

UTILIZAÇÃO DE PARTÍCULAS SUBMICROMÉTRICAS DE QUITOSANA COMO
MEDICAÇÃO INTRACANAL: ESTUDO “EX VIVO”

Patricia Silva Rodrigues

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Metalúrgica e de Materiais, COPPE, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Engenharia Metalúrgica e de Materiais.

Orientadora: Rossana Mara da Silva Moreira Thiré

Rio de Janeiro
Março de 2014

UTILIZAÇÃO DE PARTÍCULAS SUBMICROMÉTRICAS DE QUITOSANA COMO
MEDICAÇÃO INTRACANAL: ESTUDO “EX VIVO”

Patricia Silva Rodrigues

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO INSTITUTO ALBERTO LUIZ COIMBRA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA DE ENGENHARIA (COPPE) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS EM ENGENHARIA METALÚRGICA E DE MATERIAIS.

Examinada por:

Prof. Rossana Mara da Silva Moreira Thiré, D. Sc.

Prof. Heloisa Carla Dell Santo Gusman, D. Sc.

Prof. Marysilvia Ferreira da Costa, D. Sc.

Prof. Roberta Helena Mendonça, D. Sc.

RIO DE JANEIRO, RJ – BRASIL
MARÇO DE 2014

Rodrigues, Patricia Silva

Utilização de partículas submicrométricas de quitosana como medicação intracanal: estudo “ex vivo”/ Patricia Silva Rodrigues – Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2014

XIII, 74 p.: il.; 29,7 cm.

Orientador: Rossana Mara da Silva Moreira Thiré.

Dissertação (mestrado) – UFRJ/ COPPE/ Programa de Engenharia Metalúrgica e de Materiais, 2014.

Referências Bibliográficas: p. 62 - 71.

1. Biomateriais. 2. Nanopartículas de quitosana. 3. Medicação intracanal. 4. Endodontia. I. Thiré, Rossana Mara da Silva Moreira II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Programa de Engenharia Metalúrgica e de Materiais. III. Título

*Aos meus pais, Renato e
Marilena, por todo amor,
carinho e apoio em todos os
momentos da minha vida.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por ter conduzido meus passos até aqui.

Aos meus pais, Marilena e Renato, que sempre me apoiaram e deram total suporte ao longo dos meus anos de estudo. Sem vocês, nenhuma conquista teria acontecido ou valido apenas. Nunca poderei retribuir tudo o que vocês já fizeram por mim.

Aos meus irmãos, Daniela e Renato, minha tia Angela, meus tios, Fausto e Ivan, e minha prima Lívia, por acompanharem todas as fases da minha vida e vibrarem por cada conquista já realizada.

A minha orientadora, professora Rossana Mara Thiré, por ter acreditado no meu potencial e por sempre ter paciência comigo por pensar mais como endodontista que como engenheira!

A todos os colegas de laboratório, Ana Paula, Renatinha, Márcio, Daniel, Sara e Taíla, pelos papos animados e por sempre estarem dispostos a ajudar de alguma forma.

A professora Heloisa Gusman, por ter me indicado para esse projeto e por estar sempre disponível para dar bons conselhos.

Ao professor Marcos Araújo e a todos os funcionários da FO/UFRJ pela ajuda durante a etapa de testes envolvendo dentes humanos.

A professora Ana Paula Colombo e a todos os alunos e funcionários que faziam parte do Laboratório de Microbiologia Oral da UFRJ por terem me ajudado durante a etapa de testes microbiológicos.

Ao CNPq, pela bolsa de mestrado.

Aos professores e funcionários do departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais. Obrigada por toda ajuda e por serem sempre tão solícitos.

A minha querida amiga Beatriz que, mesmo longe, sempre continuou presente na minha vida. Você foi um presente que a graduação me deu!

Aos meus amigos de mestrado, Jéssica, Marlon, Dani e Felipe, que passaram comigo por toda a empreitada de disciplinas. Pelas horas de estudo, pelas boas risadas e conversas e pelo incentivo.

Um agradecimento especial ao meu namorado Rômulo e aos grandes amigos que o mestrado me deu de presente: Mari, PH e Bruna. Sem vocês essa jornada teria sido MUITO mais difícil. Obrigada por sempre estarem por perto para ajudar, pelas conversas engraçadas, pelos conselhos e, principalmente, por me darem força quando eu mesma não acreditava mais em mim. Vocês foram e são essenciais!!

A todos aqueles que torceram por mim e acreditaram que tudo daria certo.

Resumo da Dissertação apresentada à COPPE/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Ciências (M.Sc.)

UTILIZAÇÃO DE PARTÍCULAS SUBMICROMÉTRICAS DE QUITOSANA COMO
MEDICAÇÃO INTRACANAL: ESTUDO “EX VIVO”

Patricia Silva Rodrigues

Março/2014

Orientadora: Rossana Mara da Silva Moreira Thiré

Programa: Engenharia Metalúrgica e de Materiais

Neste trabalho, foi avaliada a capacidade das partículas de quitosana (PCS) em suspensão aquosa de penetrarem nos túbulos dentinários de dentes humanos *ex vivo* e eliminarem *Enterococcus faecalis* de dentes previamente contaminados, a fim de sugerir o seu uso como medicação intracanal. Para isso, as PCS em suspensão foram agitadas no interior dos canais com ultrassom odontológico por períodos de 5, 10 e 15 minutos, sendo removidas imediatamente ou após um período de 7 dias. As PCS produzidas apresentaram tamanho submicrométrico (diâmetro médio de 268,9 nm) e, portanto, menor que os túbulos dentinários (diâmetro médio de 2,5 μm). Foi possível observar a presença de PCS no interior dos túbulos dentinários em toda extensão do dente com períodos de agitação de 10 e 15 minutos. As PCS em suspensão foram capazes de atuar contra *E. faecalis* no interior dos canais, sendo capazes de reduzir em 99,9% as unidades formadoras de colônia (UFC), quando a suspensão foi removida imediatamente. Quando permaneceu no interior do canal pelo período de 7 dias, as PCS em suspensão apresentaram ação similar a clorexidina 2% gel. Os resultados mostraram que a suspensão de PCS a 0,25 mg/ml pode ser utilizada como medicação intracanal e/ou como solução irrigadora final.

Abstract of Dissertation presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science (M. Sc.)

USE OF CHITONAN SUBMICROMETRIC PARTICLES AS AN INTRACANAL
MEDICAMENT: "EX VIVO" STUDY

Patricia Silva Rodrigues

March/2014

Advisor: Rossana Mara da Silva Moreira Thiré

Department: Metallurgy and Materials Engineering

In this study, it was evaluated the ability of chitosan particles (PCS) in aqueous suspension to penetrate into dentinal tubules of ex vivo human teeth and to eliminate *Enterococcus faecalis* from previously infected teeth, in order to suggest its use as an intracanal medication. For this, the PCS suspension was stirred inside dental canals with ultrasound for periods of 5, 10 and 15 minutes, and removed immediately or only after a period of 7 days. The produced PCS presented submicrometric dimension (average diameter of 268.9 nm) and therefore, they were smaller than dentinal tubules (average diameter 2.5 μm). It was possible to observe the presence of PCS into dentinal tubules of all tooth thirds when 10 and 15 minutes of stirring were used. The PCS suspension was able to act against *E. faecalis* inside the root canals. It was observed a reduction of 99.9% in colony forming units (CFU), when the suspension was removed immediately. When it remained inside root canal for a period of 7 days, the PCS suspension exhibited a similar antibacterial action to that of 2% chlorhexidine gel. The results showed that the PCS suspension at 0.25 mg/ml can be used as root canal final solution and/or intracanal medication.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 INTRODUÇÃO E OBJETIVOS.....	1
1.1) Introdução.....	1
1.2) Objetivos	4
CAPÍTULO 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.1) Tratamento endodôntico	5
2.2) <i>Enterococcus faecalis</i>	7
2.3) <i>Candida albicans</i>	9
2.4) Medicação intracanal.....	11
2.4-1) Hidróxido de cálcio.....	13
2.4-2) Clorexidina	14
2.5) Quitosana	16
2.6) Nanopartículas de quitosana	19
CAPÍTULO 3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
3.1) Materiais	24
3.2) Produção das nanopartículas	25
3.2-1) Purificação da quitosana	25
3.2-2) Produção das nanopartículas pelo método de gelificação iônica.....	26
3.3) Caracterização das partículas.....	27
3.3-1) Espectroscopia no infravermelho (FTIR)	27
3.3-2) Espalhamento de luz.....	28
3.3-3) Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	28
3.3-4) Potencial zeta	28
3.4) Teste de Concentração Mínima Inibitória (CMI)	29
3.4-1) Preparação do inóculo.....	29
3.4-2) Realização do teste.....	29
3.5) Seleção dos dentes	30
3.6) Preparo dos dentes	31
3.7) Penetração das PCS nos túbulos dentinários	32
3.7-1) Preparo dos dentes e análise por MEV	32

3.7-2) Preparo dos dentes e análise por Microscopia Ótica de Fluorescência.....	35
3.8) Contaminação dos dentes	36
3.9) Ação antimicrobiana das PCS	37
3.10) Análise estatística.....	39
CAPÍTULO 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
4.1) Caracterização das partículas.....	40
4.1-1) Espectroscopia no Infravermelho (FTIR).....	40
4.1-2) Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	42
4.1-3) Tamanho das partículas.....	44
4.1-4) Potencial Zeta	45
4.2) Teste de Concentração Mínima Inibitória (CMI)	46
4.3) Penetração das PCS nos túbulos dentinários	48
4.3-1) Preparo dos dentes e análise por MEV	48
4.3-2) Preparo dos dentes e análise por Microscopia Ótica de Fluorescência	55
4.4) Ação antimicrobiana das PCS	57
CAPÍTULO 5 CONCLUSÕES E TRABALHOS FUTUROS.....	60
5.1) Conclusões.....	60
5.2) Sugestões para trabalhos futuros.....	61
CAPÍTULO 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62
ANEXO.....	72

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1: Representação esquemática do tratamento endodôntico: a- dente com cárie e periodontite apical; b- preparo biomecânico do SCR; c- obturação tridimensional	5
Figura 2.2: Desacetilação da quitina	17
Figura 3.1: Liofilizador usado no processo de secagem das PCS	27
Figura 3.2: Imagem do ultrassom usado nessa etapa (A) e a forma como as PCS foram agitadas no interior dos canais (B)	34
Figura 3.3: Imagens do processo de clivagem (A) e do dente clivado (B)	35
Figura 3.4: Processo de contaminação dos dentes por <i>E. faecalis</i>	37
Figura 4.1: Espectroscopia no Infravermelho da amostra de quitosana comercial.....	41
Figura 4.2: Espectroscopia no Infravermelho da amostra de PCS.....	41
Figura 4.3: Imagem da reticulação da quitosana promovida pelo TPP.....	42
Figura 4.4: Micrografias das PCS secas	43
Figura 4.5: Micrografia das PCS em suspensão aquosa.....	43
Figura 4.6: Gráfico da distribuição das partículas de PCS	44
Figura 4.7: Teste de CMI das PCS em <i>E. faecalis</i> e <i>C. albicans</i>	46
Figura 4.8: Imagem representativa da MEV do grupo controle negativo (sem irrigação de PCS). Corte longitudinal evidenciando os túbulos dentinários vazios. A- corte do terço cervical, B- corte do terço médio, C- corte do terço apical.....	49
Figura 4.9: MEV representativa do grupo 1 (5 ml de suspensão de PCS + 5 min de ultrassom odontológico). A-C: subgrupo 1a (remoção imediata). D-F: subgrupo 1b (remoção após 7 dias). A,D- corte do terço cervical; B, E- corte do terço médio; C,F- corte do terço apical.....	50
Figura 4.10: MEV representativa do grupo 2 (5 ml de suspensão de PCS + 10 min de ultrassom odontológico). A-C: subgrupo 2a (remoção imediata). D-F: subgrupo 2b	

(remoção após 7 dias). A,D- corte do terço cervical; B, E- corte do terço médio; C,F- corte do terço apical.....	52
Figura 4.11: Detalhe da morfologia do terço cervical do subgrupo 2a, indicando o tamanho das PCS presentes nos túbulos (248,088 nm).....	53
Figura 4.12: MEV representativa do grupo 3 (8 ml de suspensão de PCS + 15 min de ultrassom odontológico). A-C: subgrupo 3a (remoção imediata). D-F: subgrupo 3b (remoção após 7 dias). A,D- corte do terço cervical; B, E- corte do terço médio; C,F- corte do terço apical.....	54
Figura 4.13: Presença de fluorescência no interior dos túbulos dentinários evidenciando a penetração das PCS no subgrupo 2a (remoção imediata da suspensão de NPCCS após agitação de 10 min). A: corte do terço cervical sem fluorescência, B-D: corte dos terços cervical, médio e apical com fluorescência, respectivamente. Barra de escala = 50µm.....	56
Figura 4.14: Redução média de UFC de <i>E. faecalis</i> em dentes humanos <i>ex vivo</i> tratados com diferentes soluções. *, ** = $p < 0,1$	58

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.1: Prevalência de <i>Enterococcus faecalis</i> em casos de fracasso do tratamento endodôntico.....	9
Tabela 2.2: Prevalência de <i>Candida albicans</i> em casos de fracasso do tratamento endodôntico.....	11
Tabela 3.1: Materiais utilizados	24
Tabela 3.2: Grupos usados no teste de penetração das PCS nos túbulos dentinários.....	33
Tabela 4.1 Média e desvio padrão dos valores do potencial zeta das PCS em função do pH de cada análise.....	45
Tabela 4.2: Tabela 4.2: Resultado do teste de atividade antibacteriana da suspensão de PCS em relação ao <i>Enterococcus faecalis</i> e <i>Candida albicans</i> . Ausência de crescimento bacteriano (-); crescimento bacteriano (+).....	47
Tabela 4.3: Redução média e desvio padrão de UFC de <i>E. faecalis</i> observados nos diferentes grupos usados no teste microbiológico.....	58

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

1.1) Introdução

O tratamento endodôntico tem como objetivo eliminar micro-organismos e seus metabólitos do sistema de canais radiculares (SCR) e, com isso, prevenir e tratar a periodontite apical. Como etapas desse tratamento temos o acesso à câmara pulpar, limpeza e modelagem dos canais e, por fim, uma obturação tridimensional. O controle da infecção endodôntica continua sendo o maior desafio encontrado pelos endodontistas durante a prática clínica. Mesmo com a evolução das técnicas e dos materiais usados durante o tratamento endodôntico, a completa desinfecção do SCR permanece sendo extremamente difícil devido à sua alta complexidade anatômica, uma vez que o mesmo pode apresentar istmos, deltas apicais e outras ramificações. Assim, a máxima eliminação de micro-organismos durante o preparo do canal estará diretamente relacionado ao sucesso do tratamento (SJÖGREN *et al.*, 1997).

Mesmo que fatores não-microbianos possam estar presentes em casos de insucesso do tratamento endodôntico, os micro-organismos e seus subprodutos são os principais responsáveis pelo fracasso endodôntico, caracterizando as infecções intrarradiculares secundárias ou persistentes. As infecções secundárias são causadas por micro-organismos que não estavam presentes durante o início do tratamento (infecção primária), mas que conseguiram penetrar no canal durante o mesmo; já as infecções persistentes são causadas por micro-organismos que conseguiram, de alguma forma, resistir aos procedimentos de desinfecção (LOPES & SIQUEIRA JR., 2010).

Enterococcus faecalis é uma bactéria Gram-positiva facultativa e tem sido considerado um importante agente patogênico durante o tratamento endodôntico uma vez que essa é a espécie mais comumente encontrada nos casos em que houve fracasso da terapia endodôntica. Mesmo que sua presença em canais não tratados seja muito pequena, *E. faecalis* é frequentemente encontrado em canais obturados que apresentam sinais de periodontite apical crônica, podendo também ser encontrado em monoculturas, evidenciando que essa espécie possui mecanismos de sobrevivência que o tornam extremamente virulento (PARADELLA *et al.*, 2007).

O papel das bactérias e de seus subprodutos na etiologia e na perpetuação das infecções pulpares e periapicais é bem conhecido. A grande maioria das bactérias infectantes é removida pelos procedimentos realizados durante o preparo químico-mecânico do canal radicular. Quando múltiplas sessões de tratamento endodôntico são necessárias, utiliza-se uma medicação intracanal que apresente atividade bactericida (GOMES *et al.*, 2002). Por permanecer no interior do canal radicular por mais tempo, um medicamento intracanal dotado de ação antimicrobiana tem maiores chances de atingir áreas não afetadas pela instrumentação como istmos, ramificações e túbulos dentinários (LOPES & SIQUEIRA JR., 2010). Alguns materiais já estão consagrados no meio endodôntico para utilização como medicação intracanal. Dentre os medicamentos mais usados temos o hidróxido de cálcio, que por possuir poder alcalinizante tem sido um dos principais materiais de escolha para medicação intracanal; e a clorexidina, que pode ser usada como substância química auxiliar durante o preparo químico-mecânico ou como medicação intracanal. No entanto, encontrar novas alternativas é fundamental para combater a resistência apresentada por alguns micro-organismos.

A quitosana é um biopolímero natural obtido por meio da desacetilação parcial da quitina que, por sua vez, é um polissacarídeo presente na carapaça de crustáceos, no exoesqueleto de insetos e na parede celular de fungos. É biodegradável, biocompatível, apresenta atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-negativas,

Gram-positivas e fungos e apresenta efeito quelante. Por isso, pode ser aplicada em diversas áreas como: no tratamento de água, na agricultura, na indústria têxtil, cosmética, no processamento de alimentos, na medicina, na odontologia e na indústria farmacêutica. A mesma pode ser produzida na forma de nanopartículas, apresentando tamanho menor que 100 nm, e carga de superfície positiva, sendo muito empregada na fabricação de dispositivos para liberação controlada de fármacos (QI *et al.*, 2004; RABEA *et al.*, 2003; CAMPANA-FILHO *et al.*, 2007; SENEL & McCLURE *et al.*, 2004).

Estudos mostram que nanopartículas de quitosana (NPCS) podem inibir o crescimento de vários micro-organismos, funcionando mais eficientemente que a quitosana que não esteja na forma de nanopartículas, pois apresentam área superficial e carga maiores, possibilitando uma maior interação com a superfície das bactérias, que são carregadas negativamente (QI *et al.*, 2004). Outra vantagem no uso de nanopartículas na Odontologia é que, por seu tamanho, podem penetrar nos túbulos dentinários cujo diâmetro médio é de 2,5 μm (COHEN & HARGREAVES, 2007).

SIQUEIRA JR. *et al.* (2002) estudaram o padrão de colonização microbiana dos canais radiculares de dentes humanos não tratados e com lesão periapical utilizando microscópio eletrônico de varredura. Foi observado que as células bacterianas foram capazes de colonizar todas as áreas do SCR e que, apesar do achado mais comum ter sido a penetração superficial dos túbulos dentinários, foi possível encontrar bactérias atingindo até 300 μm de profundidade. Esse estudo comprova a importância de se desenvolver novas soluções irrigadoras e medicações que sejam capazes de penetrar profundamente nos túbulos dentinários e eliminar as bactérias que estejam presentes nessa região, uma vez que os produtos existentes no mercado não são capazes de realizar uma desinfecção completa em todos os casos em que há infecção endodôntica.

1.2) Objetivos

- **Objetivo geral**

Este trabalho teve como objetivo principal avaliar a eficácia da suspensão de partículas submicrométricas de quitosana (PCS) como medicação intracanal durante o tratamento endodôntico, em dentes *ex vivo*.

- **Objetivos específicos**

- 1) Produzir e caracterizar nanopartículas de quitosana (PCS);
- 2) Avaliar a concentração mínima inibitória das PCS contra *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans*;
- 3) Verificar a penetração das PCS nos túbulos dentinários de dentes humanos;
- 4) Avaliar a atividade antimicrobiana das PCS contra *Enterococcus faecalis* no interior de canais radiculares de dentes humanos extraídos.

CAPÍTULO 2

Revisão Bibliográfica

2.1) Tratamento endodôntico

O objetivo principal do tratamento endodôntico é a remoção de micro-organismos do SCR e evitar sua subsequente reinfecção. Para que isso ocorra é necessário que haja um correto preparo biomecânico seguido por uma obturação tridimensional (Figura 2.1).

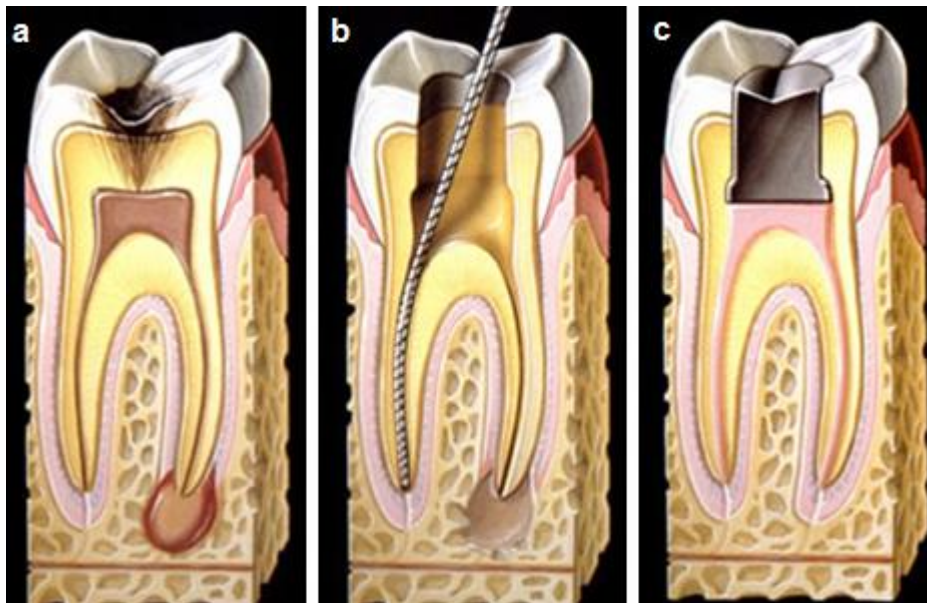


Figura 2.1: Representação esquemática do tratamento endodôntico: a- dente com cárie e periodontite apical; b- preparo biomecânico do SCR; c- obturação tridimensional. Adaptado de www.odontobastos.blogspot.com.br/2012/05/tratamento-endodontico.html (acessado em 13 de dezembro de 2012).

O preparo químico-mecânico visa promover a modelagem e a limpeza do canal radicular. A modelagem é obtida através da ação mecânica dos instrumentos endodônticos que promovem o desgaste das paredes dentinárias, conferindo ao canal um formato cônico progressivo, com menor diâmetro em seu término apical. Já a limpeza, cujo objetivo é remover tecidos orgânicos, inorgânicos e micro-organismos, é alcançada através da ação conjunta dos instrumentos endodônticos e das soluções irrigadoras (LOPES & SIQUEIRA JR., 2010). A obturação tem como função preencher o espaço antes ocupado pela polpa dentária, selando não somente o canal principal como também suas ramificações, e impedir, dessa forma, a proliferação de micro-organismos que levariam a uma reinfecção. Caso essas etapas sejam bem sucedidas, a taxa de sucesso do tratamento endodôntico é geralmente alta, variando entre 85 e 97% (SJÖGREN *et al.*, 1997; DAMMASCHKE *et al.*, 2003; SALEHRABI & ROTSTEIN, 2004).

O tratamento endodôntico pode ser realizado em sessões única ou múltiplas, dependendo do estágio de infecção em que o dente se encontra. Em casos em que o dente apresenta-se com vitalidade (biopulpectomia) é preconizado que o tratamento seja realizado em uma única sessão; já em casos de retratamento endodôntico ou em que há necrose pulpar, preconiza-se que o tratamento seja feito em mais de uma sessão, utilizando uma medicação intracanal entre as consultas para auxiliar na eliminação dos micro-organismos (SJÖGREN *et al.*, 1990; TROPE *et al.* 1999; TROPE & BERGENHOLTZ, 2002).

Os canais radiculares de dentes necrosados sem tratamento endodôntico apresentam uma microbiota mista denominada de infecção primária, caracterizada pelo predomínio de anaeróbios estritos Gram-negativos. Nos canais radiculares obturados sem sucesso há um número limitado de micro-organismos, sendo predominante a presença de anaeróbios facultativos Gram-positivos (LOPES & SIQUEIRA JR., 2010).

Devido ao fato de estar frequentemente relacionado a casos de insucesso endodôntico, *E. faecalis* é considerado o principal patógeno endodôntico e tem sido foco de diversos estudos. SUNDQVIST (1998) recuperou diversas espécies de bactérias anaeróbias de canais que tiveram fracasso do tratamento endodôntico, sendo o *E. faecalis* a bactéria com maior prevalência (38%). Entretanto, *Enterococcus* não são favorecidos pelas condições do canal não tratado e, quando presentes, ocorrem em uma porcentagem muito pequena da microbiota bacteriana inicial. Contudo, uma vez que eles penetrem o SCR e lá se estabeleçam, podem resistir a tratamentos antimicrobianos, incluindo o uso de medicação intracanal entre as consultas, e vão persistir após a obturação.

PICIULIENE *et al.*, 2001 fizeram um estudo em que investigaram a presença de fungos, bacilos entéricos gram-negativos e *E. faecalis* em uma amostra de 40 dentes tratados endodonticamente e com lesão perirradicular. Enquanto bacilos entéricos gram-negativos estavam presentes em apenas 3 casos (9% das culturas positivas), *Candida albicans* e *E. faecalis* estavam presentes em 6 (18%) e 21 (64%) canais, respectivamente.

2.2) *Enterococcus faecalis*

Enterococcus é um gênero de bactéria comensal do aparelho digestivo e urinário. Entretanto, algumas espécies como *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium*, podem gerar doenças, incluindo infecções urinárias e endocardite. A espécie *E. faecalis* está relacionada a infecções endodônticas em odontologia, sendo mais frequentemente encontrado em canais obturados com sinais de periodontite apical crônica (PARADELLA *et al.*, 2007). Estudos mostram que o *E. faecalis* tem a capacidade de penetrar nos túbulos dentinários, além de possuírem poucas exigências

para seu crescimento, suportando temperaturas de 10 a 45° C e pH de 9,6 (KAYAOGLU, 2004).

A habilidade do *E. faecalis* de formar biofilme, ou seja, se organizar em comunidade apresentando suas células aderidas umas as outras e às superfícies e/ou interfaces, possibilita a colonização de superfícies inertes e biológicas, promovendo adesão e invasão de células do hospedeiro e aumentando sua resistência aos tratamentos antimicrobianos, quando comparado a casos em que está isolada (BALDASSARRI *et al.*, 2005; DENG *et al.*, 2009). Existem também outros fatores de virulência relacionados a esse gênero como: a produção de substância de agregação, adesinas de superfície, ácido lipopoliteicóico, produção extracelular de superóxido, enzima lítica gelatinase e hialuronidase (KAYAOGLU, 2004).

Outro importante fator na virulência do *E. faecalis* é que o mesmo apresenta a capacidade de sobreviver a períodos extensos em ambientes nutricionais limitados pois degrada a dentina, através da hialuronidase, obtendo ácido hialurônico, responsável por sua nutrição (KAYAOGLU, 2004).

MÖLLER *et al.* (2004), avaliando a sobrevivência de espécies bacterianas mistas introduzidas em canais radiculares de macacos por 8 a 12 meses, observaram que *E. faecalis* foi a única espécie a ser reisolada de todos os 24 canais. SEDGLEY *et al* (2005), em um modelo *in vitro*, mostraram que *E. faecalis* é capaz de permanecer viável em dentes obturados. Estes estudos sugerem que a alta frequência em que essa espécie é encontrada em casos de insucesso endodôntico se deve a habilidade da mesma em permanecer viável por bastante tempo em áreas não instrumentadas do SCR como também em resistir a materiais antimicrobianos e obturadores (SEDGLEY,2007).

Existem vários estudos, utilizando diferentes metodologias, relacionando *E. faecalis* ao insucesso da terapia endodôntica, com sua presença variando entre 30% (HANCOCK *et al.*, 2001), 32% (MOLANDER *et al.*,1998), 38% (SUNDQVIST *et*

al.,1998), 53% (PINHEIRO *et al.*,2003), 64% (PICIULIENE *et al.*, 2001) e 77% (SIQUEIRA & RÔÇAS, 2004) (Tabela 2.2).

Tabela 2.1: Prevalência de *Enterococcus faecalis* em casos de fracasso do tratamento endodôntico. Adaptado de LOPES & SIQUEIRA JR., 2010.

Estudo	Método	Amostras contendo micro-organismos/Total	Prevalência de <i>E. faecalis</i>
Sundqvist <i>et al.</i> , 1998	Cultura	24/54	38%
Molander <i>et al.</i> , 1998	Cultura	68/100	47%
Peciuliene <i>et al.</i> , 2001	Cultura	33/40	64%
Hancock III <i>et al.</i> , 2001	Cultura	34/54	30%
Pinheiro <i>et al.</i> , 2003	Cultura	51/60	53%
Siqueira & Rôças, 2004	PCR	22/22	77%

2.3) *Candida albicans*

Fungos têm sido ocasionalmente observados na microbiota associada à infecção endodôntica primária estando geralmente associados a bactérias. Já nos casos de infecções secundárias e persistentes, os fungos são normalmente encontrados em monoinfecção (LOPES & SIQUEIRA JR., 2010). BAUMGARTNER *et*

al. (2000), usando PCR, revelou a ocorrência de *Candida albicans* em 21% das amostras obtidas de canais radiculares infectados.

A habilidade que as espécies de *Candida* têm de sobreviver em ambientes com escassez de nutrientes e de resistir à ação de medicamentos normalmente usados na Endodontia atua como importante vantagem na sobrevivência dessa espécie nos canais radiculares (WALTIMO *et al.*, 2003). Fungos apresentam alguns fatores de virulência que contribuem para a sua propensão em infectar os tecidos pulpar e dentinário como: aderência, que permite a colonização de tecidos dentais duros; a formação de hifas, que determina um aumento na patogenicidade; a facilidade de invadir os túbulos dentinários; e a liberação de enzimas que digerem proteínas teciduais contribuindo, dessa forma, para a sobrevivência em períodos de escassez nutricional (SWEET *et al.*, 1997).

Embora não sejam usualmente constituintes da infecção endodôntica primária, fungos também têm sido encontrados em casos de infecções secundárias ou persistentes, incluindo casos de fracasso da terapia endodôntica, sendo a *Candida albicans* a espécie mais comumente encontrada. Ao avaliar a microbiota associada a casos de fracasso do tratamento endodôntico, SUNDQVIST *et al.* (1998) isolaram *C. albicans* em 8,3% dos canais, enquanto MOLANDER *et al.* (1998) encontraram-na em 4,4% dos canais. HANCOCK *et al.* (2001) e PICIULIENE *et al.* (2001) isolaram *C. albicans* em canais que tiveram falha da terapia endodôntica em 3% e 18% dos casos, respectivamente. Já SIQUEIRA & RÔÇAS (2004) detectaram, por PCR, *C. albicans* em 9% dos casos (Tabela 2.2).

Tabela 2.2: Prevalência de *Candida albicans* em casos de fracasso do tratamento endodôntico. Adaptado de LOPES & SIQUEIRA JR., 2010.

Estudo	Método	Amostras contendo microrganismos/Total	Prevalência de <i>C. albicans</i>
Sundqvist <i>et al.</i>, 1998	Cultura	24/54	8%
Molander <i>et al.</i>, 1998	Cultura	68/100	4%
Peciulienė <i>et al.</i>, 2001	Cultura	33/40	18%
Hancock III <i>et al.</i>, 2001	Cultura	34/54	3%
Siqueira & Rôças, 2004	PCR	22/22	9%

Infecções persistentes ou secundárias são tratadas por revisão da odontometria (etapa que determina o comprimento de trabalho do canal), recapitulação da instrumentação com irrigação abundante e aplicação de uma medicação intracanal que possua atividade antimicrobiana (LOPES & SIQUEIRA JR., 2010).

2.4) Medicação intracanal

O preparo químico-mecânico tem como principal objetivo a limpeza do SCR, removendo todo material orgânico presente, estando este infectado ou não. A permanência de qualquer resíduo acaba funcionando como um reservatório de micro-organismos, comprometendo a eficácia do tratamento endodôntico. O uso de

medicação intracanal não substitui nenhuma etapa do tratamento, porém seu emprego apresenta grande importância em determinadas patologias pulpares e perirradiculares (LOPES & SIQUEIRA JR., 2010).

Existem regiões do canal radicular, como istmos, ramificações e irregularidades, que não são completamente limpas e, conseqüentemente, desinfetadas durante as etapas de instrumentação e irrigação. Grande importância também tem sido dada às infecções dos túbulos dentinários, pois podem atuar como um reservatório de micro-organismos não eliminados durante o preparo químico-mecânico sendo, portanto, uma das causas do fracasso da terapia endodôntica. Vários estudos têm demonstrado que a maioria dos patógenos endodônticos possui capacidade de colonizar os túbulos da dentina radicular e instalar uma infecção intratubular, como *E. faecalis* (SIQUEIRA JR. 2001a; SIQUEIRA JR. 2001b). No entanto, por permanecerem por mais tempo no interior dos canais radiculares, os medicamentos têm mais chances de atingir áreas que não são afetadas pelo preparo químico-mecânico e, com isso, contribuem para uma eliminação mais eficiente da microbiota endodôntica (LOPES & SIQUEIRA JR., 2010).

Essas medicações devem possuir, além da capacidade antimicrobiana, biocompatibilidade, amplo espectro de ação, atividade prolongada, e ser de fácil remoção. Os medicamentos também têm como funções: impedir a proliferação de micro-organismos que sobreviveram ao preparo químico-mecânico, uma vez que os micro-organismos remanescentes podem proliferar no interior do SCR se nenhum medicamento for utilizado entre as sessões de trabalho; e controlar a exsudação permanente, já que a persistência de exsudação no canal indica que irritantes permanecem atuando sobre os tecidos perirradiculares (LOPES & SIQUEIRA JR., 2010).

Assim, é importante ter em mente que a infecção do SCR só é controlada após um eficiente preparo químico-mecânico, a aplicação de uma medicação intracanal e a

realização de uma obturação tridimensional capaz de promover um adequado selamento do canal.

2.4-1) Hidróxido de cálcio

Um dos medicamentos mais tradicionais na prática endodôntica é o hidróxido de cálcio, Ca(OH)_2 , que se apresenta como um pó branco, sendo pouco solúvel em água e apresentando pH em torno de 12,8. (LOPES & SIQUEIRA JR., 2010).

As propriedades do hidróxido de cálcio derivam de sua dissociação iônica em íons cálcio e hidroxila, sendo que a ação destes íons sobre os tecidos e os micro-organismos explicam as propriedades biológicas e antimicrobianas desta substância. Seu efeito letal se dá pelos seguintes mecanismos: perda da integridade da membrana citoplasmática bacteriana, devido à peroxidação lipídica que destrói componentes estruturais da membrana; inativação enzimática, promovida pela alcalinização do meio; e dano ao DNA, pois os íons hidroxila reagem com o DNA bacteriano, inibindo sua replicação e gerando desarranjo da atividade celular (LOPES & SIQUEIRA JR., 2010).

A principal característica do hidróxido de cálcio é o seu poder alcalinizante. Porém, diferentes níveis de pH são observados ao longo da estrutura dentária após a introdução desse medicamento, tendo pH superior a 12,2 na luz do canal dentário e pH de 7,4 a 9,6 na dentina mais periférica. Uma vez que *E. faecalis* pode sobreviver em meio extremamente alcalino, os diferentes níveis de pH podem influenciar negativamente o resultado do tratamento (TRONSTAD *et al.*, 1981).

Mesmo que vários estudos já tenham comprovado a ação letal do hidróxido de cálcio sobre micro-organismos, essa ação só é observada quando a substância é colocada em contato direto com os microrganismos (SJÖGREN *et al.* 1991; SIQUEIRA JR & UZEDA, 1997; GOMES *et al.*, 2002), uma vez que o hidróxido de cálcio não possui ação satisfatória sobre micro-organismos resistentes presentes dentro dos

túbulos dentinários. ORSTAVIK & HAAPASALO (1990) observaram que o hidróxido de cálcio leva até 10 dias para desinfetar túbulos dentinários contaminados por bactérias facultativas. SAFAVI *et al.* (1990) e SUKAWAT & SRISUWAN (2002) relataram que, mesmo após tratamento com pasta de hidróxido de cálcio em solução salina por longos períodos, células de *E. faecalis* permaneciam viáveis nos túbulos dentinários.

2.4-2) Clorexidina

A clorexidina é uma bisguanida catiônica sintética, praticamente insolúvel em água e que possui atividade antibacteriana ótima numa faixa de pH de 5,5 e 7. Essa ação ocorre devido a interação da molécula de clorexidina, que é catiônica, com a membrana celular bacteriana, que é carregada negativamente (RUSSEL *et al.*, 1993).

Quando a clorexidina é empregada em baixas concentrações ocorre ruptura da membrana celular da bactéria, permitindo a saída de substâncias de baixo peso molecular, como o fósforo e o potássio. Ainda mais, a nível de membrana, a clorexidina pode inibir a atividade de algumas enzimas, como a adenosina trifosfatase. Tais mecanismos representam o efeito bacteriostático da substância. Em função deste grau de atividade, pequenas concentrações de sais de clorexidina são geralmente suficientes para inibir o processo reprodutivo ou exterminar a maioria das espécies bacterianas. Além disso, é praticamente isenta de toxicidade e efeitos corrosivos, proporcionando extrema segurança no seu emprego (DENTON, 1991).

A ação bactericida ocorre quando a clorexidina é empregada em altas concentrações e onde a injúria à membrana celular é maior, o que leva ao extravasamento de substâncias de alta massa molar, como os ácidos nucléicos. A clorexidina mostrou ser ativa contra um grande número de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, aeróbicas e anaeróbicas e fungos (DENTON, 1991).

Outra propriedade da clorexidina é a substantividade, ou seja, ela mantém sua ação antibacteriana por tempo prolongado. Isto se deve à sua capacidade de

adsorção, isto é, aderir-se a substratos aniônicos, como a hidroxiapatita, à película dental adquirida, glicoproteínas salivares e membranas mucosas. A substância é lentamente liberada à medida que sua concentração decresce no meio, resultando em prolongado efeito antibacteriano (LOPES *et al.*,1999). Porém essa propriedade depende da concentração e do tempo de aplicação da clorexidina, sendo necessária a sua utilização pelo período de 7 dias.

A clorexidina pode ser utilizada em duas diferentes formulações, líquida e gel, e diferentes concentrações, sendo as mais comuns: 0,12% (usada como enxaguatório bucal) e 2% (usada como substância irrigadora e medicação intracanal). Quando está sob a forma de gel, a clorexidina também apresenta a capacidade de eliminar *smear layer*, que é a lama dentinária formada durante o preparo químico-mecânico (FERRAZ *et al.*, 2001).

VIANNA *et al.* (2004) compararam a ação antimicrobiana de diferentes concentrações de clorexidina, nas formulações gel e líquida, com diferentes concentrações de hipoclorito de sódio (NaOCl), a solução irrigadora mais utilizada durante o tratamento endodôntico. A clorexidina 2%, tanto gel quanto líquida, foi capaz de eliminar *Staphylococcus aureus* e *C. albicans* em 15 segundos, enquanto a formulação gel desta concentração foi capaz de matar *E. faecalis* em 1 minuto. As concentrações de 1% e 2 % da clorexidina líquida levaram o mesmo tempo para eliminar todos os micro-organismos testados nesse estudo que o NaOCl 5,25%.

LENET *et al.* (2000) avaliaram, em dentes bovinos, a ação antimicrobiana contra *E. faecalis* da clorexidina 2% gel, de um dispositivo de liberação controlada de clorexidina 25% e pasta de hidróxido de cálcio com soro. A contaminação por *E. faecalis* pelo período de 21 dias ocorreu após as medicações estudadas permanecerem no interior do canal dos dentes bovinos por 7 dias. Para avaliar a ação antimicrobiana, foram usadas raspas de dentina que variavam de 0,1 a 0,45 mm de profundidade. O dispositivo contendo clorexidina apresentou ação antimicrobiana maior que a pasta de hidróxido de cálcio em profundidade de até 0,2 mm. Já a

clorexidina 2% gel foi o medicamento que apresentou maior ação antimicrobiana em todas as profundidades de dentina testadas pelo estudo.

SOUZA-FILHO *et al.* (2003) fizeram um estudo *in vitro* sobre a eficácia da clorexidina gel a 2% e hidróxido de cálcio sobre o *E. faecalis* em dentina radicular bovina e observaram que a clorexidina gel sozinha inibiu completamente o crescimento do *E. faecalis* após um período de 1, 2, 7 e 15 dias, enquanto que o hidróxido de cálcio permitiu o crescimento microbiano em todos os períodos do experimentais. A combinação de clorexidina com o hidróxido de cálcio foi eficiente durante os períodos de 1 e 2 dias porém sua atividade antibacteriana ficou reduzida após os períodos de 7 e 15 dias.

Em outro trabalho, o mesmo grupo realizou um outro estudo avaliando a atividade antimicrobiana da clorexidina gel 2% e hidróxido de cálcio, puros ou associados a outros materiais. Nele foi confirmado que a clorexidina gel 2% continua sendo o medicamento mais eficaz contra micro-organismos, sendo seguido pelo hidróxido de cálcio associado ao iodofórmio (SOUZA-FILHO *et al.*,2008).

2.5) Quitosana

A quitosana é um polímero policatiônico linear obtida através da desacetilação da quitina em meio básico (Figura 2.2). A molécula de quitosana apresenta grupos 2-amino- 2- desoxi- D- glicopirranose e 2- acetamido- 2- desoxi- D- glicopirranose, unidos por ligações β (1 \rightarrow 4). Como o processo de desacetilação é parcial, variando de acordo com a fonte de extração e os procedimentos de manufatura do polímero, sua massa molar pode variar entre 300 e 1000 kg/mol, com graus de desacetilação de 30-95 %. A quitosana possui 3 tipos de grupos funcionais reativos, um grupo amino e grupos

hidroxilas primários e secundários presentes nos carbonos 2, 3 e 6, respectivamente (RABEA *et al.*, 2003; IN-YONG KIM *et al.*, 2008).

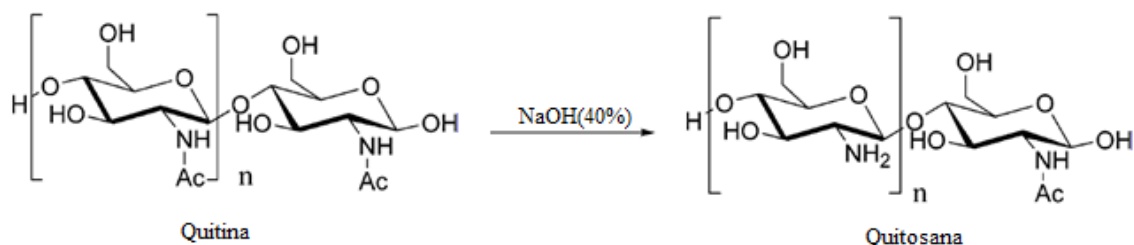


Figura 2.2: Desacetilação da quitina. Adaptado de RABEA *et al.* (2003).

A quitina é um polímero linear cuja unidade repetitiva é um homossacarídeo composto por 2- acetamido- 2- desoxi- D- glicopiranosose, unidas por ligações $\beta(1\rightarrow4)$. Possui estruturas polimórficas denominadas α -, β - e γ - quitina, sendo a α - quitina a mais abundante e estável. É a segunda substância orgânica mais abundante do planeta, sendo ultrapassada apenas pela celulose. Pode ser encontrada no exoesqueleto de invertebrados, como crustáceos, e na parede celular de fungos. É hidrofóbica, insolúvel em água e na maioria dos solventes orgânicos, biocompatível, atóxico, biodegradável, e tem como vantagem a facilidade de obtenção, uma vez que pode ser obtida dos rejeitos da indústria pesqueira, como cascas de camarão e carapaças de caranguejos (YANG & HON, 2009; SHARMA *et al.*, 2009; ANITHA *et al.*, 2009; CAMPANA-FILHO *et al.*, 2007).

A quitosana é uma base fraca devido aos grupos amina primários e que pode tornar-se solúvel em soluções ácidas diluídas com pH abaixo de 6. O ácido acético a 1% com pH 4 é o solvente mais comumente usado (WILSON *et al.*, 2009; SHARMA *et al.*, 2009). A solubilidade da quitosana vai depender do grau de desacetilação, do método de desacetilação e do pH do meio. Em pH baixo, os grupos aminos se tornam protonados e carregados positivamente, tornando a quitosana solúvel; já em pH acima

de 6, os grupos aminos se tornam desprotonados e o polímero perde sua carga, tornando-se insolúvel (SHARMA *et al.*, 2009).

Devido a sua natureza policatiônica, a quitosana e seus derivados podem ser usados em diferentes áreas como biomedicina, biotecnologia, agricultura, e nas indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética (QI *et al.*, 2004). Pode ser encontrada comercialmente nas formas de flocos secos, pó fino e solução (WILSON *et al.*, 2009) e pode ser preparada em diferentes formas, como géis, membranas, filmes, microesferas e nanopartículas tendo, por isso, uma grande variedade de aplicações (CAMPANA-FILHO *et al.*, 2007).

Possui ação antimicrobiana apenas em meio ácido, agindo em fungos e bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Os mecanismos de sua ação antimicrobiana ainda não foram totalmente elucidados, mas acredita-se que a interação entre as moléculas positivamente carregadas da quitosana e a membrana celular negativamente carregada dos micro-organismos altere a permeabilidade celular, levando ao extravasamento de constituintes intracelulares e, conseqüentemente, à morte do microrganismo (QI *et al.*, 2004; QI *et al.*, 2005; RABEA *et al.*, 2003).

A atividade antimicrobiana da quitosana é influenciada pelo seu tamanho, forma, carga superficial, e também pelas propriedades físico-químicas do polímero, como grau de desacetilação e massa molar. Quitosana de baixa massa molar tem maior efeito bactericida contra as bactérias Gram-negativas, enquanto a quitosana de alta massa molar tem maior efeito contra as Gram-positivas (QI *et al.*, 2004; ALI *et al.*, 2010; KWON & HUH, 2011). Possivelmente, isso ocorre devido a diferenças intrínsecas da estrutura das paredes celulares dessas bactérias. FERNANDES *et al.* (2008) testaram quitosana com diferentes massas molares (628, 591 e 107 kg/mol) e com graus de desacetilação de 80-85% e estes autores sugeriram que as bactérias Gram-negativas possuem parede celular mais fina, tornando mais fácil a penetração da quitosana de baixa massa molar enquanto que nas Gram-positivas, que possuem

uma parede celular mais rígida, uma barreira mecânica é formada pelas quitosanas de alta massa molar, impedindo a absorção de nutrientes (FERNANDES *et al.*, 2008).

Outra propriedade importante da quitosana é seu efeito quelante, podendo ligar-se a gorduras, proteínas, células tumorais e íons metálicos, sendo este último responsável por inibir a produção de toxinas e multiplicação dos microrganismos. Pode também se ligar ao DNA, inibindo a síntese de RNAm e proteínas, caso a quitosana consiga penetrar no núcleo dos micro-organismos (RABEA *et al.*, 2003).

BALLAL *et al.* (2009) analisaram a atividade antimicrobiana da clorexidina 2% gel, da quitosana 2% gel e da união dessas soluções contra *C. albicans* e *E. faecalis in vitro*. Os autores concluíram que a combinação de clorexidina 2% gel e quitosana 2% gel apresentou a maior atividade antimicrobiana, apresentando halo de inibição de 25,2 mm para *C. albicans* e 26,0 mm para *E. faecalis*.

ELSAKA *et al.* (2012) avaliaram a atividade antibacteriana contra *E. faecalis* de um *primer* auto-condicionante modificado por diferentes concentrações de quitosana. Os autores concluíram que, após a incorporação de quitosana, o *primer* apresentou uma potente ação contra *E. faecalis* sem prejudicar sua adesão à dentina radicular.

2.6) Nanopartículas de quitosana

A nanotecnologia é um campo científico multidisciplinar com a capacidade de sintetizar, manipular e caracterizar nanomateriais, tendo como objetivo o desenvolvimento, a caracterização, a produção e a aplicação de estruturas, dispositivos e sistemas com forma e tamanho na escala nanométrica. Nanomateriais são materiais estruturados com pelo menos 1 dimensão menor que 100 nm, tendo como principais propriedades o efeito quântico e elevada energia de superfície.

Pela reduzida escala em que atua esta tecnologia, é possível sintetizar o material da forma que for mais adequada à utilização desejada, modificando o arranjo de átomos e moléculas, visando um produto final mais resistente, mais barato, mais leve, mais preciso, mais puro e mais adequado. Neste sentido, a nanotecnologia possui o poder de revolucionar a forma com que se imagina, trata e manuseia a formação de materiais (PINA *et al.*, 2006).

O potencial zeta mede a carga da superfície das partículas. Quanto maior é o potencial zeta, maior é a carga da superfície, tornando mais forte a interação das nanopartículas com a membrana celular, aumentando, dessa forma, sua citotoxicidade (QI *et al.*, 2004; WILSON *et al.*, 2009).

A quitosana é um polissacarídeo catiônico de estrutura rígida e que possui ligações de hidrogênio inter e intramoleculares. Esse polímero possui a capacidade de formar ligações cruzadas quando em contato com poliânions específicos, como o tripolifosfato (TPP), levando a um processo de reticulação inter e intramolecular chamado gelificação. Devido a essa habilidade, a gelificação iônica é o método mais utilizado para a produção de NPCCS, sendo citado em diversos artigos (QUI *et al.*, 2004; SHI *et al.*, 2006; KISHEN *et al.*, 2008; SHRESTHA *et al.*, 2012; VAEZIFAR *et al.*, 2013). As NPCCS são formadas através das interações entre os grupos amino carregados positivamente da quitosana, em meio ácido, e os grupos fosfatos carregados negativamente do TPP, em meio básico (SHI *et al.*, 2006). Ao gotear o TPP na solução de quitosana diluída em ácido acético há a formação imediata das NPCCS, o que pode ser observado pela turvação do meio. Porém, esse método forma nanopartículas com baixa resistência mecânica, o que limita seu emprego a liberação de fármacos (AGNIHOTRI *et al.*, 2004).

As nanopartículas podem atuar como carreadores de fármacos sendo classificadas em duas categorias, as nanoesferas e as nanocápsulas, as quais diferem entre si segundo a composição e a organização estrutural. As nanocápsulas são sistemas vesiculares em que o fármaco encontra-se no interior de uma cavidade

aquosa ou oleosa circundada por uma membrana polimérica, ou podendo também ser encontrado adsorvido na membrana polimérica. As nanoesferas são formadas por uma matriz polimérica, onde o fármaco encontra-se disperso ou adsorvido (ABDELWAHED *et al.*, 2006). As NPCS também podem ser usadas como agentes de liberação controlada de antibióticos, como amoxicilina e metronidazol (QI *et al.*, 2004).

Uma das principais propriedades das NPCS é a sua atividade antimicrobiana, estando ela intimamente ligada a mudanças de tamanho, forma e carga das nanopartículas. Estas características podem variar através de alterações de determinados parâmetros durante o processo de gelificação iônica, como: concentração das soluções de quitosana e TPP, pH das soluções de quitosana e TPP, relação peso quitosana/TPP, temperatura da solução de quitosana e o tempo de reação. O pH da solução de quitosana é considerado o principal parâmetro uma vez que quanto mais ácida é a solução, maior é o número de grupos amino livres para reagirem com os grupos fosfatos do TPP, aumentando dessa forma a atividade bactericida das NPCS (ALI *et al.*, 2010; VAEZIFAR *et al.*, 2013). Devido ao fato de possuírem uma maior carga em sua superfície e maior área superficial, as NPCS exibem maior atividade antibacteriana que a quitosana em si uma vez que podem interagir mais com as bactérias, que possuem carga negativa, levando ao rompimento da membrana bacteriana e morte celular (QI *et al.*, 2004).

SHI *et al.* (2006) concluíram em seu estudo que a incorporação de NPCS em cimento ósseo proporcionou um aumento de sua atividade antibacteriana contra *S. aureus* e *S. epidermis*. As propriedades mecânicas do cimento ósseo não foram comprometidas pela adição das nanopartículas, desde que estas fossem uniformemente misturadas ao cimento.

Ainda não há um consenso sobre a melhora do efeito bactericida de cimentos endodônticos acrescidos de NPCS. KISHEN *et al.* (2008) avaliaram o efeito bactericida de nanopartículas catiônicas quando misturadas em cimento endodôntico a base de óxido de zinco e eugenol (Grossman Type 801) e a eficácia dessas mesmas

nanopartículas em prevenir a aderência de bactérias à dentina radicular. Para isso foram usadas nanopartículas de óxido de zinco, de quitosana, de óxido de zinco misturado com quitosana, e de óxido de zinco recoberto por múltiplas camadas de quitosana. Os autores concluíram que a incorporação das nanopartículas não alterou a fluidez do cimento e foi capaz de melhorar não só a ação antimicrobiana como também a capacidade do cimento liberar componentes bactericidas. Esse estudo também mostrou que houve uma redução significativa da aderência de *E. faecalis* à dentinas tratadas com nanopartículas. Com base nos estudos *in vitro*, pode-se concluir que o uso de nanopartículas no tratamento endodôntico poderia evitar a recolonização e formação de biofilme *in vivo* por esta espécie (ALLAKER, 2010).

Mesmo que as NPCS tenham um maior potencial zeta e melhor propriedade bactericida em bactérias em estado planctônico que as nanopartículas de óxido de zinco, sua atividade antibacteriana se torna bastante reduzida quando misturada a cimentos endodônticos (KISHEN *et al.*, 2008). BLANCO (2011) ao avaliar a influência de NPCS liofilizadas na ação bactericida do cimento AH Plus[®], constatou que as nanopartículas não potencializaram o poder antibacteriano do cimento. Porém não se sabe se a ausência desse efeito está relacionada à inefetividade das NPCS ou ao fato deste cimento ser inerte.

SHRESTHA *et al.* (2010) avaliaram a atividade de NPCS sobre biofilme bacteriano e concluíram que as nanopartículas são eficazes em reduzir o biofilme bacteriano, romper a estrutura do biofilme e manter-se ativo mesmo após envelhecimento, sendo a taxa de morte bacteriana dependente da concentração e do tempo de interação.

Em outro trabalho, o mesmo grupo avaliou a atividade antibacteriana contra *E. faecalis* de nanopartículas de quitosana na presença de tecidos inibidores, como dentina, matriz dentinária, tecido pulpar, lipopolissacarídeos bacterianos e soro de albumina bovina. Quando as nanopartículas encontravam-se sem inibidores ou sob a presença de dentina, matriz dentinária e lipopolissacarídeos bacterianos, o *E. faecalis*

era totalmente eliminado dentro de 24 h. Porém, na presença de tecido pulpar e soro de albumina bovina, a redução bacteriana era de apenas 27% e 40%, respectivamente (SHRESTHA *et al.*, 2012).

DaSilva *et al.* (2013) avaliaram a formação de biofilme de *E. faecalis* na interface cimento-dentina de segmentos de raízes bovinas obturadas com gutta-percha e cimento de óxido de zinco e eugenol incorporado com NPCS sem modificações de superfície e com modificações: NPCS fosforilada, NPCS conjugada ao corante rosa bengala (“*rose bengal*”) e irradiação fotodinâmica, e NPCS com combinação das duas modificações. As NPCS sem modificações incorporadas ao cimento endodôntico inibiram a formação de biofilme na interface cimento-dentina. Esse efeito foi mantido quando os canais foram tratados com as NPCS fosforiladas, enquanto que o tratamento com as NPCS conjugadas ao corante e irradiação fotodinâmica promoveu uma inibição apenas moderada. Esse resultado mostra que a simples incorporação de NPCS ao cimento endodôntico já é suficiente para inibir a formação de biofilme, não sendo necessário realizar modificações em sua superfície para aumentar essa inibição.

Uma vez que os micro-organismos conseguem penetrar e colonizar profundamente os túbulos dentinários, é importante que os materiais usados na desinfecção dos canais radiculares consigam atingi-los e eliminá-los. SHRESTHA *et al.* (2009) observaram que o uso de ultrassom focado de alta intensidade aumentou significativamente a penetração de NPCS nos túbulos dentinários, podendo chegar a 1000 µm de profundidade.

CAPÍTULO 3

MATERIAIS E MÉTODOS

3.1) Materiais

Os materiais utilizados neste trabalho estão listados na Tabela 3.1.

Tabela 3.1: Materiais utilizados

Materiais	Fabricante	Lote
Quitosana comercial (grau de desacetilação 72,5% e massa molar 86,5 kg/mol)	Polymar Indústria e Com. Imp. Exp. Ltda., Ceará, Brasil	20070629
Tripolifosfato de sódio pentabásico (TPP)	Sigma-Aldrich Chemical Co.Ltd., São Paulo, Brasil	12409021 1436920
Ácido acético glacial P.A.	Vetec Química fina Ltda	0903976
Micropérolas de Hidróxido de Sódio (NaOH) P.A.	Vetec Química Fina Ltda.	1002643
Clorexidina 2% gel	Farmácia Mil Fórmulas, Rio de Janeiro, Brasil	

Tetraetil Rodamina (Rodamina B)	Proquimios, Rio de Janeiro, Brasil	110653
Hipoclorito de sódio 5,25%	Uraby Química Ind. Com. Ltda., Rio de Janeiro, Brasil	70212
Ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA 17%)	Biodinâmica, Paraná, Brasil	
Tiosulfato de sódio 5%	Farmácia Mil Fórmulas, Rio de Janeiro, Brasil	

3.2) Produção das nanopartículas

3.2-1) Purificação da quitosana

A quitosana foi purificada por meio da dissolução de 1 g do polímero em 300 ml de solução de ácido acético diluída 1% (v/v). A solução permaneceu por 24 h a temperatura ambiente sob agitação magnética. Em seguida, a solução foi filtrada a vácuo, descartando as impurezas retidas no disco de papel de filtro. Ao adicionar 30 ml de solução aquosa de hidróxido de sódio (NaOH) 2 M ocorreu a precipitação de quitosana. O precipitado foi separado por filtração a vácuo e seco a temperatura ambiente (BLANCO, 2011).

3.2-2) Produção das nanopartículas pelo método de gelificação iônica

As PCS foram preparadas pelo método de gelificação iônica com base no método descrito por BLANCO (2011). A quitosana purificada (CS) foi dissolvida a 0,5% (p/v) em solução de ácido acético 1% (v/v). O pH original da solução foi ajustado para 4,7 através da adição de solução de NaOH, após 24 h sob agitação em temperatura ambiente. As PCS foram formadas após o gotejamento de solução aquosa de tripolifosfato de sódio (TPP) 0,25% (p/v) à solução de CS na razão 1:3 (v/v), sob agitação de 1.000 rpm. O gotejamento foi feito por intermédio de uma bomba dosadora peristáltica GILSON (Modelo Minipuls 3) com Agulha BD PrecisionGlide™ com 0,55 mm de diâmetro. A liofilização foi o método de escolha para realizar a secagem das nanopartículas (BLANCO, 2011).

A liofilização é um processo de secagem por congelamento a vácuo no qual todo o solvente é sublimado, restando apenas as nanopartículas secas. Para a confecção das amostras liofilizadas, as PCS foram separadas por centrifugação a 3500 rpm por 30 min a temperatura ambiente e lavadas abundantemente com água destilada para remoção de qualquer traço de NaOH. Utilizou-se um homogenizador Ultra Turrax T25 a 8.000 rpm por 5 min para obter uma suspensão homogênea. Esta suspensão foi imediatamente congelada em nitrogênio líquido e em seguida, liofilizada pelo LIOFILIZADOR L101 (LIOTOP) apresentado na Figura 3.1.



Figura 3.1: Liofilizador usado no processo de secagem das PCS.

3.3) Caracterização das partículas

3.3-1) Espectroscopia no infravermelho (FTIR)

As caracterizações químicas das PCS e da quitosana comercial foram feitas por espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) com auxílio do equipamento PERKIN ELMER/ SPECTRUM 100. As amostras foram colocadas diretamente sobre o cristal do equipamento, não havendo necessidade de confeccionar pastilhas de KBr. As aquisições foram realizadas no intervalo de 550 a 4.000 cm^{-1} , com 32 varreduras.

3.3-2) Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Foram feitas as análises de duas amostras: uma depositando-se uma gota da suspensão de PCS (0,01 g de NPCCS em 40 ml de água destilada) sobre o porta-amostra, aguardando-se a evaporação do solvente; e outra depositando-se as PCS secas diretamente no porta-amostra. Posteriormente, as amostras foram recobertas com uma fina camada de ouro obtida por pulverização a vácuo. As micrografias das PCS foram obtidas com o auxílio de um microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM (modelo 6460 LV), operando a 15 KV (PCS em suspensão) e 20 KV (PCS secas).

3.3-3) Espalhamento de luz

A distribuição do tamanho das PCS foi determinada pela técnica de espalhamento de luz com auxílio do equipamento ZETASIZER/NANO-ZS. As amostras foram dispersas em homogenizador Ultra Turrax T25 a 8.000 rpm por 5 min. Após essa etapa as amostras foram passadas imediatamente para o equipamento para dar início a leitura.

3.3-4) Potencial zeta

O potencial zeta das PCS foi medido utilizando um analisador de potencial zeta MARK II – RANK BROTHERS, a temperatura ambiente. Para cada amostra foram misturados 0,02 g de PCS com 40 ml de solução de KCl 10^{-3} M. Para cada amostra

foram realizadas leituras no pH original da suspensão e em pH neutro. O pH de cada suspensão foi ajustado para 7,0 com o auxílio de soluções de NaOH 0,1 M e HCl 0,1 M. As análises foram realizadas em triplicata e a média de cada grupo foi calculada.

3.4) Teste de Concentração Mínima Inibitória (CMI)

3.4-1) Preparação do inóculo

O meio de cultura utilizado foi o Muller-Hinton (MH). Os inóculos foram padronizados a partir de uma cultura pura de *E. faecalis* ATCC 29212 e *C. albicans* ATCC 21433. Para isso, a partir de um crescimento recente (24h a 37°C, em aerobiose) em placa contendo o meio de agar sangue, para *E. faecalis*, e agar comum, para *C. albicans*, várias colônias foram suspensas em caldo MH, utilizando-se como padrão a escala 0,5 de McFarland (concentração final de aproximadamente $1,5 \times 10^8$ ufc/ml). Em seguida, várias diluições foram realizadas até chegar à concentração final de $1,5 \times 10^5$ ufc/ml.

3.4-2) Realização do teste

Os testes microbiológicos foram realizados em placa de 96 poços. 20 mg de PCS foram diluídas em 1 ml de água destilada e promovendo uma diluição seriada até a concentração de 0,62 mg/ml. 10 µl de cada diluição foram incorporadas a poços contendo 100 µl do inóculo de *E. faecalis* e *C. albicans* (razão 1:10) pelo período de 48 h. O controle positivo foi feito com uma solução contendo apenas o inóculo e o controle negativo foi feito contendo apenas o meio de cultura MH. Os testes foram realizados em triplicata e a CMI foi determinada através da leitura visual das amostras.

Para determinar se as PCS possuíam ação bactericida ou bacteriostática, foi realizado o plaqueamento em ágar cromogênico utilizando as CMI de cada espécie e o controle positivo. A leitura do teste foi feita após as placas permanecerem a 37°C por 48 h. Todas as etapas deste teste foram realizadas no laboratório de Microbiologia Oral do Instituto Prof. Paulo de Góes da UFRJ.

3.5) Seleção dos dentes

Foram utilizados 70 dentes unirradiculares permanentes extraídos por motivos terapêuticos e não relacionados a este estudo. Os critérios de inclusão foram dentes com o ápice completamente formado, sem tratamento endodôntico, com classificação anatômica em relação a curvatura classes I ou II (Schneider, 1971) e sem calcificações e reabsorções. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética do Instituto de Estudos em Saúde Coletiva (IESC) da UFRJ (ANEXO).

Após extração, os dentes foram imediatamente armazenados em frascos estéreis contendo formol a 10%. Posteriormente, foram limpos e escovados. Com a utilização de curetas periodontais (Hu-Friedy, Chicago, IL, EUA) as superfícies externas das raízes foram raspadas e alisadas para a remoção de possíveis remanescentes de tecido periodontal ou ósseo. Para evitar contaminação do ambiente, a superfície externa dos dentes foi protegida por duas camadas de esmalte para unhas. Em seguida, os dentes foram autoclavados por 20 min a 121°C. A presença de um único canal foi determinada por radiografias tiradas nas direções mesio-distal e vestibulo-lingual (MIRANDA, 2011).

3.6) Preparo dos dentes

O preparo dos dentes foi realizado conforme descrito por MIRANDA (2011). O acesso à câmara pulpar foi realizado com o auxílio de brocas esféricas e tronco-cônicas, compatíveis com o tamanho da coroa, em alta rotação com irrigação constante para conferir a expulsividade desejada ao preparo da cavidade de acesso. Os dentes tiveram seu comprimento de trabalho padronizado até 20,0 mm e o comprimento de patência a 20,5 mm através de desgaste da coroa, realizado com brocas utilizando o motor de alta rotação. Estes foram estabelecidos através da introdução de uma lima manual tipo Kerr #10 ou #15 (Dentsply/Maillefer, Ballaigues, Switzerland), até a mesma ser visualizada no forame apical (visualização direta). Em seguida, foi realizado o esvaziamento do conteúdo do canal radicular por meio de solução de NaOCl a 5,25% e lima tipo Kerr manual #10 (Dentsply, Maillefer, Ballaigues, Suíça). O preparo inicial foi padronizado para que os dentes apresentassem a constricção apical com o tamanho de uma lima #20 no comprimento de patência, utilizando-se irrigação abundante com NaOCl a 5,25%.

A instrumentação em todos os grupos foi realizada com o uso de limas rotatórias ProTaper (Dentsply, Maillefer), de acordo com a recomendação do fabricante. Para os terços cervical e médio (CT equivalente a 16 mm), foram usadas as limas S1 e S2; e para o terço apical (CT apical equivalente a 20 mm), as limas S1 e S2, seguidas pelas limas F1, F2, F3 e F4 (nesta ordem), para um término de preparo apical equivalente a uma lima Kerr #40. Esta etapa foi realizada na Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro (FO-UFRJ), no Departamento de Clínica Odontológica.

Para a irrigação final foram utilizados 5 ml de NaOCl a 5,25%; seguido de 3 ml de EDTA a 17% por 5 min no agitador; 5 ml de NaOCl a 5,25%; 1 ml de tiosulfato de

sódio a 5% e finalmente com 5 ml de água destilada. Após estes procedimentos, os dentes foram secos e preparados para a esterilização.

3.7) Penetração das PCS nos túbulos dentinários

3.7-1) Preparo dos dentes e análise por MEV

A suspensão de PCS foi preparada utilizando-se a concentração determinada como sendo a CMI do *E. faecalis* (0,25 mg/ml) e homogeneizada pelo Ultra Turrax T25 a 8000 rpm, por 5 min. Após esse preparo, as soluções foram colocadas no interior do canal dos dentes previamente preparados com o auxílio de uma seringa de 10 ml e agitadas com uma lima nº 25 acoplada a um ultrassom odontológico na frequência de 20 KHz (Nac Plus, modelo V150, São Paulo, Brasil), sendo o dente posteriormente selado com coltosol (Vigodent, Rio de Janeiro, Brasil), como apresentado na Figura 3.2. A utilização do ultrassom odontológico teve o intuito de potencializar a penetração das PCS nos túbulos dentinários. Os dentes foram divididos em 3 grupos contendo 10 dentes cada. Posteriormente, as amostras foram divididas em 2 subgrupos: o 1º analisado logo após a estimulação com o ultrassom e o 2º, após um período de 7 dias (Tabela 3.2).

- Grupo 1: 5 ml da suspensão foram ativadas com o auxílio de um ultrassom odontológico por 5 minutos.
 - Subgrupo 1a- remoção imediata da suspensão contendo PCS com o auxílio de 5 ml de água destilada;
 - Subgrupo 1b- remoção da suspensão contendo PCS com o auxílio de 5 ml de água destilada após 7 dias.

- Grupo 2: 5 ml da suspensão foram ativadas com o auxílio de um ultrassom odontológico por 10 minutos.
 - Subgrupo 2a- remoção imediata da suspensão contendo PCS com o auxílio de 5 ml de água destilada;
 - Subgrupo 2b- remoção da suspensão contendo PCS com o auxílio de 5 ml de água destilada após 7 dias.
- Grupo 3: 8 ml da suspensão foram ativadas com o auxílio de um ultrassom odontológico por 15 minutos.
 - Subgrupo 3a- remoção imediata da suspensão contendo PCS com o auxílio de 5 ml de água destilada;
 - Subgrupo 3b- remoção da suspensão contendo PCS com o auxílio de 5 ml de água destilada após 7 dias.

Tabela 3.2: Grupos usados no teste de penetração das PCS nos túbulos dentinários.

Amostras	Tempo de ultrassom (min)	Intervalo para análise
Grupo 1	5	
Subgrupo 1a	5	Imediato
Subgrupo 1b	5	7 dias
Grupo 2	10	
Subgrupo 2a	10	Imediato
Subgrupo 2b	10	7 dias
Grupo 3	15	
Subgrupo 3a	15	Imediato
Subgrupo 3b	15	7 dias



Figura 3.2: Imagem do ultrassom usado nessa etapa (A) e a forma como as PCS foram agitadas no interior dos canais (B).

Para fazer a análise da penetração das PCS nos túbulos dentinários, os dentes foram seccionados no sentido transversal nos 3 diferentes terços do canal (cervical, médio e apical). Com o auxílio de um disco diamantado flexível duplo (KG Sorensen, São Paulo, Brasil) foram feitos sulcos profundos para delimitar cada terço do dente. Após essa etapa, os dentes foram colocados em uma pequena quantidade de silicone de condensação (Vigodent, Rio de Janeiro, Brasil) e clivados com o auxílio de uma faca de gesso e um martelo, como apresentado na Figura 3.3.

Os fragmentos dentários foram colocados em um suporte metálico, recobertos com ouro e levadas para análise no MEV JEOL JSM (modelo 6460 LV), operando a 20 kV. A fim de evitar o aquecimento excessivo dos dentes durante a agitação com o ultrassom, foram feitas algumas pausas durante o processo. Quando o dente começava a aquecer, a agitação era interrompida e uma nova irrigação com suspensão de PCS era realizada.



Figura 3.3: Imagens do processo de clivagem (A) e do dente clivado (B).

3.7-2) Preparo dos dentes e análise por Microscopia Ótica de fluorescência

Para confirmar a penetração das PCS, também foi realizado um teste de fluorescência, sendo utilizado um microscópio ótico invertido de fluorescência LEICA (modelo DM IL LED FLUO). A suspensão fluorescente de PCS foi preparada adicionando-se 250 µl de Rodamina B a 10 ml de suspensão aquosa de NPCCS (0,25 mg/ml). Após 24 h de agitação, foi feita a remoção do excesso de Rodamina B através de repetidas lavagens com álcool comum, usando centrífuga (CIENTEC, modelo CT-4000) a 3000 rpm por 10 min. Ao final da lavagem, foi acrescentado 10 ml de água destilada em cada amostra e essa suspensão, após agitação no Test Tube Shaker (modelo TTS 2), foi utilizada para irrigar os canais dos dentes previamente preparados, com o auxílio de um ultrassom odontológico, por 10 min. Foram usados 5 ml de água destilada para remover essa suspensão dos canais radiculares e os

dentes, depois de secos, foram clivados em sentido transversal, utilizando-se a mesma técnica descrita no item 3.7-1. O cubo N21 foi usado para a visualização da fluorescência da Rodamina B.

3.8) Contaminação dos dentes

Cepas provenientes da *American Type Culture Collection* (ATCC) da espécie *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) foram utilizadas para a contaminação dos espécimes.

A partir de culturas de 24 h de *E. faecalis* em caldo BHI, foi preparada uma suspensão na concentração equivalente a 0,5 da escala de McFarland (1.5×10^8 UFC/ml). Destas, 1600 μ L foram inoculados em cada frasco Erlenmeyer contendo os dentes (o equivalente a 200 μ L por dente), que foram incubados a 37°C por 30 dias, sob agitação de 100 rpm no Gyrotory Water Bath Shaker (modelo 676, NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC, NJ, EUA), como mostra a Figura 3.4. A cada 7 dias foi realizada a troca do meio de cultura (BHI), para evitar a saturação do mesmo (MIRANDA, 2011).

Após os 30 dias, os dentes foram removidos dos frascos Erlenmeyer, secos com gaze estéril e selados na câmara pulpar e forame apical com cera utilidade estéril (TechNew, Rio de Janeiro, Brasil) e godiva (Lysanda, São Paulo, Brasil) respectivamente, para a descontaminação externa inicial. Esta foi realizada através da lavagem com água oxigenada a 10%, NaOCl a 5,25% e solução de tiosulfato de sódio a 5%. Esta etapa foi realizada na Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro (FO-UFRJ), no Departamento de Clínica Odontológica.



Figura 3.4: Processo de contaminação dos dentes por *E. faecalis*.

3.9) Ação antimicrobiana das PCS

A suspensão de PCS foi preparada e introduzida no interior dos canais usando as mesmas técnicas descritas em 3.7-1. Foram utilizados 32 dentes nessa etapa, sendo estes separados em 5 frascos Erlenmeyers contendo caldo contaminado por *E. faecalis*. Para evitar contaminação cruzada, todos os procedimentos desta etapa foram realizados na presença de 3 lamparinas e usando materiais estéreis. Os dentes foram divididos nos seguintes grupos.

Grupo 1: foi utilizada 5 ml de solução salina estéril 0,9% no interior dos canais de 4 dentes contaminados com *E. faecalis* (controle positivo), com remoção imediata;

Grupo 2: foi utilizada 5 ml de suspensão de PCS no interior dos canais de 10 dentes contaminados com *E. faecalis*, com remoção imediata;

Grupo 3: foi utilizada 5 ml de suspensão de PCS no interior dos canais de 10 dentes contaminados com *E. faecalis*, com remoção após 7 dias;

Grupo 4- foi utilizado Clorexidina gel 2% no interior dos canais de 8 dentes contaminados com *E. faecalis*, com remoção após 7 dias (controle negativo).

Apesar de todos os cuidados, um dos frascos Erlenmeyers contendo os dentes sofreu contaminação cruzada. Por isso, o número de amostras para cada grupo ficou desigual. Os dentes nos quais as medicações permaneceram por 7 dias no interior do canal foram mantidos em algodão embebido em água destilada a 37°C para mimetizar o ambiente oral.

Para poder quantificar as unidades formadoras de colônia (UFC), todos os dentes passaram pelo mesmo processo de coleta e repicção em placas de BHI/ágar. Após a desinfecção externa, foram retiradas as ceras que protegiam as entradas das câmaras pulpares e colocada uma pequena quantidade de solução salina em cada um dos dentes. Com os canais umedecidos, foram colocadas 3 pontas de papel estéreis (META BIOMED CO., LTD, Chungbuk, Coréia do Sul) em cada dente, com um intervalo de 1 min entre cada coleta, e estas foram colocadas em eppendorfs contendo 1 ml de solução salina estéril. Cada eppendorf desta etapa foi nomeado usando o número do dente correspondente e a letra A.

A segunda coleta foi realizada após os procedimentos correspondentes a cada grupo, sendo usados 5 ml de solução salina 0,9% estéril para remover o excesso das soluções originais nos grupos 2, 3 e 4. Cada eppendorf desta etapa foi nomeado usando o número do dente correspondente e a letra B.

Após as coletas, o conteúdo dos eppendorfs do subgrupo A foi diluído até a concentração de 10^{-3} , o do subgrupo 1-B foi diluído a 10^{-2} e os subgrupos 2-B, 3-B e 4-B permaneceram puros. 100 µL de cada eppendorf final foram colocados em placas BHI/ágar e espalhados usando uma alça de plástico (etapa realizada em triplicata). Após 48 h em estufa a 37°C, foi realizada a contagem das UFC.

3.10) Análise estatística

Foi realizado o teste-t e Tukey com nível de significância de 10% para analisar diferenças estatisticamente significativas em relação aos grupos do teste da ação antimicrobiana das PCS.

Capítulo 4

Resultados e Discussão

4.1) Caracterização das partículas

4.1-1) Espectroscopia no Infravermelho (FTIR)

A Figura 4.1 apresenta o espectro de FTIR da amostra de quitosana comercial. Na região entre 3700 cm^{-1} e 2600 cm^{-1} , encontram-se bandas correspondentes às vibrações de estiramento dos grupamentos amino (NH_2), a aproximadamente 3360 cm^{-1} , e de grupos hidroxila (OH), por volta de 3280 cm^{-1} , presentes na estrutura química da quitosana (Figura 2.2). A banda em 1645 cm^{-1} corresponde ao estiramento da ligação C=O da Amida I (-CONH₂).

No espectro das PCS (Figura 4.2), verifica-se que ocorreu um deslocamento da banda de absorção antes localizada em 3360 cm^{-1} para 3226 cm^{-1} possivelmente devido à redução das ligações de hidrogênio inter moleculares das moléculas, resultante da estrutura mais aberta resultante da reticulação com TPP. A ligação entre os grupos fosfato (PO_4) do TPP com grupamentos amino ionizados (NH_3^+) da CS pode ser observada pelo deslocamento do pico antes localizado em 1645 cm^{-1} para 1634 cm^{-1} , confirmando a reticulação promovida pelo TPP na quitosana (Figura 4.3). Um pico de absorção em 1157 cm^{-1} , que representa estiramento da ligação P=O, também comprova a presença de TPP nas NPCCS (ALI *et al.*, 2011; VAEZIFAR *et al.*, 2013).

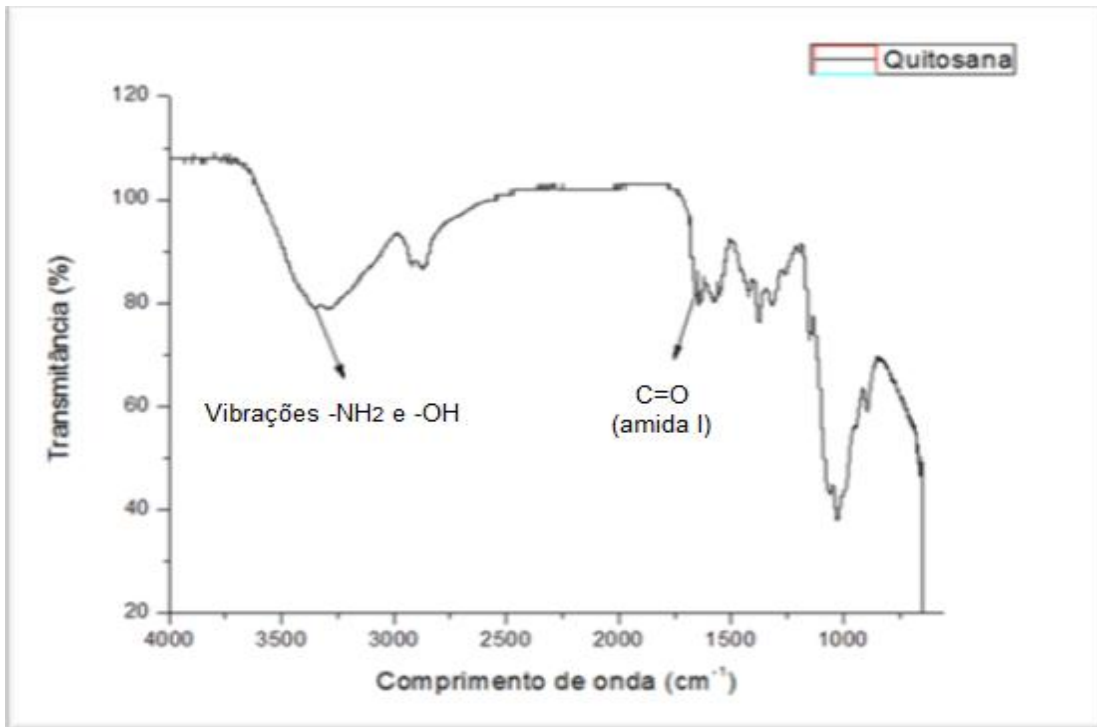


Figura 4.1: Espectroscopia no Infravermelho da amostra de quitosana comercial.

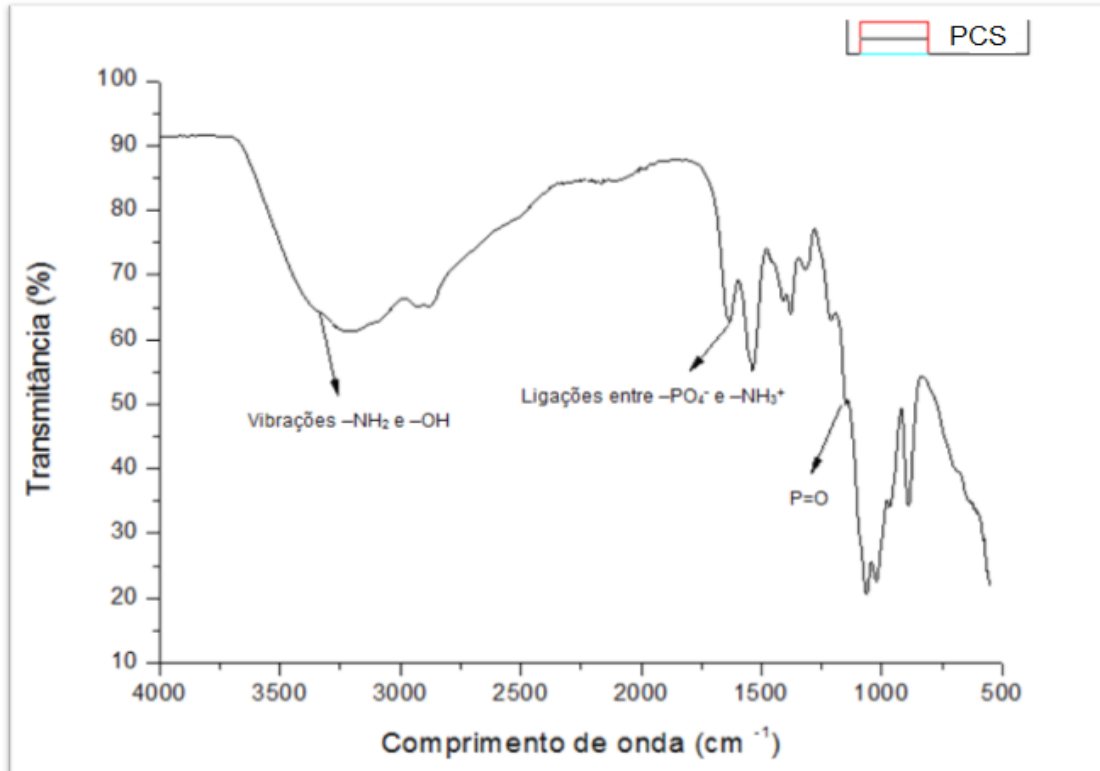


Figura 4.2: Espectroscopia no Infravermelho da amostra de PCS.

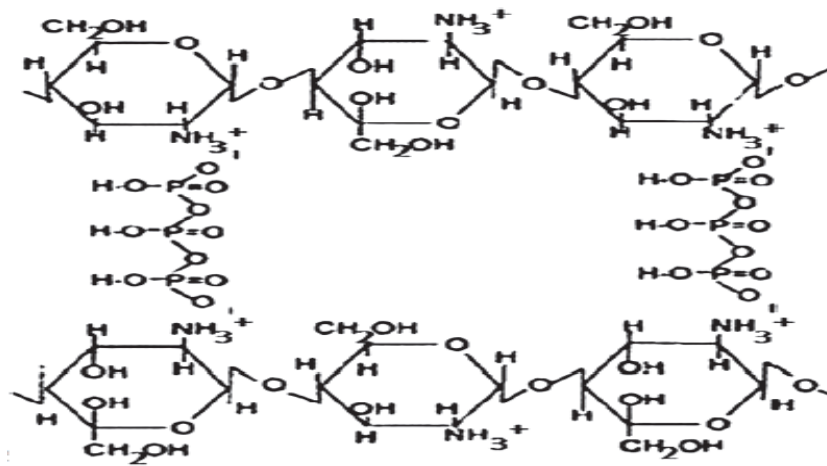


Figura 4.3: Imagem da reticulação da quitosana promovida pelo TPP. Adaptado de ALI *et al.* (2010).

Os dados encontrados nessa análise são compatíveis com os encontrados na literatura. A banda correspondente a vibrações de estiramento dos grupamentos amina das NPCS podem ser encontrados em 3419 cm^{-1} (QI *et al.*,2004), 3428 cm^{-1} (ANITHA *et al.*,2009), 3399 cm^{-1} (ALI *et al.*,2011) e 3436 cm^{-1} (VAEZIFAR *et al.*,2013). O pico relacionado à ligação entre os grupos fosfato do TPP com os íons amônia da CS é encontrado em 1632 cm^{-1} e 1547 cm^{-1} (QI *et al.*,2004), 1641 cm^{-1} (ANITHA *et al.*,2009), 1635 cm^{-1} (ALI *et al.*,2011) e 1657 cm^{-1} (VAEZIFAR *et al.*,2013) e o pico correspondente ao estiramento da ligação P=O é encontrado em 1218 cm^{-1} (ALI *et al.*,2011) e 1155 cm^{-1} (VAEZIFAR *et al.*,2013).

4.1-2) Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As Figuras 4.4 e 4.5 mostram, respectivamente, imagens de MEV das PCS após a liofilização analisadas diretamente sobre o porta-amostra (secas) e previamente dispersas em água destilada. Observa-se que as NPCS secas apresentaram um formato achatado e alongado, semelhante a uma “folha” (Figura

4.4). Por outro lado, ao analisar as micrografias das PCS em suspensão, podem ser observadas regiões contendo aglomerados de partículas mais arredondados (Figura 4.5). É válido ressaltar que, no presente trabalho, as PCS serão avaliadas em suspensão. Sendo assim, é esperado que a morfologia mais arredondada facilite a penetração das PCS nos túbulos dentinários.

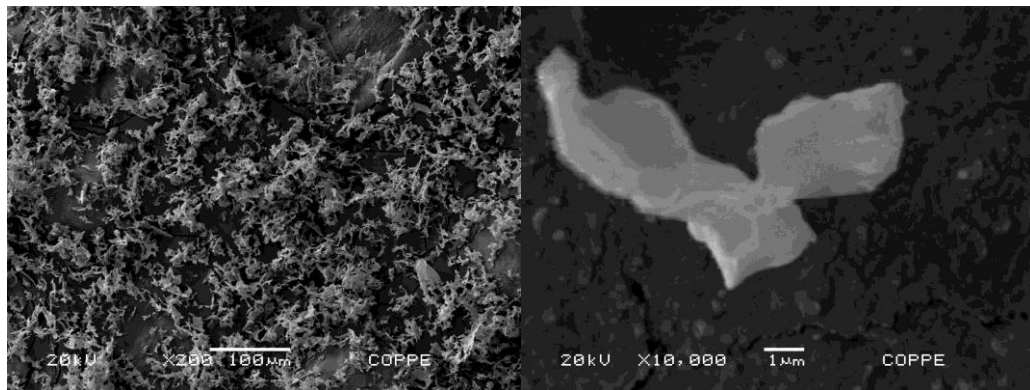


Figura 4.4: Micrografias das PCS secas.

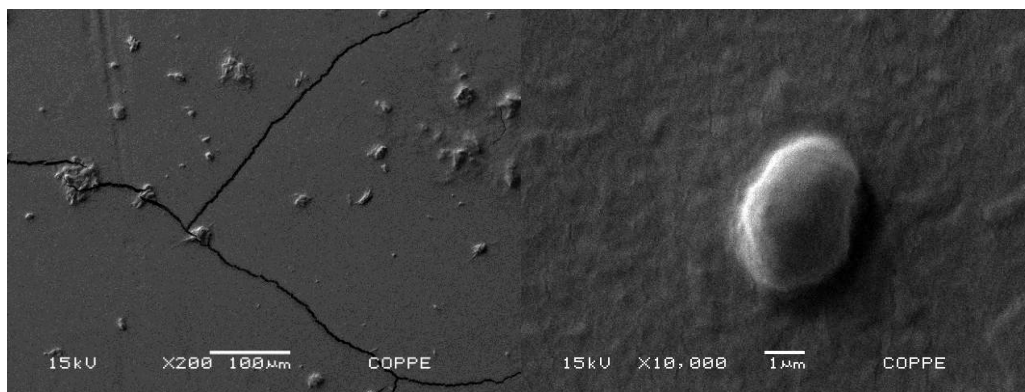


Figura 4.5: Micrografia das PCS em suspensão aquosa.

4.1-3) Tamanho das partículas

O resultado da análise do tamanho das partículas das PCS pelo ZETASIZER/NANO-ZS mostrou que 96% das partículas possuíam diâmetro médio de 268,9 nm, 1,8% de 66,6 nm e 2,2% de 5560 nm, sendo que estas últimas representavam grandes aglomerados de PCS (Figura 4.6).

De acordo com a literatura, as NPCS podem apresentar tamanhos que variam de 40 a 220 nm quando produzidas pelo método de gelificação iônica seguido de liofilização (BLANCO, 2011; Qi *et al.*, 2004; SHI *et al.*, 2006; DU *et al.*, 2008). De acordo com BANERJEE *et al.* (2002), as NPCS costumam formar aglomerados quando em suspensão aquosa devido ao fato delas interagirem entre elas e, portanto, o tamanho médio das partículas encontrado pelos testes feitos com as mesmas em suspensão costuma ser maior que o tamanho real das NPCS.

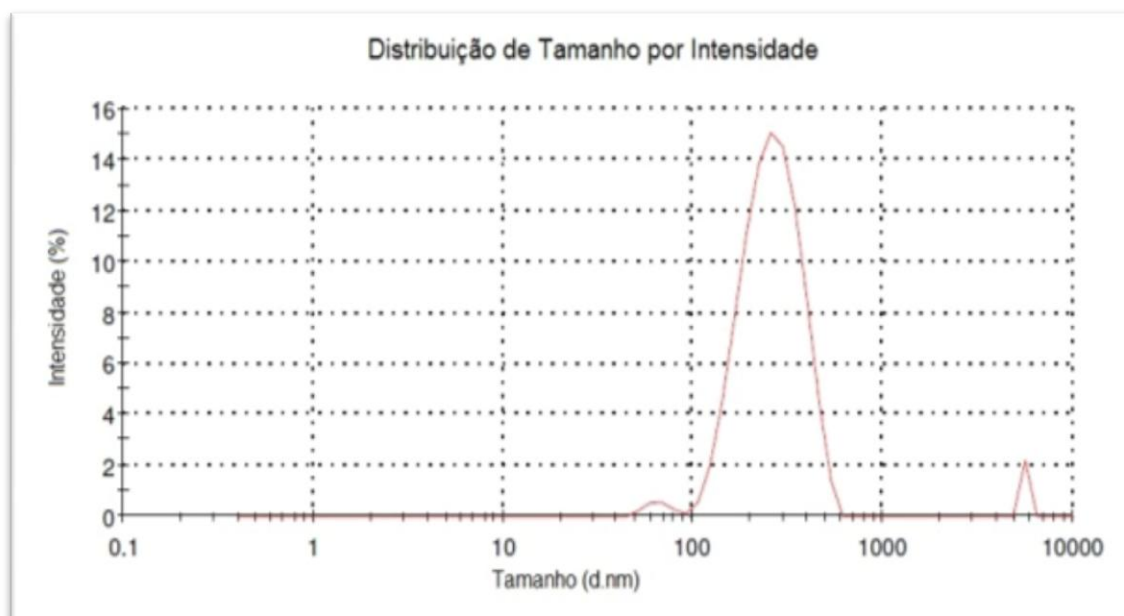


Figura 4.6: Gráfico da distribuição das partículas de PCS.

4.1-4) Potencial Zeta

O potencial zeta mede a carga superficial das partículas, podendo influenciar a estabilidade de uma partícula em suspensão através da repulsão eletrostática das partículas. Conforme o potencial zeta aumenta, a energia de superfície da partícula também aumenta, levando a uma suspensão mais estável porque as partículas carregadas vão se repelir e, portanto, superar sua tendência natural de agregação. A ação antimicrobiana está diretamente relacionada ao potencial zeta, já que para que ocorra uma forte interação com as membranas celulares das bactérias, que são carregadas negativamente, é importante que a nanopartícula seja carregada positivamente (ALI *et al.*, 2010; QI *et al.*, 2004; QI *et al.*, 2005).

Na Tabela 4.1 pode ser observada a média dos valores do potencial zeta das PCS, o desvio padrão e o pH em que cada análise foi realizada. O pH de cada solução analisada foi obtido após se acrescentar PCS a uma solução de KCl 10^{-3} com pH 5,0 (solução de leitura do equipamento).

Tabela 4.1: Média e desvio padrão dos valores do potencial zeta das PCS em função do pH de cada análise.

Potencial Zeta (mV)			
		Média	Desvio Padrão
PCS	pH 5,7	+28,83	0,87
	pH 7,0	+15,97	2,57

Os resultados obtidos evidenciam uma redução significativa do potencial zeta quando o pH da solução original foi aumentado para o pH 7,0. Como a atividade

antimicrobiana da PCS é otimizada com o aumento de sua carga superficial, todos os testes microbiológicos foram realizados em solução com pH original.

4.2) Teste de Concentração Mínima Inibitória (CMI)

Foram realizados testes para avaliar a atividade antimicrobiana das PCS pelo método de diluição. Os resultados qualitativos são apresentados na Tabela 4.2 com base na avaliação visual dos tubos contendo diferentes concentrações da suspensão (Figura 4.7). Nos poços onde a solução manteve-se límpida, considerou-se que o crescimento bacteriano foi inibido (-). Por outro lado, considerou-se que a turbidez da solução após o teste foi causada pelo crescimento bacteriano (+).

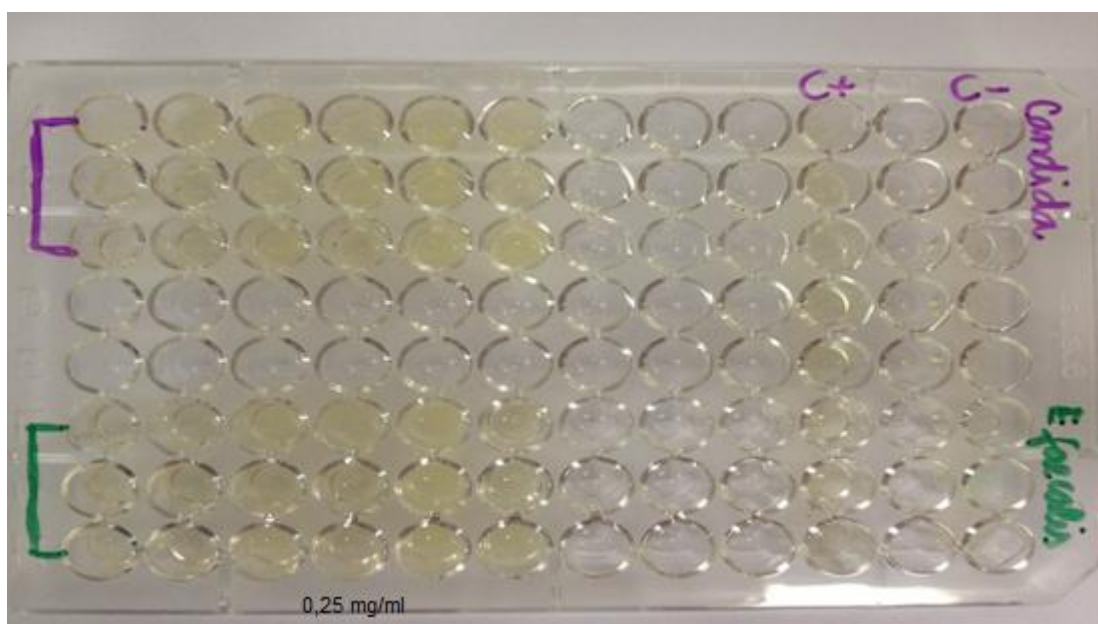


Figura 4.7: Teste de CMI das PCS em *E. faecalis* e *C. albicans*.

Tabela 4.2: Resultado do teste de atividade antibacteriana da suspensão de PCS em relação ao *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans*. Ausência de crescimento bacteriano (-); crescimento bacteriano (+).

Micro-organismos	Concentrações (mg/ml)					
	2	1	0,5	0,25	0,125	0,062
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	-	-	+	+
<i>Candida albicans</i>	+	+	+	+	+	+

As PCS foram capazes de inibir o crescimento de *E. faecalis* a partir da concentração de 0,25 mg/ml, de acordo com a análise visual dos poços contendo NPCS e o inóculo (Figura 4.7). Já contra *C. albicans*, as PCS não foram capazes de inibir o crescimento, uma vez que não foi possível utilizar concentrações maiores de NPCS, pois a suspensão tornava-se supersaturada acima da concentração de 2 mg/ml, ocorrendo a precipitação das nanopartículas. Uma possível explicação para a ausência de atividade antimicrobiana das PCS contra *C. albicans* seria o fato de a mesma, por ser um fungo, apresentar parede celular mais rígida, o que dificultaria a ação das PCS.

O teste de concentração bactericida mínima foi realizado apenas com a espécie *E. faecalis*. Após o plaqueamento dos poços com concentrações a partir de 0,25 mg/ml e do controle positivo, foi observado que em todas as placas houve proliferação bacteriana. Esse fato mostra que as PCS não possuem ação bactericida, ou seja, não são capazes de matar *E. faecalis*, apresentando apenas ação bacteriostática (inibem o crescimento do *E. faecalis*).

4.3) Penetração das PCS nos túbulos dentinários

SIQUEIRA *et al.* (1996) observou que as principais bactérias encontradas no interior de canais infectados, incluindo *E. faecalis*, são capazes de penetrar profundamente e colonizar túbulos dentinários. Devido a profundidade da penetração, que pode chegar a 375 µm em dentes com periodontite apical (PETERS *et al.*, 2001), essas bactérias podem não ser removidas durante o preparo químico-mecânico e, com isso, levar ao fracasso o tratamento endodôntico. Esses estudos evidenciam a necessidade de existirem soluções capazes de penetrar profundamente e matar/inibir o crescimento de bactérias presentes nos túbulos dentinários.

4.3-1) Preparo dos dentes e análise por MEV

O método de clivagem usado nesse trabalho teve como objetivo expor os túbulos dentinários no sentido longitudinal para, desta forma, poder avaliar a penetração das PCS. Porém, devido à dificuldade de se fazer cortes totalmente retos nesta técnica, alguns dentes tiveram que ser excluídos por apresentarem cortes em que os túbulos dentinários apareciam em sentido transversal. No total foram 05 excluídos, sendo: 01 do subgrupo 1a; 01 do subgrupo 1b; 01 do subgrupo 2b; 02 do subgrupo 3b.

A penetração das PCS foi inicialmente analisada pelo MEV e dentes que não passaram pelo processo de irrigação com as PCS foram usados como controle negativo (Figura 4.8).

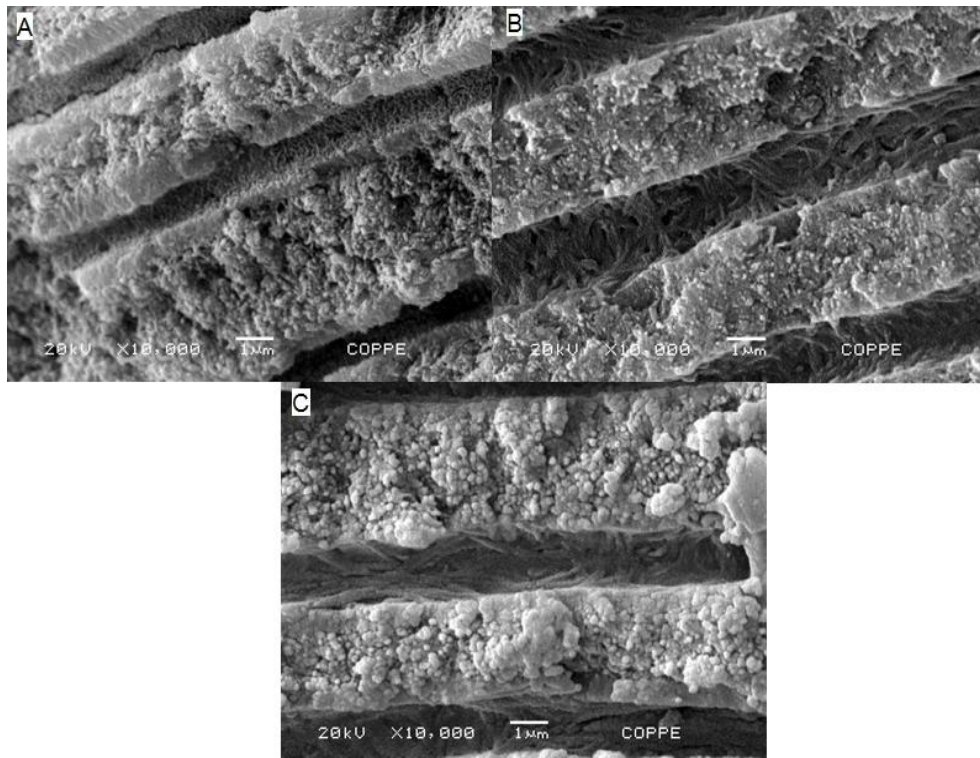


Figura 4.8: Imagem representativa da MEV do grupo controle negativo (sem irrigação de PCS). Corte longitudinal evidenciando os túbulos dentinários vazios. A- corte do terço cervical, B- corte do terço médio, C- corte do terço apical.

Os dentes do subgrupo 1a (remoção imediata da suspensão contendo PCS) não apresentaram presença de PCS no interior dos seus túbulos, assim como os dentes do subgrupo 1b (remoção da suspensão contendo PCS após 7 dias). O grupo 1 (5 minutos de agitação pelo ultrassom odontológico) possuía imagens bastante similares ao grupo de controle, evidenciando que esse período de agitação não foi suficiente para promover a penetração das PCS, como apresentado na Figura 4.9.

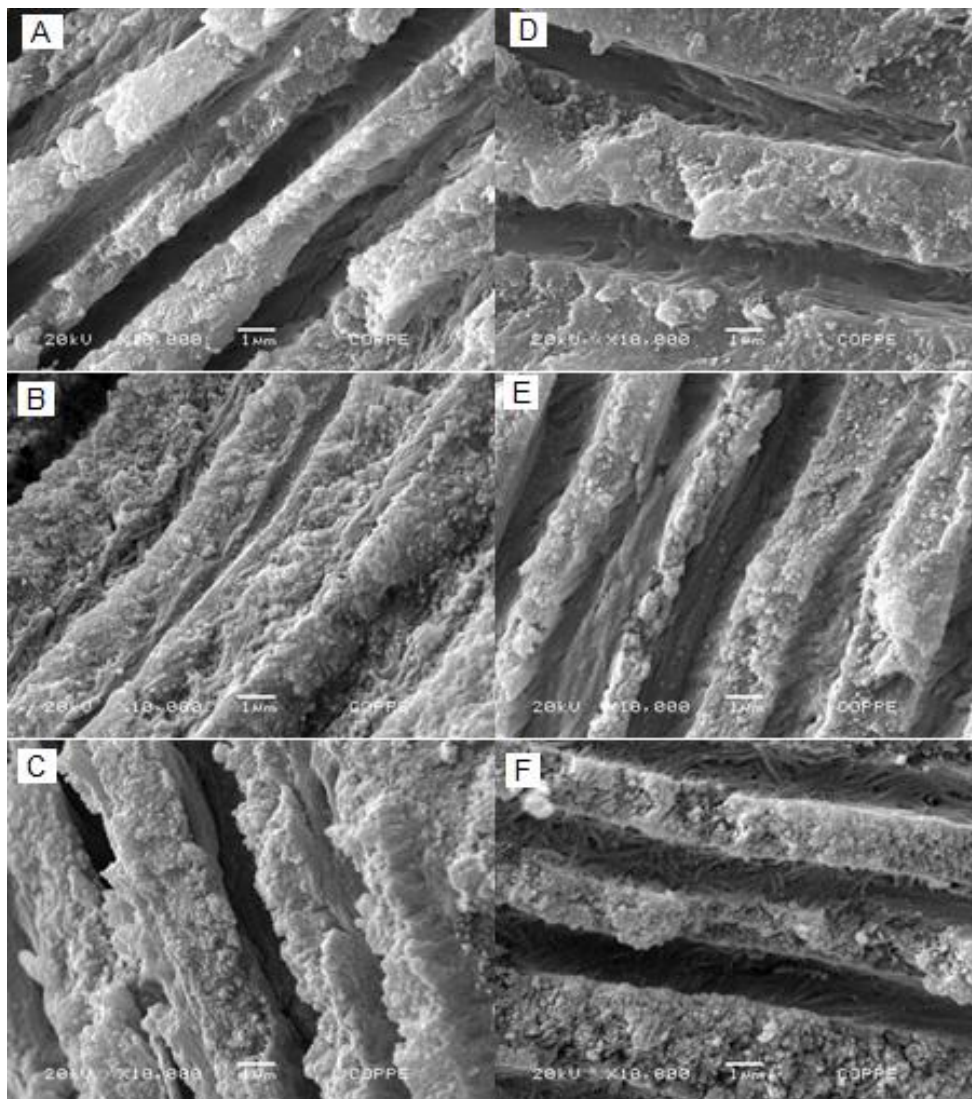


Figura 4.9: MEV representativa do grupo 1 (5 ml de suspensão de PCS + 5 min de ultrassom odontológico). A-C: subgrupo 1a (remoção imediata). D-F: subgrupo 1b (remoção após 7 dias). A,D- corte do terço cervical; B, E- corte do terço médio; C,F- corte do terço apical.

Com a utilização de agitação por ultrassom por 10 minutos (grupo 2) foi possível visualizar a penetração das PCS nos túbulos dentinários em todos os terços. Aparentemente, não houve diferença entre os subgrupos (Figuras 4.10). As PCS foram realçadas nas figuras para facilitar a visualização das mesmas. A penetração, porém, não foi uniforme, sendo possível encontrar túbulos vazios. O tamanho das PCS encontradas no interior dos túbulos mostrou-se compatível com o tamanho das PCS

encontrado pela técnica de espalhamento de luz (Figura 4.11), citada no item 4.1-3 deste trabalho (268,9 nm).

O grupo 3 (tempo de agitação de 15 minutos) também apresentou presença de PCS nos túbulos dentinários, como mostrado nas Figura 4.12. Nesse grupo também não foi possível perceber uma diferença no grau de penetração das NPCCS após a permanência das mesmas por 7 dias no interior dos canais dos dentes testados.

O ultrassom odontológico possui diversas funções como: remoção de tártaro e de materiais que estejam obstruindo os canais radiculares; auxiliando no preparo químico-mecânico do SCR; entre outros. O princípio básico do funcionamento deste ultrassom é a formação de bolhas de cavitação. Essas bolhas são formadas durante a agitação promovida pelo ultrassom e, quando as mesmas explodem, produzem áreas localizadas de pressão e calor (SHRESTHA et al., 2009; PARK E., 2013). Com isso, o ultrassom pode também auxiliar na penetração de substâncias no interior dos túbulos dentinários, como foi o caso deste trabalho.

SHRESTHA *et al.* (2009) observaram em seu estudo uma penetração não uniforme das NPCCS, com tamanhos de 80-120 nm, no interior dos túbulos dentinários de até 1000 μm , em dentes previamente clivados, utilizando um ultrassom focado de alta intensidade. Esse ultrassom é bastante utilizado na área médica e cosmética e, apesar de conseguir uma penetração em grande profundidade, ainda não é usado na prática clínica dos cirurgiões-dentistas. Uma possível explicação para isso seria a dificuldade de se acoplar um cristal de cerâmica piezoelétrica na ponta de uma lima manual para que essa penetração fosse promovida.

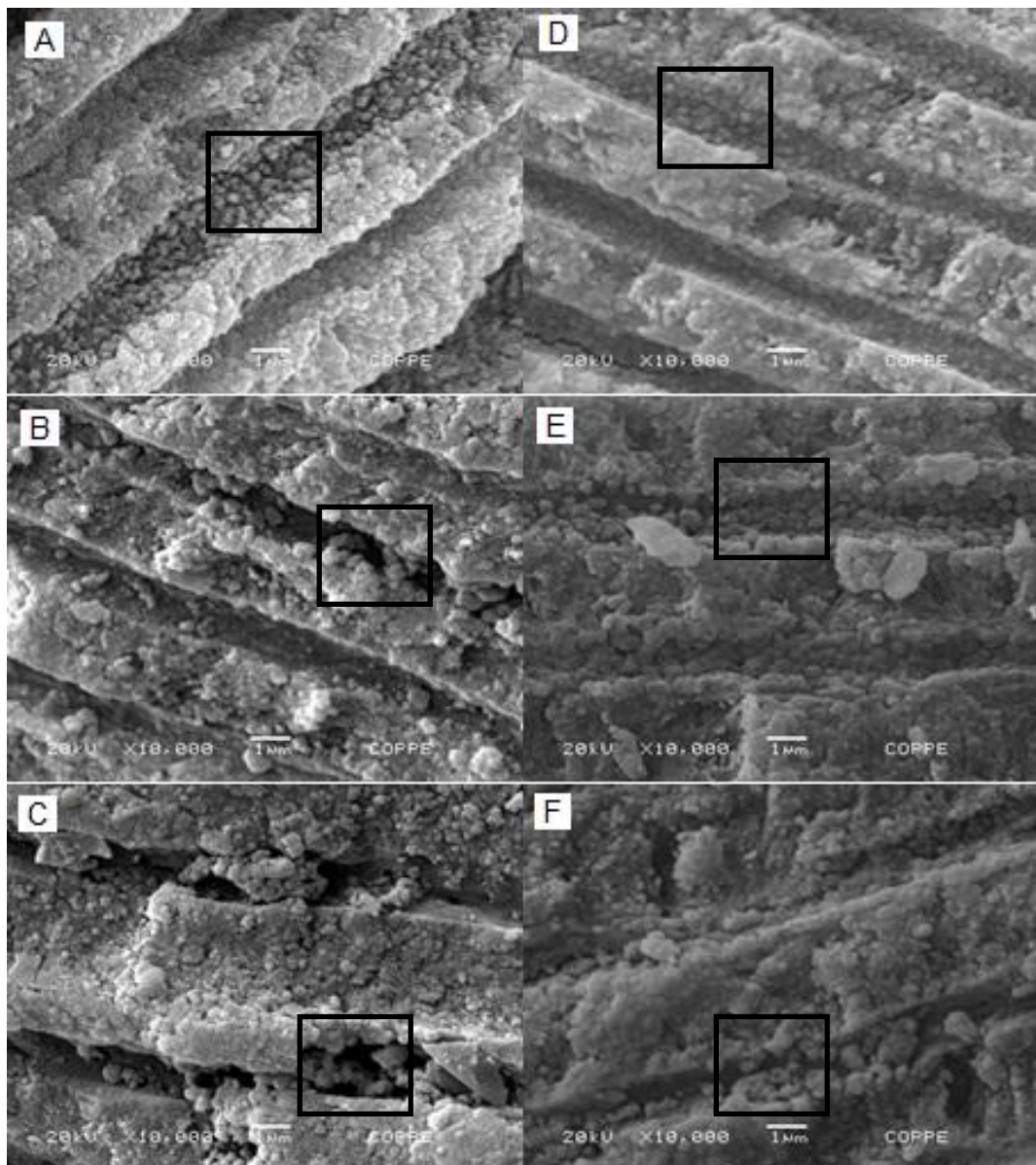


Figura 4.10: MEV representativa do grupo 2 (5 ml de suspensão de PCS + 10 min de ultrassom odontológico). A-C: subgrupo 2a (remoção imediata). D-F: subgrupo 2b (remoção após 7 dias). A,D- corte do terço cervical; B, E- corte do terço médio; C,F- corte do terço apical.

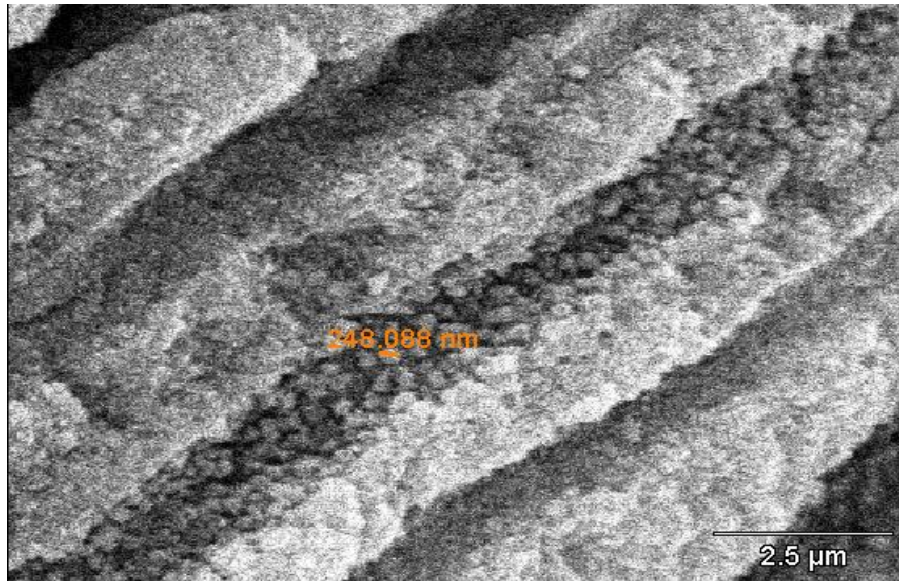


Figura 4.11: Detalhe da morfologia do terço cervical do subgrupo 2a, indicando o tamanho das PCS presentes nos túbulos (248,088 nm).

A agitação da suspensão de PCS feita pelo ultrassom odontológico mostrou-se bastante eficiente uma vez que conseguiu promover a penetração das nanopartículas até o terço apical. Esse dado é bastante importante já que a região apical é uma zona de difícil desinfecção, pois as soluções e medicações nem sempre são capazes de alcançá-la. Com isso, remanescentes de dentina infectada e bactérias viáveis podem permanecer no interior das ramificações e túbulos dentinários deste terço e, assim, comprometer o sucesso do tratamento endodôntico.

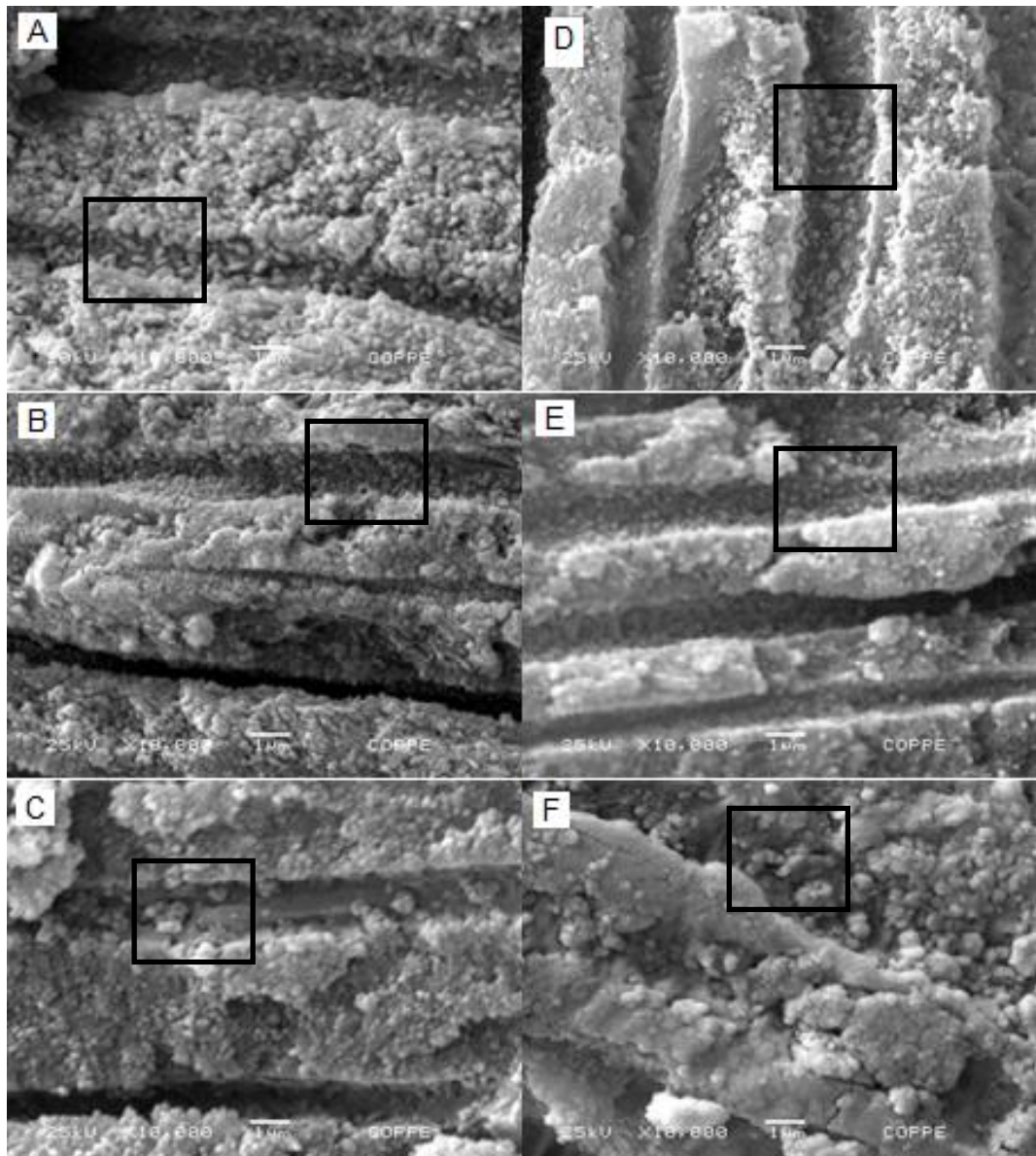


Figura 4.12: MEV representativa do grupo 3 (8 ml de suspensão de PCS + 15 min de ultrassom odontológico). A-C: subgrupo 3a (remoção imediata). D-F: subgrupo 3b (remoção após 7 dias). A,D- corte do terço cervical; B, E- corte do terço médio; C,F- corte do terço apical.

Com base nos resultados obtidos neste teste, o grupo 2 foi escolhido como sendo a condição ideal. Isso porque, além de apresentar penetração de PCS em todos os terços do dente, o período de 10 minutos de agitação pelo ultrassom consiste em um tempo clinicamente viável. Esse dado é também bastante relevante uma vez que a demanda por tratamentos odontológicos que sejam rápidos e eficientes é cada vez maior.

4.3-2) Preparo dos dentes e análise por Microscopia Ótica de Fluorescência

Este teste foi realizado no intuito de confirmar a penetração das PCS no interior dos túbulos dentinários. Para isso foi utilizado a Rodamina B, que é um corante fluorescente capaz de se ligar ao nitrogênio presente nos grupos amina das NPCS. CUNHA-REIS *et al.*(2013) utilizou esse mesmo corante em seu trabalho com o objetivo de corar a quitosana e, com isso, avaliar o grau de degradação de arcabouços de membrana de quitosana. A condição usada nesta etapa foi a do grupo 2 e as imagens obtidas são apresentadas na Figura 4.13.

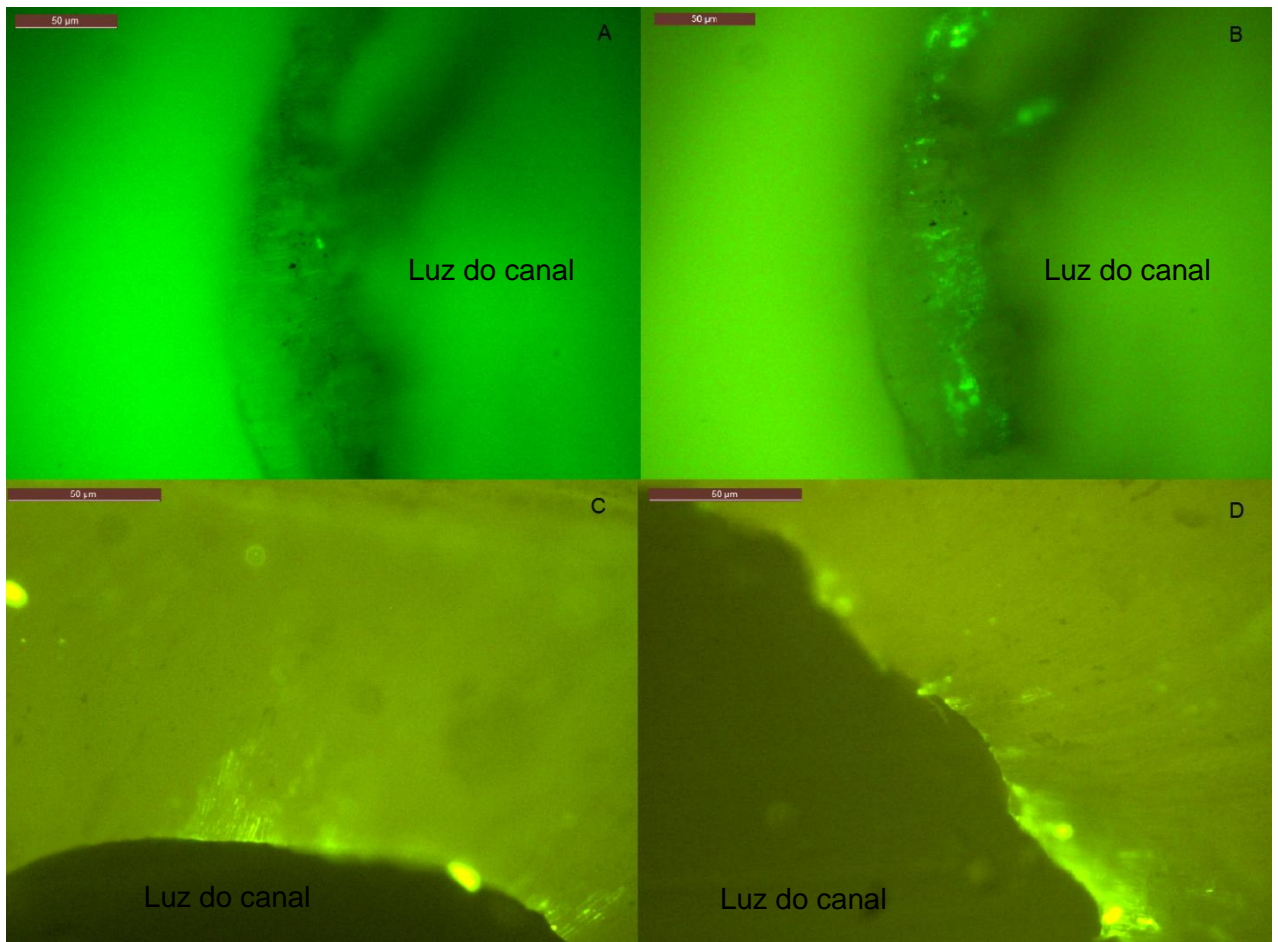


Figura 4.13: Presença de fluorescência no interior dos túbulos dentinários evidenciando a penetração das PCS no subgrupo 2a (remoção imediata da suspensão de NPCCS após agitação de 10 min). A: corte do terço cervical sem fluorescência, B-D: corte dos terços cervical, médio e apical com fluorescência, respectivamente. Barra de escala = 50 µm.

Ao analisar as imagens obtidas nesta etapa, é possível observar a presença de rastros de fluorescência no interior dos túbulos dentinários. Isso comprova que as partículas observadas nas imagens de MEV no interior dos túbulos dentinários (Figuras 4.10 e 4.12) correspondem às PCS. Assim como observado no item 4.3-1, as imagens de fluorescência também mostram que o período de 10 min de agitação das PCS pelo ultrassom odontológico é eficaz para viabilizar a penetração das PCS nos

túbulos, porém essa penetração não é uniforme. Por mais cuidadosa que tenha sido a agitação, é possível que a lima usada para agitar a suspensão tenha encostado, em algum momento, nas paredes do canal produzindo, dessa forma, *smear layer*, sendo essa uma possível explicação para a penetração não ser uniforme.

É válido ressaltar que, em função do aumento utilizado para a obtenção destas imagens, é possível observar apenas os aglomerados micrométricos de PCS presente nos túbulos.

A fluorescência não pode ser percebida no subgrupo 2b. Uma possível explicação para isso é que, devido ao tempo em que a suspensão permaneceu no interior do canal (7 dias), o corante pode ter perdido a sua ação.

4.4) Ação antimicrobiana das PCS

A ação antimicrobiana contra *E. faecalis* foi testada usando as seguintes soluções: salina 0,9% estéril (controle positivo), clorexidina 2% gel (controle negativo) e suspensão aquosa de partículas submicrométricas de quitosana (PCS) na concentração de 0,25 mg/ml removida imediatamente após a agitação de 10 min com o ultrassom (PCS-0) ou após o período de 7 dias (PCS-7). O gel de clorexidina foi removido após 7 dias.

Os valores da redução de unidade formadora de colônia (UFC) de cada grupo são mostrados na Tabela 4.3 e Figura 4.14. Os dados foram analisados estatisticamente pelo Teste-t com duas amostras em par para médias ($\alpha = 0,1$), sendo obtidos os seguintes resultados: $p = 0,078$ (controle positivo), $p = 0,036$ (controle negativo), $p = 0,009$ (PCS-0) e $p = 0,017$ (PCS-7). Como os valores de p obtidos foram menores que α , a quantidade de UFC antes e depois do tratamento em cada um dos grupos foi considerada estatisticamente diferente.

Tabela 4.3: Redução média e desvio padrão de UFC de *E. faecalis* observados nos diferentes grupos usados no teste microbiológico.

Redução média de UFC de <i>E. faecalis</i> (%)		
Grupo	Média	Desvio padrão
Controle positivo	90,7	10,4
Controle negativo	95,1	6,8
PCS-0	99,9	0,1
PCS-7	96,3	4,8

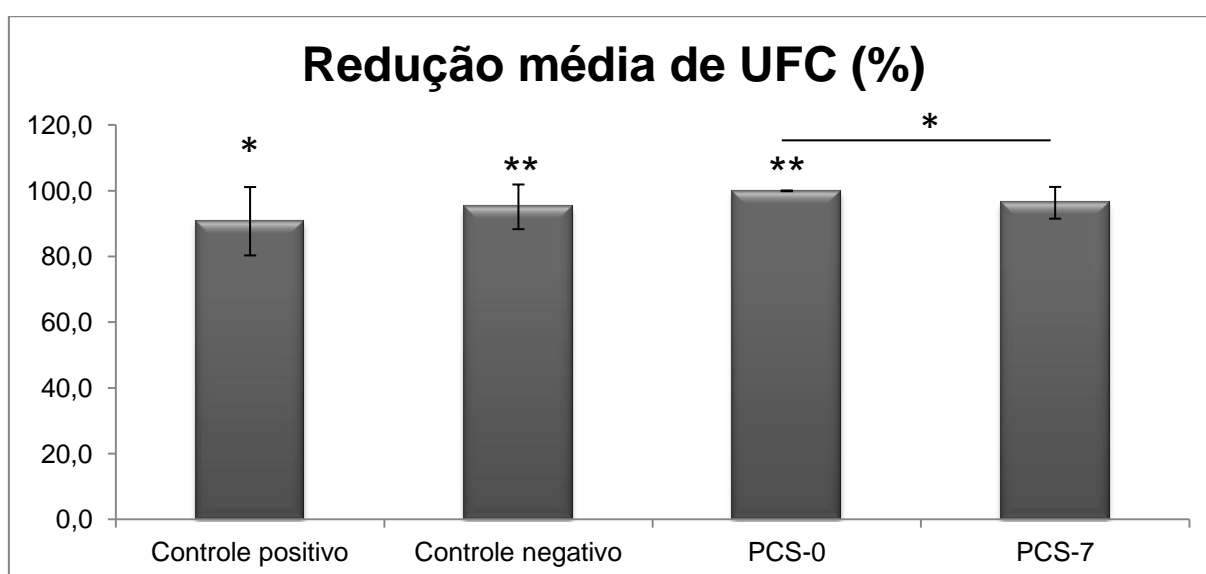


Figura 4.14: Redução média de UFC de *E. faecalis* em dentes humanos *ex vivo* tratados com diferentes soluções. *, ** = $p < 0,1$.

De acordo com os resultados desse estudo, as maiores reduções médias foram obtidas pelas PCS (99,9% e 96,3%). Também foi possível observar que a simples lavagem dos canais com solução salina estéril (que não apresenta efeito antimicrobiano) foi capaz de reduzir as UFC. Vale ressaltar que as análises microbianas refletem a condição de coleta na luz do canal, o que pode influenciar nos resultados, levando a uma redução de UFC maior. Isso ocorre porque os microorganismos presentes na luz do canal estão em suspensão, e não formando biofilme, facilitando a eliminação dos mesmos.

Também foi utilizado o teste de Tukey para realizar comparações entre os grupos testados e avaliar se havia diferenças estatísticas entre eles. Com isso, foi observado que as soluções contendo PCS eram estatisticamente diferentes do controle positivo, sendo $p = 0,013$ quando comparado ao grupo PCS-0 (remoção imediata) e $p = 0,096$ quando comparado ao grupo PCS-7 (remoção após 7 dias). O grupo PCS-0 também se mostrou estatisticamente diferente do controle negativo, possuindo $p = 0,090$. Os outros grupos, quando comparados entre si, não possuíram diferenças estatísticas ($p > 0,1$).

O grupo PCS-7 e o controle negativo não possuíram reduções de UFC estatisticamente diferentes ($p = 0,618$). Com isso, as PCS poderiam ser usadas como medicação intracanal, uma vez que apresentaram atividade antimicrobiana similar a clorexidina 2% gel, considerada a medicação de escolha da Endodontia.

De acordo com os resultados obtidos nesse trabalho, as PCS removidas logo após a agitação por 10 min (PCS-0) foram capazes de eliminar quase 100% das bactérias presentes no interior do canal. No entanto, a suspensão de partícula submicrométricas de quitosana não poderia ser usada como solução irrigadora durante o tratamento endodôntico, uma vez que, de acordo com SHERESTHA *et al.* (2012), ela não seria capaz de eliminar matéria orgânica. Sendo assim, sugere-se a utilização das PCS-0 como solução irrigadora final, ou seja, poderia ser utilizada antes de ser realizada a obturação. É válido ressaltar que o grupo PSC-0 não poderia ser considerado uma medicação intracanal, já que não permaneceu no interior do canal entre consultas.

CAPÍTULO 5

CONCLUSÕES E TRABALHOS FUTUROS

5.1) Conclusões

1. Pelo método de gelificação iônica, foi possível obter partículas submicrométricas de quitosana (PCS) com diâmetro médio de 268,9 nm e potencial zeta de $(+28,83 \pm 0,87)$. As PCS liofilizadas em suspensão apresentaram-se na forma de aglomerados com formato arredondado;
2. As PCS apresentaram ação bacteriostática contra *Enterococcus faecalis*, principal patógeno em casos de insucesso da terapia endodôntica, possuindo concentração mínima inibitória de 0,25 mg/ml. Porém, as PCS não foram capazes de atuar contra *Candida albicans*, agente patogênico fúngico encontrado em menor frequência do que o *E. faecalis*;
3. As PCS foram capazes de penetrar nos túbulos dentinários em todos os terços do canal radicular, quando agitadas com ultrassom odontológico por 10 e 15 min, período de tempo que pode ser considerado clinicamente viável. No entanto, não foi observada uma penetração uniforme;
4. As PCS em suspensão foram capazes de reduzir em 99,9% as unidades formadoras de colônia (UFC) de *E. faecalis* presentes em dentes humanos *ex vivo* contaminados, quando removidas logo após a agitação por 10 min promovida pelo ultrassom odontológico;

- As PCS que permaneceram no interior do canal pelo período de 7 dias possuíram redução média de UFC semelhante a da clorexidina 2% gel, controle negativo;
- Os resultados mostraram que a suspensão de PCS a 0,25 mg/ml pode ser utilizada tanto como medicação intracanal quanto como solução irrigadora final em tratamentos endodônticos.

5.2) Sugestões para trabalhos futuros

- Avaliar a citotoxicidade da suspensão de PCS;
- Avaliar o comportamento clínico da suspensão de PCS, tanto como solução irrigadora final quanto como medicação intracanal, em pacientes com periodontite apical.

CAPÍTULO 6

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELWAHED W, DEGOBERT G, FESSI H., 2006, "A pilot study of freeze drying of poly(epsilon-caprolactone) nanocapsules stabilized by poly (vinyl alcohol): formulation and process optimization." *Int J Pharm*, v. 309, pp. 178-188.

AE JUNG HUH, YOUNG JIK KWON., 2011, "Nanoantibiotics: A new paradigm for treating infectious disease using nanomaterials in the antibiotics resistant era." *J Cont Rel*, v. 156, pp.128-145.

AGNIHOTRI SA., MALLIKARJUNA NN., AMINABHAVI TM., 2004, "Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery." *J Cont Rel*, v. 100, pp. 5-28.

ALI, S. W., JOSHI, M., RAJENDRAN, S., 2010, "Modulation of Size, Shape and Surface Charge of Chitosan Nanoparticles With References to Antimicrobial Activity." *Adv Sci Let*, v. 3, pp. 452-460.

ALI, S. W., JOSHI, M., RAJENDRAN, S., 2011, "Synthesis and characterization of chitosan nanoparticles with enhanced antimicrobial activity." *Int J Nanosci*, v. 10, pp. 979-984.

ALLAKER RR., 2010, "The use of nanoparticles to control oral biofilm formation." *J Dent Res*, v. 89, 11, pp. 1175-1186.

ANITHA, A., RANI, V., V., D., KRISHNA, R., *et al.*, 2009, "Synthesis, characterization, cytotoxicity and antibacterial studies of chitosan, O-carboxymethyl and N,O-carboxymethyl chitosan nanoparticles." **Carb Pol**, v. 78, n. 4, pp. 672-677.

BALLAL N.V., KUNDABALA M., BHAT K.S., ACHARYA S., BALLAL M., 2009, "Susceptibility of *Candida albicans* and *Enterococcus faecalis* to chitosan, chlorhexidine gluconate and their combination *in vitro*." **Aust Endod J**, v. 35, pp. 29-33.

BALDASSARRI L, CRETÌ R, MONTANARO L, OREFICI G, ARCIOLA CR., 2005, "Pathogenesis of implant infections by enterococci." **Int J Artif Organs**, v. 28, pp.401-409.

BANERJEE T., MITRA S., SINGH AK., SHARMA RK., MAITRA A., 2002, "Preparation, characterization and biodistribution of ultrafine chitosan nanoparticles." **Int J Pharm**, v. 243, pp. 93-105.

BLANCO, M., 2011, "Avaliação da incorporação de nanopartículas de quitosana no cimento endodôntico AH PLUS™." Tese M.Sc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

CAMPANA-FILHO, S. P., DE BRITTO, D., CURTI, E., *et al.*, 2007, "Extração, estruturas e propriedades de α - e β -quitina", **Quím Nova**, v. 30, n. 3, pp. 644-650.

COHEN S., HARGREAVES K., N., 2007, **Caminhos da polpa**. 9ª ed. Rio de Janeiro, Elsevier Editora LTDA.

DAMMASCHKE *et al.*, 2003, "Long-term survival of root-canal-treated teeth: a retrospective study over 10 years." **J Endod**, v. 29, n. 10, pp. 638-643.

DaSILVA, L., FINER, Y., FRIEDMAN, S., BASRANI, B., KISHEN, A., 2013, "Biofilm formation within the interface of bovine root dentin treated with conjugated chitosan and sealer containing chitosan nanoparticles." **J Endod**, v. 39, n. 2, pp.249-253.

DENG, D. M., HOOGENKAMP, M. A., EXTERKATE, R. A. M., *et al.*, 2009 "Influence of *Streptococcus mutans* on *Enterococcus faecalis* biofilm formation." **J Endod**, v. 35, pp. 1249-1252.

DENTON GW., 1991, "Chlorhexidine. In: BLOCK SS: Disinfection sterilization and preservation." 4^a ed. Philadelphia: LEA & FEBIGER, pp.276-277.

DU WL., XU ZR., HAN XY., XU YL., MIAO ZG., 2008, "Preparation, characterization and adsorption properties of chitosan nanoparticles for eosin Y as a model anionic dye." **J Hazard Mat**, v. 153, pp. 152-156.

ELSAKA S., ELNAGHT A., 2012, "Effect of addition of chitosan to self-etching primer: antibacterial activity and push-out bond strength to radicular dentin." **J Biomed Res**, v. 26, n. 4, pp. 288-294.

FERNANDES JC., TRAVARIA F., SOARES JC., RAMOS OS., MONTEIRO MJ., PINTADO ME., MALCATA FX., 2008, "Antimicrobial effects of chitosan and chitooligosaccharides upon *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, in food model synthesis." **Food Microbiol**, v. 25, pp. 922-928.

FERRAZ CCR, GOMES BPFA, ZAIA AA, TEIXEIRA FB, SOUZA-FILHO FJ., 2001, "In vitro assessment of the antimicrobial action and mechanical ability of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant." **J Endod**, v. 27, pp.452-455.

GOMES BPFA, FERRAZ CCR, GARRIDO FD, ROSALEN PL, ZAIA AA, TEIXEIRA FB, SOUZA-FILHO FJ., 2002, "Microbial susceptibility to calcium hydroxide pastes and their vehicles." **J Endod**, v. 28, pp.758-761.

HANCOCK III HH *et al.*, 2001, "Bacteria isolated after unsuccessful endodontic treatment in a North American population." **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 91, pp.579-586.

KWON YJ., HUH AJ., 2011, "Nanoantibiotics: A new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era." **J Cont Rel**, v. 156, pp.128-145.

IN-YONG KIM, SEOG-JIN SEO, HYUN-SEUK MOON, MI-KYONG YOO, IN-YOUNG PARK, BOM-CHOL KIM, CHONG-SU CHO., 2008, "Chitosan and its derivatives for tissues engineering applications." **Biotec Adv**, v. 26, pp.1-21.

KAYAOGLU G, ORSTAVIK D., 2004, "Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease." **Crit Rev Oral Biol**, v. 15, n. 5, pp. 308-320.

KISHEN, A., SHI, Z., SHRESTHA, A., *et al.*, 2008, "An investigation on the antibacterial and antibiofilm efficacy of cationic nanoparticulates for root canal disinfection." **J Endod**, v. 34, n. 12, pp. 1515-1520.

LOPES, H.P., SIQUEIRA, ELIAS, C.N., 1999, "Substâncias químicas empregadas no preparo de canais radiculares." In: LOPES, H.P.; SIQUEIRA JR. **Endodontia. Biologia e técnica.** Rio de Janeiro: Medsi, pp.377-378.

LOPES H., P. E SIQUEIRA JR., 2010, **Endodontia biologia e técnica.** 3ª ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan.

MIRANDA R., 2011, "Efeito da terapia fotodinâmica associada à irrigação com Endovac® para eliminação de *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans* do canal radicular: estudo *in vitro*." Tese M.Sc, IMPG/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

MOLANDER A, REIT C, DAHLE'NG, KVIST T., 1998, "Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis." **Int. Endod**, v. 31, pp. 1-7.

MÖLLER AJR, FABRICIUS L, DAHLE'N G, SUNDQVIST G, HAPPONEN R-P., 2004, "Apical periodontitis development and bacterial response to endodontic treatment. Experimental root canal infections in monkeys with selected bacterial strains." **Eur J Oral Sci**, v. 112, pp. 207-215.

ORSTAVICK D, HAAPASALO M., 1990, "Desinfection by endodontic irrigants and dressings of experimentally infected dentinal tubules." **Endod Dent Traumatol**, v. 6, pp. 142-149.

PARADELLA TC, KOGA-ITO CY, JORGE AOC., 2007, "*Enterococcus faecalis*: clinical and microbiological considerations." **Rev Odontol UNESP**, v. 36, n. 2, pp. 163-168.

PARK E., 2013, "Ultrasonics in endodontics." **Endod Top**, v.29, pp. 125-159.

PECIULIENE V, REYNAUD AH, BALCIUNIENE I, HAAPASALO M., 2001, "Isolation of yeasts and enteric bacteria in root-filled teeth with chronic apical periodontitis." *Int. Endod. J*, v. 34, pp. 429-434.

PINA *et al.*, 2006, "Nanotecnologia e Nanobiotecnologia : Estado de arte, perspectivas de inovação e investimentos." *Rev Gest Ind*, v. 2, n. 2, pp. 115-125.

PINHEIRO ET *et al.*, 2003, "Microorganisms from canal of root-filled teeth with periapical lesions." *Int Endod J*, v. 36, pp. 1-11.

QI, L., XU, Z., JIANG, X., *et al.*, 2004, "Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles." *Carb Res*, v. 339, n. 16, pp. 2693-2700.

QI, L., XU, Z., JIANG, X., *et al.*, 2005, "Cytotoxic activities of chitosan nanoparticles and copper-loaded nanoparticles." *Bio Med Chem Let*, v. 15, n. 5, pp. 1397-1399.

RABEA, E., I., BADAWEY, M., E.-T., STEVENS, C., V., *et al.*, 2003, "Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action." *Biomacromolec*, v. 4, n. 6, pp. 1457-1465.

RUSSELL AD, DAY MJ., 1993, "Antibacterial activity of chlorhexidine." *J Hosp Infect*, v. 25, pp.229-238.

SALEHRABI R. & ROTSTEIN I., 2004, "Endodontic treatment outcome in a large patient population in the USA: an epidemiological study", *J Endod*, v. 30, n.12, pp. 846-850.

SAFAVI KE *et al.*, 1990, "Root canal dentinal tubule disinfection." *J Endod*, v. 16, pp. 207-210.

SEDGLEY CM, LENNAN SL, APPELBE OK., 2005, "Survival of *Enterococcus faecalis* in root canals ex vivo." ***Int Endod J***, v. 38, pp. 735–742.

SEDGLEY CM., 2007, "The influence of root canal sealer on extended intracanal survival of *Enterococcus faecalis* with and without gelatinase production ability in obturated root canals" ***J Endod***, v. 33, pp. 561-566.

SHARMA, C., P.,PILLAI, C., K., S., PAUL, W., 2009, "Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation." ***Progress in Polymer Science***, v. 34, n. 7, pp. 641-678.

SHI, Z., NEOH, K., G., KANG, E., T., *et al.*, 2006, "Antibacterial and mechanical properties of bone cement impregnated with chitosan nanoparticles." ***Biomater***, v. 27, n. 11, pp. 2440-2449.

SHRESTHA, A., FONG, S.-W., KHOO, B.-C., *et al.*, 2009, "Delivery of antibacterial nanoparticles into dentinal tubules using high-intensity focused ultrasound." ***J Endod***, v. 35, n. 7, pp. 1028-1033.

SHRESTHA, A., ZHILONG, S., GEE, N. K., *et al.*, 2010, "Nanoparticulates for Antibiofilm Treatment and Effect of Aging on Its Antibacterial Activity." ***J Endod***, v. 36, n. 6, pp. 1030-1035.

SHRESTHA, A., KISHEN, A., 2012, "The effect of tissue inhibitors on the antibacterial activity of chitosan nanoparticles and photodynamic therapy." ***J Endod***, v. 38, pp. 1275-1278.

SIQUEIRA JR., J., F., DE UZEDA, M., FONSECA, M., E., F., 1996, "A scanning electron microscopic evaluation of in vitro dentinal tubules penetration by selected anaerobic bacteria." *J Endod*, v. 22, n. 6, pp. 308-310.

SIQUEIRA JR, UZEDA M., 1997, "Intracanal medicaments: evaluation of the antibacterial effects of chlorhexidine, metronidazole, and calcium hydroxide associated with three vehicles." *J Endod*, v. 23, pp. 167-169.

SIQUEIRA JR, 2001a, "Strategies to treat infected root canals." *J Calif Dent Assoc*, v. 29, pp. 825-837.

SIQUEIRA JR, 2001b, "A etiology of the endodontic failure: why well-treated teeth can fail." *Int Endod J*, v. 34, pp. 1-10.

SIQUEIRA JR., J., F., RÔÇAS, I., N., LOPES, H., P., 2002, "Patterns of microbial colonization in primary root canal infections", *Oral Surg, Oral Med, Oral Pathol, Oral Rad Endod*, v. 93, n. 2, pp. 174-178.

SIQUEIRA JR, RÔÇAS IN., 2004, "Polymerase chain reaction-based analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment." *Oral Surg*, v. 97, pp. 85-94.

SJÖGREN U *et al.*, 1990, "Factors affecting the long-term results of endodontic treatment." *J Endod*, v. 16, pp. 498-504.

SJÖGREN U *et al.*, 1991, "The antimicrobial effect of calcium hydroxide as a short-term intracanal dressing." *Int Endod J*, v. 24, pp. 119-125.

SJÖGREN U *et al.*, 1997, "Influence of infection at the time of root filling on the outcome of endodontic treatment of teeth with apical periodontitis." ***Int Endod J***, v. 30, pp. 297-306.

SOUZA-FILHO F.J., GOMES, B.P.F.A, SOUZA, S.F.C., FERRAZ,C.C.R., TEIXEIRA F.B., ZAIA A.A., VALDRIGHI L., 2003, "Effectiveness of 2% chlorhexidine gel and calcium hydroxide against *Enterococcus faecalis* in bovine root dentine in vitro." ***IEJ***, v. 36, pp.267-275.

SOUZA-FILHO F.J., GOMES, B.P.F.A., SOARES A.J., FERRAZ,C.C.R.,VIANNA M.E., ZAIA A.A., 2003, "Effectiveness of 2% chlorhexidine gel and calcium hydroxide against *Enterococcus faecalis* in bovine root dentine in vitro." ***Braz Dent J***, v. 19, pp.28-33.

SUKAWAT C, SRISUWAN T., 2002, "A comparison of the antimicrobial efficacy of three calcium hydroxide formulation on human dentin infected with *Enterococcus faecalis*." ***J Endod***, v. 28, pp. 102-104.

SUNDQVIST G, FIGDOR D, PERSSON S, SJÖGRENU., 1998, "Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment." ***Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod***, n. 85, pp. 86–93.

SWEET SP., 1997, "Selection and pathogenicity of *Candida albicans* in HIV infection." ***Oral Dis***, v. 3, pp. 88-95.

TRONSTAD L *et al.*, 1981, "PH changes in dental tissue after root canal filling with calcium hydroxide." ***J Endod***, v. 7, pp. 17-21.

TROPE M. *et al.* 1999, "Endodontic treatment of teeth with apical periodontitis: single vs. multivisit treatment." **J Endod**, v. 25, pp. 345-350.

TROPE M. & BERGENHOLTZ G., 2002, "Microbiological basis for endodontic treatment: can a maximal outcome be achieved in one visit?" **Endod Top**, v. 1, pp. 40-53.

VAEZIFAR S., RAZAVI S., GOLOZAR MA., KARBASI S., MORSHED M., KAMALI M., 2013, "Effects of some parameters on particle size distribution of chitosan nanoparticles prepared by ionic gelation method." **J Clust Sci**, v. 24, pp. 891-903.

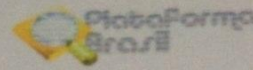
WALTIMO TMT, SEN BH, MEURMAN JH, ORSTAVIK D, HAAPASALO MPP., 2003, "Yeasts in apical periodontitis." **Crit. Rev. Oral Biol. Med**, v. 14, pp. 128-137.

WILSON, B., SAMANTA, M., K., SANTHI, K., *et al.*, 2009, "Chitosan nanoparticles as a new delivery system for the anti-Alzheimer drug tacrine." **Nanomed Nanotech, Biol Med**, Doi: 10.1016/j.nano.2009.04.001.

YANG, H.-C., HON, M.-H., 2009, "The effect of the molecular weight of chitosan nanoparticles and its application on drug delivery." **Microchem J**, v. 92, n. 1, pp. 87-91.

ANEXO

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
CLEMENTINO FRAGA FILHO
(HUCFF/ UFRJ)



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: A utilização de nanopartículas de quitosana como medicação intracanal: estudo ex vivo.

Pesquisador: Patricia Silva Rodrigues

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 12364213.3.0000.5257

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO ((FACULDADE DE

Patrocinador Principal: UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO ((FACULDADE DE ODONTOLOGIA)

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 237.918

Data da Relatoria: 04/04/2013

Apresentação do Projeto:

Protocolo 055-13 do grupo III. Respostas recebidas em 21.3.13

Objetivo da Pesquisa:

Vide parecer 220.223 de 14/03/2013

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Vide parecer 220.223 de 14/03/2013

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Vide parecer 220.223 de 14/03/2013

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Vide parecer 220.223 de 14/03/2013

Recomendações:

Nenhuma

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

As seguintes pendências haviam sido apresentadas no parecer supra-citado:

***Relativamente ao projeto:**

Peço que o projeto incorpore garantia explícita e inequívoca de que os resultados serão tomados

Endereço: Rua Prof. Rodolpho Paulo Rocco Nº255 Sala 01D-46

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 21.941-913

UF: RJ

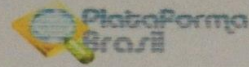
Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)2562-2480

Fax: (21)2562-2481

E-mail: cep@hucff.ufrj.br

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
CLEMENTINO FRAGA FILHO
((HUCFF/ UFRJ))



disponíveis, quaisquer que sejam eles.

Relativamente ao TCLE:

Peço que os seguintes termos do TCLE sejam explicados ou substituídos por outros de mais fácil compreensão para o sujeito de pesquisa:

pesquisa, pautada nos parâmetros;

nanopartículas;

medicação intracanal;

tratamento endodôntico;

razões ortodônticos;

problemas periodontais;

eliminação de micro-organismos;

canal radicular;

esclarecimentos permanentes.*

Análise:

Ambas as pendências acima foram cumpridas no projeto/TCLE apresentado.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

- 1) De acordo com o item VII.13.d, da Resolução CNS n.º 196/96, o pesquisador deverá apresentar relatórios anuais (parciais ou finais, em função da duração da pesquisa). Nos trabalhos sobre "Fármacos, medicamentos, vacinas e testes diagnósticos novos ou não registrados no país", os relatórios deverão ser semestrais (Resolução CNS n.º 251/97, item V.1.c).
- 2) Eventuais emendas (modificações) ao protocolo devem ser apresentadas, com justificativa, ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada

Endereço: Rua Prof. Rodolpho Paulo Rocco Nº255 Sala 01D-46

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 21.941-913

UF: RJ

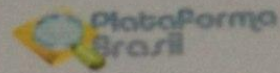
Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)2562-2480

Fax: (21)2562-2481

E-mail: cep@hucff.ufrj.br

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
CLEMENTINO FRAGA FILHO
(HUCFF/ UFRJ)



RIO DE JANEIRO, 04 de Abril de 2013

Assinador por:
Carlos Alberto Guimarães
(Coordenador)

Endereço: Rua Prof. Rodolpho Paulo Rocco Nº255 Sala 01D-46
Bairro: Cidade Universitária CEP: 21.941-913
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)2562-2480 Fax: (21)2562-2481 E-mail: cep@hucff.ufrj.br