



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA



GUSTAVO AMORIM SOARES DA SILVA

**DESENVOLVIMENTO DE NANOPARTÍCULAS
PARA INCREMENTO DO SINAL DE
ESPECTROSCOPIA FTIR SALIVAR COMO
FLUIDO DIAGNÓSTICO**

UBERLÂNDIA

2017

GUSTAVO AMORIM SOARES DA SILVA

**DESENVOLVIMENTO DE NANOPARTÍCULAS
PARA INCREMENTO DO SINAL DE
ESPECTROSCOPIA FTIR SALIVAR COMO
FLUIDO DIAGNÓSTICO**

Trabalho de conclusão de curso
apresentado a Faculdade de
Odontologia da UFU, como requisito
parcial para obtenção do título de
Graduado em Odontologia

Orientador: Prof. Dr. Robinson Sabino
da Silva

Coorientadora: Emília Maria Gomes
Aguilar

UBERLÂNDIA

2017

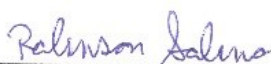


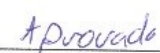
SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

ATA DA COMISSÃO JULGADORA DA DEFESA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DO (A) DISCENTE **Gustavo Amorim Soares da Silva** DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA.

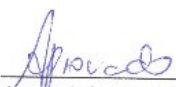
No dia **09 de novembro de 2017**, reuniu-se a Comissão Julgadora aprovada pelo Colegiado de Graduação da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia, para o julgamento do Trabalho de Conclusão de Curso apresentado pelo (a) aluno (a) **Gustavo Amorim Soares da Silva**, COM O TÍTULO: - **"DESENVOLVIMENTO DE NANOPARTÍCULAS PARA INCREMENTO DO SINAL DE ESPECTROSCOPIA FTIR SALIVAR COMO FLUIDO DIAGNÓSTICO"**. O julgamento do trabalho foi realizado em sessão pública compreendendo a exposição, seguida de arguição pelos examinadores. Encerrada a arguição, cada examinador, em sessão secreta, exarou o seu parecer. A Comissão Julgadora, após análise do Trabalho, verificou que o mesmo encontra-se em condições de ser incorporado ao banco de Trabalhos de Conclusão de Curso desta Faculdade. O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas da Graduação, legislação e regulamentação da UFU. Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos e lavrada a presente ata, que após lida e achada conforme, foi assinada pela Banca Examinadora.

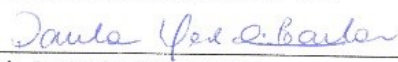
Uberlândia, 09 de novembro de 2017

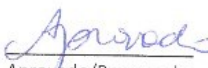

Prof. Dr. Robinson Sabino da Silva
Universidade Federal de Uberlândia – UFU

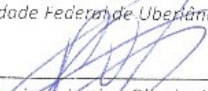

Aprovado/Reprovado

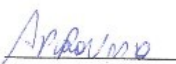

Profa. Dra. Marlete Ribeiro da Silva
Universidade Federal de Uberlândia – UFU


Aprovado/Reprovado


Profa. Dra. Paula Dechichi Barbar
Universidade Federal de Uberlândia – UFU


Aprovado/Reprovado


Pedro Henrique Justino Oliveira Limirio
Aluno(a) de doutorado – PPGO/UFU


Aprovado/Reprovado

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus por estar sempre presente, ter permitido esta oportunidade em minha vida e por ter me dado saúde e força de superação.

Aos meus pais Antônio e Ednaci e meu irmão Guilherme, pelo apoio, paciência e incentivo, sem eles nada disso seria possível.

Aos professores que contribuíram com o ensino e aprendizado nesta trajetória, permitindo um crescimento profissional e uma visão pessoal mais abrangente. Em especial ao meu orientador Robinson pela confiança, pela oportunidade e dedicação para desenvolver este trabalho.

Ao pessoal do grupo de pesquisa em Fisiologia Integrativa e Nanobiotecnologia Salivar, em especial Emília e Léia, por muitas vezes terem dedicado parte do tempo na orientação e desenvolvimento do trabalho.

Aos Professores Anielle Christine Almeida Silva e Noelio Oliveira Dantas, do Laboratório de Novos Materiais Isolantes e Semicondutores (LNMIS), Instituto de Física, pela contribuição imprescindível na síntese e caracterização das nanopartículas.

Aos meus amigos que sempre estiveram presentes nos momentos de alegrias, dificuldades e de conquistas.

A todos que diretamente e indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigado.

SUMÁRIO

Resumo	06
Introdução	07
Materiais e Métodos	12
Resultados	15
Discussão	18
Conclusão	21
Referências bibliográficas	22
Anexos	25

DESENVOLVIMENTO DE NANOPARTÍCULAS PARA INCREMENTO DO SINAL DE ESPECTROSCOPIA FTIR SALIVAR COMO FLUIDO DIAGNÓSTICO

DEVELOPMENT OF NANOPARTICLES FOR SURFACE-ENHANCED FTIR SPECTROSCOPY OF SALIVA AS DIAGNOSTIC FLUID

Gustavo Amorim Soares da Silva

Emília Maria Gomes Aguiar

Robinson Sabino da Silva

RESUMO

A utilização da saliva como fluido diagnóstico e de monitoramento de doenças na clínica médica e odontológica pode melhorar os índices de qualidade de vida da população com um diagnóstico mais precoce e um monitoramento de doenças crônicas mais frequentes. A espectroscopia de infravermelho de transformada de Fourier (ATR/FTIR) permite a identificação de compostos químicos de forma eficiente sem utilização de reagentes. No entanto, a intensificação de componentes mensurados no FTIR por nanopartículas pode aumentar o potencial diagnóstico da saliva. A hipótese do presente estudo é que nanopartículas de prata podem interagir com componentes específicos da saliva promovendo aumento da sua absorbância. O presente trabalho avaliou o efeito da nanopartícula Ag₂O (óxido de prata) em três concentrações (1mg/ml, 0,1mg/ml, 0,01mg/ml) no perfil da espectroscopia da saliva. A saliva de pacientes saudáveis de forma pura ou associada com Ag₂O (n=4) foi avaliada por meio de espectroscopia FTIR entre 4000-400cm⁻¹, usando um aparelho Vertex 70 (Bruker). A nanopartícula Ag₂O na concentração 0,01mg/ml aumentou (P < 0,05) o modo vibracional em 3067 cm⁻¹ que indica a presença de aminas primárias e secundárias frequentemente observadas em proteínas. A Ag₂O não promoveu (P > 0,05) aumento do sinal de FTIR nos outros componentes salivares. Desta maneira, constatou-se que a aplicação de Ag₂O na concentração 0,01mg/ml associado com a saliva pode ser utilizada em plataformas diagnósticas que o modo vibracional 3067 cm⁻¹ atua como biomarcador salivar.

Palavras-chave: Saliva, Nanopartículas, Biomarcadores, Diagnóstico.

ABSTRACT

The use of saliva as diagnostic fluid and disease monitoring in the medical and dental clinic can improve the quality of life indexes of the population with an earlier diagnosis and a monitoring of more frequent chronic diseases. The Fourier transform infrared spectroscopy (ATR/FTIR) allows the identification of chemical compounds efficiently without the use of reagents. However, the intensification of components measured in the FTIR by nanoparticles may increase the diagnostic potential of saliva. The hypothesis of the present study is that silver nanoparticles may interact with specific components of the saliva promoting the increase in absorbance. The present work evaluated the effect of the Ag₂O (silver oxide) nanoparticle in three concentrations (1mg/ml, 0,1mg/ml, 0,01mg/ml) in the profile of saliva spectroscopy. The Saliva of healthy patients in pure form or associated with Ag₂O (n=4) was evaluated by means of FTIR spectroscopy between 4000-400cm⁻¹ using a Vertex 70 (Bruker) apparatus. The Ag₂O nanoparticle at the concentration 0.01mg/ml increased (P <0.05) the vibrational mode at 3067cm⁻¹ indicating the presence of primary and secondary amines frequently observed in proteins. Ag₂O did not (P>0.05) increase the FTIR signal in the other salivary components. Thus, it was found that the application of Ag₂O at the concentration of 0.01mg / ml associated with saliva can be used in diagnostic platforms that the vibrational mode 3067 cm⁻¹ acts as salivary biomarker.

Keywords: Saliva, Spectroscopy, Nanoparticles, Biomarkers, Diagnosis.

INTRODUÇÃO

Secreção Salivar

A produção de saliva ocorre principalmente pela secreção proveniente das glândulas salivares parótida, submandibular e sublingual. Além disso, a saliva total é composta por secreções das glândulas salivares menores, fluidos do sulco gengival e outros componentes presentes na cavidade oral (KAUFMAN et al., 2002). A importância da saliva para a saúde oral é bem conhecida. Suas múltiplas funções ocorrem tanto por sua característica fluida quanto por seus componentes específicos como proteínas, íons e glicose (HUMPHREY & WILLIAMSON, 2001).

As glândulas salivares maiores são revestidas por uma cápsula de tecido conjuntivo e seus parênquimas são ricos em porções secretoras e ductos que se ramificam e se arranjam em lóbulos separados por septos de tecido conjuntivo. As células presentes na porção secretora são serosas ou mucosas e ainda contém células mioepiteliais não secretoras. Por seguinte, há um sistema ductal que modifica a saliva quando conduzida até a cavidade oral. Os ductos são continuidades das porções secretoras que por meio de uma união daqueles considerados curtos, irá originar os ductos estriados que se desembocam em ductos maiores e se tornam ductos excretores. São formados inicialmente por epitélio cuboide estratificado e nas porções distais por epitélio colunar estratificado. Cada uma das glândulas maiores possuem seu ducto principal com desembocadura na cavidade oral e está revestido por epitélio pavimentoso estratificado não queratinizado (KRISHNAN et al., 2017).

A saliva secretada na cavidade oral é regulada pelo sistema nervoso simpático e sistema parassimpático. O sistema simpático estimula principalmente a secreção de proteínas provenientes de células acinosas, enquanto a secreção por meio da inervação parassimpática promove uma secreção mais aquosa (HUMPHREY & WILLIAMSON, 2001). Conforme demonstrado na (Figura 1), o estímulo da inervação parassimpática para as glândulas salivares ocorre por meio da acetilcolina (ACh). Na membrana basolateral das células acinosas estão presentes receptores muscarínicos tipo 1 (M1) e tipo 3 (M3), que após interação com o neurotransmissor ACh, promovem mudança conformacional por meio dessa interação molecular. Essa mudança de conformação do receptor promove ativação de proteínas Gs presentes no citoplasma das células. Após sua ativação ocorre a liberação da sua subunidade α que promove estimulação da

fosfolipase C. Esta atua sobre o fosfatidilinositol (PIP2 – fosfatidilinositol-4,5-bifosfato) e aumenta formação de inositol trifosfato (IP3) (SHITARA et al, 2007). O IP3 se dissocia no citoplasma da célula em direção ao retículo endoplasmático e promove liberação de íons cálcio no meio intracelular. O aumento desta molécula ativa a abertura de canais presentes na membrana basolateral e luminal e também a inserção de canais Aquaporina 5 (AQP5) para a passagem de água pela via transcelular (HUMPHREY & WILLIAMSON, 2001; TURNER & SUGIYA, 2002).

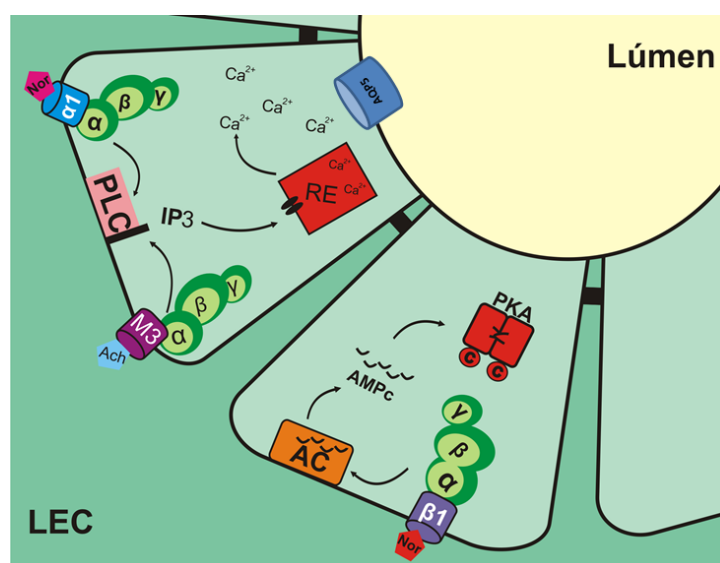


Figura 1. Descrição de vias simpáticas e parassimpáticas que promovem a secreção de saliva em uma célula acinosa. Autor: (SABINO-SILVA, 2015).

Atualmente, sabe-se que a cavidade oral é capaz de fornecer material genético devido às células presentes neste local. O DNA coletado através da saliva, permite análises para obtenção das relações entre as células e avaliar a saúde individual de pacientes que possam estar desenvolvendo alguma enfermidade. Na oncologia, através do plasma sanguíneo é possível a detecção de DNA de células tumorais. O diagnóstico salivar por sua vez, permite uma visão semelhante e de alta eficiência, preservando pacientes que já estão passando por procedimentos acentuadamente invasivos. (WONG, 2015)

Além das moléculas que podem ser detectadas na saliva (DNA, RNA e proteínas), ela possui outros componentes específicos que trazem recursos para a triagem e detecção de doenças orais e sistêmicas. Pesquisadores demonstraram que tais componentes são importantes para distinguir doenças bucais (câncer bucal e síndrome

de Sjögren) e doenças sistêmicas (câncer de pulmão, câncer de mama, câncer de pâncreas e câncer de ovário) (MARON, 2017)

A utilização da saliva como fluido diagnóstico e de monitoramento de doenças na clínica médica e odontológica pode melhorar os índices de qualidade de vida da população com um diagnóstico mais precoce e um monitoramento de doenças crônicas mais frequentes (BAKER et al., 2014).

Sabe-se que hoje, o vírus HIV-1 é secretado junto à saliva pelas glândulas salivares e é capaz de ser medida a sua carga viral como um ensaio não invasivo, visto que ela está correlacionada à carga viral plasmática (IKENO et al., 2017).

Um diagnóstico por coleta de saliva além de evitar riscos de contaminação ao operador, é de fácil armazenamento, envio e coleta, não causa tanto incomodo ao paciente, não sofre coagulação como o material sanguíneo e reflete as condições fisiológicas do indivíduo (BOSSOLA et al., 2012). O uso da saliva como biofluido não necessita de pessoal médico, permitindo até mesmo a coleta domiciliar, sendo adequado para o uso em pesquisas epidemiológicas (KAUFMAN et al., 2002). As análises salivares reduzem também a ansiedade dos pacientes em comparação ao sangue devido à ausência de dor e utilização de agulhas. Desta forma, a coleta das amostras salivares é considerada mais confortável, evita o risco de lesão cutânea e o contágio de doenças infecciosas (KACZOR-URBANOWICZ et al., 2017; LEE; WONG, 2009).

Considerando que a presença de biomarcadores salivares costuma ter concentrações reduzidas na saliva em comparação ao sangue, durante muito tempo uma desvantagem do diagnóstico por saliva estava relacionada à falta de tecnologia economicamente adequada. Com o avanço das tecnologias de biologia molecular, as análises de biomarcadores em baixas concentrações se tornaram viáveis comercialmente em grande escala (GIANNOBILE et al., 2011) associados a características de coleta fácil e não invasiva. Atualmente, sabe-se que a saliva possui biomarcadores específicos de diversas doenças e que podem ser detectados pelas tecnologias existentes. (SEGAL; WONG, 2008)

A saliva humana vem sendo constantemente utilizada para o desenvolvimento de biomarcadores, permitindo assim a detecção não invasiva de doenças (MARON, 2017). Na Odontologia, a utilização deles tem contribuindo na avaliação do estado periodontal atual para acompanhar as respostas do tratamento e prever a progressão da doença (KAUFMAN; LAMSTER, 2000). O diagnóstico salivar também pode contribuir na avaliação do risco de cárie por meio da abordagem microbiana, proteômica, genômica e

transcriptômica. A avaliação do pH, fluxo salivar e a capacidade tampão do paciente também se relacionam ao risco de cárie (GUO; SHI, 2013). Na área da Ortodontia, a análise salivar pode indicar risco de reabsorções radiculares durante o período em que o paciente está em tratamento. A composição salivar também pode orientar decisões clínicas que minimizam os riscos e a gravidade de causar este tipo de alterações ortodônticas. (KACZOR-URBANOWICZ et al., 2017).

Espectroscopia de Infravermelho com Transformada em Fourier (FTIR)

As técnicas de espectroscopia FTIR, que não utilizam reagentes onerosos, são consideradas plataformas fundamentais para diagnósticos “point of care” rápidos, precisos e de baixo custo (BAKER et al., 2014). Considerando que a espectroscopia no infravermelho é uma das mais importantes técnicas analíticas de amostras biológicas disponíveis atualmente, será avaliada a composição da saliva pelo espectrômetro de infravermelho com transformada de *Fourier* (FTIR, Vertex 70, Bruker Optik) em regiões com espectro eletromagnético entre 4000 cm^{-1} e 400 cm^{-1} . Esta técnica permite identificar com grande acurácia as terminações C-H, O-H e N-H de proteínas, a composição lipídica, de carboidratos, ácidos nucleicos e compostos glicídicos por meio de FTIR com alta taxa de precisão e sem utilizar reagentes (BAKER et al., 2014, KHAUSTOVA et al., 2010).

A espectroscopia FTIR permite a construção de imagens realizadas a partir de espectros de impressões digitais por meio da passagem de dados espectrais, podendo refletir um estado de saúde subjacente da amostra em análise (BAKER et al., 2014).

A espectroscopia de infravermelho de transformada de Fourier (FTIR) é uma técnica bem estabelecida que tem sido ferramenta inestimável para químicos há mais de 15 anos. Na molécula, ocorre em seu modo de vibração uma mudança do momento de dipolo elétrico após absorção de luz. A absorção da luz infravermelha devido à excitação do nível de energia vibracional para um nível de energia mais elevado fornece informações sobre a estrutura molecular e as interações moleculares. (MUDUNKOTUWA et al., 2014).

Nanopartículas

A palavra nanopartícula é derivada do grego com o prefixo “nano” significando milhão. Um nanômetro (1 nm) corresponde à bilionésima parte do metro ($1.0 \times 10^{-9}\text{ m}$). Átomos são menores que 1 nm e algumas moléculas (proteínas possuem dimensão

aproximada de 1 nm). As nanopartículas de prata tiveram suas primeiras aplicações na técnica de Espectroscopia Raman, onde aumentavam o sinal originado de moléculas orgânicas (LEE; MEISEL, 1982). São também aplicadas no combate a infecções bacterianas, fungicas e virais (CLEMENT; JARRETT, 1994), amplificadoras de fluorescência (GEDDES; LAKOWICZ, 2002), auxiliares em técnicas de diagnóstico e no tratamento de cânceres por meio de terapia fototérmica e fotodinâmica (HIRSCH et al., 2003).

No processo de síntese é de suma importância o controle de tamanho e volume das nanopartículas de prata, pois, tanto a aplicação quanto suas propriedades estão relacionadas a esses parâmetros (HENGLEIN, 1989). Algumas nanopartículas apresentam alta capacidade de amplificação de sinais de fluorescência com baixo custo de processamento (TATON et al., 2000).

A Nanobiotecnologia originou da combinação de duas áreas, a nanotecnologia e biologia. Uma fornece ferramentas e meios tecnológicos para investigar e transformar sistemas biológicos, enquanto a outra fornece modelos e componentes biológicos (ROCO, 2003). Estudos têm indicado potencial da confecção de sensores biológicos associados à nanopartículas de metais nobres para monitoramento dos níveis de glicose na saliva, sangue e urina em pacientes diabéticos. Estes componentes tem uma capacidade de agregação por meio das interações biológicas específicas e dissociação de agregados devido à competição com a glicose (ASLAN et al., 2004).

As nanopartículas (NPs) são componentes utilizados como sensores mas ainda não está claro sua interação com os componentes da saliva total não estimulada (TEUBL et al., 2017). Sabe-se que quando conjugadas, a intensidade de sua fluorescência é reduzida dependendo da conjugação. Desta forma, as NPs isoladas ou funcionalizadas com grupamentos externos a sua superfície permite uma conjugação com moléculas biológicas (WU et al., 2003).

A intensificação de componentes mensurados no FTIR por nanopartículas pode aumentar o potencial diagnóstico da saliva. Nossa hipótese é que diferentes nanopartículas podem interagir com componentes específicos da saliva promovendo aumento de seus modos vibracionais.

Objetivos

O presente trabalho buscou avaliar o efeito da nanopartícula Ag_2O nas concentrações de 1mg/ml, 0,1mg/ml e 0,01mg/ml no perfil da espectroscopia da saliva.

MATERIAIS E MÉTODOS

O protocolo experimental foi aprovado pelo CEP - Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), sob o protocolo de número CAAE 55582016.0.0000.5152.

Síntese e caracterização das nanopartículas

Os nanocristais de Ag_2O foram sintetizados com base na metodologia de Dantas et al. (2008). Os difratogramas de raios-X (DRX) foram registrados com um DRX-6000 (SHIMADZU), usando radiação monocromática Cu-K1 ($\lambda = 1,54056 \text{ \AA}$), para confirmar a formação dos nanocristais de Ag_2O , bem como a estrutura cristalina e tamanho médio. O tamanho médio dos nanocristais foi obtido utilizando a equação de Debye – Scherrer (YOSHIO; EIICHIRO, 2011).

Coleta de saliva não-estimulada

A coleta da saliva de 4 indivíduos saudáveis sem descrição de doenças sistêmicas e que não tomam medicamentos foi realizada em pacientes confortavelmente sentados no período matutino, entre 8:00 e 10:00 horas, evitando alterações de ritmo circadiano. Para a coleta de amostra os indivíduos permaneceram pelo menos 2 horas sem refeição e 1 hora após a higiene oral. Para a coleta de saliva não estimulada, o indivíduo foi orientado a não realizar deglutições e não mastigar por 7 minutos. Deste modo, a saliva acumulada no assoalho da boca pode ser gotejada em um tubo de polipropileno apropriado. As amostras foram armazenadas em freezer $-70 \text{ }^\circ\text{C}$ até o momento do processamento (SABINO-SILVA et al., 2013).

Associação da saliva com as nanopartículas

A saliva foi avaliada de forma pura ou associada com Ag_2O em três diferentes concentrações (1mg/ml, 0,1mg/ml, 0,01mg/ml). Para a associação da nanopartícula de prata, 2mg de Ag_2O foram diluídos em 2 ml de saliva de cada paciente, obtendo-se uma concentração de 1mg/ml. Posteriormente, separou-se 10 μl de saliva contendo nanopartículas de prata na concentração de 1mg/ml e associou a 90 μl de saliva pura, obtendo-se uma concentração de 0,1mg/ml. Em seguida, 10 μl de saliva associada com nanopartícula de prata na concentração de 0,1mg/ml foi diluída em 90 μl de saliva para obtenção da concentração 0,01mg/ml.

Aquisição dos Espectros FTIR

Os espectros foram obtidos por meio da Espectroscopia Infravermelha com Transformada de Fourier com Reflectância Total Atenuada (ATR/ FTIR Vertex 70; Bruker, Ettlingen, Germany) em uma faixa espectral de 4000 a 400 cm^{-1} . Dois microlitros das amostras foram inseridos diretamente no cristal e após protocolo de secagem (jato de ar por 3 minutos), foi realizada a aquisição dos espectros em temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ e umidade controlada. A aquisição dos espectros foi realizada por meio de 32 escaneamentos com uma resolução de 4 cm^{-1} . Os espectros de referência (background) foram adquiridos de cada amostra para garantir a qualidade do espectro em relação a variação de CO_2 , vapores de água presentes na análise e possíveis variações na linha de base.

Análise dos Dados FTIR

Os dados foram normalizados pelo método do vetor, tiveram as suas linhas de base corrigidas e posteriormente realizou-se a análise da área das bandas obtidas no espectro por meio do programa Opus 6.5 (Bruker, Ettlingen, Germany). Após a análise, os dados foram salvos em formato txt e os gráficos foram plotados no programa Origin Pro 9.0.

Análises Estatísticas

Os resultados foram expressos como média $\pm$ EPM. Para testar a normalidade dos dados foi utilizado o teste de Shapiro-Wilk. Para amostras paramétricas foram realizadas comparações por meio de análise de variância (ANOVA) de uma via para dados independentes, utilizando-se o pós-teste Student-Newman-Keuls ou teste T não pareado. Para amostras não-paramétricas foi utilizado o teste de Mann-Whitney. Essas análises foram realizadas com o auxílio do programa computacional GraphPad Prism®, v. 3,02 (GraphPad, USA). Com nível de significância estabelecido de 5% (valor descritivo de $P < 0,05$).

Foi confeccionada uma tabela caracterizando cada componente e seu modo vibracional correspondente, além do pico e frequência da banda após a obtenção dos espectros pela técnica FTIR (Tabela 1).

Tabela 1. Frequência da banda, pico da banda, identificação de componentes e modo vibracional da saliva por FTIR.

Banda Frequência (cm⁻¹)	Pico Frequência (cm⁻¹)	Identificação dos Componentes	Modo Vibracional
3683-3118	3284	Amida A	Vibrações simétricas N-H
3118-3012	3067	NH e NH ₂	Aminas Primárias e secundárias
2092-2012	2067	Anéis de Tiocianato	Vibrações C-N
1730-1589	1636	C=O	Amida I
1588-1485	1541	C-N-H	Amida II
1482-1433	1453	Proteínas	Dobramento assimétrico CH ₃
1433-1369	1401	Proteínas	C=O
1297-1213	1240	Amida III/Fosfolipídios	PO ²⁻ Assimétrico
1196-1002	1079	Açúcares	Proteínas glicosiladas

A tabela foi baseada em (Moshaverinia *et al.*, 2008; Khaustova *et al.*, 2010; Mitchell *et al.*, 2014; Caetano Júnior *et al.*, 2015; Orphanou *et al.*, 2015).

RESULTADOS

No difratograma de Raios-X (DRX) da amostra sintetizada observou-se os picos de difração de Bragg característicos de Ag_2O (JCPDS: 76-1393), confirmando a formação de Ag_2O com estrutura cúbica (Figura 2). Esse resultado confirma o crescimento de nanocristais de Ag_2O de tamanho médio em torno de 58 nm. O inset da Figura 2 também mostra a estrutura cristalina do Ag_2O , onde os átomos em azul esverdeado correspondem aos de prata (Ag) e o azul escuro oxigênio (O).

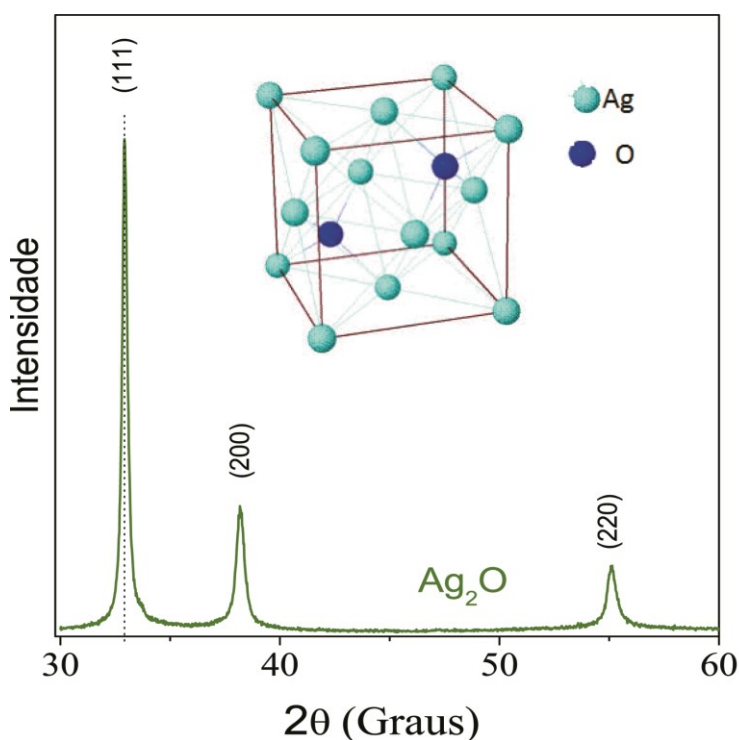


Figura 2. Difratograma de DRX dos nanocristais de Ag_2O a temperatura ambiente.

O espectro infravermelho da saliva é uma superposição de vários compostos e a intensidade das bandas de absorção neste espectro de FTIR é diretamente proporcional à concentração de cada componente específico. Os espectros FTIR da saliva pura e de sua associação com nanopartícula de prata Ag_2O em três diferentes concentrações (1mg/ml, 0,1mg/ml, 0,01mg/ml) estão representados na (Figura 3).

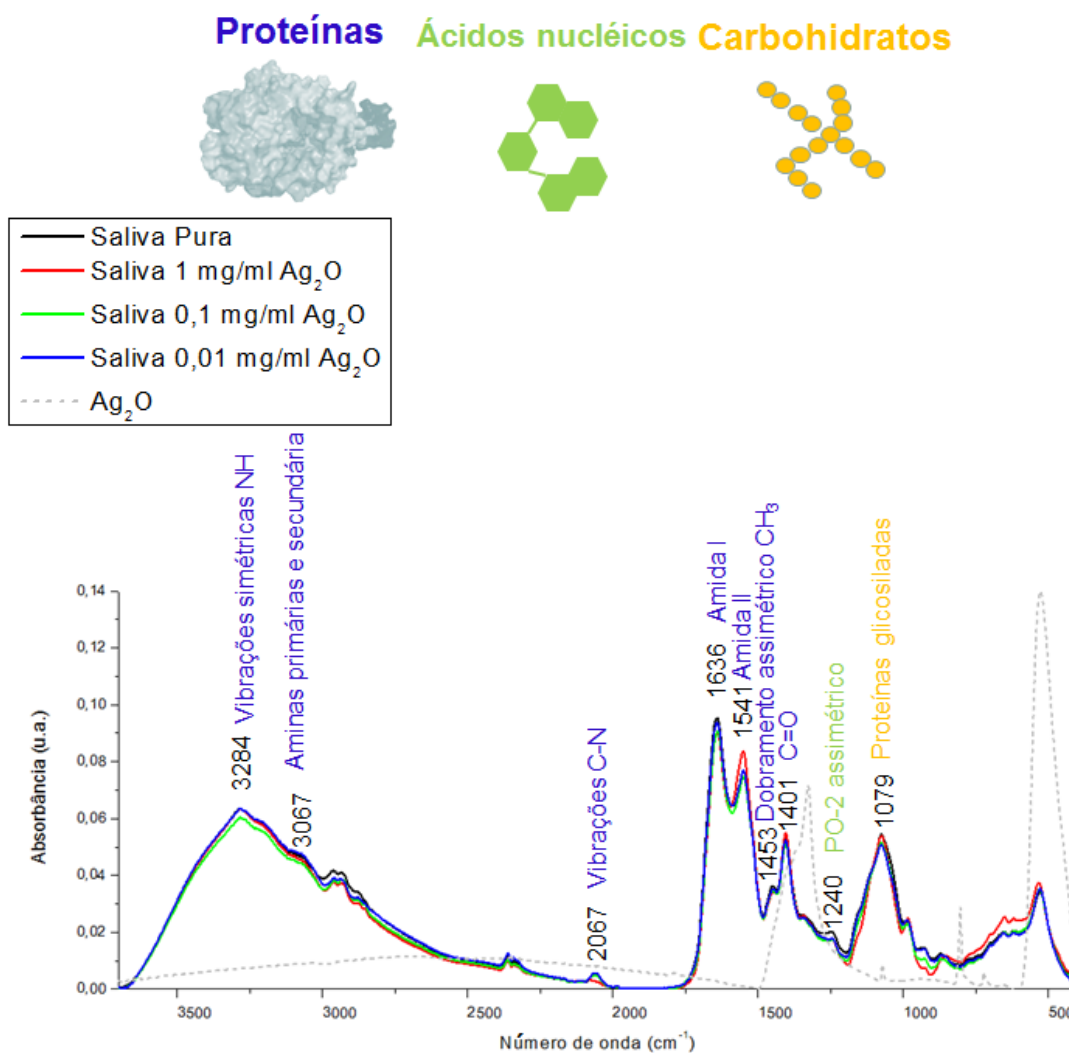


Figura 3: Espectro de infravermelho com transformada de Fourier (ATR/FTIR) da saliva pura e da sua associação com nanopartícula de prata Ag_2O em três diferentes concentrações (1mg/ml, 0,1mg/ml, 0,01mg/ml). O espectro da saliva pura está representado na cor preta e suas respectivas associações nas concentrações 1mg/ml, 0,1mg/ml, 0,01mg/ml nas cores vermelha, verde e azul. A identificação dos componentes derivados de proteínas está descrita em azul, componentes derivados de ácidos nucleicos em verde e componentes derivados de carboidratos em laranja.

Em seguida, será apresentado os gráficos demonstrativos das análises da saliva associada, ou não, com diferentes concentrações de nanopartícula de prata para os componentes: vibrações simétricas N-H, Aminas primárias e secundárias, Vibrações C-N, Amida I, Amida II, CH_3 , C=O, PO_2^- assimétrico e proteínas glicosiladas (Figura 4 A-D).

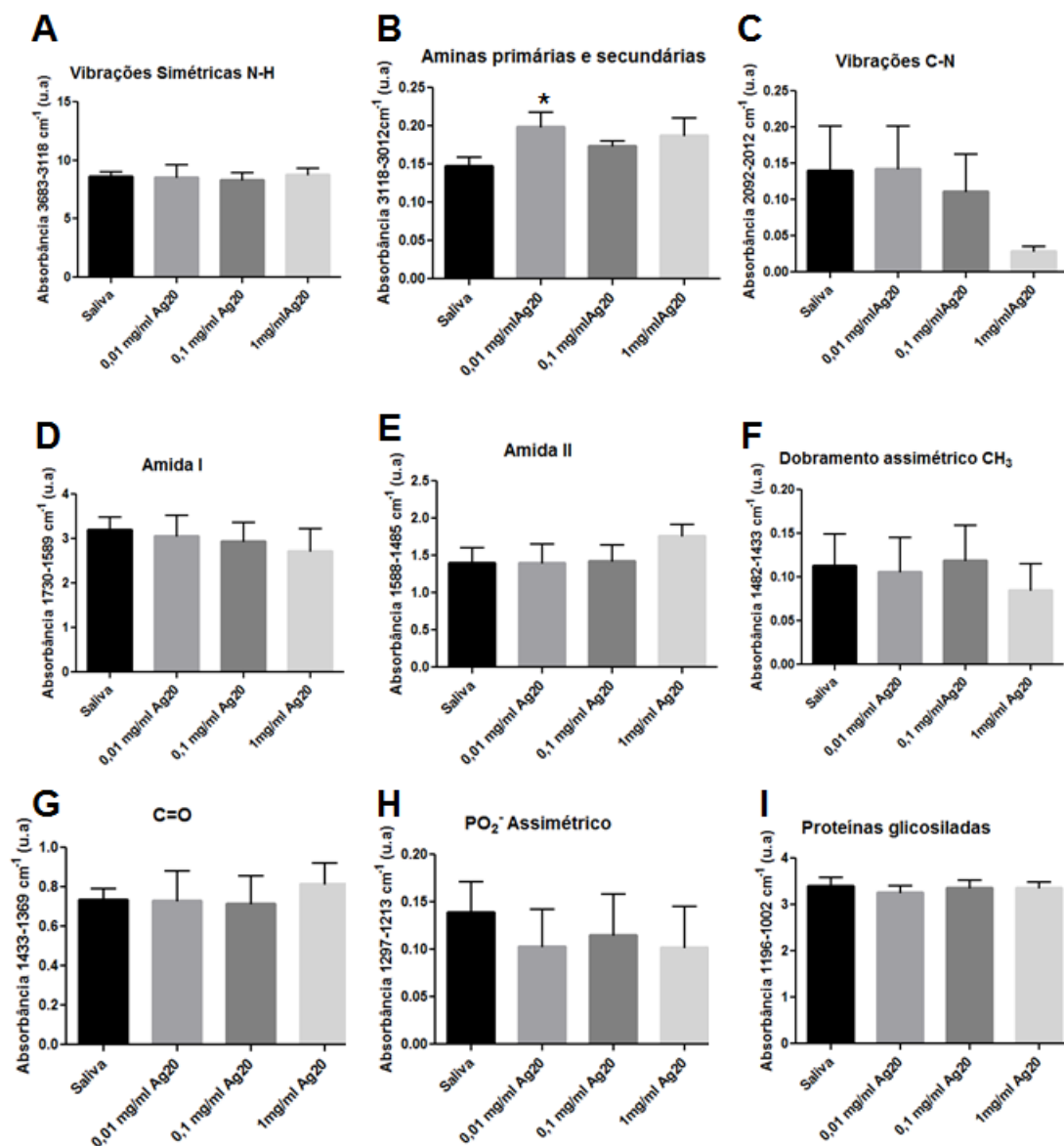


Figura 4. Quantificação dos componentes salivares da saliva pura e da saliva associada com nanopartícula de prata Ag_2O em concentrações (1mg/ml, 0,1mg/ml, 0,01mg/ml): vibrações simétricas N-H (A), Aminas primárias e secundárias (B), Vibrações C-N (C), Amida I (D), Amida II (E), CH_3 (F), C=O (G), PO_2^- assimétrico (H) e proteínas glicosiladas (I). * $P < 0,05$ vs. Saliva.

Os componentes vibrações simétricas N-H, Vibrações C-N, Amida I, Amida II, CH_3 , C=O, PO_2^- assimétrico e proteínas glicosiladas não tiveram alterações ($P > 0,05$) entre a saliva pura e a saliva associada com nanopartícula de prata Ag_2O em três diferentes concentrações (1mg/ml, 0,1mg/ml, 0,01mg/ml). No entanto, a saliva associada com nanopartícula de prata Ag_2O na concentração 0,01mg/ml promoveu aumento de absorbância (34%, $p < 0,05$) do componente aminas primárias e secundárias. As concentrações 1mg/ml e 0,1mg/ml da nanopartícula de prata Ag_2O não promoveram alterações significativas neste componente salivar.

DISCUSSÃO

O presente trabalho, em busca do aperfeiçoamento de novos métodos de diagnóstico pela saliva, avaliou a capacidade de uma nanopartícula (Ag_2O) promover o aumento da absorbância de moléculas específicas em saliva de pacientes saudáveis por meio da espectroscopia de transformada de Fourier (FTIR). É importante enfatizar que, atualmente, as análises de biologia molecular permitem mensurações de componentes em concentrações muito reduzidas (GIANNOBILE et al., 2011). Até o momento, são escassos os trabalhos que buscam aperfeiçoar as análises salivares por meio de espectroscopia, especialmente no FTIR.

Pela espectroscopia salivar, detectamos uma série de componentes dentro da frequência entre $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$. A identificação dos componentes para N-H, Aminas primárias e secundárias, Vibrações C-N, Amida I, Amida II, CH_3 , C=O, PO_2^- assimétrico e Proteínas glicosiladas apresentados neste estudo, estão correlacionadas a outros trabalhos já existentes onde os picos identificam os componentes em cada frequência da banda (KHAUSTOVA et al., 2010).

O padrão do espectro obtido por meio da saliva neste trabalho condiz com a lei de Bouguer-Lambert-Beer, onde a intensidade das bandas de absorção no espectro de FTIR é diretamente proporcional à concentração de cada componente específico. O padrão espectral apresentado já foi relatado também, por outros autores que analisaram a saliva por meio desta técnica (KHAUSTOVA et al., 2010; MIKKONEN et al., 2016; MOSHAVERINIA et al., 2008; MITCHELL et al., 2014; CAETANO JÚNIOR et al., 2015; ORPHANOU et al., 2015). Nestes trabalhos percebe-se uma variabilidade da concentração de cada componente salivar. No presente trabalho e em Khaustova e colaboradores (2010) ocorreu um aumento do modo vibracional 1401 cm^{-1} (C=O) em comparação ao 1453 cm^{-1} (Dobramento assimétrico CH_3). No entanto, no trabalho de Caetano Júnior e colaboradores (2015) esta relação foi inversa. Acreditamos que estas modificações ocorram pelas diferenças de processamento entre as amostras. Nos três trabalhos supracitados a absorbância dos modos vibracionais (amida I) 1636 cm^{-1} foi maior do que (amida II) 1541 cm^{-1} .

Conforme esperado, acreditamos que as nanopartículas Ag_2O apresentaram interações com as moléculas presentes na saliva, igualmente relatado em outros estudos (WU et al., 2003). Isto pode ser demonstrado de forma mais evidente pelo aumento do modo vibracional 3067 cm^{-1} , que corresponde a aminas primárias e secundárias, após a

inserção da nanopartícula Ag_2O na concentração de 0,01mg/ml. Por meio desta análise de FTIR, não fomos capazes de dizer realmente como essa interação acontece. Ou seja, não temos como identificar a parte das nanopartículas de Ag_2O que interagem com as aminas primárias e secundárias. Além disto, outros ensaios serão necessários para avaliar o efeito desta nanopartícula em concentrações ainda mais reduzidas. Apesar do presente trabalho ter identificado aumento do modo vibracional 3067 cm^{-1} somente na concentração de 0,01mg/ml, acreditamos que esta interação possa ocorrer nas outras concentrações apesar da ausência de aumento significativo do sinal de FTIR.

Apesar do presente trabalho ter identificado aumento da intensidade do sinal do FTIR somente em um modo vibracional (3067 cm^{-1}), acreditamos que possam existir outros locais de interação desta nanopartícula que não promovem aumento de determinados modos vibracionais. Considerando o aumento médio do modo vibracional de amida II (1541 cm^{-1}), acreditamos que ensaios com maior número de amostras ou com variações da concentração da nanopartícula Ag_2O poderão futuramente trazer resultados promissores para aumentar a intensidade deste importante modo vibracional que apresenta potencial de biomarcador para diversas doenças sistêmicas.

Não identificamos outros trabalhos na literatura que associaram a nanopartícula Ag_2O à saliva com o intuito de identificar o aumento do modo vibracional de candidatos à biomarcadores. Além disso, os resultados descritos pelo presente trabalho não corroboram a hipótese do potencial aumento da intensidade de absorbância para os componentes de Vibrações simétricas N-H, Vibrações C-N, Amida I, Amida II, CH_3 , C=O, PO^{2-} assimétrico e Proteínas glicosiladas após a associação da nanopartícula de prata nas concentrações salivares de 1mg/ml, 0,1mg/ml, 0,01mg/ml. Contudo, detectamos que a saliva associada à Ag_2O , teve um aumento de (34%, $p < 0,05$) no modo vibracional 3067 cm^{-1} do componente aminas primárias e secundárias na concentração 0,01mg/ml mesmo não tendo um aumento similar nas concentrações de 1mg/ml e 0,1mg/ml.

O presente estudo reforça a importância do uso da saliva como biofluido para o diagnóstico, visto que é um método de fácil coleta, armazenamento, diminui a ansiedade por parte dos pacientes, não é um método invasivo e apresenta capacidade de mensurar componentes específicos que refletem as condições fisiológicas do indivíduo (BOSSOLA et al., 2012; KAUFMAN et al., 2002; KACZOR-URBANOWICZ et al., 2017; LEE; WONG, 2009; MARON, 2017). Acreditamos que o presente trabalho poderá ter aplicação biotecnológica para construção de plataformas diagnósticas por

meio da saliva quando o modo vibracional 3067 cm^{-1} for importante para o diagnóstico de doenças orais ou sistêmicas. Este trabalho também abre perspectivas para análises do efeito da nanopartícula Ag_2O para aumento da intensidade de sinal em outros fluídos ou tecidos que expressam o modo vibracional 3067 cm^{-1} na análise de FTIR.

CONCLUSÃO

Em conjunto, nossos resultados constataram que a aplicação de Ag_2O na concentração 0,01mg/ml associado com a saliva pode promover aumento da intensidade do sinal do modo vibracional 3067 cm^{-1} presente neste fluido, o que aumenta o potencial desta nanopartícula para uso em plataformas diagnósticas pela saliva.

REFERÊNCIAS

- ASLAN, K. et al. Saccharide sensing using gold and silver nanoparticles--a review. **Journal of fluorescence**, v. 14, n. 4, p. 391–400, 2004.
- BAKER M. J. et al. Using Fourier transform IR spectroscopy to analyze biological materials. **Nat Protoc.**, v. 9, p. 1771–1791, Jul 2014.
- BOSSOLA M.; TAZZA L. Xerostomia in patients on chronic hemodialysis. **Nat Rev Nephrol**, v. 8, n. 3, p. 176-82, Jan 2012.
- CAETANO JÚNIOR, P. C.; STRIXINO, J. F.; RANIERO, L. Analysis of saliva by Fourier transform infrared spectroscopy for diagnosis of physiological stress in athletes. **Research on Biomedical Engineering**, v. 31, p. 116-124, 2015.
- CLEMENT, J. L.; JARRETT, P. S. Antibacterial Silver. **Metal-Based Drugs**, v. 1, n. 5–6, p. 467–482, 1994.
- DANTAS N. O. et al. “Raman investigation of ZnO and Zn_{1-x}Mn_xO nanocrystals synthesized by precipitation method,” **J. Non. Cryst. Solids**, vol. 354, no. 42–44, pp. 4827–4829, Nov. 2008.
- GEDDES, C. D.; LAKOWICZ, J. R. Metal-enhanced fluorescence. **J. Fluoresc.**, v. 12, n. 2, p. 121–129, 2002.
- GIANNOBILE, W. V. et al. Translational and clinical applications of salivary diagnostics. **Advances in dental research**, v. 23, n. 4, p. 375–380, 2011.
- GUO, L.; SHI, W. Salivary biomarkers for caries risk assessment. **Journal of the California Dental Association**, v. 41, n. 2, p. 107–9, 112–8, 2013.
- HENGLEIN, A. Small-Particle Research: Physicochemical Properties of Extremely Small Colloidal Metal and Semiconductor Particles. **Chemical Reviews**, v. 89, n. 8, p. 1861–1873, 1989.
- HIRSCH, L. R. et al. Nanoshell-mediated near-infrared thermal therapy of tumors under magnetic resonance guidance. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 23, p. 13549–13554, 2003.
- HUMPHREY S.P.; WILLIAMSON R.T. A review of saliva: normal composition, flow, and function. **J Prosthet Dent**, V. 85, n. 2, p.162-9, Feb 2001.
- IKENO, R. et al. Factors contributing to salivary human immunodeficiency virus type-1 levels measured by a Poisson distribution-based PCR method. **Journal of International Medical Research**, p. 30006051772865, Nov 2017.
- KACZOR-URBANOWICZ, K. E. et al. Saliva diagnostics – Current views and directions. **Experimental Biology and Medicine**, v. 242, n. 5, p. 459–472, 2017.
- KAUFMAN, E.; LAMSTER, I. B. Analysis of saliva for periodontal diagnosis. A review. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 27, n. 7, p. 453–465, 2000.

KAUFMAN K.; LAMSTER I. B. The diagnostic applications of saliva: a review. **Crit Rev Oral Biol Med**, v. 12, n. 2, p. 197-212, 2002.

KHAUSTOVA, S. et al. Noninvasive biochemical monitoring of physiological stress by Fourier transform infrared saliva spectroscopy. **Analyst**, v. 135, n. 12, p. 3183-92, Dec 2010.

KRISHNAN, M. et al. Acute Radiation-Induced Changes in Sprague-Dawley Rat Submandibular Glands : A Histomorphometric Analysis. **World J Oncology**, v. 8, n. 2, p. 45–52, 2017.

LEE, P. C.; MEISEL, D. Adsorption and surface-enhanced Raman of dyes on silver and gold sols. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 86, n. 17, p. 3391–3395, 1982.

LEE, Y. H.; WONG, D. T. Saliva: An emerging biofluid for early detection of diseases. **American Journal of Dentistry**, v. 22, n. 4, p. 241–248, 2009.

MARON, J. L. Salivary Diagnostics in Pediatrics : Applicability, Translatability, and Limitations. **Front Public Health**, v. 5, n. April, p. 1–8, 2017.

MIKKONEN J.J. et al. Fourier Transform Infrared Spectroscopy and Photoacoustic Spectroscopy for Saliva Analysis. **Applied Spectroscopy**, v. 70, n. 9, p. 1502-10, Sep 2016.

MITCHELL, A. L. et al. Vibrational spectroscopy of biofluids for disease screening or diagnosis: translation from the laboratory to a clinical setting. **J Biophotonics**, v. 7, n. 3-4, p. 153-65, Apr 2014.

MOSHAVERINIA, A. et al. Modification of conventional glass-ionomer cements with N-vinylpyrrolidone containing polyacids, nano-hydroxy and fluoroapatite to improve mechanical properties. **Dent Mater**, v. 24, n. 10, p. 1381-90, Oct 2008.

MUDUNKOTUWA, I. A.; MINSHID, A. AL; GRASSIAN, V. H. ATR-FTIR spectroscopy as a tool to probe surface adsorption on nanoparticles at the liquid–solid interface in environmentally and biologically relevant media. **The Analyst**, v. 139, n. 5, p. 870–881, 2014.

ORPHANOU, C. M. et al. The detection and discrimination of human body fluids using ATR FT-IR spectroscopy. **Forensic Sci Int**, v. 252, p. e10-6, Jul 2015. ISSN 0379-0738.

ROCO, M. C. Nanotechnology : convergence with modern biology and medicine. **Current opinion in biotechnology**, v. 14, p. 337–346, 2003.

SABINO-SILVA R. et al. Increased SGLT1 expression in salivary gland ductal cells correlates with hyposalivation in diabetic and hypertensive rats. **Diabetol Metab Syndr.**, v. 24; 5, n. 1, p. 64, Oct 2013.

SEGAL, A.; WONG, D. T. Salivary diagnostics: Enhancing disease detection and making medicine better. **European Journal of Dental Education**, v. 12, n. SUPPL. 1, p. 22–29, 2008.

SHITARA A. et al. Multi-photon microscopic imaging of rat parotid ducts demonstrates cellular heterogeneity in Ca²⁺ responsiveness. **Arch Oral Biol.**, v. 52, n 11. p. 1072-8, Nov 2007

STUART, D. A. et al. Biological applications of localised surface plasmonic phenomena. **IEE Proc.-Nanobiotechnol**, v. 152, p. 13. 2005.

TATON, T. A.; MIRKIN, C. A.; LETSINGER, R. L. Scanometric DNA array detection with nanoparticle probes. **Science**, v. 289, n. 5485, p. 1757–1760, 2000.

TEUBL, B. J. et al. The effect of saliva on the fate of nanoparticles. **Clinical Oral Investigations**, p. 1–12, 2017.

TURNER RJ, SUGIYA H. Understanding salivary fluid and protein secretion. **Oral Dis**, v. 8 n. 1, p. 3-11, Jan 2002.

WONG, D. T. W. Salivary Extracellular Noncoding RNA : Emerging Biomarkers for Molecular Diagnostics. **Clinical Therapeutics**, v. 37, n. 3, p. 540–551, 2015.

WU X. et al. Immunofluorescent labeling of cancer marker Her2 and other cellular targets with semiconductor quantum dots. **Nat Biotechnol.**, v. 21, n. 1, p. 41-6. Jan 2003.

YOSHIO W. K. S, EIICHIRO MATSUBARA. X-Ray Diffraction Crystallography. **Springer Science & Business Media**, 2011.

ANEXO

DIRETRIZES PARA AUTORES

A revista Horizonte Científica é uma publicação eletrônica, semestral, da Diretoria de Pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia, que publica em português os artigos científicos resultantes de pesquisas iniciação científica como dos apoiados pelo CNPq, FAPEMIG e UFU - e do Programa Institucional de Apoio à Iniciação Científica - PIAIC.

1. FORMATAÇÃO DO TEXTO:

1.1. Margens de 2,5 cm, espaçamento 1,5 cm, fonte Times New Roman 12. Espaçamento 1,5 Cada página deverá ser numerada consecutivamente com algarismos arábicos no canto superior direito;

1.2. O artigo deverá conter no máximo 30 páginas e deve estar em formato DOC. (versão 97-2003 do WORD) OBS: A formatação deve ser em uma coluna.

1.3. Os nomes dos autores devem constar somente na Submissão de Metadados, devendo ser excluídos do corpo do texto.

OBS: os nomes dos autores serão incluídos no processo de Editoração de Texto, logo após a avaliação dos pareceristas.

1.4. As ilustrações (mapas, fotos (colorido ou preto e branco), etc.) devem fazer parte do corpo do texto em formato digital GIF ou JPEG. Os gráficos também devem fazer parte do corpo do texto;

1.5. Notas de rodapé: serão aceitas quando forem absolutamente necessárias para explanações que não possam ser incluídas no texto ou nas tabelas, tais como: a) nome da instituição onde foi realizado o trabalho; b) consignação de bolsas e outros auxílios financeiros; c) comunicação pessoal. As notas de rodapé deverão ser anunciadas no texto mediante número sobrescrito e devem figurar na página em que o número aparece;

1.6. Os nomes científicos devem ser escritos, no texto, na íntegra (Ex.: Vellozia caruncularis e não V. caruncularis;

1.7. Quando o texto contiver fórmulas editadas no módulo de Equações do Word, o tamanho deve ser o seguinte: Interno – 12 pts; Subscrito/Subrescrito – 10pts; Sub-Subscrito/Sobrescrito – 8 pts; Símbolo – 12 pts e Sub-Símbolo – 10 pts;

1.8. O texto é de inteira responsabilidade dos autores. A redação deve ser clara, concisa e objetiva e a linguagem correta, precisa, coerente e simples. Adjetivos supérfluos devem ser evitados, assim como, a forma excessivamente compacta, que pode prejudicar a compreensão do texto. O texto deve passar por uma criteriosa correção de português antes de ser enviado para a publicação; A REvista Horizonte Científico se resguarda o direito a pequenas adequações textuais para melhor compreensão do texto.

1.9. Os autores concedem os direitos autorais para futuras publicações desde que a fonte seja referenciada.

2. FORMATO DO ARTIGO:

2.1. TÍTULO: em letra maiúscula e negrito. Deve ser conciso e informativo.

2.2. NOME DOS AUTORES: os nomes completos dos autores (em letra maiúscula) deverão estar posicionados entre o título em português e o Resumo, alinhados a esquerda, colocados em seqüência horizontal, identificados com número sobrescrito e caracterizado no rodapé da primeira página, conforme

a seguinte seqüência: unidade acadêmica, instituição, endereço, cidade, CEP e endereço eletrônico do autor para correspondência.

OBS: Lembrando que os nomes serão inseridos no corpo do texto somente após a avaliação dos pareceristas, no processo de Editoração de Texto.

O Resumo devem conter, no máximo, 250 palavras.

2.3. ABSTRACT, RÉSUMÉ ou RESUMEN: O artigo deverá ser encaminhado com o resumo em português e em uma segunda língua, que poderá ser o inglês, francês ou Espanhol. OBS: O resumo e o abstract devem constar em página exclusiva do texto. Exceção: nos casos em que o resumo e o abstract couberem na mesma página.

2.4. PALAVRAS CHAVE: até 5, em espanhol, inglês, francês e português. O abstract, résumé, resumen e o Resumo devem conter, no máximo, 250 palavras.

2.5. TEXTO: O texto deverá iniciar logo a seguir, colocando sequencialmente: INTRODUÇÃO, MATERIAL E MÉTODOS; RESULTADOS; DISCUSSÃO; CONCLUSÃO; AGRADECIMENTOS (se necessário) e REFERÊNCIAS.

OBS.: A critério dos autores os itens Resultados, Discussão e Conclusão, poderão aparecer em separado ou Resultados e Discussão juntos e ainda as Conclusões poderão aparecer junto com a Discussão. Citar cada figura e tabela no texto em ordem numérica crescente. Todas as citações, no decorrer do texto, devem ser incluídas na lista de Referências Bibliográficas, em ordem alfabética, de acordo com as normas ABNT (NBR-6023/89), conforme alguns exemplos abaixo: Livros completos: LACAZ, C. da S.; BARUZZI, R.G.; SIQUEIRA JÚNIOR, W. Introdução a geografia médica no Brasil. São Paulo: Blucher, 1972. 568 p. (se houver número do volume, indicar também) Parte de Livro com autoria específica: FLEURY, J. A. Análise a nível de empresa dos impactos da automação sobre a organização da produção de trabalho. In: SOARES, R.M.S.M. Gestão da empresa. Brasília: IPEA/IPLAN, 1980. p. 149-159. Parte de Livros sem autoria específica: MARTIN, L.C.T. Confinamento de bovino de corte. São Paulo: Nobel, 1986. 124p. Cap.3: Nutrição de corte em confinamento, p.29-89. Folheto: PRATES, H.S.; PELEGRINETTI, J.R. Controle sanitário e cultural: legislação e relação de defensivos para citros. Campinas: Fundação Cargill, 1985. 40p. Artigos de revistas e outros periódicos: MATOS, A. P. de. Epidemiologia da fusariose do abacaxi. Informe Agropecuário, Campinas, v. 11, n. 130, p 46-49, 1985. BAILEY, I.W. - The use and abuse of anatomical data in the study of phylogeny and classification. Phytomorphology v. 1, p. 67-69, 1951. Artigos apresentados em congresso – Impresso: SILVA, J.N.M. Possibilidades de produção sustentada de madeira em floresta densa de terra firme da Amazônia brasileira. In: CONGRESSO FLORESTAL BRASILEIRO, 6., 1990, Campos do Jordão. Anais... Campos do Jordão: SBS/SbEF, 1990. P..39-45. CD-ROOM: MUNIZ, C. A. de; QUEIRÓZ, S. A. de - Avaliação do desempenho até a desmama de bezerros cruzados, no Mato Grosso do Sul. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 34., 1997, Juiz de Fora. Anais... Geratec, 1997. 1 CD-ROOM. Internet: SILVA, N.M. - The chemotaxonomy of plants. Disponível: (colocar o endereço completo da página de onde foi retirada a informação): Acesso em: (data da captura). SILVA, M.M.L. Crimes na era digital. Net, Rio de Janeiro, nov. 1998. Disponível: (colocar o endereço completo da página de onde foi retirada a informação): Acesso em: (data da captura). Dissertações e Teses: QUEIRÓZ FILHO, E.S.F.de. Análise da indústria de beneficiamento primário de madeira do Estado do Pará. Curitiba. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) - Universidade Federal do Paraná, 1983. 103 p. Apostila: SILVA, C.E. Elaboração de trabalhos acadêmicos. Lavras: ESAL, 1990. 3p. Apostila. Publicações Institucionais (sem autores): FAO El eucalipto en la repoblación forestal. Roma, 1981. 303p. Como fazer as citações no texto: Ex: Steel (1960) ou (Steel, 1960); Resende & Andrade (1992) ou (Resende & Andrade, 1992); Silva, Cardoso, Pereira (1990) ou (Silva, Cardoso, Pereira, 1960); Obras com mais de três autores poderá ser indicado apenas o primeiro autor, seguido da expressão "et al."; os dois primeiros autores seguido da expressão "et al." ou ainda os três primeiros autores seguidos da expressão "et al.", na ordem em que aparecem na publicação. Ex.: SOUZA, P.R. et al.; SILVA, J.P.; MELO, P.N. et al. ou FERREIRA, L.C.; SOUSA, T.R.; ANDRADE, M. et al. Citações Longas (mais de três linhas) Devem constituir um parágrafo independente, recuado 4 cm da margem esquerda, com linhas separadas por espaço simples, letra menor que a do texto utilizado e sem aspas.

CONDIÇÕES PARA SUBMISSÃO

Como parte do processo de submissão, os autores são obrigados a verificar a conformidade da submissão em relação a todos os itens listados a seguir. As submissões que não estiverem de acordo com as normas serão devolvidas aos autores.

1. O artigo deve estar no formato DOC ou DOCX. (word 2003, 2007);
2. A submissão deve ser feita na seção mais correspondente ao tema do artigo;
3. Os dados da Submissão devem ser preenchidos corretamente, inserindo-se o máximo de informações possíveis;
4. É obrigatório a colocação inserção de todos os nomes dos autores, dando preferência ao autor bolsista, e ao orientador, necessariamente nesta ordem;
5. O título e o resumo do artigo são obrigatórios;
6. Não devem constar no próprio artigo, os nomes dos autores ou do orientador;
7. Verificar o número de páginas, artigos que não estiverem de acordo com o intervalo serão devolvidos aos autores
8. Verificar se o artigo está de acordo com as diretrizes

DECLARAÇÃO DE DIREITO AUTRAL

Direitos Autorais para artigos publicados nesta revista são do autor, com direitos de primeira publicação para a revista. Os artigos são de uso gratuito, com atribuições próprias, em aplicações educacionais e não-comerciais.