

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

**PAULA BISETTO**

**CITOTOXICIDADE DE MICROPARTÍCULAS POLIMÉRICAS MUCOADESIVAS  
PARA LIBERAÇÃO CONTROLADA DE NISTATINA**

**PONTA GROSSA  
2020**

PAULA BISETTO

**CITOTOXICIDADE DE MICROPARTÍCULAS POLIMÉRICAS MUCOADESIVAS  
PARA LIBERAÇÃO CONTROLADA DE NISTATINA**

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 em Propriedades Físico-Químicas e Biológicas de Materiais

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Nara Hellen Campanha Bombarda

PONTA GROSSA

2020

B621 Bisetto, Paula  
Citotoxicidade de micropartículas poliméricas mucoadesivas para liberação controlada de nistatina / Paula Bisetto. Ponta Grossa, 2020.  
96 f.

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

Orientadora: Profa. Dra. Nara Hellen Campanha Bombarda.

1. Nistatina. 2. Testes de citotoxicidade. 3. Polímeros. I. Bombarda, Nara Hellen Campanha. II. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Clínica Integrada. III.T.

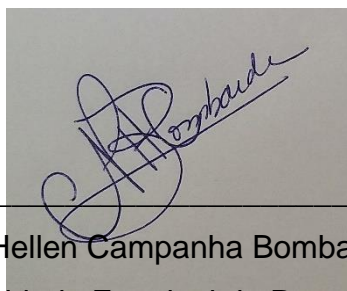
CDD: 617.6

PAULA BISETTO

**CITOTOXICIDADE DE MICROPARTÍCULAS POLIMÉRICAS MUCOADESIVAS  
PARA LIBERAÇÃO CONTROLADA DE NISTATINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Universidade Estadual de Ponta Grossa, como requisito para obtenção do título de Mestre no curso de Mestrado em Odontologia – Área de Concentração em Clínica Integrada. Linha de pesquisa em Propriedades Físico-Químicas e Biológicas de Materiais.

Ponta Grossa, 19 de fevereiro de 2020.



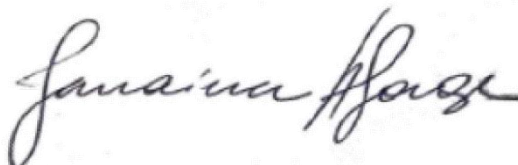
---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Nara Hellen Campanha Bombarda – Orientadora  
Universidade Estadual de Ponta Grossa



---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. ShelonCristina Souza Bandeca  
Universidade Estadual de Ponta Grossa



---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Janaina Habib Jorge  
Universidade Estadual Paulista

## DADOS CURRICULARES

NASCIMENTO	04/02/1986 Ponta Grossa, Paraná
FILIAÇÃO	Delton Bisetto Matilde Esteves Perez
2004 – 2008	Graduação em Odontologia pela Universidade Estadual de Ponta Grossa – Ponta Grossa (UEPG).
2009 – 2010	Aperfeiçoamento em Cirurgia Oral Menor, pelo Centro de Ensino Superior dos Campos Gerais – Ponta Grossa (CESCAGE).
2012 – 2014	Especialização em Prótese Dentária, pelo Faculdade Ilapeo – Curitiba.
2014 – 2016	Especialização em Implantodontia, Faculdade Ilapeo – Curitiba.
2018 -	Curso de Pós-Graduação em Odontologia. Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) nível de Mestrado em Odontologia – Área de Concentração em Clínica Integrada. Ponta Grossa – Paraná.

*Dedico esta obra a Deus, por todo seu amor,  
por ter guiado meu caminho.*

*Aos meus pais, Delton (in memoriam) e  
Matilde, por terem me proporcionado tudo  
para que pudesse chegar até aqui. Serei  
eternamente agradecida pela vida, amor,  
ensinamentos e confiança.*

*Mãe, obrigada por ser meu exemplo!!*

*A minha irmã e melhor amiga Thaís, que  
sempre se faz presente em tudo.*

*Ao meu querido cunhado Rodrigo,  
companheiro em todos os momentos.*

*E ao nosso presentinho que está por vir,  
minha amada Mano...*

*Ao meu marido Saulo, pelo seu amor, apoio e  
cuidado. Obrigada por ser meu presente.*

*E aos meus amados João e Mari, obrigada  
por transformarem minha vida.*

## AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Nara Hellen Campanha Bombarda, agradeço por confiar na minha capacidade, pela paciência em todos os momentos, por transmitir seus ensinamentos.

A Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Janaina Habib Jorge, da FOAR-Unesp, pelos ensinamentos, orientações, generosidade e gentileza que sempre me tratou.

A amiga Jacqueline de Oliveira Zocolotti, doutoranda da FOAR - Unesp por transmitir seu conhecimento e me acompanhar nesta jornada.

Aos meus amigos do grupo de pesquisa, Josiane, Cynthia, Carol e Luiz pela ajuda nos experimentos, disponibilidade, apoio nas diversas etapas da pesquisa.

Aos queridos amigos do mestrado de Odontologia, uma grande oportunidade ter compartilhado com vocês tantos momentos de aprendizagem e conquistas.

Aos professores da Pós-graduação em Odontologia da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Aos funcionários da Pós-graduação em Odontologia, pela ajuda e apoio na execução deste trabalho.

À Universidade Estadual de Ponta Grossa, pela oportunidade de cursar o mestrado onde fiz minha graduação.

A Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP, por me acolher e permitir desempenhar parte desta pesquisa.

A PROAP CAPES pelo auxílio financeiro no desenvolvimento desta pesquisa.

A FUNDAÇÃO ARAUCÁRIA pelo auxílio financeiro concedido (convênio n. 009/2017), dentro do programa de pesquisa Básica e Aplicada da UEPG, edital Propesp 43/2016.

Bisetto, P. **Citotoxicidade de micropartículas poliméricas mucoadesivas para liberação controlada de nistatina**. 96f. Dissertação (Mestrado em Odontologia – Clínica Integrada). Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2020.

## RESUMO

Micropartículas (MPs) poliméricas para liberação controlada de nistatina (N) foram testadas em relação a citotoxicidade nas suas concentrações inibitórias mínimas (CIM<sub>50</sub> e CIM<sub>80</sub> contra *C. albicans*) in vitro, pelos métodos Alamar Blue® e MTT. As MPs foram obtidas com os polímeros Eudragit L-100® (E), Gantrez MS-955® (G) ou da combinação de ambos (EG), acrescidos de N 10% ou a 20%. Queratinócitos humanos (NOK) foram proliferados in vitro e semeados (2 X 10<sup>4</sup> cél/mL), em meio de cultura DEMEM com 10% de soro fetal bovino em placas de 96 orifícios e incubados durante 24 h, para semiconfluência. O meio de cultura foi substituído por meio novo (200 µl) contendo 2 µl de soluções-mãe, em DMSO, dos materiais estudados, para atingir as CIMs, conformando os grupos experimentais: GN10<sub>50</sub>, GN10<sub>80</sub>, GN20<sub>50</sub>, GN20<sub>80</sub>, EN10<sub>50</sub>, EN10<sub>80</sub>, EN20<sub>50</sub>, EN20<sub>80</sub>, EGN10<sub>50</sub>, EGN10<sub>80</sub>, EGN20<sub>50</sub>, EGN20<sub>80</sub> (todas MPs com N) e G0 e E0 (MPs brancas, sem fármaco). O solvente também foi avaliado a 1% (grupo DMSO). Como grupo controle (C), foram cultivadas células que receberam somente o meio de cultura (100% de crescimento). Juntamente com os tratamentos, 20 µl do reagente Alamar Blue® foram adicionados aos poços contendo as células, que foram incubadas por 24 h. Leituras de fluorescência foram realizadas em 6 h, 12 h e 24 h (emissão de 544 nm e 590 nm de transmissão). No teste de MTT, o reagente foi inserido ao término do período de incubação com os tratamentos (24 h). Para isso, as células foram lavadas com PBS e receberam 200 µl de MTT a 0,5 mg/mL, foram seladas e voltaram à estufa por 4 h. A solução foi descartada e os cristais de formazan solubilizados em 200 µl de metanol, por 5 min. O sobrenadante foi lido a 570 nm. Os testes foram realizados em triplicata e em três ocasiões. As medidas de fluorescência ou de absorvância foram calculadas como porcentagem de inibição de atividade metabólica comparadas ao controle e classificadas qualitativamente. Os dados também foram analisados pelo teste Shapiro-Wilk, que mostrou distribuição não normal. Os testes complementares usados foram Kruskal-Wallis e Friedman ( $\alpha = 0,05$ ). Na análise qualitativa de citotoxicidade das leituras de fluorescência das diferentes MPs, nenhuma delas foi classificada como moderada ou altamente citotóxica. Na análise quantitativa inferencial, não houve diferença estatisticamente significativa entre a maior parte dos grupos avaliados nos períodos de tempo testados, mostrando um comportamento semelhante para a maioria das MPs, exceto as partículas EN20<sub>50</sub>, G0<sub>50</sub> e GN10<sub>50</sub>, que se apresentaram levemente citotóxicas no tempo de 6h. Nas leituras de absorvância, na análise qualitativa, as MPs apresentaram comportamento levemente ou não citotóxico. Já na análise quantitativa, as MPs mostraram diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle, mas não entre si. A MP GN10<sub>80</sub> se apresentou não citotóxica em todos os testes. De acordo com os testes realizados no presente estudo, pode-se concluir que nenhuma MP testada foi classificada como moderada ou altamente citotóxica in vitro.

**Palavras-chave\***: Nistatina, Testes de Citotoxicidade, Polímeros.

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



Bisetto, P. **Cytotoxicity of mucoadhesive polymeric microparticles for controlled release of nystatin**. 96f. Ponta Grossa, 2020. Dissertação (Mestrado em Odontologia – Clínica Integrada). Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2020.

### ABSTRACT

Polymeric microparticles (MPs) for controlled release of nystatin (N) were tested for cytotoxicity at their MIC<sub>50</sub> and MIC<sub>80</sub> against *C. albicans* in vitro, by the Alamar Blue® and MTT methods. The MPs obtained with the polymers Eudragit L-100® (E), Gantrez MS-955® (G) or the combination of both (EG), plus N 10% or 20%. Human keratinocytes (NOK) were proliferated in vitro and seeded ( $2 \times 10^4$  cells / mL), in DEMEM culture medium with 10% fetal bovine serum in 96-well plates and incubated for 24 h for semiconfluency. Then, the culture medium was replaced with new medium (200 µl) containing 2 µl of stock solutions, in DMSO, of the studied materials, to reach the MICs, conforming the experimental groups: GN10<sub>50</sub>, GN10<sub>80</sub>; GN20<sub>50</sub>, GN20<sub>80</sub>, EN10<sub>50</sub>, EN10<sub>80</sub>, EN20<sub>50</sub>, EN20<sub>80</sub>, EGN10<sub>50</sub>, EGN10<sub>80</sub>, EGN20<sub>50</sub>, EGN20<sub>80</sub> (all MPs with N) and G0 and E0 (white MPs, without drug). The solvent was also evaluated at 1% (DMSO group). As a control group (C), cells were cultured that received only the culture medium (100% growth). Along with the treatments, 20 µl of the Alamar Blue® reagent were added to the wells containing the cells, which were incubated for 24 h. Fluorescence readings were taken at 6, 12 and 24 h (emission of 544 nm and 590 nm of transmission). In the MTT test, the reagent was inserted at the end of the incubation period with the treatments (24 h). For this, the cells were washed with PBS and received 200 µl of MTT at 0.5 mg / mL, sealed and returned to the oven for 4 h. The solution was discarded and the formazan crystals solubilized in 200 µl of methanol, for 5 min. The supernatant was read at 570 nm. The tests were carried out in triplicate and on three occasions. The fluorescence or absorbance measurements were calculated as a percentage of inhibition of metabolic activity compared to the control and classified qualitatively. The data were analyzed using the Shapiro-Wilk test, which showed a non-normal distribution. The factors considered were material (independent, ten levels), MIC (dependent, two levels: 50/80) and incubation time (only Alamar Blue®, dependent, three levels). The complementary tests used were Kruskal-Wallis and Friedman. Significant difference was considered with  $p < 0.05$  values. The qualitative analysis of cytotoxicity of the different MPs showed that in the fluorescence readings, no MP showed moderate or highly cytotoxic behavior. In the quantitative analysis, there was no significant difference between the groups evaluated in the periods of time tested, showing a similar behavior for the MPs. In the absorbance readings, in the qualitative analysis, the MPs also showed a mild or non-cytotoxic behavior. In the quantitative analysis, the MPs showed a significant difference in relation to the control group, but not between them. MP GN10<sub>80</sub> was found to be non-cytotoxic in all tests. No MP showed moderate or high cytotoxicity.

**Keywords** \*: Nystatin, Cytotoxicity Immunological Tests, Polymers.

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

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

EP	Estomatite protética
N	Nistatina
E	Eudragit® L-100
G	Gantrez MS-955® MS-955
%	Porcentagem
°C	Grau Celsius
±	Mais ou menos
ANOVA	Análise de variância
G	Gramma
Min	Minuto
Mg	Miligramma
ml	Mililitro
mm	Milímetro
Nm	Nanometro
Rpm	Revoluções por minuto
µg	Microgramma
µL	Microlitro

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	10
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	13
2.1. Estomatite Protética.....	13
2.2 Sistema De Liberação Controlada.....	21
2.3 Testes De Citotoxicidade.....	31
2.4 Testes De Citotoxicidade Usando Ensaio De Redução De Enzima Resazurina E Sal De Tetrazólio.....	46
2.5 Toxicidade De Dimetilsulfóxido (DmsO).....	55
<b>3. PROPOSIÇÃO</b> .....	58
3.1 Proposição Geral.....	58
3.2 Proposição Específica.....	58
<b>4. MATERIAIS E MÉTODO</b> .....	59
4.1 Delineamento Experimental.....	59
4.2. Grupos Experimentais.....	60
4.3 Preparo Dos Materiais A Serem Testados.....	61
4.3.1 Obtenção das MPs poliméricas.....	61
4.3.2 Soluções mãe para a diluição das MPs.....	61
4.4 Descongelamento E Manutenção Das Células.....	61
4.5 Plaqueamento Das Células Para O Experimento.....	62
4.6 Aplicação Dos Tratamentos Nas Células Semeadas.....	63
4.7 Avaliação Da Viabilidade Celular Pelo Teste Alamar Blue.....	64
4.8 Avaliação Da Viabilidade Celular Pelo Teste MTT.....	64
4.9 Análise Estatística Dos Dados.....	65
4.9.1 Estatística descritiva: medidas de tendência central e de dispersão das variáveis quantitativas.....	65

4.9.2 Estatística de Inferência: Avaliação da distribuição dos dados quantitativos....	66
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>67</b>
5.1 Resultados Referentes Aos Valores Obtidos Pela Leitura De Fluorescência Do Teste Alamar Blue.....	67
5.1.1 Análise qualitativa para classificação dos materiais testados seguindo a ISO....	67
5.1.2 Comparação estatística (análise quantitativa dos dados de fluorescência) .....	73
5.2 Resultados Referentes Aos Valores Obtidos Pela Leitura De Absorbância Do Teste MTT.....	77
5.2.1 Análise qualitativa para classificação dos materiais testados seguindo a ISO....	77
5.2.2 Comparação estatística (análise quantitativa dos dados).....	81
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>83</b>
<b>7. CONCLUSÃO.....</b>	<b>88</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>89</b>
<b>APÊNDICE A - VALORES DE PROLIFERAÇÃO CELULAR.....</b>	<b>93</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Entre as infecções orais oportunistas, a candidíase é uma das mais comuns, que apresenta diferentes apresentações clínicas agudas e crônicas com diversas abordagens diagnósticas e terapêuticas (QUINDÓS et al., 2019). É uma infecção fúngica causada por leveduras que pertencem ao gênero *Candida*, sendo a mais comum a *Candida albicans* (SAWANT; KHAN, 2017). Um dos tipos mais comuns candidíase oral é a estomatite protética (EP).

Na mucosa oral, tanto em maxila como em mandíbula, várias condições inflamatórias podem se desenvolver, entre elas a EP (condição inflamatória crônica) (SANITÁ, 2012; SIVARAMAKRISHNAN; SRIDHARAN, 2017). A EP pode ser causada pelo uso contínuo de próteses removíveis totais ou parciais, principalmente no palato. Os possíveis fatores identificados são trauma devido a próteses mal ajustadas ou com superfície rugosa, falta de higiene bucal e uso noturno de próteses, todas sobrepostas à infecção por *Candida* (SIVARAMAKRISHNAN; SRIDHARAN, 2017). Geralmente é tratada com aplicação tópica de nistatina, clorexidina ou miconazol antes do uso de drogas sistêmicas (SANITÁ, 2012; SIVARAMAKRISHNAN; SRIDHARAN, 2017; QUINDÓS et al., 2019).

Entre os medicamentos de uso tópico está a Nistatina (N) que é um antibiótico polieno-tetraeno frequentemente usado no tratamento de micoses. Este medicamento é ativo contra a maioria dos fungos patogênicos, como algumas espécies de *Candida* (STEFONOVIC et al., 2013). A N obtida de *Streptomyces noursei*, liga-se ao ergosterol da membrana plasmática fúngica e forma poros que a torna mais permeável, causando perda de potássio intracelular com efeito fungicida (QUINDÓS et al., 2019).

Embora a terapia tópica seja a primeira escolha, sua falha não é infrequente, principalmente devido ao efeito diluente da saliva e aos movimentos da língua, os quais reduzem os agentes antifúngicos a concentrações subterapêuticas (SANITÁ, 2012). Além disso, os agentes tópicos frequentemente requerem doses múltiplas, e seu sabor pode causar náuseas, o que pode diminuir a adesão do paciente. Se uma abordagem sistêmica for necessária, medicamentos com triazol como fluconazol são frequentemente utilizados. No entanto, esses medicamentos devem ser administrados com cautela, pois podem causar efeitos colaterais

hepatotóxicos e nefrotóxicos. (SANITÁ, 2012; SIVARAMAKRISHNAN; SRIDHARAN, 2017; QUINDÓS et al., 2019).

Pensando em solucionar estes problemas, o avanço da ciência dos materiais e da tecnologia farmacêutica permitiu a criação de várias estratégias para a administração de medicamentos, como bombas osmóticas, lipossomas, hidrogéis e micropartículas (MPs) poliméricas. Os principais objetivos desses dispositivos de administração de medicamentos são a duração da droga por mais tempo, número reduzido de doses necessárias para o tratamento de doenças e a proteção dos fármacos de inativação para atingir o tecido alvo (VILOS; VELASQUEZ, 2012; ANWAR et al., 2018).

As MPs poliméricas como estratégia de administração de medicamentos têm vantagens sobre outros sistemas como: uma melhor estabilidade no ambiente biológico do que os lipossomos, suporte para encapsular medicamentos hidrofílicos e hidrofóbicos oferecendo uma ampla gama de aplicações terapêuticas, modulam a taxa de liberação por um longo período de tempo e tem a capacidade de reduzir a sua toxicidade (VILOS; VELASQUEZ, 2012; ANWAR et al., 2018; KURT et al., 2017).

Para melhorar as propriedades dos medicamentos, polímeros podem ser usados para sintetizar as MP por vários métodos de síntese, como o método de secagem por pulverização (spray dryer). Este permite produzir grandes quantidades de partículas com morfologia esférica e amorfa com rugosidade ou porosidade em sua superfície (VILOS; VELASQUEZ, 2012).

Um dos polímeros mais utilizados nos sistemas de liberação controlada de fármacos é o Eudragit® L-100, copolímero derivado do ácido metacrílico e do ácido metil-metacrílico empregado em formulações farmacêuticas nas formas de microesferas, nanopartículas, lipossomas e comprimidos. Estão disponíveis em diversas formas físicas como dispersão aquosa, orgânica, solução, grânulos e pós (EUDRAGIT® L-100, 2019).

O polímero Gantrez MS-955® MS-955 é um sal misto de sódio e cálcio de éter metilvinílico e anidrido maleico fornecido como um pó esbranquiçado. O polímero é lentamente solúvel em água, resultando em soluções de cor âmbar com alta viscosidade e adesão. Os cátions formam pontes de sal que reticulam as cadeias poliméricas. É muito usado na formulação adesiva para próteses dentárias. Oferece

excelente bioadesão em ambientes úmidos, proporciona retenção a longo prazo de cremes e pós adesivos para próteses (GANTREZ® MS-955, 2018).

MPs de N foram desenvolvidas e caracterizadas por Ribeiro, em 2018 (RIBEIRO, 2018), tendo como um dos objetivos a incorporação destas MP em adesivo protético para tratamento da EP. Após a caracterização, essas MPs tiveram seu potencial antifúngico testado por Egg, em 2020 (EGG, 2020), que calculou a concentração inibitória mínima de 50% e 80% (CIM<sub>50</sub> e CIM<sub>80</sub>, respectivamente) sobre células de *C. albicans*. Porém para o desenvolvimento de novos medicamentos, testes que avaliem a biocompatibilidade do material são necessários.

Existem inúmeros testes para avaliar o grau de toxicidade da nova formulação. Os testes mais específicos que existem são os terciários (em humanos) que procuram testar o material na maneira como se pretende usá-lo clinicamente. Estes testes são precedidos pelos testes secundários (in vivo, com animais) com a implantação em tecidos subcutâneos e ósseos e testes de irritação da membrana da mucosa oral. Entretanto para que possam ser selecionados os materiais para serem levados aos testes secundários e terciários, testes preliminares são utilizados, os quais podem ser realizados em cultura de células *in vitro* (HENSTEN-PETTERSEN, 1988).

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 ESTOMATITE PROTÉTICA

O estudo de Semis et al., 2010 (SEMIS et al., 2010), teve como objetivo desenvolver uma formulação nistatina-intralipídica (NYT-IL) que pode ser administrada sistemicamente e, portanto, ser útil no tratamento de micoses invasivas. A nistatina (NYT, Sigma Chemical, EUA) foi dissolvida em dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma Chemicals, St. Louis, MO, EUA) e diluída com solução salina até uma concentração final de 0,8 mg/ml em uma solução a 4% de DMSO. O NYT-IL foi preparado por uma diluição de 25 vezes do NYT em Intralipid™ 20% (Kabi Pharmacia, Estocolmo, Suécia) até uma concentração final de NYT de 0,8 mg/ml e agitada vigorosamente a 24°C por 18 h em um agitador de incubadora em ambiente controlado a 280 rpm. Todas as amostras foram diluídas 100 a 2.000 vezes em solução salina antes da medição. Cada diluição foi medida três vezes utilizando o dimensionador de partículas ALV (sistema de dispersão dinâmica da luz), em ângulo de 170°. Para determinação da associação de NYT com partículas de IL, 1 ml de NYT-IL (1 mg / ml) foi fracionado por ultracentrifugação por 30 minutos a 200.000 g usando uma ultracentrífuga com rotor TLA-120. A atividade antifúngica in vitro de NYT-IL versus NYT foi testada nas seguintes cepas: *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida Krusei*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus niger*, *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*. Todas as culturas foram mantidas a -70°C em glicerol a 25%. Antes do teste de suscetibilidade, os fungos foram cultivados em ágar Sabouraud dextrose a 28°C e subcultivados para o teste. As atividades in vitro de agentes antifúngicos foram determinadas usando o sistema de microdiluição com placas de microtitulação de 96 poços, de acordo com o protocolo CLSI M27-A para leveduras e protocolo M38-A para fungos filamentosos. As concentrações inibitórias mínimas (CIM) dos fármacos foram determinadas após 48 h de incubação. A menor concentração de fármaco sem crescimento nas placas de SDA foi determinada como o valor da concentração fungicida mínima (CFM). Eritrócitos frescos de ovelha (SRBC) foram suspensos em solução salina estéril a 5% [vol / vol] e lavados duas vezes com solução salina por centrifugação (1.800 g 10 min). Quatro e meio ml de SRBC lavado e 0,5 ml de NYT ou NYT-IL diluídos em série foram incubados a 37°C por 1 h. Após a incubação, os



tubos foram centrifugados (1.800 g 10 min) e a hemólise foi avaliada visualmente. O vazamento de potássio foi avaliado nos sobrenadantes usando um espectrofotômetro de absorvância atômica Perkin Elmer 403. A concentração de íons potássio foi determinada após calibração com KCl a 383 nm. A análise estatística dos dados foi realizada utilizando-se o teste t de Student bicaudal (( $P < 0,05$ ). O tamanho das partículas na mistura de NYT-IL imediatamente após a preparação foi semelhante à da emulsão de IL. Esta característica física não mudou durante o armazenamento de 4 semanas à temperatura ambiente, 4 e 37°C apontando para a estabilidade da mistura. 80% do NYT está associado as partículas de IL. A quantidade de NYT associada a IL foi mantida durante o armazenamento em 24 e 4°C, indicando novamente a estabilidade da formulação de NYT-IL. A atividade antifúngica in vitro do NYT-IL e NYT em relação as espécies de *Candida*, revelaram que os valores de CIM e CFM do NYT-IL são inferiores aos da NYT. Os valores médios da CIM do NYT-IL foram inferiores aos do NYT para todas as espécies de *Aspergillus* testado. A suscetibilidade de cepas de *Fusarium* mostraram variabilidade, sem maior eficácia da NYT-IL versus a do NYT ( $P > 0,05$ ). Para avaliar um possível efeito tóxico da formulação do NYT-IL, foi determinado a hemólise do SRBC exposto a várias concentrações de NYT-IL em comparação com o NYT. Enquanto a hemólise foi obtida na presença de 40µg / ml de NYT, para NYT-IL, uma concentração de 800 µg / ml foi necessário para obter o mesmo efeito. Assim, indicando menor toxicidade do NYT-IL. Em conclusão, foi relatado o desenvolvimento de uma nova formulação de nistatina: nistatina-intralipídeo, com atividade in vitro contra *Candida* e espécies de *Aspergillus*.

Sanitá et al., em 2012 (SANITÁ et al, 2012), devido a mudanças epidemiológicas no tratamento da EP, julgaram necessário estabelecer novas estratégias de controle e manejo das infecções causadas por diferentes espécies de *Candida* spp. Em um ensaio clínico randomizado que compararam a eficácia da desinfecção por micro-ondas e da N no tratamento de pacientes diabéticos tipo 2 bem controlados com EP em termos de resultados microbiológicos e clínicos. Pacientes diabéticos que usavam próteses totais maxilares e que apresentavam EP (n = 40) foram divididos em dois grupos: N (pacientes tratados com N tópica 4 vezes/dia por 14 dias) e micro-ondas (pacientes com próteses irradiadas no micro-ondas - 650 W por 3 min - 3 vezes/semana por 14 dias). Amostras micológicas foram coletadas dos palatos e próteses dos pacientes para quantificação e identificação de *Candida*, e fotografias padronizadas dos palatos foram tiradas para análise clínica. As avaliações

foram repetidas no início, no final do tratamento (dia 14) e durante o acompanhamento (dias 30, 60 e 90). Os dados microbiológicos foram avaliados por análise de variância usando um modelo estatístico de efeitos aleatórios, teste post hoc de Tukey e teste qui-quadrado ( $\alpha = 0,05$ ). Os resultados clínicos foram analisados usando os testes exatos de Mann-Whitney e Fisher ( $\alpha = 0,05$ ). Ambos os tratamentos foram considerados bem-sucedidos na redução dos sinais clínicos de EP e reduziram significativamente os valores de unidades formadoras de colônias/ml dos palatos e próteses nos dias 14 e 30. Além disso, 40% dos pacientes tratados foram curados pelo fim do tratamento. Não foram reveladas diferenças significativas nos resultados microbiológicos e clínicos entre os dois grupos ( $P > 0,05$ ). *C albicans* foi a espécie mais predominantemente isolada ( $P < 0,01$ ), seguida por *C tropicalis* e *C glabrata*. Os tratamentos de desinfecção por micro-ondas e N reduziram significativamente as ufc/mL dos palatos e próteses nos dias 14 e 30 e foram considerados bem-sucedidos na redução dos sinais clínicos de estomatite protética. A desinfecção por micro-ondas das próteses totais superiores foi tão eficaz quanto a N no tratamento de pacientes diabéticos bem controlados com EP.

Stefanovic et al., em 2013 (STEFANOVIC et al., 2013), acoplaram a N, um antibiótico polieno-tetraeno amplamente utilizado no tratamento de micoses, com goma de polissacarídeo oxidada, formando estruturas entre grupos amina de antibióticos e grupos aldeído de carboidratos modificados. Os conjugados de amina sintetizados desta maneira foram reduzidos com boro-hidreto de sódio para aminas secundárias. Dois conjugados de amina foram obtidos com diferentes teores de N. Os conjugados foram caracterizados por UV-Vis, FTIR, espectroscopia de RMN e análise termogravimétrica. A solubilidade em água, diferentemente da N, e a atividade significativa contra *C. albicans* e *Aspergillusniger* com concentrações inibitórias mínimas na faixa de 3,125 a 6,25 IgmL<sup>-1</sup> e 6,25 a 25 IgmL<sup>-1</sup>, respectivamente, indicam que a integridade química e a função biológica destes compostos foram mantidas. A formação de conjugados resultou em estabilidade significativamente aumentada nas diferentes condições de armazenamento, enquanto as atividades antifúngicas foram mantidas e a atividade hemolítica diminuída, em comparação com a N livre. Do ponto de vista da aplicação potencial, a solubilidade desses compostos na água é uma indicação de seu potencial uso em várias formulações que seriam não tóxicas a valores fisiológicos de pH. Assim, a ligação da N às amostras oxidadas pode ser

alterada variando a extensão da oxidação do polissacarídeo, alterando assim a concentração do antibiótico.

Em 2017, Sawant e Khan (SAWANT E KHAN et al., 2017) revisaram as várias classes de candidíase, sua patologia, limitações das terapias antifúngicas convencionais e avaliaram e discutiram as novas abordagens de sistemas de liberação controlada de fármacos visando redução de efeitos colaterais e melhora do seu perfil terapêutico e eficácia. Segundo os autores, a candidíase é uma infecção fúngica causada por leveduras que pertencem ao gênero *Candida*. Existem outras espécies desse gênero que podem causar infecção em humanos, sendo a mais comum a *C. albicans*. Leveduras de *Candida* normalmente residem no trato gastro intestinal e podem ser encontradas nas membranas mucosas e na pele sem causar infecção; no entanto, o crescimento excessivo desses organismos pode causar o desenvolvimento de sintomas. *C. albicans* é um fungo polimórfico e pode de apresentar na forma leveduriforme ovoide em pH baixo ou como hifas verdadeiras de paredes paralelas em pH alto. Ambas as formas são importantes por sua patogenicidade. Outro fator importante que determina a virulência é a capacidade de formar biofilme nas superfícies abióticas ou bióticas, como cateter, próteses totais e superfície da mucosa. Atualmente existem novas abordagens para se tentar tratar a candidíase. A presença de outras doenças que comprometem a imunidade do paciente torna mais difícil o tratamento. A candidíase é majoritariamente dividida em infecções superficiais (orais ou vaginais) e infecções sistêmicas, também conhecidas como candidíase invasiva. As modalidades terapêuticas convencionais usadas para tratar a candidíase estão associadas a vários efeitos colaterais que limitam a dosagem. A candidíase faríngea oral é a infecção oportunista mais comum encontrada em pacientes infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) (até 90%) devido à diminuição da imunidade. Pacientes infectados pelo HIV em estágios avançados são muito mais propensos à candidíase oral do que os estágios iniciais infectados pelo HIV. Fumar produz um grau de xerostomia (secura na boca), que quando combinada com uma redução da IgA salivar, facilita a invasão por espécies de *Candida*. É geralmente associado a quatro formas orais primárias: candidíase pseudomembranosa (candidíase oral), candidíase oral eritematosa aguda, candidíase oral eritematosa crônica e candidíase hiperplásica crônica. Essas formas primárias de candidíase também estão associadas a lesões referidas como formas secundárias de candidíase: quelite angular, glossite romboide mediana e EP. A candidíase oral é

tratada através do gerenciamento de fatores predisponentes identificáveis, como limpeza adequada de próteses em pacientes com candidíase eritematosa crônica, usando preparações de hipoclorito de sódio a 1% ou solução de clorexidina. No entanto, o uso de clorexidina pode causar descoloração dos dentes e da língua. Outro método para manter uma boa higiene bucal é o uso de escova de dentes automatizada com a capacidade de remover placas em locais inacessíveis devido à força de cisalhamento de fluido gerada. Em casos como AIDS e leucemia, o sistema imunológico comprometido e os fatores predisponentes dificultam a erradicação da infecção fúngica e, portanto, a terapia antifúngica é necessária. Os agentes antifúngicos são classificados em polienos (compostos anfipáticos heterocíclicos), azóis, análogo de pirimidina fluorada 5-ucitosina e equinocandinas. Os polienos são frequentemente utilizados no tratamento da candidíase eritematosa oral. A anfotericina B é administrada como uma suspensão oral para candidíase oral refratária, frequentemente observada nos pacientes infectados pelo HIV. Fluconazol e o Itraconazol também são administrados por via oral, devido à sua fácil absorção pelo intestino. O miconazol é usado como preparação tópica no tratamento da queilite angular. O tratamento antifúngico administrado de maneira apropriada e oportuna é necessário, pois um atraso no tratamento está associado a um aumento da taxa de mortalidade. Outro fator associado à taxa de mortalidade é a formação de biofilmes de micro-organismos, particularmente na presença de corpos estranhos, como dispositivos de permanência e próteses. Vários agentes antifúngicos sistêmicos disponíveis para o tratamento da candidíase invasiva incluem polienos, azóis, equinocandinas e ictiostatina. Os azóis são inativos contra o biofilme, enquanto as equinocandinas mostram eficácia variável; no entanto, a anfotericina B mostra atividade *in vitro* consistente contra o biofilme produzido por diferentes espécies de *Candida*. Os autores concluíram que o desenvolvimento de novos sistemas de administração de medicamentos direcionada localmente, redução na frequência de doses e alívio de efeitos colaterais é uma necessidade não atendida. Algumas das novas abordagens exploradas para a liberação de agentes antifúngicos incluem sistemas vesiculares, baseados em nanopartículas, transportadores coloidais e sistemas de geleificação *in situ*. No caso da N, micropartículas tem apresentado menor CIM de 5,21 µg mL, contra *C. albicans* e foram melhores que as esferas (13,5 µg/mL) e nanopartículas (38 µg/mL), demonstrando a eficácia das micropartículas de alginato como portador promissor no tratamento da candidíase oral. Para o nitrato de

miconazol, formulações muco adesivas contendo micropartículas tem proporcionado liberação sustentada do medicamento em comparação com o gel oral comercializado. Mais estudos pré-clínicos e clínicos precisam validar o uso desses portadores de nanotecnologia para agentes antifúngicos de primeira e segunda geração para melhor gerenciamento terapêutico da candidíase.

Sivaramakrishnan e Sridharan, em 2017 (SIVARAMAKRISHNAN, SRIDHARAN, 2017) relataram que a EP é uma condição inflamatória crônica clinicamente evidente da mucosa oral, principalmente na maxila, causada pelo uso contínuo de próteses totais ou parciais. Os possíveis fatores identificados são trauma devido a próteses mal ajustadas, superfície rugosa da prótese, falta de higiene bucal e uso noturno de próteses, todas sobrepostas à infecção por *Candida*. Isso leva a vermelhidão e inflamação da mucosa em contato com as próteses. A condição é mais pronunciada em pacientes imunocomprometidos (terapia com esteróides ou distúrbios imunossupressores), levando a uma infecção oportunista por *Candida* mais grave. Por causa da etiologia fúngica, agentes antifúngicos como N, anfotericina B e nitrato de miconazol estão sendo tradicionalmente usados para o tratamento de estomatite induzida por prótese. No entanto, causam efeitos adversos no uso a longo prazo. A prevenção de EP seria a medida mais apropriada para evitar a carga adicional causada pelos efeitos adversos aos agentes antifúngicos. A desinfecção de próteses usando agentes como a clorexidina e outros agentes antimicrobianos, a desinfecção por micro-ondas e o uso de terapia fotodinâmica foram experimentados em vários ensaios clínicos randomizados para identificar seu papel na prevenção da EP, diminuindo a carga de *Candida* spp. Se essas técnicas de desinfecção pudessem reduzir a carga de *Candida* spp tão efetivamente quanto os agentes antifúngicos, elas poderiam ser usadas como alternativas prováveis aos agentes antifúngicos, eliminando assim os efeitos adversos da terapia antifúngica. Portanto, o objetivo dos autores nesta revisão sistemática e metanálise foi identificar a eficácia de várias técnicas de desinfecção na redução da carga de *Candida* spp em comparação com agentes antifúngicos, com o objetivo de minimizar o uso de agentes antifúngicos e seus efeitos adversos causados. Esta revisão sistemática e meta-análise visou identificar a desinfecção de próteses como um modo de prevenção de EP para evitar os efeitos adversos da terapia antifúngica. A pesquisa bibliográfica foi realizada em bancos de dados eletrônicos. A ferramenta de Cochrane foi usada para avaliar o risco de viés. O gráfico foi gerado para heterogeneidade com a estatística e o teste do qui-

quadrado para as seguintes medidas de resultado: contagem de *Candida spp*, melhora clínica, recorrência de estomatite e eventos adversos. Um total de cinco estudos foi considerado elegível, e a estimativa combinada para a contagem de *Candida spp* de 0,39 (0,03, 0,75) foi estatisticamente significativa, favorecendo a terapia antifúngica. O gráfico do risco relativo de cura clínica não foi significativo entre os grupos com a estimativa combinada de 1,38 (0,87, 2,18), e a recorrência de estomatite foi de 1,06 (0,79, 1,43). Enxagatórios bucais, desinfetantes, desinfecção por micro-ondas e terapia fotodinâmica pode ser considerados modos de prevenção de EP, com base na melhora clínica observada. Assim o uso de terapia antifúngica seria necessário apenas em casos graves.

Para Quindós et al., em 2019 (QUINDÓS et al., 2019), a candidíase é uma das infecções orais oportunistas mais comuns que apresenta diferentes apresentações clínicas agudas e crônicas com diversas abordagens diagnósticas e terapêuticas. Esses autores realizaram uma revisão bibliográfica sobre os instrumentos terapêuticos disponíveis contra a candidíase oral e sua utilidade em cada situação clínica. Estudos recentes sobre o tratamento da candidíase oral foram recuperados no PubMed e na Cochrane Library. Limitaram os estudos em seres humanos, publicações em inglês e espanhol de 2010 até a data de submissão de 2019. A busca bibliográfica identificou 296 artigos, dos quais 72 foram selecionados após a leitura dos resumos dos manuscritos. Após a análise desses artigos, 33 manuscritos foram finalmente incluídos nas referências, após exclusão das publicações que não se enquadravam nos objetivos da presente revisão. Assim, os autores encontraram que a N e M são os antifúngicos tópicos mais utilizados. Ambos os medicamentos antifúngicos são muito eficazes, mas precisam de um longo tempo de uso para erradicar a infecção. As apresentações farmacológicas do M são mais confortáveis para os pacientes, mas este medicamento pode interagir com outros medicamentos e esse fato deve ser avaliado antes do uso. Outras alternativas tópicas para candidíase oral, como anfotericina B ou clotrimazol, não estão disponíveis em muitos países. O fluconazol oral é eficaz no tratamento da candidíase oral que não responde ao tratamento tópico. Outras alternativas de tratamento sistêmico, oral ou intravenoso, menos utilizadas são itraconazol, voriconazol ou posaconazol. As novidades disponíveis incluem equinocandinas (anidulafungina, caspofungina) e isavuconazol. As equinocandinas só podem ser usadas por via intravenosa. O isavuconazol está disponível para uso oral e intravenoso. Outras alternativas

promissoras são novas drogas ou o uso de anticorpos, citocinas e peptídeos antimicrobianos. A N, obtida de *Streptomyces nursei*, liga-se ao ergosterol da membrana plasmática fúngica e forma poros que a tornam mais permeável, causando perda de potássio intracelular com efeito fungicida. Além disso, a N também causa danos celulares secundários por auto-oxidação. O espectro anti-Candida da N é bastante amplo. O ponto de corte antifúngico dos polienos nos testes de suscetibilidade in vitro é uma concentração inibitória mínima (CIM) de 1 µg/mL. Alguns isolados clínicos resistentes ou menos suscetíveis foram descritos em *Candidalusitaniae*, *C. rugosa*, *C. haemulonii*, *C. lipolytica*, *C. guilliermondii*, *C. krusei* e *C. glabrata*. A N não é absorvida por via oral. Seu uso parenteral é tóxico, mas foram realizados ensaios clínicos com uma formulação lipossômica que permite sua administração intravenosa. Seus efeitos indesejáveis incluem irritação local e, quando administrados por via oral, náusea, vômito e diarreia. A N é provavelmente segura durante a gravidez e a amamentação e seu tratamento é eficaz se administrada por um período suficiente. No entanto, o sabor desagradável e esse padrão de tratamento prolongado comprometem a adesão do paciente. O encapsulamento da N nas nanopartículas ou a inclusão em cremes dentais ou condicionadores de tecidos exibem propriedades que permitem sua funcionalidade in vitro e podem fornecer a base para novas abordagens bem-sucedidas no tratamento da candidíase oral. O M e o restante dos azóis (imidazóis ou triazóis) bloqueiam a lanosterol 14- $\alpha$ -desmetilase dependente do citocromo P450. Esta ação é fungistática, causando uma importante alteração da permeabilidade celular e a inibição do crescimento da célula fúngica. Azóis desenvolvem o seu efeito de forma mais lenta do que polienos, mas com menos toxicidade porque a sua ação contra membranas de fungos é mais seletiva do que a de polienos. O Nitrato de Miconazol tem uma boa atividade in vitro antifúngica contra Candida, mas esta atividade é inferior contra alguns isolados de *C. glabrata* e *C. krusei*. Pode ser administrado topicamente, por via oral ou por via intravenosa, mas estas duas últimas formas são muito pouco frequentes. É administrado na forma de comprimidos bucais, goma de mascar, gel oral. Em alguns países, existe uma apresentação alternativa de M em formulação mucoadesiva bucal diária a 50 mg. A aplicação diária é uma vantagem sobre a aplicação de N por quatro ou cinco vezes por dia para manter a adesão do paciente ao tratamento. Essa formulação de nitrato de miconazol mucoadesiva exibiu maiores concentrações salivares e melhor tolerância para o paciente. N, M e fluconazol são muito eficazes no tratamento da

candidíase oral. Existem alternativas sistêmicas para o tratamento de infecções recalcitrantes, como os novos triazóis, equinocandinas ou apresentações lipídicas da anfotericina B.

## 2.2 SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA

Albers et al., em 2013 (ALBERS et al., 2013), investigaram os efeitos citotóxicos das nano e micropartículas (MPs) de prata e prata iônica nos osteoblastos (OBs) e osteoclastos (OCs) e correlacionaram seus efeitos com a eficácia antibacteriana em *Staphylococcusepidermidis*. Culturas celulares de OBs e OCs primários foram realizadas para estudar a influência de partículas de prata e prata iônica no desenvolvimento e diferenciação de OBs e OCs. Os OBs primários foram isolados de calvárias de camundongos com 1-2 dias de idade por digestão sequencial de colagenase, expandidas por 4 dias em meio de cultura DMEM suplementado com 10% de SFB (inativado pelo calor) e 1% de penicilina e estreptomicina e posteriormente armazenado em azoto líquido. As células foram subsequentemente separadas com tripsina a 0,05% em ácido etilenodiaminotetraacético 0,53 mM (EDTA) e semeadas em placas de 96 poços. Após a semeadura, os meios de cultura foram suplementados para induzir diferenciação de OBs. Os OCs foram cultivados a partir de células da medula óssea (BMC). Para o plaqueamento, todas as células foram cultivadas em DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (não inativado pelo calor) e 1% de penicilina/estreptomicina e mantidos a 37 °C em uma atmosfera umidificada de 5% de CO<sub>2</sub>. As células foram tratadas com partículas de prata por 72 h. Para determinar se os efeitos potenciais induzidos por partículas de prata foram devidos à liberação desses íons das partículas, estas foram incubadas primeiro em meio de cultura de células DMEM por 6 dias sem a adição de OBs ou OCs. Depois disso, os sobrenadantes livres de partículas foram coletados e ambas as células foram tratadas com meio condicionado a 20%. Partículas de titânio foram usadas como controles para distinguir entre efeitos mediados por partículas e íons. NaNO<sub>3</sub> serviu como controle contra nitrato de prata. Todas as culturas foram interrompidas após 6 dias e foram realizados ensaios de diferenciação e viabilidade celular. A viabilidade celular foi quantificada com ensaios XTT. A reação de cor foi medida a 490 nm. A diferenciação do OB foi avaliada quantificando a atividade da fosfatase alcalina. As comparações pareadas com os respectivos controles foram realizadas usando o teste



de Dunnett duplo como análise post hoc. Comparações múltiplas em pares foram feitas usando o teste de Tukey para análise post hoc ( $\alpha = 0,05$ ). Os valores médios de IC<sub>50</sub> foram calculados usando análises de regressão, usando modelo de ajuste de curva para determinar se os modelos de regressão linear ou logarítmica podiam ser aplicados. Todos os dados numéricos estão representados na média, com o desvio padrão. Os dados foram avaliados estatisticamente por ANOVA. Nanopartículas de prata (50 nm) exibiram fortes efeitos citotóxicos em OBs e OCs. Efeitos citotóxicos fracos foram observados para MPs de prata (3 nm). A citotoxicidade foi mediada principalmente pela liberação de prata iônica independentemente do tamanho. Efeitos antibacterianos ocorreram em concentrações de Ag<sup>+</sup> 2-4 vezes maiores do que aquelas que induzem efeitos citotóxicos. Tais efeitos adversos na sobrevivência de OB e OC podem ter efeitos negativos na biocompatibilidade de implantes ortopédicos.

Endo et al., em 2012 (ENDO et al., 2012), realizaram um estudo que produziu MPs contendo extrato de romã pela técnica de spray dryer, utilizando alginato ou quitosana como agentes encapsulantes. Ensaio de caracterização, antifúngico e de citotoxicidade (48 h) foram realizados. Verificou-se que a concentração tóxica teria que ser 20 vezes maior do que a necessária para inibir *C. albicans*. Os rendimentos de produção foram de cerca de 40% para as MPs de alginato e 41% para a quitosana. Os diâmetros médios foram de 2,45  $\mu\text{m}$  e 2,80  $\mu\text{m}$  e a eficiência de encapsulação foram de 81,9% e 74,7% para as MPs de alginato e quitosana, respectivamente. O processo de secagem por pulverização preservou a atividade antifúngica contra *C. albicans*. A microencapsulação protege o fármaco encapsulado e permite uma liberação controlada para alcançar o efeito terapêutico desejado. Estes resultados podem ser úteis para o desenvolvimento de formas farmacêuticas para o tratamento da candidíase, e mais investigado em modelos *in vivo*.

Vilos e Velasquez em 2012 (VILOS, VELASQUEZ, 2012) apresentaram fundamentos sobre MPs poliméricas com base em sua formulação, mecanismos de liberação de fármacos e algumas de suas estratégias terapêuticas inovadoras para o tratamento de múltiplas doenças. Relataram que a descoberta e o desenvolvimento de novos medicamentos para o tratamento de doenças é um processo demorado e caro. O desenvolvimento do medicamento geralmente requer cerca de 14 anos, e estudos demonstraram que, no ano de 2013, cada fase III do ensaio clínico foi de cerca de US \$ 1,9 bilhão. O longo tempo necessário para

desenvolver uma nova aplicação de medicamento e seus altos custos ilustram a necessidade de desenvolver novas estratégias terapêuticas, que melhoram a eficácia de medicamentos disponíveis. O avanço da ciência dos materiais e da tecnologia farmacêutica permitiu a criação de várias estratégias para a administração de medicamentos, como bombas osmóticas, lipossomas, hidrogéis e MP. Os principais objetivos desses dispositivos de administração de medicamentos são a geração de liberação mantida de tempo de droga, número reduzido de doses necessárias para o tratamento de doenças e a proteção dos fármacos de inativação para atingir o tecido alvo. As MP como estratégia de administração de medicamentos têm vantagens sobre outros sistemas, pois não requerem procedimentos cirúrgicos para sua aplicação ou remoção do corpo, como as bombas osmóticas. Além disso, as MP exibiram uma melhor estabilidade no ambiente biológico do que os lipossomas, e seus métodos de formulação altamente reprodutíveis fornecem suporte para encapsular medicamentos hidrofílicos e hidrofóbicos, que oferecem uma ampla gama de aplicações terapêuticas. A liberação de medicamentos pelas MP mostra vários benefícios em comparação com os métodos convencionais de administração de medicamentos, que incluem a capacidade de modular a taxa de liberação de medicamentos por um longo período de tempo e a capacidade de reduzir a toxicidade do medicamento. As MP, como sistemas de administração de medicamentos, foram desenvolvidas usando diferentes polímeros naturais e sintéticos. Os polímeros naturais incluem quitosana, alginato, dextrano, gelatina e albumina e polímeros sintéticos. Vários métodos podem ser utilizados para a síntese das MPs. A secagem por pulverização é um método amplamente utilizado na indústria farmacêutica e de biotecnologia para a síntese de MP, porque permite produzir grandes quantidades de partículas com morfologia esférica e amorfa e pode exibir rugosidade ou porosidade em sua superfície. A liberação de drogas a partir de MP surge como consequência da degradação e/ou erosão do dispositivo polimérico. Portanto, o conhecimento sobre a natureza química dos polímeros é essencial para entender o mecanismo de liberação. Nos casos em que ocorre degradação da matriz polimérica, o medicamento difere através dos canais gerados pela quebra das cadeias poliméricas sem perda de volume na partícula. Por outro lado, quando o transportador polimérico sofre erosão, juntamente com a perda de massa do polímero, o medicamento é liberado. Nesse caso, há uma diminuição no volume da matriz polimérica de acordo com a liberação do medicamento. As MPs podem ter várias indicações como em casos de doenças oncológicas, doenças

cardíacas, resposta imunológica e tratamento de diabetes. A incorporação de MPs poliméricas como transportadoras de drogas na prática médica melhora as desvantagens geradas por níveis plasmáticos elevados de curto prazo e reações adversas causadas pela formulação farmacêutica tradicional. Também cria novas estratégias para locais de liberação localizados e sustentados com baixa permeabilidade vascular. Além disso, a ampla gama de biomateriais com diferentes propriedades físico-químicas permite a criação de sistemas inteligentes para a administração de medicamentos, os quais promovem uma resposta ótima e longo prazo para tratamentos de diferentes doenças. O desenvolvimento de MP, como sistemas de administração de medicamentos, estabeleceu as bases para o papel emergente e significativo da nanomedicina baseada em polímeros nanopartículas como portadoras de drogas.

Date et al., em 2013 (DATE et al., 2013) descreveu a obtenção de nanopartículas de Rifampicina adicionada de ácido fólico a partir do polímero Gantrez (NA-119) por complexação iônica - RFGzFa. A Rifampicina é utilizada para tratamento da tuberculose. O ácido fólico foi incorporado em diferentes concentrações simplesmente variando a quantidade de ácido durante a preparação. Nanopartículas de RFGzFa foram preparadas pelo método de difusão de solvente de emulsão. O Gantrez AN-119 hidrolisa rapidamente em meio aquoso, liberando grupos ácido carboxílico, para criar um ambiente ácido. Este facilita a protonação e subsequente complexação iônica do ácido fólico com os grupos carboxílicos, para permitir a incorporação. Os espectros de FTIR confirmaram essa interação. A imagem infravermelha revelou distribuição de ácido fólico através da superfície das nanopartículas. Nanopartículas foram obtidas na faixa de tamanho de 350 a 450 nm com carga de RFM de 12 a 14% em peso. O TEM / SEM revelou morfologia esférica. As nanopartículas de RFGzFa exibiram liberação sustentada de RFM e ácido fólico. O ácido fólico mostrou liberação sustentada por até 12 horas, mediada pela troca iônica. Houve aumento de 480% na captação de RFM com nanopartículas de RFGzFa em comparação com 300% com nanopartículas de RFGz in vitro, em macrófagos humanos. Teste de citotoxicidade pelo método MTT foi realizado, também em macrófagos, nos períodos de 3, 6, 12 e 24 h e as nanopartículas exibiram citotoxicidade significativamente maior em comparação RFM simples. A linhagem celular U-937 sugeriu o papel do ácido fólico na captação mediada pelo receptor de

folato. A complexação iônica representou então uma simples abordagem não covalente para incorporar o ácido fólico em nanopartículas poliméricas de Gantrez.

Iglesias et al., 2016 (IGLESIAS et al., 2016) relata que as principais preocupações com medicamentos projetados para administração oral são sua inativação ou degradação nas condições adversas do trato gastrointestinal, sua baixa solubilidade através da camada de gel de muco gastrointestinal, a baixa permeabilidade do epitélio intestinal que limita sua absorção e sua toxicidade. Nesse contexto, nanopartículas de poli (anidrido) são capazes de proteger a droga do ambiente hostil, reduzir a toxicidade da droga e, em virtude da modificação da superfície, para melhorar ou reduzir sua permeabilidade ao muco e a bioadesão a células alvo específicas. Os copolímeros entre éter metilvinílico e anidrido maleico (comercializado como Gantrez® AN 119) fazem parte das nanopartículas de poli (anidrido). Estas biocompatíveis e biodegradáveis nanopartículas (NPs) podem ser modificadas usando diferentes ligantes. Sua utilidade como droga portadores e sua bioadesão com componentes da mucosa intestinal foram descritos. Contudo, sua toxicidade, genotoxicidade e capacidade de permeação de muco não foram completamente estudadas. O objetivo deste trabalho foi avaliar e comparar a toxicidade in vitro, viabilidade celular e genotoxicidade de nanopartículas de Gantrez® AN 119. Os resultados mostraram que, em geral, as NPs revestidas apresentaram melhor permeabilidade ao muco do que as que são revestidas com manosamina que são os mais permeáveis. As nanopartículas estudadas afetaram o metabolismo celular, a integridade da membrana ou a viabilidade das células das células nas diferentes condições testadas. Além disso, eles não induziram um nível relevante de quebras na fita de DNA.

Kurt et al., em 2017 (KURT et al., 2017), avaliou em estudo in vitro a atividade antifúngica e a citotoxicidade de material de base de prótese contendo MPs de prata. Utilizou-se o material de base para prótese de polimetilmetacrilato (PMMA) e MPs de prata foram adicionadas ao pó do polímero em diferentes concentrações por volume (0%, 0,25%, 0,5% e 1%). Sua atividade antifúngica contra *C. albicans* foi avaliada em termos de unidades formadoras de colônias. As amostras de disco de PMMA contendo MPs de prata foram analisadas em meio de cultura por 1, 2 e 5 dias. A citotoxicidade para as células de fibroblastos de camundongo L929 cultivadas foi avaliada usando um sistema de análise de células em tempo real (RTCA) e o ensaio de 3- [4,5-dimetiltiazol-2-il] -2,5 difenil tetrazólio (MTT). O meio de cultura celular

completo sem soro foi utilizado para o teste. As amostras foram preparadas colocando três discos de material de base para prótese de PMMA em seus próprios tubos estéreis com 9 mL de meio de cultura. Eles foram incubados a 37 ° C por 1, 2 e 5 dias em uma atmosfera umidificada de 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de ar. As amostras foram esterilizadas por filtração através de um filtro de 0,22 µm e foram transferidas para novos tubos contendo meio de cultura fresco após cada período de cultivo. O meio de cultura sem amostra também foi incubado como controle negativo. Em seguida, soro fetal bovino a 10% foi adicionado e foram armazenados a -20°C até o ensaio de citotoxicidade. Foram utilizadas duas técnicas de ensaio de citotoxicidade in vitro: RTCA xCELLigence System e o MTT CellProliferation Kit. Células não tratadas foram usadas como controle e as análises foram feitas em quadruplicata. Para quantificar o número de células viáveis, os dados foram expressos em um índice de células (CI) e exportados para o software Excel. A viabilidade celular em momentos específicos foi expressa como uma porcentagem das células de controle não tratadas. As análises estatísticas dos dados foram realizadas às 24, 56 e 138 h para observar respostas celulares imediatas, agudas e crônicas, respectivamente. Ensaio MTT foi realizado para indicar a resposta celular aguda em 1, 2 e 5 dias. Plaquearam-se 3 x 10<sup>4</sup> células/100 µL de meio por poço em placas de 96 poços e incubaram-se a 37 ° C por 24 h em uma atmosfera umidificada de 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de ar. As partículas foram adicionadas em volumes de 50 µL e as células foram tratadas por 28 h. Após o tratamento, 10 µL de reagente de marcação MTT foram adicionados a cada poço e incubados por mais 4 h. Em seguida, 100 µL da solução de solubilização foram adicionados a cada poço e incubados durante a noite. Após a incubação, a absorbância colorimétrica foi medida a 580 nm (comprimento de onda de referência a 650 nm) usando um leitor de placas de microtitulação. A viabilidade celular foi expressa como uma porcentagem das células de controle não tratadas. Os dados foram analisados no GraphPad Prism 5.0 e são apresentados como média ± desvio padrão (DP). As diferenças estatisticamente significantes foram avaliadas pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste U de Mann-Whitney. Os dados agrupados foram submetidos a análises de variância com testes post hoc de Tukey. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes em P <0,05. O efeito antifúngico contra *C. albicans* aumentou com a porcentagem de MPs de prata (P <0,05). Para ambos os testes, tanto o RTCA como o ensaio MTT, não foi observada citotoxicidade dependente do tempo ou do material de base da prótese PMMA contendo MPs de

prata. O material de base para prótese de PMMA, contendo MPs de prata, possui atividade antifúngica e efeito não citotóxico.

EI-Nahas et al., 2017 (EL-NAHAS et al., 2017) formularam e caracterizaram nanopartículas de Eudragit com silimarina e avaliaram seus efeitos hepatoprotetores e citotóxicos após administração oral. As nanopartículas foram preparadas pela técnica de nanoprecipitação e avaliadas para tamanho de partícula, eficiência de aprisionamento, caracterização em estado sólido e medicamento in vitro. A atividade hepatoprotetora foi avaliada após administração oral de pacientes selecionados. O estudo potencial de citotoxicidade aguda in vivo foi também avaliado, em células de ratos. As nanopartículas selecionadas continham 50 mg de silimarina e 50 mg de polímeros Eudragit (1:1 Eudragit RS 100 e Eudragit LS 100). O teste de morfologia revelou nanopartículas esféricas e uniformemente distribuídas. Estudos DSC e FT-IR sugeriram presença de silimarina em estado amorfo e ausência de interação química. A avaliação hepatoprotetora das nanopartículas em ratos intoxicados por CCl<sub>4</sub> revelou melhora significativa nas atividades de diferentes parâmetros bioquímicos ( $P \leq 0,01$ ) em relação ao produto comercializado. Os estudos histopatológicos sugeriram que as nanopartículas selecionadas produziam melhor efeito hepatoprotetor em ratos intoxicados por CCl<sub>4</sub> em comparação com os produtos comercializados. O estudo de toxicidade não revelou efeito tóxico evidente para amostras em branco ou nanopartículas de silimarina na dose de 50 mg/kg de peso corporal. Os resultados obtidos sugeriram que as nanopartículas selecionadas foram seguras e aprimoraram as propriedades hepatoprotetoras e farmacológicas da silimarina.

Cartagena et al., em 2017 (CARTAGENA et al., 2017), desenvolveram um novo sistema de administração oral de drogas, incorporando MPs poliméricas de nitrato de miconazol em um adesivo experimental para prótese antifúngica (DA). As MPs Eudragit L-100 (E) e Gantrez MS-955 (G) MN de secagem por pulverização foram incorporadas no DA. Os grupos DAE1, DAG1, DAEG1, DAE2, DAG2, DAEG2 foram obtidos a partir da combinação de polímeros usados em MPs MN (E, G e EG) e concentração de MN em DA (1, para 1% e 2, para 2%). DA com MN puro a 2% (DAM) e DA sem MPs ou medicamento (DACT) foram ambos os grupos controle. Todos os grupos foram avaliados para determinar o ensaio microbiológico, força adesiva e toxicidade. A concentração inibitória mínima (CIM) foi realizada pelos métodos de microdiluição e diluição em ágar no extrato de DAs e na forma de gel convencional

(Daktarin). O teste de carga adesiva foi realizado entre amostras de resina acrílica em uma máquina de teste universal após imersão em água. A toxicidade de várias diluições de DAs foi realizada com bioensaio após 24 e 48 h. Os dados de força adesiva foram avaliados pelos testes ANOVA a dois fatores e Bonferroni ( $\alpha = 0,05$ ). A concentração necessária para matar 50% (CL50) foi determinada usando a análise Provit. A DA com MPs poliméricas e droga pura apresentou CIM entre 1,25–5  $\mu\text{g} / \text{mL}$ , semelhante aos valores de CIM do DAM. DAEG2, DAEG1, DAG20 mostraram mais ativos contra. As melhores propriedades adesivas foram exibidas pelo DAEG2, consistindo em alta força adesiva inicial que foi mantida por até 6 h. Os extratos de todos os DA apresentaram baixa ou não toxicidade às 24 e 48 h. Os DA contendo 2% de MN carregados em MPs fabricadas apenas por Gantrez MS-955 ou combinadas com Eudragit L-100 produzem atividade antifúngica eficaz, boa força adesiva e nenhum efeito de toxicidade, sendo uma terapêutica promissora para usuários de próteses removíveis afetadas por estomatite dentária.

Anwar et al., em 2018 (ANWAR et al., 2018), conjugaram anfotericina B, N (polienosmacrocíclicos) e fluconazol (azol) com nanopartículas de prata. Os fármacos conjugados à prata foram sintetizados com sucesso e caracterizados por espectrofotometria visível no ultravioleta, espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier e microscopia de força atômica. Os fármacos conjugados e não conjugados foram testados contra *Acanthamoeba castellanii* pertencentes ao genótipo T4, utilizando ensaio amebicida e ensaio de citotoxicidade de células hospedeiras. As células foram cultivadas em meio RPMI-1640 contendo soro fetal bovino a 10%, 10% de soro Nu, 2 mM glutamina, 1 mM de piruvato, penicilina, estreptomicina, aminoácidos não essenciais e vitaminas. As células foram tripsinizadas com 2 mL de tripsina e centrifugadas. Foram então plaqueadas. As placas foram observadas ao microscópio óptico para a formação de monocamada uniforme de células HeLa e utilizadas para o ensaio de citotoxicidade. Os ensaios foram realizados em placas de 96 poços. Amebas ( $8 \times 10^4$ ) foram tratadas com vários fármacos conjugados com AgNPs, AgNPs isolados e medicamentos isolados (concentração de 5 e 10  $\mu\text{M}$ ) seguidos por 2 h de incubação a 30 ° C. Após a incubação, essas amostras e controle foram centrifugadas a 5000 x g por 1 min para remover os materiais extracelulares e o sedimento foi suspenso em 200  $\mu\text{L}$  de FRP RP seguido pela adição de HeLa. As placas foram incubadas por 24 h. Valores de controle negativos para ensaios de citotoxicidade foram obtidos através da incubação

de células HeLa apenas com RPMI-1640, e valores de controle positivos foram obtidos por 100% de morte celular usando 1% de Triton X-100. Após a incubação, os sobrenadantes foram coletados de cada poço e a liberação de desidrogenase de lactato foi medida usando o kit de teste de detecção de citotoxicidade. O LDH é uma enzima intracelular e é liberado apenas a partir de células danificadas. Os ensaios de viabilidade revelaram que as nanopartículas de prata conjugadas com anfotericina B (Amp-AgNPs) e N (Nys-AgNPs) exibiram propriedades antiamebicas significativas em comparação com fármacos isolados ou AgNPs isolados ( $P < 0,05$ ), conforme determinado pelo ensaio de exclusão com azul de tripano. Em contraste, a conjugação de fluconazol com AgNPs teve efeito limitado em suas propriedades antiamebicas. Notavelmente, os medicamentos revestidos com AgNP inibiram a citotoxicidade das células hospedeiras mediadas por amebas, conforme determinado pela medição da liberação de lactato desidrogenase. Os autores desenvolveram uma nova formulação de agentes antiamebicos mais eficazes baseados em AgNPs revestidos com medicamentos que possíveis aplicações futuras.

Ribeiro, em 2018 (RIBEIRO, 2018), pensando em aumentar a solubilidade e favorecer a disponibilidade de fármacos usados no tratamento de candidíase, desenvolveu MPs contendo N a 10% e 20%, a partir dos polímeros Eudragit® L-100 e Gantrez MS-955® MS-955 pelo método de secagem por pulverização (spray drying). As formulações de MP resultantes EN10, EN20, GN10, GN20, EGN10 e EGN20 tiveram seu rendimento calculado e analisado. Para quantificar o fármaco presente nas MPs obtidas, foi desenvolvido e validado um método de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) simples, específico, linear, robusto e exato. As propriedades físico-químicas das MP, dos compostos utilizados e de suas respectivas misturas físicas foram analisadas por microscópio eletrônico de varredura (MEV), difração de raios X (DRX), espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), calorimetria exploratória diferencial e termogravimetria (DSC e TG). As imagens obtidas por MEV sugeriram que houve incorporação do fármaco pelo polímero em todas as formulações exceto na GN20 onde se observaram cristais de N dispersos ao redor do polímero. Os espectros obtidos por FTIR das formulações de MP não apresentaram as bandas características de N, assim como os respectivos difratogramas não apresentaram os picos cristalinos de N e as curvas de calorimetria exploratória diferencial não evidenciaram os picos referente a N, sugerindo a incorporação do fármaco pelos polímeros em todas



formulações. Já a análise de TG das formulações apontou que dentre todas as formulações, GN10 e GN20 apresentaram a menor estabilidade térmica. Considerando estas análises foram selecionadas as MP EN10, EN20 e EGN20 para o ensaio de eficiência de encapsulação. Neste ensaio observou-se que a formulação que obteve o maior percentual de incorporação de fármaco foi a EN20 (66,52%), a qual poderia representar uma alternativa para carrear o fármaco em formulações a serem testadas e aumentar sua biodisponibilidade no uso tópico para o tratamento da estomatite protética.

Dalcin et al., 2019 (DALCIN et al., 2019) avaliaram a influência da nanoencapsulação da dihidromicetina flavonóide (DMY) na redução da genotoxicidade e citotoxicidade induzidas por nanocápsulas catiônicas. Foram realizados ensaios para avaliar o potencial de formação de proteínas, citotoxicidade, genotoxicidade e capacidade antioxidante. Nanocápsulas contendo DMY (NC-DMY) e DMY livre (DMY-F) não demonstrou citotoxicidade e genotoxicidade. Contudo, as nanocápsulas Eudragit RS100® (NC-E) aumentaram a citotoxicidade e a formação de danos ao DNA. NC-DMY e NC-E apresentou alta interação com o DNA *in vitro*, sugerindo seqüestro de DNA. Esses resultados indicam que DMY nanoencapsulado não induz citotoxicidade ou genotoxicidade e demonstra alta capacidade antioxidante. Essa capacidade antioxidante está provavelmente associada ao DMY e ocorre devido à sua capacidade de evitar a formação de radicais livres, impedindo a toxicidade causada pela nanoestrutura com o polímero catiônico Eudragit RS100®. Portanto, o NC-DMY pode ser considerado uma formulação importante com importante potencial antioxidante a ser explorado pela nanomedicina.

O hidrogenotartarato de rivastigmina (RHT) é aplicado no tratamento da doença de Alzheimer, é encontrado na forma de comprimidos e cápsulas, na administração oral ele possui baixa biodisponibilidade e a via intranasal apresenta uma entrega do fármaco que contorna a barreira hematoencefálica. O estudo de Salatin et al., 2020 (SALATIN et al., 2020), teve como objetivo desenvolver formulações de gel termorreversíveis embebidas em nanopartículas (NPs) Eudragit RL-100 (EU-RL) para a entrega intranasal de hidrogenotartarato de rivastigmina (RHT), utilizando PF-127 como agente gelificante. As NPs de RHT foram formuladas usando diferentes proporções polímero/medicamento através da técnica de nanoprecipitação. RHT (35 mg) e EU-RL em diferentes proporções de peso foram dissolvidos em água (2 mL) e acetona (5 mL), respectivamente. A solução RHT foi

adicionada gota a gota à solução orgânica EU-RL sob agitação vigorosa a 400 rpm. A solução orgânica obtida foi então injetada na solução externa (10 mL de 3% PF-127). A acetona foi completamente evaporada sob agitação à temperatura ambiente. As NPs preparadas foram submetidas a centrifugação (60 minutos a 18 500 x g), lavada e liofilizada. A solução PF-127 foi preparada de acordo com o "método frio" usual desenvolvido por Schmolka. Para isso, o PF-127 (1.8 g) foi adicionado lentamente a 10 mL de água desionizada gelada (4°C) sob agitação magnética. O pó de RHT (10 mg) foi adicionado à solução transparente contendo 18% de PF-127 (10 mL) e misturado suavemente com o agitador magnético. A solução preparada foi então armazenada em uma geladeira a 4°C. O peso necessário de Grânulos PF-127 foi disperso nas nanossuspensões de RHT (10% p / v) e agitado até se formar uma solução clara. As nanoformulações foram avaliadas em termos de temperatura de gelificação, viscosidade, pH, resistência à mucoadesão, estabilidade e estudos de liberação. A absorção celular e citotoxicidade *in vitro* das NPs contra células de carcinoma pulmonar (A459) foram avaliadas. A permeabilidade das nanoformulações também foi abordada através da mucosa nasal de ovelhas. Todos os dados foram examinados por t teste e relatado significativo quando  $P < 0,05$ . As NPs RHT eram de forma aproximadamente esférica com um tamanho médio de 118 a 154 nm. Os valores do potencial zeta foram positivos (22,5 a 30,8 mV) para todas as NPs. O potencial zeta é conhecido como um importante índice de estabilidade das dispersões coloidais. À medida que o potencial zeta aumenta, a estabilidade e a monodispersidade das partículas aumentam, independentemente do tipo de carga. Este efeito pode ser atribuído à alta repulsão elétrica. As nanoformulações RHT exibiram uma temperatura de transição mais próxima da temperatura corporal e um perfil de liberação sustentada por um período de 24 horas, regido principalmente pela difusão de Fickian. As NPs RHT demonstraram um baixo efeito citotóxico nas células A459, que foram absorvidas por aqueles de maneira dependente da dose e do tempo. O teste de permeação *in vivo* mostrou aumento da permeabilidade da RHT através da mucosa nasal. Os resultados do estudo indicaram o uso potencial das nanoformulações atuais como sistemas de administração de medicamentos nasais.

### 2.3 TESTES DE CITOTOXICIDADE *IN VITRO*

Hensten-Pettersen, em 1988 (HENSTEN-PETTERSEN, 1988), descreveu métodos de cultura celular que são utilizados para avaliar a citotoxicidade de materiais odontológicos, baseando-se principalmente em documentos e especificações disponíveis à época (ADA 1979, BSI 1980, FDI 1980, ISO 1984, AFNOR 1985, DIN 1986), segundo os quais os métodos sugeridos devem ser considerados como de natureza preliminar ou sugestiva. O autor classificou os testes de toxicidade em preliminares (entre os quais se incluem os testes de culturas de células *in vitro*), secundários (estudos de implantação em tecidos subcutâneos e ósseos, testes de irritação da membrana mucosa oral e testes de sensibilização) e de uso, ou terciários (que procuram testar o material na maneira como se pretende usá-lo clinicamente). Em relação aos testes de cultura celular usados para materiais odontológicos, o autor mencionou que parâmetros diferentes foram usados para monitorar os efeitos citotóxicos, tais como inibição do crescimento celular, alteração na permeabilidade de membrana, qtólise, marcadores (de membrana ou citoplasmáticos) e mudanças na atividade metabólica ou citopatogênicas, sendo comum a utilização de dois ou mais desses aspectos para avaliar o mesmo material. Os métodos também empregam diferentes meios de estabelecer contato de material de célula, variando de contato direto a incorporar espaçadores permeáveis de ágar, dentina ou filtros moleculares, usando extratos de material ou material particulado. Um dos métodos mais utilizados, segundo o autor, é o método de sobreposição de ágar, cujo objetivo é detectar a citotoxicidade aguda de componentes através de testes diretamente no material sólido e testes em extratos do material. O material de teste colocado em contato com a superfície de uma camada de ágar sobrepondo uma monocamada de células de fibroblastos de camundongo (L929) que são coradas com corante vital vermelho neutro. Após 24 h de incubação, a presença de substâncias lixiviáveis e tóxicas manifesta-se pela perda de corante das células dentro da zona de difusão das substâncias solúveis que se libertam das amostras. A lise das células ocorre dentro da zona se a concentração das substâncias tóxicas difusas for alta o suficiente. A resposta citotóxica é relatada em termos de um índice de resposta baseado no tamanho da difusão como visto por uma zona descolorada (índice de zona 0-5) e a porcentagem das células dentro das zonas que são lisadas (Índice de Lise 0-5). O teste pode ser invalidado por várias condições artefatuais. Estes podem ocorrer devido a condições inadequadas de incubação (temperatura, pH), liberação de compostos voláteis de materiais sólidos ou falta de proteção das células coradas da

luz. O corante vital vermelho neutro pode ser ativado pela luz ambiente para se tornar citotóxico por si. O ensaio de sobreposição de ágar requer o uso de um material tóxico conhecido e um material não tóxico conhecido em cada placa. O cloreto de polivinila contendo acetato de dibutilamina é sugerido como controle positivo e polietileno de alta densidade como controle negativo. As monocamadas de células levam cerca de 24 h para se tornarem confluentes. O teste requer cerca de 1 hora de preparação, um período de incubação de 24 h e, dependendo do número de placas, cerca de 15-30 min para registrar o índice de resposta. Bastante fácil de executar, e os resultados são reprodutíveis dentro do mesmo laboratório. Um problema geral na comparação dos resultados obtidos com os vários métodos é avaliar a concentração e a identidade das substâncias às quais as células estão expostas. A relação entre a área superficial da amostra e o volume do meio de cultura celular é um parâmetro crítico na maioria dos testes. A caracterização dos componentes dissolvidos ou produtos de degradação melhoraria substancialmente o valor a longo prazo dos resultados. O autor concluiu seu texto afirmando que testes de toxicidade de materiais odontológicos por meio de métodos de cultura celular têm sido considerados bastante simples, reprodutíveis, custo-efetivos relevantes e adequados como uma alternativa para experimentos com animais, fortemente indicados para o rastreio de toxicidade de novos materiais, identificação de substâncias citotóxicas e apropriado para o controle de qualidade biológica de lotes de produção.

Weenberg, em 1988 (WEENBERG, 1988) descreveu a técnica do filtro milipore para o teste de materiais odontológicos. O autor definiu o teste como sendo um sistema de ensaio baseado no contato indireto de material celular, onde as células alvo crescem em um lado de um filtro molecular e a amostra de teste é colocada em contato com o outro lado do filtro. Descreveu a técnica de cultivo de células epiteliais humanas (HeLa) ou fibroblastos de camundongo (L929) sobre a superfície dos filtros da seguinte maneira: células cultivadas com meio de cultura (MEM) suplementado com 5% de soro fetal bovino e contendo  $1 \times 10^4$  UI / l de penicilina e 100 mg / l de estreptomicina. Os discos de filtro Millipore de 47 mm de diâmetro, com tamanho de poro de 0,45  $\mu$ m, foram colocados no fundo de placas de cultura. Um anel de teflon (diâmetro interno de 40 mm) foi colocado no topo de cada filtro para impedir que ele se mova no meio líquido. As células das culturas foram colhidas e suspensas em meio fresco para uma concentração celular que resultou em uma monocamada celular confluenta quando cada filtro que foi coberto com 6 mL da

suspensão celular e as placas foram incubadas por 24 h a 37 ° C. Volumes iguais de ágar e DMEM de Eagle (2 X) foram misturados e imediatamente entregues a pratos de cultura vazios, 5 mL por prato. O meio foi deixado solidificar à temperatura ambiente. O filtro millipore com a monocamada celular aderente foi lavado uma vez com solução salina tamponada com fosfato (PBS), pré-aquecido a 37 ° C e colocado na superfície do meio de ágar, com a célula voltada para baixo. As amostras de teste foram colocadas em cima do filtro e a placa foi incubada por um período adicional de 2 h. Se a inserção da placa de cultura for usada, o meio de cultura foi removido e a camada de células no filtro foi lavada uma vez com PBS, pré-aquecida a 37 C. A agarose tipo I-IV (3%) foi derretida e mantida em 40° C. Volumes iguais de agarose e DMEM de Eagle (2 x) foram misturados e a placa preenchida com o meio de agarose líquido nivelado com a borda do anel de poliestireno. A agarose tipo I-IV possui um ponto de gel de 36°C na concentração de solução de 1,5% e substitui o ágar para evitar lesões térmicas nas células. O meio de agarose foi deixado solidificar à temperatura ambiente. A placa virada de cabeça para baixo e uma amostra de teste colocada em cima do filtro. O dispositivo foi então incubado por um período adicional de 2 h. As amostras de teste devem ter uma área de superfície plana e uniforme para garantir contato adequado com o filtro. Materiais viscosos, ou materiais em pó, foram inseridos em veículos inertes, anéis de vidro ou anéis de borracha de silicone, para manter a área de contato do material celular sob controle. O líquido foi absorvido em um disco de celulose colocado no filtro. No final do período de 2 h escolhido para o contato com o material da célula, as amostras de teste foram removidas e o filtro com células aderentes suavemente afrouxado da camada de ágar e lavado uma vez com PBS. O filtro com a camada celular foi corado Hematoxilina e Miosina. O filtro com a camada celular aderente foi então incubado para demonstração citoquímica da atividade da succinato desidrogenase. Após um período de incubação de 3 h a 37 ° C, os filtros foram enxaguados em água destilada e deixados secar ao ar. Os filtros secos foram examinados macroscopicamente e a intensidade da mancha de cada área de contato da amostra comparada com a mancha de fundo. Para estudos microscópicos das células coradas com enzimas, o filtro seco foi cortado em pedaços apropriados que se tornaram transparentes em xileno e montados em lâminas com a camada de células voltada para a cobertura. Os autores não observaram diferenças nos padrões de atividade enzimática entre as várias enzimas testadas. Verificaram que o material induz a coloração 'não enzimática' neste sistema de teste e que foi

cimento de policarboxilato recém-misturado. A morfologia celular foi bem preservada e a única indicação da influência nociva do cimento de silicato foi o inchaço e a disseminação cromossômica das células na mitose causada pelas características hipotônicas do cimento. Então concluíram que o método do filtro millipore é um teste de citotoxicidade independente do estado físico do material de teste. Materiais sólidos, semi-sólidos e líquidos podem ser testados. As células alvo são cultivadas em uma fina membrana permeável e o contato do material celular é estabelecido através da membrana. Isso aumenta a possibilidade de que todos os componentes lixiviáveis do material de teste cheguem às células alvo, incluindo substâncias que não são solúveis em água.

Zheng e Audus, em 1994 (ZHENG, AUDUS, 1994), utilizaram culturas primárias de células epiteliais bucais de hamster para investigar a potencial citotoxicidade da clorexidina e da N em suspensão ou solução. Os materiais a serem testados foram preparados da seguinte maneira: Todas as soluções e suspensões de digluconato de clorexidina e N foram feitas em meio de cultura sem soro. Uma solução de digluconato de clorexidina a 20% foi primeiro preparada a 0,1% em água destilada e depois diluída em meio para as concentrações desejadas. A N foi dissolvida em dimetilsulfóxido (DMSO) antes de diluir no meio. A concentração final de DMSO foi inferior a 3% nas experiências e não foi diretamente citotóxica na concentração usada. As suspensões de N foram feitas suspendendo diretamente a N no meio de cultura. As soluções e suspensões de N foram preparadas imediatamente antes dos testes de citotoxicidade. Para o teste de MTT, as células epiteliais bucais de hamster foram plaqueadas com densidade de  $1-2 \times 10^5$  células /  $\text{cm}^2$  em placas de 96 poços por 5 dias antes do ensaio de MTT. As monocamadas celulares foram lavadas com PBS de Hank antes e depois de serem expostas a 0,1 mL de soluções ou suspensões de clorexidina ou N por 1 h. As células foram então cultivadas em 0,1 mL de meio de cultura contendo 10  $\mu\text{l}$  de solução-mãe de MTT (5 mg / mL em pH 7,4 PBS) a 37 ° C. Após 4 h, 0,1 mL de isopropanol ácido (HCl 0,04 N em isopropanol) foi adicionado aos poços e incubado durante a noite à temperatura ambiente para dissolver os cristais azuis escuros produzidos pelas células vivas. As mudanças de cor foram determinadas a partir de mudanças na absorvância a 540 nm, utilizando um leitor de microplacas. Os poços sem células tratados exatamente como os poços contendo células serviram como controles em branco. Para o teste de contagem de unidades formadoras de colônias, as células foram plaqueadas em  $1 \times 10^5$  células/poço em

placas de 6 poços e incubadas por 20 h antes do tratamento. Uma alíquota de 1 mL de uma solução de clorexidina ou suspensão de N foi adicionada a cada poço por 1 h. Após a incubação, cada poço foi lavado duas vezes com PBS de Hank. As células foram então incubadas em meio de cultura contendo fator de crescimento epitelial (10 ng/mL) por 7 dias antes da lavagem e fixação em formalina a 10%. As células foram coradas com violeta de cristal aquoso a 1%. A citotoxicidade foi determinada pela contagem das colônias formadas nos poços tratados com medicamentos versus aquelas formadas nos poços livres de drogas. Os tempos de exposição das células à clorexidina ou à N foram de 5 ou 60 min, para o ensaio de MTT e somente foi testado o tempo de 1 h de exposição para o teste de unidades formadoras de colônia. Em ambos os testes tanto a clorexidina quanto a N demonstraram maior citotoxicidade em maiores concentrações das drogas e no caso do MTT, o aumento no tempo de exposição aumentou a citotoxicidade. Os efeitos das soluções de N na viabilidade das células epiteliais bucais de hamster após um contato de 1 h diminuíram quase linearmente com soluções de N variando de 50 a 200 µg / mL (0,005-0,02%). Foi necessário cerca de 110 µg / mL (0,011%) de N para reduzir a viabilidade em 50%. A suspensão de N foi testada no teste de unidades formadoras de colônias e verificou-se qual a dose necessária para inibir em 50% ou o desenvolvimento dessas unidades foi muito superior para a suspensão do que para a solução de N (634 µg / mL versus 0.00076 µg / mL). A conclusão dos autores foi que a citotoxicidade de substâncias como drogas testadas foi tempo e concentração dependente: os tempos de exposição e as concentrações mais baixas eram geralmente não tóxicas para as células. A citotoxicidade da suspensão de N em células epiteliais bucais de hamster foi 8,3 vezes menor que a de solução de N e 39,6 vezes menor que a de clorexidina.

DeVengencie et al., em 1997 (DEVENGENCIE et al., 1997), descreveram como características de um adesivo ideal para próteses: pH neutro ou ligeiramente básico, toxicidade mínima para a mucosa oral e resistência adesiva satisfatória por 12 a 16 h. Com base nisso, selecionaram três marcas de adesivos para próteses disponíveis no mercado (FixodentFresb, Procter and Gamble, Cincinnati, OH; Super Poli Crip, BlockDrug, Jersey City, NJ; e Super Wernet's, BlockDrug, Jersey City, NJ) e um complexo carboidrato de manose (Acemannan, CarringtonLaboratories, Irving, TX) in vitro para determinar diferenças significativas em pH, citotoxicidade e resistência da união adesiva. Para avaliar as amostras de pH de cada material (n = 5) foram pesadas e misturadas com água deionizada (1 g / 2

µmL, solução a 5%) até formar um gel uniforme e realizar diluições até 3,3%, 2,5%, 2%, 1,3% e 1%, sendo a água deionizada um controle. O pH foi medido de forma cega usando um eletrodo de pH de vidro com uma ponte de sal e um medidor de pH pH-50. A avaliação da citotoxicidade foi realizada usando o ensaio colorimétrico MTT in vitro, que mede a atividade da desidrogenase mitocondrial, por ser amplamente aceito, confiável e sensível para medir a viabilidade celular, bem como a avaliação quantitativa da compatibilidade entre células e biomateriais. Os autores explicaram que na reação in vitro, células viáveis reduzem o sal de tetrazólio MTT para formazan. O formazan é azul e insolúvel, portanto, precipita nas mitocôndrias. Quando a reação está completa, ocorre uma mudança de cor de amarelo para azul, e o grau de transformação é diretamente proporcional à reação enzimática do sal de tetrazólio. O produto MTT-formazan cristalino é dissolvido por dimetilsulfóxido antes da espectrofotometria. Um espectrofotômetro é usado para ler a densidade óptica da cor azul em alíquotas a 550 nm. A densidade óptica é proporcional à atividade mitocondrial e ao número de células viáveis e comparam-se culturas controle nas quais nenhuma substância é adicionada ao meio de cultura, com culturas que entraram em contato com possíveis substâncias tóxicas. A toxicidade é expressa como uma porcentagem do produto da reação azul em relação ao controle (intensidade máxima azul). Os autores utilizaram fibroblastos gengivais humanos (n = 6 culturas por grupo) cultivados em placas de Petri em 10 mL de RPMI-1640-L-glutamina suplementada com 100 unidades/mL de penicilina e estreptomicina e soro fetal bovino a 10%. As culturas foram mantidas a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>, com 95% de ar e umidade saturada. Após incubação das culturas de estoque por 2 semanas em placas de Petri, o meio foi removido e cada placa foi lavada 3 vezes com 10 mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS) para remover o excesso de meio. Tripsina (10% em PBS) foi então aplicada para desagregar as células das placas, o que foi verificado com microscopia óptica. As suspensões celulares foram colhidas e centrifugadas e a seguir contadas em câmara de Neubauer. Uma suspensão de células de 2 mL foi adicionada a cada poço de uma microplaca de 12 poços produzindo 25.000 células por poço e incubadas de 24 h. Cada adesivo de próteses foi colocado a uma concentração de 1% em 2 mL de meio fresco nos poços das microplacas (os poços de controle receberam apenas meio fresco). Essa solução foi usada com base em estudos preliminares que indicaram que a viscosidade da solução a 1% não interferem com a subsequente penetração da solução de MTT nas células



ou mitocôndrias. Estas soluções foram incubadas por 3, 6, 12 e 24 h, respectivamente, a 37°C, contendo sextuplicatas para os controles e para cada material em cada momento. Após cada período de incubação, o sobrenadante do meio de cultura foi removido e os poços foram lavados três vezes com 2 mL de PBS e 2 mL de solução de MTT. Os resultados do estudo de Lavegencie demonstraram que o Super PollGrip e o Super Wernet permaneceram acima do pH crítico para a hidroxiapatita (pH 6,5) durante o estudo, enquanto Acemannan e FixodentFresh permaneceram abaixo desse pH. FixodentFresb exibiu citotoxicidade significativa para os fibroblastos gengivais humanos. Acemannan demonstrou uma força adesiva média geral significativamente maior nas condições orais secas e simuladas. O desempenho geralmente favorável *in vitro* do material Acemannan em comparação com o adesivo dentário disponível comercialmente. As formulações indicam que carboidratos complexos podem ser adesivos eficazes para próteses.

Segundo a norma ISO 10993-5, de 2009 (INTERNATIONAL STANDARDS ORGANIZATION, 2009), devido à aplicabilidade geral dos testes de citotoxicidade *in vitro* e seu amplo uso na avaliação de uma grande variedade de dispositivos e materiais, o teste mais apropriado deve ser selecionado. Três categorias de teste foram listadas: teste de extrato, teste de contato direto, teste de contato indireto. A escolha de uma ou mais dessas categorias depende da natureza da amostra a ser avaliada, do local, potencial de uso e da natureza do uso. Esta escolha determina os detalhes da preparação das amostras a serem testadas, a preparação das células em cultura e a maneira como as células são expostas às amostras ou seus extratos. Para a avaliação da toxicidade existe: avaliações de danos celulares por meios morfológicos, medições de dano celular, medições do crescimento celular, medições de aspectos específicos do metabolismo celular. Para a realização dos testes existe o controle positivo. O objetivo do controle positivo é demonstrar uma resposta apropriada do sistema de teste. Veículo de extração em branco que não contém a amostra para ensaio, retido num recipiente idêntico ao que alberga a amostra a testar e sujeito a condições idênticas àqueles a que a amostra é submetida durante a extração. O propósito do branco é avaliar os possíveis efeitos de confusão devido ao processo de extração, veículo e extração. O controle negativo que não produz uma resposta citotóxica. As condições de extração das amostras a serem testadas devem tentar simular ou exagerar as condições de uso clínico, a fim de determinar o potencial risco toxicológico sem causar mudanças significativas na

amostra de teste, como fusão, ou qualquer alteração na estrutura química, a menos que é esperado durante a aplicação clínica. O material usado para o veículo de extração pode ser: meio de cultura com soro; solução salina fisiológica; outro veículo adequado. A escolha do veículo deve refletir o objetivo da extração. O meio de cultura com soro é o veículo de extração preferido. O uso de meio de cultura com soro é preferido para a extração devido à sua capacidade de suportar o crescimento celular, bem como extrair substâncias polares e não polares. Além do meio de cultura com soro, a utilização de meio sem soro deve ser considerada para extrair especificamente substâncias polares (por exemplo, compostos iônicos). Outros veículos adequados incluem água purificada e dimetilsulfóxido (DMSO). O DMSO é citotóxico em sistemas de ensaio selecionados em mais de 0,5% (fração volumétrica). A concentração de exposição celular dos extraíveis em DMSO será menor devido à maior diluição em comparação com a extração em meio de cultura com soro. O teste de contato direto das amostras permite avaliação qualitativa e quantitativa da citotoxicidade. A avaliação quantitativa da citotoxicidade é preferível. Avaliação quantitativa: Medir morte celular, inibição do crescimento celular, proliferação celular ou formação de colônias. O número de células, quantidade de proteína, liberação de enzimas, liberação de corante vital, redução de corante vital ou qualquer outro parâmetro mensurável pode ser quantificado por meios objetivos. A medida e resposta objetivas devem ser registradas no relatório de ensaio. A redução da viabilidade celular em mais de 30% é considerada um efeito citotóxico. Outros critérios, incluindo diferentes pontos de corte ou uma relação aceitável de resultado de teste para controle, devem ser justificados para linhas de células alternativas ou construções de tecido de múltiplas camadas. Para a análise dos resultados pode ser utilizado teste de citotoxicidade MTT. Para o experimento células semeadas em placas de 96 poços e mantidas em cultura durante 24 h (1 período de duplicação) para formar uma monocamada semi-confluyente. Eles são então expostos ao composto de teste ao longo de uma gama de concentrações. Após 24 h de exposição, a formação de formazan é determinada para cada concentração de tratamento e comparada com aquela determinada em culturas de controle. Para cada tratamento, a percentagem de inibição do crescimento é calculada.

Os objetivos do estudo de Zager, 2000 (ZAGER, 2000), foram os seguintes: (1) testar se a incorporação de N em uma formulação lipossômica reduz com sucesso sua citotoxicidade tubular proximal; (2) avaliar a toxicidade tubular

relativa das formulações de N lipossômica versus anfotericina B lipossômica; (3) porque se acredita amplamente que a insuficiência renal aguda clínica possui uma base multifatorial (isto é, resultante de insultos renais combinados nefrotóxicos e isquêmicos) verificar o grau em que as várias preparações de polieno afetam a resistência das células tubulares renais ao ataque isquêmico tóxico ou simulado sobreposto; (4) dado que os lipossomas podem liberar seus polienos na circulação sistêmica e / ou dentro dos alvos celulares (por exemplo, no fígado e nos rins), determinar a toxicidade relativa da N não lipossômica contra a anfotericina B; e (5) porque os polienos se ligam ao colesterol dentro da membrana plasmática, verificar se essa ligação leva a alterações secundárias no colesterol da membrana celular e no conteúdo de fosfolípidios. Para os testes foi utilizado segmento de túbulos proximais (PTS) de camundongo isolados e preparados e células de túbulo proximal humano (HK-2). O PTS e HK-2 foram expostas a N tradicional (N-3503; Sigma Chemicals, St Louis, MO), N lipossômica (Nyotran; Aronex Pharmaceuticals), anfotericina B lipossômica no uso clínico atual (Abelcet; Liposome Co, Princeton, NJ; e AmBisome; Fujisawa USA, Deerfield, IL) com 0, 4, 16 e 64 µg/mL. Todos os valores foram expressos como média, as comparações estatísticas foram realizadas pelo teste t de Student, o significado estatístico foi julgado como  $P < 0,05$ . Apesar da capacidade de reduzir as proporções ATP e ATP-ADP, nem a nistatina nem o Nyotran causaram lesão celular letal, avaliada pela falta de aumento da liberação de LDH. Nyotran e as duas formulações lipossômicas de anfotericina B (Abelcet, AmBisome) causaram reduções modestas nas proporções ATP-ADP em comparação com os controles coincidentes ( $P < 0,001$  a  $0,03$ ), nenhum dos agentes causou citotoxicidade evidente, avaliado pela liberação de LDH. Nenhuma das preparações lipossômicas causou lesão celular letal (N lipossômica e anfotericina lipossômica). Em relação a citotoxicidade as depressões foram de aproximadamente 25% e 50% pior com a anfotericina B em comparação com o tratamento com N. Tanto a N quanto a anfotericina B aumentaram os níveis de ceramida. Apesar da visão clínica predominante de que N é substancialmente mais citotóxica que a anfotericina B, no estudo, aparentemente a N é menos citotóxica que a anfotericina B. A toxicidade tubular mediada por polieno pode ser substancialmente atenuado pela incorporação lipossômica. Apesar da formulação lipossômica poder diminuir acentuadamente a citotoxicidade direta do polieno, isso não se equipara necessariamente à segurança em relação ao desenvolvimento de lesão tubular aguda.

Santos et al., 2010 (SANTOS et al., 2010), relatou a citotoxicidade *in vitro* de MPs de silício mesoporoso (PSi) nas células Caco-2 como função das frações granulométricas (1,2–75  $\mu\text{m}$ ), concentração das partículas (0,2–4  $\text{mg ml}^{-1}$ ) e incubação nos tempos (3, 11 e 24 h). O tamanho das partículas (partículas menores de PSi apresentaram maior citotoxicidade) e a superfície de tratamento químico das MPs de PSi foi considerado o fator chave na toxicidade. Esses efeitos foram significativos após os tempos de exposição de 11 e 24 horas e foram explicados por interações de partículas envolvendo rupturas mitocondriais resultantes da depleção de ATP e oxigênio reativo produção de espécies induzida pela superfície do PSi. Esses eventos induziram ainda um aumento na apoptose celular e consequente dano celular e morte celular de maneira dependente da dose e em função do tamanho da partícula. Esses efeitos foram, no entanto, menos pronunciados com partículas de PSi oxidadas termicamente. Debaixo nas condições experimentais testadas e com granulometria > 25  $\mu\text{m}$ , a concentração limiar não tóxica para partículas de PSi termicamente hidrocarbonizadas e carbonizadas foi <2  $\text{mg ml}^{-1}$ , e para partículas termicamente oxidadas. As MPs de PSi eram <4  $\text{mg ml}^{-1}$ .

A segurança biológica dos adesivos para próteses removíveis na aplicação clínica deve ser explorada. O estudo de de Gomes e colaboradores (DE GOMES et al., 2011) teve como objetivo contribuir para a compreensão do perfil de citotoxicidade de adesivos para próteses, por meio de testes com células cultivadas *in vitro*. Dez adesivos comercialmente disponíveis, sendo nove formulações solúveis (seis cremes e três pós) e um produto insolúvel (almofada adesiva), foram analisados em relação ao perfil de citotoxicidade em ensaios diretos e indiretos usando fibroblastos de camundongo (células L929). No ensaio direto, as células foram semeadas sobre a superfície dos materiais que foram previamente hidratados com meio de cultura e mantidos a 37 °C a 5% de CO<sub>2</sub> no fundo de placas de cultura de 96 orifícios até se obter um espesso gel adesivo (5%, creme; 2,5%, pó e almofada adesiva). Foram encubadas por 12 h. Os controles foram culturas celulares realizadas em placas de cultura de poliestireno padrão. No ensaio indireto, as células foram cultivadas na presença de extratos dos adesivos preparados em condições estática e sob agitação mecânica (0,5 a 2%, creme; 0,25 a 1%, pó e pastilha). A mistura foi incubada a 37 °C em uma atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>/ar por 12 h. O meio de extração foi esterilizado por filtro e testado não diluído e diluído. Os fibroblastos L929 foram semeados em placas de cultura de 96 poços (100  $\mu\text{L}$ ;  $3 \times 10^4$  células  $\text{mL}^{-1}$  –  $1 \times 10^4$

células cm<sup>2</sup>) e cultivadas por 24 h para permitir a ligação celular. Depois disso, o meio foi removido e os extratos foram adicionados à camada celular aderente. Culturas expostas aos extratos preparados em condições estáticas foram cultivadas por 12 h. Culturas expostas aos extratos obtidos sob agitação contínua foram cultivadas por 6, 12, 24 e 72 h. As culturas celulares realizadas em placas de cultura de poliestireno padrão e foram usadas como controle. A toxicidade celular foi avaliada, em ambos os ensaios (direto e indireto), quanto à viabilidade celular/proliferação (ensaio MTT - 0.5 mg mL<sup>-1</sup>, 64/5000, durante as últimas 3 h do período de cultura testado, lido a 600 nm) e morfologia celular (observação da organização do citoesqueleto de actina F por microscopia confocal de varredura a laser. Para isto, as culturas expostas aos extratos adesivos preparados sob agitação foram fixadas com formaldeído a 4% isento de metanol, permeabilizadas com Triton® a 0,1%, por 5 min à temperatura ambiente e incubadas em 10 mg mL<sup>-1</sup> de albumina sérica bovina com 100 µg mL<sup>-1</sup> de RNase. Após isso, os filamentos de actina-F foram corados usando 488 faloidina conjugada com Alexa-Fluor, 1: 100, 1 h, RT e núcleos foram contrastados com 10 µg mL<sup>-1</sup> de iodeto de propídio, 10 min. A fluorescência foi visualizada pelo microscópio confocal. Três experimentos independentes foram realizados. No ensaio MTT, seis réplicas foram instaladas em cada condição. O efeito dos adesivos para próteses dentárias na viabilidade/proliferação celular é expresso como uma porcentagem de culturas de controle. As diferenças estatísticas entre o controle e as culturas expostas aos adesivos foram analisadas pelo teste t de Student ( $\alpha = 0,05$ ). O contato direto dos fibroblastos L929 com os géis adesivos não causou, ou causou apenas uma pequena diminuição na viabilidade celular/proliferação. Os extratos adesivos (especialmente aqueles preparados em condições dinâmicas) causaram inibição do crescimento de fibroblastos significativamente maior e, além disso, causaram efeitos dependentes de dose e tempo, durante o período de exposição de 6, 12, 24 e 72 h. Além disso, efeitos dependentes da dose na morfologia celular, com evidente ruptura da organização do citoesqueleto de F-actina, foram observados na presença dos mais aderentes. Os dez adesivos testados neste estudo - seis cremes, três pós e uma pastilha insolúvel - mostraram diferentes graus de citotoxicidade sobre células L929 de fibroblastos, mas perfis citotóxicos similares dependentes da dose e do tempo, avaliados por ensaios diretos e indiretos. Assim, a comparação do comportamento celular observado sobre o gel adesivo e na presença dos extratos, preparados em condições estáticas e dinâmicas, mostrou que o espesso gel polimerizado apresenta baixo potencial

citotóxico, mas o fluido de extração contendo produtos lixiviados, e resultante de a quebra do adesivo revelou maiores efeitos citotóxicos no modelo in vitro testado.

Wang et al., em 2013 (WANG et al., 2013), avaliaram a citotoxicidade in vitro do poli (propileno fumarato) (PPF). O PPF é um polímero biodegradável alifático que foi bem caracterizado para uso em esqueleto de suporte de tecido ósseo. Quatro diferentes tipos celulares, células-tronco mesenquimais humanas (hMSC), fibroblastos (L929), pré-osteoblastos (MC3T3) e células-tronco mesenquimais caninas (cMSC), foram utilizados para avaliar a citotoxicidade do PPF. Estes tipos de células representam os tecidos com os quais o PPF interagiria in vivo como um suporte de tecido ósseo. As células foram cultivadas em meio de cultura (DMEM) + 10% de soro fetal bovino +penicilina e estreptomicina. O cultivo e proliferação celular foram realizados seguindo a norma ISSO 10993-5. As células foram plaqueadas e os testes se iniciaram quando atingiram confluência de 80%. Foram realizados testes de contato direto, indireto e de extrato. Para o teste de contato direto, após as células serem plaqueadas e formar uma monocamada celular no fundo da placa, o material a ser testado é colocado no meio de modo que exista uma interação física com as células. A citotoxicidade foi avaliada usando ensaio XTT e imagem de fluorescência. Os resultados mostraram que o PPF suportou atividades metabólicas celulares semelhantes de hMSC, L929, MC3T3 e cMSC em comparação ao controle não citotóxico, polietileno de alta densidade (HDPE) e foram estatisticamente diferentes daqueles cultivados com o controle citotóxico, um filme de poliuretano contendo 0,1% de zinco dietilditiocarbamato (ZCF). Os resultados mostraram diferentes respostas celulares ao ZCF, o controle citotóxico. As células L929 apresentaram os menores níveis de atividade metabólica celular após a exposição ao ZCF em comparação com os níveis de atividade metabólica celular das células MC3T3, hMSC ou cMSC. A verificação qualitativa dos resultados usando imagens de fluorescência não demonstrou alteração na morfologia celular, vacuolização ou descolamento quando cultivadas com PPF em comparação com HDPE ou culturas de meios em branco. Globalmente, a resposta de citotoxicidade das células ao PPF demonstrou ser semelhante à resposta citotóxica das células a materiais não citotóxicos conhecidos (HDPE).

Boros-Majewska et al., 2015 (BOROS-MAJEWSKA et al., 2015), descreveu um novo ensaio in vitro que simultaneamente determina a eficiência antifúngica e a toxicidade das células hospedeiras usando suspensões de células

leucêmicas humanas (HL-60) infectadas com *C. albicans*. O efeito da infecção por *Candida* na viabilidade das células hospedeiras foi avaliada pela microscopia de células coradas com azul de tripano e atividade da lactato desidrogenase (LDH). O ensaio de potência da droga in vitro utilizou o Cell Counting Kit-8 e viabilidade do tratamento pós-antifúngico medido de células HL-60 infectadas por *Candida* e a capacidade do tratamento antifúngico para prevenir a infecção. Atividade de LDH mostraram que 42% e 85,3% das células HL-60 foram mortas após a infecção por *Candida* na multiplicidade de infecção (MOI) de 1: 1 e 1: 5, respectivamente. A N antifúngica inibiu a infecção por *C. albicans*, como visto pela viabilidade significativamente aumentada das células HL-60. A citotoxicidade da N em relação às células HL-60 infectadas foi evidente em algumas concentrações e isso também foi confirmado pela coloração com iodeto de propídio. O ensaio foi desenvolvido com sucesso para avaliar a seletividade da terapia antifúngica em ambiente host-*Candida* representando um método promissor para testar interações de compostos antifúngicos com células fúngicas e hospedeiras.

O objetivo do estudo de Lee e colaboradores (LEE et al., 2015) foi comparar a citotoxicidade de quatro adesivos para próteses removíveis em creme (Polident, Protefix, Staydent e Denfix-A) em células de fibroblastos gengivais humanos -1 (HGF-1, ATCC CRL-2014). A cultura destas células foi realizada em meio DMEM complementado com 5% de soro fetal bovino, 100 U/mL de penicilina, 100 mg/mL de estreptomicina e HEPES 10 mM. As culturas foram mantidas a 37 °C numa atmosfera humidificada de 5% de CO<sub>2</sub>. O efeito dos adesivos sobre a viabilidade de células HGF-1 foi analisado por ensaio MTT, avaliação de apoptose por citometria de fluxo e pela morfologia celular em microscopia eletrônica de varredura (MEV). Para o primeiro teste, HGF-1 foram semeadas a densidade de  $1 \times 10^5$  células/poço em placas de 24 poços. Após incubação durante 24 h, o meio foi removido e 2 mL de meio novo foram adicionados a cada poço. A seguir, os adesivos foram colocados dentro de membranas transfiltro que foram colocadas dentro de cada poço de modo que as concentrações diluídas destes no meio de cultura fossem de 10% (peso/volume). As placas foram incubadas por 48 h. Em seguida, 5 µL de reagente MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] diluído em uma relação de 1:20 com meio de cultura foi adicionado a todos os poços e incubada por 3 h. Em seguida, 2 mL de dimetilsulfóxido foram adicionados em todas os poços e as placas foram protegidas da luz por 20 min à temperatura ambiente. Um espectrofotômetro foi usado para ler

a densidade óptica do precipitado. Para o ensaio de apoptose por citometria de fluxo, as células foram cultivadas em placas de cultura de 6 poços a uma densidade de  $4 \times 10^5$  células/poço. Após uma incubação de 24 h, o meio foi removido e 2 mL de meio de cultura novo foram adicionados a cada poço. A seguir, os adesivos foram colocados dentro de membranas transfiltro que foram colocadas dentro de cada poço de modo que as concentrações diluídas destes no meio de cultura fossem de 10% (peso/volume). As placas foram incubadas por mais 48 h. As células foram coletadas por tripsinização (0,05% de tripsina-EDTA), e lavadas uma vez com soro fisiológico tamponado com fosfato (pH 7,4). Posteriormente, as células foram tratadas com Anexina V-FITC e PI KIT. As amostras foram analisadas num citômetro de fluxo com separador de células ativadas por fluorescência. Então foi realizada análise da morfologia celular por microscopia eletrônica de varredura. Para isso as células foram semeadas em uma densidade de  $4 \times 10^5$  células/poço em placas de 6 poços. Após uma incubação de 24 h, o meio foi removido e meio de cultura novo foi adicionado a cada poço. A seguir, os adesivos foram colocados dentro de membranas transfiltro que foram colocadas dentro de cada poço de modo que as concentrações diluídas destes no meio de cultura fossem de 10% (peso/volume). As placas foram incubadas por mais 48 h. No final do período experimental, os poços foram removidos e preparados para o MEV. As células foram pré-fixadas durante a noite por 2,5% de GTA + 2% de PFA em PBS (pH 7,2) a 4° C e foram lavadas com o PBS durante 10 min três vezes. As células foram fixadas com tetróxido de ósmio a 1% por 90 min e lavadas com água destilada terciária por 10 min três vezes. As células foram desidratadas de um modo passo a passo por uma série de incubação em concentrações crescentes de etanol: 70% (15 min), 80% (15 min), 90% (15 min), 95% (15 min), 100% (15 min), 100% (15 min) e 100% (20 min). Os espécimes foram secos ao ar durante a noite e revestidos por aspensão com ouro paládio por 20 mA durante 30 s duas vezes e observados sob um S-4700 FESEM a uma voltagem de aceleração de 15,0 kV e uma distância de trabalho de 12 mm. Uma imagem representativa dos espécimes de cada grupo em 200 x de ampliação foi usada para a análise. Para análise estatística foram criadas triplicatas para cada condição. Diferenças estatísticas entre controle e as culturas expostas foram analisadas por ANOVA (SPSS 16.0 para Windows). A análise de Duncan foi usada para análise post-hoc ( $\alpha = 0,05$ ). O ensaio MTT mostrou que todos os adesivos para próteses dentárias resultaram em uma viabilidade celular significativamente menor em comparação com as células controle



( $p < 0,05$ ), com Staydent demonstrando a menor viabilidade celular. De acordo com o ensaio de citometria de fluxo, Staydent e Protefix mostraram taxas de apoptose significativamente maiores do que o grupo controle ( $p < 0,05$ ), enquanto que o Polident e o Denfix-A não apresentaram diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) com o controle. A microscopia eletrônica de varredura mostrou que as células do grupo Staydent sofreram retração da membrana citoplasmática, com áreas livres de células contendo fragmentos residuais da membrana das células mortas. Os autores concluíram que os quatro adesivos para próteses avaliados nesse estudo conferiram efeitos citotóxicos em células de fibroblastos gengivais humanos, especialmente Staydent. Afirmaram também que os cirurgiões dentistas devem aconselhar os pacientes a não os usar em demasia em termos de quantidade e duração de tempo e que adesivos para próteses contendo formaldeído ou ingredientes liberadores de formaldeído devem ser evitados sempre que possível.

#### 2.4 TESTES DE CITOTOXICIDADE *IN VITRO* USANDO ENSAIOS DE REDUÇÃO DE ENZIMA RESAZURINA E SAL DE TETRAZÓLIO

O'Brien et al., 2000 (O'BRIEN et al., 2000) mostraram a identidade de Alamar Blue® como resazurina (azul e não fluorescente). Um FluoroskanAscent (LabsystemsInternational) foi usado para medir a fluorescência do Alamar Blue® em placas de 96 poços com comprimentos de onda de excitação de 530 nm e emissão de 590 nm. Um TitertekMultiskan MC (FlowLaboratories) foi usado para medir a absorbância para o ensaio MTT a 550 e 690 nm. As células utilizadas foram hepatócitos primários de rato obtidos do fígado de ratos machos derivados de Alderley Park Wistar. As células foram examinadas em microscópio confocal. Testes com vários tóxicos mostraram acumulação do produto fluorescente de Alamar Blue® no meio, o que poderia levar a uma superestimação de população celular. Além disso, a extensa redução do Alamar Blue® pelas células metabolicamente ativas levou a um produto não fluorescente e, portanto, uma subestimação da atividade celular. Qualquer que seja o responsável pela redução do azul de Alamar ou da resazurina, esse teste continuou sendo uma medição de viabilidade celular muito simples, rápida, sensível e precisa, desde que tomadas certas precauções. Os autores relataram a necessidade de se verificar a reatividade cruzada do Alamar Blue® com qualquer composto a ser testado, sem células no meio. Afirmam que a taxa de redução pelas

células em cultura também deve ser verificada para que as condições para a concentração de Alamar Blue® e o tempo de incubação sejam otimizados, a fim de evitar a redução excessiva de Alamar Blue® na hidrorresorufina incolor e não fluorescente. O Alamar Blue® foi mais valioso como medida de ponto final para citotoxicidade do que como medida cinética para monitorar o crescimento celular.

Hamid et al., 2004 (HAMID et al., 2004), compararam o desempenho dos ensaios de viabilidade celular Alamar Blue® e brometo de 3- [4,5-dimetiltiazol-2-il] -2,5-difenil-tetrazólio (MTT) em um formato de alto rendimento. Um total de 117 fármacos escolhidos para a sua vasta gama de áreas terapêuticas foi rastreado a 10 microM utilizando ambos os ensaios na linha celular de hepatoma humano HepG2. Exceto a terfenadina e o astemizol, que tiveram um desempenho consistente em ambos os ensaios, o ensaio de azul de alamar foi ligeiramente mais sensível que o ensaio de MTT para a maioria dos compostos. O ensaio MTT foi menos sensível na detecção de um efeito para daunorrubicina e trifluoperazina. Sete drogas, astemizol, daunorrubicina, elipticina, flufenazina, terfenadina, tioridazina e trifluoperazina, tiveram resultados de viabilidade percentual de 55% ou menos no ensaio de azul de alamar. Estes foram refeitos em ambos os ensaios para reconfirmação da citotoxicidade e determinação dos valores de EC50. Exceto pela daunorrubicina, os valores de EC50 foram comparáveis nos dois ensaios. Com base nesses resultados e na avaliação do fator da qualidade dos ensaios, ambos os ensaios forneceram informações úteis para identificar drogas citotóxicas in vitro nos estágios iniciais da seleção dos candidatos às drogas. No entanto, é necessária uma interpretação cuidadosa dos dados devido à possibilidade de resultados falsos positivos ou negativos causados por indutores e/ou inibidores de enzimas metabólicas responsáveis pela transformação dos pontos finais da toxicidade celular.

O estudo de Campanha et al., 2006 (CAMPANHA et al., 2006), teve como objetivo avaliar a citotoxicidade de 6 resinas de reembasamento duras, em tratamentos de banho-maria e de pós-polimerização por micro-ondas. Os materiais testados foram Tokuso Rebase Fast (TR), Ufi Gel Hard (UGH), Duraliner II (D), Kooliner (K), New Truliner (NT) e Light Liner (LL). Nove espécimes de cada resina foram preparados em condições assépticas. Um molde de aço inoxidável com compartimento separável (10 mm de diâmetro por 1 mm de espessura) foi feito para fabricar amostras das várias resinas. Cada material foi manipulado de acordo com as instruções do fabricante e inserido no molde, que foi colocado em uma folha de acetato

e uma placa de vidro. Outra folha de acetato e placa de vidro foram colocadas sobre o material, e uma leve pressão foi aplicada para remover o excesso de material do molde. A fotopolimerização das amostras LL foi realizada com uma Unidade Bosworth Light Cure pouco tempo (3 min) após o início do processo de polimerização. A resina LL foi adicionalmente testada com um revestimento de barreira de ar (LLABC). Após a polimerização, os espécimes foram separados dos moldes e as bordas foram cuidadosamente alisadas. As amostras foram divididas em 3 grupos de teste. Grupo 1, as amostras não foram submetidas a nenhum tratamento pós-polimerização. Grupo 2, as amostras foram pós-polimerizadas em forno de micro-ondas (Sensor Crisp 38, Sistema de Emissão Dupla, Brastemp) em estado seco. Grupo 3, as amostras foram pós-polimerizadas em banho-maria a 55°C por 10 minutos, seguindo a recomendação do fabricante do material D para reduzir o sabor do monômero. Os eluatos dos materiais foram preparados colocando 3 discos em um frasco de vidro estéril com 9 ml do meio essencial mínimo de Eagle (Instituto Adolfo Lutz), suplementado com gentamicina a 80 mg / ml e soro bovino fetal (Instituto Adolfo Lutz), estes foram então incubados a 37°C por 24h. O meio sem discos também foi incubado como acima para servir como controle negativo. Teste de citotoxicidade de Mossmann (MTT) e o teste de proliferação de H-timidina foi realizado em fibroblastos de camundongos L-929. As células foram plaqueadas em placas de 96 poços e após 24 horas de fixação (a 37 ° C em uma atmosfera de 55 CO<sub>2</sub> / 95% de ar), as células foram realimentadas com meio fresco contendo eluatos apropriados ou meio de controle a uma concentração final de 1:1 (v:v). A análise estatística dos dados foi realizada por meio da análise de variância bidirecional (ANOVA) e teste de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ) para determinar diferenças na citotoxicidade com base no material e no tratamento pós-polimerização. A extensão da inibição da síntese de DNA foi calculada com base na comparação da radioatividade incorporada nas culturas experimentais e nas culturas de controle. A análise com ANOVA bidirecional indicou que os tipos de materiais e tratamentos pós-polimerização tinham interações estatisticamente significativas ( $P < .05$ ) na síntese de DNA. Houve uma resposta inibitória significativa das células produzidas pelos eluatos UGH e D do grupo 1. Além disso, houve inibição significativa da síntese de DNA nas células expostas aos eluatos do grupo 3 das resinas TR, D, NT e LLABC e ao grupo 2 eluato das resinas K, D, NT, LL e LLABC. Os resultados da análise estatística mostraram que a citotoxicidade avaliada pelo ensaio MTT era dependente do tipo de resina acrílica. Os eluatos dos discos das resinas NT, LL e LLABC produziram uma

diminuição significativa na viabilidade celular em comparação com o grupo controle. Em conclusão, (1) os tratamentos pós-polimerização por micro-ondas e banho-maria não tiveram efeito significativo na citotoxicidade dos materiais de resina, conforme avaliado pelo ensaio MTT. (2) conforme avaliado pelo ensaio H-timidina, pós-polímero os tratamentos de ionização diminuíram significativamente a citotoxicidade do material UGH, enquanto a citotoxicidade do material D permaneceu inalterada. (3) uma inibição significativa na proliferação celular (3H-timidina) foi observado para os materiais TR, NT e LLABC após o tratamento pós-polimerização em banho-maria e para os materiais K, NT, LL e LLABC após o tratamento pós-polimerização por micro-ondas.

Como em qualquer ensaio de viabilidade, a otimização e a avaliação da compatibilidade devem ser realizadas para cada modelo de célula. O objetivo da revisão de literatura de Rampersad, 2012 (RAMPERSAD, 2012) foi destacar as considerações mais importantes envolvidas no uso, no design e nas possíveis armadilhas. A revisão forneceu uma introdução e discussão de ensaios celulares, incluindo seus formatos, químicas, vantagens e limitações. Os ensaios de viabilidade celular, com métodos morfológicos requer profissionais altamente capacitados e equipamentos caros, e seus resultados geralmente não são quantificáveis. Os ensaios de proliferação celular usando análogos de nucleotídeos, na quantificação do conteúdo de DNA das células com base em ensaios radioisotópicos são terminais, trabalhosos e apresentam problemas de manuseio, armazenamento e descarte. Eles também consomem tempo e estão sujeitos a erros do operador, especialmente para aplicativos de médio a alto rendimento. A redução do sal de tetrazólio é uma medida indireta de viabilidade celular, comumente utilizada e de baixo custo. Os sais de tetrazólio mais frequentemente utilizados são MTT, XTT e WST-1, apesar de seu amplo uso e aplicabilidade, os usuários destes ensaios podem encontrar uma série de problemas de incompatibilidade dependendo dos objetivos do estudo. Assim, a seleção do mais apropriado sal de tetrazólio como indicador da atividade metabólica é importante. O Alamar Blue contorna muitos dos problemas de incompatibilidade e oferece muitas vantagens sobre esses sais. O ensaio de viabilidade robusta no estudo in vitro os dados podem ser usados para prever com segurança implicações biológicas, os dados representam um sinal estimado de toda a população de células e podem nem sempre refletir uma resposta in vivo. O ensaio de Alamar Blue monitora o ambiente redutor da célula, seu ingrediente ativo é a resazurina que é solúvel em água, estável em meio de cultura, é não-tóxico e permeável através das membranas

celulares, portanto, é permitido o monitoramento contínuo de células em cultura. Como o corante indicador aceita elétrons, ele muda do estado azul oxidado, não fluorescente, para o estado reduzido, fluorescente, rosa. Uma contaminação microbiana pode reduzir o corante e levar a sinais falsos positivos, portanto, o ensaio Alamar Blue deve ser realizado sob condições assépticas e o meio pode exigir antibióticos para eliminar a contaminação microbiana. O Alamar Blue demonstrou ser um indicador redox mais reprodutível e mais barato que o XTT e é útil na identificação de mutantes comprometidos pela resistência e na identificação de compostos com atividade antibiofilme. O ensaio foi usado para identificar antimicrobianos com eficácia aprimorada contra certos biofilmes bacterianos e fúngicos clinicamente importantes. Embora o ensaio Alamar Blue seja simples, rápido e sensível, pode não ser tão útil em avaliar a proliferação celular, portanto, pode ser mais valioso para testes de citotoxicidade. É necessária uma previsão precisa dos efeitos adversos dos compostos de teste em sistemas vivos, detecção de limiares tóxicos e expansão de conjuntos de dados experimentais para incluir análises de múltiplos pontos finais de toxicidade para qualquer regime de triagem robusto. O ensaio Alamar Blue fornece medições precisas no curso de tempo, possui alta sensibilidade e linearidade, não envolve lise celular, é ideal para uso com ensaios funcionais pós-medicação, é flexível, pois pode ser usado com diferentes modelos de células, é escalável e pode ser usado com plataformas de instrumentação baseadas em fluorescência e / ou absorvância e, finalmente, é não-tóxico, não-radioativo e é seguro para o usuário e o meio ambiente.

No estudo de Leng et al., 2018 (LENG et al., 2018), a toxicidade de nanocápsulas de lactoferrina bovina (NCs) carregadas com quitosana-fosfato de cálcio e alginato foi relatada usando o ensaio de letalidade de camarão salmoura, *Allium cepa*, ensaio cometa e citotoxicidade celular, especialmente em caso de genotoxicidade. A lactoferrina bovina livre de endotoxina (bLf) foi preparada a partir de leite bovino australiano. Após tratamento com ácido suave (pH 2,6), bLf foi dialisado por um período de 48h em 0,1 M ácido cítrico para remover íons metálicos ligados e depois saturados com ferro [Fe(III)] não hidratado para formar complexos bLf- Fe<sup>3+</sup> coordenados para produzir Fe-bLf de cor profunda. O Fe-bLf produzido foi carregado nas NCs de fosfato de quitosana-cálcio e revestido com alginato. As nanocápsulas de Alginato/EUDRAGIT® S 100-fosfato de quitosana e cálcio carregadas com Fe-bLf (NCs) foram produzidas por uma combinação de métodos de nanoprecipitação e gelificação iônica. A citotoxicidade das NCs foi monitorada pelo teste de letalidade de

artemia salina, com temperatura controlada a 28°C, sob regime de luz contínua. Concentração letal (LC50) para Artemia salina foi determinado pela análise Probit usando um programa de computador Finney (Biostats 2009). A citotoxicidade in vitro das NCs contra células Vero foi avaliada por MTT utilizando um método modificado. As células Vero foram cultivadas em balão de cultura de 25 cm<sup>2</sup> por dois dias em uma incubadora de CO<sub>2</sub> a 37°C em DMEM. O ensaio cometa foi conduzido sob condições alcalinas OxiSelect™ o kit de ensaio cometa (lâminas de 3 poços) da Cell Biolabs, Inc. (Cell Biolabs, Inc., San Diego, EUA) foi utilizado para avaliar o dano ao DNA nas células Vero. As células Vero foram plaqueadas em placas de 6 poços em cultura de tecidos e incubadas por 24 h para fixação das células. Posteriormente, NCs em 100µg/mL foram adicionadas quando as células atingiram 50-60% de confluência e incubadas por 24 h. Para a avaliação da genotoxicidade in vivo, os bulbos de Allium cepa foram cultivados por dois a três dias à temperatura ambiente. Após as raízes terem de dois a quatro centímetros de comprimento, os bulbos foram expostos a várias concentrações de NCs (125, 250, 500 e 1000 µg/mL) por 24h. As lâminas preparadas foram examinadas sob o microscópio (BX41-CCD, Olympus, Japão) com ampliação de 200x e 400x, para observar imagens claras de aberrações cromossômicas a partir das pontas das raízes. Fotomicrografias foram capturadas e um mínimo de 100 células foram examinadas (foram observadas nove lâminas para cada tratamento). Os dados obtidos a partir do cálculo do índice mitótico foram analisados por Análise de Variância (ANOVA) a um nível significativo de  $p < 0,05$ . O teste de alcance múltiplo Duncan foi conduzido para determinar a diferença significativa entre os vários tratamentos ( $p < 0,05$ ). As características físico-químicas das NCs poliméricas revelaram que as NCs vazias (sem proteínas) tinham uma carga de potencial zeta negativa de  $- 2,6 \pm 0,6$  mV e um índice de dispersão de  $0,231 \pm 0,05$ . O encapsulamento proteico revelou que as NCs de Fe-bLf tinham  $87 \pm 4\%$  de eficiência, carregando aproximadamente  $0,62 \pm 0,14$  mg/100 mg de NCs. O ensaio de letalidade de artemia salina foi conduzido para determinar a citotoxicidade das NCs, não houve efeito de letalidade em qualquer uma das concentrações das NCs testadas às 24h e não foram tóxicas contra a artemia salina às 24h de exposição porque o LC50 (6,364 mg / mL) é maior que 1 mg / mL. Os resultados obtidos no ensaio MTT indicam que as NCs inibiram a viabilidade das linhas celulares Vero de uma maneira dose-dependente. Além disso, o resultado mostrou que as NCs não possuem efeito tóxico sobre as células Vero não cancerosas. Nenhuma cauda ou cauda mais curta do

cometa foi vista nas células Vero não tratadas e tratadas pelas NCs, o que indica que as NCs não possuem um efeito genotóxico no DNA das células Vero. Os resultados mostraram que não há diferença significativa ( $p > 0,05$ ) no índice mitótico entre a água deionizada e as NCs das células da ponta da raiz de *Allium cepa* tratadas. Portanto, estes achados revelaram que o tratamento com NCs não exerce nenhum efeito genotóxico no DNA das células da ponta da raiz de *Allium cepa*. Em conclusão, os resultados dos testes *in vitro* e *in vivo* demonstraram que as NCs foram desprovidas de efeito tóxico significativo sob as condições experimentais.

Masetti et al., em 2018 (MASETTI et al., 2018) avaliou o potencial citotóxico de base de prótese de resinas acrílicas após imersão em soluções desinfetantes. Amostras em forma de disco ( $14 \times 1,2$  mm) foram obtidas e divididas em grupos ( $n = 9$ ), de acordo com as soluções desinfetantes (água destilada [controle], digluconato de clorexidina a 2%, perborato de sódio a 3,8%, hipoclorito de sódio a 0,5% e vinagre de maçã ao período de armazenamento (0, 1, 3 e 6 meses). As soluções eram trocadas diariamente. Após os diferentes períodos de armazenamento, as amostras foram imersas em meio de cultura por 24 h e os extratos foram obtidos. Queratinócitos humanos foram cultivados e o metabolismo celular foi avaliado usando Alamar Blue®. Os dados foram submetidos à análise de variância de três vias e testes *post hoc* de Games-Howell ( $\alpha = 0,05$ ). Ambas as resinas acrílicas testadas apresentaram propriedades de biocompatibilidade semelhantes após imersão em diferentes soluções ( $P = 0,400$ ). A imersão em água destilada, perborato de sódio a 3,8% e hipoclorito de sódio a 0,5% não afetou o metabolismo celular dos queratinócitos ( $P > 0,05$ ), independentemente do período de imersão e do tipo de resina acrílica ( $P > 0,05$ ). A imersão em digluconato de clorexidina a 2% ou vinagre de maçã resultou em alta citotoxicidade ao longo do tempo, até o terceiro mês ( $P < 0,05$ ), após o qual nenhuma alteração foi observada ( $P > 0,05$ ). O tipo de resina acrílica (base ou reembasador) não teve efeito significativo na viabilidade das células. As soluções de digluconato de vinagre e clorexidina aumentaram o efeito citotóxico ao longo do tempo e foram fortemente citotóxicas após 6 meses de imersão. O perborato de sódio e o hipoclorito de sódio foram não citotóxicos em todos os períodos testados.

Procópio et al, em 2018 (PROCÓPIO et al, 2018), avaliaram os efeitos antimicrobianos e citotóxicos de uma resina acrílica para prótese após ciclos sucessivos de imersão diária durante a noite em hipoclorito de sódio a 1% (NaClO a 1%) e digluconato de clorexidina a 2% (CHX a 2%), simulando os períodos de 9 meses

ou 1,5 ano. Foram realizados ensaios microbiológicos e citotóxicos, respectivamente, pelo método de microdiluição em caldo (*Candida albicans* ou *Staphylococcus aureus*) e MTT. Os resíduos químicos de CHX a 2% impregnados na resina acrílica da prótese tiveram efeito antimicrobiano em ambos os períodos de imersão, o que não foi observado com os de NaClO a 1%. Entretanto, resíduos de CHX a 2% foram severamente citotóxicos para os fibroblastos gengivais humanos em comparação com os de NaClO a 1% e resina acrílica (não submetidos aos limpadores de próteses), que eram levemente citotóxicos. Mesmo em baixas concentrações recomendadas para a imersão de próteses removíveis durante a noite, os resíduos químicos de CHX podem resultar em algum grau de toxicidade para a mucosa portadora de prótese após imersão diária prolongada.

Nanopartículas de prata (AgNPs) estão entre as nanopartículas mais amplamente produzidas devido às suas propriedades físico-químicas e antimicrobianas de amplo espectro. Atualmente, as AgNPs são usadas em produtos de consumo, dispositivos médicos, biotecnologia, farmacologia, engenharia, eletrônica e remediação ambiental. Sendo assim, o objetivo do estudo de Mello et al., 2020 (MELLO et al., 2020), foi testar especificamente a interferência da AgNP usando uma variedade de tamanhos e revestimentos de AgNPs: AgNPs não revestidos de 2 nm e 15 nm (2AgNP e 15AgNP, respectivamente), goma arábica (GA) revestida de 6 nm AgNP e polivinilpirrolidona (PVP) revestida de 9 nm AgNP (GA-6AgNP e PVP-9AgNP respectivamente) e quatro corantes classicamente utilizados em ensaios in vitro: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio brometo (MTT), Vermelho Neutro (NR), Hoechst, e Resazurin. Também foi incluso prata iônica dissolvida (das ações da AgNO<sub>3</sub>) em todas as análises. As AgNPs revestidas com goma arábica (GA) e polivinilpirrolidona (PVP) (GA-6AgNP e PVP-9AgNP, respectivamente) foram produzidas pelo laboratório do professor Mark Wiesner, como parte do Centro de Implicações Ambientais da Nanotecnologia (CEINT). A AgNP não revestida de 2 nm e 15 nm (2AgNP e 15AgNP, respectivamente) foi adquirida da US Research Nanomaterials, Inc. (Houston, EUA) como dispersões aquosas. As células AML12 de hepatócitos de camundongo foram mantidas em meio de crescimento completo (CGM) e cultivadas em uma incubadora de cultura de tecidos (Symphony, VWR) a 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub>. Para os experimentos, as células foram colhidas usando tripsina (0,25%) - ácido etilenodiaminotetracético e semeadas em placas de 96 poços (5x10<sup>4</sup> células/poço) em 200 µl de CGM e permitido estabelecer-se e crescer por



aproximadamente 18 h a 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub>. Para o ensaio MTT, o sal de tetrazólio amarelo 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio (MTT, Sigma) foi incubado diretamente em placas de 96 poços com várias concentrações de AgNPs, a incubação foi realizada no escuro, a 37°C por 1 h. A absorbância foi avaliada a 560 nm usando um leitor de placas (FLUOstar OPTIMA, BMG Labtech). Para o ensaio Vermelho Neutro, as células AML12 aclimatadas em placas de 96 poços foram lavadas duas vezes com DPBS e depois incubadas com 0,005% de Vermelho Neutro (NR) em DPBS no escuro a 37°C por 1h. AgNPs foram adicionados à NR em várias concentrações para cada poço. Absorbância e fluorescência foram avaliados usando um leitor de placas Spectramax M5 (Dispositivos Moleculares). O ensaio Hoechst, as células AML12 aclimatadas em placas de 96 poços foram lavadas duas vezes com DPBS e depois incubadas com 100 µl de 1 µg/ml Hoechst 33342 (Sigma) em DPBS no escuro, a 37°C durante 30 min. Após a incubação, foram adicionados AgNPs para avaliar a interferência de nanopartículas com o corante Hoechst, mas não a citotoxicidade. O espectro de fluorescência (excitação: 352 nm; emissão: 400-550 nm) foi avaliado usando leitor de placas Spectramax M5 (Dispositivos Moleculares). Para o ensaio Resazurin, a resazurina (Sigma) foi incubada diretamente em placas de 96 poços com várias concentrações de AgNPs. A concentração final da Resazurina foi a mesma utilizada para medições de viabilidade celular (25 µg/ml) no DPBS. As incubações foram realizadas no escuro, a 37 °C durante 1 h. O espectro de fluorescência (excitação: 560 nm; emissão: 570-750 nm) foi avaliado utilizando o leitor de placas Spectramax M5 (Dispositivos Moleculares). Foi observado uma redução do MTT dependente da concentração em todos os AgNPs testados, exceto nos 2AgNPs. Apesar do comportamento estranho desses 2AgNPs, essa reação provavelmente foi catalisada pela prata, pois o AgNO<sub>3</sub> também foi capaz de reduzir o MTT de maneira dose-dependente. A fluorescência Hoechst foi claramente afetada, de forma dose-dependente, pela não revestido 15AgNP e o revestido em GA 6AgNP. As outras AgNPs, bem como o AgNO<sub>3</sub>, apresentaram interferência mínima ou insignificante. Resultados semelhantes foram observados com NR, em que 15AgNPs e GA6AgNPs apresentaram os maiores níveis de têmpera de fluorescência, entretanto, também foi observada alguma interferência com 2AgNPs nas concentrações mais elevadas testadas. Embora a Resazurina sofra reação redox in vivo semelhante ao MTT, reagindo principalmente com o NADH, não houve redução da Resazurina por qualquer um das AgNPs testadas. Foi observado algum resfriamento por fluorescência com

15AgNP e GA6AgNP, embora tenha sido muito menos significativo do que para os outros corantes. Neste estudo, foi demonstrado que as AgNPs têm o potencial de causar aumento na absorvância, têmpera por fluorescência e redução de MTT. O nível de interferência depende das características físico-químicas (tamanho e funcionalização) de cada tipo de AgNPs. Também descobrimos que o ensaio Resazurin causou interferência insignificante nas AgNPs testadas neste estudo, quando comparado a outros ensaios.

O protocolo AlamarBlue® Assay, (Patent No. 5,501,959), explica que o reagente de Ensaio de Viabilidade Celular AlamarBlue® é usado para quantificar metabólica celular atividade e, por sua vez, determinam a concentração de células viáveis em uma determinada amostra. O reagente fornecido pode ser usado para medir a cinética de crescimento celular, isto é, o crescimento de uma célula população ao longo do tempo, medindo-a em dois ou mais momentos da (s) amostra (s). O reagente de viabilidade celular Alamar Blue® mede quantitativamente a proliferação de linhas celulares de mamíferos, bactérias e fungos. O corante incorpora uma redução de oxidação (REDOX), que fluorescem e mudam de cor em resposta à substância química redução devido ao crescimento celular. O Alamar Blue® é muito estável e não tóxico para as células, é possível o monitoramento contínuo das culturas ao longo do tempo. O corante Alamar Blue®, na sua forma oxidada, é azul e não fluorescente. No ensaio de reagente Alamar Blue®, as células em crescimento causam uma redução química do alamar. A cor muda do azul não fluorescente ao vermelho fluorescente. O crescimento contínuo de células viáveis mantém um ambiente redutor (fluorescente, vermelho) e inibição do crescimento mantém um ambiente oxidado (não fluorescente, azul), que pode ser detectado usando um detector de fluorescência ou absorvância. O protocolo para testar a viabilidade celular com este composto pode ser realizado em placas de 96 poços. Após as células serem plaqueadas e levadas a incubadora por um período de 24 h, os materiais a serem testados são adicionados juntamente com o composto. O cultivo é feito a 37° C em uma incubadora pelo período de exposição do teste desejado. Após o término do tempo de incubação, remove-se a placa e a fluorescência com comprimento de onda de excitação em 530-560 nm e comprimento de onda de emissão em 590 nm é medida.

## 2.5 TOXICIDADE DO DIMETILSULFÓXIDO (DMSO)

Para Violante et al., em 2002 (VIOLANTE et al., 2002), compostos pouco solúveis em água são frequentemente encontrados durante o processo de descoberta de drogas. Na maioria dos casos, co-solventes são usados para aumentar a solubilidade dos compostos para realizar ensaios farmacocinéticos/de permeação para a seleção de novas entidades químicas com altas taxas de absorção intestinal. Em geral, o uso de 1% de DMSO aumenta a solubilidade de forma suficiente para realizar estudos de transporte. Mas em séries muito altamente lipofílicas, a porcentagem de DMSO deve aumentar para 5% ou mais. O DMSO é geralmente usado como um crioprotetor, e é também descrito como um intensificador de absorção de sulfadiazina e insulina pela pele. Pesquisaram então a toxicidade do DMSO em células Caco-2/TC7 e determinaram a concentração máxima utilizável em experimentos de permeação. As células foram cultivadas por 21 dias em placas de 96 poços para avaliação da toxicidade. A determinação da lactato desidrogenase foi realizada pela sua liberação no sobrenadante celular e a medição da captação de Vermelho Neutro (NR) foram usadas para os ensaios de citotoxicidade. As soluções DMSO (0 a 100%) na solução salina balanceada de Hank contendo HEPES (25mM), pH 7,4, foram incubadas com células Caco-2/TC7 em placas de 96 poços. As células foram cultivadas em pastilhas Transwell-Clear® para avaliar a influência do DMSO na permeabilidade aparente do marcador paracelular manitol. A concentração de radiomarcadores dos compostos foram determinados por contagem líquida de cintilação b com correção de atenuação de acordo com o modo de etiqueta única. Os resultados da análise estatística foram expressos em média SD. Para análise de variância de grupos múltiplos, ANOVA foi utilizado. A localização da variância foi determinada usando o teste t de Student em comparação com o controle. DMSO 10% não induziu aumento significativo na liberação de LDH, enquanto um aumento significativo na atividade de LDH ocorreu a uma concentração de DMSO de 20 a 50%. A incorporação de NR em células viáveis foi estatisticamente reduzida em 27 a 36% na concentração de DMSO de 20% a 100%. Nenhuma diferença estatística foi observada na permeabilidade aparente ao manitol entre os grupos controle e 10% de DMSO. Em concentrações de até 10%, o DMSO não produziu alteração significativa na permeabilidade da membrana apical ou em complexos juncionais de célula a célula. Alguns efeitos metabólicos do DMSO não puderam ser detectados usando estes métodos, embora pudessem estar presentes.

Para Sumida et al., 2011 (SUMIDA et al., 2011), o dimetilsulfóxido (DMSO) é um solvente orgânico muito comum usado para dissolver substâncias lipofílicas, por exemplo, para ensaios baseados em células *in vitro*. Ao mesmo tempo, sabe-se que o DMSO é citotóxico em altas concentrações. Portanto, é importante definir concentrações limiares de DMSO para células. Foram realizadas análises em hepatócitos de ratos tratados com mais de 100 substâncias químicas na tentativa de identificar genes candidatos a biomarcadores. Os efeitos do DMSO na expressão do gene e citotoxicidade foi avaliada em hepatócitos humanos criopreservados e em hepatócitos primários cultivados em ratos. As células foram tratadas com DMSO por 24 h em cinco concentrações diferentes, Teste de citotoxicidade com atividade da lactato desidrogenase (LDH) demonstrou que o DMSO não foi citotóxico até uma concentração de 2% (v / v) em ambos os casos e houve poucos efeitos nos perfis de expressão gênica de até 0,5%. As diferenças observadas em relação aos controles foram consideradas de pouca importância toxicológica, mas ainda precisam ser levados em consideração na interpretação das descobertas quando o DMSO é usado em alta concentração.

Hebling et al., em 2015 (HEBLING et al., 2015), avaliaram a citotoxicidade do dimetilsulfóxido (DMSO) na atividade relacionada ao reparo de células MDPC-23 cultivadas semelhantes a odontoblastos em placas de 24 poços. Soluções com diferentes concentrações de DMSO (0,05; 0,1; 0,3; 0,5; e 1,0 mM), diluídas em meio de cultura (DMEM), foram colocadas em contato com células MDPC-23 ( $5 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup>) por 24 h. Foram preparadas oito repetições (n = 8) para cada solução para os seguintes métodos de análise: corante de cristal violeta para adesão celular (CA), quantificação de proteína total (TP), alizarina vermelha para formação de nódulos de mineralização (MN) e morte celular por necrose (fluxo citometria); enquanto doze réplicas (n = 12) foram preparadas para número de células viáveis (Trypan Blue) e viabilidade celular (ensaio MTT). Os dados foram analisados pelos testes ANOVA e Tukey ou Kruskal – Wallis e Mann – Whitney ( $p < 0,05$ ). A viabilidade celular, adesão e porcentagem de morte celular por necrose não foram afetadas pelo DMSO em nenhuma concentração, sem diferença estatística significativa entre os grupos. Foi observada uma redução significativa na produção total de proteínas para 0,5 e 1,0 mM de DMSO, em comparação ao controle, enquanto a formação de nódulos mineralizados aumentada foi observada apenas para 1,0 mM de DMSO. O contato

direto de células semelhantes a odontoblastos com baixas concentrações de DMSO não provocou nenhum efeito citopático substancial.

### 3. PROPOSIÇÃO GERAL

Avaliar a citotoxicidade, em cultura de células epiteliais (queratinócitos), de micropartículas (MPs) poliméricas obtidas a partir dos polímeros Eudragit L-100® (E) e/ou Gantrez MS-955® (G) e da combinação de ambos (EG), acrescidos do antifúngico nistatina (N) a 10% ou a 20%, nas suas concentrações inibitórias mínimas (CIM<sub>50</sub> e CIM<sub>80</sub>) sobre *Candida albicans*.

#### 3.1 PROPOSIÇÕES ESPECÍFICAS

Avaliar a citotoxicidade de seis formulações de MPs poliméricas contendo E e/ou G para liberação controlada de N a 10% ou 20% por meio da determinação da inibição da atividade metabólica mitocondrial (Alamar Blue®) e inibição da atividade da desidrogenase succínica (MTT®) de células epiteliais cultivadas *in vitro*, nas suas respectivas CIM<sub>50</sub> e CIM<sub>80</sub> determinadas em cepa padrão de *C. albicans*.

## 4. MATERIAIS E MÉTODO

### 4.1. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

No presente estudo foi avaliada a citotoxicidade *in vitro*, em queratinócitos humanos, de micropartículas (MPs) poliméricas para liberação controlada de nistatina (N). Os testes utilizados para verificação da citotoxicidade foram Alamar Blue® (redução de resazurina) e MTT® (redução de tetrazólio), ambos como parâmetro de viabilidade (ZHENG; AUDUS, 1994; DEVENGENCIE et al., 1997; INTERNATIONAL STANDARDS ORGANIZATION, 2009; LEE et al., 2015).

Foram testadas seis formulações de MPs poliméricas para a liberação controlada de N (em duas concentrações cada), as quais foram previamente desenvolvidas e caracterizadas físico-quimicamente (RIBEIRO, 2018) e tiveram, anteriormente a esse trabalho, as CIM<sub>50</sub> e CIM<sub>80</sub> calculadas (EGG, 2019). Duas MPs brancas (sem o fármaco) foram produzidas apenas com os polímeros Eudragit L-100® (E) ou Gantrez MS-955® MS-955 (G), as quais foram testadas somente em uma concentração cada. Para os testes, todas as MPs foram dissolvidas em DMSO, de modo que a concentração final desse solvente no meio de cultura das células ficasse em 1%. Para se verificar a citotoxicidade intrínseca do DMSO, foi incluída a avaliação desse solvente apenas na concentração de 1%, sem MPs, sobre as células, como sendo uma das condições experimentais. Como controle negativo, foram cultivadas células sem nenhuma substância teste, apenas com meio de cultura, para ser considerado como crescimento máximo, dentro das condições do experimento. Ao todo foram conformados 16 grupos experimentais.

As leituras de fluorescência (no caso do Alamar Blue®) foram realizadas em três diferentes tempos de incubação em contato com as 16 condições experimentais (grupos): 6 h, 12 h e 24 h, sendo os valores obtidos de maneira dependente ao longo do tempo. As leituras de absorbância (no caso do MTT®) foram realizadas apenas no tempo de 24 h de incubação em contato com as 16 condições experimentais.

Ambos os testes (Alamar Blue® e MTT) foram realizados em triplicata (três poços de placas com 96 orifícios para cada grupo experimental), e em três ocasiões (repetições em dias diferentes) (ZHENG; AUDUS, 1994; DEVENGENCIE et al., 1997; INTERNATIONAL STANDARDS ORGANIZATION, 2009; LEE et al., 2015).

## 4.2. GRUPOS EXPERIMENTAIS

Todos os materiais e a descrição dos grupos experimentais que compuseram o presente estudo podem ser visualizadas no Quadro 1.

Quadro 1. Descrição dos grupos experimentais, composição e concentrações dos materiais testados no presente estudo.

Grupo experimental	Composição da solução levada ao spray drier (RIBEIRO, 2018)	Concentração teórica de fármaco (em peso) na MP	Concentração testada – CIM <sub>50</sub> ou CIM <sub>80</sub> , em µg/mL (EGG, 2019)	Peso inicial do material, em mg, para se obter a solução mãe	Descrição do grupo
GN10 <sub>50</sub>	Gantrez MS-955®, nistatina, etanol 95%, água destilada	10%	0,420	0,210	MP em CIM <sub>50</sub>
GN10 <sub>80</sub>			2,250	1,800	MP em CIM <sub>80</sub>
GN20 <sub>50</sub>	Gantrez MS-955®, nistatina, etanol 95%, água destilada	20%	0,450	0,225	MP em CIM <sub>50</sub>
GN20 <sub>80</sub>			2,200	1,76	MP em CIM <sub>80</sub>
EN10 <sub>50</sub>	Eudragit L-100®; nistatina, etanol 95%, água destilada	10%	0,588	0,294	MP em CIM <sub>50</sub>
EN10 <sub>80</sub>			2,000	1,600	MP em CIM <sub>80</sub>
EN20 <sub>50</sub>	Eudragit® L-100; nistatina, etanol 95%, água destilada	20%	0,855	0,427	MP em CIM <sub>50</sub>
EN20 <sub>80</sub>			2,500	2,000	MP em CIM <sub>80</sub>
EGN10 <sub>50</sub>	Eudragit L-100®; Gantrez MS-955®, nistatina, etanol 95%, água destilada	10%	4,500	2,250	MP em CIM <sub>50</sub>
EGN10 <sub>80</sub>			18,500	14,800	MP em CIM <sub>80</sub>
EGN20 <sub>50</sub>	EudragitL-100®; GantrezMS-955®, nistatina, etanol 95%, água destilada	20%	0,920	0,460	MP em CIM <sub>50</sub>
EGN20 <sub>80</sub>			3,250	2,600	MP em CIM <sub>80</sub>
G0	GantrezMS-955®, etanol 95%, água destilada	—	Não determinada*	14,800	MP branca
E0	Eudragit® L-100; etanol 95%, água destilada	—	Não determinada*	14,800	MP branca
DMSO	DMSO a 1%; solvente utilizado na obtenção das soluções-mãe dos materiais; a concentração de 1% é a mesma contida nos poços das outras condições experimentais.				
C	Controle negativo, células cultivadas sem nenhuma substância teste, apenas com o mesmo meio de cultura, considerado padrão de crescimento máximo, dentro das condições do experimento.				

Fonte: a autora



### 4.3. PREPARO DOS MATERIAIS A SEREM TESTADOS

#### 4.3.1. Obtenção das MPs poliméricas

MPs poliméricas foram obtidas a partir dos polímeros E (lote CC2305825, Ashland, ISP Chemicals, Wilmington, DE, EUA) ou G (lote B121003016, Evonik Industries, Essen, Alemanha) e da combinação de ambos, acrescidos de N a 10% ou a 20% por meio do processo de secagem por pulverização (*spray dryer*), segundo os métodos descritos por Ribeiro, em 2018 (RIBEIRO, 2018). Dessa forma foram obtidas seis formulações de MPs contendo N incorporada. Também foram confeccionadas MPs de Eudragit L100® ou Gantrez MS955®, ambos os polímeros com os quais foram confeccionadas as MPs, sem adição de N, também pelo método de *spray dryer*, que passarão a ser chamadas de MPs brancas (Quadro 1).

#### 4.3.2. Soluções mãe para a dissolução das MPs.

Para que as MPs fossem utilizadas no presente experimento, estas foram primeiramente solubilizadas em DMSO. Para isso, cada MP foi pesada em balança de precisão (ME204E, Mettler Toledo, SP, Brasil) para se obter os pesos descritos no Quadro 1. A seguir, cada material foi diluído em 1 mL de DMSO puro sob agitação até que se verificasse total dissolução. As soluções mãe foram preparadas no mesmo dia da realização dos testes e mantidas à temperatura de 4°C até o uso (ISO 10993-5; ZHENG, AUDUS, 1994).

### 4.4 DESCONGELAMENTO E MANUTENÇÃO DAS CÉLULAS

Para os testes de citotoxicidade foram utilizadas células epiteliais – queratinócitos humanos – NOK (MASETTI et al., 2018). As células foram adquiridas e estocadas a – 80°C em meio de cultura contendo DMSO como crioprotetor, no Laboratório de Citologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara (HENSTEN-PETTERSEN, 1988; WEENBERG, 1988; ZHENG, AUDUS, 1994).

Dentro de fluxo laminar (VecoBioseg 09, SP, Brasil), adicionaram-se 5 mL de meio de cultura de Eagle modificado por Dulbecco (Dulbecco's Modified Eagle's Medium - DMEM, lote 0000718565, Lonza, Walkersville, MD, USA) adicionado

de 10% de soro fetal bovino (SFB – 5534 FEP, LGC Biotecnologia, SP, Brasil) e estreptomicina e penicilina (1ml), em tubo Falcon de 15 mL. O criotubo com a suspensão celular congelada foi aquecido em banho maria até que começasse a se liquefazer. Um mililitro de DMEM com SFB foi inserido dentro do criotubo, que foi homogeneizado até que toda a suspensão celular estivesse descongelada. O conteúdo do criotubo foi transferido para o Falcon que continha o os 5 mL de meio de cultura e foi levado à centrifuga por 6 min a 1200 rpm. Este processo permite a separação das células do meio de cultura de congelamento que continha DMSO. Enquanto isso em frasco para cultivo celular (75 cm<sup>2</sup>, tampa com filtro, TPP, Suíça) foram adicionados 9 mL de meio DMEM com 10% de SFB. Após a centrifugação das células, o tubo Falcon foi levado ao fluxo laminar e o sobrenadante foi aspirado, deixando apenas o pellet de células. Um microlitro de DMEM com SFB a 10% foi adicionado ao pellet e homogeneizado. O volume total dessa suspensão foi transferido para o frasco que havia sido preparado. As células foram replicadas em novos frascos e incubadas até atingirem semiconfluência. Para isso, solução de tripsina e tampão fosfato-salino (PBS lote 000.B16TB, LGC Biotecnologia, SP, Brasil) foram utilizados para a extração e lavagem das células respectivamente (WEENBERG, 1988; DE GOMES et al., 2011; WANG et al., 2013).

Periodicamente, as células foram checadas com relação a aspectos morfológicos e tempo de duplicação. As culturas foram mantidas a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>, 95% de atmosfera e umidade saturada (INTERNATIONAL STANDARDS ORGANIZATION, 2009). O pH do meio foi checado e mantido entre 7,2 e 7,4. (WEENBERG, 1988; INTERNATIONAL STANDARDS ORGANIZATION, 2009; DE GOMES et al., 2011; WANG et al., 2013).

#### 4.5. PLAQUEAMENTO DAS CÉLULAS PARA EXPERIMENTO

Os frascos de cultura celular que continham as células prontas para serem plaqueadas foram retirados da estufa e, dentro do fluxo laminar, o meio foi descartado. As células que ficaram aderidas aos frascos foram lavadas com solução PBS (WEENBERG, 1988; INTERNATIONAL STANDARDS ORGANIZATION, 2009; DE GOMES et al., 2011; WANG et al., 2013). A seguir, foram desagregadas do frasco com 5 mL de solução de tripsina, por 5 min em estufa. Cinco ml de meio de cultura foram adicionados para neutralizar a tripsina. Este conteúdo foi então transferido para

um tubo Falcon e levado para centrífuga por 6 min a 1200 rpm. Descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o pellet celular em 1 mL de DMEM com 10% SFB (WEENBERG, 1988; INTERNATIONAL STANDARDS ORGANIZATION, 2009; DE GOMES et al., 2011; WANG et al., 2013).

Uma alíquota de 10 µl da suspensão celular foi misturada com 10 µl de solução de azul de tripan e foi levada a câmara de Neubauer, a qual foi levada a um contador automático (Countess IIFL, lifetechnologies, USA) para determinação da concentração da suspensão celular. Multiplicou-se o número de poços que seriam plaqueados com células (inserindo margem de erro) pela quantidade de células necessárias em cada poço para saber o número total de células necessárias para o experimento. Foi calculado então o volume total da suspensão celular necessário para o plaqueamento dividindo o número de células necessário pelo número total de células em 1 mL, pela seguinte fórmula:

Volume de suspensão celular necessário = número de células necessária/número total de células em 1mL.

O valor foi de  $2 \times 10^4$  células para cada poço da placa contendo 96 poços.

O número de poços plaqueados com células foram contados e multiplicados por 200 µl, pois foram utilizadas placas de 96 poços (96 U, TPP, Suíça), e assim obteve-se o volume necessário de DMEM com 10% SFB para o experimento (WEENBERG, 1988; INTERNATIONAL STANDARDS ORGANIZATION, 2009; DE GOMES et al., 2011; WANG et al., 2013).

Volume total de meio = número de poços com células do experimento x 200

Removeu-se então do volume total de meio, a quantidade do volume de suspensão celular necessária. Foi misturado o volume de meio com o volume de suspensão celular necessário, homogeneizado e aplicado 200 µl em cada poço do experimento. As placas foram incubadas 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> por 24 h (WEENBERG, 1988; INTERNATIONAL STANDARDS ORGANIZATION, 2009; DE GOMES et al., 2011; WANG et al., 2013).

#### 4.6. APLICAÇÃO DOS TRATAMENTOS NAS CÉLULAS SEMEADAS

Após o período de incubação, retiraram-se as placas da incubadora. No fluxo laminar, o meio de cultura foi aspirado e os poços foram lavados com PBS,

sempre cuidando para não destruir a monocamada celular formada, inserindo e removendo os líquidos pelas bordas, nunca encostando as ponteiras no fundo do poço.

Na sequência, o meio de cultura descartado foi substituído por 200 µl de meio novo adicionado de alíquotas de 2 µl das soluções mãe dos materiais testados (Quadro 1) resultando na concentração de 1% de cada solução mãe para o meio de cultura (V/V), conformando os seguintes grupos experimentais: GN10<sub>50</sub>, GN10<sub>80</sub>, GN20<sub>50</sub>, GN20<sub>80</sub>, EN10<sub>50</sub>, EN10<sub>80</sub>, EN20<sub>50</sub>, EN20<sub>80</sub>, EGN10<sub>50</sub>, EGN10<sub>80</sub>, EGN20<sub>50</sub>, EGN20<sub>80</sub>, G0 e E0 (Quadro 1). Os valores de CIMs utilizados (Quadro 1) foram determinados com base nos testes microbiológicos realizados por Egg, em 2019, (dados não publicados) em que foram calculadas as CIMs capazes de inibir o crescimento de *C. albicans* em 50% (CIM<sub>50</sub>) e 80% (CIM<sub>80</sub>). A concentração final de DMSO (310.816BB, LGC Biotecnologia, SP, Brasil) para cada CIM<sub>50</sub> e CIM<sub>80</sub> também foi igual a 1% no presente trabalho. Para o grupo controle negativo (C) foram apenas colocados 200 µl de meio de cultura. Também foram adicionados poços contendo células cultivadas cujo meio de cultura foi substituído por meio contendo 1% de DMSO para se controlar a citotoxicidade intrínseca desse solvente.

#### 4.7. AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR PELO TESTE ALAMAR BLUE

Para este teste, já no momento de aplicação das soluções mãe, 20 µl do reagente Alamar Blue (Alamar Blue®, Sigma Aldrich) foram adicionados aos poços contendo as células. As placas foram então levadas à estufa. Leituras de fluorescência foram realizadas nos períodos de 6 h, 12 h e 24 h. A fluorescência das amostras foi medida (Fluoroskan Ascent FL; Lab Sistemas) com filtros de emissão de 544 nm e 590 nm de transmissão (O'BRIEN et al., 2000; HAMID et al., 2004; DE GOMES et al., 2011; MASETTI et al., 2018).

A variável de interesse foi o valor da fluorescência dos poços que continham células (subtraídos do valor de fluorescência de poços idênticos, porém sem a presença de células – branco da reação) obtido pelo teste Alamar Blue® para avaliar o metabolismo das células após todas as condições experimentais. Os valores foram convertidos em porcentagem de redução de viabilidade quando comparados com o grupo controle (células cultivadas sem a presença dos materiais testes).

#### 4.8. AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR PELO TESTE MTT®

Para o ensaio de redução de MTT® (MTT, MKBW0025, SIGMA, Darmstadt, Alemanha), no fluxo laminar após a incubação por 24 h dos queratinócitos submetidos aos tratamentos descritos no item 4.5, retirou-se o sobrenadante dos poços com ponteiros estéreis acopladas a uma bomba à vácuo. Os poços foram lavados com 200 µl de PBS, e este também foi aspirado (ZHENG, AUDUS, 1994, DEVENGENCIE et al., 1997; INTERNATIONAL STANDARDS ORGANIZATION, 2009; WANG et al., 2013).

Em cada poço foram adicionados 200 µl de solução de MTT a 0,5 mg/ml. As placas foram, então, seladas e voltaram à estufa por 4 h (HAMID et al., 2004; INTERNATIONAL STANDARDS ORGANIZATION, 2009).

A partir desta etapa os procedimentos puderam ser realizados fora do fluxo laminar. A solução de MTT® foi descartada, e nos poços foram aplicados 200 µl de etanol para solubilização dos cristais de formazan. As placas foram deixadas agindo por 5 min no agitador de placas (INTERNATIONAL STANDARDS ORGANIZATION, 2009).

O conteúdo de cada poço foi transferido para outra placa sem células, pois o acúmulo destas podem interferir na leitura. Foi então feita a leitura da densidade óptica (D. O.) em espectrofotômetro em 570nm (ZHENG, AUDUS, 1994, DEVENGENCIE et al., 1997; INTERNATIONAL STANDARDS ORGANIZATION, 2009; WANG et al., 2013; PROCÓPIO et al, 2018).

A variável de interesse foi o valor da D. O. dos poços que continham células (subtraídos do valor de D. O. de poços idênticos, porém sem a presença de células – branco da reação) obtido pelo teste do MTT para avaliar o metabolismo das células após todas as condições experimentais. Os valores foram convertidos em porcentagem de redução de viabilidade, quando comparados com os valores do controle negativo. (C)

#### 4.9 ANÁLISE DOS DADOS

4.9.1 Estatística descritiva: Medidas de tendência central e de dispersão das variáveis quantitativas.

Para quantificar o efeito citotóxico das MPs testadas, os valores de fluorescência de cada grupo experimental foram comparados com os valores de fluorescência obtidos no grupo controle negativo (C) (viabilidade de 100%), no caso do Alamar Blue® e MTT, e foram classificados da seguinte forma: 0, não citotóxicos (a inibição foi 25% menor que o grupo de 100% de viabilidade); 1, ligeiramente citotóxico (a inibição foi entre 25% e 50% em comparação com o grupo 100% de viabilidade); 2, moderadamente citotóxico (a inibição foi entre 50% e 75% em comparação com o grupo 100% de viabilidade); e 3, fortemente citotóxico (a inibição foi 75% maior que a do grupo 100% de viabilidade); (INTERNATIONAL STANDARDS ORGANIZATION, 2009).

#### 4.9.2 Estatística de inferência - Avaliação da distribuição dos dados quantitativos.

Para a análise estatística, o software SPSS 20.0 (IBM, 2012) foi utilizado. As variáveis foram testadas com o teste Shapiro-wilk e não apresentaram distribuição normal. Assim, métodos não paramétricos foram aplicados. Inicialmente, procedeu-se a estatística descritiva das leituras de fluorescência ou D.O. e da porcentagem de inibição de cada MP, em cada tempo avaliado (no caso da fluorescência), com estimativa de mediana e intervalo interquartil, mínimo e máximo. Posteriormente, foram avaliadas as diferenças entre as MPs com o teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn para comparações múltiplas. As diferenças entre os tempos foram avaliadas com o teste de Friedman, seguido do teste de Wilcoxon, nas comparações múltiplas. Para melhor visualização dos resultados, produziu-se gráficos do tipo boxplot. Os testes foram considerados significativos quando  $p < 0,05$ .

## 5. RESULTADOS

### 5.1 RESULTADOS REFERENTES AOS VALORES OBTIDOS PELA LEITURA DE FLUORESCÊNCIA DO TESTE ALAMAR BLUE®

#### 5.1.1 Análise qualitativa para classificação dos materiais testados seguindo a ISO 10993-5 (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, 2009).

Os valores de mediana e intervalos interquartis das leituras de fluorescência obtidos pelo teste Alamar Blue® para cada grupo experimental, tempo de incubação e concentração do material teste no meio de cultura estão demonstrados na Tabela 1.

Tabela 1. Mediana, Percentil de 25% e Percentil de 75% dos valores de leitura de fluorescência obtidos nos testes Alamar Blue® nos tempos de incubação de 6 h, 12 h e 24 h, em três ocasiões das MPs experimentais e brancas.

(continua)

Tempo de incubação	Grupo Experimental	CIM <sub>80</sub>			CIM <sub>50</sub>		
		MD	Perc 25%	Perc 75%	MD	Perc 25%	Perc 75%
6 h	C	540,3	407,1	656,5	540,3	407,1	656,5
	DMSO	423,0	319,7	525,5	423,0	319,7	525,5
	E0	544,9	418,7	689,0	447,0	301,5	639,9
	EGN10	527,3	432,4	675,7	466,7	418,6	503,1
	EGN20	442,9	320,5	475,7	458,1	270,6	481,9
	EN10	444,1	377,1	522,5	376,4	308,8	508,1
	EN20	563,5	387,4	591,0	349,4	332,6	446,9
	G0	400,1	306,7	424,2	365,8	311,5	395,0
	GN10	427,6	360,5	583,5	331,2	270,2	439,3
	GN20	536,9	284,9	579,2	345,8	248,5	473,2
12 h	C	1040,8	827,1	1125,3	1040,8	827,1	1125,3
	DMSO	959,2	884,5	1042,6	959,2	884,5	1042,6
	E0	986,9	895,0	1103,4	844,5	688,4	1080,4
	EGN10	971,4	929,3	1218,4	889,8	810,8	978,9
	EGN20	816,8	689,1	1040,5	944,0	727,1	1047,1
	EN10	942,4	931,9	1011,1	868,7	736,3	949,9
	EN20	968,6	838,0	1062,6	853,3	726,1	928,5
	G0	882,3	728,9	913,4	843,3	742,7	857,7
GN10	999,2	877,3	1047,2	823,7	735,0	983,6	

Tabela 1. Mediana, Percentil de 25% e Percentil de 75% dos valores de leitura de fluorescência obtidos nos testes Alamar Blue® nos tempos de incubação de 6 h, 12 h e 24 h, em três ocasiões das MPs experimentais e brancas.

Tempo de incubação	Grupo Experimental	CIM <sub>80</sub>			CIM <sub>50</sub>		
		MD	Perc 25%	Perc 75%	MD	Perc 25%	Perc 75%
24 h	C	1683,1	1474,9	1843,9	1683,1	1474,9	1843,9
	DMSO	1613,4	1486,5	1669,5	1613,4	1486,5	1669,5
	E	1564,9	1540,3	1619,1	1445,8	1162,6	1584,3
	EGN10	1629,3	1555,5	1859,5	1589,4	1450,1	1727,3
	EGN20	1375,9	1322,9	1639,5	1473,6	1453,8	1716,8
	EN10	1594,7	1573,0	1743,4	1481,0	1358,3	1534,0
	EN20	1682,0	1545,9	1688,6	1613,5	1484,5	1643,3
	G	1439,8	1384,0	1646,8	1384,9	1347,9	1457,6
	GN10	1551,6	1447,7	1707,9	1556,1	1436,7	1641,1
	GN20	1621,8	1562,8	1658,6	1512,0	1408,9	1589,0

(conclusão)

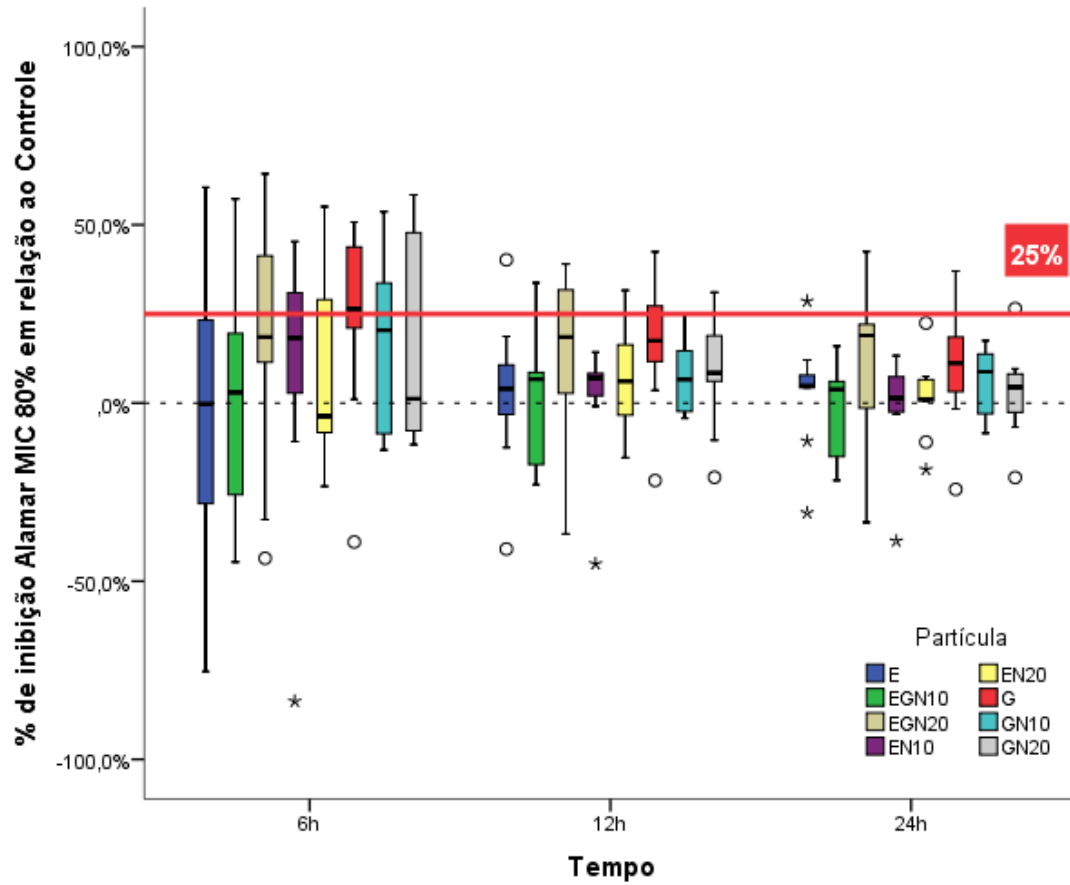
Os valores das porcentagens de inibição da proliferação celular em relação ao grupo controle para o teste Alamar Blue® CIM<sub>80</sub> nos tempos de 6 h, 12 h e 24 h estão demonstrados na Tabela 2 e na Figura 1. Pode-se observar que as MPs na MIC<sub>80</sub> estimularam (valores negativos) ou inibiram o crescimento celular, se comparados ao grupo controle (Tabela 2). Todos os valores de inibição (quando presentes) em todos os tempos e MPs estudadas se apresentaram inferiores a 25%, caracterizando um comportamento não citotóxico, exceto a G0<sub>80</sub> no tempo de 6 h que se apresentou levemente citotóxica segundo a ISO (INTERNATIONAL STANDARDS ORGANIZATION, 2009).



Tabela 2. Valores (medianas e percentil 25% e 75%) das porcentagens de inibição em relação ao grupo controle para o teste Alamar Blue® CIM<sub>80</sub> (intensidade) das MPs experimentais e das MPs brancas.

TEMPO	GRUPOS	% de inibição em relação ao controle			Classificação do material (ISO10993-5,2009)
		MD %	Perc 25%	Perc 75%	
6h	E0 <sub>80</sub>	-0,3%	-28,2%	23,3%	Não citotóxico
	EGN10 <sub>80</sub>	3,0%	-25,8%	19,5%	Não citotóxico
	EGN20 <sub>80</sub>	18,5%	11,5%	41,3%	Não citotóxico
	EN10 <sub>80</sub>	18,3%	2,8%	30,9%	Não citotóxico
	EN20 <sub>80</sub>	-3,7%	-8,3%	29,0%	Não citotóxico
	G0 <sub>80</sub>	26,4%	21,1%	43,8%	Levemente citotóxico
	GN10 <sub>80</sub>	20,4%	-8,6%	33,6%	Não citotóxico
	GN20 <sub>80</sub>	1,2%	-7,8%	47,8%	Não citotóxico
12h	E0 <sub>80</sub>	4,0%	-3,2%	10,7%	Não citotóxico
	EGN10 <sub>80</sub>	6,6%	-17,2%	8,6%	Não citotóxico
	EGN20 <sub>80</sub>	18,5%	2,7%	31,7%	Não citotóxico
	EN10 <sub>80</sub>	7,0%	2,0%	8,3%	Não citotóxico
	EN20 <sub>80</sub>	6,1%	-3,4%	16,4%	Não citotóxico
	G0 <sub>80</sub>	17,5%	11,6%	27,3%	Não citotóxico
	GN10 <sub>80</sub>	6,6%	-2,4%	14,6%	Não citotóxico
	GN20 <sub>80</sub>	8,4%	6,1%	18,9%	Não citotóxico
24h	E0 <sub>80</sub>	4,8%	4,3%	7,8%	Não citotóxico
	EGN10 <sub>80</sub>	3,8%	-15,0%	6,0%	Não citotóxico
	EGN20 <sub>80</sub>	19,0%	-1,4%	22,1%	Não citotóxico
	EN10 <sub>80</sub>	1,4%	-2,5%	7,3%	Não citotóxico
	EN20 <sub>80</sub>	1,1%	0,5%	6,5%	Não citotóxico
	G0 <sub>80</sub>	11,2%	3,2%	18,5%	Não citotóxico
	GN10 <sub>80</sub>	8,8%	-3,0%	13,7%	Não citotóxico
	GN20 <sub>80</sub>	4,5%	-2,6%	8,1%	Não citotóxico

Figura 2. Valores (mediana e amplitude interquartis) de porcentagem de inibição das MPs na CIM<sub>80</sub> em relação ao grupo controle, nos tempos de 6 h, 12 h e 24 h.

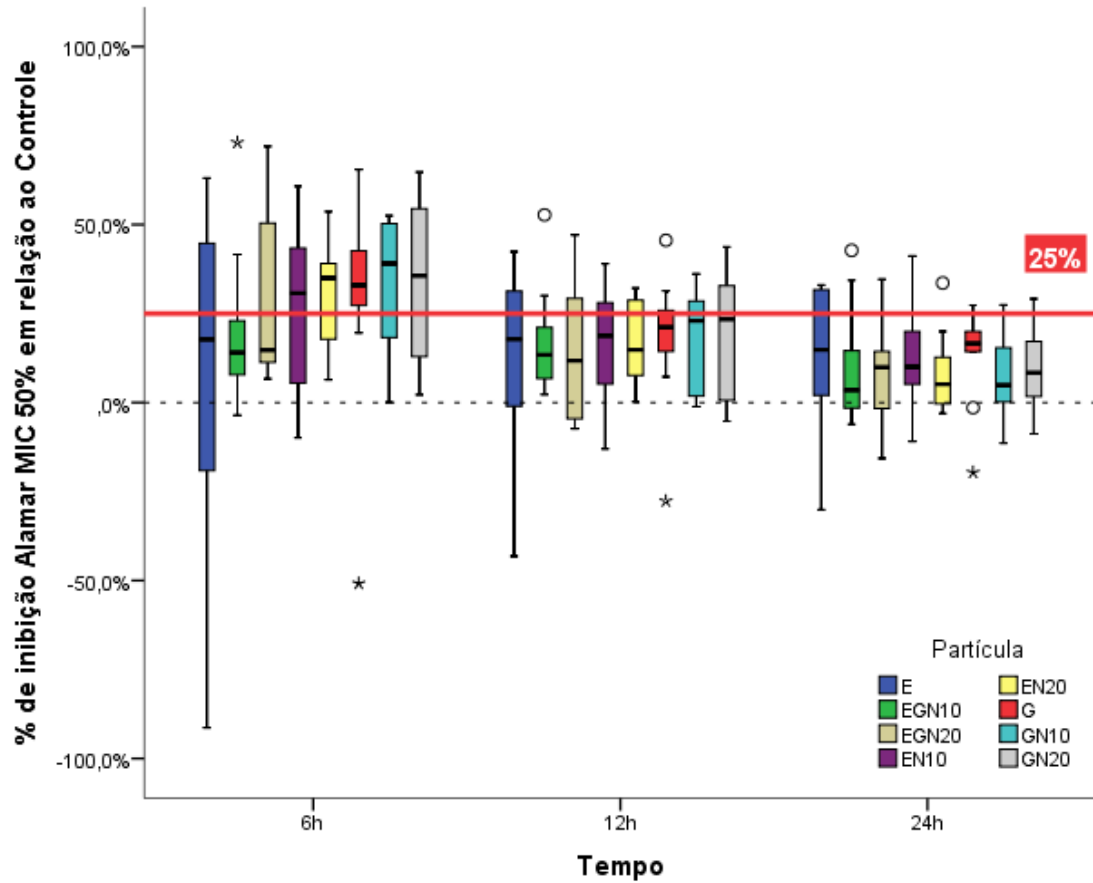


Os valores das porcentagens de inibição da proliferação celular em relação ao grupo controle para o teste Alamar Blue® CIM<sub>50</sub> nos tempos de 6 h, 12 h e 24 h estão demonstrados na Tabela 3 e Figura 2. Os valores de fluorescência obtidos pelo teste Alamar Blue® denotam que as MPs na MIC<sub>50</sub> inibiram o crescimento celular. Em 6h, as MPs EN10<sub>50</sub>, EN20<sub>50</sub>, G0<sub>50</sub>, GN10<sub>50</sub> e GN20<sub>50</sub> se apresentaram levemente citotóxicas, as demais não citotóxicas. No tempo de 12h e 24h todas as MPs foram não citotóxicas.

Tabela 3. Valores (medianas e percentil 25% e 75%) das porcentagens de inibição em relação ao controle para o teste Alamar Blue® CIM<sub>50</sub> (intensidade) das MPs experimentais e das MPs brancas.

TEMPO	GRUPOS	% de inibição em relação ao controle			Classificação do material (ISO10993-5,2009)
		MD %	Perc 25%	Perc 75%	
6 h	E0 <sub>50</sub>	17,7%	-19,1%	44,8%	Não citotóxico
	EGN10 <sub>50</sub>	14,1%	7,8%	22,9%	Não citotóxico
	EGN20 <sub>50</sub>	14,8%	11,3%	50,4%	Não citotóxico
	EN10 <sub>50</sub>	30,7%	5,4%	43,4%	Levemente citotóxico
	EN20 <sub>50</sub>	35,0%	17,8%	39,0%	Levemente citotóxico
	G0 <sub>50</sub>	33,0%	27,3%	42,7%	Levemente citotóxico
	GN10 <sub>50</sub>	39,0%	18,2%	50,3%	Levemente citotóxico
	GN20 <sub>50</sub>	35,6%	12,9%	54,5%	Levemente citotóxico
12 h	E0 <sub>50</sub>	17,8%	-1,0%	31,3%	Não citotóxico
	EGN10 <sub>50</sub>	13,4%	6,8%	21,1%	Não citotóxico
	EGN20 <sub>50</sub>	11,7%	-4,5%	29,3%	Não citotóxico
	EN10 <sub>50</sub>	18,8%	5,2%	28,1%	Não citotóxico
	EN20 <sub>50</sub>	14,8%	7,6%	28,8%	Não citotóxico
	G0 <sub>50</sub>	21,2%	14,4%	25,9%	Não citotóxico
	GN10 <sub>50</sub>	23,0%	1,8%	28,5%	Não citotóxico
	GN20 <sub>50</sub>	23,4%	0,6%	32,8%	Não citotóxico
24 h	E0 <sub>50</sub>	14,8%	2,0%	31,7%	Não citotóxico
	EGN10 <sub>50</sub>	3,5%	-1,5%	14,6%	Não citotóxico
	EGN20 <sub>50</sub>	9,9%	-1,7%	14,4%	Não citotóxico
	EN10 <sub>50</sub>	10,0%	5,1%	20,0%	Não citotóxico
	EN20 <sub>50</sub>	5,1%	-0,3%	12,7%	Não citotóxico
	G0 <sub>50</sub>	16,6%	14,3%	20,0%	Não citotóxico
	GN10 <sub>50</sub>	4,9%	0,2%	15,4%	Não citotóxico
	GN20 <sub>50</sub>	8,4%	1,7%	17,2%	Não citotóxico

Figura 2. Valores (mediana e amplitude interquartis) de porcentagem de inibição das MPs na CIM<sub>50</sub> em relação ao grupo controle, nos tempos de 6 h, 12 h e 24 h.



### 5.1.2 Comparação estatística (análise quantitativa dos dados de fluorescência)

A análise das leituras de fluorescência obtidas pelo teste Alamar Blue®, CIM<sub>80</sub> (tabela 4), mostra que houve diferença estatística entre os tempos 6h, 12h e 24h. Dessa forma, observa-se que houve a proliferação celular esperada ao longo do tempo. Quando comparados todos os grupos entre si dentro cada tempo, não houve diferença significativa entre eles, independentemente de ser C, DMSO ou MPs aplicada.

Tabela 4. Análise estatística de cada grupo de MPs experimentais, brancas, DMSO e controle (teste de Kruscall-Wallys) em cada tempo (teste de Friedman) para verificar se houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre eles, para o teste Alamar Blue® CIM<sub>80</sub>, para os valores de fluorescência.

GRUPOS	6 h		12 h		24 h		p-valor entre tempos
	MD	IIQ	MD	IIQ	MD	IIQ	
C	540,3	172,9	1040,8	244,4	1683,1	279,0	<0,001
DMSO	544,9	123,1	986,9	126,8	1564,9	151,7	<0,001
E0 <sub>80</sub>	527,3	220,0	971,4	242,3	1629,3	270,8	<0,001
EGN10 <sub>80</sub>	442,9	186,4	816,8	225,5	1375,8	191,5	<0,001
EGN20 <sub>80</sub>	444,1	191,6	942,4	284,2	1594,7	354,6	<0,001
EN10 <sub>80</sub>	563,5	204,5	968,6	205,4	1682,0	229,4	<0,001
EN20 <sub>80</sub>	400,1	146,2	882,3	164,9	1439,8	195,2	<0,001
G0 <sub>80</sub>	427,6	147,9	999,2	204,8	1551,6	274,6	<0,001
GN10 <sub>80</sub>	536,9	130,3	965,1	119,4	1621,8	160,4	<0,001
GN20 <sub>80</sub>	540,3	161,2	947,1ab	184,1	1683,1	214,6	<0,001
p-valor entre grupos	0,660		0,566		0,471		

MD= mediana; IIQ= intervalo interquartil; diferentes letras correspondem a diferenças significativas entre tempos

A análise estatística que comparou a porcentagem de inibição do crescimento celular das MPs experimentais e brancas (CIM<sub>80</sub>) em relação ao grupo controle, não mostrou diferença significativa entre os tempos de 6 h, 12 h e 24 h. Para a comparação entre grupos, nos tempos de 6 h, 12 h e 24 h, não houve diferença significativa entre eles, mostrando então um comportamento semelhante das MPs em cada tempo testado (Tabela 5).

Tabela 5. Análise estatística entre cada grupo, MPs experimentais e brancas (teste de Kruscall-Wallys), em cada tempo (teste de Friedman) para verificar se houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ), para o teste Alamar Blue® CIM<sub>80</sub>, para os valores de % de inibição.

GRUPOS	6h		12h		24h		p-valor entre tempos
	MD	IIQ	MD	IIQ	MD	IIQ	
E0 <sub>80</sub>	-0,3%	27,0%	4,0%	15,1%	4,8%	10,5%	0,879
EGN10 <sub>80</sub>	3,0%	11,3%	6,6%	14,3%	3,8%	6,0%	0,770
EGN20 <sub>80</sub>	18,5%	19,2%	18,5%	11,1%	19,0%	11,6%	0,814
EN10 <sub>80</sub>	18,3%	11,0%	7,0%	1,2%	1,4%	2,2%	0,110
EN20 <sub>80</sub>	-3,7%	12,6%	6,1%	9,8%	1,1%	5,8%	0,791
G0 <sub>80</sub>	26,4%	10,1%	17,5%	10,5%	11,2%	9,7%	0,204
GN10 <sub>80</sub>	20,4%	11,1%	6,6%	9,2%	8,8%	5,7%	0,633
GN20 <sub>80</sub>	1,2%	8,2%	8,4%	10,3%	4,5%	7,5%	0,758
p-valor entre grupos	0,143		0,298		0,444		

MD= mediana; IIQ= intervalo interquartil.

A análise das leituras de fluorescência obtidas pelo teste Alamar Blue®, CIM<sub>50</sub> (tabela 6), mostra que houve diferença estatística entre os tempos 6h, 12 h e 24h. Dessa forma, observa-se que houve a proliferação celular esperada ao longo do tempo. Quando comparados todos os grupos entre si dentro cada tempo, não houve diferença significativa entre eles, independentemente de ser controle, DMSO ou MPs aplicada.

Tabela 6. Análise estatística de cada grupo de MPs experimentais, brancas, DMSO e controle (teste de Kruskal-Wallis) em cada tempo (teste de Friedman) para verificar se houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre eles, para o teste Alamar Blue® CIM<sub>50</sub>, para os valores de fluorescência.

GRUPOS	6h		12h		24h		p-valor entre tempos
	MD	IIQ	MD	IIQ	MD	IIQ	
Controle	540,3	172,9	1040,8	244,4	1474,9	279,0	<0,001
DMSO	432,0	123,1	959,8	126,8	1597,6	151,7	<0,001
E0 <sub>50</sub>	447,0	270,6	844,5	307,9	1162,6	320,4	<0,001
EGN10 <sub>50</sub>	466,7	124,1	889,8	165,6	1450,1	298,0	<0,001
EGN20 <sub>50</sub>	458,1	127,7	943,9	220,8	1453,8	226,0	<0,001
EN10 <sub>50</sub>	376,4	125,9	868,6	159,5	1358,3	260,2	<0,001
EN20 <sub>50</sub>	349,4	78,0	853,3	133,8	1484,5	200,0	<0,001
G0 <sub>50</sub>	365,8	171,7	843,3	222,5	1347,9	225,4	<0,001
GN10 <sub>50</sub>	331,2	115,4	823,7	150,5	1436,7	200,9	<0,001
GN20 <sub>50</sub>	345,8	130,2	767,5	197,0	1408,9	217,1	
p-valor entre grupos	0,078		0,489		0,428		

MD= mediana; IIQ= intervalo interquartil.

A análise estatística que comparou os valores de porcentagem de inibição dos grupos quando comparados ao grupo controle (C), e a comparação realizada entre cada tempo (6 h, 12 h e 24 h) mostra diferença significativa para os grupos EN20<sub>50</sub>, G0<sub>50</sub>, GN10<sub>50</sub>, denotando um decréscimo de inibição ao longo do tempo. Quando comparados os grupos entre si em cada tempo, não houve diferença significativa.

Tabela 07. Análise estatística entre cada grupo, MPs experimentais e brancas (teste de Kruscall-Wallys), em cada tempo (teste de Friedman) para verificar se houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparado ao grupo controle (C), para o teste Alamar Blue® CIM<sub>50</sub>, para os valores de % de inibição.

GRUPOS	6h		12h		24h		p-valor entre tempos
	MD	IIQ	MD	IIQ	MD	IIQ	
E0 <sub>50</sub>	17,7%	16,6%	17,8%	12,0%	14,8%	12,8%	0,898
EGN10 <sub>50</sub>	14,1%	26,5%	13,4%	16,7%	3,5%	17,9%	0,251
EGN20 <sub>50</sub>	14,8%	20,6%	11,7%	13,7%	9,9%	8,9%	0,161
EN10 <sub>50</sub>	30,7%	16,5%	18,8%	11,5%	10,0%	13,0%	0,438
EN20 <sub>50</sub>	35,0%	12,4%	14,8%	10,3%	5,1%	11,9%	0,011
G0 <sub>50</sub>	33,0%	18,0%	21,2%	12,2%	16,6%	5,9%	0,039
GN10 <sub>50</sub>	39,0%	14,3%	23,0%	7,7%	4,9%	7,4%	0,035
GN20 <sub>50</sub>	35,6%	18,8%	23,4%	12,5%	8,4%	9,2%	0,089
p-valor entre grupos	0,529		0,817		0,448		

MD= mediana; IIQ= intervalo interquartil.



## 5.2 RESULTADOS REFERENTES AOS VALORES OBTIDOS PELA LEITURA DE ABSORBÂNCIA DO TESTE MTT

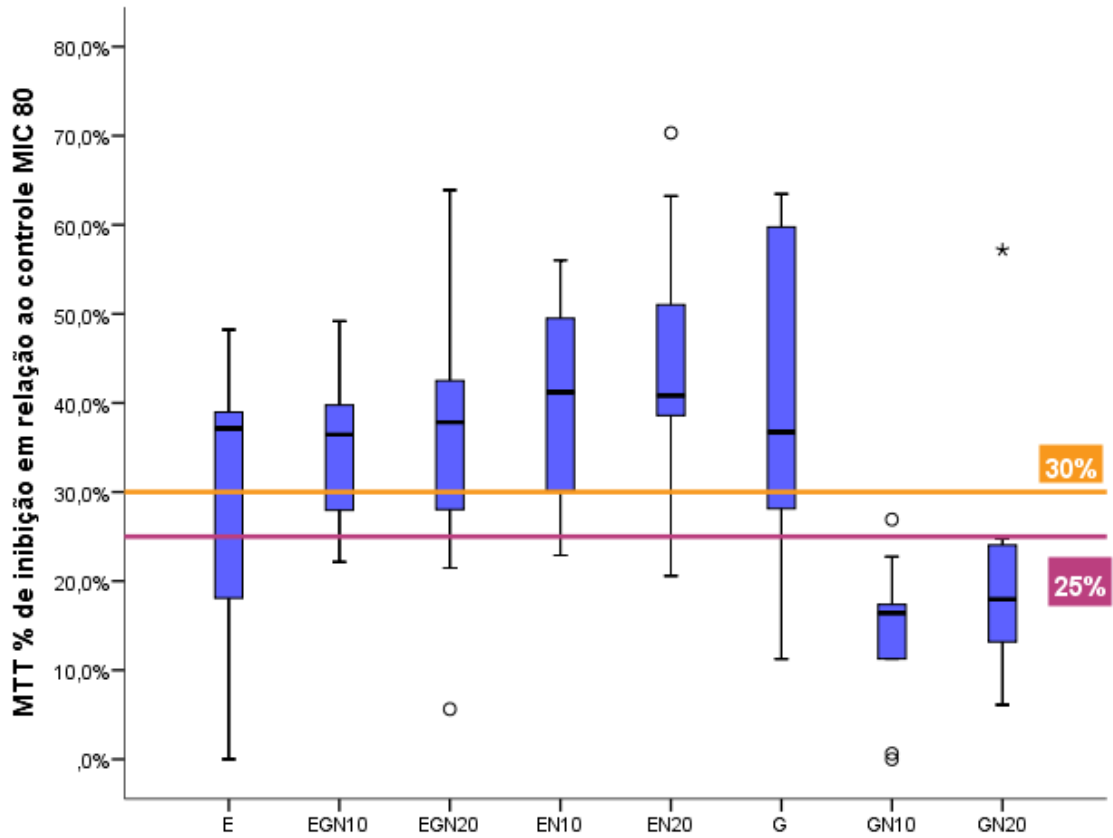
### 5.2.1 Análise qualitativa para classificação dos materiais testados seguindo a norma ISO (INTERNATIONAL STANDARDS ORGANIZATION, 2009).

Na tabela 8 e gráfico da figura 3, os valores da mediana e intervalos interquartis da porcentagem de inibição da proliferação celular das MPs testadas foram representados. Para as leituras de absorvância, pelo teste MTT, para as MPs CIM<sub>80</sub>, quando se observam os valores de porcentagem de inibição, verifica-se que todas as MP apresentaram mediana superior a 25% e inferior a 50%, sendo consideradas com efeito levemente citotóxico. As partículas GN10<sub>80</sub> e GN20<sub>80</sub> foram consideradas não citotóxicas, pois apresentaram porcentagem de inibição inferior a 25%.

Tabela 08. Porcentagem de inibição em relação ao controle para o teste MTT, CIM<sub>80</sub>.

GRUPOS	% de inibição em relação ao controle						
	M	MD	DP	Perc 25%	Perc 75%	Min	Max
E0 <sub>80</sub>	29,3%	37,1%	16,5%	18,1%	39,0%	0,0%	48,2%
EGN10 <sub>80</sub>	35,5%	36,4%	8,7%	27,9%	39,8%	22,2%	49,2%
EGN20 <sub>80</sub>	36,4%	37,8%	17,0%	28,0%	42,5%	5,6%	63,9%
EN10 <sub>80</sub>	40,3%	41,2%	12,2%	30,1%	49,5%	22,9%	56,0%
EN20 <sub>80</sub>	44,1%	40,8%	16,5%	38,6%	51,0%	20,6%	70,3%
G0 <sub>80</sub>	39,4%	36,7%	18,8%	28,1%	59,8%	11,3%	63,5%
GN10 <sub>80</sub>	14,0%	16,4%	9,0%	11,3%	17,4%	0,0%	26,9%
GN20 <sub>80</sub>	20,8%	18,0%	14,9%	13,2%	24,0%	6,1%	57,2%

Figura 3. Valores (mediana e amplitude interquartis) de porcentagem de inibição das MPs na CIM<sub>80</sub> em relação ao grupo controle (C<sub>80</sub>).



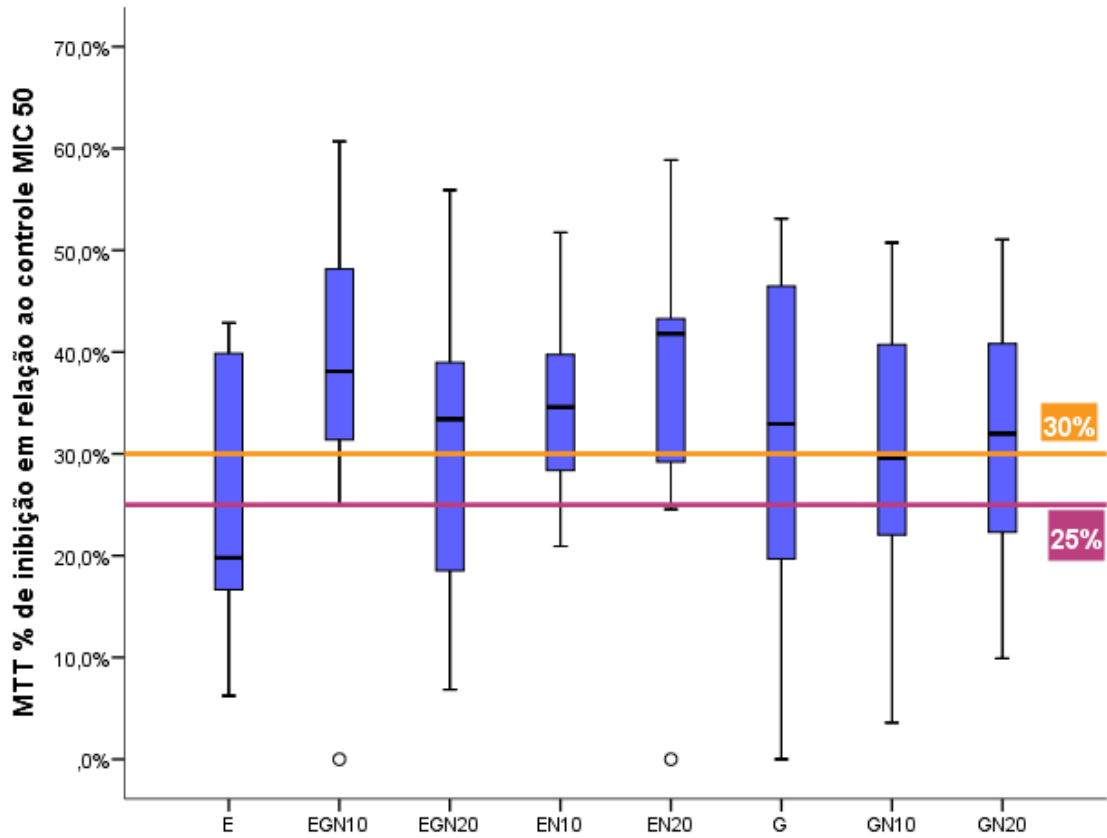
Na Tabela 9 e no gráfico da figura 4, os valores de mediana da porcentagem de inibição da proliferação celular das MPs testadas foram representados.

Para as leituras de absorbância, pelo teste MTT, para as MPs CIM<sub>50</sub>, quando se observam os valores de porcentagem de inibição, verifica-se que todas as MPs apresentaram mediana superior a 25% e inferior a 50%, sendo consideradas com efeito levemente citotóxico, exceto a partícula E<sub>50</sub>, que foi não citotóxica.

Tabela 09. Porcentagem de Inibição em relação ao controle para o teste MTT, CIM<sub>50</sub> (intensidade).

GRUPOS	% de inibição em relação ao controle						
	M	MD	DP	Perc 25%	Perc 75%	Min	Max
E <sub>50</sub>	25,8%	19,8%	14,3%	16,6%	39,9%	6,2%	42,9%
EGN10 <sub>50</sub>	37,9%	38,1%	18,0%	31,4%	48,2%	0,0%	60,7%
EGN20 <sub>50</sub>	31,2%	33,4%	17,1%	18,5%	39,0%	6,8%	55,9%
EN10 <sub>50</sub>	35,2%	34,6%	11,3%	28,4%	39,8%	20,9%	51,7%
EN20 <sub>50</sub>	36,0%	41,8%	16,6%	29,2%	43,3%	0,0%	58,9%
G <sub>50</sub>	30,8%	32,9%	19,8%	19,7%	46,5%	0,0%	53,1%
GN10 <sub>50</sub>	29,6%	29,6%	13,8%	22,0%	40,7%	3,6%	50,8%
GN20 <sub>50</sub>	31,3%	32,0%	13,8%	22,3%	40,8%	9,9%	51,0%

Figura 4. Valores (mediana e amplitude interquartis) de porcentagem de inibição das MPs na CIM<sub>80</sub> em relação ao grupo controle.



### 5.2.2 Comparação estatística (análise quantitativa dos dados)

Os valores (MD, Perc 25% e Perc 75%) de densidade óptica obtidos pelo teste MTT, na MIC<sub>80</sub>, das MPs experimentais e das MPs brancas estão demonstradas na tabela 10. As comparações entre o grupo controle (C) e DMSO não encontraram diferença estatística. Portanto as comparações com os demais grupos foram sempre realizadas com o grupo controle, tendo sido encontradas diferenças significativas entre os grupos de MPs em relação a este.

Tabela 10. Mediana, percentil 25% e percentil 75% dos valores de densidade óptica obtidos pelo teste MTT, na CIM<sub>80</sub>. Valores analisados e comparações entre grupos feitos pelo teste U de Mann-Withney.

Grupo	MD	Min	Max	Perc 25%	Perc 75%	p-valor em relação ao controle*
Controle**	0,885	0,674	1,169	0,817	0,983	Ref
DMSO**	0,684	0,582	0,994	0,615	0,726	-
E0 <sub>80</sub>	0,582	0,525	1,021	0,532	0,725	0,001
EGN10 <sub>80</sub>	0,619	0,442	0,653	0,537	0,637	<0,001
EGN20 <sub>80</sub>	0,541	0,371	0,807	0,480	0,664	<0,001
EN10 <sub>80</sub>	0,519	0,446	0,671	0,475	0,584	<0,001
EN20 <sub>80</sub>	0,519	0,305	0,691	0,409	0,631	<0,001
G0 <sub>80</sub>	0,600	0,318	0,741	0,378	0,659	<0,001
GN10 <sub>80</sub>	0,772	0,636	1,021	0,714	0,859	0,015
GN20 <sub>80</sub>	0,746	0,440	0,843	0,661	0,784	<0,001

M=média; DP=desvio padrão; MD=mediana; Min=mínimo; Max=máximo; Perc=percentil; \*p-valor ao teste U de Mann-Withney; \*\*controle e DMSO não tiveram diferença estatisticamente significativa entre si (p=0,177)

Os valores (MD, Perc 25% e Perc 75%) de densidade óptica obtidos pelo teste MTT, na MIC<sub>50</sub>, das MPs experimentais e das MPs brancas estão demonstradas na Tabela 11. As comparações entre o grupo controle e DMSO não encontraram diferença estatística. Portanto as comparações com os demais grupos foram sempre realizadas com o grupo controle (C). Foram encontradas diferenças significativas entre os grupos de MPs em relação ao grupo C.

Tabela 11. Mediana, percentil 25% e percentil 75% dos valores de densidade óptica obtidos pelo teste MTT CIM<sub>50</sub>. Valores analisados e comparações entre grupos feitas pelo teste U de Mann-Withney.

Grupo	MD	Min	Max	Perc 25%	Perc 75%	p-valor em relação ao controle*
Controle**	0,885	0,674	1,169	0,817	0,983	Ref
DMSO**	0,684	0,582	0,994	0,615	0,726	-
E0 <sub>50</sub>	0,693	0,518	0,911	0,587	0,698	<0,001
EGN10 <sub>50</sub>	0,549	0,404	1,101	0,451	0,627	<0,001
EGN20 <sub>50</sub>	0,628	0,441	0,778	0,531	0,710	<0,001
EN10 <sub>50</sub>	0,605	0,403	0,688	0,547	0,652	<0,001
EN20 <sub>50</sub>	0,597	0,358	0,863	0,531	0,616	<0,001
G0 <sub>50</sub>	0,613	0,408	0,849	0,550	0,699	<0,001
GN10 <sub>50</sub>	0,613	0,506	0,805	0,593	0,651	<0,001
GN20 <sub>50</sub>	0,608	0,496	0,784	0,568	0,676	<0,001

M=média; DP=desvio padrão; MD=mediana; Min=mínimo; Max=máximo; Perc=percentil; \*p-valor ao teste U de Mann-Withney; \*\*controle e DMSO não tiveram diferença estatisticamente significativa entre si (p=0,177)

## 6 DISCUSSÃO

No presente estudo, a citotoxicidade de seis micropartículas (MPs) poliméricas (EN10, EN20, GN10, GN20, EGN10, EGN20), foi testada em duas concentrações efetivas para inibição de *Candida albicans* (CIM<sub>50</sub> e CIM<sub>80</sub>), pelos testes Alamar Blue® e MTT. Quando os dados de fluorescência foram analisados de forma quantitativa, para inferências estatísticas, para o teste Alamar Blue®, não houve diferença significativa da viabilidade celular promovida pelas MPs em relação grupo controle. Além disso, todas as MPs se comportaram de maneira similar dentro dos tempos avaliados. A diferença estatística encontrada foi somente quando os grupos foram analisados ao longo dos tempos de 6 h, 12 h e 24 h, indicando que houve a proliferação celular esperada para todos os grupos. Para o teste MTT, todas as MPs se comportaram de forma diferente (inibição celular), quando comparadas ao grupo controle, exceto o grupo DMSO, cuja densidade óptica não apresentou diferença estatística significativa em relação ao controle. Já quando os valores de porcentagem de inibição celular em relação ao controle são analisados quantitativamente, no teste Alamar Blue®, para as MPs CIM<sub>80</sub>, não houve diferença estatística ao longo dos tempos testados, ou seja, as MPs mantiveram o mesmo padrão de comportamento. Na comparação das porcentagens de inibição para as MPs CIM<sub>50</sub>, as partículas EN20<sub>50</sub>, G0<sub>50</sub> e GN10<sub>50</sub> apresentaram diferença significativa ao longo dos tempos de 6 h, 12 h e 24 h. No tempo de 6 h os valores foram estatisticamente maiores, porém nos demais tempos já se apresentavam estatisticamente iguais às demais. E quando se compararam todas as MPs dentro de cada tempo, não houve diferença estatística entre elas, demonstrando não toxicidade.

O teste do Alamar Blue® tem sido utilizado na investigação de citotoxicidade de fármacos encapsulados (HAMID et al., 2004). Da mesma forma o MTT é um teste largamente utilizado na investigação da citotoxicidade de materiais microparticulados (KURT et al., 2017), fármacos (ZHENG, AUDUS, 1994), materiais adesivos (DEVENGENCIE et al., em 1997; DE GOMES et al., 2011; LEE et al., 2015), entre outros materiais odontológicos (CAMPANHA et al., 2006). Em um estudo anterior (HAMID et al., 2004), os ensaios Alamar Blue® e MTT, conjuntamente, forneceram informações úteis para identificar 117 drogas de diversas áreas terapêuticas citotóxicas in vitro nos estágios iniciais da seleção (*screening*), tendo sido mais sensível o teste Alamar Blue® em comparação com o MTT. Assim, no presente

estudo, que pretende auxiliar na seleção inicial de uma ou mais MPs poliméricas que possam vir a ser incorporadas em futuras formulações farmacêuticas, optou-se pela utilização desses dois testes largamente utilizados. O teste MTT pareceu ser mais sensível para detectar inibição da proliferação celular, uma vez que a maioria das MPs se comportou estatisticamente diferente em relação ao controle. Tem sido recomendado que, quando da utilização de ambos os testes utilizados, o avaliador considere a possibilidade de ocorrência de falsos positivos e negativos devido a inibição ou indução de enzimas metabolizadoras que poderia levar a interpretações errôneas (HAMID et al., 2004). Em revisão de literatura que compara o teste Alamar Blue® e o MTT (RAMPERSAD, 2012), considera-se o sal de tetrazólio mais citotóxico porque os cristais de formazan produzidos a partir da redução dos sais devem ser solubilizados com DMSO ou HCl/isopropanol, que destrói as células sob investigação, e experimento no curso de tempo não podem ser realizados. O teste Alamar Blue® contorna muitos dos problemas de incompatibilidade descritos e oferecem muitas vantagens sobre os sais de tetrazólio, o que explicaria o fato das MPs terem apresentado diferença estatística em relação ao controle no teste MTT.

Além disso, as ocorrências de citotoxicidade para o Alamar Blue® devem ser vistas no presente estudo com cuidado, pois não foram encontradas apenas inibições de viabilidade celular, mas também houve a ocorrência de sua estimulação, em relação ao grupo controle, o que poderia significar maior proliferação celular. Para O'Brien et al., 2000, o acúmulo do produto fluorescente (resultante da ação de enzimas mitocondriais) poderia causar uma superestimação da população. Ramperstad também afirmou, em 2012 (RAMPERSAD, 2012) que a composição do meio de cultura e os próprios materiais, uso de dispersantes ou outros aditivos e o tipo de células usadas no ensaio também podem afetar o resultado do teste. Portanto ressalta a necessidade do uso de mais de um teste para se determinar a citotoxicidade de novos materiais. O teste Alamar Blue®, MTT e Vermelho Neutro foram utilizados para avaliar toxicidade de nanopartículas de prata e verificou-se que o ensaio de Rezazurina foi o teste com menos interferência quando comparado aos outros ensaios (MELLO et al., 2020).

O fármaco que foi selecionado para encapsulação nas MPs, a nistatina (N), é insolúvel em meio aquoso. Por essa razão a solubilização das MPs foi realizada em DMSO (BOROS-MAJEWSKA et al., 2015), na concentração final de 1% e esta não resultou em citotoxicidade direta. O DMSO é um solvente orgânico usado



tanto na dissolução de substâncias lipofílicas, quanto como crioprotetor para células em experimentos *in vitro* (HEBLING et al., 2015; SUMIDA et al., 2011, VRANA et al., 2011). Também vem sendo utilizado como veículo para vários medicamentos (HEBLING et al., 2015), e usado para solubilizar medicamentos pouco solúveis em ensaios de permeabilidade (VIOLANTE et al., 2002). O uso do DMSO como solvente é considerado seguro, em até 3% de concentração no meio de cultura, não causando efeito citotóxico (SUMIDA et al., 2011; INTERNATIONAL STANDARDS ORGANIZATION, 2009; SEMIS et al., 2010; ZHENG, AUDUS, 1994). Alguns estudos afirmam que até a concentração de 10%, o DMSO não apresentou potencial de toxicidade (da VIOLANTE et al., 2002).

Os tempos testados para o teste Alamar Blue® também não influenciaram diretamente para que houvesse um aumento da citotoxicidade, e alguns materiais promoveram sua redução. Os testes foram realizados em 6 h, 12 h e 24 h para que se simulasse o tempo em que um usuário de prótese removível permaneceria com o adesivo na cavidade oral. O Alamar Blue®, no estudo realizado por O'Brien et al., em 2000 (O'BRIEN et al., 2000) foi considerado mais valioso como medida para o tempo final para citotoxicidade do que como medida cinética (ao longo dos tempos estudados) para monitorar o crescimento celular, o que afirma a similaridade dos níveis de citotoxicidade entre os tempos avaliados, na maioria dos grupos testados.

As MPs também foram classificadas (análise qualitativa), como instruiu a norma INTERNATIONAL STANDARDS ORGANIZATION, 2009, de acordo com os valores de porcentagem de inibição do crescimento celular em relação a cultura C, com padrão de crescimento de 100%. De acordo com o teste Alamar Blue®, tendo as MPs sido testadas na CIM<sub>80</sub>, apenas a G<sub>0</sub> foi classificada como levemente citotóxica e apenas quando analisada num período de 6 h de incubação, tornando-se não citotóxica nos tempos seguintes, o que denota uma redução de toxicidade ao longo do tempo. Todas as outras MPs analisadas na CIM<sub>80</sub> em todos os tempos foram não citotóxicas. Para a dose CIM<sub>50</sub>, no tempo de 6 h, demonstraram apenas leve citotoxicidade as MPs EN<sub>10</sub><sub>50</sub>, EN<sub>20</sub><sub>50</sub>, G<sub>0</sub><sub>50</sub>, GN<sub>10</sub><sub>50</sub> e GN<sub>20</sub><sub>50</sub>, segundo a classificação da ISO. No tempo de 12 h e 24 h, todos os grupos foram classificados como não citotóxicos. A citotoxicidade também foi avaliada pelo teste MTT, somente no período de 24 h. Para os testes na CIM<sub>80</sub>, as MPs GN<sub>10</sub><sub>80</sub> e GN<sub>20</sub><sub>80</sub> foram as únicas classificadas como não citotóxicas, as demais partículas foram classificadas

como levemente citotóxicas. As análises para as partículas CIM<sub>50</sub> mostraram que a MP E<sub>050</sub> foi não citotóxica e as demais foram classificadas como levemente citotóxicas. Mas essa classificação qualitativa não corrobora os resultados de comparação estatística entre os grupos discutida nos parágrafos anteriores, em que se verificou que todas as MPs, em todos os testes e tempos de incubação não apresentaram diferença de crescimento em relação ao controle. Contrariando as expectativas, a dose das MPs parece não ter uma relação direta com a citotoxicidade encontrada, haja visto que MPs que foram citotóxicas na MIC<sub>50</sub>, não o foram na MIC<sub>80</sub>. A composição, que variou entre dois polímeros utilizados e associação de ambos, também não interferiram para que diferenças fossem encontradas, exceto quando se verificou que as duas MPs que continham apenas o polímero G na MIC<sub>80</sub> se mostraram não citotóxicas, nas leituras de absorbância.

Os polímeros da família Eudragit® têm sido largamente utilizados na produção de fármacos (SALATIN et al., 2020; DALCIN et al., 2019; EL NAHAS et al., 2017) e também vem sendo utilizado em formulações de adesivo para próteses (Eudragit® L-100; CARTAGENA et al., 2017), devido a sua capacidade de formar partículas de tamanho menores, superfície com carga positiva, força bio-adesiva moderada e excelente estabilidade (EL NAHAS et al., 2017). Citotoxicidade não tem sido verificada nos compostos obtidos a partir de sua união com diferentes fármacos (DALCIN et al., 2019; EL NAHAS et al., 2017).

O polímero G é bastante utilizado em sistemas de liberação controlada de fármacos, sendo comumente usado em formulações de adesivos para próteses dentárias, (GANTREZ MS-955® MS-955, 2018, CARTAGENA et al., 2017). Estudos realizados têm demonstrado que estes polímeros não apresentam potencial de citotoxicidade (EL NAHAS et al., 2017, IGLESIAS et al, 2017, LENG et al., 2018). Nas leituras de fluorescência no tempo de 6 h, a MP contendo somente Gantrez MS-955® (G0), apresentou citotoxicidade leve. Date et al, 2013., afirma que partículas de Gantrez MS-955® teriam a capacidade de favorecer a penetração dos fármacos no interior das células em testes de *in vitro*, aumentando assim o nível de toxicidade do fármaco, mas isso não foi verificado nas MPs do presente estudo.

As MPs testadas foram incorporadas com N. É amplamente aceito que a atividade e toxicidade da N dependem da presença e do tipo de esteróis da membrana celular (SANTOS et al., 2017). A N obtida de *Streptomyces noursei*, liga-se ao ergosterol da membrana plasmática fúngica e forma poros que a torna mais

permeável, causando perda de potássio intracelular com efeito fungicida (QUINDÓS et al., 2019). Novos medicamentos contendo N na composição vem sendo desenvolvidos e testados em relação à sua toxicidade (SEMIS et al., 2010). Segundo Zager, em 2000 (ZAGER., 2000), este fármaco apresenta potencial de nefrotoxicidade, limitando assim seu uso clínico. Em teste de citotoxicidade, encontrou que a N parece ser menos tóxica que a anfotericina B (em contraste com a visão clínica predominante). Essa citotoxicidade diminuída pode ocorrer devido a composição lipossômica da N.

Pode-se observar que nenhuma MP utilizada foi considerada moderadamente ou altamente citotóxica. Levando-se em consideração somente estes testes, pode-se dizer que a partícula GN10<sub>80</sub> seria a mais indicada para ser utilizada. Porém, outros testes, como eficiência de encapsulação, testes de liberação do fármaco e testes microbiológicos devem ser também analisados. Assim como outros testes de citotoxicidade celular, que analisem outras vias metabólicas, que não a respiração celular, poderiam ser realizados. Para que então testes secundários em animais e terciários (clínicos) possam vir a ser executados.

## 7 CONCLUSÃO

A toxicidade não pareceu ser dependente da concentração (CIM<sub>80</sub> ou CIM<sub>50</sub>), e das composições das MPs também não influenciaram os valores de toxicidade.

A única MP que não demonstrou citotoxicidade em todos os tempos de incubação e testes foi a GN10<sub>80</sub>.

A maioria das MPs em algum momento de algum teste se apresentou levemente citotóxica, porém nenhuma foi considerada moderadamente ou altamente citotóxica.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALBERS CE. et al. In vitro cytotoxicity of silver nanoparticles on osteoblasts and osteoclasts at antibacterial concentrations. **Nanotoxicology**, v. 7, n. 1, p. 30-36, feb. 2001.
2. ANWAR A. et al. Silver nanoparticle conjugation affects antiacanthamoebic activities of amphotericin B, nystatin, and fluconazole. *Parasitol Res*, v. 117, n. 1, p. 265-271, jan. 2018.
3. BOROS-MAJEWSKA J. et al. A novel in vitro assay for assessing efficacy and toxicity of antifungals using human leukaemic cells infected with *Candida albicans*. **J Appl Microbiol**, v. 119, n. 1, p. 177-187, Jul. 2015.
4. CAMPANHA NH. et al. Cytotoxicity of hard chairside reline resins: effect of microwave irradiation and water bath postpolymerization treatments. *Int J Prosthodont*, v. 19, n. 2 p. 195-201, Mar-Apr. 2006.
5. CARTAGENA-MOLINA A. F. **Desenvolvimento de um adesivo para próteses removíveis contendo micropartículas poliméricas de nitrato de miconazol: síntese e caracterização**. 118 f. Tese de doutorado – UEPG. Ponta Grossa 2016.
6. DALCIN AJF. et al. Nanoencapsulation of the flavonoid dihydromyricetin protects against the genotoxicity and cytotoxicity induced by cationic nanocapsules. **Colloids Surf B Biointerfaces**, v. 173, p. 798-805, jan. 2019.
7. DA VIOLANTE G. Evaluation of the cytotoxicity effect of dimethyl sulfoxide (DMSO) on Caco2/TC7 colon tumor cell cultures. **Biol Pharm Bull**, v. 25, n. 12, p. 1600-1603, dec. 2002.
8. DE GOMES PS, Figueiral MH, Fernandes MH, Scully C. Cytotoxicity of denture adhesives. **Clin Oral Investig**, v. 15, n. 6, p. 885-893, Dec. 2001.
9. DATE PV, et al. Ionic complexation as a non-covalent approach for the design of folate anchored rifampicin Gantrez nanoparticles. **J Biomed Nanotechnol**, v. 9, n. 5, p. 765-775, May. 2013.
10. DEVENGENCIE J. et al. In vitro evaluation of denture adhesives: possible efficacy of complex carbohydrates. **Int J Prosthodont**, v. 10, n. 1, p. 61-72, jan-feb. 1997.
11. EL-NAHAS AE. et al. Silymarin-Loaded Eudragit Nanoparticles: Formulation, Characterization, and Hepatoprotective and Toxicity Evaluation. **AAPS PharmSciTech**, v. 18, n. 8, p. 3076-3086, nov. 2017.

12. ENDO EH. et al. Activity of spray-dried microparticles containing pomegranate peel extract against *Candida albicans*. **Molecules**, v. 17, n. 9, p. 10094-10107, aug. 2012. doi: 10.3390/molecules170910094.
13. EUDRAGIT® functional polymers for oral solid dosage forms. Disponível em: <<https://healthcare.evonik.com/product/healthcare/en/products/pharmaceutical-excipients/EUDRAGIT/>>.
14. GANTREZ TM MS-955 calcium/sodium PVM/MA polymer. Disponível em: <<https://www.ulprospector.com/pt/la/PersonalCare/Detail/4990/95503/Gantrez-MS-955-calcium-sodium-PVM-MA-polymer>>.
15. HAMID R. et al. Comparison of Alamar Blue® and MTT assays for high throughput screening. **Toxicol In Vitro**, v. 18, n. 5, p. 703-710, oct. 2004.
16. HEBLING J. et al. Cytotoxicity of dimethyl sulfoxide (DMSO) indirect contact with odontoblast-like cells. **Dent Mater**, v. 31, p. 4, p. 399-405, apr. 2015.
17. IGLESIAS T. et al. Evaluation of the cytotoxicity, genotoxicity and mucus permeation capacity of several surface modified poly(anhydride) nanoparticles designed for oral drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 17 p. 67-79, 2017.
18. International organization for standardization, “biological evaluation of medical devices”. Part 5: Tests for cytotoxicity: in vitro methods”, 3st ed, ISO 10993-5, 2009.
19. HENSTEN-PETTERSEN A. Comparison of the methods available for assessing cytotoxicity. **IntEndod J**, v. 21, p. 2, p. 89-99, mar. 1988.
20. KURT A. et al. The antifungal activity and cytotoxicity of silver containing denture base material. **Niger J Clin Pract**, v. 20, n. 3, p. 290-295, mar. 2017.
21. LEE Y. et al. Cytotoxicity of four denture adhesives on human gingival fibroblast cells. **Acta Odontol Scand**, v. 73, n. 2, p. 87-92, feb. 2015.
22. LENG KM. In vitro and in vivo toxicity assessment of alginate/eudragit S 100-enclosed chitosan–calcium phosphate loaded Iron saturated bovine lactoferrin capsules. **Biomed Pharmacother**, v. 97, p. 26-37, jan. 2018.
23. MASETTI P. et al. Cytotoxic potential of denture base and relined acrylic resins after immersion in disinfectant solutions. **J Prosthet Dent**. V. 120, n. 1, p. 155.e1-155.e7. 2018.

24. MELLO DF. et al. Caveatstothe use of MTT, neutral red, Hoechst and Resazurin to measure silver nanoparticle cytotoxicity. **Chem Biol Interact**, v. 5, p. 315-318, jan. 2020
25. O'BRIEN J. et al. Investigation of the Alamar Blue® (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **Eur J Biochem**, v. 267, n. 17, p. 5421-5426, sep. 2000.
26. PROCÓPIO ALF. et al. Antimicrobial and cytotoxic effects of denture base acrylic resin impregnated with cleaning agents after long-term immersion. **Toxicol In Vitro**, v. 52, p. 8-13, oct. 2018
27. QUINDÓS G. Therapeutic tools for oral candidiasis: Currentand new antifungaldrugs. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, v. 24, n. 2, p. 172-180, mar. 2019.
28. RAMPERSAD SN. Multipleapplications of Alamar Blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. **Sensors (Basel)**, v. 12, n. 9, p. 12347-12360. 2012.
29. RIBEIRO, J. L. **Desenvolvimento e caracterização de micropartículas poliméricas contendo nistatina para adesivos protéticos**. 84 f. Ponta Grossa, 2018. Dissertação (Mestrado em Odontologia – Clínica Integrada). Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2018.
30. SALATIN S. et al. Formulation and Evaluation of Eudragit RL-100 Nanoparticles Loaded In-Situ Forming Gel for Intranasal Delivery of Rivastigmine. **Adv Pharm Bull**, v. 10, n. 1, p. 20-29, jan. 2020.
31. SANTOS HA. et al. In vitro cytotoxicity of porous silicon microparticles: effect of the particle concentration, surface chemistry and size. **Acta Biomater**, v. 6, n 7, p. 2721-2731, jul. 2010.
32. SANITA PV. et al. Microwave denture disinfection versus nystatin in treating patients with well-controlled type 2 diabetes and denture stomatitis: a randomized clinical trial. **Int J Prosthodont**, v. 25, n. 3, p. 232-244, may-jun. 2012.
33. SAWANT B, KHAN T. Recent advances in delivery of antifungal agents for therapeutic management of candidiasis. **Biomed Pharmacother**, v. 96, p. 1478-1490. 2017.
34. SEMIS R. et al. Nystatin-intralipid preparation: characterizationand in vitro activity against yeast sandmolds. **Mycopathologia**, v. 195, n. 5, p. 333-341, may. 2010.

35. SIVARAMAKRISHNAN G, SRIDHARAN K. Alternatives to antifungal therapy for denture stomatitis: A systematic review and meta-analysis. **S J Oral Sci**, v 4, n. 2, p. 67-71, Jul-Dec. 2017.
36. STEFANOVIC J. et al. Synthesis, Characterization, and Antifungal Activity of Nystatin—Gum Arabic Conjugates. **J. Appl. Polym Sci**, v. 127, p. 4736–4743. 2013.
37. SUMIDA K. et al. Effects of DMSO on gene expression in human and rat hepatocytes. **Hum Exp Toxicol**, v. 30, n. 10, p. 1701-1709, oct. 2011.
38. VRANA NE. et al. Cell encapsulation and cryostorage in PVA-gelatin cryogels: incorporation of carboxylated-poly-L-lysine as cryoprotectant. **J Tissue Eng Regen Med**, v. 6, n. 4, p. 280-290, apr. 2012.
39. VILOS C, VELASQUEZ LA. Therapeutic strategies based on polymeric microparticles. **J Biomed Biotechnol**, v. 16, p. 672-760, may. 2012.
40. WANG MO. et al. Evaluation of the in vitro cytotoxicity of cross-linked biomaterials. **Biomacromolecules**, v. 13;14, n. 5, p. 1321-1329, may. 2013.
41. WENBERG A. In vitro assessment of the biocompatibility of dental materials—the millipore filter method. **Int Endod J**, v. 21, n. 2, p. 67-71, mar. 1988.
42. ZAGER RA. Polyene Antibiotics: Relative Degrees of In Vitro Cytotoxicity and Potentia IEffects on Tubule Phospholipid and Ceramide Content. **Am J Kidney Dis**. V. 36, n. 2, p. 238-249, aug. 2000.
43. ZESSEL K. et al. Biocompatibility and antibacterial activity of photolytic products of sulfonamides. **Chemosphere**, v. 100, p. 167-174, apr. 2014.
44. ZHENG H, AUDUS KL. Cytotoxic effects of chlorhexidine and nystatin on cultured hamster buccal epithelial cells. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 101, p. 121-126. 1994.



## APÊNDICE A – VALORES DE PROLIFERAÇÃO CELULAR

Tabela 1. Valores originais de proliferação celular obtidos a partir de leitura de fluorescência na primeira ocasião, em 6 horas, para cada grupo avaliado.

REPETIÇÃO	1	2	3	4	5	6
<b>GN 10 – 50</b>	920,8	877,3	1051,9	-	-	-
<b>GN20 – 50</b>	965,1	708,9	1242,1	-	-	-
<b>EN10 – 50</b>	881,66	912,76	942,36	-	-	-
<b>EN20 – 50</b>	1062,64	702,54	1185,64	-	-	-
<b>EGN10 – 50</b>	971,42	959,42	1218,42	-	-	-
<b>EGN20 – 50</b>	804,01	689,11	857,51	-	-	-
<b>GN 10 – 80</b>	944,2	784,2	735	-	-	-
<b>GN20 – 80</b>	1081,31	690,51	578,31	-	-	-
<b>EN10 – 80</b>	892,2	736,3	626,6	-	-	-
<b>EN20 – 80</b>	841,68	928,48	709,38	-	-	-
<b>EGN10 – 80</b>	810,76	889,76	485,86	-	-	-
<b>EGN20 – 80</b>	1027,15	727,05	543,85	-	-	-
<b>G</b>	805,6	953,2	845,6	808,4	678,6	591,9
<b>E</b>	844,52	716,52	592,52	986,94	835,63	1448,94
<b>DMSO 1%</b>	885,77	1019,77	1148,77	802,84	825,14	826,04
<b>Controle</b>	1233,56	827,06	1316,56	797,9	922,7	1068,6

Tabela 2. Valores originais de proliferação celular obtidos a partir de leitura de fluorescência na primeira ocasião, em 12 horas, para cada grupo avaliado.

REPETIÇÃO	1	2	3	4	5	6
<b>GN 10 – 50</b>	503,3	360,5	391	-	-	-
<b>GN20 – 50</b>	536,87	238,77	594,57	-	-	-
<b>EN10 – 50</b>	460,49	444,09	369,99	-	-	-
<b>EN20 – 50</b>	580,21	244,01	563,51	-	-	-
<b>EGN10 – 50</b>	527,26	526,56	736,06	-	-	-
<b>EGN20 – 50</b>	452,66	266,86	442,86	-	-	-
<b>GN 10 – 80</b>	331,19	270,19	282,59	-	-	-
<b>GN20 – 80</b>	473,23	191,83	194,53	-	-	-
<b>EN10 – 80</b>	376,4	295,1	213,3	-	-	-
<b>EN20 – 80</b>	328,72	388,52	251,72	-	-	-
<b>EGN10 – 80</b>	317,32	418,62	146,32	-	-	-
<b>EGN20 – 80</b>	481,89	259,29	152,39	-	-	-
<b>G</b>	400,1	267,5	295,7	311,53	436,83	395,03
<b>E</b>	544,88	367,96	952,88	447,03	353,33	200,83
<b>DMSO 1%</b>	452,46	371,96	516,06	393,59	330,89	277,59
<b>Controle</b>	695,82	354,52	805,42	407,07	436,77	560,17

Tabela 3. Valores originais de proliferação celular obtidos a partir de leitura de fluorescência na primeira ocasião, em 24 horas, para cada grupo avaliado.

REPETIÇÃO	1	2	3	4	5	6
<b>GN 10 – 50</b>	1548,7	1447,7	1748,7	-	-	-
<b>GN20 – 50</b>	1621,8	1247,8	2052,8	-	-	-
<b>EN10 – 50</b>	1471,99	1519,99	1572,99	-	-	-
<b>EN20 – 50</b>	1688,6	1316,6	2014,6	-	-	-
<b>EGN10 – 50</b>	1629,28	1595,28	1956,28	-	-	-
<b>EGN20 – 50</b>	1322,88	1297,88	1375,88	-	-	-
<b>GN 10 – 80</b>	1614,7	1436,7	1232,7	-	-	-
<b>GN20 – 80</b>	1846,75	1479,75	1293,75	-	-	-
<b>EN10 – 80</b>	1527,29	1358,29	1229,29	-	-	-
<b>EN20 – 80</b>	1490,27	1643,27	1358,27	-	-	-
<b>EGN10 – 80</b>	1450,08	1735,08	1114,08	-	-	-
<b>EGN20 – 80</b>	1725,79	1453,79	1109,79	-	-	-
<b>G</b>	1404,58	1722,58	1358,58	1384,02	1252,02	1069,02
<b>E</b>	1445,76	1231,76	1136,76	1564,94	1568,94	2220,94
<b>DMSO 1%</b>	1494,67	1686,67	1876,67	1341,83	1452,83	1471,83
<b>Controle</b>	2011,64	1413,64	2147,64	1380,77	1503,77	1728,77

Tabela 4. Valores originais de proliferação celular obtidos a partir de leitura de fluorescência na segunda ocasião, em 6 horas, para cada grupo avaliado.

REPETIÇÃO	1	2	3	4	5	6
<b>GN 10 – 50</b>	600,74	321,84	252,64	-	-	-
<b>GN20 – 50</b>	502,82	284,92	226,82	-	-	-
<b>EN10 – 50</b>	604,66	377,06	298,46	-	-	-
<b>EN20 – 50</b>	591	387,4	327,9	-	-	-
<b>EGN10 – 50</b>	533,45	294,15	233,25	-	-	-
<b>EGN20 – 50</b>	380,71	320,51	194,51	-	-	-
<b>GN 10 – 80</b>	262,48	545,38	352,88	-	-	-
<b>GN20 – 80</b>	248,53	427,53	322,53	-	-	-
<b>EN10 – 80</b>	308,76	533,16	468,86	-	-	-
<b>EN20 – 80</b>	332,63	448,63	333,23	-	-	-
<b>EGN10 – 80</b>	468,95	503,05	447,85	-	-	-
<b>EGN20 – 80</b>	270,58	509,48	374,68	-	-	-
<b>G</b>	188,31	345,91	365,81	540,12	379,72	306,72
<b>E</b>	260,47	462,67	301,47	516,43	215,53	418,73
<b>DMSO 1%</b>	547,42	314,72	319,72	307,91	488,61	327,91
<b>Controle</b>	601,64	539,54	360,54	260,3	656,5	855,7