* (2017), as dispersões de nanopartículas de ouro reduzidas com citrato de sódio exibem comprimentos de onda da máxima absorção na faixa de 516 nm para amostras de 5–10 nm, e na faixa de 520–530 nm para amostras de 30–50 nm. Entretanto, os artigos não relatam em quais períodos foram realizadas as análises. A presença de uma única banda bem definida é compatível com nanopartículas de formato esférico (ALKILANY; MURPHY, 2010).

A coloração vermelho rubi obtida após o processo de síntese das dispersões de nanopartículas de ouro está de acordo com estudos anteriores da literatura, que apontam que nanopartículas de ouro esféricas apresentam uma cor vermelha distinta, que surge de suas pequenas dimensões através da superfície de *plasmon* ressonante (BLAKEY; MERICAN; THURECHT, 2013; EUSTIS; EL-SAYED, 2006; FERNANDEZ CABADA *et al.*, 2012; PHILIP, 2008). A cor da dispersão é dependente do formato e tamanho da nanopartícula, à medida que uma destas características é alterada, a cor observada também sofre variações (EUSTIS; EL-SAYED, 2006).

Os resultados obtidos através de microscopia eletrônica de varredura com fonte de emissão de campo (FEG–SEM) confirmaram o padrão esférico e o diâmetro médio das Au@CS, como proposto pelo método de síntese, corroborando com os resultados obtidos através da espectroscopia de absorção no ultravioleta–visível. Não foi possível obter imagens das Au@CS+PVP utilizando esta técnica, entretanto na literatura há estudos mostrando imagens de FEG–SEM para nanopartículas estabilizadas com PVP (MAHL *et al.*, 2012). Uma

possível interpretação seria que a maior concentração de PVP utilizada na estabilização das nanopartículas do que em outras pesquisas (MAHL *et al.*, 2012) dificultou a visualização das nanopartículas.

O valor do potencial Zeta está intimamente relacionado com a estabilidade da suspensão e a morfologia da superfície das partículas (XU, 2008). As medidas de potencial Zeta obtidas para as dispersões coloidais de Au@CS e Au@CS+PVP sintetizadas demonstraram perfil aniônico com valores de -30,2 e -30,4 mV, respectivamente. Como os valores obtidos foram inferiores a -30 mV, as dispersões sintetizadas são consideradas altamente estáveis (BHATTACHARJEE, 2016; PATEL; AGRAWAL, 2011).

Tais resultados corroboram com estudos prévios na literatura que mostram valores de potencial Zeta próximos a -30 mV para nanopartículas de ouro esféricas reduzidas com citrato de sódio (CORADEGHINI *et al.*, 2013; ESFAHANI *et al.*, 2017; VERISSIMO *et al.*, 2016) e estabilizadas com PVP (MAHL *et al.*, 2010). Os valores aniônicos verificados nas dispersões coloidais de Au@CS e Au@CS+PVP são indicativos de menor potencial citotóxico, uma vez que nanopartículas catiônicas geralmente apresentam maior toxicidade associada ao rompimento da membrana celular (JIA *et al.*, 2017).

Como complemento dos testes de caracterização, seria interessante realizar: 1) microscopia eletrônica de transmissão, para confirmar o tamanho médio das nanopartículas e 2) espectroscopia de absorção atômica para confirmar a concentração das dispersões.

Testes de citotoxicidade

Os experimentos *in vitro* se justificam, pois ao realizar o manejo cuidadoso das condições experimentais, os mesmos podem imitar o sistema e a função *in vivo* como um método simples para investigar o efeito citotóxico dos materiais (KONG *et al.*, 2011).

Os ensaios de viabilidade (MTT e exclusão do Azul de Tripán) apresentaram resultados similares. Segundo as normas do documento ISO 10993-5 (2009), se o valor obtido for inferior a 70% de viabilidade celular comparado ao controle (redução maior que 30%), significa que o material testado apresenta potencial citotóxico. Desta forma, apenas o grupo Citrato foi tóxico para as células indiferenciadas da polpa dental humana, nos dois períodos avaliados e em ambas as metodologias.

Resultados semelhantes foram obtidos por Connor *et al.* (2005) que analisaram nanopartículas de ouro esféricas, com diâmetros médios de 4, 12 e 18 nm, contendo uma variedade de modificadores de superfície. Os resultados quanto à citotoxicidade em células

K562 (linhagem de células de eritroleucemia) revelaram que, embora alguns precursores das nanopartículas possam ser tóxicos quando analisados isoladamente, nenhuma das nanopartículas foram tóxicas nas concentrações avaliadas, apesar de serem internalizadas.

Para o presente estudo, a morfologia celular foi analisada através de microscopia óptica de campo claro. Segundo as normas do documento ISO 10993-5 (2009), escores moderados e severos indicam que o material testado apresenta potencial tóxico para as células. Desta forma, apenas o grupo Citrato foi tóxico para as células indiferenciadas da polpa dental humana, em ambos os períodos avaliados, apresentando alterações morfológicas severas. Tais resultados corroboram com os obtidos para os testes de viabilidade celular. Resultados semelhantes foram obtidos por De *et al.* (2014) onde a exposição de células HeLa a diferentes concentrações de AuNPs durante 24 horas não ocasionou mudanças visíveis na morfologia das células.

Os resultados obtidos para avaliação do efeito das nanopartículas sobre o potencial de reparo celular, através do ensaio de “*Scratch*”, mostraram que as Au@CS e Au@CS+PVP não interferem com a proliferação e migração celular. No teste de quantificação de proteínas totais, ocorreu um aumento na quantidade de proteínas para os grupos de Au@CS+PVP nas menores concentrações. Uma possível interpretação seria que as Au@CS+PVP dada a sua persistência sem agregação, devido a presença do PVP, podem penetrar nas membranas biológicas muito mais efetivamente (HITCHMAN *et al.*, 2013) e desta forma ativar as células.

Consta na literatura que o efeito tóxico das nanopartículas é altamente dependente do tipo de células com as quais as AuNPs entram em contato (KONG *et al.*, 2011). Patra *et al.* (2007) investigaram nanopartículas de ouro reduzidas com citrato de sódio sem qualquer funcionalização específica. Os resultados mostraram uma redução da viabilidade na linhagem A549 (adenocarcinoma pulmonar humano). Em contraste, a linhagem celular HepG2 (carcinoma hepatocelular humano) permaneceu inalterada pelo tratamento com AuNPs. Mahl *et al.* (2012) avaliaram nanopartículas de ouro esféricas estabilizadas com PVP, os resultados mostraram apenas um leve efeito sobre a viabilidade em células-tronco mesenquimais humanas após 7 dias de incubação, sendo este verificado apenas para a maior concentração.

Além da linhagem celular, alguns efeitos tóxicos das nanopartículas de ouro estão relacionados com a forma (SULTANA *et al.*, 2015), o tamanho (PAN *et al.*, 2009), a concentração (SULTANA *et al.*, 2015) e a carga de superfície (GOODMAN *et al.*, 2004; SPERLING *et al.*, 2008). Sendo que estes parâmetros afetam a viabilidade celular de maneira

mais significativa do que a modificação de superfície com agentes de revestimentos (SULTANA *et al.*, 2015).

De acordo com Sultana *et al.* (2015), as formas esféricas das nanopartículas de ouro apresentam maior biocompatibilidade, por apresentarem uma superfície menor do que as outras formas, tendo uma menor probabilidade de interação com a membrana celular. Estudos *in vitro* demonstram que AuNPs de 1,4 nm de diâmetro provocam morte celular por indução de estresse oxidativo e danos mitocondriais (PAN *et al.*, 2009), sendo que quanto menor o diâmetro maior o potencial tóxico da partícula, devido a sua maior facilidade de penetrar nos tecidos e membranas (OBERDORSTER; OBERDORSTER; OBERDORSTER, 2005). Com relação a carga de superfície, as AuNPs catiônicas são consideradas moderadamente tóxicas, enquanto que AuNPs aniônicas não apresentam efeitos tóxicos consideráveis (GOODMAN *et al.*, 2004). Por fim, o aumento da concentração de nanopartículas está relacionado com a diminuição da viabilidade celular (SULTANA *et al.*, 2015).

Os resultados da toxicidade das nanopartículas de ouro são muitas vezes conflitantes na literatura, devido à grande variedade de condições experimentais incluindo diferentes linhagens celulares, nanopartículas de ouro com vários tamanhos e formas, diversos revestimentos de superfície, diferentes doses, tempo de exposição e diversos ensaios para avaliar a toxicidade, com variações entre as nanopartículas que impedem comparações significativas entre diferentes estudos (BUTTERWORTH *et al.*, 2012; ISWARYA *et al.*, 2016; JIA *et al.*, 2017; SCHUEMANN *et al.*, 2016).

Desta forma, as pesquisas e os resultados obtidos são específicos para o tipo de nanopartícula avaliada. A extrapolação de um tipo de nanopartícula para outro, ou de um tamanho para outro, é, de acordo com o conhecimento atual, ainda impossível (FORBE; GARCÍA; GONZALEZ, 2011).

Como complemento dos testes de citotoxicidade, seria interessante realizar a quantificação de citocinas, através de ensaio de Elisa, para especificar quais proteínas estão aumentadas no teste de quantificação de proteínas totais.

Testes microbiológicos

Para os testes de difusão em ágar, o material avaliado deve difundir-se no ágar e inibir o crescimento do microrganismo (BALOUIRI; SADIKI; IBNSOUDA, 2016). A interpretação dos diâmetros dos halos de inibição é diferente para cada material avaliado, não

somente pelo potencial antimicrobiano, mas pela difusão e solubilidade do material no meio de cultivo (BAUER *et al.*, 1966).

Desta forma, a ausência de halos de inibição consideráveis para as nanopartículas de ouro pode ser atribuída a dois motivos: 1) baixa capacidade de difusão das Au@CS em ágar Mueller–Hinton ou 2) ausência de potencial antimicrobiano para o microrganismo avaliado. Uma vez que é impossível quantificar a quantidade de agente antimicrobiano difundida no meio ágar (BALOUIRI; SADIKI; IBNSOUDA, 2016), outra metodologia foi utilizada para complementar a avaliação do potencial antimicrobiano das Au@CS.

Os métodos de microdiluição são os mais apropriados para a determinação dos valores da concentração inibitória mínima (CIM). A CIM é definida como a menor concentração do material avaliado que visualmente inibe por completo o crescimento microbiano (BALOUIRI; SADIKI; IBNSOUDA, 2016; NCCLS, 2003a).

Para a determinação exata da CIM, dispositivos como leitoras de microplacas podem ser utilizados. Além disso, vários métodos colorimétricos baseados no uso de corantes foram desenvolvidos para facilitar a visualização (BALOUIRI; SADIKI; IBNSOUDA, 2016). Os resultados obtidos mostraram que as Au@CS nas concentrações testadas não possuem a capacidade de inibir o crescimento microbiano, sendo os microrganismos resistentes ao tratamento pelos métodos avaliados.

Os estudos presentes na literatura referentes à utilização das nanopartículas de ouro para potenciais antimicrobianos descrevem sua aplicação: 1) conjugadas com anticorpos específicos e ativação por laser, levando à redução seletiva da viabilidade dos microrganismos (MILLENBAUGH *et al.*, 2015; NORMAN *et al.*, 2008; SHOKRI; SALOUTI; ZANJANI, 2015; ZHAROV *et al.*, 2006); 2) conjugadas com antibióticos, mostrando a potencialização do mesmo (GU *et al.*, 2003; RASTOGI; KORA; ARUNACHALAM, 2012; SAHA *et al.*, 2007; VIDYA *et al.*, 2016) e 3) aplicadas sobre superfícies, interferindo na adesão microbiana (DEWALD *et al.*, 2018).

Potencial antimicrobiano foi verificado em nanopartículas de ouro sintetizadas pela metodologia da síntese “verde”, através de redução do precursor metálico HAuCl_4 com extratos de plantas (RAO; INWATI; SINGH, 2017). Entretanto, o potencial antimicrobiano não é observado em todos os compostos utilizados para realização da síntese “verde” (GOPINATH *et al.*, 2014).

Como complemento dos testes microbiológicos seria interessante avaliar o efeito das nanopartículas sobre a formação do biofilme microbiano com microrganismos relacionados à cárie.

Propriedades anti-inflamatórias

As nanopartículas de ouro, nas suas maiores concentrações, inibiram o nível de TNF- α no sobrenadante das células após estimulação com LPS. Tais resultados corroboram com estudos prévios na literatura que mostram efeitos anti-inflamatórios para nanopartículas de ouro *in vitro* (AHN *et al.*, 2018; SUMBAYEV *et al.*, 2013) e *in vivo* (AHMAD *et al.*, 2017; OMLOR *et al.*, 2017; PAULA *et al.*, 2015; SUMBAYEV *et al.*, 2013). Entretanto, as mesmas nanopartículas com diferentes substâncias químicas de superfície podem exibir interações bastante diferentes com proteínas de sinalização, apresentando tanto efeitos anti-inflamatórios como pró-inflamatórios (SUMBAYEV *et al.*, 2013).

Compostos de ouro apresentam ação anti-inflamatória, devido a sua capacidade de inibir a ativação do Fator Nuclear - κ B (NF- κ B) e conseqüentemente seus efeitos na inflamação (JEON; BYUN; JUE, 2003; MA *et al.*, 2010). O NF- κ B é ativado em resposta a muitos sinais, incluindo o LPS bacteriano (BARNES; KARIN, 1997), levando à expressão coordenada de muitos genes que codificam proteínas envolvidas na síntese de diversos mediadores da resposta inflamatória, como a produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α), colaborando para a amplificação e perpetuação da resposta inflamatória (BARNES; KARIN, 1997; KARIN, 1999).

Como complemento dos testes de potencial anti-inflamatório, seria interessante realizar a quantificação de outras citocinas, como a Interleucina-1 β , através de ensaio de Elisa.

7 CONCLUSÃO

Interpretados em conjunto, os resultados obtidos sugerem que nas condições experimentais do trabalho aqui apresentado:

- As dispersões coloidais de nanopartículas de ouro sintetizadas possuem formato esférico, diâmetro médio aproximado de 20 nm, perfil aniônico e são altamente estáveis;
- As nanopartículas reduzidas com citrato (Au@CS) e estabilizadas com polivinilpirrolidona (Au@CS+PVP) nas concentrações testadas não apresentam potencial citotóxico para as células indiferenciadas da polpa dental humana;
- As nanopartículas não alteraram a viabilidade celular;
- As nanopartículas não alteraram a morfologia celular de forma moderada e severa;
- As nanopartículas não interferiram na proliferação e migração celular, mas apresentaram aumento na quantidade de proteínas para as menores concentrações de Au@CS+PVP;
- As Au@CS nas concentrações testadas não possuem efeito antimicrobiano, sendo os microrganismos resistentes ao tratamento pelos métodos avaliados;
- As Au@CS demonstraram potencial anti-inflamatório em sua maior concentração avaliada e as Au@CS+PVP nas duas maiores concentrações (50 e 100 µg/mL).

REFERÊNCIAS

ABOU NEEL, E. A. et al. Nanotechnology in dentistry: prevention, diagnosis, and therapy. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, n. 1, p. 6371–94, 2015.

AHMAD, N. et al. Biosynthesis and characterization of gold nanoparticles: Kinetics, in vitro and in vivo study. **Materials Science and Engineering C**, v. 78, p. 553–64, 2017.

AHN, S. et al. Gold nanoflowers synthesized using *Acanthopanax cortex* extract inhibit inflammatory mediators in LPS-induced RAW264.7 macrophages via NF- κ B and AP-1 pathways. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 162, p. 398–404, 2018.

ALKILANY, A.; MURPHY, C. Toxicity and cellular uptake of gold nanoparticles: what we have learned so far? **Journal of Nanoparticle Research**, v. 12, n. 7, p. 2313–33, 2010.

BALOUIRI, M.; SADIKI, M.; IBNSOUDA, S. K. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 6, n. 2, p. 71–79, 2016.

BARNES, P. J.; KARIN, M. Nuclear Factor- κ B – a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. **The New England Journal of Medicine**, v. 336, n. 15, p. 1066–71, 1997.

BARTHEL, C. R. et al. Pulp capping of carious exposures: treatment outcome after 5 and 10 years: a retrospective study. **Journal of Endodontics**, v. 26, n. 9, p. 525–8, 2000.

BAUER, A. W. et al. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, n. 4, p. 493–6, 1966.

BHAMIDIPATI, M.; FABRIS, L. Multiparametric Assessment of Gold Nanoparticle Cytotoxicity in Cancerous and Healthy Cells: The Role of Size, Shape, and Surface Chemistry. **Bioconjugate Chemistry**, v. 28, n. 2, p. 449–60, 2017.

BHARDWAJ, A. et al. Nanotechnology in dentistry: Present and future. **Journal of International Oral Health**, v. 6, n. 1, p. 121–6, 2014.

BHATTACHARJEE, S. DLS and zeta potential: What they are and what they are not? **Journal of Controlled Release**, v. 235, n. 1, p. 337–51, 2016.

BHATTACHARYA, R.; MUKHERJEE, P. Biological properties of "naked" metal nanoparticles. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, n. 11, p. 1289–306, 2008.

BLAKEY, I.; MERICAN, Z.; THURECHT, K. J. A method for controlling the aggregation of gold nanoparticles: tuning of optical and spectroscopic properties. **Langmuir**, v. 29, n. 26, p. 8266–74, 2013.

BORM, P. J. et al. The potential risks of nanomaterials: a review carried out for ECETOC. **Particle and Fibre Toxicology**, v. 3, n. 1, p. 1–11, 2006.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1, p. 248–54, 1976.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Projeto SB BRASIL 2010: Pesquisa Nacional de Saúde Bucal**. Brasília: Ministério da Saúde; 2012.

BRUNIUS, G. et al. Bradykinin upregulates IL-8 production in human gingival fibroblasts stimulated by interleukin-1beta and tumor necrosis factor alpha. **Regulatory Peptides**, v. 126, n. 3, p. 183–8, 2005.

BUTTERWORTH, K. T. et al. Physical basis and biological mechanisms of gold nanoparticle radiosensitization. **Nanoscale**, v. 4, n. 16, p. 4830–8, 2012.

CHANG, E. H. et al. Nanomedicine: Past, present and future – A global perspective. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 468, n. 3, p. 511–17, 2015.

CHO, W. S. et al. Acute toxicity and pharmacokinetics of 13 nm-sized PEG-coated gold nanoparticles. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 236, n. 1, p. 16–24, 2009.

CHUANG, S. M. et al. Extensive evaluations of the cytotoxic effects of gold nanoparticles. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1830, n. 10, p. 4960–73, 2013.

CONNOR, E. E. et al. Gold nanoparticles are taken up by human cells but do not cause acute cytotoxicity. **Small**, v. 1, n. 3, p. 325–7, 2005.

CORADEGHINI, R. et al. Size-dependent toxicity and cell interaction mechanisms of gold nanoparticles on mouse fibroblasts. **Toxicology Letters**, v. 217, n. 3, p. 205–16, 2013.

COULTER, J. A. et al. Cell type-dependent uptake, localization, and cytotoxicity of 1.9 nm gold nanoparticles. **International Journal of Nanomedicine**, v. 7, n. 1, p. 2673–85, 2012.

DAS, S. et al. Comparative analysis of stability and toxicity profile of three differently capped gold nanoparticles for biomedical usage. **Biometals**, v. 25, n. 5, p. 1009–22, 2012.

DE, S. et al. Green synthesis of gold nanoparticles for staining human cervical cancer cells and DNA binding assay. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 140, n. 1, p. 130–9, 2014.

DEWALD, C. et al. Gold nanoparticle contact point density controls microbial adhesion on gold surfaces. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 163, n. 1, p. 201–8, 2018.

ESFAHANI, M. R. et al. Extinction, emission, and scattering spectroscopy of 5–50 nm citrate-coated gold nanoparticles: An argument for curvature effects on aggregation. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 175, n. 1, p. 100–9, 2017.

EUSTIS, S.; EL-SAYED, M. A. Why gold nanoparticles are more precious than pretty gold: Noble metal surface plasmon resonance and its enhancement of the radiative and nonradiative

properties of nanocrystals of different shapes. **Chemical Society Reviews**, v. 35, n. 3, p. 209–17, 2006.

FERNANDEZ CABADA, T. et al. Induction of cell death in a glioblastoma line by hyperthermic therapy based on gold nanorods. **International Journal of Nanomedicine**, v. 7, n. 1, p. 1511–23, 2012.

FORBE, T.; GARCÍA, M.; GONZALEZ, E. Potential risks of nanoparticles. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 31, n. 4, p. 835–42, 2011.

GAO, H.; SHI, W.; FREUND, L. B. Mechanics of receptor-mediated endocytosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States**, v. 102, n. 27, p. 9469–74, 2005.

GAO, L. et al. Nanocatalysts promote *Streptococcus mutans* biofilm matrix degradation and enhance bacterial killing to suppress dental caries in vivo. **Biomaterials**, v. 101, n. 1, p. 272–84, 2016.

GHOSH, P. et al. Gold nanoparticles in delivery applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, n. 11, p. 1307–15, 2008.

GOMEZ-GALLEGO, D. M.; URCUQUI-INCHIMA, S.; HERNANDEZ, J. C. Efecto inmunomodulador de nanoparticulas usadas en nanomedicina. **Iatreia**, v. 29, n. 4, p. 445–57, 2016.

GOODMAN, C. M. et al. Toxicity of Gold Nanoparticles Functionalized with Cationic and Anionic Side Chains. **Bioconjugate Chemistry**, v. 15, n. 4, p. 897–900, 2004.

GOPINATH, K. et al. Green synthesis of gold nanoparticles from fruit extract of *Terminalia arjuna*, for the enhanced seed germination activity of *Gloriosa superba*. **Journal of Nanostructure in Chemistry**, v. 4, n. 3, p. 1–11, 2014.

GRACE, A. N.; PANDIAN, K. Antibacterial efficacy of aminoglycosidic antibiotics protected gold nanoparticles – A brief study. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 297, n. 1–3, p. 63–70, 2007.

GU, H. et al. Presenting Vancomycin on Nanoparticles to Enhance Antimicrobial Activities. **Nano Letters**, v. 3, n. 9, p. 1261–3, 2003.

HASHIMOTO, M. et al. Gold Nanoparticles Inhibit Matrix Metalloproteases without Cytotoxicity. **Journal of Dental Research**, v. 94, n. 8, p. 1085–91, 2015.

HEO, J. H. et al. Ultrastable-Stealth Large Gold Nanoparticles with DNA Directed Biological Functionality. **Langmuir**, v. 31, n. 51, p. 13773–82, 2015.

HITCHMAN, A. et al. The effect of environmentally relevant conditions on PVP stabilised gold nanoparticles. **Chemosphere**, v. 90, n. 2, p. 410–6, 2013.

HOSHINO, E. et al. Bacterial invasion of non-exposed dental pulp. **International Endodontic Journal**, v. 25, n. 1, p. 2–5, 1992.

HUANG, G. T. et al. In vitro characterization of human dental pulp cells: various isolation methods and culturing environments. **Cell and Tissue Research**, v. 324, n. 2, p. 225–36, 2006.

HULLA, J. E.; SAHU, S. C.; HAYES, A. W. Nanotechnology: History and future. **Human & Experimental Toxicology**, v. 34, n. 12, p. 1318–21, 2015.

INTERNATIONAL ORGANIZATION for STANDARDIZATION. ISO 10993-5. **Biological evaluation of medical devices -- Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity**, v. 3, p. 24, 2009.

ISWARYA, V. et al. Surface capping and size-dependent toxicity of gold nanoparticles on different trophic levels. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 5, p. 4844–58, 2016.

JEON, K. I.; BYUN, M. S.; JUE, D. M. Gold compound auranofin inhibits IkappaB kinase (IKK) by modifying Cys-179 of IKKbeta subunit. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 35, n. 2, p. 61–6, 2003.

JIA, Y. P. et al. The in vitro and in vivo toxicity of gold nanoparticles. **Chinese Chemical Letters**, v. 28, n. 4, p. 691–702, 2017.

KANAPARTHY, R.; KANAPARTHY, A. The changing face of dentistry: nanotechnology. **International journal of nanomedicine**, v. 6, n. 1, p. 2799–804, 2011.

KARIN, M. The beginning of the end: IkappaB kinase (IKK) and NF-kappaB activation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 39, p. 27339–42, 1999.

KASRAEI, S. et al. Antibacterial properties of composite resins incorporating silver and zinc oxide nanoparticles on Streptococcus mutans and Lactobacillus. **Restorative dentistry & endodontics**, v. 39, n. 2, p. 109–14, 2014.

KHAN, H. A. et al. Effects of naked gold nanoparticles on proinflammatory cytokines mRNA expression in rat liver and kidney. **BioMed Research International**, v. 2013, n. 1, p. 1–6, 2013.

KHURSHID, Z. et al. Advances in nanotechnology for restorative dentistry. **Materials**, v. 8, n. 2, p. 717–31, 2015.

KIM, B. Y.; RUTKA, J. T.; CHAN, W. C. Nanomedicine. **The New England Journal of Medicine**, v. 363, n. 25, p. 2434–43, 2010.

KIM, C. K.; GHOSH, P.; ROTELLO, V. M. Multimodal drug delivery using gold nanoparticles. **Nanoscale**, v. 1, n. 1, p. 61–7, 2009.

KONG, B. et al. Experimental considerations on the cytotoxicity of nanoparticles. **Nanomedicine**, v. 6, n. 5, p. 929–41, 2011.

KUMAR, S. S. et al. Stabilized gold nanoparticles by reduction using 3,4-ethylenedioxy thiophene-polystyrenesulfonate in aqueous solutions: nanocomposite formation, stability, and application in catalysis. **Langmuir**, v. 23, n. 6, p. 3401–8, 2007.

KWIZERA, E. A. et al. Synthesis and properties of magnetic-optical core-shell nanoparticles. **RSC Advances**, v. 7, n. 28, p. 17137–53, 2017.

LAINOVIĆ, T.; BLAZIC, L.; POTRAN, M. Nanotechnology in Dentistry - Current State and Future Perspectives. **Serbian Dental Journal**, v. 59, n. 1, p. 44–8, 2012.

LANGILLE, M. R. et al. Defining rules for the shape evolution of gold nanoparticles. **Journal of the American Chemical Society**, v. 134, n. 35, p. 14542–54, 2012.

LEE, U. et al. Cytotoxicity of gold nanoparticles in human neural precursor cells and rat cerebral cortex. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 121, n. 3, p. 341–4, 2016.

LEITE, P. E. C. et al. Gold nanoparticles do not induce myotube cytotoxicity but increase the susceptibility to cell death. **Toxicology in Vitro**, v. 29, n. 5, p. 819–27, 2015.

LEONARDI, D. P. et al. Alterações pulpares e periapicais. **Revista Sul-Brasileira de Odontologia**, v. 8, n. 4, p. 47–61, 2011.

LEWINSKI, N.; COLVIN, V.; DREZEK, R. Cytotoxicity of Nanoparticles. **Small**, v. 4, n. 1, p. 26–49, 2008.

LIANG, C. C.; PARK, A. Y.; GUAN, J. L. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. **Nature Protocols**, v. 2, n. 2, p. 329–33, 2007.

MA, J. S. et al. Gold nanoparticles attenuate LPS-induced NO production through the inhibition of NF- κ B and IFN- β /STAT1 pathways in RAW264.7 cells. **Nitric Oxide**, v. 23, n. 3, p. 214–9, 2010.

MAHL, D. et al. Gold nanoparticles: dispersibility in biological media and cell-biological effect. **Journal of Materials Chemistry**, v. 20, n. 29, p. 6176–83, 2010.

MAHL, D. et al. Silver , gold , and alloyed silver – gold nanoparticles : characterization and comparative cell-biologic action. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 14, n. 1, p. 1153–66, 2012.

MENTE, J. et al. Mineral trioxide aggregate or calcium hydroxide direct pulp capping: an analysis of the clinical treatment outcome. **Journal of Endodontics**, v. 36, n. 5, p. 806–13, 2010.

MILLENBAUGH, N. J. et al. Photothermal killing of Staphylococcus aureus using antibody-targeted gold nanoparticles. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, n. 1, p. 1953–60, 2015.

MODENA, K. C. et al. Cytotoxicity and biocompatibility of direct and indirect pulp capping materials. **Journal of Applied Oral Science**, v. 17, n. 6, p. 544–54, 2009.

MORONES, J. R. et al. The bactericidal effect of silver nanoparticles. **Nanotechnology**, v. 16, n. 10, p. 2346–53, 2005.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1, p. 55–63, 1983.

NAKASHIMA, S. et al. Effect of a test dentifrice containing nano-sized calcium carbonate on remineralization of enamel lesions in vitro. **Journal of oral science**, v. 51, n. 1, p. 69–77, 2009.

NCCLS. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically**. v. 6, n. 1, p. 1–81, 2003a.

NCCLS. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests**. v. 8, p. 1–58, 2003b.

NORMAN, R. S. et al. Targeted photothermal lysis of the pathogenic bacteria, *Pseudomonas aeruginosa*, with gold nanorods. **Nano Letters**, v. 8, n. 1, p. 302–6, 2008.

NORTON, S. A brief history of potable gold. **Molecular interventions**, v. 8, n. 3, p. 120–3, 2008.

OBERDORSTER, G.; OBERDORSTER, E.; OBERDORSTER, J. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. **Environmental Health Perspectives**, v. 113, n. 7, p. 823–39, 2005.

OMLOR, A. J. et al. Local Effects on Airway Inflammation and Systemic Uptake of 5 nm PEGylated and Citrated Gold Nanoparticles in Asthmatic Mice. **Small**, v. 13, n. 10, p. 1–12, 2017.

OSORIO, R. et al. Polymer nanocarriers for dentin adhesion. **Journal of Dental Research**, v. 93, n. 12, p. 1258–63, 2014.

PAN, Y. et al. Gold nanoparticles of diameter 1.4 nm trigger necrosis by oxidative stress and mitochondrial damage. **Small**, v. 5, n. 18, p. 2067–76, 2009.

PARK, H.; TSUTSUMI, H.; MIHARA, H. Cell penetration and cell-selective drug delivery using α -helix peptides conjugated with gold nanoparticles. **Biomaterials**, v. 34, n. 20, p. 4872–9, 2013.

PARK, J. W.; SHUMAKER-PARRY, J. S. Structural study of citrate layers on gold nanoparticles: role of intermolecular interactions in stabilizing nanoparticles. **Journal of the American Chemical Society**, v. 136, n. 5, p. 1907–21, 2014.

PATEL, T. et al. Substance P induces interleukin-8 secretion from human dental pulp cells. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology**, v. 96, n. 4, p. 478–85, 2003.

PATEL, V. R.; AGRAWAL, Y. K. Nanosuspension: An approach to enhance solubility of drugs. **Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research**, v. 2, n. 2, p. 81–7, 2011.

PATRA, H. K. et al. Cell selective response to gold nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 3, n. 2, p. 111–19, 2007.

PAULA, M. M. et al. Gold nanoparticles and/or N-acetylcysteine mediate carrageenan-induced inflammation and oxidative stress in a concentration-dependent manner. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v. 103, n. 10, p. 3323–30, 2015.

PHILIP, D. Synthesis and spectroscopic characterization of gold nanoparticles. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 71, n. 1, p. 80–5, 2008.

PISSUWAN, D. et al. Functionalised gold nanoparticles for controlling pathogenic bacteria. **Trends in Biotechnology**, v. 28, n. 4, p. 207–13, 2010.

PISSUWAN, D.; NIIDOME, T.; CORTIE, M. B. The forthcoming applications of gold nanoparticles in drug and gene delivery systems. **Journal of Controlled Release**, v. 149, n. 1, p. 65–71, 2011.

PISSUWAN, D.; VALENZUELA, S. M.; CORTIE, M. B. Therapeutic possibilities of plasmonically heated gold nanoparticles. **Trends in Biotechnology**, v. 24, n. 2, p. 62–7, 2006.

RAO, Y.; INWATI, G. K.; SINGH, M. Green synthesis of capped gold nanoparticles and their effect on Gram-positive and Gram-negative bacteria. **Future Science OA**, v. 3, n. 4, p.1–15, 2017.

RASTOGI, L.; KORA, A. J.; ARUNACHALAM, J. Highly stable, protein capped gold nanoparticles as effective drug delivery vehicles for amino-glycosidic antibiotics. **Materials Science & Engineering C**, v. 32, n. 6, p. 1571–77, 2012.

SAHA, B. et al. In Vitro Structural and Functional Evaluation of Gold Nanoparticles Conjugated Antibiotics. **Nanoscale Research Letters**, v. 2, n. 12, p. 614–22, 2007.

SANGUANSRI, P.; AUGUSTIN, M. A. Nanoscale materials development – a food industry perspective. **Trends in Food Science & Technology**, v. 17, n. 10, p. 547–56, 2006.

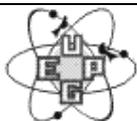
SCHUEMANN, J. et al. Roadmap to Clinical Use of Gold Nanoparticles for Radiation Sensitization. **International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics**, v. 94, n. 1, p. 189–205, 2016.

SHOKRI, R.; SALOUTI, M.; ZANJANI, R. S. Anti protein A antibody-gold nanorods conjugate: a targeting agent for selective killing of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* using photothermal therapy method. **Journal of Microbiology**, v. 53, n. 2, p. 116–21, 2015.

SILVA, A. C. et al. Interleukin-1 beta and interleukin-8 in healthy and inflamed dental pulps. **Journal of Applied Oral Science**, v. 17, n. 5, p. 527–32, 2009.

- SMITH, M. C. et al. Zeta potential: a case study of cationic, anionic, and neutral liposomes. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 409, n. 24, p. 5779–87, 2017.
- SPERLING, R. A. et al. Biological applications of gold nanoparticles. **Chemical Society Reviews**, v. 37, n. 9, p. 1896–908, 2008.
- STEFAN, M. et al. Attenuated effects of chitosan-capped gold nanoparticles on LPS-induced toxicity in laboratory rats. **Materials Science & Engineering C**, v. 33, n. 1, p. 550–6, 2013.
- SULTANA, S. et al. Comparative toxicity evaluation of flower-shaped and spherical gold nanoparticles on human endothelial cells. **Nanotechnology**, v. 26, n. 5, p. 01–13, 2015.
- SUMBAYEV, V. V. et al. Gold nanoparticles downregulate interleukin-1beta-induced pro-inflammatory responses. **Small**, v. 9, n. 3, p. 472–7, 2013.
- THOMAS, M.; KLIBANOV, A. M. Non-viral gene therapy: polycation-mediated DNA delivery. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 62, n. 1, p. 27–34, 2003.
- TURKEVICH, J.; STEVENSON, P. C.; HILLIER, J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. **Discussions of the Faraday Society**, v. 11, n. 1, p. 55–75, 1951.
- VERISSIMO, T. V. et al. In vitro cytotoxicity and phototoxicity of surface-modified gold nanoparticles associated with neutral red as a potential drug delivery system in phototherapy. **Materials Science and Engineering C**, v. 65, n. 1, p. 199–204, 2016.
- VIDYA, S. M. et al. Preparation of gold nanoparticles by novel bacterial exopolysaccharide for antibiotic delivery. **Life Sciences**, v. 153, n. 1, p. 171–9, 2016.
- WARHEIT, D. B. et al. Health effects related to nanoparticle exposures: Environmental, health and safety considerations for assessing hazards and risks. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 120, n. 1, p. 35–42, 2008.
- XU, H. H. K.; WEIR, M. D.; SUN, L. Calcium and phosphate ion releasing composite: Effect of pH on release and mechanical properties. **Dental Materials**, v. 25, n. 4, p. 535–42, 2009.
- XU, R. Progress in nanoparticles characterization: Sizing and zeta potential measurement. **Particuology**, v. 6, n. 2, p. 112–5, 2008.
- ZHANG, P. et al. Enhanced radiation therapy with multilayer microdisks containing radiosensitizing gold nanoparticles. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 7, n. 8, p. 4518–24, 2015.
- ZHAROV, V. P. et al. Photothermal nanotherapeutics and nanodiagnostics for selective killing of bacteria targeted with gold nanoparticles. **Biophysical Journal**, v. 90, n. 2, p. 619–27, 2006.
- ZUBER, A. et al. Detection of gold nanoparticles with different sizes using absorption and fluorescence based method. **Sensors & Actuators: B. Chemical**, v. 227, n. 1, p. 117–27, 2016.

ANEXO A – Termo de Doação de Dentes para a Pesquisa



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGIA

TERMO DE DOAÇÃO DE DENTES PARA A PESQUISA

Pesquisa: "Caracterização e avaliação do potencial citotóxico, antimicrobiano e anti-inflamatório de nanopartículas de ouro".

Pesquisador responsável: Professor Doutor Michel Fleith Otuki.

Por esse instrumento particular, declaro, para os devidos fins éticos e legais, que eu,

natural de _____, gênero _____, idade _____, data de nascimento
____/____/____, RG _____, residente à

_____, cidade _____, UF _____, CEP _____, telefone

(____) _____, aceito doar _____ dente(s) permanente(s) para utilização na pesquisa intitulada "Caracterização e avaliação do potencial citotóxico, antimicrobiano e anti-inflamatório de nanopartículas de ouro". Estou ciente de que este(s) dente(s) será (serão) extraído(s) por indicação terapêutica, como documentado em meu prontuário e a cirurgia será realizada por pessoal capacitado para sua realização. Fui informado que o objetivo dessa pesquisa é avaliar o efeito de nanopartículas de ouro sobre células da polpa dentária em laboratório.

Certifico também que fui informado dos riscos do procedimento de remoção do(s) dente(s), que incluem reações adversas e acidentes como: alergia aos componentes do anestésico, hemorragia, dor, fratura do dente ou osso, perda temporária ou definitiva de sensibilidade na região em caso de proximidade do dente com nervos, deglutição ou aspiração do dente. Porém, estou ciente de que receberei todo o apoio e cuidados necessários pelo aluno e professor responsável pela execução desses procedimentos, a fim de minimizar esses riscos.

Declaro conhecer a importância da minha contribuição para a pesquisa, sabendo que posso negar minha participação no estudo, sem prejuízo do atendimento, cuidado e tratamento pela equipe responsável nas dependências da UEPG, sendo minha identidade

preservada durante toda a execução do trabalho e na divulgação posterior dos resultados do estudo. Autorizo também a divulgação e publicação em revistas científicas, brasileiras ou estrangeiras, dos dados obtidos na pesquisa.

Em caso de qualquer outra dúvida, poderei contatar o pesquisador responsável pela pesquisa, Professor Doutor Michel Fleith Otuki, responsável pelo estudo, pelo telefone: (41) 9906-5187 – para qualquer informação adicional em relação à pesquisa da qual participo.

Ponta Grossa, _____ de _____ de 20 ____

Assinatura do participante voluntário

Assinatura do pesquisador responsável

Assinatura e CRO do cirurgião-dentista
responsável pelo procedimento