



## AVALIAÇÃO DA INCORPORAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA AO CIMENTO ENDODÔNTICO AH PLUS™

Michelle Abreu Blanco

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.

Orientador: Rossana Mara da Silva Moreira Thiré

Rio de Janeiro

Março de 2011

AVALIAÇÃO DA INCORPORAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA  
AO CIMENTO ENDODÔNTICO AH PLUS™

Michelle Abreu Blanco

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<sup>a</sup>. Rossana Mara da Silva Moreira Thiré, D. Sc.

---

Prof<sup>a</sup>. Heloisa Carla Dell Santo Gusman, D. Sc.

---

Prof. Fernando Luiz Bastian, Ph. D.

RIO DE JANEIRO, RJ - BRASIL

MARÇO DE 2011

Blanco, Michelle Abreu

Avaliação da Incorporação de Nanopartículas de Quitosana ao Cimento Endodôntico AH Plus™/ Michelle Abreu Blanco. – Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2011.

XII, 66 p.: il.; 29,7 cm.

Orientadora: Rossana Mara da Silva Moreira Thiré

Dissertação (mestrado) – UFRJ/ COPPE/ Programa de Engenharia Metalúrgica e de Materiais, 2011.

Referências Bibliográficas: p. 60-66.

1. Nanopartículas de quitosana. 2. Cimento endodôntico. 3. Atividade antimicrobiana. 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, José Carlos e Maria de Fátima,  
por todo amor, carinho e apoio em  
todos os momentos da minha vida*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por cuidar de mim sustentando-me e fortalecendo-me todos os dias.

À Professora Rossana Mara da Silva Moreira Thiré por todo apoio, incentivo e suporte para a realização deste trabalho.

Ao CNPq e à FAPERJ pelo apoio financeiro.

À Professora Andréa Motta pelo incentivo e apoio.

Ao Professor Sérgio Eduardo Longo Fracalanza, ao técnico Marco Antônio Américo e ao Laboratório de Bacteriologia Médica do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da UFRJ.

Ao técnico Emerson Rocha Gonçalves do Laboratório de Agregação de Proteínas Amiloidoses do Instituto de Bioquímica Médica da UFRJ.

À Professora Anna Paola Pierucci e à aluna Camila Costa do Laboratório de Desenvolvimento de Alimentos para Fins Especiais e Educacionais do Instituto de Nutrição da UFRJ.

À Professora Renata Antoun Simão e ao técnico Heleno do Laboratório de Caracterização de Superfícies (AFM) do PEMM.

À técnica Aline do Laboratório de Análises Químicas e Processamentos Cerâmicos do PEMM.

Às técnicas Ana Paula, Elizabete e Luiza do Laboratório de Polímeros do PEMM.

À aluna Priscila do Laboratório de Química de Interfaces e Sistemas Coloidais do PEMM.

A todos os Professores e funcionários deste departamento que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Às amigas Danielle Assis e Paula Gil pela amizade e por fazerem parte desta conquista.

A todos os amigos do Laboratório de Biopolímeros, fundamentais ao longo desses dois anos de mestrado.

Ao amigo Ronaldo pelo exemplo de determinação e força de vontade.

Aos irmãos Raffael Blanco e Tyrrell Blanco pelo carinho.

À avó Maria Blanco, à madrinha Maria Cristina Abreu e ao companheiro Rodrigo Simião pela compreensão nos momentos de estresse.

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

AVALIAÇÃO DA INCORPORAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA  
AO CIMENTO ENDODÔNTICO AH PLUS™

Michelle Abreu Blanco

Março/2011

Orientadora: Rossana Mara da Silva Moreira Thiré

Programa: Engenharia Metalúrgica e de Materiais

Neste trabalho foi avaliada a incorporação de nanopartículas de quitosana (NPs) no cimento endodôntico AH Plus™ como uma estratégia para melhorar a atividade antimicrobiana deste cimento. As nanopartículas foram produzidas pelo método de gelificação iônica (secas por dois processos diferentes - liofilização e spray drying) e pela técnica de spray drying. As NPs produzidas foram caracterizadas por espalhamento de luz, análise do potencial zeta, MEV, AFM e FTIR. Testes antimicrobianos de concentração mínima inibitória também foram realizados. A caracterização do cimento contendo NPs foi realizada por meio de testes de fluxo, análise do tempo de presa, teste antimicrobiano do halo de inibição e microscopia eletrônica de varredura. Os resultados indicaram que apenas as nanopartículas liofilizadas possuíam atividade antimicrobiana sobre o *Enterococcus faecalis*. Estas nanopartículas apresentaram tamanho compatível com os túbulos dentinários. A composição AH Plus™/1% nanopartículas possui potencial para ser aplicado no tratamento endodôntico, uma vez que as propriedades de fluxo e de tempo de presa do cimento não foram afetadas de forma significativa. No entanto, não foi possível avaliar a atividade antimicrobiana desta composição pelo teste do halo de inibição.

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

EVALUATION OF CHITOSAN NANOPARTICLES ADDITION TO AH PLUS™  
ENDODONTIC CEMENT

Michelle Abreu Blanco

March/2011

Advisor: Rossana Mara da Silva Moreira Thiré

Department: Metallurgical and Materials Engineering

In this work the addition of chitosan nanoparticles (NPs) to AH Plus™ endodontic cement was evaluated as an approach to improve the antimicrobial activity of this cement. Chitosan nanoparticles were produced by ionic gelation method and spray drying technique. In the former case, NPs were dried by two different processes: lyophilization or spray drying. The NPs were characterized by light scattering, zeta potential analysis, scanning electron microscopy, atomic force microscopy and infrared spectroscopy. MICs and inhibition zone tests were also performed. The characterization of cement containing nanoparticles was performed by means of setting time and flow properties analysis. The results indicated that only lyophilized nanoparticles had antimicrobial activity against *Enterococcus faecalis*. These nanoparticles presented compatible size to dentinary tubules. The AH Plus™/1% NPs composition has potential to be applied in endodontic treatment since cement flow properties and setting time were not significantly affected. Nevertheless, it was not possible to evaluate antimicrobial activity of this composition by inhibition zone tests.

## SUMÁRIO

CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO .....	1
1.1. Objetivos .....	4
1.1.1 Objetivo geral da dissertação .....	4
1.1.2 Objetivos específicos da dissertação .....	4
CAPÍTULO II – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	5
2.1. Cimentos Endodônticos .....	5
2.2. Atividade Antimicrobiana .....	10
2.3. AH Plus™ .....	13
2.4. Quitina .....	17
2.5. Quitosana .....	20
2.6. Nanopartículas de Quitosana .....	22
CAPÍTULO III – MATERIAIS E MÉTODOS .....	26
3.1. Produção das nanopartículas .....	26
3.1.1. Purificação da quitosana .....	26
3.1.2. Produção das nanopartículas pelo método de gelificação iônica .....	27
3.1.3. Produção das nanopartículas por spray drying .....	28
3.2. Caracterização das nanopartículas .....	28
3.2.1. Espectroscopia no infravermelho (FTIR) .....	28
3.2.2. Tamanho das partículas .....	29
3.2.3. Microscopia de Força Atômica (AFM) .....	29
3.2.4. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) .....	30
3.2.5 Potencial Zeta .....	30
3.3. Preparo do cimento contendo nanopartículas .....	31
3.4. Caracterização do cimento .....	31
3.4.1. Tempo de presa .....	31
3.4.2. Teste de Fluxo .....	32
3.5. Propriedades Antimicrobianas .....	33
3.5.1. Teste da Concentração Mínima Inibitória (CMI) .....	33
3.5.1.1. Nanopartículas .....	33
3.5.1.2. Solução de quitosana com tripolifosfato .....	34
3.5.2. Teste do halo de inibição .....	35
3.6. Análises Estatísticas .....	35

CAPÍTULO IV – RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	36
4.1. Caracterização das nanopartículas .....	36
4.1.1. Espectroscopia no infravermelho (FTIR) .....	36
4.1.2. Tamanho das partículas .....	38
4.1.3. Microscopia de Força Atômica (AFM) .....	41
4.1.4. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) .....	43
4.1.5. Potencial Zeta .....	46
4.1.6. Teste da Concentração Mínima Inibitória (CMI) .....	47
4.1.6.1. Nanopartículas .....	47
4.1.6.2. Solução de quitosana com tripolifosfato .....	49
4.2. Caracterização do cimento com nanopartículas .....	51
4.2.1. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) .....	51
4.2.2. Teste do Tempo de Presa .....	52
4.2.3. Teste de Fluxo .....	54
4.2.4. Teste antimicrobiano do halo de inibição .....	56
CAPÍTULO V – CONCLUSÕES .....	58
5.1. Conclusões .....	58
5.2. Sugestões para Trabalhos Futuros .....	59
CAPÍTULO VI – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	60

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 (a) - Instrumento endodôntico introduzido no canal durante o preparo químico-mecânico; (b) - Canais selados com material obturador .....	2
Figura 2.1 - Apresentação comercial do AH Plus™ .....	14
Figura 2.2 - Fórmula estrutural da quitina .....	18
Figura 2.3 - Fórmula estrutural da quitosana .....	21
Figura 2.4 Interação da quitosana com tripolifosfato de sódio .....	23
Figura 3.1 - Equipamento para realizar secagem por spray drying .....	28
Figura 3.2 - Disposição dos grupos de amostras na placa de vidro .....	32
Figura 4.1 Espectroscopia no Infravermelho das amostras de CS, NP-L/TPP, NP-S e NP-S/TPP .....	37
Figura 4.2 Espectros no Infravermelho das amostras de CS, NP-L/TPP, NP-S e NP-S/TPP. Detalhe da região de 740-2000 cm <sup>-1</sup> .....	37
Figura 4.3 - Gráfico da distribuição de partículas da solução de CS com TPP .....	38
Figura 4.4 - Gráfico da distribuição de partículas das NP-L/TPP .....	39
Figura 4.5 - Gráfico da distribuição de partículas das NP-S/TPP .....	40
Figura 4.6 - Gráfico da distribuição de partículas das NP-S .....	40
Figura 4.7 Imagem de AFM da topografia das NPs presentes na solução de quitosana com tripolifosfato .....	42
Figura 4.8 Imagem de AFM da topografia das NP-L/TPP .....	42
Figura 4.9 Imagem de AFM da topografia das NP-S/TPP .....	43
Figura 4.10 Micrografia eletrônica de varredura da solução de quitosana purificada com tripolifosfato .....	44
Figura 4.11 Micrografia eletrônica de varredura das NP-L/TPP .....	44
Figura 4.12 Micrografia eletrônica de varredura das NP-S/TPP .....	45
Figura 4.13 Teste de concentração mínima inibitória mostrando crescimento bacteriano apenas nos tubos com volume menor de 150 µL .....	48
Figura 4.14 Teste de concentração mínima inibitória mostrando inibição do crescimento bacteriano em todos os tubos contendo a solução .....	50
Figura 4.15 Micrografias das amostras de cimento puro (a, d), cimento com 5% de NP-L/TPP (b, e) e cimento com 10% de NP-L/TPP (c, f) .....	51
Figura 4.16 Fotografia dos discos de cimento formados após o teste de fluxo .....	55

Figura 4.17 Halo de inibição do AH Plus™ puro (a); com 1% de NPs (b); com 5% de NPs (c) e com 10% de NPs (d) ..... 57

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.1. Composição do cimento AH Plus™, segundo o fabricante .....	14
Tabela 2.2 Características e benefícios do AH Plus™.....	15
Tabela 4.1 Média e desvio padrão dos valores do potencial zeta de cada grupo de nanopartículas em função do pH de cada análise .....	46
Tabela 4.2 Resultados dos testes de atividade antimicrobiana das amostras contendo nanopartículas de quitosana em relação ao <i>Enterococcus faecalis</i> : crescimento bacteriano (+); ausência de crescimento bacteriano (-) .....	48
Tabela 4.3 Tempo de presa em horas do AH Plus™ puro e com nanopartículas secas em spray drying com TPP .....	52
Tabela 4.4 Valores do diâmetro (mm) do disco de cimento formado após o teste de fluxo, média e desvio padrão de cada grupo de amostras .....	54

## **CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO**

O tratamento endodôntico consiste no acesso a câmara pulpar, remoção da polpa dental viva ou necrosada, limpeza e modelagem do sistema de canais radiculares (SCR) para que este possa receber o material obturador, responsável pelo selamento tridimensional. Sendo a anatomia do SCR muito complexa, torna-se muito difícil conseguir uma completa desinfecção deste devido aos ístmos, ramificações do canal principal e reentrâncias.

A Figura 1.1 ilustra as etapas do tratamento endodôntico. Durante o preparo químico-mecânico, a limpeza é realizada pela ação mecânica dos instrumentos endodônticos visando à eliminação de irritantes como os microorganismos, seus subprodutos e tecido pulpar vivo ou necrosado (Figura 1.1 a). As soluções irrigadoras são responsáveis pela ação química, atuando como solventes de matéria orgânica, lubrificantes e apresentando atividade antimicrobiana. A irrigação-aspiração cria um fluxo dentro do canal permitindo a saída dos detritos. A modelagem por sua vez permite que o canal obtenha um formato final cônico com menor diâmetro apical e maior em nível coronário. O objetivo final do tratamento endodôntico é a restituição da função normal do dente. A obturação é considerada a finalização de um conjunto de procedimentos intracanaís que visa substituir o espaço vazio antes ocupado pela polpa dentária, por material adequado evitando o trânsito de bactérias e subprodutos irritantes entre coroa/periápice e vice-versa (Figura 1.1 b). Normalmente, a maior massa do material obturador é formada pela guta-percha (material sólido) e complementada com o cimento endodôntico (LOPES e SIQUEIRA JR., 2010).

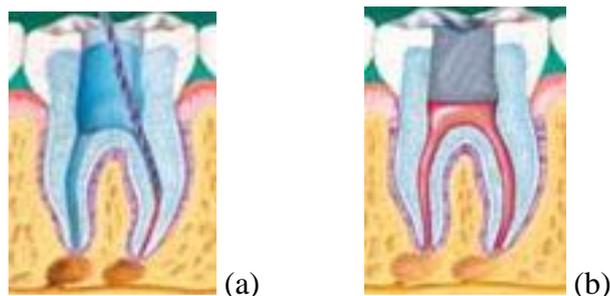


Figura 1.1 (a) Instrumento endodôntico introduzido no canal durante o preparo químico mecânico; (b) Canais selados com material obturador. Adaptado de [www.matuckodonto.com.br](http://www.matuckodonto.com.br) (acessado em 10 de dezembro de 2010).

A guta-percha é um polímero obtido a partir do metil-butadieno ou isopropeno que possui duas formas cristalinas: alfa e beta. É utilizada na clínica em forma de cones e apresenta como propriedade central a viscoelasticidade, pois quando submetida à força de compactação, mantida por alguns segundos, se deforma plasticamente. Quanto maior a deformação plástica, maior o escoamento. Suas vantagens são: biocompatibilidade, radiopacidade, passível de ser plastificada, estabilidade dimensional, além de não alterar a cor da coroa e ter fácil remoção. A principal desvantagem é a baixa adesividade, podendo ser deslocada sob pressão. Por isso é necessária a complementação com o cimento endodôntico, fazendo com que a interface cones de guta-percha/paredes do canal radicular seja reduzida. Além disso, o cimento lubrifica as paredes do canal radicular, facilitando a introdução do material obturador sólido e o preenchimento das irregularidades dos canais, nas quais a penetração da guta-percha torna-se impossível (LOPES e SIQUEIRA JR., 2010).

A importância da remoção dos microorganismos está relacionada com a prevenção para uma subsequente reinfecção. O *Enterococcus faecalis* tem se mostrado a bactéria mais prevalente nos casos de insucesso do tratamento endodôntico. Quando presente em infecções iniciais apresenta-se em baixíssima porcentagem, porém quando penetra no canal radicular durante ou após o tratamento, tem a capacidade de resistir a medicamentos intracanal, soluções irrigadoras e obturação. Em casos de persistência desses microorganismos após a obturação, a atividade antimicrobiana do cimento endodôntico tem papel fundamental na contribuição para o sucesso do tratamento. Seu

agente antimicrobiano necessita ter a capacidade de se difundir e atingir túbulos dentinários e áreas contaminadas (MICKEL *et al.*, 2003).

Com tantas opções de cimentos endodônticos no mercado, torna-se cada vez mais difícil a escolha do melhor material pelo cirurgião dentista. O AH Plus™ (Dentsply De Trey GmbH, Alemanha) é um cimento resinoso que, segundo o fabricante, apresenta ótimas propriedades adesivas, excelente biocompatibilidade e boa penetração em canais laterais. Apesar dessas qualidades, sua atividade antimicrobiana é considerada moderada.

A quitosana, polímero natural derivado da desacetilação parcial da quitina, tem grande importância em diversas aplicações biomédicas pela capacidade de exibir alta atividade antimicrobiana sobre bactérias gram-positivas e gram-negativas. Sua atividade antimicrobiana é influenciada por diversos fatores incluindo o tipo de quitosana utilizado e grau de polimerização dentre outras propriedades físico-químicas (QI *et al.*, 2004). A quitosana pode ser utilizada nas indústrias cosmética e gastronômica; em aplicações médicas e odontológicas atuando, por exemplo, como carreadoras de fármacos (YANG e HON, 2009; WILSON *et al.*, 2009), DNA ou proteínas (GAN *et al.*, 2005), eliminando os microorganismos com sua elevada atividade antimicrobiana (QI *et al.*, 2004; SHI *et al.*, 2006; ANITHA *et al.*, 2009; DU *et al.*, 2009; SHRESTHA *et al.*, 2010); atuando como quelante de íons metálicos, etc. Devido a sua versatilidade, este polímero pode ser produzido na forma de filmes, fibras, hidrogéis, micro ou nanopartículas.

Nanopartículas de quitosana (NPs) têm sido utilizadas como carreadoras de fármacos. Possuindo tamanho reduzido (entre 40 nm e 100 nm) e superfície positiva (50 mV) podem exibir alta capacidade de sorção (fenômeno simultâneo de absorção e adsorção) e considerável atividade antimicrobiana (QI *et al.*, 2005). Sua atividade antimicrobiana tem relação direta com o tamanho das partículas e com o potencial zeta; características estas que podem ser controladas variando-se o pH das soluções durante a formação das nanopartículas (ALI *et al.*, 2010). Na odontologia, é importante que as nanopartículas tenham tamanho e morfologia adequados para possibilitar a sua penetração nos túbulos dentinários, os quais apresentam diâmetros médios de 2,5 µm (COHEN e HARGREAVES, 2007).

## **1.1. Objetivos**

### **1.1.1. Objetivo geral da dissertação**

Avaliar uma estratégia para aumentar a atividade antimicrobiana do cimento AH Plus™ por meio da incorporação de nanopartículas de quitosana (NPs).

### **1.1.2. Objetivos específicos da dissertação**

- Produção de NPs pelo método de gelificação iônica ou pela técnica de spray drying;
- Caracterização das NPs produzidas;
- Caracterização físico-química do cimento AH Plus™ contendo NPs (1%, 5% e 10% (p/p));
- Análise da atividade antimicrobiana das NPs produzidas e do cimento contendo NPs frente ao *Enterococcus faecalis*.

## CAPÍTULO II - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Cimentos Endodônticos

O sucesso do tratamento endodôntico depende principalmente da eliminação dos microorganismos presentes na infecção do canal radicular, realizada por meio do preparo químico-mecânico, das substâncias irrigadoras e do preenchimento total do SCR (KAYAOGLU *et al.*, 2005). Um cimento endodôntico que promova uma boa adaptação do cone nas paredes dos canais radiculares aumenta as chances de sucesso do tratamento visto que, embora muito importante para a manutenção do estado de desinfecção dos canais, o selamento coronário nem sempre é respeitado. O contato da saliva com a obturação pode fazer com que ocorra uma microinfiltração, contaminando novamente os canais, resultando no fracasso do tratamento (SILVA NETO *et al.*, 2007). A situação ideal após um tratamento endodôntico é regeneração periapical óssea, ligamento periodontal intacto e deposição de cimento em torno do ápice (DESAI e CHANDLER, 2009).

A obturação do sistema de canais radiculares (SCR), última etapa do tratamento endodôntico, é realizada com materiais em formato de cones e cimentos. Alguns materiais têm sido testados para a obturação do SCR, porém nenhum substitui a gutapercha, universalmente aceita como “padrão-ouro” para os materiais obturadores. Existem na clínica dois tipos de cones: cones de gutapercha e cones Resilon™. Os cones de gutapercha são fabricados em diversos diâmetros e tamanhos, atendendo às necessidades das técnicas de obturação. Esses cones são amplamente utilizados na odontologia devido ao baixo custo, à biocompatibilidade e as diversas opções de cimentos que podem ser associados a estes. Os cimentos são necessários para reduzir as interfaces cones de gutapercha/paredes do canal e cones de gutapercha/cones de gutapercha (quando utilizada a técnica de condensação lateral); facilitar a introdução dos cones no canal e preencher irregularidades não preenchidas pelo cone. Outro sistema de obturação utiliza o cone Resilon™, um primer específico e o cimento resinoso Epiphany™. Essa técnica necessita da exposição dos materiais à luz halógena para que ocorra a união entre a dentina e o material (LOPES e SIQUEIRA JR., 2010). Antes da obturação, é de fundamental importância a retirada da lama dentinária (*smear layer*),

formada por raspas de dentina cortadas com os instrumentos endodônticos, restos de soluções irrigadoras e detritos presentes no interior dos canais. Essa lama pode ocluir os túbulos dentinários e canais laterais, prejudicando o preenchimento desses espaços pelo cimento endodôntico (STAMOS *et al.*, 1995). Os autores realizaram estudos relacionados à utilização do ultrassom como etapa final da limpeza dos canais e na obturação, no momento da introdução do cimento, observando uma melhor remoção da lama dentinária e adaptação do cimento nas paredes dos canais.

No mercado existem vários tipos de cimentos endodônticos disponíveis, classificados quanto ao seu constituinte básico. Podem ser à base de óxido de zinco e eugenol (OZE), hidróxido de cálcio, resinosos, ionômero de vidro e à base de silicone.

Os cimentos à base de óxido de zinco e eugenol são freqüentemente utilizados na clínica. Dentre os utilizados na endodontia, podemos citar: Endofill™ (Dentsply Maillefer), Intrafill™ (SSWhite) e Kerr Pulp Canal Sealer™ (SybronEndo, EUA). Quando os cimentos com esse constituinte básico são aplicados em cavidades dentinárias, pouca quantidade de eugenol se difunde pela dentina até atingir a polpa. Em baixas concentrações, o eugenol atua como anestésico e antiinflamatório. Como restauração provisória, pode facilitar a reparação do tecido pulpar, embora uma aplicação direta do eugenol sobre a polpa exerça efeito deletério. No entanto, em altas concentrações, o eugenol torna-se citotóxico (MARKOWITZ *et al.*, 1992). Durante a obturação, o extravasamento de uma pequena quantidade de cimento contendo eugenol pelo forame apical pode exercer efeitos antiinflamatórios e analgésicos sobre os tecidos perirradiculares, enquanto que uma grande quantidade de cimento extravasado tende a interferir negativamente no processo de reparo tecidual. As propriedades físico-químicas e biológicas do cimento dependem do tamanho de partículas da fase sólida (pó), pureza das matérias-primas, condições do ambiente clínico (umidade relativa do ar e temperatura) e do tempo e modo de espatulação (LOPES e SIQUEIRA JR., 2010).

Dentre os cimentos contendo hidróxido de cálcio podemos destacar: Sealapex™ (SybronEndo/Kerr, EUA) e Sealer 26™ (Dentsply, Brasil). Os cimentos à base de hidróxido de cálcio possuem muitos efeitos biológicos benéficos embora apresentem alguns requisitos físico-químicos inconvenientes, como por exemplo, a falta de radiopacidade, pouco escoamento e solubilização com o tempo. DESAI e CHANDLER (2009) realizaram uma revisão bibliográfica das principais características desses cimentos e afirmaram que as duas maiores razões para o amplo uso deles são a estimulação de reparação dos tecidos periapicais e seus efeitos antimicrobianos. Além

disso, sua toxicidade mostrou-se mais amena quando comparada a outros tipos de cimentos.

Em relação aos cimentos à base de silicone, existem poucos estudos avaliando suas propriedades físico-químicas e biológicas. Um exemplo desse grupo é o RoekoSeal Automix™ (Dental Products, Langenau, Alemanha). O cimento é colocado no canal através de um aplicador específico, o qual mistura o cimento na dosagem apropriada. Sua polimerização completa independe da umidade e da temperatura (LOPES e SIQUEIRA JR., 2010). LEONARDO *et al.* (2008) avaliaram histologicamente os tecidos perirradiculares de dentes de cães após a obturação com o RoekoSeal Automix™ e o AH Plus™ (cimento resinoso). Em relação ao infiltrado inflamatório, à espessura do ligamento periodontal e à quantidade de reabsorção dentinária, cementária ou óssea não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os dois cimentos empregados.

Cimentos à base de ionômero de vidro têm sido amplamente utilizados na odontologia em consequência de suas propriedades benéficas tais como atividade antimicrobiana, efeito cariostático, adesão química à estrutura dentária e biocompatibilidade. O Ketac-Endo™ (3M-ESPE, Alemanha) é o representante mais estudado desse grupo. SHALHAV *et al.* (1997) mostraram que esses cimentos apresentaram uma potente, porém curta, atividade antimicrobiana, a qual se mostrou mais eficaz quando o cimento estava fresco e quase nula no período após 24 horas da manipulação.

Os cimentos à base de resina epóxi apresentam uma ótima adesão com as paredes dentinárias e uma significativa penetração nos túbulos dentinários (RAHIMI *et al.*, 2009). Estes são comumente representados pelo AH 26™ (Dentsply / Maillefer, Ballaigues, Suíça) e AH Plus™ (Dentsply DeTrey GmbH, Alemanha). Além das vantagens citadas acima, ainda apresentam uma excelente capacidade de selamento apical. Com o objetivo de tentar reduzir a microinfiltração e os espaços vistos em obturações com guta-percha, foi desenvolvido um novo sistema relacionado com os procedimentos adesivos da dentina. Este sistema é composto pelo cimento resinoso à base de metacrilato, Epiphany™ (Pentron Clinical Technologies) e pelos cones à base de poliéster, Resilon™ (RealSeal; SybronEndo) (SLUTZKY-GOLDBERG *et al.*, 2008). As paredes dentinárias são preparadas para o contato com o Resilon e o cimento através de um *primer* e após a obturação uma luz halógena é utilizada para formar uma ligação entre a dentina e o material obturador (LOPES e SIQUEIRA JR., 2010).

Existem alguns requisitos básicos que os cimentos necessitam preencher, tais como:

Escoamento - Quando manipulado o cimento necessita obter um escoamento adequado que permita uma boa penetração nas ramificações, ístmos e irregularidades das paredes dos canais, mas que não promova um extravasamento apical desnecessário. Canais laterais e túbulos dentinários são regiões propícias ao estabelecimento e multiplicação de microorganismos. O cimento deve conseguir preencher estes canais e túbulos favorecendo uma obturação tridimensional, visto que estas áreas quando não obturadas devidamente podem levar ao insucesso do tratamento (STAMOS *et al.*, 1995).

Adesividade entre o cimento endodôntico e a dentina das paredes dos canais radiculares - Essa força adesiva é importante para manter a integridade do selamento e da obturação, evitando futuras microinfiltrações. Um cimento com viscosidade adequada penetrará mais facilmente em ramificações e túbulos dentinários, promovendo de forma mecânica, uma boa adesão (TAGGER *et al.*, 2002).

Biocompatibilidade do cimento com os tecidos adjacentes – Não apenas o cimento como também a guta-percha não devem interferir negativamente no processo de reparo dos tecidos com os quais estão em contato. Embora a maioria dos cimentos apresente citotoxicidade antes da presa, normalmente perdem esta propriedade após endurecimento (LOPES e SIQUEIRA JR., 2010). A citocompatibilidade e a capacidade de gerar mutações gênicas dos cimentos e seus componentes que se difundem, necessitam ser estudadas criteriosamente para averiguar a viabilidade do seu uso na clínica (HUANG *et al.*, 2002). Por isso, é preciso conhecer as características biológicas dos cimentos antes de sua aplicação clínica. Vários estudos têm mostrado que alguns cimentos à base de resina epóxi frescos podem induzir fortes efeitos citotóxicos. No caso do AH26™, esses efeitos podem ser explicados devido à presença de formaldeído. Além de citotóxico, este cimento também tem mostrado efeitos mutagênicos, em contraste com o AH Plus™ que não demonstra nenhum efeito mutagênico e citotóxico, apresentando maior biocompatibilidade (LEYHAUSEN *et al.*, 1999).

Tempo de trabalho – O material deve permitir que o profissional consiga fazer a manipulação de acordo com o fabricante e proceda a sua consulta em tempo razoável

até o término da obturação sem alterações na consistência do cimento. O tempo de presa do cimento é o tempo necessário para que todas as reações ocorram e o cimento obtenha o endurecimento definitivo. O ideal é que ao tomar presa haja uma leve expansão do cimento, promovendo um selamento tridimensional da área.

Fácil inserção e remoção – O cimento deve apresentar solubilidade em solventes disponíveis no mercado (eucaliptol e óleo de laranja, por exemplo), possibilitando o retratamento, quando necessário. Deve ser insolúvel em fluidos teciduais e na saliva, garantindo a integridade da obturação. Além disso, deve ser impermeável, não permitindo o trânsito de fluidos contendo bactérias e suas toxinas no interior dos canais radiculares (LOPES e SIQUEIRA JR., 2010).

Radiopacidade – Esta característica é importante para controlar radiograficamente o preenchimento do canal radicular e depende do tipo de cimento e cones utilizados, compactação e volume da obturação. Sulfato de bário, carbonato de bismuto, óxido de zinco e óxido de bismuto são substâncias químicas empregadas como opacificadores dos cimentos endodônticos. Embora tenham que ser radiopacos, os cimentos não devem manchar a estrutura dentária (LOPES e SIQUEIRA JR., 2010).

Atividade antimicrobiana - A obturação do sistema de canais radiculares com um cimento que apresenta atividade antimicrobiana não apenas no momento da obturação como também continue eliminando as bactérias presentes dentro dos túbulos dentinários ou áreas de reentrâncias tende a melhorar a qualidade do tratamento (HELING e CHANDLER, 1996). Atividade antimicrobiana e biocompatibilidade são dois requisitos que devem estar associadas no momento da escolha de um material obturador apropriado (HUANG *et al.*, 2002).

No momento da escolha de um cimento endodôntico, outras propriedades, assim como estabilidade dimensional, também precisam ser consideradas (KAYAOGLU *et al.*, 2005).

## 2.2. Atividade Antimicrobiana

Embora a instrumentação, as substâncias irrigadoras e a medicação intracanal reduzam significativamente o número de microorganismos presentes na infecção dos canais radiculares, é impossível eliminá-los totalmente em todos os casos. Por isso, o uso de cimentos endodônticos que apresentem atividade antimicrobiana é muito importante para a eliminação desses microorganismos que sobreviveram às etapas anteriores e a erradicação da infecção (ZHANG *et al.*, 2009).

As bactérias remanescentes no SCR após o tratamento endodôntico podem ocasionar a manutenção ou o aparecimento de uma lesão perirradicular, determinando o fracasso do tratamento endodôntico. Para que estas bactérias sejam capazes de ocasionar o fracasso do tratamento elas necessitam possuir capacidade de adaptação ao ambiente modificado drasticamente pelas etapas do tratamento endodôntico; adquirir nutrientes e resistir aos efeitos antimicrobianos dos materiais obturadores; alcançar números críticos e exibir virulência suficiente para manutenção ou aparecimento de inflamação perirradicular; e ter acesso irrestrito aos tecidos perirradiculares para exercer patogenicidade. Além disso, microrganismos inibidores devem estar ausentes ou em baixos números no SCR (LOPES e SIQUEIRA JR., 2010).

O *E. faecalis*, uma vez estabelecido no interior do canal radicular, tem se mostrado o microorganismo mais resistente tendo, portanto, um importante papel no insucesso dos tratamentos endodônticos (MICKEL *et al.*, 2003; DENG *et al.*, 2009). É considerada a espécie mais prevalente em dentes com canal tratado, estando presente em infecções secundárias/persistentes. Além disso possui capacidade de invadir túbulos dentinários (LOPES e SIQUEIRA JR., 2010). Sua resistência pode ser atribuída ao polimorfismo genético, penetração nos túbulos dentinários, adaptação rápida a condições adversas, resistência às substâncias antimicrobianas empregadas durante o preparo e a formação de biofilme. Quando os microorganismos se organizam em comunidade apresentando suas células aderidas umas a outras e às superfícies e/ou interfaces, formando o biofilme, sua capacidade de resistir aos tratamentos antimicrobianos passa a ser maior do que se estivesse isolado (DENG *et al.*, 2009).

Os microorganismos que se posicionam superficialmente nas paredes dentinárias do canal são facilmente retirados durante o preparo químico-mecânico. Já os que penetram nos túbulos dentinários, são mais difíceis de serem eliminados, sendo

necessário lançar mão da atividade antimicrobiana do cimento endodôntico como último recurso de combate a esses microorganismos. Além disso, devido à dificuldade de remoção total da lama dentinária (*smear layer*) formada durante a instrumentação, o contato direto dos cimentos com as bactérias nem sempre é possível na clínica. Devido a estes locais de fixação e multiplicação das bactérias, é necessário que os testes realizados com os cimentos sejam baseados no contato direto ou indireto (por meio do uso de membranas como barreiras) do cimento com os microorganismos (KAYAOGLU *et al.*, 2005).

No mercado, devido à diversidade de cimentos disponíveis, existe uma enorme variedade de agentes antimicrobianos. É interessante que o agente haja rapidamente sobre o microorganismo, embora sua atividade tanto a curto quanto em longo prazo seja fundamental (KAYAOGLU *et al.*, 2005). Além disso, o conceito do sepultamento de bactérias sugere que ao escoar para os túbulos dentinários o cimento isola as bactérias e estas se tornam inofensivas quando privadas de seus nutrientes essenciais e do espaço necessário para seu crescimento e proliferação (MAMOOTIL e MESSER, 2007).

SIQUEIRA JR. *et al.* (1996) analisaram através da microscopia eletrônica de varredura (MEV), a penetração de diversas bactérias em túbulos dentinários, dentre elas o *E. faecalis*. Os dentes utilizados no experimento tiveram suas paredes internas tratadas (desinfetadas) e colonizadas pelas seguintes bactérias: *Porphyromonas endodontalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Actinomyces israelii*, *Porphyromonas gingivalis*, *Propionibacterium acnes* e *Enterococcus faecalis*. Constataram a presença de todas as bactérias utilizadas, associadas ou não, em diversas profundidades, na maioria dos túbulos.

Em outro estudo também utilizando MEV, dentes não tratados e com lesão periapical foram submetidos à análise para observação do padrão de colonização microbiana dos canais radiculares. Células bacterianas foram encontradas em praticamente todas as áreas do SCR. Apesar do achado mais comum ter sido a penetração superficial nos túbulos, células bacterianas foram encontradas atingindo até 300 µm de profundidade. Uma importante observação para o auxílio no tratamento endodôntico foi que muitas vezes essas bactérias estavam associadas, formando um biofilme, dificultando a erradicação total destas apenas com os procedimentos usuais (SIQUEIRA JR. *et al.*, 2002).

Um dos métodos mais utilizados para a avaliação da atividade antimicrobiana de cimentos endodônticos é o de difusão em Agar. Neste método mede-se o halo de

inibição (halo sem crescimento bacteriano) formado ao redor de onde o cimento é depositado. Apesar de ser uma metodologia consolidada, ainda é preciso comprovar se o tamanho do halo de inibição depende somente da toxicidade do cimento ou se também tem relação à capacidade de difusão do material. Neste método o cimento pode ser depositado diretamente em poços confeccionados no Agar (LEONARDI *et al.*, 2009) ou sobre discos de papel de filtro posteriormente colocados sobre o Agar (KOPPER *et al.*, 2007).

Um estudo utilizando quatro cimentos endodônticos foi realizado para observar a atividade antimicrobiana destes sobre o *E. faecalis*. Discos impregnados com os cimentos foram colocados em placas contendo o microorganismo e o halo de inibição formado por cada cimento foi observado. O cimento à base de óxido de zinco e eugenol obteve o maior halo mostrando, portanto, a melhor atividade antimicrobiana. O cimento resinoso AH Plus™ não demonstrou nenhuma atividade antimicrobiana (MICKEL *et al.*, 2003).

GOLDBERG-SLUTZKY *et al.* (2008) também analisaram a atividade antimicrobiana de quatro cimentos endodônticos sobre o *E. faecalis*, por meio do teste de contato direto. Alguma atividade antimicrobiana foi mostrada apenas pelo cimento à base de hidróxido de cálcio. Similarmente ao estudo descrito acima, o AH Plus™ não mostrou nenhuma atividade antimicrobiana. Este fato pode estar relacionado à pouquíssima quantidade de formaldeído liberada por este cimento.

Em contraste com os dois estudos descritos anteriormente, KAYAOGLU *et al.* (2005) demonstraram que quando o AH Plus™ foi submetido ao teste de contato direto apresentou uma redução significativa do número de bactérias. No teste de contato indireto foi utilizada uma membrana como barreira, simulando a falta de contato direto que ocorre na clínica, devido à profundidade de penetração das bactérias nos túbulos dentinários e a dificuldade de remoção total da lama dentinária presente nestes. Sob estas condições houve uma drástica redução no poder antimicrobiano do cimento.

ZHANG *et al.* (2009) submeteram o AH Plus™ ao teste de contato direto modificado. No primeiro dia, o cimento apresentou atividade antimicrobiana satisfatória, reduzindo significativamente o número de bactérias nos dois primeiros minutos e eliminando todas elas entre os primeiros cinco a vinte minutos. Após o sétimo dia, o cimento não apresentou atividade antimicrobiana. Em relação ao seu pH, quando fresco se manteve básico, em torno de 10,0, apresentando depois uma redução para 6,0 do primeiro ao terceiro dia, tornando a se elevar após o sétimo dia para 7,5.

YUCEL *et al.* (2006) realizaram um experimento no qual observaram a penetração bacteriana (*E. faecalis*) em 100 dentes, 30 e 60 dias após a obturação. Utilizaram quatro cimentos endodônticos diferentes para obturação dos dentes, dentre eles o AH Plus™ e o AH 26™. Apesar dos cimentos não apresentarem diferença estatisticamente significativa, o AH Plus™ foi o cimento que apresentou a maior infiltração bacteriana tanto na análise feita no 30º quanto no 60º dia.

Em relação aos cimentos à base de hidróxido de cálcio, HELING e CHANDLER (1996) observaram que o cimento obteve a maior atividade antimicrobiana após o sétimo dia, a partir da obturação. Isso ocorreu devido à formação de hidróxido de cálcio, a partir do contato do óxido de cálcio com fluidos orais. O elevado poder antimicrobiano foi atribuído à baixa solubilidade e ao efeito neutralizador do pH do hidróxido de cálcio dentro dos túbulos dentinários.

Ainda na pesquisa supracitada, o cimento endodôntico AH 26™, à base de resina epóxi, mostrou a melhor atividade antimicrobiana no período entre as primeiras vinte e quatro horas e o sétimo dia. A liberação do formaldeído atingiu seu pico dentro de quarenta e oito horas e decresceu até o sétimo dia. Embora esse cimento tenha apresentado uma excelente atividade antimicrobiana, os autores detectaram alta citotoxicidade. Geralmente, uma potente atividade antimicrobiana vem acompanhada de citotoxicidade (KAYAOGLU *et al.*, 2005).

### **2.3. AH Plus™**

Muitos cimentos endodônticos vêm sendo utilizados juntamente com a gutapercha para obturar o canal radicular após o preparo químico-mecânico. O AH Plus™ é um cimento endodôntico à base de resina epóxi bastante utilizado nesta especialidade (Figura 2.1). De acordo com o fabricante, este cimento possui propriedades vantajosas semelhantes às do AH 26™, preservando a química das amino epóxi (VERSIANI *et al.*, 2006). A principal diferença entre o AH Plus™ e seu precursor AH 26™ é que a quantidade de formaldeído liberada pelo AH Plus™ durante o processo de cura é mínima. Levando em consideração a discreta liberação deste componente, a atividade antimicrobiana do AH Plus™ provavelmente vem de outros componentes presentes em sua fórmula (KAYAOGLU *et al.*, 2005).

De acordo com o fabricante, a excelente biocompatibilidade e radiopacidade são os principais pontos positivos do cimento. Além disso, suas propriedades físicas e apresentação na forma de duas pastas permitem uma fácil manipulação e utilização em qualquer técnica de trabalho. Na Tabela 2.1, está listada a composição de cada pasta e na Tabela 2.2, encontram-se as características e os benefícios do AH Plus™.



Figura 2.1 Apresentação comercial do AH Plus™ ([www.dentsply.com.br](http://www.dentsply.com.br)). Acessado em 10 de dezembro de 2010.

Tabela 2.1 Composição do cimento AH Plus™, segundo o fabricante. Adaptado de LEYHAUSEN *et al.* (1999).

AH Plus™	
Pasta A (Lote nº 9502188)	Pasta B (Lote nº 9504176)
Resina epóxi	Amina adamantana
Tungstato de cálcio	N,N-dibenzil-5-oxanonano-diamina-1,9
Óxido de zircônio	TCD-diamina
Óxido de ferro	Tungstato de cálcio
Aerosil	Óxido de zircônio
	Aerosil
	Óleo de silicone

Tabela 2.2 Características e benefícios do AH Plus™ ([www.dentsply.com.br](http://www.dentsply.com.br)). Acessado em 10 de dezembro de 2010.

<b>Características</b>	<b>Benefícios</b>
Fácil manipulação, muito baixo vazamento, baixa contração, alta estabilidade.	Promove selamento sem espaços.
Propriedades auto-adesivas proporcionando alta adesivação a dentina.	Promove selamento sem espaços.
Baixa solubilidade.	Maior tempo de selamento.
Biocompatibilidade: Biologicamente inerte. Apresenta moderada propriedade antimicrobiana.	Segurança.
Alta radiopacidade (13.6Al).	Excelente visualização das imagens em raios-X.
Maior tempo de trabalho.	Penetrar em todos os canais acessórios e não é necessário de apressar para realizar o procedimento.
Tolera o calor não perdendo suas propriedades químicas durante a termoplastificação.	Ideal para técnica de termoplastificação.

BALDI (2009) avaliou as propriedades físico-químicas do AH Plus™ preparado com diferentes porções de pastas retiradas das bisnagas, observando que a pasta B apresentava-se bastante fluida em determinados momentos de uso, principalmente na porção inicial da pasta. Suspeitou-se que não ocorreu uma completa miscibilidade entre os componentes orgânicos e inorgânicos da pasta B. Além disso, ressaltou a importância da manutenção da proporção monômeros/catalisadores para que não ocorra uma variação das propriedades físico-químicas e biológicas do cimento. O autor não

conseguiu determinar se a fase fluida retirada da pasta era apenas os catalisadores, apenas o óleo de silicone ou um pouco de cada componente. A presença do óleo de silicone e sua proporção na fase líquida coletada da pasta B podem ter interferido no tempo de presa do cimento.

A profundidade e a densidade da penetração dos cimentos nos túbulos dentinários são influenciadas por características físico-químicas desses materiais. MAMOOTIL e MESSER (2007) mostraram uma maior profundidade e densidade de penetração dos cimentos resinosos quando comparados a outros cimentos. Foi também verificado que a remoção da lama dentinária auxilia a penetração dos cimentos nos túbulos. Como método de análise da penetração dos cimentos nos túbulos dentinários, foi utilizado o MEV. As imagens produzidas permitiram uma observação detalhada dos túbulos, da integridade e superfície do cimento. Também pôde ser observada a adaptação do cimento dentro dos túbulos. Algumas desvantagens desta técnica são a produção de artefatos durante a preparação das amostras para análise, e a falta de obtenção de todos os detalhes em determinadas resoluções.

VERSIANI *et al.* (2006) realizaram um estudo *in vitro* comparando as propriedades físico-químicas de dois cimentos resinosos: AH Plus™ e Epiphany™, de acordo com a ANSI/ADA nº 57/ 2000. Dentre as propriedades analisadas estavam tempo de presa, solubilidade, escoamento, espessura de película e expansão. O AH Plus™ manteve a maioria de suas propriedades dentro das especificações padrão e apresentou superioridade de algumas de suas propriedades em relação às do Epiphany™.

O sucesso do tratamento endodôntico apenas pode ser completo se o material obturador for biocompatível e promover um selamento biológico da região periapical. SCARPARO *et al.* (2009) realizaram um estudo sobre a histologia do tecido perirradicular, utilizando implantação de tubos de polietileno contendo determinado tipo de cimento endodôntico em subcutâneo de ratos. Foi observado que os cimentos resinosos à base de metacrilato e cimentos de óxido de zinco e eugenol apresentaram um maior potencial para reação inflamatória que o AH Plus™. Este demonstrou o mesmo infiltrado inflamatório quando comparado ao grupo controle após longo período de tempo. O número de células inflamatórias decresceu de acordo com os intervalos de análise (7, 30 e 60 dias), mostrando que a reação inflamatória apresentou uma tendência a diminuir com o passar do tempo.

A fórmula do AH Plus™ não contém metamina, que quando hidrolisada forma amônia e formaldeído. HUANG *et al.* (2002) comprovaram que os efeitos citotóxicos deste cimento mantiveram uma relação dose-dependente, na qual com o aumento da pasta A ou B isoladas ou misturadas, o número de células sobreviventes diminuiu. O componente que apresentou a maior inibição das células foi a pasta B. Já os efeitos citotóxicos do AH 26™ fresco ou com presa completa foram superiores devido à elevada liberação de formaldeído, principalmente no período próximo à sua introdução no canal radicular. Ainda neste estudo, apesar de isolada, os autores mostraram uma possibilidade de mutagenicidade do AH Plus™ pós-tratamento. Por outro lado, LEYHAUSEN *et al.* (1999) não observaram em seus estudos genotoxicidade e mutagenicidade relacionadas ao AH Plus™. Além disso, mostraram que o cimento provocou discreta ou nenhuma injúria celular.

OLIVEIRA *et al.* (2010) avaliaram mudanças na biocompatibilidade do AH Plus™ após adição de hidróxido de cálcio no cimento. As análises foram realizadas através de implantes de tubos de silicone em tecido subcutâneo de ratos e observação do tecido inflamatório formado quando em contato com os tubos. Os resultados comprovaram que a adição do hidróxido de cálcio ao cimento fez com que houvesse uma menor resposta inflamatória e uma menor citotoxicidade. Ainda testando adição de hidróxido de cálcio no AH Plus™, outro estudo avaliou alterações nas propriedades físicas do cimento, concluindo que a adição de 5% ou 10% de hidróxido de Cálcio ao cimento não interferiu no tempo de presa, porém a adição de 10% reduziu significativamente seu escoamento (DUARTE *et al.*, 2010).

## 2.4. Quitina

A quitina é a segunda substância orgânica mais abundante na biosfera, depois da celulose, apesar de superar esta segundo a taxa de reposição, que chega a ser duas vezes maior. Possui baixa toxicidade e é insolúvel em água e na maioria dos solventes orgânicos usuais. É um polímero linear que tem como unidade repetitiva um dissacarídeo unido por uma ligação glicosídica (Figura 2.2) (ANITHA *et al.*, 2009). Suas ligações do tipo  $\beta$  (1  $\rightarrow$  4) definem os terminais redutores e não redutores das

cadeias poliméricas, sendo a hidroxila livre ligada ao carbono 1 e carbono 4, respectivamente, do anel de glicopiranosose. (CAMPANA-FILHO *et al.*, 2007).

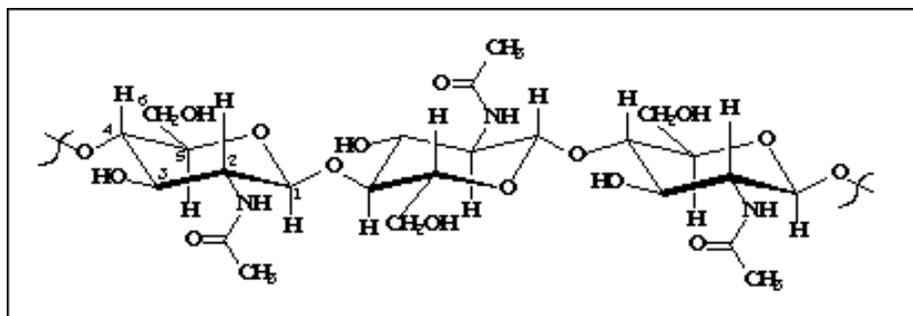


Figura 2.2 Fórmula estrutural da quitina. Adaptado de [www.Polymer.com.br](http://www.Polymer.com.br) (acessado em 10 de dezembro de 2010).

Sendo um polissacarídeo natural, a quitina pode ser extraída da biomassa ou a partir de matérias-primas abundantes e baratas, tais como exoesqueleto de artrópodes, algas diatomáceas e paredes celulares de fungos e leveduras. Apesar de ser sintetizada por uma enorme quantidade de animais e vegetais, as principais fontes comerciais de obtenção da quitina são as carapaças de caranguejo e de camarão, descartadas pelas indústrias pesqueiras. Sua biossíntese não é controlada estritamente por fatores genéticos, apresentando variações de composição quanto ao comprimento das cadeias, conteúdo de unidades glicosamina acetiladas e desacetiladas e sua distribuição ao longo das cadeias. Essas variações também podem ocorrer em função da espécie utilizada e seu estágio de desenvolvimento. Como raramente ocorre em forma pura, a completa eliminação das outras substâncias associadas à quitina não é simples, dificilmente atingindo o padrão de pureza necessário para determinadas aplicações. No caso de aplicações em áreas como a medicina, indústria farmacêutica e alimentícia é importante determinar, por exemplo, o conteúdo residual de metais pesados (CAMPANA-FILHO *et al.*, 2007).

A extração da quitina a partir da biomassa passa por tratamentos químicos sequenciais de desmineralização, desproteinização e despigmentação, não necessariamente nesta ordem, a fim de eliminar as substâncias que a acompanham. Na desmineralização, são utilizadas soluções aquosas de diferentes ácidos (ácido clorídrico e ácido acético, por exemplo) para eliminar os sais minerais, principalmente o carbonato

e fosfato de cálcio. Condições vigorosas relacionadas à temperatura e tempo de tratamento devem ser evitadas para que não haja degradação das propriedades macromoleculares da quitina. Soluções de EDTA podem ser utilizadas embora o tratamento com estas seja mais brando e menos eficiente. A desproteíntização pode ser realizada através da utilização de soluções aquosas de diferentes bases como, por exemplo, hidróxido de sódio ou hidróxido de potássio. Quando necessária, a remoção dos pigmentos pode ser feita por extração com solventes (etanol e acetona são os mais comuns) ou por branqueamento (CAMPANA-FILHO *et al.*, 2007).

A quitina adota estruturas polimórficas de acordo com o organismo em que está presente e o papel que desempenha. Diferencia-se em formas distintas que correspondem a diferentes arranjos no estado sólido com disposições distintas das cadeias do polímero nas lamelas ou folhas constituintes dos domínios cristalinos. São três formas:

$\alpha$ -quitina: encontrada em estruturas rígidas e resistentes, associada às proteínas e/ou materiais inorgânicos, é a forma mais abundante e estável (a transformação das outras duas formas nesta é irreversível). Possui denso empacotamento devido à disposição antiparalela das cadeias poliméricas em diferentes lamelas ou folhas, favorecendo a ocorrência de muitas ligações de hidrogênio inter- e intra-cadeias da mesma lamela e de lamelas diferentes. Apesar de ser insolúvel em água, é capaz de absorver e reter umidade.

$\beta$ -quitina: ocorre em estruturas flexíveis/resistentes. Cadeias de diferentes lamelas encontram-se paralelas, dificultando a ocorrência de ligações de hidrogênio intermoleculares, deixando o empacotamento do material menos denso. Tem aspecto fibroso, não se solubiliza em água, mas por ser menos densa é capaz de absorver mais umidade do que a forma anterior.

$\gamma$ -quitina: também encontrada em estruturas flexíveis/resistentes, é uma combinação do arranjo estrutural das duas anteriores, sendo cadeias de duas lamelas em disposição paralela intercaladas por lamelas com cadeias antiparalelas (CAMPANA-FILHO *et al.*, 2007).

Quando submetidas à difração de raios X, a  $\alpha$ -quitina apresenta um maior número de picos cristalinos quando comparada com a  $\beta$ -quitina, que apresenta picos mais largos e menos intensos, confirmando uma estrutura menos ordenada. Além disso, a cristalinidade das amostras depende de fatores como a natureza do organismo do qual

a quitina foi extraída e as condições às quais o polímero foi submetido no processo de extração. Outro método que pode ser utilizado para distinguir as estruturas polimórficas da quitina é a espectroscopia no infravermelho, embora por este a distinção seja mais difícil (CAMPANA-FILHO *et al.*, 2007).

## 2.5. Quitosana

A quitosana é um polissacarídeo linear obtido a partir da desacetilação parcial da quitina. Sua estrutura primária é idêntica à da quitina, ressaltando que na quitosana predominam as unidades 2-amino-2-desoxi-D-glicopiranosose (Figura 2.3). A completa desacetilação da quitina é raramente realizada por serem necessárias muitas reações consecutivas, que favoreceriam sua progressiva despolimerização. Assim, o termo quitosana abrange o conjunto de copolímeros que contém pelo menos 50-60% dessas unidades (grau de desacetilação maior que 50%). Na prática, é a solubilidade que permite uma distinção rápida e simples entre quitina e quitosana, pois apenas a quitosana é solúvel em soluções aquosas diluídas de vários ácidos (ácido acético e clorídrico são os mais empregados) (CAMPANA-FILHO *et al.*, 2007). Assim, quando o grau de desacetilação se torna maior que 50%, a quitina passa a ser solúvel em meio aquoso e o polímero passa a ser denominado quitosana. A desacetilação pode ser realizada através de processos químicos ou microbiológicos (utilizando enzimas específicas ou microorganismos). As características da quitosana podem variar de acordo com o grau de desacetilação da quitina.

O acesso aos sítios reativos presentes nos domínios cristalinos da quitina é limitado, fazendo com que a hidrólise alcalina dos grupos acetamido, que leva à obtenção da quitosana, não ocorra de forma homogênea e completa ao longo de todas as cadeias. Simultaneamente, é comum a ocorrência de reações como despolimerização e outras colaterais. Conseqüentemente, a desacetilação da quitina realizada em laboratórios e em escala industrial, dá origem a copolímeros de composição e massa molar variáveis, não mantendo uma padronização das propriedades e características mesmo em condições reacionais semelhantes (CAMPANA-FILHO *et al.*, 2007).

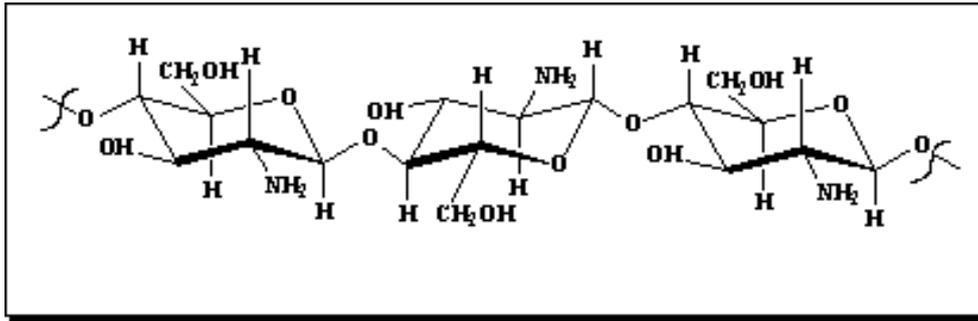


Figura 2.3 Fórmula estrutural da quitosana. Adaptado de [www.Polymer.com.br](http://www.Polymer.com.br) (acessado em 10 de dezembro de 2010).

Uma propriedade variável das soluções contendo quitosana é a viscosidade. Esta varia em função do grau de desacetilação, peso molecular, concentração, pH e temperatura. Geralmente, com o aumento da temperatura nota-se um decréscimo na viscosidade da solução. Já o efeito do pH na viscosidade depende do ácido utilizado (RABEA *et al.*, 2003).

A quitosana possui grupos amino e hidroxila funcionais, os quais podem ser devidamente modificados, a fim de conferir propriedades distintas e desejadas de acordo com a função biológica a ser desempenhada. Os grupos amino podem sofrer diversas reações para dar origem, por exemplo, a produtos com propriedades antibacterianas, antifúngicas, antivirais, anti-ácidas, antialérgicas, anti-úlceras, biocompatíveis e biodegradáveis (PILLAI *et al.*, 2009). Sua natureza química também possibilita modificações covalentes e iônicas que permitem adequações das propriedades biológicas e mecânicas de acordo com a aplicação (KIM *et al.*, 2008).

É considerado um polímero muito versátil com aplicações nas indústrias cosmética e alimentícia e como agente de floculação no tratamento de efluentes aquosos. Sua capacidade de interagir com várias substâncias como proteínas, lipídeos, pesticidas, corantes, íons metálicos e radioisótopos garantem aplicações voltadas para detecção e análise dessas substâncias, sua concentração e recuperação. Exibe também alta atividade antimicrobiana, e devido a sua atoxicidade, biocompatibilidade e biodegradabilidade é aplicada em agricultura, medicina, odontologia e indústria farmacêutica (CAMPANA-FILHO *et al.*, 2007).

A variedade de aplicações da quitosana conta com a diversidade de formas nas quais pode ser preparada, tais como: soluções de viscosidade controlada, géis, filmes,

membranas, microesferas e nanopartículas. As nanopartículas, por exemplo, podem ser produzidas baseadas na gelificação iônica entre sítios positivos da quitosana e negativos do tripolifosfato de sódio (TTP) (KISHEN *et al.*, 2008; DU *et al.*, 2008; SHRESTHA *et al.*, 2009). PILLAI *et al.* (2009) descreveram a eletrofição como um método promissor e versátil de processamento de fibras com diâmetros nanométricos.

A quitosana é considerada um bioadesivo. Sua natureza catiônica possibilita interações com diversas moléculas carregadas negativamente. Apresenta várias vantagens sobre outros tipos de desinfetantes por possuir uma excelente atividade antimicrobiana e antifúngica, um amplo espectro de ação e baixa toxicidade em células de mamíferos. Interações entre moléculas de quitosana positivamente carregadas e membranas celulares microbianas com carga negativa levam a uma alteração na permeabilidade da célula bacteriana, causando um extravasamento de diversos constituintes intracelulares. Conseqüentemente, a quitosana atua principalmente na superfície externa das bactérias. Além disso, a quitosana pode atuar como agente quelante, ligando-se seletivamente a qualquer traço de metal, inibindo a produção de toxinas e o crescimento microbiano. Um terceiro modo de ação sugerido envolve a penetração da quitosana de baixa massa molar na célula, ligando-se ao DNA, inibindo a síntese de RNA e proteínas. Entretanto, a quitosana mostra sua atividade antimicrobiana apenas em meio ácido, devido a sua baixa solubilidade em pH acima de 6,5 (RABEA *et al.*, 2003).

### **2.5.1. Nanopartículas de Quitosana**

A nanotecnologia está relacionada ao estudo de materiais em uma escala muito pequena. No caso das nanopartículas, são compostas por, no máximo, algumas centenas de átomos, nas quais as propriedades dos materiais diferem dos objetos em escalas maiores. Um determinado material quando produzido em escala nanométrica, pode ter o aprimoramento de suas propriedades, tornando-se, por exemplo, mais leve, resistente e/ou funcional. No caso dos biomateriais, a melhora pode ocorrer na biocompatibilidade.

No caso de materiais poliméricos, as nanopartículas podem ser compostas de polímero natural, sintético ou semi-sintético. Seu tamanho varia entre 1 nm até 100 nm.

São mais vantajosas que as micropartículas maiores por serem mais adequadas para a administração intravenosa. Fármacos ou outras moléculas normalmente utilizadas em conjunto com as nanopartículas podem apresentar-se dissolvidas em seu interior, aprisionadas, encapsuladas, adsorvidas ou anexadas a estas (WILSON *et al.*, 2009).

Devido à habilidade da quitosana de gelatinizar em contato com poliânions específicos, o método de gelificação iônica vem sendo descrito na literatura como um dos mais utilizados para obtenção de NPs (QI *et al.*, 2004; QI *et al.*, 2005; DU *et al.*, 2008; DU *et al.*, 2009; DUDHANI e KOSARAJU *et al.*, 2010). Essa técnica envolve a adição de uma fase alcalina contendo TPP em uma fase ácida contendo quitosana. A formação das nanopartículas ocorre imediatamente após a mistura das duas fases por meio de ligações inter e intramoleculares entre os fosfatos do TPP e os grupos amino da quitosana, conforme apresentado na Figura 2.4.

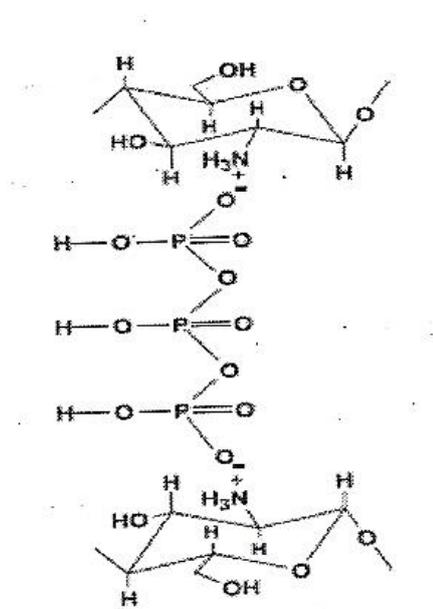


Figura 2.4 Interação da quitosana com tripolifosfato de sódio. Adaptado de Laus *et al.* (2006).

Uma vantagem do processo de gelificação iônica é que o tamanho e o potencial zeta das NPs formadas podem ser variados mediante o controle direto de parâmetros críticos do processamento, tais como: pH da solução de CS e de TPP, relação peso CS/TPP, concentração de CS, temperatura da solução de CS e velocidade de agitação da

solução no momento da formação das NPs. De todos os parâmetros citados, o pH da solução de CS é o mais importante porque dependendo da variação do pH os grupamentos amino da quitosana podem apresentar-se protonados (ligam-se ao P do TPP) ou desprotonados. Todas essas modificações de tamanho, forma e potencial zeta das NPs interferem na atividade antimicrobiana (GAN *et al.*, 2005; ALI *et al.*, 2010).

As nanopartículas ganham destaque entre os pós com atividade antimicrobiana por apresentarem um alto potencial antimicrobiano. Sua maior área superficial e a densidade de cargas que as nanopartículas possuem, fazem com que elas tenham um maior grau de interação com a superfície de carga negativa das células bacterianas (SHI *et al.*, 2006).

DU *et al.* (2009) realizaram um estudo no qual foram produzidas nanopartículas de quitosana pelo método de gelificação iônica e carregadas com íons metálicos. Análises mostraram que a atividade antimicrobiana das nanopartículas de quitosana é diretamente proporcional ao seu potencial zeta. As nanopartículas puras de quitosana apresentaram um potencial zeta em torno de +51,37mV, enquanto que nas nanopartículas carregadas com alguns íons como  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$ , o potencial zeta foi de +88,69mV e +86,65mV, respectivamente. As nanopartículas de maior potencial zeta apresentaram uma atividade antimicrobiana maior quando testadas pelos métodos de Concentração Mínima Inibitória e Concentração Mínima Bactericida utilizando os microorganismos *Escherichia coli*, *Salmonella choleraesuis* e *Staphylococcus aureus*.

Uma importante aplicação das nanopartículas de quitosana na área biomédica é a de carreadoras de fármacos, formando um sistema de liberação deste fármaco lento e contínuo. Os produtos resultantes da degradação da quitosana não são tóxicos nem cancerígenos. A quitosana tem vantagem sobre as outras nanopartículas em desenvolvimento devido à sua capacidade de controlar a liberação de agentes ativos e evitar o uso de solventes perigosos durante a preparação das nanopartículas, devido à sua solubilidade em solução ácida aquosa (WILSON *et al.*, 2009).

Na área médica, uma complicação que afeta muitos pacientes portadores de implantes é a sua contaminação e infecção por microorganismos. A formação de um biofilme e o crescimento bacteriano suportado por este, aumentam a resistência bacteriana aos tratamentos com antibióticos. Juntamente com os implantes, é colocado um tipo de cimento ósseo pré-preparado. A incorporação de íons de prata no cimento auxilia na atividade antimicrobiana, porém quando colocados em altas concentrações causam efeitos citotóxicos (SHI *et al.*, 2006). Esses autores realizaram um estudo para

avaliar a atividade antimicrobiana do cimento mediante a incorporação de nanopartículas de quitosana. Os autores concluíram que a incorporação das NPs aumentou seu potencial antimicrobiano, não apresentou citotoxicidade e ensaios mecânicos demonstraram que houve um aumento na resistência do cimento.

Na área odontológica, nanopartículas de quitosana foram incorporadas a um cimento endodôntico à base de óxido de zinco e eugenol com a finalidade de avaliar a contribuição destas para a atividade antimicrobiana do cimento. Os resultados mostraram um reforço da atividade dos cimentos tanto em testes de contato direto quanto em testes nos quais o contato foi limitado pelo uso de uma membrana, embora neste último a atividade tenha sido mais branda (KISHEN *et al.*, 2008).

SHRESTHA *et al.* (2009) realizaram experimentos envolvendo um sistema de liberação de nanopartículas de quitosana dentro dos túbulos dentinários por meio da técnica de ultrassom focado de alta intensidade (*high-intensity focused ultrasound – HIFU*). As nanopartículas utilizadas tinham tamanho entre 80 e 120 nm, sendo assim menores que o diâmetro dos túbulos dentinários. Os autores verificaram uma penetração de 1.000 µm dentro dos túbulos dentinários, embora sua distribuição não tenha sido uniforme. As nanopartículas foram utilizadas com o objetivo de auxiliar na desinfecção dos canais radiculares.

Um estudo mais recente testou a capacidade de nanopartículas de quitosana e nanopartículas de óxido de zinco de desinfecção e redução de biofilmes contendo *E. faecalis*. Avaliaram também a eficácia antibacteriana dessas nanopartículas em longo prazo, após o envelhecimento. Os autores concluíram que a taxa de morte bacteriana dependeu da concentração das nanopartículas e do tempo de exposição do biofilme à estas. Ambas nanopartículas conseguiram reduzir o biofilme e mantiveram sua atividade antimicrobiana mesmo após o envelhecimento (SHRESTHA *et al.* (2010).

## CAPÍTULO III – MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais utilizados:

- Quitosana comercial (Polymar Indústria e Com. Imp. Exp. Ltda., Ceará, Brasil - lote: 20070629) com grau de desacetilação 72,5%;
- Tripolifosfato de sódio pentabásico (TPP) (Sigma-Aldrich Chemical Co. Ltd., São Paulo, Brasil – lote: 12409021 1436920);
- Ácido acético glacial produzido pela Vetec Química fina Ltda, grau de pureza P.A;
- Hidróxido de sódio produzido pela Vetec Química fina Ltda, grau de pureza P.A;
- Cimento endodôntico AH Plus™ (Dentsply DeTrey GmbH, Germany – lote: 1002000072 e 1005000144).

### 3.1. Produção das nanopartículas

#### 3.1.1. 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. Ocorreu a precipitação da quitosana ao serem adicionados 30 ml de solução aquosa de hidróxido de sódio (NaOH) 2M. O precipitado foi separado por filtração a vácuo e seco a temperatura ambiente (QI *et al.*, 2004).

### 3.1.2. Produção das nanopartículas pelo método de gelificação iônica

As nanopartículas de quitosana (NPs) foram preparadas pelo método de gelificação iônica com base no método descrito por QI *et al.* (2004). A quitosana purificada (CS) foi dissolvida a 0,5% (p/v) em solução de ácido acético 1% (v/v). Após 24h sob agitação e temperatura ambiente, o pH original da solução de 4,0 foi ajustado para  $4,7 \pm 0,1$  com solução de NaOH 10 N. As NPs 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 MILAN (Modelo 202/série 143) com Agulha BD PrecisionGlide™ com 0,55 mm de diâmetro. A partir dessa etapa dois métodos de secagem das NPs foram testados: liofilização e spray drying.

A liofilização é um processo de secagem por congelamento a vácuo no qual todo o solvente é sublimado, restando apenas as NPs secas. Para a confecção das amostras liofilizadas (NP-L/TPP), as NPs foram separadas por centrifugação a 9000xg 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.

O método de spray drying é baseado na secagem de partículas atomizadas em um leito de ar quente. A atomização leva à formação de pequenas gotas que, com a evaporação instantânea do solvente, originam as partículas. Para a produção das nanopartículas secas por spray drying (NP-S/TPP), 267 ml da solução de NPs (solução de CS após gotejamento da solução de TPP) foram secos por meio do equipamento MINI SPRAY DRYER (B-290/BUCHI) pertencente ao Laboratório de Desenvolvimento de Alimentos para Fins Especiais e Educacionais do Instituto de Nutrição da UFRJ, semelhante ao apresentado na Figura 3.1. A temperatura de entrada da solução no aparelho foi de 180<sup>0</sup>C e a temperatura de saída foi de 73<sup>0</sup>C, aproximadamente.



Figura 3.1 Equipamento para realizar secagem por spray drying. Adaptado de [www.ul.ie/web](http://www.ul.ie/web) (acessado em 10 de dezembro de 2010).

### **3.1.3. Produção das nanopartículas por spray drying**

As nanopartículas de quitosana também foram preparadas pelo método de spray drying a partir da solução de CS sem a presença de TPP (NP-S). Testes preliminares mostraram que 200 ml de solução de ácido acético 1% (v/v) contendo 2 g de CS eram suficientes para obtenção das NPs. Neste caso, também foram utilizadas as mesmas condições operacionais descritas no item 3.1.2: temperatura de entrada da solução no igual a 180<sup>0</sup>C e a temperatura de saída em torno de 73<sup>0</sup>C.

## **3.2. Caracterização das nanopartículas**

### **3.2.1. Espectroscopia no Infravermelho (FTIR)**

A caracterização química das NPs foi feita por espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) com auxílio do equipamento

PERKIN ELMER/ SPECTRUM 100. As amostras foram separadas em 4 grupos: CS (quitosana purificada), NP-L/TPP, NP-S e NP-S/TPP. As amostras foram colocadas diretamente sobre o cristal do equipamento, não havendo necessidade de confeccionar pastilhas de KBr.

### **3.2.2. Tamanho das partículas**

A distribuição do tamanho das NPs foi determinada pela técnica de espalhamento de luz com auxílio do equipamento ZETASIZER / NANO-ZS, do Laboratório de Análises Químicas e Processamentos Cerâmicos (PEMM/COPPE). Foram preparadas amostras de solução de CS com TPP, NP-L/TPP, NP-S e NP-S/TPP. Misturou-se 1 gota da solução de CS com TPP com 2 ml de álcool, 0,01 g de NPs com 40 ml de álcool para os grupos NP-L/TPP e NP-S, e com 40 ml de água destilada para o grupo NP-S/TPP. Posteriormente, 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.

### **3.2.3. Microscopia de Força Atômica (AFM)**

Foram analisadas amostras da solução de CS contendo TPP, NP-L/TPP, NP-S e NP-S/TPP. Uma gota da solução de CS com TPP foi misturada com 40 ml de água destilada. Para as NPs secas adicionou-se 0,001 g à 40 ml de água destilada. As amostras foram homogenizadas por meio de um homogenizador Ultra Turrax T25 a 8.000 rpm por 5 min. Imediatamente após essa etapa, uma gota de cada amostra foi vertida em placa de silício com auxílio de uma seringa plástica. Após a evaporação do solvente, a amostra da solução de CS com TPP foi analisada por microscopia de força atômica (AFM) utilizando o Microscópio JPK Nanowizard AFM 1 e as amostras das NPs, por meio do Microscópio Raman Confocal, Modelo Alpha 300R da Witec Focus Inoovations (ULM, Alemanha). Ambos os equipamentos pertencentes ao Laboratório de

Caracterização de Superfícies (AFM) (PEMM/COPPE). Todas as imagens foram obtidas com os equipamentos operando em modo de contato intermitente.

#### **3.2.4. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

As micrografias das NPs e do cimento contendo as NPs foram obtidas com o auxílio de um microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM (modelo 6460 LV), operando a 15 KV. Foi depositada uma gota da amostra de solução de CS com TPP sobre o porta-amostra e aguardou-se a evaporação do solvente. As amostras de NP-L/TPP e NP-S/TPP foram depositadas diretamente sobre o porta-amostra. As amostras contendo o cimento foram retiradas da placa de vidro após a realização do teste de fluxo conforme será descrito no item 3.4.2. Posteriormente, as amostras foram recobertas com uma fina camada de ouro obtida por pulverização a vácuo.

#### **3.2.5. Potencial Zeta**

O potencial zeta das nanopartículas foi medido utilizando um analisador de potencial zeta MARK II – RANK BROTHERS, pertencente ao Laboratório de Química de Interfaces e Sistemas Coloidais do PEMM/COPPE, a temperatura ambiente. Para cada amostra foram misturados 0,02 g de NPs com 40 mL de solução de KCl  $10^{-3}$  M. Para cada amostra dos três grupos de NPs produzidas (NP-L/TPP, NP-S/TPP e NP-S) foram realizadas leituras no pH original da solução e em pH neutro. O pH de cada solução 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.

### **3.3. Preparo do cimento contendo NPs**

O AH Plus™ é um cimento endodôntico resinoso à base de resina epóxi, apresentado comercialmente em duas pastas (Figura 2.1 e Tabela 2.2). Proporções variadas de 2 grupos de NPs (NP-L/TPP e NP-S/TPP) foram adicionadas ao cimento AH Plus™ (0%, 1%, 5% e 10% (p/p)). Testes preliminares mostraram que não houve variação na consistência e no tempo de presa do cimento em função da ordem de incorporação de 1% de NP-S/TPP ((pasta A + NPs) + pasta B; (pasta B + NPs) + pasta A; (pasta A + pasta B) + NPs). Decidiu-se, então, incorporar as NPs à mistura das duas pastas para que não houvesse interferência das NPs nas ligações químicas que ocorrem entre as pastas. O cimento foi espatulado de acordo com as instruções do fabricante, homogeneizando a mistura com as NPs manualmente em uma placa de vidro com auxílio de uma espátula 24.

### **3.4. Caracterização do cimento**

#### **3.4.1. Tempo de Presa**

Para a realização desse teste as amostras foram separadas em 4 grupos (AH Plus™ puro, AH Plus™ com 1%, 5% e 10% de NP-S/TPP) e para cada grupo de amostras foram confeccionados 6 corpos de prova. Testes preliminares demonstraram que a mistura de 0,1 g de cada pasta do cimento eram suficientes para preencher um eppendorf de 0,1 mL. Duas placas de vidro com dimensões 150 x 80 x 5 mm foram utilizadas. Cada placa recebeu 12 eppendorfs fixados por uma cera em sua base (3 corpos de prova de cada grupo) e as amostras foram colocadas no interior dos eppendorfs com o auxílio de uma seringa Centrix™ (Figura 3.2). Uma das placas foi transferida para uma estufa com temperatura a 37°C e 21% de umidade relativa do ar. A outra placa permaneceu em contato com o ambiente com temperatura a 23°C e 40% de umidade relativa do ar. Para a determinação do tempo de presa foi utilizada uma Agulha BD PrecisionGlide™ de peso 0,20 g e ponta com 0,55 mm de diâmetro. Quando o

tempo de presa fornecido pelo fabricante foi atingido (480 min), foi colocada a agulha verticalmente até encostar a superfície do cimento. A ponta da agulha foi limpa e o movimento repetido em intervalos de 30 minutos até que as impressões não fossem mais vistas. O tempo desde o início da mistura até o momento que as impressões deixaram de ser vistas foi registrado. A média do tempo de cada grupo foi calculada e estabelecida como o tempo de presa do cimento.

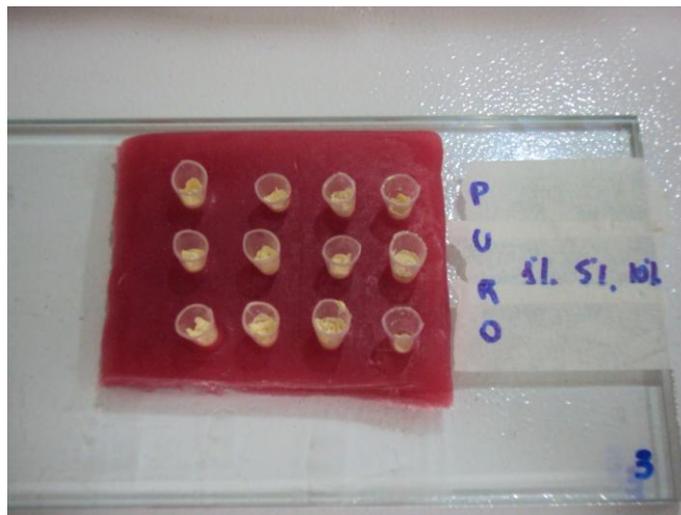


Figura 3.2 Disposição dos grupos de amostras na placa de vidro.

### 3.4.2. Teste de Fluxo

Existem muitos métodos de avaliação do escoamento dos cimentos. Alguns autores seguiram a metodologia descrita pela norma ANSI/ADA n°57, que utiliza a quantidade de 0,5 mL de cimento colocada sobre uma placa de vidro com tamanho de, pelo menos, 40 x 40 mm e 5 mm de espessura. Uma segunda placa semelhante é colocada sobre esse cimento associada a um peso, totalizando 120 g de compressão sobre o cimento (ALMEIDA *et al*, 2007; BERNARDES *et al*, 2010). Variações da norma também são encontradas na literatura em relação ao peso total de compressão (SIQUEIRA *et al*, 2000) e ao tamanho das placas de vidro (BALDI, 2009). Nesse trabalho utilizou-se um procedimento adaptado dessa Norma. Para a realização desse

teste as amostras foram separadas em 3 grupos (AH Plus™ puro, AH Plus™ com 5% e 10% de NP-L/TPP). O cimento foi espatulado de acordo com as instruções do fabricante e para cada amostra foi colocado 0,1 ml de cimento sobre uma placa de vidro lisa e plana, com dimensões de 150 x 80 x 5 mm, com auxílio de uma seringa Centrix™ com ponteira agulhada. Três minutos após o início da mistura, foi colocada uma segunda placa de vidro com as mesmas dimensões da primeira e peso de 180 g sobre o cimento, fazendo uma massa total de compressão de 180 g. Dez minutos após o início da espatulação, a placa superior foi removida e o diâmetro do disco de cimento medido com o auxílio de uma régua de alumínio graduada em milímetros e confirmado por meio de um paquímetro. O teste foi realizado em triplicata e a média dos diâmetros encontrados em cada grupo foi calculada. O valor encontrado foi considerado como o valor do escoamento do cimento.

### **3.5. Propriedades Antimicrobianas**

Os testes antimicrobianos foram realizados no Laboratório de Bacteriologia Médica do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da UFRJ.

#### **3.5.1. Teste da Concentração Mínima Inibitória (CMI)**

##### **3.5.1.1. NPs**

Para a realização do teste de atividade antimicrobiana, as amostras do produto foram divididas em 3 grupos: NP-L/TPP, NP-S e NP-S/TPP. Cada amostra de NPs foi preparada adicionando 0,01g de NPs em 5 mL de água deionizada estéril.

##### **a) Preparação do inóculo**

O meio de cultura utilizado foi o Trypticase Soy Broth (TSB, Caldo Caseína Soja). O inóculo foi padronizado a partir de uma cultura pura de *E. faecalis* ATCC 29212. Para isso, a partir de um crescimento recente (18 h a 35°C, em aerobiose) em placa contendo o meio de agar sangue, várias colônias foram suspensas em caldo TSB, 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.

#### **b) Realização do teste**

Sete tubos 13x100 mm receberam 1 mL da diluição do inóculo microbiano e 50, 75, 100, 125, 150, 175 e 200 µL da amostra do produto, respectivamente. Os tubos foram incubados em uma estufa BOD Q-315 QUIMIS a 35°C durante um período de 24 h. Após o período de incubação, foi realizada a leitura visual do teste e de cada tubo uma alíquota de 10 µL foi semeada para uma placa contendo agar cromogênico para detecção do crescimento de *E. faecalis* (PlastLabor) com o auxílio de uma alça calibrada. As placas foram incubadas em estufa a 35°C por 24 h e a leitura efetuada. Este teste teve como objetivo determinar a concentração mínima inibitória das amostras sobre o *E. faecalis*.

Como controles, foram utilizados:

- um tubo contendo 1 mL do caldo TSB (sem bactéria) mais 200 µL da amostra - teste de controle de contaminação do produto;
- um tubo contendo 1 mL do caldo com inóculo - controle do crescimento bacteriano.

#### **3.5.1.2. Solução de CS com TPP**

Para a realização do teste de atividade antimicrobiana da solução foi utilizada a mesma metodologia descrita nos itens 3.5.1.1. (a) e (b). A diferença deste teste foi a amostra utilizada (solução de CS com TPP).

### **3.5.2. Teste do halo de inibição**

Para a realização desse teste foi utilizada uma placa de Trypticase Soy Agar (TSA, Ágar Caseína Soja). A placa foi semeada com a diluição de  $1,5 \times 10^5$  ufc/mL preparada para o teste anterior, com o auxílio de um swab. Em seguida, a placa foi dividida em 4 partes iguais e um poço de 6 mm de diâmetro foi confeccionado em cada quadrante. Amostras do AH Plus™ puro e adicionado de 1%, 5% e 10% de NP-L/TPP foram preparadas e depositadas nos poços identificados, por meio de uma seringa Centrix™. A placa foi incubada em estufa a 35°C por 24 h e, em seguida, a presença de um halo de inibição ao redor do poço contendo o produto foi anotada.

### **3.6. Análises estatísticas**

Foram realizados os testes ANOVA e Tukey com nível de significância de 5% para analisar diferenças estatisticamente significantes em relação ao tempo de presa e escoamento do cimento.

## CAPÍTULO IV – RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Caracterização das nanopartículas

#### 4.1.1. Espectroscopia no Infravermelho (FTIR)

A Figura 4.1 apresenta a espectroscopia no infravermelho de todas as amostras analisadas. No espectro da quitosana purificada (CS), a banda em  $3360\text{ cm}^{-1}$  corresponde a vibrações de estiramento dos grupamentos amino ( $\text{NH}_2$ ) e hidroxila (OH) presentes na estrutura química da quitosana. As bandas em  $1645\text{ cm}^{-1}$  e  $1554\text{ cm}^{-1}$  correspondem ao estiramento da ligação C=O da amida I e vibrações dos grupamentos amino, respectivamente.

No espectro das NP-L/TPP, ocorre um deslocamento do pico e alargamento da banda de absorção antes localizada em  $3360\text{ cm}^{-1}$  para  $3200\text{ cm}^{-1}$  devido ao reforço nas ligações de hidrogênio. Observa-se com maior detalhamento na Figura 4.2 um deslocamento do pico localizado em  $1645\text{ cm}^{-1}$  para  $1634\text{ cm}^{-1}$  indicando a ocorrência de ligações entre os grupos fosfato do TPP e íons amônia da CS. A reticulação da quitosana pelo TPP foi confirmada pelo aparecimento de um pequeno pico de absorção a  $1219\text{ cm}^{-1}$  no espectro das NP-L/TPP, relacionado ao estiramento da ligação P=O (ligação presente na estrutura química do tripolifosfato de sódio – Figura 2.4). No entanto, esta banda não foi observada no espectro das NP-S/TPP. Neste caso, observou-se o aparecimento de uma nova banda de absorção a  $1121\text{ cm}^{-1}$ . Esta banda pode estar relacionada à presença de íons fósforo em outro estado de oxidação.

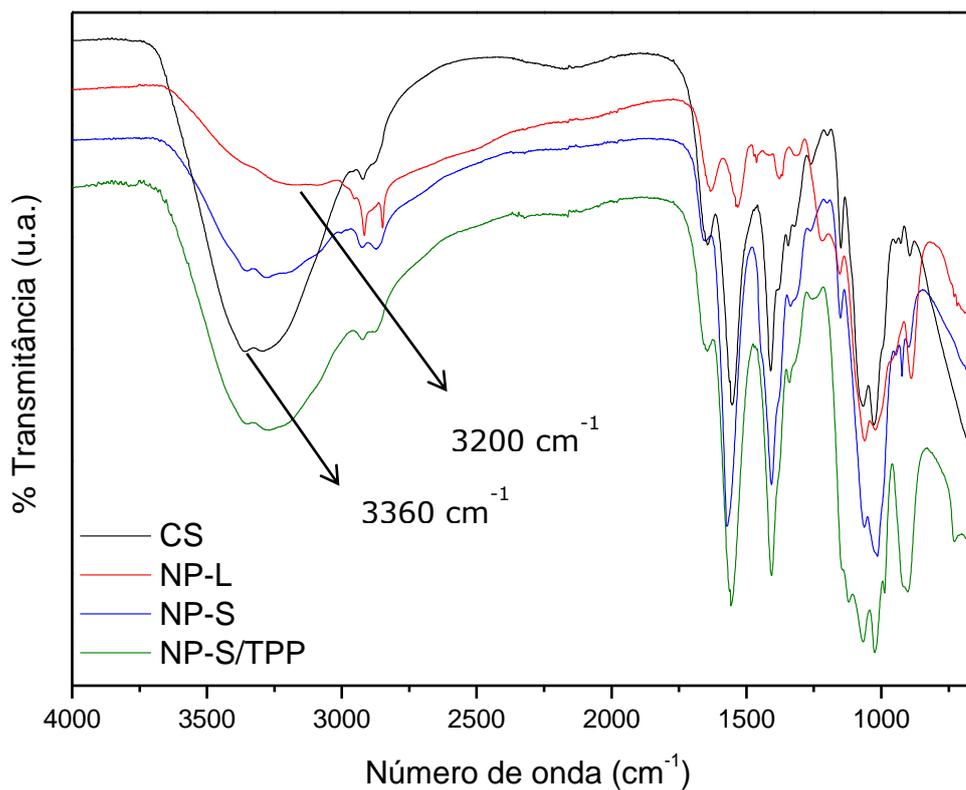


Figura 4.1 Espectroscopia no Infravermelho das amostras de CS, NP-L/TPP, NP-S e NP-S/TPP.

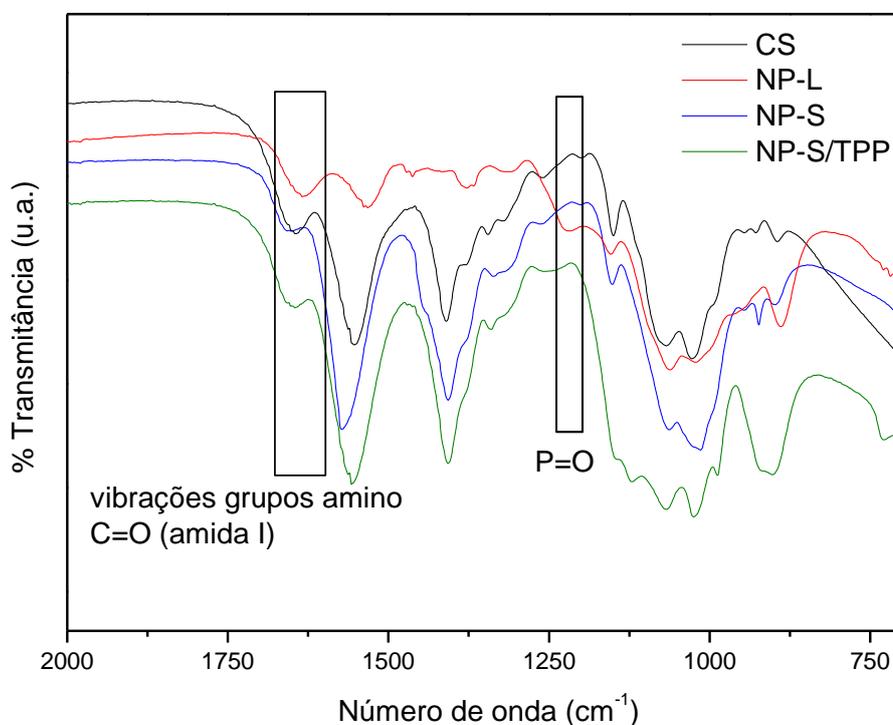


Figura 4.2 Espectros no Infravermelho das amostras de CS, NP-L/TPP, NP-S e NP-S/TPP. Detalhe da região de  $740-2000 \text{ cm}^{-1}$ .

Na literatura, a banda correspondente a vibrações de estiramento dos grupamentos amina e hidroxila da CS também é encontrada em  $3419\text{ cm}^{-1}$  (QI *et al.*, 2004),  $3428\text{ cm}^{-1}$  (ANITHA *et al.*, 2009),  $3435\text{ cm}^{-1}$  (AOUADA, 2009) e  $3367\text{ cm}^{-1}$  (DUDHANI e KOSARAJU, 2010). No espectro das NPs, o pico relacionado à ligação entre os grupos fosfato do TPP com os íons amônia da CS são encontrados, por exemplo, em  $1642\text{ cm}^{-1}$  e  $1547\text{ cm}^{-1}$  (QI *et al.*, 2004),  $1641\text{ cm}^{-1}$  (ANITHA *et al.*, 2009),  $1530\text{ cm}^{-1}$  (AOUADA, 2009) e  $1528\text{ cm}^{-1}$  (DUDHANI e KOSARAJU, 2010).

#### 4.1.2. Tamanho das partículas

A primeira análise foi realizada na solução de CS com TPP. Os resultados mostraram que 96,7% das partículas em solução tinham diâmetro médio de 219 nm e 3,3% diâmetro médio de 96 nm. A distribuição de partículas dessa amostra está apresentada na Figura 4.3, mostrando a presença de partículas com diâmetros no intervalo de 79 a 342 nm.

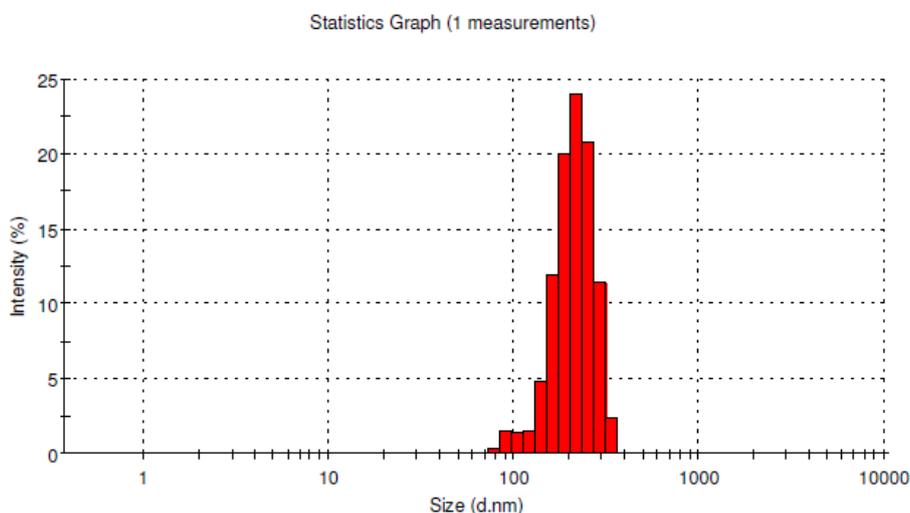


Figura 4.3 Gráfico da distribuição de partículas da solução de CS com TPP.

Para a amostra das NP-L/TPP (secagem pela técnica de liofilização) verificou-se que 66,2% das partículas apresentaram diâmetro médio de 145 nm e 33,8% diâmetro

médio de 59 nm. Na Figura 4.4 está apresentada a distribuição de partículas de NP-L/TPP mostrando ampla distribuição de tamanho situada no intervalo de 38 a 295 nm.

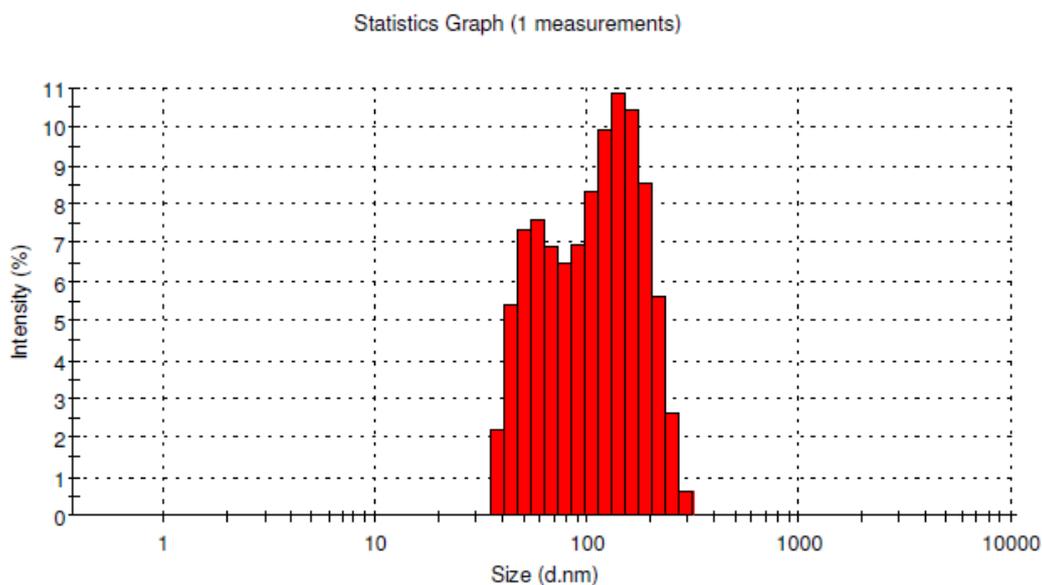


Figura 4.4 Gráfico da distribuição de partículas das NP-L/TPP.

A amostra das NP-S/TPP (secagem pela técnica de spray drying) apresentou 93,7% das partículas com diâmetro médio de 86 nm e 6,7% próximos a 22 nm. A Figura 4.5 mostra que houve uma distribuição de um número pequeno de partículas com diâmetros no intervalo de 18 a 28 nm e um número maior de partículas com diâmetros no intervalo de 51 a 122 nm.

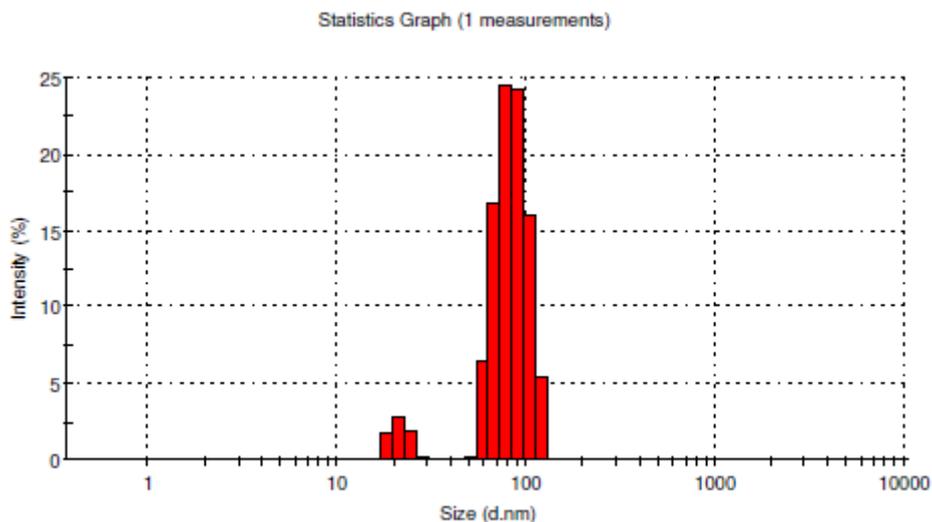


Figura 4.5 Gráfico da distribuição de partículas das NP-S/TPP

A amostra das NP-S (produção das NPs pela técnica de spray drying) mostrou um pico no qual 100% das partículas obtiveram diâmetro médio de 315,6 nm. A sua distribuição de partículas está apresentada na Figura 4.6, mostrando uma estreita distribuição com diâmetros no intervalo de 295 a 342 nm.

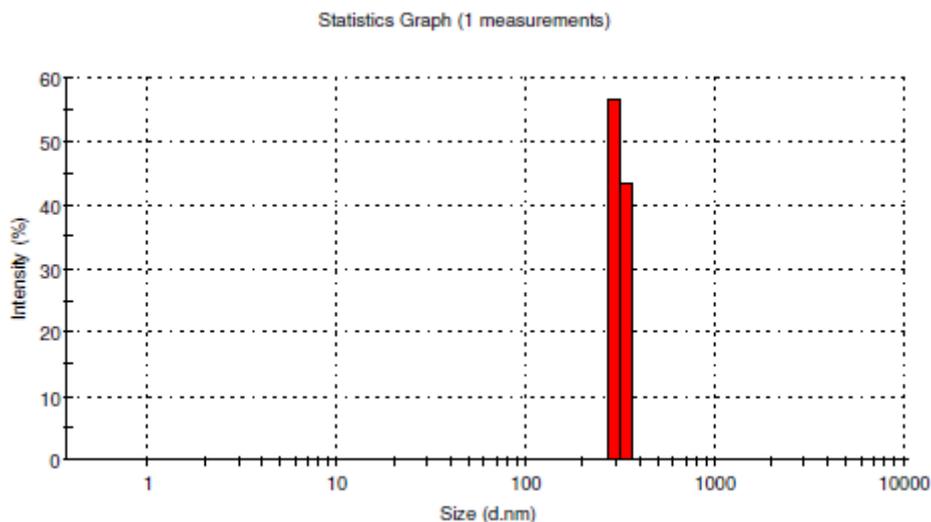


Figura 4.6 Gráfico da distribuição de partículas das NP-S.

O método de produção das NPs por spray drying possibilitou a obtenção de NPs com distribuição de tamanho mais homogênea, porém com tamanhos superiores a 100 nm. As demais amostras apresentaram de forma geral uma ampla distribuição de tamanho de partículas, confirmando a existência de partículas em escala nanométrica (menores que 100 nm). Os intervalos de tamanhos maiores podem ser leituras de aglomerados, justificados pela extensa área superficial das partículas e pela dificuldade de dispersão destas no meio. Mesmo nos casos de NPs com tamanhos maiores que 100 nm, esses tamanhos foram compatíveis com o diâmetro médio dos túbulos dentinários (2,5  $\mu\text{m}$ ).

De acordo com a literatura, NPs produzidas pelo método de gelificação iônica e liofilizadas apresentaram tamanhos entre 40 e 100 nm (QI *et al.*, 2004; QI *et al.*, 2005, DU *et al.*, 2009). KISHEN *et al.* (2008) produziram nanopartículas utilizando a mesma metodologia para incorporação em um cimento endodôntico à base de óxido de zinco e eugenol, obtendo nanopartículas com diâmetro médio de aproximadamente 70 nm. A variação na concentração dos materiais formadores das NPs (CS e TPP) é um dos fatores que influenciam no tamanho final dessas partículas (AOUADA, 2009).

#### **4.1.3. Microscopia de Força Atômica (AFM)**

A microscopia de força atômica é uma técnica que permite obter imagens tridimensionais da topografia das superfícies. A Figura 4.7 mostra a imagem da topografia das NPs presentes na solução de CS com TPP. Apesar do enorme aglomerado mostrado na Figura, aparentemente as NPs apresentam-se na forma esférica.

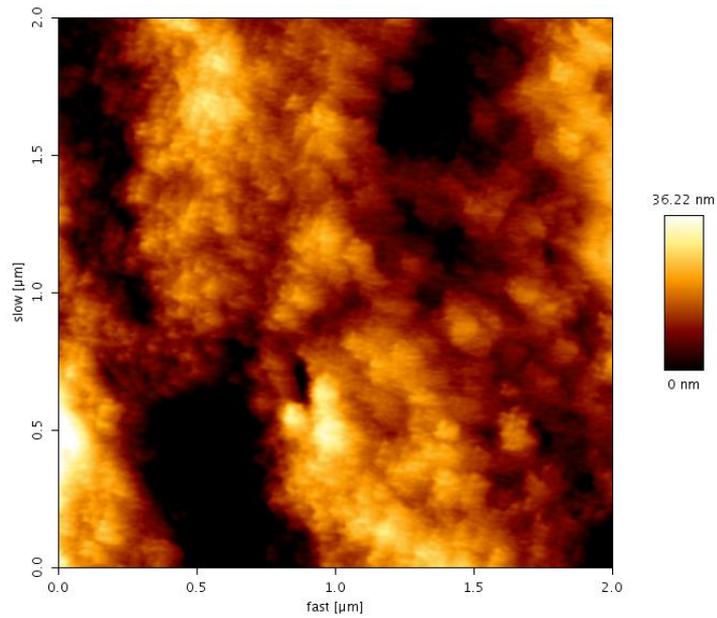


Figura 4.7 Imagem de AFM da topografia das NPs presentes na solução de quitosana com tripolifosfato.

A Figura 4.8 mostra a imagem da topografia das NP-L/TPP. Pode-se observar a presença de um número reduzido de nanopartículas esféricas e muitos aglomerados com tendência de formato alongado.

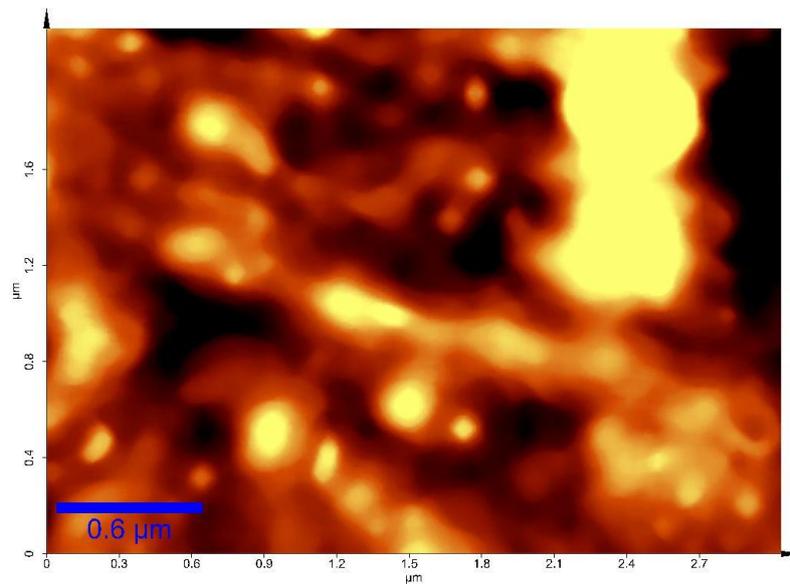


Figura 4.8 Imagem de AFM da topografia das NP-L/TPP.

Na análise das NP-S/TPP conseguiu-se um número maior de partículas esféricas dispersas. Pode-se observar na Figura 4.9 a imagem da topografia desta amostra.

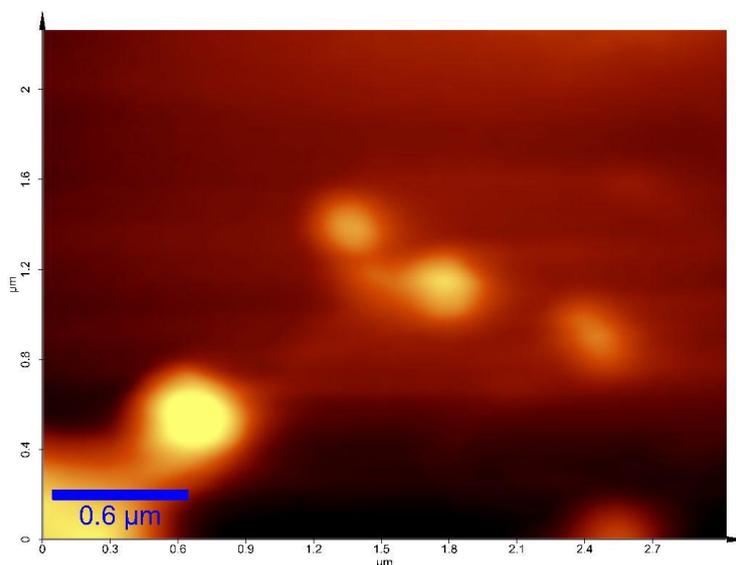


Figura 4.9 Imagem de AFM da topografia das NP-S/TPP.

#### 4.1.4. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A Microscopia Eletrônica de Varredura foi utilizada para analisar a morfologia das NPs. Nesta análise a superfície do material é varrida ponto a ponto por um feixe de elétrons resultando em uma micrografia com aspecto tridimensional.

A Figura 4.10 mostra a micrografia de MEV da solução de CS com TPP. Nesta imagem observa-se que as partículas formadas possuem forma esférica e apresentam-se em diversos tamanhos devido aos aglomerados.

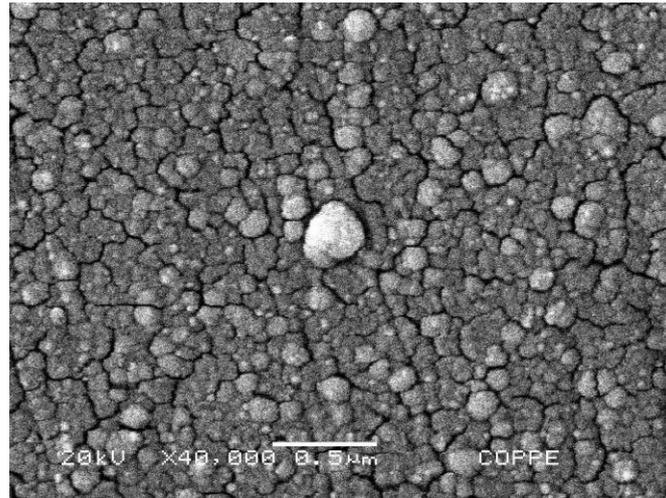


Figura 4.10 Micrografia eletrônica de varredura da solução de quitosana purificada com tripolifosfato.

Analisando a micrografia de MEV das NP-L/TPP (Figura 4.11), observou-se uma mudança na morfologia das nanopartículas. Ao passarem pelo processo de liofilização, aparentemente as partículas sofreram um rompimento, ficando com formato semelhante a uma “folha”. Esta morfologia está de acordo com o formato alongado das NPs observado pelo AFM (Figura 4.8).

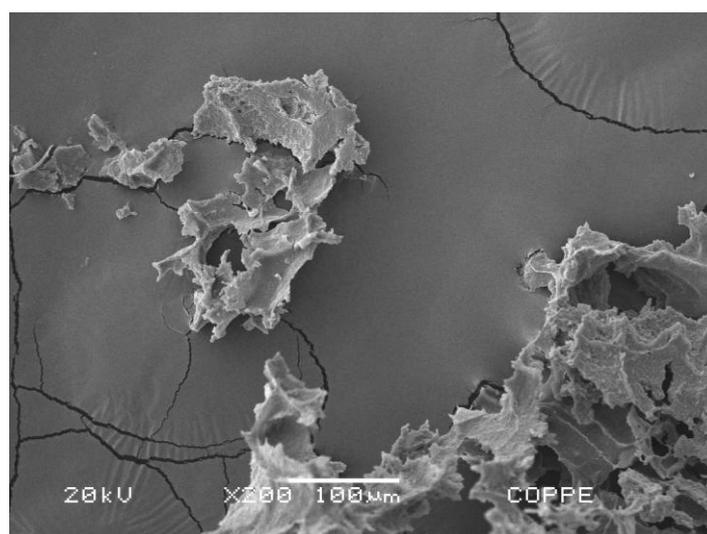


Figura 4.11 Micrografia eletrônica de varredura das NP-L/TPP.

A morfologia das NP-S/TPP está apresentada na Figura 4.12. As NPs secas pelo processo de spray drying obtiveram forma irregular com áreas de reentrância, interferindo em sua área superficial.

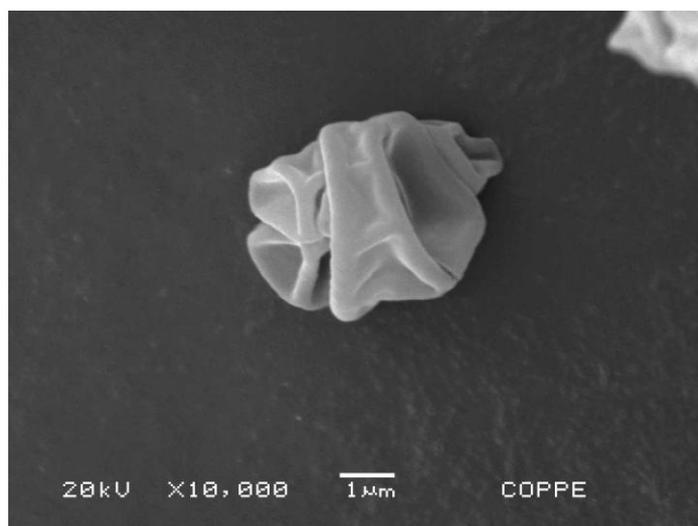


Figura 4.12 Micrografia eletrônica de varredura das NP-S/TPP.

As imagens de MEV possibilitaram maior detalhamento da superfície das NPs devido à diferença de preparo das amostras utilizadas no AFM. Nas análises de AFM, as NPs foram suspensas em água destilada e esta suspensão gotejada sobre a placa de silício. O tempo de evaporação do solvente foi respeitado e as amostras analisadas. No preparo das amostras utilizadas no MEV, exceto a amostra da solução de CS com TPP, as NPs foram colocadas diretamente sobre o porta-amostra, sendo recobertas por ouro e analisadas. A análise de MEV possibilitou observar uma variação de morfologia das nanopartículas formadas de acordo com cada processo de secagem.

#### 4.1.5. Potencial Zeta

O potencial zeta é descrito como a carga total de uma partícula em um meio específico. É uma medida da magnitude de atração ou repulsa entre as partículas e fornece informações sobre a interação eletrostática entre as superfícies. No caso das NPs, uma característica importante é a carga superficial positiva. O potencial zeta está diretamente relacionado ao seu potencial antimicrobiano. A média dos valores do potencial zeta de cada grupo de amostra, o desvio padrão e o pH de cada análise estão apresentados na Tabela 4.1. Os valores de pH correspondem ao pH final da solução analisada, visto que as amostras das NPs foram suspensas em solução de KCl  $10^{-3}$  M com pH 5,0.

Tabela 4.1 Média e desvio padrão dos valores do potencial zeta de cada grupo de nanopartículas em função do pH de cada análise.

<b>Potencial Zeta (mV)</b>			
		<b>Média</b>	<b>Desvio Padrão</b>
<b>NP-L/TPP</b>	pH 5,7	+22,93	0,9
	pH 7,0	+23,09	1,7
<b>NP-S</b>	pH 6,5	+34,90	0,3
	pH 7,0	+27,49	3,6
<b>NP-S/TPP</b>	pH 8,3	+35,14	1,3
	pH 7,0	+25,01	1,7

A variação do pH das NP-L/TPP não influenciou os valores do potencial zeta, ao contrário das NP-S e NP-S/TPP que quando tiveram o pH ajustado para 7,0 mostraram valores de potencial zeta mais baixos.

A Literatura afirma que quanto menor o tamanho das partículas, maior será o valor do seu potencial zeta. Nesse trabalho, essa afirmativa foi verdadeira apenas para as NPs produzidas pelo método de gelificação iônica e secas pela técnica de spray drying. As NP-L/TPP apresentaram um baixo valor de potencial zeta, podendo ser

justificado pela ampla distribuição de tamanho das partículas e a possível presença de inúmeros aglomerados. A variação morfológica das NPs (item 4.1.4) pode ser uma possível explicação para a variação de potencial zeta entre as NPs secas por spray drying e por liofilização.

ALI *et al.* (2010) constataram em seu estudo que com o aumento do pH da solução inicial de quitosana ocorre uma drástica redução no grau de protonação dos grupamentos amina da CS, diminuindo a repulsão eletrostática entre elas, aumentando a probabilidade de aglomeração, conseqüentemente reduzindo o valor do potencial zeta. Existe uma exceção quando o pH encontra-se na faixa de 6,0, onde o tamanho das partículas reduz de repente fazendo com que o potencial zeta aumente e a atividade antimicrobiana também. Quando um menor tamanho de partículas é encontrado, tem-se uma maior quantidade de grupamentos amina da CS protonados, ou seja, livres para interagir com a superfície celular bacteriana. Esses autores também variaram o pH da solução de TPP de alcalino para ácido (8,9 – 4,0), pois em meio alcalino (pH 8,9) os íons do TPP competem com íons  $\text{-OH}^-$  para ligar com os grupamentos  $\text{-NH}_3^+$  da CS. (ALI *et al.*, 2010). GAN *et al.* (2005) também relataram em seus estudos a redução do potencial zeta com o aumento do pH da solução inicial de CS.

#### **4.1.6. Teste da Concentração Mínima Inibitória (CMI)**

##### **4.1.6.1. NPs**

Foram realizados testes preliminares para avaliar a atividade antimicrobiana das NP-L/TPP, NP-S e NP-S/TPP pelo método de diluição. Os resultados qualitativos estão apresentados na Tabela 4.2 com base na avaliação visual dos tubos contendo diferentes concentrações das amostras e posterior semeadura no meio de cultura. Nos tubos 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 (+).

Tabela 4.2 Resultados dos testes de atividade antimicrobiana das amostras contendo nanopartículas de quitosana em relação ao *E. faecalis*: crescimento bacteriano (+); ausência de crescimento bacteriano (-).

Amostras	Volume de amostra adicionada ( $\mu\text{l}$ )						
	50	75	100	125	150	175	200
NP-L/TPP	+	+	+	+	-	-	-
NP-S	+	+	+	+	+	+	+
NP-S/TPP	+	+	+	+	+	+	+

As NP-S e NP-S/TPP não apresentaram atividade antimicrobiana sobre o *E. faecalis*, apresentando crescimento bacteriano em todos os tubos analisados. Para as NP-L/TPP, o teste foi repetido oito vezes com a finalidade de confirmação dos resultados. Concluiu-se com a análise visual dos tubos que houve crescimento bacteriano nos tubos adicionados de volumes menores que  $150\mu\text{L}$  (Figura 4.13). O resultado das placas confirmou estas observações. Os testes microbiológicos com as NP-L/TPP revelaram que o material possui atividade antimicrobiana sobre o *E. faecalis* ATCC 29212, sendo que  $300\mu\text{g/ml}$  de NP-L/TPP foram suficientes para inibição do crescimento bacteriano em uma concentração de  $10^5\text{ufc/ml}$  (Cálculo 1).

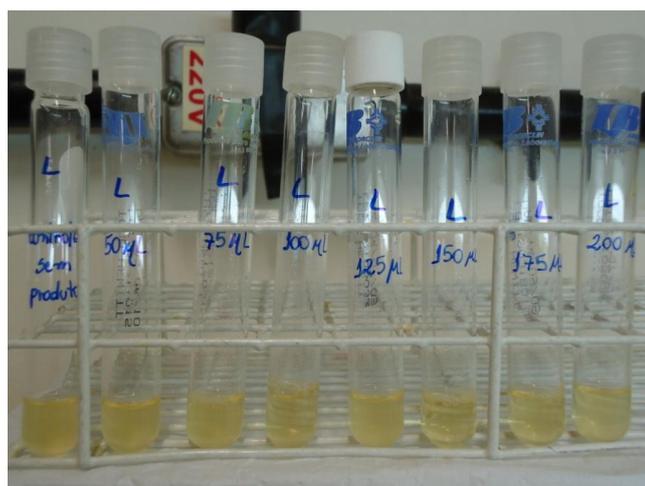


Figura 4.13 Teste de concentração mínima inibitória mostrando crescimento bacteriano apenas nos tubos com volume menor de  $150\mu\text{L}$ .

### Cálculo 1

0,01 g NP-L/TPP	-----	5 ml água estéril
10000 µg NP-L/TPP	-----	5000 µL água estéril
2 µg NP-L/TPP	-----	1 µL água estéril

Se 150 µL foram capazes de inibir o crescimento bacteriano,

1 µL	-----	2 µg
150 µL	-----	<b>300 µg</b>

Na Literatura encontra-se a relação da morfologia e do potencial zeta interferindo na atividade antimicrobiana (ALI *et al.*, 2010). Quanto maior o potencial zeta, maior seria a atividade antimicrobiana. Este fato não se confirmou neste trabalho, mostrando possivelmente uma maior influência da morfologia na atividade antimicrobiana.

#### **4.1.6.2. Solução de CS com TPP**

No teste realizado com a solução de CS contendo TPP não houve crescimento bacteriano em nenhum tubo, exceto no tubo controle da diluição (Figura 4.14). De acordo com os cálculos do rendimento de NP-L/TPP na solução de CS com TPP, concluiu-se que a solução possui atividade antimicrobiana sobre o *E. faecalis*, sendo que 0,7 µg/ml de NPs foram suficientes para inibição do crescimento bacteriano em uma concentração bacteriana de  $10^5$  ufc/mL (Cálculo 2).

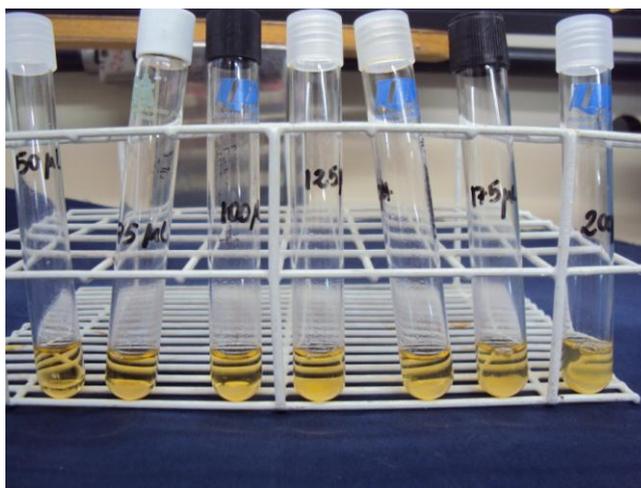


Figura 4.14 Teste de concentração mínima inibitória mostrando inibição do crescimento bacteriano em todos os tubos contendo a solução.

### Cálculo 2

Rendimento do processo de liofilização:

72 ml de solução de CS com TPP	-----	0,01 g NP-L/TPP
72000 µL de solução de CS com TPP	-----	10000 µg NP-L/TPP
1 µL de solução de CS com TPP	-----	0,014 µg NP-L/TPP

Se 50 µL foram capazes de inibir o crescimento bacteriano,

1 µL	-----	0,014 µg
50 µL	-----	<b>0,7 µg</b>

O teste microbiológico realizado com a solução de CS com TPP serviu apenas para mostrar que as NPs formadas antes de passar por qualquer processo de secagem também possuem atividade antimicrobiana, visto que na clínica seria inviável a utilização da solução misturada ao cimento endodôntico.

## 4.2. Caracterização do cimento com NPs

### 4.2.1. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As análises de MEV do cimento endodôntico puro e contendo as proporções (5% e 10% (p/p)) das NPs não foram conclusivas. As partículas observadas na Figura 4.15 aparecem tanto nas imagens do cimento puro quanto nas imagens do cimento contendo as NPs. Provavelmente essas partículas observadas estão presentes na composição do cimento. A análise de Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS) foi realizada durante a análise dessas imagens na tentativa de observar a presença do fósforo contido no TTP das NPs, porém a quantidade de TPP nas amostras era muito baixa, impossibilitando a detecção deste elemento.

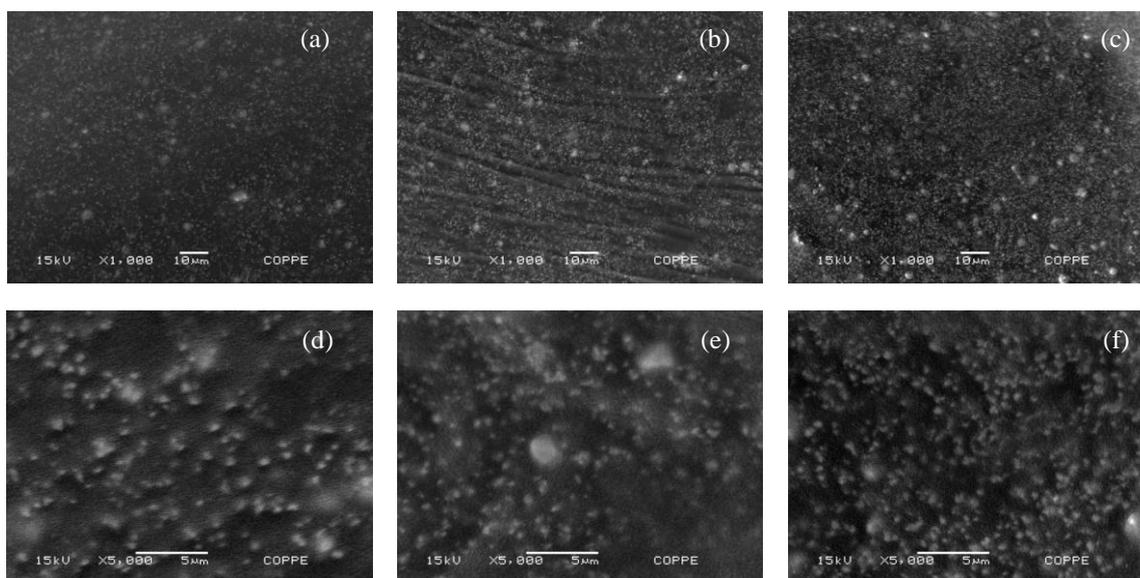


Figura 4.15 Micrografias das amostras de cimento puro (a, d), cimento com 5% de NP-L/TPP (b, e) e cimento com 10% de NP-L/TPP (c, f).

#### 4.2.2. Teste do Tempo de Presa

Foi avaliado o tempo de presa do cimento puro e do cimento contendo 1%, 5% e 10% NP-S/TPP. Um grupo de amostras foi mantido em estufa a 37°C e 21% de umidade relativa do ar (RH), enquanto que outro grupo foi testado sob condições ambiente a 23°C e 40% umidade relativa do ar. A média do tempo de presa encontrado para cada grupo de amostra foi calculada e exposta na Tabela 4.3. Não houve diferença significativa para o tempo de presa entre os corpos de prova de cada grupo, não apresentando portanto desvio padrão entre as amostras.

Tabela 4.3 Tempo de presa em horas do AH Plus™ puro e com nanopartículas secas em spray drying com TPP. O teste foi realizado em estufa e sob condições ambientes.

Concentração de NP-S/TPP	Tempo de Presa (h)	
	ESTUFA 37 <sup>0</sup> C, 21% RH	AMBIENTE 23 <sup>0</sup> C, 40% RH
0%	46	47
1%	44	46
5%	43	45
10%	41	43

Neste trabalho, foi encontrado um tempo de presa para o cimento puro de 46h, quando o experimento foi realizado em estufa e de 47h, quando testado em condições ambientes. Estes valores foram maiores do que os encontrados na Literatura. NIELSEN *et al.* (2006) testaram o tempo de presa do AH Plus™ em condições de aerobiose (incubadora a 37<sup>0</sup>C com 95% RH) simulando a parte do cimento que fica em contato com o forame apical e tecidos radiculares, e anaerobiose (câmara anaeróbia) simulando um SCR fechado. O AH Plus™ em ambas situações obteve presa em 24 horas. VERSIANI *et al.* (2006) realizaram um estudo comparativo entre o AH Plus™ e o Epiphany™, utilizando agulha de Gilmore de 100 g. O resultado para o tempo de presa

do AH Plus™ foi em cerca de oito horas em ambiente com umidade relativa de 95% a 37°C.

A discrepância nos valores de tempo de presa pode estar associada às condições experimentais utilizadas neste trabalho. A umidade relativa do ar utilizada foi menor do que a reportada na literatura (NIELSEN *et al.*, 2006; VERSIANI *et al.*, 2006; DUARTE *et al.*, 2010). DUARTE *et al.* (2010) concluíram em seus estudos que a umidade parece não alterar significativamente o tempo de presa do AH Plus™, talvez por causa da presença de óleo de silicone em sua composição.

A agulha utilizada também foi diferente. Em geral, a determinação do tempo de presa em odontologia é realizada pela utilização de agulhas de Gilmore, colocadas sobre a superfície do cimento (VERSIANI *et al.*, 2006; NIELSEN *et al.*, 2006; DUARTE *et al.*, 2010; MARIN-BAUZA *et al.*, 2010). No entanto, neste estudo optou-se pelo emprego de uma Agulha BD PrecisionGlide™ de peso 0,20 g e ponta com 0,55 mm de diâmetro. A agulha utilizada possui peso consideravelmente menor que o das agulhas de Gilmore, podendo interferir na marcação da superfície do cimento. Além disso, não houve controle da força aplicada sobre o cimento.

Para os cimentos em forma de pasta, o longo intervalo de tempo desde a fabricação do cimento até sua utilização na clínica odontológica pode alterar a homogeneidade no interior dos recipientes, havendo uma possível segregação dos seus componentes. O tempo de utilização do material pelo cirurgião-dentista e as condições de armazenamento também são fatores que podem influenciar negativamente na qualidade final do cimento (BALDI, 2009). BALDI (2009) observou uma segregação do material no interior da pasta B (pasta catalisadora) do AH Plus™. Dependendo da porção da bisnaga que esse material era retirado havia uma diferença de fluidez, interferindo em algumas propriedades do cimento, inclusive aumentando o tempo de presa.

De acordo com a Norma ANSI/ADA n°57, os resultados devem estar dentro de uma variação de até 10% da estabelecida pelo fabricante (VERSIANI *et al.*, 2006). Os resultados obtidos neste trabalho apresentaram-se bastante discrepantes quando comparados ao tempo estabelecido pelo fabricante, porém não foram excluídos visto que na bula do AH Plus™ o fabricante não é específico ao definir o tempo de presa do cimento, citando apenas um tempo mínimo de 8 h.

Com adição das NP-S/TPP, o tempo de presa do cimento diminuiu em função da quantidade de nanopartículas adicionadas. Esta tendência foi observada tanto nos testes

realizados tanto em estufa quanto sob condições ambientes. Por meio das análises estatísticas ficou comprovado que houve diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) entre todas as amostras testadas em ambos os testes; logo a adição das NPs propiciou a secagem do material em tempos mais curtos. No entanto, do ponto de vista clínico, esta pequena redução no tempo de presa não tende a afetar os procedimentos. DUARTE *et al.* (2010) avaliaram as propriedades físico-químicas do AH Plus™ com adição de 0%, 5% e 10% de hidróxido de cálcio. Neste caso, foi observado que não houve alteração significativa do tempo de presa do cimento em presença do hidróxido de cálcio.

#### 4.2.3. Teste de Fluxo

As propriedades de fluxo do cimento têm fundamental importância na endodontia, uma vez que estão relacionadas com a possibilidade de adaptação do cimento nas irregularidades das paredes do SCR e a penetração em lugares inacessíveis aos instrumentos durante o preparo químico-mecânico.

Os resultados dos testes de fluxo obtidos para o cimento AH Plus com e sem nanopartículas estão apresentados na Tabela 4.4. A Figura 4.16 mostra a fotografia da placa após o teste de fluxo.

Tabela 4.4 Valores do diâmetro (mm) do disco de cimento formado após o teste de fluxo, média e desvio padrão de cada grupo de amostras.

	<b>Diâmetro de escoamento (mm)</b>			
	<b>AH Plus™ puro</b>	<b>AH Plus™ + 1% NP-S/TPP</b>	<b>AH Plus™ + 5% NP-L/TPP</b>	<b>AH Plus™ + 10% NP- L/TPP</b>
1° teste	28	24	22	15
2° teste	27	23	22	15
3° teste	28	24	23	15
Média	27,7	23,7	22,3	15
Desvio padrão	0,6	0,6	0,6	0

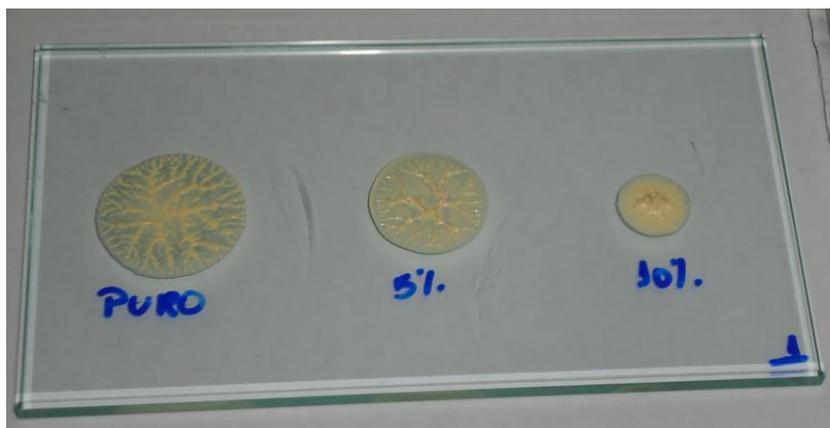


Figura 4.16 Fotografia dos discos de cimento formados após o teste de fluxo.

De acordo com a Norma ANSI/ADA nº 57, duas condições são necessárias para validar o teste: a diferença entre o diâmetro mínimo e máximo de cada tipo de amostra não deverá exceder 1 mm e a compressão deverá obter discos de formato uniforme. Desta forma, com base nos valores dos desvios padrões obtidos menores do que 1 mm (Tabela 4.4) e na uniformidade dos diâmetros apresentados na Figura 4.16 pode-se concluir o teste foi válido para as amostras avaliadas. Por meio das análises estatísticas ficou comprovado que houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as médias de cada grupo de amostras testadas, indicando que a adição das NPs reduziu a capacidade de escoamento do cimento. Essa redução é prejudicial visto que o cimento necessita ter um bom escoamento para penetrar em locais não obturados pelos cones de guta percha.

Para o cimento puro obteve-se um diâmetro de  $(27,7 \pm 0,6)$  mm. Este valor está diferente dos valores encontrados na Literatura. Analisando o escoamento do AH Plus™ puro, uma faixa de diâmetros entre 35 e 43 mm foi encontrada por outros autores (VERSIANI *et al.*, 2006; ALMEIDA *et al.*, 2007; BERNARDES *et al.*, 2010; MARIN-BAUZA *et al.*, 2010). No entanto, é válido ressaltar que os testes apresentados nos trabalhos publicados foram feitos com 0,5 ml de cimento, enquanto que no presente trabalho foi utilizado apenas 0,1 ml de cada amostra em função da quantidade reduzida de NPs produzidas. Testes preliminares com 0,5 ml de AH Plus™ puro mostraram que foi possível obter um diâmetro médio de 43 mm.

Um estudo avaliando o escoamento do AH Plus™ com adição de 0%, 5% e 10% de hidróxido de cálcio foi realizado encontrando valores de 40 mm, 37 mm e 27 mm, respectivamente. Os autores concluíram a respeito desta propriedade que canais mais

amplos, com forame apical de maior diâmetro podem ser obturados com o cimento adicionado de maior quantidade de hidróxido de cálcio (10%), prevenindo com esta conduta que haja um extravasamento de cimento pelo forame (DUARTE *et al.*, 2010).

#### 4.2.4. Teste antimicrobiano do halo de inibição

O teste do halo de inibição foi realizado apenas com as NP-L/TPP, uma vez que apenas estas nanopartículas apresentaram atividade antimicrobiana contra *E. faecalis*. Para o poço contendo o AH Plus™ puro, foi encontrado um halo de inibição de 12 mm, em seu maior diâmetro. Na região na qual não houve contato do cimento com o ágar (indicado por seta), o halo de inibição não ficou uniforme (Figura 4.17 a). Na amostra de AH Plus™ com 1% de NPs pode-se observar que houve halo de inibição porém, completamente disforme, acompanhando a parte do cimento que ficou sobre o ágar (Figura 4.17 b). Nos poços contendo AH Plus™ com 5% e 10% de NPs também houve formação de halos de inibição disformes (Figuras 4.17 c e 4.17 d), porém bem mais discretos do que os observados para as amostras contendo 1% NPs. Os halos para o cimento contendo as NPs não foi medido justamente devido a sua apresentação disforme. Não foram formados halos de inibição uniformes possivelmente devido à dificuldade de depositar o cimento no poço de forma que houvesse um contato uniforme do cimento com o ágar. Quanto maior a proporção de NPs adicionadas ao cimento, menor o escoamento deste, dificultando o contato com o ágar e, conseqüentemente, com o *E. faecalis*.

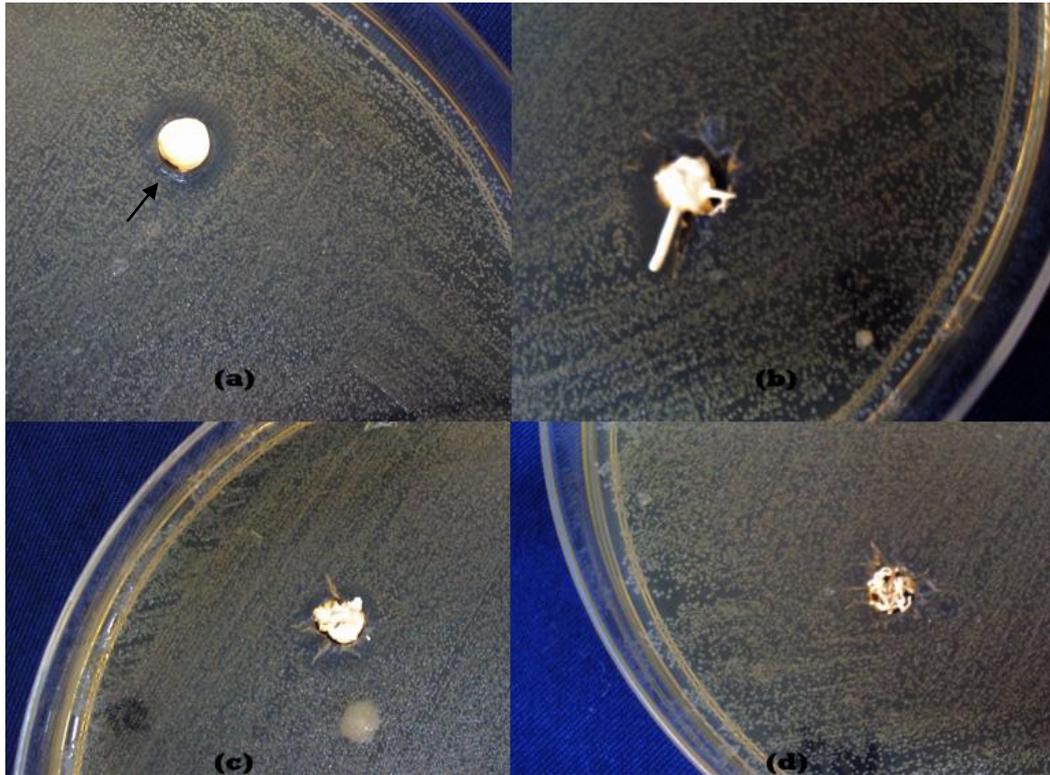


Figura 4.17 Halo de inibição do AH Plus™ puro (a); com 1% de NPs (b); com 5% de NPs (c) e com 10% de NPs (d).

Outros autores realizaram o teste do halo de inibição do AH Plus™ utilizando o *E. faecalis*, revelando resultados divergentes. MICKEL *et al.* (2003) testaram o cimento em discos de papel filtro (teste indireto) e concluíram que o AH Plus™ não apresentou atividade antimicrobiana sobre o microrganismo, devido a ausência do halo de inibição. KOPPER *et al.* (2007) também utilizaram em seus estudos discos de papel filtro revelando um discreto halo de inibição do AH Plus™. Quando o AH Plus™ foi testado em condições semelhantes às deste trabalho, sendo depositado em poço de 6 mm de diâmetro, o cimento também apresentou um halo de inibição de 12 mm (LEONARDI *et al.*, 2009).

## CAPÍTULO V – CONCLUSÕES

### 5.1. Conclusões

- A produção das nanopartículas de quitosana pelo método de gelificação iônica (liofilizadas ou secas por spray drying) foi eficaz e permitiu a obtenção de nanopartículas compatíveis com o diâmetro dos túbulos dentinários;
- Foram observadas diferenças morfológicas de acordo com cada processo de secagem. A morfologia das partículas pode ser considerada um dos fatores que influenciaram na carga superficial da partícula, interferindo diretamente em sua atividade antimicrobiana;
- As nanopartículas secas por spray drying não apresentaram atividade antimicrobiana sobre o *Enterococcus faecalis*;
- A caracterização do cimento AH Plus™ contendo partículas de quitosana mostrou uma redução tanto no tempo de presa quanto nas propriedades de fluxo do cimento. A redução no tempo de presa é aceitável clinicamente visto que o tempo mínimo recomendado pelo fabricante é de 8 h. Quanto ao escoamento, a adição de 5% e 10% de nanopartículas comprometeria o desempenho do cimento na clínica, devido a sua necessidade de penetração em áreas de difícil acesso;
- Não foi possível determinar com precisão o efeito da adição das NPs na atividade antimicrobiana do cimento por meio do teste do halo de inibição. Será necessária a otimização da metodologia para a realização deste teste.

- Os resultados obtidos mostraram que a composição do cimento AH Plus™ contendo 1% nanopartículas de quitosana produzidas por gelificação iônica e secas por liofilização possui grande potencial para ser aplicado no tratamento endodôntico, uma vez que as propriedades de fluxo e de tempo de presa do cimento não foram afetadas de forma significativa.

## 5.2. Sugestões para Trabalhos Futuros

- Analisar outras propriedades do cimento contendo nanopartículas;
- Realizar análise de Espectroscopia de Fotoelétrons de Raios X (XPS) para verificar a composição química da superfície das nanopartículas de acordo com cada processo de secagem e relacionar este resultado aos testes antimicrobianos;
- Otimizar a metodologia para realização de teste antimicrobiano do halo de inibição com o cimento;
- Avaliar a liberação das nanopartículas de quitosana por meio de testes *in vitro*;
- Analisar a possibilidade de utilizar a solução de quitosana contendo as nanopartículas como forma de tratamento da parede do canal antes da obturação;
- Realizar análises de MEV com dentes humanos obturados para avaliar o escoamento do cimento contendo nanopartículas nos túbulos dentinários.

## CAPÍTULO VI - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALI, S. W., JOSHI, M., RAJENDRAN, S., 2010, “Modulation of Size, Shape and Surface Charge of Chitosan Nanoparticles With References to Antimicrobial Activity”, *Advanced Science Letters*, v. 3, pp. 452-460.

ALMEIDA, J. F. A., GOMES, B. P. F. A., FERRAZ, C. C. R., *et al.*, 2007, “Filling of artificial lateral canals and microleakage and flow of five endodontic sealers”, *International Endodontic Journal*, v. 40, pp. 692-699.

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”, *Carbohydrate Polymers*, v. 78, issue 4, pp. 672-677.

AOUADA, M. R. M., 2009, *Aplicação de nanopartículas em filmes utilizados em embalagens para alimentos*. Tese de D.Sc., UFSCar, São Carlos, SP, Brasil.

BALDI, J. V., 2009, *Avaliação de propriedades físico-químicas do cimento AH Plus preparado com porções de pastas retiradas do início, metade e final das bisnagas*. Tese de D.Sc., Faculdade de odontologia de Bauru/USP, São Paulo, SP, Brasi

BERNARDES, R. A., CAMPELO, A. A., JUNIOR, D. S. S., *et al.*, 2010, “Evaluation of the flow rate of 3 endodontic sealers: Sealer 26, AH Plus, and MTA Obtura”, *Oral surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology*, v. 109, n. 1 , pp.e47-e49.

CAMPANA-FILHO, S. P., DE BRITTO, D., CURTI, E., *et al.*, 2007, “Extração, estruturas e propriedades de  $\alpha$ - e  $\beta$ -quitina”, *Química Nova*, v. 30, n. 3, pp. 644-650.

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

DENG, D. M., HOOGENKAMP, M. A., EXTERKATE, R. A. M., *et al.*, 2009, "Influence of *Streptococcus mutans* on *Enterococcus faecalis* Biofilm Formation Evaluation of zeta potencial difference as na indicator for antibacterial strength of low moloecular weight chitosan", *Journal of Endodontics*, v. 35, n. 9, pp. 1249-1252.

DESAI, S., CHANDLER, N., 2009, "Calcium hydroxide-based root canal sealers: A review", *Journal of Endodontics*, v. 35, n. 4, pp. 475-480.

DU, W. L., XU, Z. R., HAN, X. Y., *et al.*, 2008, "Preparation, characterization and adsorption properties of chitosan nanoparticles for eosin Y as a model anionic dye", *Journal of Hazardous Materials*, v. 153, issue 1-2, pp. 152-156.

DU, W.-L., NIU, S. S., XU, Y.-L., *et al.*, 2009, "Antibacterial activity of chitosan tripolyphosphate nanoparticles loaded with various metal ions", *Carbohydrate Polymers*, v. 75, issue 3, pp. 385-389.

DUARTE, M. A. H., ORDINOLA-ZAPATA, R., BERNARDES, R. A., *et al.*, 2010, "Influence of Calcium Hydroxide Association on the Physical Properties of AH Plus", *Journal of Endodontics*, v. 36, n. 6, pp. 1048-1051.

DUDHANI, A. R., KOSARAJU, S. L., 2010, "Bioadhesive chitosannanoparticles: Preparation and characterization", *Carbohydrate Polymers*, v. 81, pp. 243-251.

GAN, Q., WANG, T., COCHRANE, C., *et al.*, 2005, "Modulation of surface charge, particle size and morphological properties of chitosan-TPP nanoparticles intended for gene delivery", *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 44, pp. 65-73.

HELING, I., CHANDLER, N. P., 1996, "The antimicrobial effect within dentinal tubules of four root canal sealers", *Journal of Endodontics*, v. 22, n. 5, pp. 257-259.

HUANG, T.-H., YANG, J.-J., LI, H., *et al.*, 2002, "The biocompatibility evaluation of epoxy resin-based root canal sealers in vitro", *Biomaterials*, v. 23, issue 1, pp. 77-83.

KAYAOGLU, G., ERTEN, H., ALAÇAM, T., *et al.*, 2005, "Short-term antibacterial activity of root canal sealers towards *Enterococcus faecalis*", *International Endodontic Journal*, v. 38, issue 7, pp. 483-488.

KIM, I-Y., SEO, S-J., MOON, H-S., *et al.*, 2008, "Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications", *Biotechnology Advances*, v. 26, pp. 1-21.

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

KOPPER, P. M. P., ROSA, R. O., FIGUEIREDO, J. A.P., *et al.*, 2007, "avaliação, In Vitro, da atividade Antimicrobiana de Três Cimentos Endodônticos", *Revista Odontologia – Faculdade de Odontologia/PUCRS*, v. 22, n. 56, pp. 106-111.

LAUS, R., LARANJEIRA, M. C. M., MARTINS, A. O., *et al.*, 2006, "Microesferas de quitosana reticuladas com tripolifosfato utilizadas para remoção da acidez, ferro (III) e Manganês (II) de águas contaminadas pela mineração de carvão", *Química Nova*, v. 29, n. 1, pp. 34-39.

LEONARDI, D. P., BATTISTI, J. C., KLIMIONT, D. T., *et al.*, 2009, "Avaliação in vitro da ação antimicrobiana de alguns cimentos endodônticos", *Revista Sul-Brasileira de Odontologia*, v. 6, n. 4, pp. 367-373.

LEONARDO, M. R., FLORES, D. S., DE PAULA, E. S. F. W., *et al.*, 2008, "A comparison study of periapical repair in dog's teeth using RoekoSeal and AH Plus root canal sealers: a histopathological evaluation", *Journal of Endodontics*, v. 34, n. 7, pp. 822-825.

LEYHAUSEN, G., HEIL, J., REIFFERSCHIED, G., *et al.*, 1999, “Genotoxicity and cytotoxicity of the epoxy resin-based root canal sealer AH Plus”, *Journal of Endodontics*, v. 25, n. 2, pp. 109-113.

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

MAMOOTIL, K., MESSER, H., H., 2007, “Penetration of dentinal tubules by endodontic sealer cements in extracted teeth and in vivo”, *International Endodontic Journal*, v. 40, issue 11, pp. 873-881.

MARIN-BAUZA, G. A., RACHED-JUNIOR, F. J. A., SOUZA-GABRIEL, A. E., *et al.*, 2010, “Physicochemical Properties of Methacrylate Resin-based Root Canal Sealers”, *Journal of Endodontics*, v. 36, n. 9, pp. 1531-1536.

MARKOWITZ, K., MOYNIHAN, M., LIU, M., *et al.*, 1992, ”Biologic properties of eugenol and zinc oxide-eugenol: A clinically oriented review”, *Oral surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology*, v. 73, issue 6 , pp. 729-737.

MICKEL, A. K., NGUYEN, T. H., CHOGLE, S., 2003, “Antimicrobial activity of endodontic sealers on *Enterococcus faecalis*”, *Journal of Endodontics*, v. 29, n. 4, pp. 257-258.

NIELSEN, B. A., BEELER, W. J., VY, C., *et al.*, 2006, “Setting Times of Resilon and Other Sealers in Aerobic and Anaerobic Environments”, *Journal of Endodontics*, v. 32, n. 2, pp. 130-132.

OLIVEIRA, R. L., FILHO, R. S. O., GOMES, H. C., *et al.*, 2010, "Influence of calcium hydroxide addition to AH Plus sealer on its biocompatibility", *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology*, v. 109, n. 1, pp. e50-e54.

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

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

QI, L., XU, Z., JIANG, X., *et al.*, 2005, "Cytotoxic activities of chitosan nanoparticles and copper-loaded nanoparticles", *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 15, issue 5, pp. 1397-1399.

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

RAHIMI, M., JAINAEN, A., PARASHOS, P., *et al.*, 2009, "Bonding of resin-based sealers to root dentin", *Journal of Endodontics*, v. 35, n. 1, pp. 121-124.

SCARPARO, R., K., GRECCA, F., S., FACHIN, E., V., F., 2009, "Analysis of tissue reactions to methacrylate resin-based, epoxy resin-based, and zinc oxide-eugenol endodontic sealers", *Journal of Endodontics*, v. 35, n. 2, pp. 229-232.

SHALHAV, M., FUSS, Z., WEISS, E., I., 1997, "In vitro antibacterial activity of a glass ionomer endodontic sealer", *Journal of Endodontic*, v. 23, n. 10, pp. 616-619.

SHI, Z., NEOH, K., G., KANG, E., T., *et al.*, 2006, "Antibacterial and mechanical properties of bone cement impregnated with chitosan nanoparticles", *Biomaterials*, v. 27, issue 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", *Journal of Endodontics*, 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", *Journal of Endodontics*, v. 36, n. 6, pp. 1030-1035.

SILVA NETO, U. X., DE MORAES, I. G., WESTPHALEN, V. P. D., *et al.*, 2007, "Leakage of 4 resin-based root-canal sealers used with a single-cone technique", *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology*, v. 104, n. 2, pp. e53-e57.

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", *Journal of Endodontics*, v. 22, n. 6, pp. 308-310.

SIQUEIRA JR., J., FAVIERI, A., GAHYVA, S. M., *et al.*, 2000, "Antimicrobial activity and flow rate of newer and established root canal sealers", *Journal of Endodontics*, v. 26, n. 5, pp. 274-277.

SIQUEIRA JR., J., F., RÔÇAS, I., N., LOPES, H., P., 2002, "Patterns of microbial colonization in primary root canal infections", *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology*, v. 93, n. 2, pp. 174-178.

SLUTZKY-GOLDBERG, I., SLUTZKY, H., SOLOMONOV, M., *et al.*, 2008, “Antibacterial Properties of Four Endodontic Sealers”, *Journal of Endodontics*, v. 34, n. 6, pp. 735-738.

STAMOS, D. E., GUTMANN, J. L., GETTLEMAN, B. H., 1995, “In vivo evaluation of root canal sealer distribution”, *Journal of Endodontics*, v. 21, n. 4, pp. 177-179.

TAGGER, M., TAGGER, E., TJAN, A. H. L., *et al.*, 2002, “Measurement of adhesion of endodontic sealers to dentin”, *Journal of Endodontics*, v. 28, n. 5, pp. 351-354.

VERSIANI, M., A., CARVALHO-JUNIOR, J., R., PADILHA, M., I., A., F., *et al.*, 2006, “A comparative study of physicochemical properties of AH Plus TM and Epiphany TM root canal sealants”, *International Endodontic Journal*, v. 39, issue 6, pp. 464-471.

ZHANG, H., SHEN, Y., RUSE, N. D., *et al.*, 2009., “Antibacterial activity of endodontics sealers by Modified Direct Contact Test against *Enterococcus faecalis*”, *Journal of Endodontics*, v. 35, n. 7, pp. 1051-1055.

YANG, H.-C., HON, M.-H., 2009, “The effect of the molecular weight of chitosan nanoparticles and its application on drug delivery”, *Microchemical Journal*, v. 92, issue 1, pp. 87-91.

YUCEL, A. Ç., GULLER, E., GULER, A. U., *et al.*, 2006, “arterial Penetration After Obturation With Four Different Root Canal Sealers”, *Journal of Endodontics*, v. 32, n. 9, pp. 890-893.

WILSON, B., SAMANTA, M., K., SANTHI, K., *et al.*, 2009, “Chitosan nanoparticles as a new delivery system for the anti-Alzheimer drug tacrine”, *Nanomedicine: nanotechnology, Biology and Medicine*, *in press*. Doi: 10.1016/j.nano.2009.04.001.