



PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE NANO E
MICROPARTÍCULAS DE ÁCIDO ASCÓRBICO PARA FINS ODONTOLÓGICOS

Íris Sol Figueiredo Telles

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(as): Renata Antoun Simão
Maíra do Prado

Rio de Janeiro
Julho de 2018

PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE NANO E
MICROPARTÍCULAS DE ÁCIDO ASCÓRBICO PARA FINS ODONTOLÓGICOS

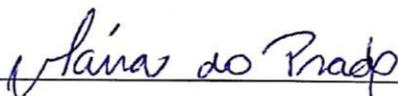
Íris Sol Figueiredo Telles

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. Renata Antoun Simão, D.Sc.



Prof. Maíra do Prado, D.Sc.



Prof. Paula Mendes Jardim, D.Sc.



Prof. Patrícia de Andrade Risso, D.Sc.

RIO DE JANEIRO, RJ - BRASIL

JULHO DE 2018

Telles, Íris Sol Figueiredo

Produção, caracterização e avaliação de nano e micropartículas de ácido ascórbico para fins odontológicos/
Íris Sol Figueiredo Telles. – Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2018.

XIV, 73 p.: il.; 29,7 cm.

Orientadoras: Renata Antoun Simão

Maíra do Prado

Dissertação (mestrado) – UFRJ/ COPPE/ Programa de Engenharia Metalúrgica e de Materiais, 2018.

Referências Bibliográficas: p. 65-70.

1. Resistência de união. 2. Pinos de fibra de vidro.
3. Soluções irrigantes. 4. Adesão. I. Simão, Renata Antoun et al II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Programa de Engenharia Metalúrgica e de Materiais.

Agradecimentos

Agradeço a Deus por me conceder a realização de todos os meus sonhos e por me dar forças de concluir mais uma etapa da minha vida.

A minha orientadora, Renata Antoun Simão, que se tornou uma grande amiga e conselheira. Obrigada por sempre me receber de braços abertos todos esses anos, por ouvir todas as minhas reclamações e sempre me arrumar uma saída. Levarei seu carinho para sempre comigo.

Agradeço a minha coorientadora Maíra do Prado que é uma mulher incrível, maior responsável por toda a minha caminhada profissional, meu exemplo de ética, dedicação e profissionalismo. A você não há palavras que possam ser capazes de agradecer todos esses anos juntas. Minha grande querida amiga e eterna orientadora!

A professora Anna Paola Pierucci, por ceder seu laboratório para a realização da pesquisa, por me deixar tão à vontade no laboratório que me sentia em “casa”, local onde fiz amigos, que dei boas risadas e tive dias incríveis de muito aprendizado. Obrigada pelo seu apoio, por todas as reuniões e conversas.

Agradeço a minhas novas e maravilhosas amigas Ana Carolina Prudencio e Isabelle Cornelsen, que foram anjinhos na minha vida nesse mestrado, estiveram ao meu lado, me apoiando, ensinando e incentivando para que tudo ser tornasse possível. Sem vocês por perto as coisas teriam sido bem mais difíceis.

Ao meu namorado Victor Júlio, pelo apoio e pela ajuda nesses 2 anos em todos os momentos, por sempre me ouvir e me orientar em minhas decisões. A minha mãe Claudia, por ter sido meu conforto e segurança, quem aguentou todas as dificuldades quando decidi parar de trabalhar e me dedicar ao mestrado. A toda minha família amada!

Àqueles que me ajudaram com as coletas de dentes, ao Paulo, Bernardo, Thais, Delano, Kenner, Felipe, Marina, Ligia, Leilane, Talita e ao Biobanco da UERJ e suas funcionárias, em especial a Raquel que foi um amor comigo e me deu todo suporte.

Aos outros novos amigos que fiz no Mestrado, em especial ao Javier, Jeniffer, Bernardo, Erica, Vanessa, Lucas, Maira, Soraya, Thaísa e Yuri, agradeço pela amizade, risadas e pelas palavras de conforto. A todos do laboratório da Professora Renata e aos técnicos, Heleno e Jacson, agradeço a ajuda!

A todos do laboratório de biopolímeros e a professora Rossana, obrigada por todo o apoio e por me receberem tantas vezes que precisei usar o laboratório.

Ao laboratório Microbiologia de Alimentos do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, ao professor Marco e ao técnico Antônio, aprendi muito com vocês, obrigada!

A todos os professores do PEMM e funcionários, que me deram ensinamento e suporte.

A CAPES pelo auxílio.

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

PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE NANO E MICROPARTÍCULAS DE ÁCIDO ASCÓRBICO PARA FINS ODONTOLÓGICOS

Íris Sol Figueiredo Telles

Julho/2018

Orientadoras: Renata Antoun Simão

Maíra do Prado

Programa: Engenharia Metalúrgica e de Materiais

Este estudo objetivou produzir e caracterizar nano e micropartículas (NP-MP) de ácido ascórbico (AA) com a finalidade de aumentar a estabilidade do fármaco e desenvolver soluções antioxidantes para serem usadas previamente a cimentação de pinos de fibra de vidro à dentina. O AA foi encapsulado por vicilina, proteína da ervilha verde, através da técnica de spray drying. As partículas foram caracterizadas através de MEV, AFM, DRX, FTIR e a liberação do AA foi avaliada através do UV-Vis. A atividade antimicrobiana foi avaliada pela técnica de difusão em ágar com *E. faecalis* e *C. albicans*. Por fim, 50 raízes de pré-molares humanos receberam tratamento endodôntico. Foi realizado o preparo para pino em 10mm, seguido de irrigação do conduto com solução de 0,5%, 1%, 1,5% de NP-MP de AA em água destilada acidificada ou ascorbato de sódio 10% (AS) e então, os pinos foram cimentados. A resistência de união dos pinos foi avaliada através do teste de push-out. As NP-MP demonstraram eficiente encapsulamento e liberação do AA, porém apresentaram menores valores de resistência de união, quando comparados a água destilada acidificada e ao AS. Através de MEV foi possível observar partículas de 10 a 1 µm. Já em AFM foram encontradas nanopartículas de 50 a 2 nm. O desenvolvimento de sistemas NP-MP possui um grande potencial para proteção do AA, porém interferem negativamente na resistência de união de pinos de fibra de vidro à dentina intrarradicular.

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

PRODUCTION, CHARACTERIZATION AND EVALUATION OF NANO AND
MICROPARTICLES OF ASCORBIC ACID FOR DENTAL PURPOSES

Íris Sol Figueiredo Telles

July/2018

Advisors: Renata Antoun Simão

Maíra do Prado

Department: Metallurgical and Materials Engineering

This study aimed to produce and characterize nano and microparticles (NP-MP) of ascorbic acid (AA) to increase the stability of the drug and to develop antioxidant solutions to be used prior to the sealing of fiberglass pins to dentin. The AA was encapsulated by vicillin, the green pea protein, through the spray drying technique. The particles were characterized through SEM, AFM, XRD, FTIR and the release of AA was evaluated through UV-Vis. The antimicrobial activity was evaluated by ágar diffusion technique with *E. faecalis* and *C. albicans*. Finally, 50 roots of human premolars received endodontic treatment. Preparation was made for 10mm pin, followed by irrigation of the conduit with 0.5%, 1%, 1.5% solution of NP-MP of AA in acidified distilled water or 10% of sodium ascorbate (AS), and then the pins were sealed. The pins bond resistance was evaluated through the push-out test. The NP-MPs prove efficient encapsulation and release of AA, but presented lower resistance bond values when compared to acidified distilled water and AS. Through SEM it was possible to observe particles of 10 to 1 μ m. However, through the AFM were found nanoparticles of 50 to 200 nm. The development of NP-MP systems has great potential for AA protection, but they negatively interfere in the bond resistance of fiberglass pins to the intraradicular dentin.

SUMÁRIO

1.	Introdução	1
2.	Revisão bibliográfica	3
2.1.	Nano e microencapsulamento	3
2.2.	Nano e micropartículas na Endodontia	7
2.3.	Ácido ascórbico.....	11
2.4.	Falha na resistência de união	13
3.	Objetivos	16
4.	Materiais e método.....	17
4.1.	Obtenção das micropartículas de ácido ascórbico	17
4.1.1.	Material de encapsulamento e núcleo	17
4.1.2.	Produção das nano e micropartículas de AA.....	21
4.2.	Caracterização das nano e micropartículas.....	23
4.2.1.	Análise do rendimento do encapsulamento.....	23
4.2.2.	Análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	23
4.2.3.	Análise por microscopia de força atômica (Atomic Force Microscopy - AFM).....	23
4.2.4.	Difração de raios X (DRX)	24
4.2.5.	ATR/FTIR (ATR - Attenuated total reflectance / FTIR- Fourier transform infrared spectroscopy).....	24
4.2.6.	Espectroscopia UV-visível	24
4.3.	Atividade antimicrobiana	26
4.3.1.	Preparo do inóculo.....	27
4.3.2.	Difusão em placas	28
4.4.	Efeito das soluções contendo nanopartícula na resistência de união de um cimento resinoso autoadesivo à dentina, empregado na cimentação de pinos de fibra de vidro.....	29
4.4.1.	Preparo das amostras.....	30
4.4.2.	Descrição da técnica de instrumentação	30
4.4.3.	Descrição da técnica de obturação.....	32

4.4.4.	Descrição da técnica de cimentação do pino	33
	<i>Divisão dos grupos experimentais</i>	34
	<i>Cimentação do pino</i>	35
4.4.5.	Teste de cisalhamento por extrusão (<i>Push-out</i>)	36
4.4.6.	Análise do padrão de fratura por microscopia óptica.....	38
4.4.7.	Análise estatística dos dados	38
5.	Resultados e discussão	39
5.1.	Análise das nano e micropartículas produzidas.....	39
5.1.1.	Morfologia e superfície das NP-MP (MEV e AFM)	41
5.1.2.	Difração de Raios-X (DRX).....	48
5.1.3.	ATR/FTIR (ATR - Attenuated total reflectance / FTIR- Fourier transform infrared spectroscopy).....	49
5.1.4.	Análise da liberação das nano e micropartículas	52
5.2.	Análise da atividade antimicrobiana.....	57
5.3.	Análise do teste de push-out.....	59
6.	Conclusão	63
7.	Sugestões para trabalhos futuros	64
8.	Referências Bibliográficas.....	65

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Morfologia dos diferentes tipos de partículas obtidas pelo processo de encapsulamento (adaptado de NESTERENKO et al., 2013). (a) cápsula, (b) esfera, (c) cápsula com várias camadas, (d) esfera com vários núcleos. 4
- Figura 2.** Esquema mostrando o processo de formação de nano e micropartículas por spray drying..... 5
- Figura 3.** Esquema de reação para oxidação do ácido ascórbico (Adaptado de KARLSEN; BLOMHOFF; GUNDERSEN, 2005). Ácido ascórbico (A1), que em condições biológicas é encontrado na sua forma iônica como AS (A2). Quando sofre oxidação, o radical ascorbil (B) é formado e sofre uma reação espontânea de dismutação (1), onde uma molécula de AS e uma molécula de ácido desidroascórbico (C) são formadas a partir de duas moléculas de radical ascorbil. Em condições biológicas o ácido desidroascórbico sofre rápida e irreversível hidrólise com formação de ácido dicetogulônico (D). 12
- Figura 4.** a) Ervilha verde Yoki; b) Moinho; c) Moagem dos grãos de ervilha; d) Farinha de ervilha obtida através do grão moído. 17
- Figura 5.** a) Farinha de ervilha misturada na acetona e estágios de decantação da farinha; b) Remoção do sobrenadante de acetona com lipídeos removidos da farinha; c) Farinha de ervilha desengordurada e completamente seca..... 18
- Figura 6.** a) Farinha de ervilha desengordurada sendo pesada; b) Incubação da farinha em solução tampão de Tris-HCl 0,05 M (pH 8,5); c) Centrífuga. 19
- Figura 7.** a) Tubo de centrífuga com o precipitado da solução de 75% de saturação; b) Tubo de centrífuga com a vicilina precipitada após centrifugação final; c) Solução de vicilina obtida com o precipitado ressuspensão; d) Membrana de diálise com solução de vicilina; f) Solução de vicilina ao final do processo de diálise..... 20
- Figura 8.** a) Mini Spray Dryer Buchi 290; b) Ácido Ascórbico; c) Vicilina em pó misturada à água recebendo o Ácido Ascórbico que foi gotejado forma de líquido; d) Ultra-Turrax; e) Processador ultrassônico; f) Solução final passando pelo spray. 22
- Figura 9.** a) Coletor final das partículas; b) Partículas dispersas pelo vidro do coletor; c) Pó de partículas sendo coletado. 22

Figura 10. Câmara de fluxo laminar.....	27
Figura 11. a) Preparo do cultivo dos microrganismos; b) Microrganismos cultivados.	27
Figura 12. a) Preparado da solução que servirá de camada base; b) Autoclave; c) Camada base estéril; d) Solidificação da camada base.....	28
Figura 13. Placas com a camada de inóculo solidificada e poços produzidos até o final da paca.	29
Figura 14. a) Padronização dos dentes; b) Remoção das coroas; c) Raízes cortadas com 14mm.....	30
Figura 15. Representação esquemática do preparo químico e mecânico das raízes	32
Figura 16. a) Raízes seladas com cera utilidade e posicionadas para o tratamento; b) Kit de limas ProTaper® Universal; c) EDTA; d) Aplicação da solução de hipoclorito de sódio com seringa hipodérmica descartável.....	32
Figura 17. a) Cones de guta percha; b) Cimento endodôntico; c) Cimentação da raiz com cone principal e cones acessórios.	33
Figura 18. Representação esquemática do preparo para o pino com desobstrução parcial de 10 mm.	34
Figura 19. Representação esquemática do preparo do pino (Adaptado de 3M ESPE).....	35
Figura 20. Representação esquemática da inserção e cimentação do pino após o preenchimento do espaço intrarradicular com o cimento (Adaptado de 3M ESPE).....	36
Figura 21. a) Máquina de corte IsoMet®; b) Confecção das fatias; c) Máquina de ensaios universal Instron; d) Ensaio de push-out.....	37
Figura 22. Pó de partículas produzido no spray dryer.	40
Figura 23. Fotomicrografias da vicilina. a) 3000x. b) 10000x.	42
Figura 24. Fotomicrografias das NP-MP. a) 2000x. b)5000x.....	43

Figura 25. Fotomicrografias das NP-MP. a) 5000x. b) 10000x.....	43
Figura 26. Height retrace. a) 5 nm x 5 nm. b) Perfil de linha traçado sobre uma partícula de aproximadamente 5 nm.	45
Figura 27. 10 nm x 10 nm. a) Height trace. b) Phase trace.	46
Figura 28. Height trace 10 nm x 10 nm. Perfil de linha traçado sobre uma partícula de aproximadamente 50 nm.	46
Figura 29. Height trace 10 nm x 10 nm. Perfil de linha traçado sobre uma partícula de aproximadamente 10 nm.	47
Figura 30. Height trace 10 nm x 10 nm. Perfil de linha traçado sobre uma partícula de aproximadamente 2 nm.	47
Figura 31. Difractograma das amostras de AA, vicilina e NP-MP.	49
Figura 32. Espectros das amostras de NP-MP, vicilina e do AA, respectivamente	50
Figura 33. Sobreposição dos espectros de todas as amostras analisadas.	50
Figura 34. Identificação das bandas e suas respectivas ligações químicas.	51
Figura 35. Curva de calibração do AA.	53
Figura 36. Curvas de liberação de AA com análises feitas em diferentes tempos. Amostra de concentração de 0,5% de NP-MP.	55
Figura 37. Placa de <i>E. faecalis</i> . Crescimento difuso e homogêneo da bactéria, sem a presença de halos de inibição.	58
Figura 38. Placa de <i>C. albicans</i> . Crescimento difuso e homogêneo do fungo, sem a presença de halos de inibição.	58

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Curva de calibração de absorbância do AA em função da concentração em ppm..... 54

Gráfico 2. Concentração do AA nos tempos analisados. Amostra de 0,5% de NP-MP. 57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Diluição realizada para análise do teste de liberação das NP-MP.....	26
Tabela 2. Tempo de cada análise realizada após os 4 min da homogeneização..	26
Tabela 3. Divisão dos grupos em relação ao irrigante ativo.....	34
Tabela 4. Calculo do rendimento de produção em %.....	40
Tabela 5. Absorbâncias das soluções, obtidas através do gráfico da curva de calibração.....	53
Tabela 6. Concentração de AA liberado por unidade de tempo das NP-MP 0,5%.	56
Tabela 7. Valores da análise estatística da resistência de união de todos os grupos independente do terço analisado.....	61
Tabela 8. Padrão de fratura expresso em porcentagem.....	61

1. Introdução

A tecnologia de liberação controlada de fármacos possui aplicação multidisciplinar e pode contribuir para o avanço da saúde humana. Os sistemas de liberação, ou *drug delivery systems*, oferecem inúmeras vantagens quando comparados a outros sistemas de dosagem convencional. Os sistemas de liberação controlada têm como objetivo prolongar e melhorar o controle da administração de fármacos, objetivos estes possibilitados devido a técnica de nano e microencapsulamento, que consiste em envolver o fármaco por uma matriz polimérica. A eficácia do fármaco encapsulado dependerá da preservação de sua biodisponibilidade no local desejado. Assim, o encapsulamento é uma tecnologia proposta para estabilizar fármacos, como o ácido ascórbico, garantindo a sua função (DE SOUZA *et al.*, 2015; NESTERENKO *et al.*, 2013).

O ácido ascórbico é uma vitamina hidrossolúvel, que atua como um potente antioxidante devido a sua habilidade de doar átomos de hidrogênio para neutralizar radicais livres (DE SOUZA *et al.*, 2015). No entanto, é um composto de natureza altamente instável, sendo proposto o seu encapsulamento (COSTA, 2009; PIERUCCI *et al.*, 2006)

Os principais materiais utilizados para o encapsulamento dos fármacos, denominados materiais de parede, são os sistemas poliméricos. Dentre os polímeros biodegradáveis destacam-se as proteínas vegetais, que além de serem compostos geralmente reconhecidos como seguros, apresentam propriedades funcionais ideais para este processo (NESTERENKO *et al.*, 2013).

Legumina e vicilina, usualmente classificadas como globulinas 11S e 7S, respectivamente, são as duas principais proteínas encontradas na ervilha verde, sendo que a vicilina representa cerca de 35% desse conteúdo (COSTA, 2014; GHARSALLAOUI *et al.*, 2010; PIERUCCI *et al.*, 2006). A vicilina possui propriedades funcionais como a formação de filmes e solubilidade em ampla faixa de pH, características essenciais para os processos de encapsulamento, especialmente por *spray drying* (NESTERENKO *et al.*, 2013; RANGEL *et al.*, 2003). A utilização de proteínas da ervilha verde como materiais de parede, no encapsulamento do ácido ascórbico, pode promover sua proteção e estabilidade (COSTA, 2014; PEREIRA *et al.*, 2009; PIERUCCI *et al.*, 2006).

O emprego de nano e micropartículas vem sendo proposto e testado na Odontologia para promover melhorias aos materiais endodônticos. Estudos vem sendo realizados a fim de avaliar a atividade antimicrobiana (BO *et al.*, 2014; DEL CARPIO-PEROCHENA *et al.*, 2015; FAN *et al.*, 2016; GONZÁLEZ-LUNA *et al.*, 2016; HASEEB *et al.*, 2016;

JAVIDI *et al.*, 2014; KISHEN *et al.*, 2008; LOTFI *et al.*, 2011); propriedades mecânicas (BARROS *et al.*, 2014a; MOHN *et al.*, 2010; SAGHIRI *et al.*, 2012); citocompatibilidade (ABBASZADEGAN *et al.*, 2015; ABRAMOVITZ *et al.*, 2012; BARROS *et al.*, 2014a; BOUILLAGUET *et al.*, 2006; FAN *et al.*, 2016).

Devido ao seu efeito antioxidante, soluções de ácido ascórbico estão sendo indicadas na Odontologia, com a finalidade de melhorar a adesão de materiais à dentina (DA CUNHA *et al.*, 2010; FURUSE *et al.*, 2014; KHOROUSHI; KACHUEI, 2014), no entanto estas soluções apresentam alta instabilidade e prazo de validade curto. Tendo em vista o crescente uso da nanotecnologia e processos de encapsulamento na endodontia, este estudo pioneiro em Odontologia, teve como objetivo produzir nano e micropartículas de matriz proteica (vicilina) a fim de proteger o ácido ascórbico, por encapsulamento, para desenvolver uma solução com maior estabilidade a ser aplicada como irrigante previamente à cimentação de pinos de fibra de vidro à dentina intrarradicular.

2. Revisão bibliográfica

Neste capítulo serão apresentados os tópicos relevantes para a contextualização e entendimento do tema.

2.1. Nano e microencapsulamento

O nano e microencapsulamento é a tecnologia empregada para envolver materiais sólidos, líquidos ou gasosos, em pequenas cápsulas. Essa técnica é aplicada muitas vezes para a proteção de substâncias sensíveis, contra à umidade, calor, oxidação química ou fatores ambientais, de modo a melhorar sua estabilidade, prolongar o prazo de validade, evitando a sua degradação e mudanças negativas, como a perda do efeito que se deseja obter com essa substância (DE SOUZA *et al.*, 2015; NESTERENKO *et al.*, 2013).

O processo de *spray drying*, ou secagem por atomização, é um dos processos de nano e microencapsulamento que se baseia na pulverização de uma solução, formada pelo material a ser envolvido juntamente ao material que irá envolver. Isto é feito em uma câmara de ar quente evaporadora, onde há a secagem rápida e solidificação das gotículas, formando um pó seco, originando partículas no tamanho nano e micron (COSTA, 2014; PEREIRA *et al.*, 2009).

Diferentes fatores exercem influência sobre a formação das partículas, conferindo diferentes formatos e tamanhos. A estrutura das partículas é geralmente classificada como: cápsulas com um único núcleo revestidas por um único material de parede; esferas com o núcleo disperso no material de parede; e estruturas mais complexas de cápsulas com diferentes materiais de revestimento (multilayer) e esferas contendo diferentes núcleos (multicore) (**Figura 1**).

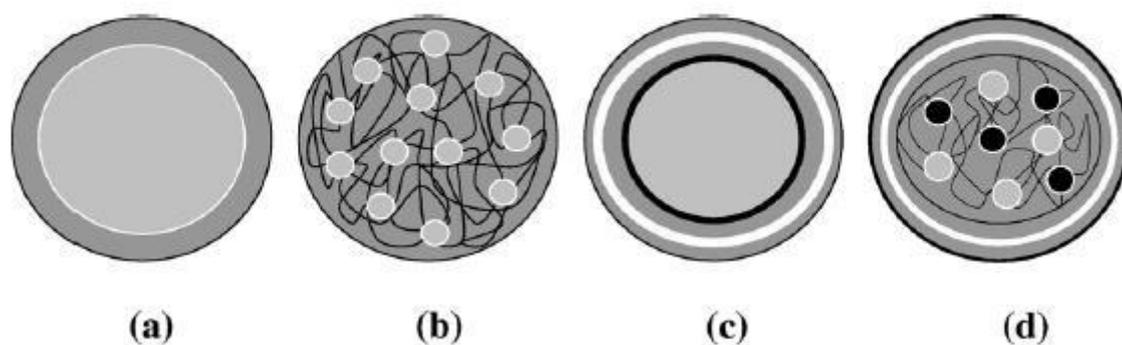


Figura 1. Morfologia dos diferentes tipos de partículas obtidas pelo processo de encapsulamento (adaptado de NESTERENKO et al., 2013). (a) cápsula, (b) esfera, (c) cápsula com várias camadas, (d) esfera com vários núcleos.

O microencapsulamento conduzido em um *spray dryer* se inicia com a preparação da dispersão a ser processada, chamada de solução alimentadora, em seguida, é feita a homogeneização da dispersão e, finalmente a solução alimentadora é levada ao aparelho de *spray dryer* para a atomização na câmara de secagem (**Figura 2**) (COSTA, 2009; COSTA, 2014; DE SOUZA *et al.*, 2015; NESTERENKO *et al.*, 2013; PEREIRA *et al.*, 2009; PIERUCCI *et al.*, 2006).

Durante o passo de homogeneização é crucial o uso de ultrassom, uma vez que, a ativação por sonicação produz um colapso cavitacional que a leva a colisões, que podem resultar na redução do tamanho de partícula (COSTA, 2014; PIERUCCI *et al.*, 2006).

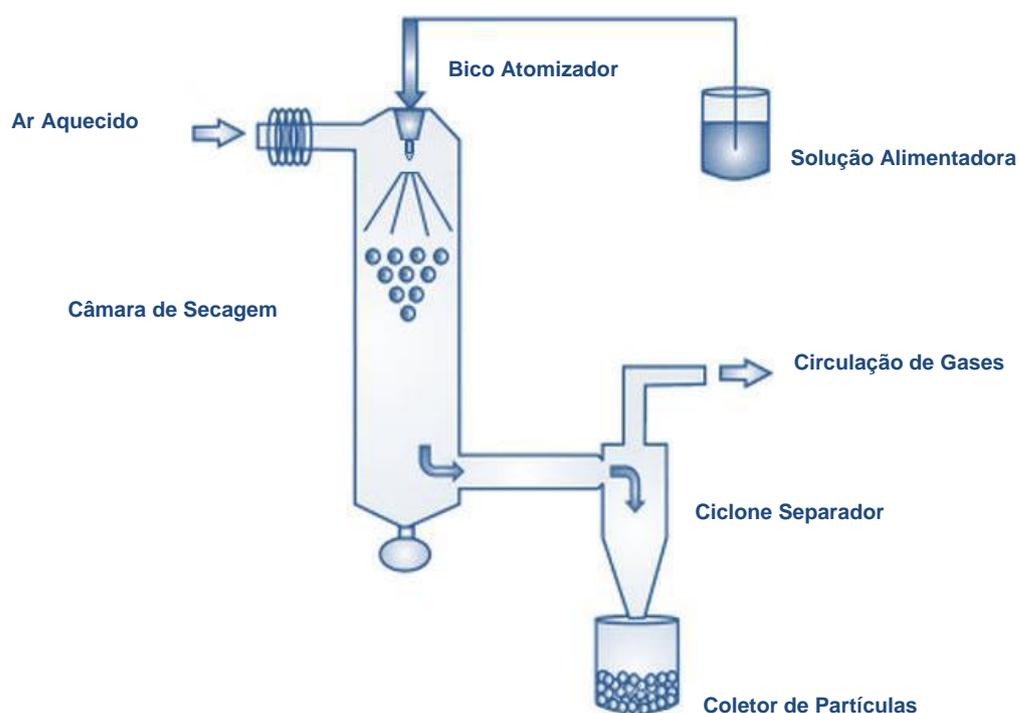


Figura 2. Esquema mostrando o processo de formação de nano e micropartículas por spray drying.

Uma dificuldade encontrada no processo de *spray drying* é a variedade limitada de materiais de parede disponíveis. Um material de parede deve possuir boas propriedades de emulsificação, formação de película e solubilidade em ampla faixa de pH. Estas características são encontradas nas proteínas de sementes de leguminosas (GHARSALLAOUI *et al.*, 2012). O uso de proteínas de origem vegetal vem crescendo devido a tendência por materiais “verde” nas indústrias farmacêutica, cosmética e alimentícia. Entre as possíveis proteínas extraídas de plantas para material de parede de microencapsulação, proteínas de soja, proteínas de ervilha e proteínas de cereais são as mais estudadas (NESTERENKO *et al.*, 2013).

A legumina (globulinas 11S) e a vicilina (globulinas 7S), são as principais proteínas de reserva da ervilha verde (*Pisum sativum*). Isolados proteicos de ervilha apresentam predominantemente vicilina na sua composição (35%) e suas propriedades funcionais são essenciais para os processos de encapsulamento por *spray drying* como: ação emulsificante e gelificante; boa capacidade de formação e estabilidade de filmes; e solubilidade em ampla faixa de pH, sendo praticamente insolúvel apenas em torno do seu

ponto isoelétrico (pH 5-6) (GHARSALLAOUI *et al.*, 2010; NESTERENKO *et al.*, 2013; PIERUCCI *et al.*, 2006; RANGEL *et al.*, 2003).

Alguns estudos vêm explorando o uso das proteínas de ervilhas para encapsular moléculas bioativas (COSTA, 2009; COSTA, 2014, GHARSALLAOUI *et al.*, 2010; GHARSALLAOUI *et al.*, 2012; PEREIRA *et al.*, 2009; PIERUCCI *et al.*, 2006). O isolado proteico comercial, o isolado extraído e a vicilina também extraída do grão da ervilha, foram utilizados para encapsular ácido ascórbico (COSTA, 2009; COSTA, 2014; PEREIRA *et al.*, 2009; PIERUCCI *et al.*, 2006).

No presente trabalho foi realizado um processo de extração de proteínas, através da farinha da semente da ervilha verde, para se obter a vicilina purificada. Este processo foi descrito por COSTA *et al.* (2014), que utilizou o estudo de RANGEL *et al.* (2003) como referência, com algumas modificações. Resumidamente, o protocolo se baseia em incubar a farinha em um tampão de Tris-HCl 50 mM (pH 8,5) e precipitação em $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sólido. O material é centrifugado diversas vezes, até a obtenção de um pellet final que corresponde à vicilina.

Pelo método de Lowry, procede-se à determinação da concentração total de proteínas presentes na solução obtida após a ressuspensão do pellet de vicilina.

Utilizando uma mistura contendo molibdato, tungstato e ácido fosfórico (reagente Folin-Ciocalteu), o princípio do método de Lowry baseia-se em duas reações químicas: a primeira reação é a redução do íon cobre (II) em condições alcalinas (básicas), formando um complexo com as ligações peptídicas, denominada reação de Biureto; e a segunda reação envolve a redução do reagente Folin-Ciocalteu pelo complexo cobre-ligação peptídica, causando uma mudança na coloração da solução para azul.

A principal vantagem do método de Lowry é a sua alta sensibilidade, além de ser preciso com menor consumo de amostra. Algumas desvantagens são o tempo da reação, a incompatibilidade com detergentes e agentes redutores, a perda de amostra e possui muitas operações. Para a quantificação de proteínas, pode ser utilizada uma curva padrão com outra proteína, cuja concentração seja conhecida, como por exemplo a albumina bovina sérica (RANDALL; LEWIS, 1951).

A solubilidade de uma proteína depende do número e arranjo de cargas na molécula, que por sua vez dependerá da composição em aminoácidos e das partes não proteicas. É possível alcançar uma maior solubilidade em temperaturas mais altas por um longo período. As proteínas são muito sensíveis ao calor e, durante o processo de secagem por *spray drying*, podem ocorrer alterações estruturais e físicas devido à desnaturação,

agregação e formação de complexos proteicos, o que, por sua vez, afeta a solubilidade, conferindo a esta proteína uma boa interação com a água, lipídios e outras moléculas (COSTA, 2014; GHARSALLAOUI *et al.*, 2010; PEREIRA *et al.*, 2009; PIERUCCI *et al.*, 2006; RANGEL *et al.*, 2003).

2.2. Nano e micropartículas na Endodontia

Na endodontia, são encontrados obstáculos devido à complexidade anatômica dos sistemas de canais radiculares, e devido as limitações na produção de materiais com propriedades ideais. Nesse cenário, o desenvolvimento de materiais, com adição de nanopartículas (NPs), vem crescendo como uma alternativa aos tradicionais, devido as suas propriedades, uma vez que a diminuição do tamanho das partículas permite a adição de características especiais aos materiais existentes ou ao desenvolvimento de novos (SHRESTHA; KISHEN, 2016; TELLES; PRADO; SIMÃO, 2017).

Recente revisão de literatura, indicou que os tipos de NPs já testadas foram: de prata (NPsAg), de quitosana (NPsCS), de polietilenimina de amônio quaternário (NPsQPEI), de nano agregado trióxido mineral branco (NWMTA), de biovidro ativo (BAG), de óxido de zinco (NPsZnO), e de clorexidina (NPsCHX) (TELLES; PRADO; SIMÃO, 2017).

As NPs podem apresentar atividade antimicrobiana pois, devido ao seu tamanho reduzido, as partículas possuem uma grande proporção superfície/massa o que gera uma reatividade química e uma maior interação com as paredes das células microbianas (SHRESTHA; KISHEN, 2016). Outro fator interessante é a possibilidade de alcançar os túbulos dentinários da dentina intrarradicular, local de difícil acesso para alguns materiais de tratamento endodôntico e de permanência bacteriana (HASEEB *et al.*, 2016). Logo, a ideia de que pequenas partículas entrem nos túbulos dentinários e produzam efeitos antibacterianos é instigante.

KISHEN *et al.* (2008) incorporaram NPs ao cimento de Grossman tipo 801, um cimento de óxido de zinco e eugenol, com a finalidade de avaliar a atividade antimicrobiana da mistura do cimento com três diferentes tipos de NPs: NPsZnO, NPsCS e NPsCS/ZnO, que foram misturadas ao pó do cimento. Também foi avaliada a atividade antimicrobiana de quatro tipos de NPs isoladas contra *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*): NPsZnO, NPsCS, NPsCS-camada-ZnO e NPsCS/ZnO. Os resultados indicaram que as NPsCS isoladamente eram melhores contra *E. faecalis*, porém essa atividade era diminuída quando adicionadas ao cimento. Para as NPsZnO, isoladas, foi observada uma menor atividade antimicrobiana contra *E. faecalis*, quando comparadas as outras NPs

testadas, porém quando misturadas ao cimento, a atividade antimicrobiana era maior, provavelmente devido à sua compatibilidade com o pó do cimento.

LOTFI *et al.* (2011) compararam o efeito antibacteriano da solução de hipoclorito de sódio (NaOCl), gluconato de clorexidina e NPsAg, contra *E. faecalis*. Não houve diferença significativa entre NaOCl 5,25% e 0,005% de NPsAg. Os autores concluíram que a solução de 0,005% NPsAg possui o mesmo efeito bactericida que o NaOCl, portanto, poderia ser usada como um novo irrigante intracanal.

JAVIDI *et al.* (2014) avaliaram o efeito antimicrobiano do hidróxido de cálcio ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) com ou sem suspensão de NPsAg. O efeito foi avaliado contra *E. faecalis* em 66 dentes humanos extraídos e contaminados. As soluções testes foram: 10% de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ puro; $\text{Ca}(\text{OH})_2$ + NPsAg; água estéril. Os resultados indicaram que o número de colônias observadas após o tratamento de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ + NPsAg foi significativamente menor que o número observado com $\text{Ca}(\text{OH})_2$ puro, tanto após 1 ou 7 dias. Este estudo demonstra uma vantagem em misturar hidróxido de cálcio com NPsAg como medicamento intracanal, reduzindo significativamente o número de *E. faecalis*.

BO *et al.* (2014) compararam a atividade antimicrobiana contra *E. faecalis* do gel de NPsAg nas concentrações 0,05%, 0,1% e 0,2% que foram testados e comparados a clorexidina (CHX) 2% e ao fenol canforado. Não foram encontradas diferenças significativas entre NPsAg 0,05% e a CHX 2% ou o fenol canforado. Porém o gel de NPsAg nas concentrações de 0,1% e 0,2% foram mais eficazes que a CHX 2% e o fenol canforado.

DEL CARPIO-PEROCHENA *et al.* (2015) avaliaram a eficácia do carboximetil-quitosano (CMCS) e de NPsCS na inativação biofilmes de *E. faecalis* nas interfaces cimento-dentina. Foi avaliada a capacidade antibacteriana dos cimentos ThermoSeal Plus e MTA Fillapex com ou sem NPsCS. Também foi avaliado a formação de biofilme nas interfaces tratadas com CMCS e nas interfaces com cimentos incorporados de NPsCS. A incorporação de NPsCS aumentou significativamente a eficácia antibacteriana dos cimentos mesmo após um tempo de 4 semanas.

GONZÁLEZ-LUNA *et al.* (2016) avaliaram o efeito antibacteriano de soluções de NPsAg como um irrigante final em endodontia. Cento e vinte dentes inoculados com *E. faecalis* foram divididos em grupos conforme o irrigante final: (A) solução de NPsAg (537 $\mu\text{g}/\text{mL}$); (B) NaOCl 2,25%; (C) NPsAg (537 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + EDTA 17%; e (D) solução salina. Os resultados constataram que a solução de NPsAg e o NaOCl 2,25% foram igualmente efetivos na eliminação de *E. faecalis*.

NPs de silicato de cálcio mesoporoso são biomateriais recentemente sintetizados com capacidade para promoverem a mineralização e liberação de moléculas bioativas de forma controlada. A funcionalização de NPs de silicato de cálcio mesoporoso com CHX foi avaliada por FAN *et al.* (2016), através de análises do perfil de liberação, atividade antibacteriana, o efeito na proliferação celular e propriedade de mineralização *in vitro*. A CHX foi incorporada com sucesso em silicato de cálcio mesoporoso por um método de acoplamento de mistura. A capacidade antimicrobiana contra *E. faecalis* foi melhorada após a incorporação de CHX. As NPs apresentaram capacidade em liberarem CHX e Ca^{2+} e SiO_3^{2-} , com baixa citotoxicidade, produzindo excelente atividade antimicrobiana e de mineralização *in vitro*.

Um estudo recente, produziu NPs contendo CHX como sistemas de liberação para o interior dos túbulos dentinários. A CHX foi encapsulada em poli(etilenoglicol) -bloco-poli(L-lactido) (PEG-b-PLA). Foi avaliada a eficiência da encapsulação e a morfologia das partículas, além do efeito antimicrobiano contra *E. faecalis*. As NPs foram dispersas em matriz de hidrogel composto por 1% de hidroxietilcelulose. Os autores observaram em seus resultados que, o sistema de hidrogel permitiu uma maior inibição bacteriana durante períodos mais longos de tempo, além do tamanho e velocidade da liberação de CHX que também influenciam na inibição prolongada de *E. faecalis* (HASEEB *et al.*, 2016).

Estudos descritos abaixo, estão testando a incorporação de NPs em substâncias químicas auxiliares e cimentos endodônticos, a fim de melhorar não somente as propriedades antimicrobianas, mas também as propriedades mecânicas. Os resultados apresentaram aumento nas propriedades estruturais como rigidez, resistência e microdureza. Além disso, houve um cuidado para que as propriedades ideias dos materiais, não fossem afetadas, quando adicionadas as NPs.

MOHN *et al.* (2010) produziram materiais compósitos de poliisopreno (PI) ou policaprolactona (PCL) incorporados de BAG tipo 45S5, que seriam capazes de produzir uma interface vedante de hidroxiapatita, tornando desnecessário o uso de cimentos endodônticos. Foi avaliada a formação de precipitado *in vitro* em fluido corporal simulado. Os canais radiculares simulados foram preenchidos com materiais compósitos aquecidos e foi avaliado o extravasamento de corante. Os compósitos incorporados de BAG revelaram formação de hidroxiapatita nas suas superfícies, melhorando a vedação imediata uma vez que o extravasamento do corante foi impedido completamente.

SAGHIRI *et al.* (2012) avaliaram as propriedades físico-químicas como: tempo de presa, microdureza e a área de superfície, de NWMTA e quando comparado ao Agregado Trióxido Mineral Branco convencional. O NWMTA apresentou os melhores resultados, houve um aumento da área superficial do pó que está relacionado com a redução do tempo de presa e maior microdureza, inclusive em ambientes de pH ácido.

Conforme os estudos de BARROS *et al.* (2014b) que avaliaram a atividade antibacteriana e as propriedades físico-químicas e mecânicas, dos cimentos endodônticos AH Plus e Pulp Canal Sealer EWT incorporados com NPsQPEI. O Pulp Canal Sealer com NPsQPEI, teve rápido efeito antibacteriano dentro de 30 a 60 min, sendo este um resultado melhor do que a fórmula não modificada do cimento. A atividade bacteriana foi reduzida com o AH Plus composto de NPs além de produzindo um efeito prolongado dessa redução de atividade. As propriedades físico-químicas e mecânicas dos cimentos não foram afetadas pela incorporação de NPsQPEI, exceto o tempo de fixação, molhabilidade e potencial zeta, que apesar de serem alteradas, os autores afirmaram que estas alterações podem ser favoráveis para uma melhor atividade antimicrobiana.

Visando diminuir a citotoxicidade dos materiais, são propostas associações de substâncias com diferentes concentrações e tamanhos de partículas. Neste sentido, BOUILLAGUET *et al.* (2006) avaliaram a citotoxicidade dos cimentos endodônticos AH Plus, Epiphany e GuttaFlow. O GuttaFlow é composto por NPsAg que funcionam como conservantes. A citotoxicidade foi avaliada em culturas celulares através do ensaio MTT. Os resultados indicaram diferenças significativas entre os materiais e a citotoxicidade aumentou com o tempo independente do material. O GuttaFlow se apresentou significativamente menos tóxico que o AH Plus e o Epiphany, porém a toxicidade aumentava com o tempo o que pode estar atribuído à liberação de NPsAg.

ABRAMOVITZ *et al.* (2012) estudaram o efeito de NPsQPEI 1% adicionadas aos cimentos AH Plus, Epiphany e GuttaFlow, em macrófagos RAW264.7, em linhas de fibroblastos L-929 e a produção de TNF α a partir de macrófagos. Os resultados mostram que a incorporação não prejudicou a biocompatibilidade dos cimentos. A adição de NPsQPEI 1% de concentração não prejudicou a biocompatibilidade dos cimentos. Os autores concluíram que NPsQPEI são potenciais para aplicações clínicas futuras pois não produzem efeito de citotoxicidade.

BARROS *et al.* (2014a) em um estudo com células ósseas humanas, avaliaram o comportamento celular em contato com dois tipos de cimentos endodônticos, AH Plus e Pulp Canal Sealer, adicionados de NPsQPEI. Além disso células osteoblásticas ou

osteoclásticas foram cultivadas com NPsQPEI (1% - 10%). Os cimentos sem NPsQPEI afetaram algumas vias de sinalização intracelular, porém os cimentos com NPsQPEI modulam ainda mais estes mecanismos. As NPsQPEI isoladas a 2% não afetaram o comportamento celular. Os autores concluíram que a incorporação de NPsQPEI a 2% em AH Plus e Pulp Canal Sealer modula a proliferação e diferenciação de células ósseas sem aumentar a citotoxicidade dos cimentos endodônticos.

Para avaliar a citotoxicidade e atividade antibacteriana, na ausência e na presença de dentina, um experimento determinou a concentração inibitória mínima de NPsAg carregas, contra *E. faecalis*. Comparou com NaOCl e CHX. Depois os autores testaram a eliminação de *E. faecalis* em diferentes tempos de contato (5, 20 e 60 min e 4 e 24 horas) e avaliaram o pó de dentina. Os autores ainda selecionaram a solução de NPsAg mais eficaz para avaliação da citocompatibilidade. Nos resultados, o pó de dentina apresentou efeito inibitório variável em todos os materiais testados após 1 hora de incubação, mas após 24 horas. O NaOCl e as NPsAg com cargas positivas não foram inibidas pelo pó de dentina em nenhuma concentração utilizada. A solução de NPsAg carregada positivamente foi a solução menos tóxica para os fibroblastos L929. A carga superficial das NPsAg diferenciou a eficácia bactericida. Os agentes iônicos imidazólios com NPsAg com cargas positivas mostraram efeitos antibacterianos promissores contra *E. faecalis* (ABBASZADEGAN *et al.*, 2015).

Até o presente momento não foram relatados estudos que tenham avaliado o uso de NPs de ácido ascórbico para fins Odontológicos, bem como também não há indícios de aplicação de partículas encapsuladas com proteínas vegetais. O presente estudo aborda a aplicação de um material diferente dos testados anteriormente, podendo resultar em uma nova linha de pesquisa que utiliza materiais de fontes naturais.

2.3. Ácido ascórbico

O ácido ascórbico (AA), ou Vitamina C, é uma cetolactona hidrossolúvel, que possui dois grupos hidroxila ionizáveis. Sua fórmula é $C_6H_8O_6$ (**Figura 3 - A1**) e o seu peso molecular é 176,12 g (KARLSEN; BLOMHOFF; GUNDERSEN, 2005). É essencial na formação do colágeno e na manutenção do sistema imunológico e nervoso. (DA CUNHA *et al.*, 2010) O ascorbato de sódio (AS), sal proveniente do AA, é um excelente agente redutor que sofre rapidamente oxidações consecutivas para formar o ácido desidroascórbico. Na degradação do ácido desidroascórbico ocorre a hidrólise do anel de

lactona, uma reação irreversível que caracteriza a perda da atividade biológica (**Figura 3 - C**) (COSTA, 2009; KARLSEN; BLOMHOFF; GUNDERSEN, 2005).

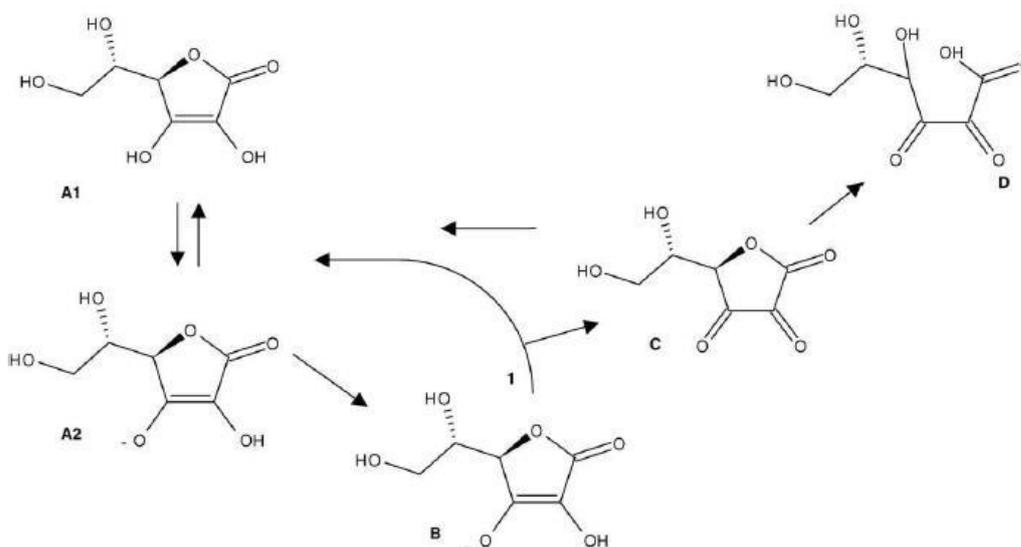


Figura 3. Esquema de reação para oxidação do ácido ascórbico (Adaptado de KARLSEN; BLOMHOFF; GUNDERSEN, 2005). Ácido ascórbico (A1), que em condições biológicas é encontrado na sua forma iônica como AS (A2). Quando sofre oxidação, o radical ascorbil (B) é formado e sofre uma reação espontânea de dismutação (1), onde uma molécula de AS e uma molécula de ácido desidroascórbico (C) são formadas a partir de duas moléculas de radical ascorbil. Em condições biológicas o ácido desidroascórbico sofre rápida e irreversível hidrólise com formação de ácido dicetogulônico (D).

Além da indústria alimentícia, o AA também é usado como conservante nas indústrias farmacêutica, química e cosmética devido a suas propriedades antioxidantes. O AA quando dissolvido em água possui degradação imediata, podendo apresentar melhor estabilidade na forma de pó quando armazenado corretamente em condições ideais. Ainda assim é possível que haja algum nível de degradação. Fatores ambientais, tais como temperatura, pH, teor de umidade, oxigênio, íons metálicos, UV e raios-x afetam a sua estabilidade e provocam sua degradação (COSTA, 2014; PALMA-RODRIGUEZ *et al.*, 2013; PEREIRA *et al.*, 2009; PIERUCCI *et al.*, 2006).

Nesse sentido, o encapsulamento por *spray drying* pode protegê-lo da oxidação, aumentando a sua estabilidade, sofrendo uma menor degradação no seu armazenamento,

consequentemente facilitando sua aplicação em produtos (COSTA, 2009; COSTA, 2014; DE SOUZA *et al.*, 2015; PALMA-RODRIGUEZ *et al.*, 2013; PEREIRA *et al.*, 2009; PIERUCCI *et al.*, 2006).

2.4. Falha na resistência de união

Dentes endodônticamente tratados podem apresentar uma destruição coronariana acentuada sendo necessária uma reabilitação dentária. Acredita-se que o sucesso do tratamento endodôntico a longo prazo pode estar relacionado com a qualidade desta reabilitação. Os pinos intrarradiculares são indicados nesses casos, com o objetivo de obter a união e retenção entre a coroa protética e o remanescente da estrutura radicular (BATEMAN; RICKETTS; SAUNDERS, 2003).

Os pinos de fibra de vidro são uma alternativa aos núcleos metálicos na reabilitação das estruturas dentárias e apresentam vantagens, tais como: estética e módulo de elasticidade semelhante à dentina, característica que contribuem para um melhor prognóstico clínico destes dentes enfraquecidos, que pode reduzir as chances de uma fratura. Devido às suas excelentes propriedades mecânicas e de selamento, os cimentos adesivos associados aos pinos intrarradiculares, são considerados materiais de primeira escolha para a restauração definitiva e imediata desses dentes (ASMUSSEN; PEUTZFELDT; HEITMANN, 1999; DA CUNHA *et al.*, 2010).

Diversos fatores são considerados responsáveis por produzirem falhas na resistência de união, como a limpeza do conduto após remoção do material obturador endodôntico; o tipo de sistema adesivo utilizado; o tipo de agente cimentante utilizado e as técnicas de aplicação do cimento resinoso no ato da cimentação do pino; a impregnação deficiente do sistema adesivo na dentina e subpolimerização; alta permeabilidade da interface adesiva e a ativação de enzimas endógenas colagenolíticas como as metaloproteinasas da matriz extracelular – MMPs (BALDEA *et al.*, 2013; MAZZONI *et al.*, 2011; ZHOU *et al.*, 2009)

O NaOCl, principal irrigante utilizado durante o tratamento endodôntico, é um agente proteolítico não específico, que pode afetar as propriedades mecânicas da dentina, tais como microdureza, rugosidade, módulo de elasticidade, flexão e fadiga, através da degradação do seu conteúdo orgânico e mineral (ABUHAIMED; NEEL, 2017). Acredita-se que o uso do NaOCl, remova fibrilas colágenas o que tende a aumentar a capacidade de molhamento, resultando numa superfície hidrofílica, o que melhora a penetração dos materiais adesivos na estrutura dentinária. No entanto, muito se discute sobre seu

potencial de degradação de colágeno como sendo um fator que afeta desfavoravelmente a resistência de união à dentina intrarradicular (DA CUNHA *et al.*, 2010; FARINA *et al.*, 2011; KUL *et al.*, 2016).

O NaOCl tem sua molécula dissociada em cloreto de sódio e oxigênio, resultando em uma liberação de oxigênio residual horas após o tratamento. Acredita-se que a presença deste oxigênio residual produza uma oxidação de componentes da matriz dentinária, comprometendo a penetração e polimerização dos sistemas adesivos. Estudos têm demonstrado que a impregnação deficiente dos monômeros do sistema adesivo na dentina, pode ocasionar degradação hidrolítica, uma vez que esses materiais gradualmente absorvem água tornando-se cada vez mais permeáveis e susceptíveis à eluição, deixando as fibras colágenas desprotegidas, ocorrendo uma degradação ao longo do tempo, ocasionando falhas de união dos pinos às paredes do canal, levando ao insucesso da restauração final. Assim, novas soluções químicas para tratamento da dentina estão sendo testadas na tentativa de sanar ou diminuir os constantes problemas relativos a ação residual do NaOCl. Soluções com potencial antioxidante, compostas de AA ou AS estão sendo testadas com a finalidade de aumentar a resistência de união (CELIK *et al.*, 2010; EBRAHIMI-CHAHAROM *et al.*, 2015; GÖNÜLOL; KALYONCUOĞLU; ERTAŞ, 2015; MOREIRA *et al.*, 2011; PRASANSUTTIPORN *et al.*, 2011; RABI; CAI; VADERHOBLI, 2017; REDDY *et al.*, 2018; STEVENS, 2014; WESTON *et al.*, 2007).

Alguns estudos testaram a atividade de soluções contendo AA e AS quanto à resistência à tração de pinos de fibra de vidro. DA CUNHA *et al.* (2010) avaliaram a resistência de união de pinos de fibra de vidro cimentados com RelyX U100 ou RelyX ARC, após aplicação de AA 10% na dentina intrarradicular desproteïnizada com NaOCl 5%. Os resultados mostraram que o tratamento subsequente com AA foi capaz de reverter as alterações no valor da força de adesão para níveis semelhantes aos dos controles. KHOROUSHI; KACHUEI (2014), testaram três agentes antioxidantes sobre a resistência de união da dentina tratada com hipoclorito. Os canais radiculares foram irrigados com ácido rosmarínico 10%, hesperidina 10% e um hidrogel de AS 10%. Os autores concluíram que a irrigação com NaOCl durante o preparo do canal diminuiu a resistência de união do cimento resinoso à dentina radicular. Dentre os antioxidantes testados, o AS 10% apresentou resultados superiores na resistência de união à dentina radicular. FURUSE *et al.* (2014) testaram a aplicação de AA 10% na dentina desproteïnizada com NaOCl 5%. Os pinos de fibra de vidro foram cimentados com RelyX ARC e dois sistemas

adesivos diferentes foram avaliados. Testes de *push-out* foram realizados e pode-se concluir que o AA foi responsável pelo aumento da resistência de união.

Como citado na seção anterior, a maior dificuldade para trabalhar com estes antioxidantes é manter a estabilidade para que o efeito principal não se perca. Diante do exposto, o microencapsulamento do AA por uma matriz protetora foi sugerido neste trabalho a fim de proteger o AA e prolongar o seu efeito antioxidante.

3. Objetivos

Objetivo geral:

- Produzir nano e micropartículas de ácido ascórbico para aplicação odontológica.

Objetivos específicos:

- Avaliar a morfologia das partículas produzidas;
- Confirmar se há encapsulamento do ácido ascórbico;
- Avaliar o comportamento da liberação do ácido ascórbico contido nas partículas;
- Avaliar se há atividade antimicrobiana nas partículas;
- Avaliar o efeito da irrigação das soluções teste em comparação ao ascorbato de sódio 10% quanto a resistência de união de pinos de fibra de vidro cimentados com um cimento autoadesivo.

4. Materiais e método

4.1. Obtenção das nano e micropartículas de ácido ascórbico

Os encapsulados de ácido ascórbico foram produzidos através do método de secagem por pulverização (*spray-drying*), de acordo com COSTA (2014) com modificações.

Todos os produtos químicos utilizados foram de grau de reagente analítico, e todas as soluções foram preparadas frescas diariamente.

4.1.1. Material de encapsulamento e núcleo

As nano e micropartículas foram formadas através da vicilina, uma proteína da ervilha verde (*Pisum sativum*), como material de parede, e o ácido ascórbico (P.A.- American Chemical Society - Synth, Diadema, SP, Brasil) como material de núcleo.

Para a obtenção da vicilina foi realizada uma purificação desta proteína através da precipitação em sulfato de amônio $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ com algumas modificações. As sementes de ervilha verde (Ervilha verde partida / Grupo II / Tipo 2 - Yoki Alimentos S/A, São Bernardo do Campo, SP, Brasil) foram moídas em um moinho (ZM-1 Centrifugal Mill - Retsch Technology GmbH, Haan, Alemanha) com filtro de malha de 0,5 mm à temperatura ambiente, produzindo uma farinha fina de ervilha (**Figura 4**).

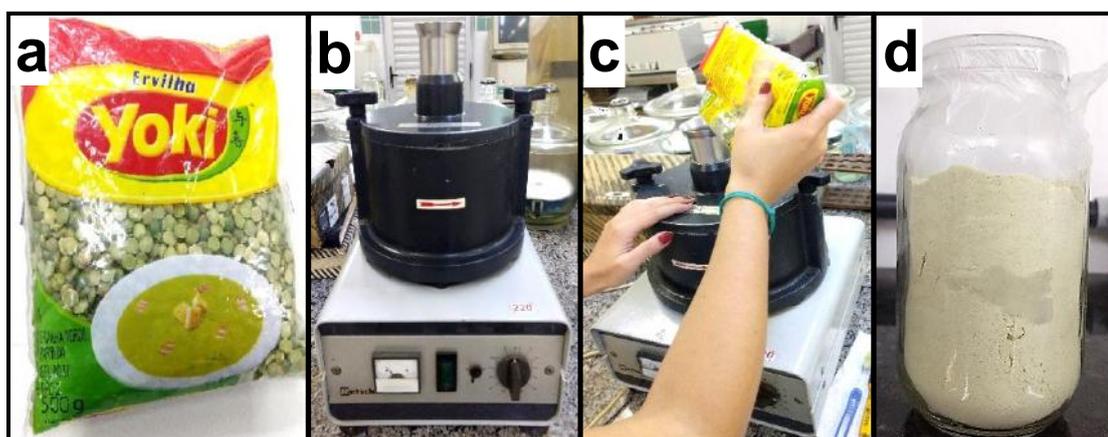


Figura 4. a) Ervilha verde Yoki; b) Moinho; c) Moagem dos grãos de ervilha; d) Farinha de ervilha obtida através do grão moído.

A farinha de ervilha obtida foi inicialmente desengordurada através de agitação vigorosa em acetona (proporção de farinha para solvente aproximadamente de 1:10). Após agitação, a solução foi deixada em repouso para a decantação da farinha, e em

seguida a solução sobrenadante foi descartada com auxílio de uma pipeta de vidro. Para finalizar o desengorduramento, o processo foi repetido duas vezes (**Figura 5**).

Para a evaporação completa da acetona, a farinha de ervilha desengordurada foi transferida para um refratário de vidro largo onde foi deixada na capela durante uma noite à temperatura ambiente de 25°C.

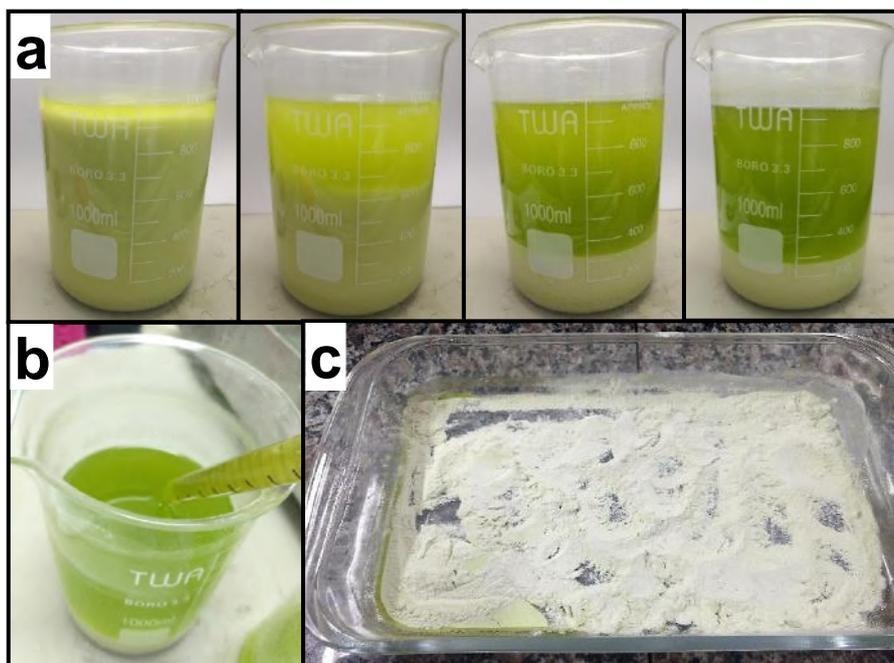


Figura 5. a) Farinha de ervilha misturada na acetona e estágios de decantação da farinha; b) Remoção do sobrenadante de acetona com lipídeos removidos da farinha; c) Farinha de ervilha desengordurada e completamente seca.

Dando sequência à obtenção da vicilina, a farinha de ervilha seca e desengordurada foi pesada (200 gramas / Balança semi-analítica - BK 3000 - Cetec®, Ribeirão Preto, SP, Brasil) e incubada em uma solução tampão de Tris-HCl 0,05 M, NaCl 0,2 M e EDTA 0,001 M para 1L em água destilada (pH 8,5) (Vetec Química Fina Ltda, Duque de Caxias, RJ, Brasil) dando início ao processo de purificação da vicilina. A farinha foi incubada durante 90 min em agitação magnética a 25°C (relação farinha para tampão de 1:10). A solução foi centrifugada (Himac CR21G II - Hitachi, Tokyo, Japão / Rotor R14A) a 10.000 g, por 30 minutos, à 18°C, com a finalidade de extrair as proteínas solúveis (**Figura 6**).

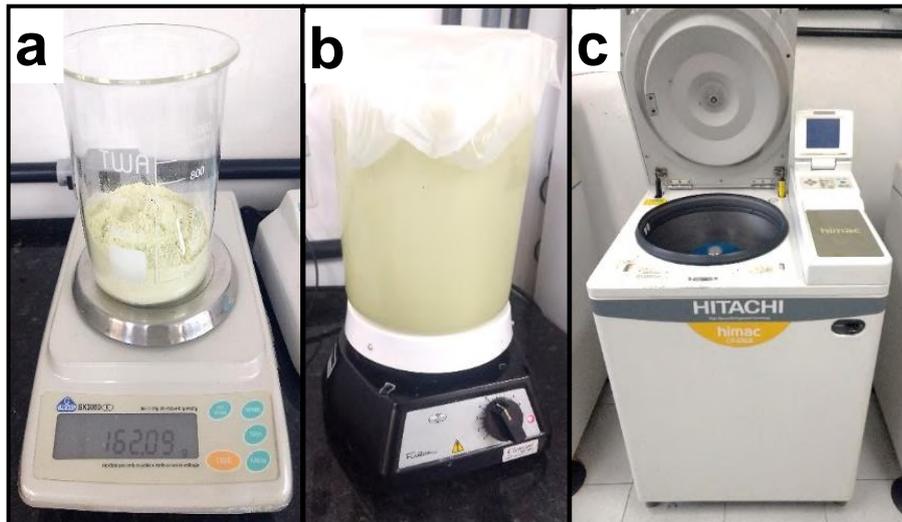


Figura 6. a) Farinha de ervilha desengordurada sendo pesada; b) Incubação da farinha em solução tampão de Tris-HCl 0,05 M (pH 8,5); c) Centrífuga.

Após a centrifugação, o sobrenadante foi coletado para precipitação em sulfato de amônio $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ P.A. (ISOFAR Indústria e Comércio de Produtos Químicos Ltda, Duque de Caxias, RJ, Brasil). O sulfato de amônio foi adicionado lentamente, levando a solução à uma precipitação de 45% de saturação, e após 30 minutos de agitação magnética, centrifugou-se (10.000 g, 30 min, 18°C). O sobrenadante desta centrifugação foi levado a uma saturação de 75% e centrifugado. Em seguida, o sobrenadante foi levado a uma saturação de 99% e novamente centrifugado para recolher o precipitado de vicilina. O precipitado foi ressuspenso em quantidade mínima de tampão de Tris-HCl 0,05 M em água destilada (pH 10,0) para ser submetido a diálise a fim de purificar e dessalinizar a solução de vicilina (**Figura 7**).

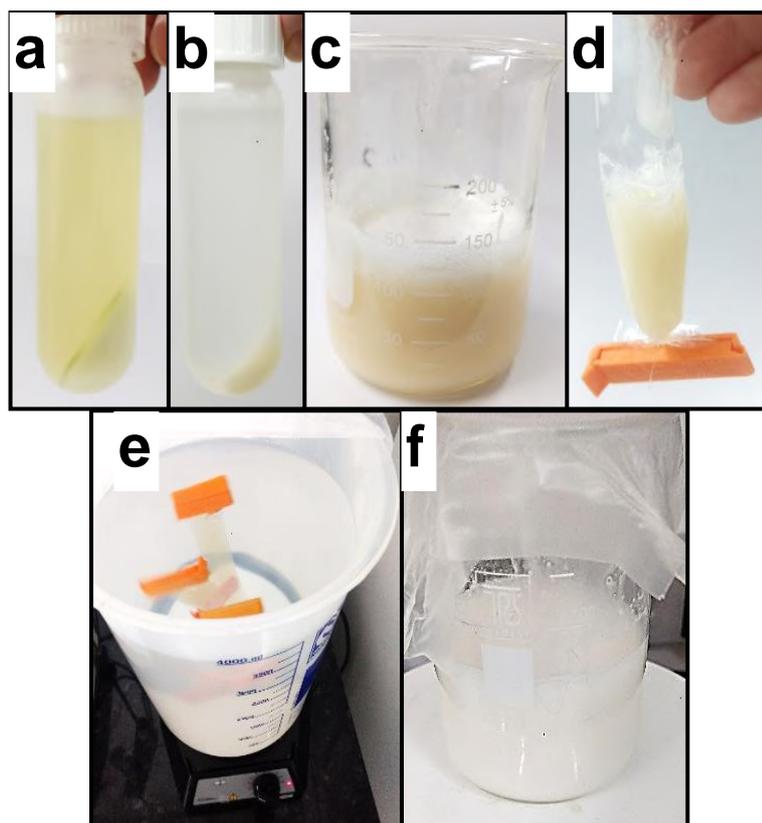


Figura 7. a) Tubo de centrífuga com o precipitado da solução de 75% de saturação; b) Tubo de centrífuga com a vicilina precipitada após centrifugação final; c) Solução de vicilina obtida com o precipitado ressuspensão; d) Membrana de diálise com solução de vicilina; e) Solução de vicilina ao longo do processo de diálise; f) Solução de vicilina ao final do processo de diálise.

A diálise foi realizada com um filtro de membrana (SERVAPOR® 3 dialysis tubing, MWCO 3500, membrana de celulose regenerada, 28 mm de diâmetro - SERVA Serving Scientists, Heidelberg, Alemanha), que foi preparado conforme as especificações do fabricante, contra o tampão Tris-HCl 0,05 M em água destilada (pH 10,0) diluído em 10X. A solução com vicilina foi dialisada durante dois dias com 4 trocas da solução de diálise, sendo 3 trocas com a solução contendo o tampão de Tris-HCl e a última troca somente com água destilada.

Para determinar a concentração total de vicilina na solução obtida, foi aplicado o método de Lowry (RANDALL; LEWIS, 1951).

4.1.2. Produção das nano e micropartículas de AA

A solução de proteína extraída (vicilina) foi levada ao Mini Spray Dryer Büchi 290 (Büchi Laboratoriums Technik AG, Flawil, Suíça) (**Figura 8-a**), operando a uma temperatura de entrada e saída de 140°C e 65 ± 3°C com bocal de 0,7 mm e taxa de alimentação de 6 mL.min⁻¹. Após o processo de secagem a solução de vicilina extraída foi transformada em pó de vicilina. O pó obtido foi coletado e armazenado em recipientes fechados dentro de um dessecador.

Para a produção das nano e micropartículas de AA (NP-MP) foram preparadas soluções com o teor total de sólidos de 4%, sendo assim 2% de vicilina em pó e 2% de AA para um volume de 100 mL. Inicialmente, 2 g de vicilina foram diluídas em 50 mL de água destilada, e esta solução foi mantida em agitação magnética durante 30 min. Em paralelo, 2 g do AA foram dissolvidos em 50 mL de água destilada.

Em seguida, as soluções contendo material de parede (vicilina) e núcleo (AA) foram misturadas, sob agitação contínua (13.500 rpm) (Ultra-Turrax, T25-IKA®, Labotechnik, Campinas, SP, Brasil) (**Figura 8-d**). Por fim, foi utilizado um processador ultrassônico (90% de amplitude / 1 ciclo / 90sec) (DRH-UP 100H; Hielscher Ultrasonics, Alemanha) para dispersão das partículas (**Figura 8-e**). Após a preparação, a solução foi imediatamente levada ao *spray-dryer* para a secagem por pulverização (Mini Spray-Dryer Büchi 290 - Büchi Laboratoriums Technik Flawil, Suíça) a uma temperatura de entrada e saída de 140 ± 3°C / 80 ± 5°C, respectivamente (**Figura 8-f**).

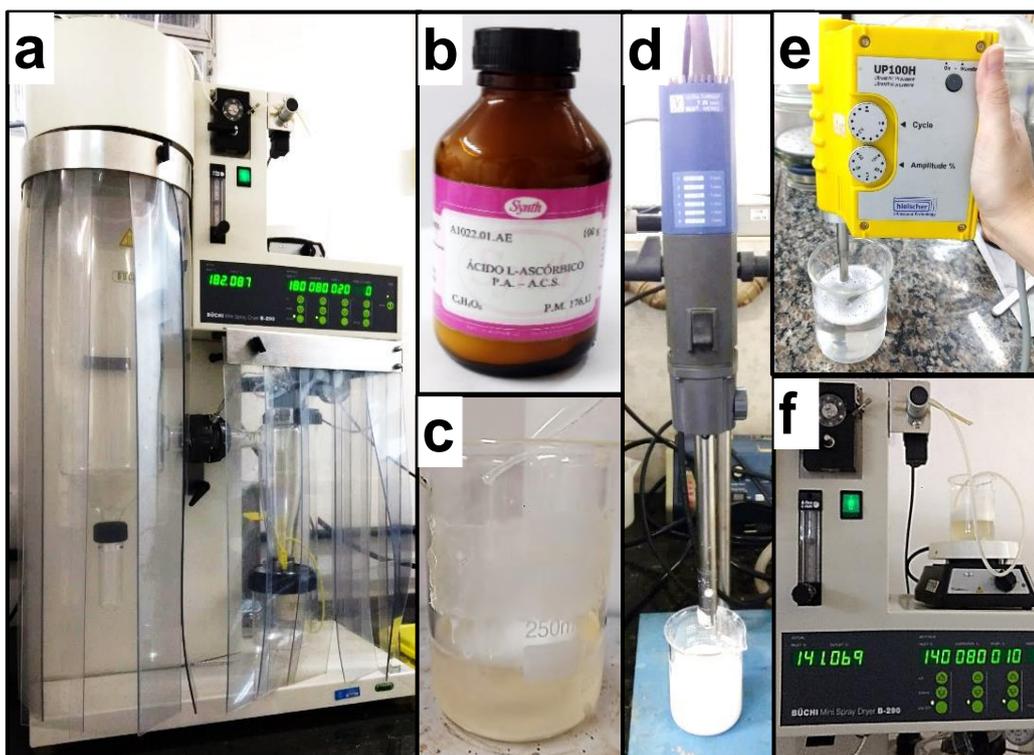


Figura 8. a) Mini Spray Dryer Buchi 290; b) Ácido Ascórbico; c) Vicilina em pó misturada à água recebendo o Ácido Ascórbico que foi gotejado forma de líquido; d) Ultra-Turrax; e) Processador ultrassônico; f) Solução final passando pelo spray.

Ao fim do processo de pulverização, as NP-MP foram recolhidas e colocadas imediatamente em *ependorfs* plásticos. O material foi pesado e embalado com papel alumínio para bloquear a luz. Os *ependorfs* foram armazenados em um dessecador à temperatura ambiente (25°) com umidade relativa de 20% (**Figura 9**).

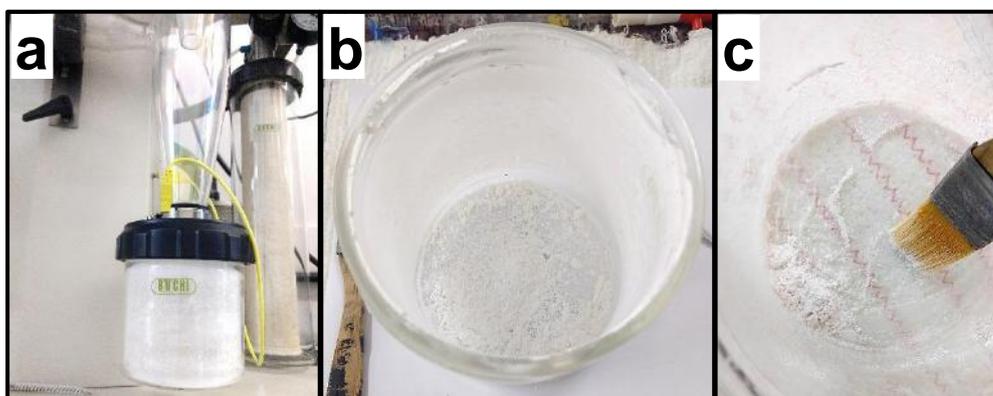


Figura 9. a) Coletor final das partículas; b) Partículas dispersas pelo vidro do coletor; c) Pó de partículas sendo coletado.

4.2. Caracterização das nano e micropartículas

Para o estudo da morfologia, tamanho das partículas e a confirmação do encapsulamento, diferentes técnicas de análises foram aplicadas.

4.2.1. Análise do rendimento do encapsulamento

O rendimento do encapsulamento (%) foi calculado como a proporção da massa das nano e micropartículas obtida no final do processo e a massa da solução alimentadora (eq1). Para isso ao final de três processos de obtenção de partículas, estas foram pesadas.

$$\text{Equação 1 - } \% = \frac{\text{Massa das partículas (g)}}{\text{Massa do material de parede + núcleo (g)}} \times 100$$

4.2.2. Análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Três lotes de NP-MP produzidas foram avaliadas. Estas foram depositadas em fita adesiva de carbono dupla-face, fixadas na superfície dos stubs de aço apropriados para MEV. As amostras foram recobertas com uma fina camada de ouro em um metalizador SCD-050 BAL-TEC (BAL-TEC, Balzers, Liechtenstein), por 120 segundos, a 40 mA e analisadas no microscópio VEGA3 (TESCAN, Brno-Kohoutovice, Brno, CZE), a 15kV. Foram realizadas fotomicrografias da vicilina e das NP-MP com ampliações de 2000x, 3000x, 5000x e 10000x.

4.2.3. Análise por microscopia de força atômica (Atomic Force Microscopy - AFM)

Para o preparo das amostras para a leitura no AFM, as NP-MP foram colocadas em água destilada, e a solução foi misturada em agitação magnética por 10 min. Em seguida a solução foi gotejada sobre pequenas placas de silício, que foram secas imediatamente em um agitador magnético com controle de aquecimento.

Foram feitas imagens de topografia para estudo da morfologia de três produções de NP-MP. O microscópio utilizado foi o JPK™ NanoWizard® II (JPK Instruments AG, Colditzstr, BE, Alemanha), por varredura no modo de contato intermitente, e frequência de 75 kHz.

Para avaliar o tratamento das partículas utilizou-se o software JPK Image Processing.

4.2.4. Difração de raios X (DRX)

Para análise da cristalinidade das NP-MP, foi realizada DRX de três produções de partículas. O difratômetro XRD-6000 Shimadzu (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) com radiação $\text{CuK}\alpha$ foi utilizado, na faixa de varredura de 10° até 80° de ângulo de difração no modo contínuo, com passo de $0,02^\circ \text{ min}^{-1}$ e velocidade $2^\circ/\text{min}$. A tensão e a corrente aplicada da fonte de raios-X foram de 30 kV e 30 mA. Para efeito de comparação, a vicilina seca e o AA também foram analisados.

4.2.5. ATR/FTIR (ATR - Attenuated total reflectance / FTIR- Fourier transform infrared spectroscopy)

Para as análises das ligações químicas, foi realizado o FTIR com o equipamento Spectrum™ 100 (PerkinElmer Waltham, MA, USA). As amostras de AA puro triturado, vicilina e NP-MP produzidas em três processos diferentes, foram medidas empregando modo de refletância total atenuada (ATR). Estas foram depositadas por cima do cristal de seleneto de zinco (ZnSe) e os espectros foram registados no intervalo de $4000 - 550 \text{ cm}^{-1}$ com 128 scans e 2 cm^{-1} de resolução.

As formações de bandas foram comparadas com a literatura já estabelecida sobre o tema, para a correta identificação dos constituintes.

4.2.6. Espectroscopia UV-visível

A fim de avaliar se há liberação do AA contido no interior das NP-MP, a análise de espectrofotometria visível foi realizada. Pode-se obter a liberação através da ocorrência de: desorção do fármaco adsorvido na superfície da matriz; difusão do fármaco pela matriz polimérica; erosão da matriz; e os processos de erosão e difusão combinados (SOPPIMATH *et al.*, 2001). Foi utilizado o equipamento Lambda 25 UV/VIS Spectrophotometer (PerkinElmer, Waltham, MA, EUA). Anteriormente à realização do experimento, calibrou-se o espectrofotômetro, que foi ajustado para gerar gráficos de espectros de absorção. As varreduras foram realizadas nos intervalos de 200 a 500 nm. O ensaio do branco foi executado com a as soluções base das amostras. Foi utilizada a cubeta de quartzo. As análises foram realizadas em temperatura ambiente.

Curva de Calibração do AA

Com o objetivo de identificar o pico do comprimento de onda absorvido pelo AA e determinar a equação de reta e o coeficiente de correlação linear, foi preparada uma solução principal de AA com concentração de 20 ppm em um balão volumétrico de 1 L de água destilada. Cinco soluções diluídas foram produzidas misturando 200, 400, 600, 800 e 1000 μL da solução principal (20 ppm de AA) em 2 mL de água destilada. As leituras foram realizadas imediatamente após o preparado das soluções.

As soluções possuíam concentrações de:

- Solução 1 (200 μL de AA + 2 mL de água destilada) = 1,82 ppm;
- Solução 2 (400 μL de AA + 2 mL de água destilada) = 3,33 ppm;
- Solução 3 (600 μL de AA + 2 mL de água destilada) = 4,62 ppm;
- Solução 4 (800 μL de AA + 2 mL de água destilada) = 5,71 ppm;
- Solução 5 (1000 μL de AA + 2 mL de água destilada) = 6,66 ppm;

Absorção da matriz de vicilina

O objetivo é avaliar se a vicilina absorve no mesmo comprimento de onda que o AA. Desse modo, pegou-se a vicilina após a secagem por *spray drying* e misturou-se em água destilada por 5 min. Após esse período, foi retirada uma alíquota de 3 mL e realizada a leitura no espectrofotômetro.

Teste de liberação

As NP-MP foram pesadas em 0,0250 g (concentração de 0,5%) para a realização do teste de liberação (**Tabela 1**). A solução escolhida para a análise de liberação das partículas foi a água destilada acidificada (HCl) com pH=2 (ADA), para que se consiga uma liberação rápida uma vez que a vicilina possui boa solubilidade nesta região de pH (PEREIRA *et al.*, 2009; PIERUCCI *et al.*, 2006; RANGEL *et al.*, 2003). Inicialmente, foram determinadas as diluições necessárias para evitar desvios na lei de Beer e então a melhor diluição foi escolhida (**Tabela 1**). A homogeneização visual das partículas foi analisada e definida em 4 min como tempo de agitação e mistura inicial das soluções. As NP-MP foram misturadas na ADA sob agitação magnética na temperatura ambiente. Após os 4 min, alíquotas de 3 mL foram retiradas em intervalos de tempo pré-determinados (**Tabela 2**). Os dados foram salvos e tratados no software OriginPro 8.

Tabela 1. Diluição realizada para análise do teste de liberação das NP-MP.

Concentração (%)	Peso (g)	Diluição ADA (L)
0,5%	0,0250 g	1 L

Tabela 2. Tempo de cada análise realizada após os 4 min da homogeneização.

Análise	Tempo
1	Imediatamente após a mistura
2	3 min
3	5 min
4	10 min
5	15 min
6	25 min
7	40 min
8	60 min
9	85 min

4.3. Atividade antimicrobiana

As soluções de NP-MP foram preparadas com 0,5%, 1% e 1,5% de concentração em 5 mL de ADA e os processos da análise foram realizados conforme descrito na Farmacopeia Brasileira 5ª Edição (ANVISA, 2010).

Os microrganismos testados provenientes do padrão American Type Culture Collection foram a espécie bacteriana anaeróbia facultativa *E. faecalis* (ATCC 10541) e a espécie de fungo *Cândida albicans* (ATCC 10231). Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes - Universidade Federal do Rio de Janeiro. A metodologia escolhida para a realização do teste foi o método clássico de difusão radial em ágar, em sistema de bicamada (Clsi, 2009). Todo o procedimento foi realizado sob câmara de fluxo laminar com materiais estéreis (**Figura 10**).



Figura 10. Câmara de fluxo laminar.

4.3.1. Preparo do inóculo

Os microrganismos foram ativados em tubos contendo caldo de Infusão de Cérebro e Sangue (BHI – KASVI, São José do Pinhais, PR, Brasil) (**Figura 11-a**). A verificação da pureza das culturas através da turvação do meio e a concentração final de $6,5 \times 10^6$ ufc/mL foi obtida pela densidade óptica. Em seguida os microrganismos foram cultivados no meio sólido em placas de BHI Ágar (BHIA) e incubados na estufa por 24 horas a 37°C (**Figura 11-b**). Após crescimento em meio sólido, as culturas foram suspensas em solução salina estéril e após agitação mecânica, a suspensão foi ajustada até que atingisse uma concentração final de 0,5 da escala de Mc Farland ($1,5 \times 10^8$ ufc/mL).

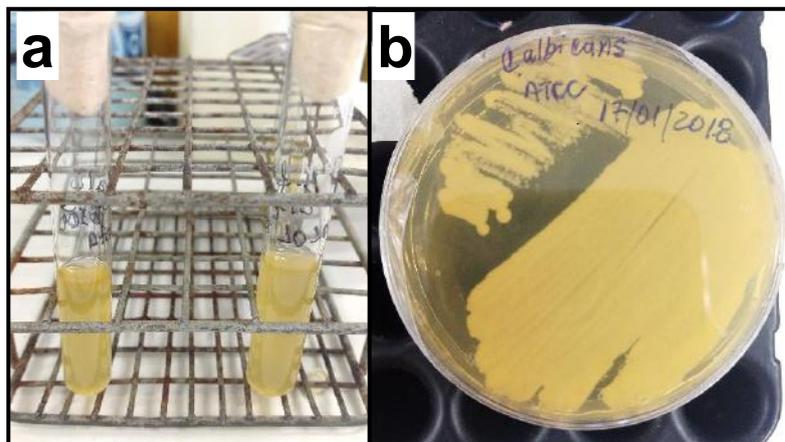


Figura 11. a) Preparo do cultivo dos microrganismos; b) Microrganismos cultivados.

4.3.2. Difusão em placas

Para o *E. faecalis* cada placa de Petri (150 x 15 mm) recebeu uma camada contendo 15 mL de Ágar Müeller Hinton (MHA – HiMediaLaboratories, Pensilvânia, EUA) que foi preparada para servir de camada base (**Figura 12**). Em seguida, BHIA foi preparado e autoclavado em frascos de vidro com tampas rosqueáveis. Ainda em estado líquido foi acrescentado ao BHIA o inóculo microbiano (1 mL da suspensão para cada 100 mL de meio). O BHIA contendo inóculo microbiano foi adicionado à placa de Petri (15 mL) sobre a camada base de MHA solidificada.

Para a *C. albicans* cada placa de Petri (60x15 mm) recebeu uma camada contendo 5 mL de Ágar Batata Dextrose (ABD - HiMediaLaboratories, Pensilvânia, EUA) que foi preparada para servir de camada base (**Figura 12**). Em seguida, BHIA autoclavado em estado líquido recebeu o inóculo microbiano (1 mL da suspensão para cada 100 mL de meio) e foi adicionado à placa de Petri (5 mL) sobre a camada base de ABD solidificada.

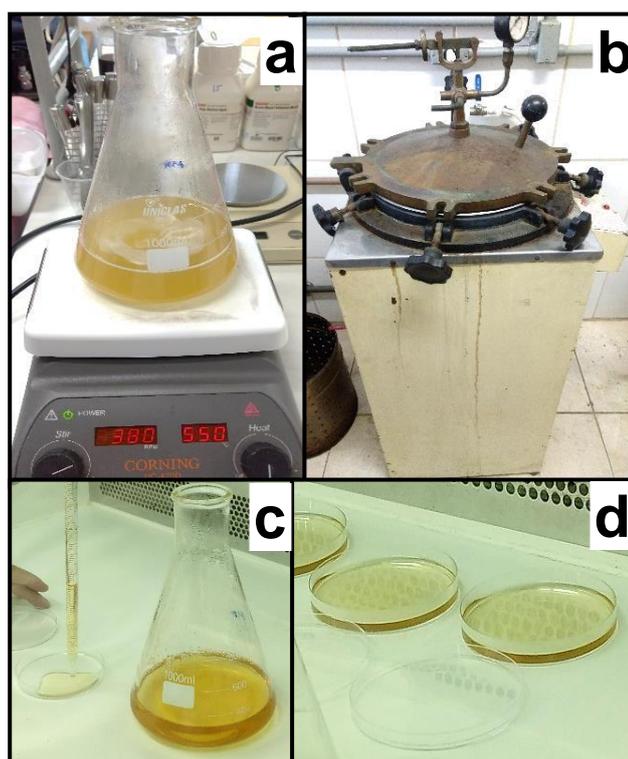


Figura 12. a) Preparado da solução que servirá de camada base; b) Autoclave; c) Camada base estéril; d) Solidificação da camada base.

Após as placas estarem solidificadas, foram confeccionados pequenos poços de 5 mm de diâmetro (**Figura 13**), onde foram inseridas as soluções experimentais de NP-MP nas concentrações de 0,5%, 1%, 1,5%, solução de vicilina após extração e após secagem e ADA. As placas foram incubadas durante 24 horas em estufa a 37°C.

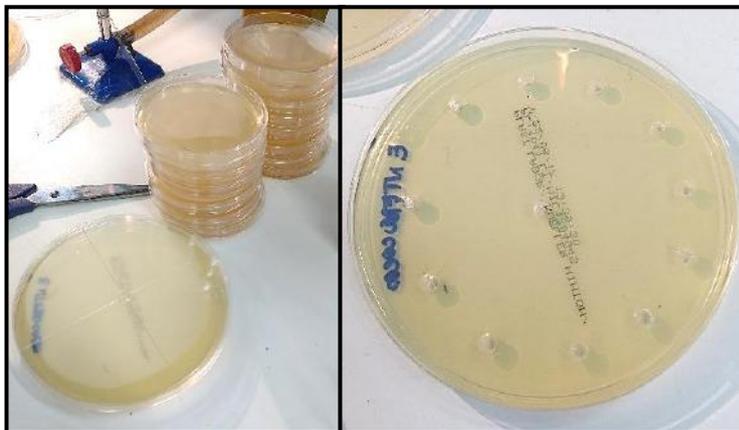


Figura 13. Placas com a camada de inóculo solidificada e poços produzidos até o final da paca.

Cada placa recebeu dois poços de uma mesma solução, somando um total de seis placas analisadas, sendo três de cada microrganismo.

Concluído o período de incubação foi realizada a verificação da presença de halos de inibição ao redor dos poços.

4.4. Efeito das soluções contendo NP-MP na resistência de união de um cimento resinoso autoadesivo à dentina, empregado na cimentação de pinos de fibra de vidro

Após a aprovação dos dentes humanos pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio de Janeiro (Número do parecer 2.236.710) (**ANEXO I**), foram selecionados 50 dentes pré-molares unirradiculares permanentes, recém extraídos, cedidos ao pesquisador por pacientes através do termo de consentimento livre e esclarecido e pelo Biobanco de Dentes Humanos FO-UERJ (BHD FO-UERJ).

4.4.1. Preparo das amostras

Os dentes foram limpos, raspados para remover tártaro e restos de tecidos, escovados e armazenados em frascos contendo água destilada, mantidos na geladeira até a realização dos testes.

As coroas foram removidas com auxílio de discos de carborundum cinza (Dentorium Products Co Inc, Farmingdale, NY, EUA) em baixa rotação, para padronização das raízes a um comprimento de 14 mm medidos com um paquímetro digital (MPI/E-101, Mytutoyo, Tóquio, Japão) (**Figura 14**). Foi verificada a patência do forame apical, realizada com uma lima Kerr #10 (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Suíça), bem como a exploração do trajeto do canal endodôntico, selecionando apenas canais retos e com patência. Para realização do tratamento endodôntico foi feita a odontometria (14 mm) e o comprimento de trabalho (CT=13 mm) foi confirmado introduzindo uma lima Kerr #10 (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Suíça) no interior do canal até que sua ponta atingisse visivelmente o forame apical e assim 1 mm foi subtraído deste comprimento. Em seguida as extremidades das raízes foram secas e seladas com cera utilidade (Lysandra, São Paulo, SP, Brasil) para simular as condições *in vivo* e permitir o fluxo e refluxo do irrigante durante a instrumentação.

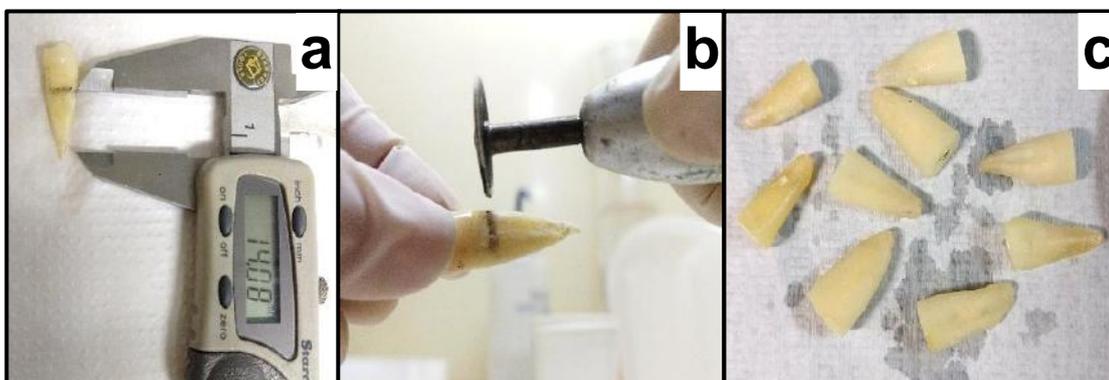


Figura 14. a) Padronização dos dentes; b) Remoção das coroas; c) Raízes cortadas com 14mm.

4.4.2. Descrição da técnica de instrumentação

O tratamento endodôntico foi realizado seguindo a metodologia Cérvico-Apical com instrumentação com pressão apical leve. Inicialmente foram utilizadas brocas Gates Glidden (#4, #3, #2) (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Suíça) nos terços cervical e médio

dos canais radiculares, para promover uma maior limpeza do conteúdo pulpar contido no interior destes canais radiculares. Um pré-alargamento foi realizado com as limas manuais Kerr #15 e #20 (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Suíça) para que as limas rotatórias agissem com maior eficiência no interior dos canais radiculares produzindo uma menor deformidade e menor risco de fratura dessas.

O sistema ProTaper® Universal (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Suíça) foi utilizado e consiste em seis instrumentos: dois instrumentos de modelagem (S1 e S2), um instrumento de modelagem auxiliar (SX) e três instrumentos de acabamento (F1, F2 e F3). A lima SX foi a primeira a ser usada com movimento de pincelagem para remover a dentina que reveste o acesso ao canal radicular. A utilização dos instrumentos rotatórios S1 e S2 foi realizada através da penetração em direção apical até obter resistência e então o instrumento foi recuado. A lima F1 foi introduzida mais profundamente até alcançar o comprimento de trabalho. Para finalizar, a lima de acabamento F2 foi selecionada para determinar o diâmetro final apical dos dentes também no comprimento de trabalho.

A patência foi realizada com uma lima Kerr #10 (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Suíça) no comprimento total da raiz depois de cada instrumento rotatório utilizado. Os instrumentos rotatórios trabalharam em torque 3,5 com velocidade de rotação de 350 rpm no motor X-Smart® Plus (Dentsply Tulsa Especialidades Odontológicas, Tulsa, OK, EUA).

Durante a instrumentação o NaOCl 5,25% (Mil Fórmulas, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) foi utilizado como substância química auxiliar principal, onde a raiz foi irrigada a cada troca de instrumento tendo cada raiz recebido um volume total de 10 mL. Terminada a instrumentação, para remover a *smear layer*, 3 mL de EDTA (Biodinâmica Química e Farmacêutica LTDA, Ibiporã, PR, Brasil) foi utilizado durante 3 minutos (1 mL por minuto) com auxílio da agitação manual com um cone de gutapercha. Para concluir a técnica de remoção da *smear layer*, os canais foram novamente irrigados com 1 mL de NaOCl 5,25% e por fim uma lavagem final foi realizada com 5mL de água destilada. Os canais foram secos com pontas de papel absorvente Cell Pack (Dentsply Sirona, Pirassununga, SP, Brasil) (**Figura 15**). Todas as soluções foram aplicadas com uma seringa hipodérmica descartável de 3 e 5 mL (BD Plastipak™, São Paulo, SP, Brasil) e Agulha de Irrigação Endo-Eze Tips (Ultradent, Jd. Panorama, Indaiatuba, SP, Brasil) (**Figura 16**).

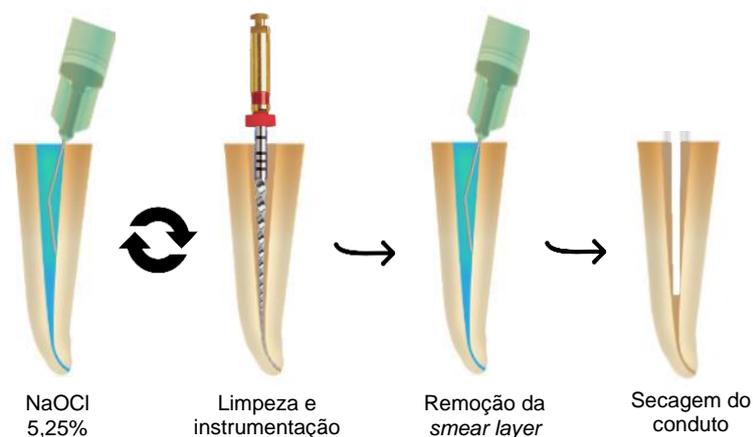


Figura 15. Representação esquemática do preparo químico e mecânico das raízes.

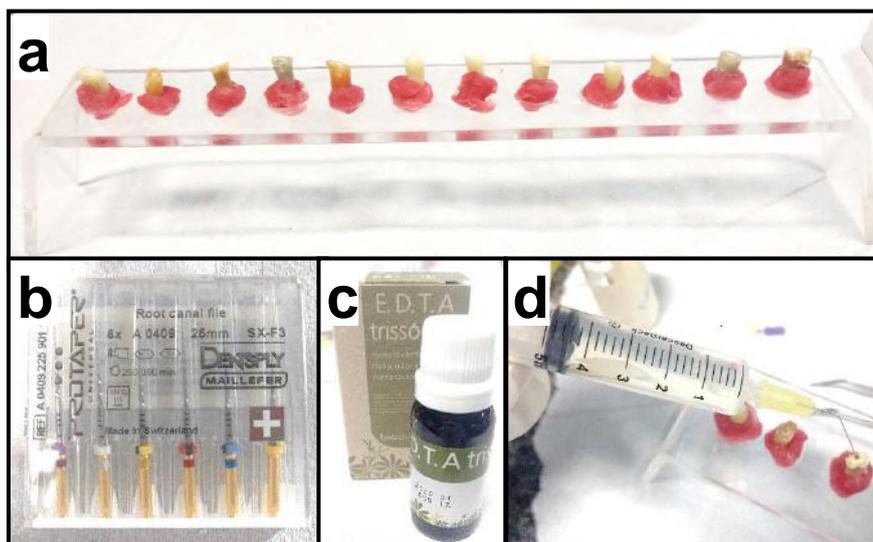


Figura 16. a) Raízes seladas com cera utilidade e posicionadas para o tratamento; b) Kit de limas ProTaper® Universal; c) EDTA; d) Aplicação da solução de hipoclorito de sódio com seringa hipodérmica descartável.

4.4.3. Descrição da técnica de obturação

Os dentes foram obturados usando a técnica da condensação lateral a frio com o cimento AH Plus (Dentsply Sirona, Pirassununga, SP, Brasil) e cones de guta-percha. O cone de guta-percha principal F2 (Dentsply Sirona, Pirassununga, SP, Brasil), correspondente ao diâmetro obtido com a instrumentação, foi descontaminado através da

imersão do mesmo durante 1 min em NaOCl 5,25% e foi seco com gaze estéril. Uma verificação tátil do “travamento” do cone foi realizada sentindo a resistência na tentativa de remover o cone com uma pinça, e o mesmo foi reservado limpo enquanto o cimento AH Plus foi manipulado segundo as especificações do fabricante. O cone principal F2 foi envolto por cimento e ancorado na raiz. Cones de guta-percha acessórios F (DiaDent® - Cheongju, Chungcheongbuk-do, Coreia do Sul) foram inseridos após a abertura do espaço pelo espaçador digital (**Figura 17**). Por fim os cones foram cortados com um condensador aquecido e uma condensação vertical com um calcador de Paiva frio foi realizada com a finalidade de preencher falhas e bolhas. As raízes tratadas endodônticamente foram armazenadas em estufa a 37°C e com umidade relativa por 7 dias.

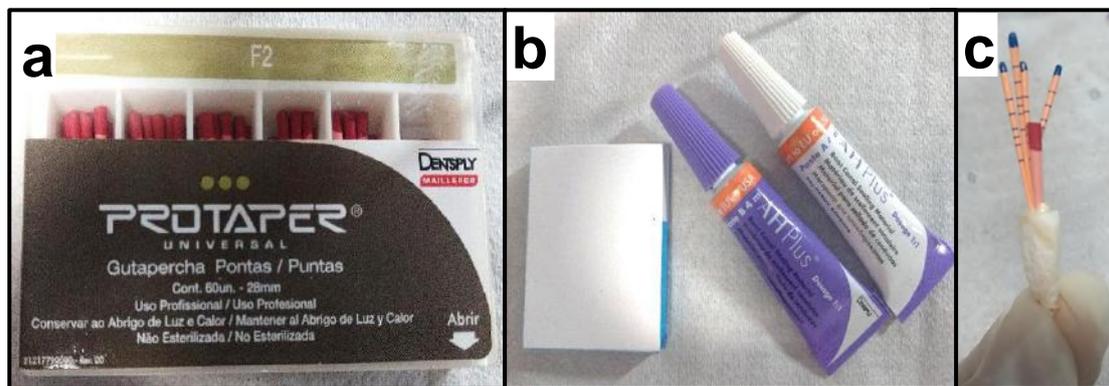


Figura 17. a) Cones de guta percha; b) Cimento endodôntico; c) Cimentação da raiz com cone principal e cones acessórios.

4.4.4. Descrição da técnica de cimentação do pino

Após 7 dias, as raízes foram preparadas para receberem um pino de fibra de vidro White Post DC® #2, (FGM, Joinville, SC, Brasil). A guta-percha foi removida com o intuito de criar um substrato de dentina livre de material obturador. Este procedimento foi realizado em baixa rotação, com brocas Gates Glidden #3 e #4 (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Suíça) em até 7 mm no interior do canal radicular e finalizado com a broca do próprio sistema do pino de fibra de vidro (White Post DC® #2, tronco cônica, 4 lâminas, parte ativa de 20 mm, diâmetro da ponta 1,05 mm, diâmetro cervical 2,1 mm. FGM, Joinville, SC, Brasil) até 10 mm no interior do canal radicular (**Figura 18**). Por fim, foi realizada uma limpeza com 5mL de água destilada no espaço para o pino.

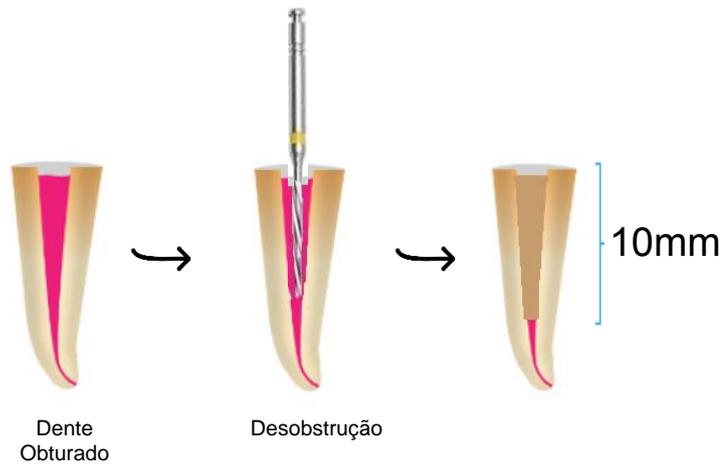


Figura 18. Representação esquemática do preparo para o pino com desobstrução parcial de 10 mm.

Divisão dos grupos experimentais

As raízes prontas para receberem o pino, foram divididas em 5 grupos sendo que em cada grupo uma solução irrigante diferente foi aplicada (n=10 em cada grupo), como visto na **Tabela 3**. As soluções de NP-MP foram preparadas com a ADA como descrito anteriormente na seção **4.3**. Foram utilizados 5 mL durante 5 minutos em cada raiz, sendo aplicado 1 mL a cada 1 min, com uma seringa descartável de 5 mL (BD Plastipak™, São Paulo, SP, Brasil) e Agulha descartável 0,45 x 23 mm (Terumo®, São Paulo, SP, Brasil).

Tabela 3. Divisão dos grupos em relação ao irrigante ativo.

Grupo	Solução irrigadora
GC	ADA
G1	Ascorbato de sódio 10%
G2	0,5% de NP-MP de AA em ADA
G3	1% de NP-MP de AA em ADA
G4	1,5% de NP-MP de AA em ADA

Cimentação do pino

Foram utilizados pinos de fibra de vidro White Post DC® #2, (FGM, Joinville, SC, Brasil). Características: Pino cônico, com dupla conicidade, diâmetro cervical de 1,8 mm, diâmetro apical 1,05 mm, comprimento total de 20 mm, translúcido, radiopaco, sendo que em 10 mm o diâmetro é 1,6 mm, que é comprimento ideal para o preparo para pino. O pino foi previamente higienizado com álcool 70% e depois uma fina camada de agente de união silano Prosil (FGM Produtos Odontológicos Ltda, Zona Ind Norte, Joinville, SC, Brasil) foi aplicada e evaporada por 5 segundos. Em seguida o adesivo Adper Single Bond 2 (3M ESPE, St. Paul, MN, USA) foi aplicado no pino, evaporado por 5 segundos e foto ativado por 10 segundos (**Figura 19**).



Figura 19. Representação esquemática do preparo do pino (Adaptado de 3M ESPE).

Os pinos foram cimentados com cimento resinoso dual autoadesivo RelyX U200® (3M ESPE, St. Paul, MN, USA), com o auxílio de uma espátula Suprafill Nº 1 que levou o cimento até o fundo do canal. Após o preenchimento do espaço intrarradicular com o cimento, uma fina camada de cimento foi aplicada sobre o pino de fibra vidro preparado, e este foi adaptado no interior do canal. O excesso do cimento foi removido e aguardou-se 6 min para que o cimento tomasse presa química, conforme recomendado pelo fabricante (**Figura 20**).



Figura 20. Representação esquemática da inserção e cimentação do pino após o preenchimento do espaço intrarradicular com o cimento (Adaptado de 3M ESPE).

4.4.5. Teste de cisalhamento por extrusão (*Push-out*)

Para avaliar a resistência de união entre o pino cimentado e área de adesão, as raízes foram fixadas com o auxílio de cera pegajosa (New Wax®, Technew, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) em placas de acrílico, e foram levadas para a máquina de corte IsoMet® (Buehler Ltd, Lake Bluff, IL, EUA) (**Figura 21-a-b**). Foram confeccionadas fatias com 1 mm de espessura, seccionadas transversalmente e sob refrigeração constante. Os 4 mm finais das raízes foram descartados e 6 fatias foram produzidas do terço apical até o terço cervical. Apesar de terem sido produzidas 2 fatias de cada terço, apenas uma fatia de cada terço, cervical, médio e apical do pino, foi selecionada para o teste.

As fatias foram armazenadas em estufa a 37°C e com umidade relativa por 24 h, e então, foram submetidas ao ensaio mecânico de cisalhamento por extrusão (*push-out*) na máquina de ensaios universal Instron 33R5567 (Norwood, Massachusetts, EUA) com velocidade de 0,5 mm/min e carga de 200 kgf, até que ocorresse uma queda brusca da força e/ou o deslocamento do pino. A força foi aplicada perpendicularmente ao longo eixo do dente, sobre o centro do pino, em sentido ápico-cervical com uma ponta metálica de 0,90 mm de diâmetro, adaptada à máquina (**Figura 21-c-d**).

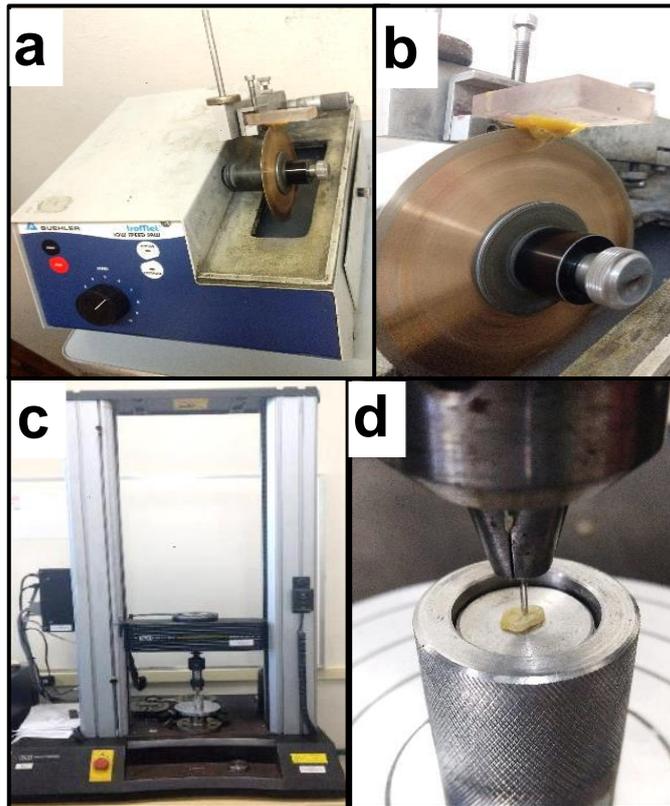


Figura 21. a) Máquina de corte IsoMet®; b) Confeção das fatias; c) Máquina de ensaios universal Instron; d) Ensaio de push-out.

Os valores de resistência de união foram obtidos em Newton (N) e depois foram transformados para Megapascal (MPa). Para transformação dos valores de N para MPa, a seguinte fórmula foi utilizada:

$$\text{Equação 2 - Área de adesão} = \pi(R + r) [(h^2 + (R-r)^2)^{0,5}]$$

Onde (h) representa a altura da fatia, (R) o maior raio da fatia e (r) o menor raio. Estes valores foram medidos com auxílio do paquímetro digital (MPI/E-101, Mytutoyo, Tóquio, Japão). Os valores de carga em N foram divididos pela área de adesão (mm²) transformando-se nos valores da resistência de união em Mpa.

$$\text{Equação 3 - Resistência de União (MPa)} = \frac{\text{Carga Máxima (N)}}{\text{Área de adesão (mm}^2\text{)}}$$

4.4.6. Análise do padrão de fratura por microscopia óptica

Após o teste de *push-out*, as amostras foram analisadas através de lupa estereoscópica (Nikon SMZ 800, Japão), para verificação do padrão de fratura.

O padrão de fratura foi classificado de acordo com os escores proposto por ELNAGHY *et al.* (2014) com modificações:

Tipo I: Adesivo cimento/pino: a fratura ocorrerá na adesão, predominantemente na interface cimento/pino.

Tipo II: Adesivo cimento/dentina: a fratura ocorrerá na adesão, predominantemente na interface cimento/dentina

Tipo III: Coesiva em pino: ocorrerá fratura no pino.

Tipo IV: Coesiva em cimento: ocorrerá falha dentro do cimento

Tipo V: Mista: Quando os tipos de falha forem combinados.

4.4.7. Análise estatística dos dados

Os valores da resistência de união foram avaliados estatisticamente através do programa SPSS. Foram aplicados testes de Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk. Como os dados não apresentaram normalidade, foram aplicados testes não paramétricos de Kruskal-Wallis. Foi considerado um nível de significância de 5%. A análise do padrão de fratura foi realizada descritivamente.

5. Resultados e discussão

5.1. Análise das nano e micropartículas produzidas

O microencapsulamento é uma técnica promissora para proteger o AA aumentando sua estabilidade a longo prazo (PIERUCCI *et al.*, 2006). Este trabalho objetivou encapsular o AA com a finalidade de atrasar sua oxidação, uma vez que os materiais de parede atuam como uma barreira física contra a transferência de oxigênio.

Esse efeito depende da natureza dos materiais de revestimento e das condições do processo. A seleção dos melhores materiais de revestimento é um passo crucial no microencapsulamento. Os materiais encapsulantes devem ter alta solubilidade, para que possam funcionar adequadamente e produzirem rendimentos satisfatórios (PEREIRA *et al.*, 2009). Características como tamanho de partícula, densidade, morfologia e estabilidade, são influenciados pelo tipo de agente encapsulante utilizado.

O estudo da aplicação da proteína vegetal por suas propriedades funcionais tem crescido devido ao “apelo verde” e ao consumo de produtos sustentáveis. O uso de proteínas de ervilha é interessante devido ao caráter não alergênico, boas propriedades funcionais biocompatíveis e de baixo custo (GHARSALLAOUI *et al.*, 2010; NESTERENKO *et al.*, 2013; PEREIRA *et al.*, 2009; PIERUCCI *et al.*, 2006). Trabalhos anteriores confirmaram que cápsulas formadas com matrizes proteicas extraídas da ervilha verde, possuem boas propriedades como material de revestimento (COSTA, 2009; COSTA, 2014; PEREIRA *et al.*, 2009; PIERUCCI *et al.*, 2006).

Neste trabalho foi utilizada como matriz encapsulante uma proteína da ervilha verde, a vicilina. O processo resultou na formação de um pó branco, seco, de fácil manuseio e armazenamento, porém, observou-se a formação de poucos aglomerados visíveis de partículas (**Figura 22**).

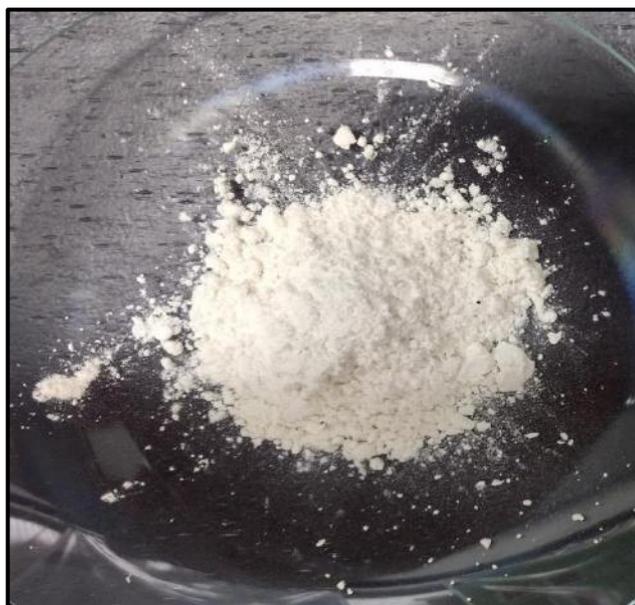


Figura 22. Pó de partículas produzido no spray dryer.

Na **Tabela 4.** É apresentado o rendimento das partículas com relação a massa inicial da solução alimentadora. A recuperação do pó pelo sistema alcançou 77 ± 2 % de rendimento na produção das NP-MP, valor obtido através da média dos rendimentos dos processos realizados.

Tabela 4. Calculo do rendimento de produção em %.

Formulação	Vicilina (g)	Ácido ascórbico (g)	Sólidos totais (%)	Rendimento (%)
Vicilina/AA (1:1)	2	2	4	77 ± 2

Durante o processo de *spray drying*, a aglomeração do pó formado, como consequência da humidade e instabilidade química é um problema comum durante o processo de encapsulamento e pode ocasionar baixos rendimentos (PEREIRA *et al.*, 2009). A recuperação do pó também é determinada pela interação entre a matriz e o núcleo. Diferentes rendimentos podem ser observados quando se consideram outros tipos de substâncias e materiais de parede (PALMA-RODRIGUEZ *et al.*, 2013).

A recuperação adequada observada neste estudo, pode estar relacionada à utilização da vicilina como material de parede pois, esta proteína possui propriedades funcionais como a capacidade de formar géis e filmes criando uma camada viscoelástica protetora e imobilizadora em torno das partículas. Além disso, ajustes nos parâmetros da taxa de solução atomizada e temperatura do processo, contribuíram para a produção de partículas menos aglomeradas mudando a natureza higroscópica dos materiais da parede melhorando o rendimento do processo (COSTA, 2014; RANGEL *et al.*, 2003).

Além do exposto, durante a secagem da solução de vicilina extraída, ocorre uma desnaturação parcial dessa proteína onde sua estrutura de enovelamento é alterada (COSTA, 2014). Quando a vicilina em pó é solubilizada e homogeneizada ao AA, o pH ácido desta solução promove mais instabilidade na conformação dessas proteínas, expondo cargas positivas de aminoácidos, permitindo melhores interações entre o AA e a vicilina (PIERUCCI *et al.*, 2006). Tais acontecimentos podem ter favorecido o encapsulamento de AA, diminuindo a perda dos produtos para o sistema, aumento o rendimento do processo.

PIERUCCI *et al.* (2006) produziu micropartículas com matrizes de concentrado proteico de ervilha comercial para proteção do AA, e obteve rendimentos superiores a 90%, no entanto, esse material é composto por outros componentes além das proteínas. COSTA (2014) obteve 48% de rendimento na microencapsulação de AA com vicilina da ervilha verde. Entretanto, nos estudos de PEREIRA *et al.* (2009) o rendimento foi de aproximadamente 69%. Os autores afirmaram que houve alguma influência causada pela presença de AA na solução alimentadora, uma vez que os valores de rendimento foram menores quando este foi adicionado.

Diante disso, foi possível concluir que a técnica de *spray drying* possuiu baixa quantidade de material residual no produto, sendo perdido apenas aproximadamente 23% do total que ficou retido no ciclone separador. O método empregado apresentou excelente eficiência de encapsulamento com um rendimento maior que 75%.

5.1.1. Morfologia e superfície das NP-MP (MEV e AFM)

A avaliação da morfologia foi inicialmente realizada através da MEV. Esta técnica fornece imagens de diversos tipos de contrastes, no entanto as imagens mais usuais são as provenientes da análise de elétrons secundários e de elétrons retroespalhados. Para este estudo foi utilizado o modo de elétrons secundários onde o sinal é de baixa energia e

fornece imagens da topografia de superfície. Foram realizadas fotomicrografias da vicilina e das NP-MP com ampliações de 2000x, 3000x, 5000x e 10000x. Não foi possível realizar maiores aumentos devido a degradação causada pelo feixe de elétrons.

A vicilina, observada na **Figura 23**, apresenta distribuições de tamanhos diferentes, com alto grau de esfericidade sendo uma superfície intensamente invaginada e lisa.

As fotomicrografias das NP-MP (**Figura 24 e Figura 25**) demonstraram que a morfologia destas partículas é similar à da vicilina, porém é observada uma menor invaginação devido a presença do AA em seu interior. A esfericidade das partículas é característica inerente ao processo de produção por *spray drying* e as invaginações ocorrem devido à natureza físico-química de matrizes proteicas. As NP-MP apresentaram uma superfície lisa, sem evidências do AA. Tais características também foram encontradas em outros estudos que produziram micropartículas da proteína da ervilha verde como matriz encapsulante de AA, por *spray drying* (COSTA, 2009; COSTA, 2014; DE SOUZA *et al.*, 2015; PEREIRA *et al.*, 2009; PIERUCCI *et al.*, 2006). Os autores afirmam que o AA havia sido totalmente encapsulado. Esta afirmação pôde ser verificada no presente estudo uma vez que os resultados obtidos nas análises de DRX e FTIR, abordadas nos próximos tópicos, confirmaram estes mesmos resultados demonstrados com a MEV.

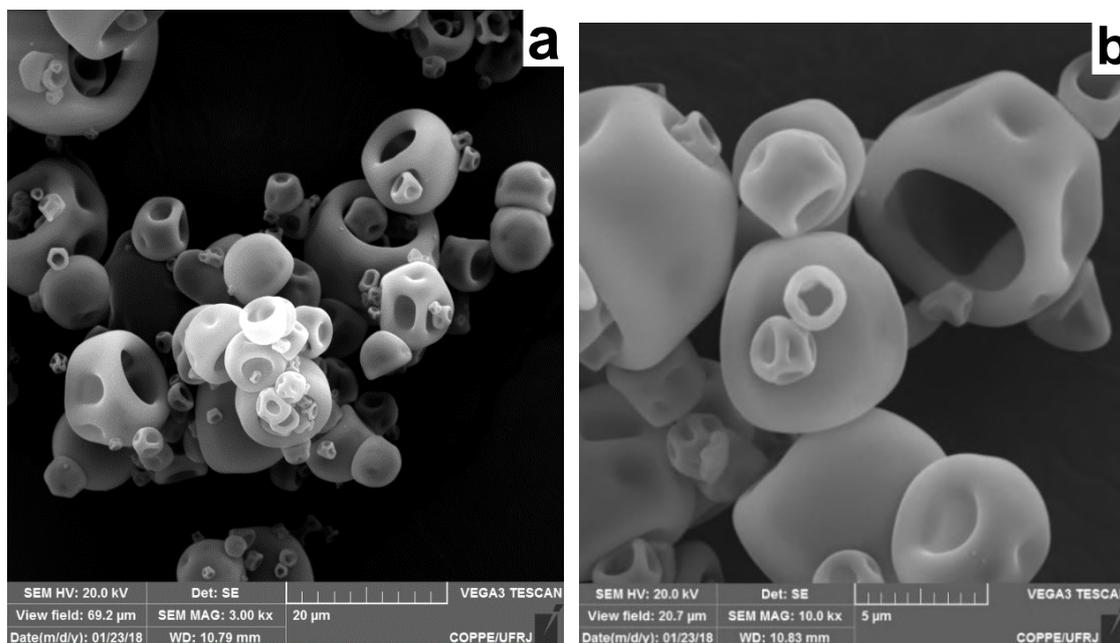


Figura 23. Fotomicrografias da vicilina. a) 3000x. b) 10000x.

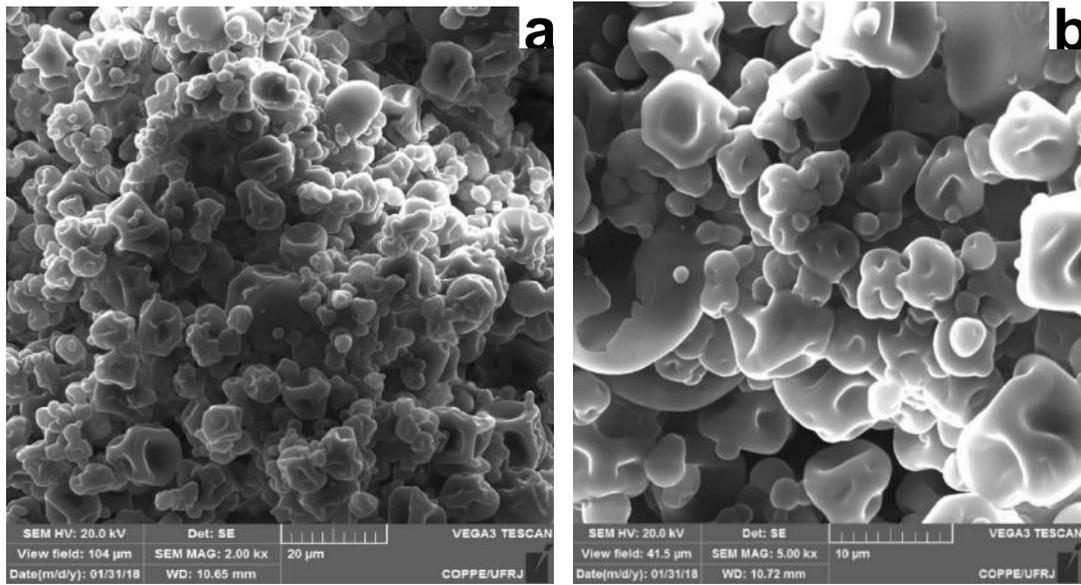


Figura 24. Fotomicrografias das NP-MP. a) 2000x. b)5000x

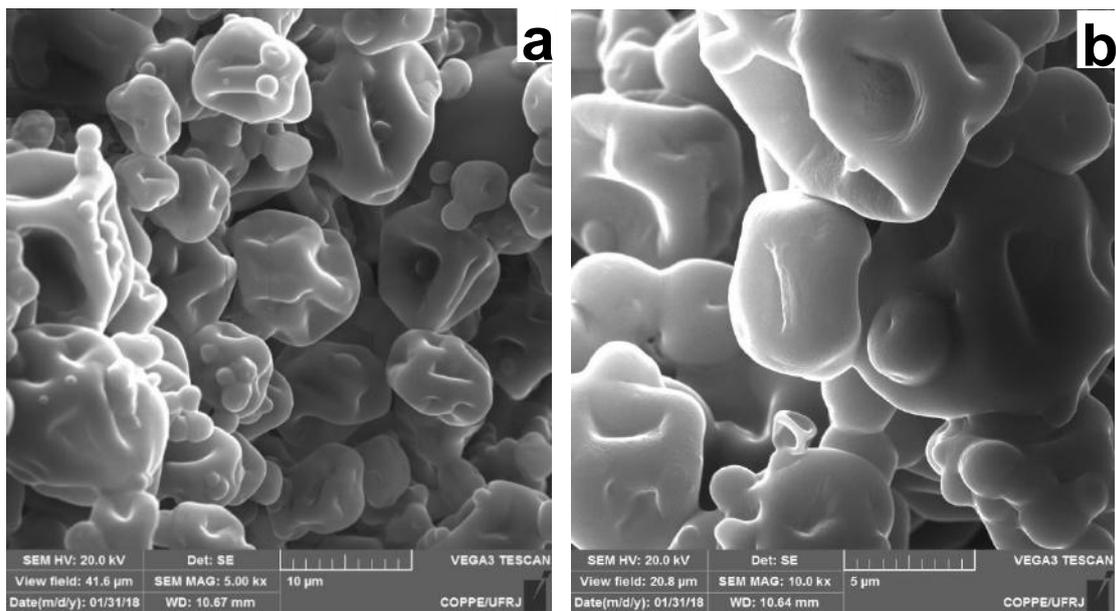


Figura 25. Fotomicrografias das NP-MP. a) 5000x. b) 10000x.

As NP-MP apresentaram tamanhos na microescala, com diâmetros aproximadamente 10 a 1 μm . A distribuição de tamanho e a morfologia podem exercer forte influência sobre a cinética de liberação e, conseqüentemente, na biodisponibilidade do material encapsulado.

Partículas menores, devido à sua grande superfície, frequentemente se aglomeram para formar partículas secundárias a fim de minimizar a área total e com isso baixar a tensão de interface do sistema. A aglomeração de partículas foi observada, no entanto, no presente estudo, apesar de as partículas formarem aglomerados, elas demonstraram uma boa taxa de liberação, como será mostrado nos testes de liberação *in vitro* (**seção 5.1.2**).

Existem diversos métodos disponíveis para caracterização de partículas, principalmente em termos de tamanho, mas nenhuma delas é totalmente satisfatória. Portanto, torna-se necessário a combinação de mais de um método. Com isso foram realizadas análises por microscopia de força atômica (AFM).

A Microscopia de Força Atômica consiste na varredura realizada por uma ponta de silício, montada em uma haste flexível, composta por átomos que interagem com os átomos que compõem a amostra. As forças repulsivas e atrativas defletem a haste sendo esta variação detectada pelo movimento do laser incidindo no fotodetector gerando imagens da topografia da amostra em alta resolução. As imagens topográficas realizadas neste estudo registraram áreas de varredura de 5 mm x 5 mm (**Figura 26-a**) e 10 mm x 10 mm (**Figura 27-a**). Um perfil de linha foi traçado para análise dos tamanhos das partículas (**Figura 26-b; Figura 28; Figura 29 e Figura 30**). Foram encontradas partículas esféricas, com tamanhos entre 50 e 2 nm. Estes resultados não estão de acordo com as dimensões das partículas medidas por MEV, o que pode ser justificado pela cobertura do ouro necessária para a realização da técnica de MEV, que impediria a visualização das partículas menores. A complementação da análise morfológica com o AFM permitiu a observação das partículas dispersas e confirmou a presença nanopartículas.

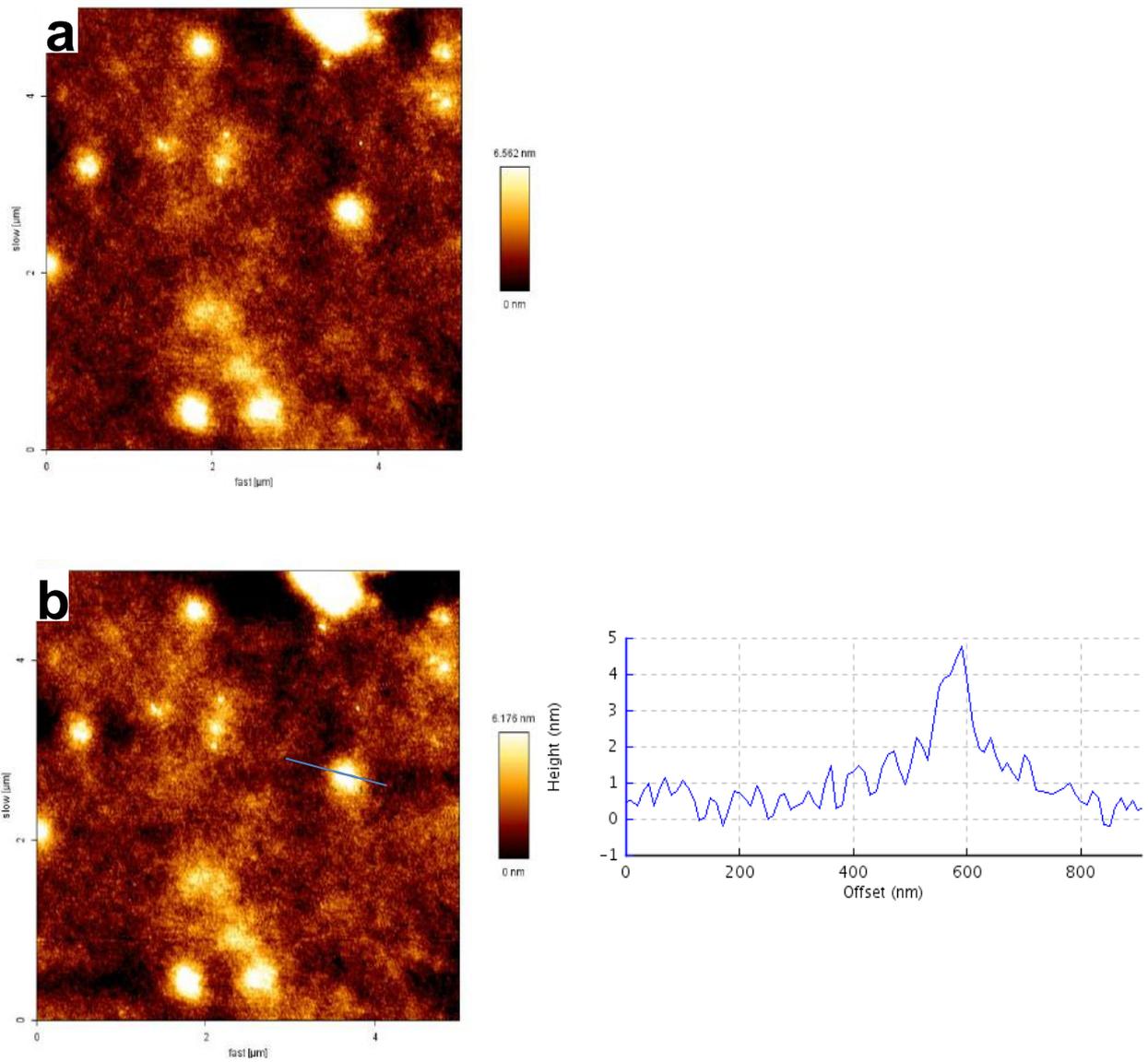


Figura 26. Height retrace. a) 5 nm x 5 nm. b) Perfil de linha traçado sobre uma partícula de aproximadamente 5 nm.

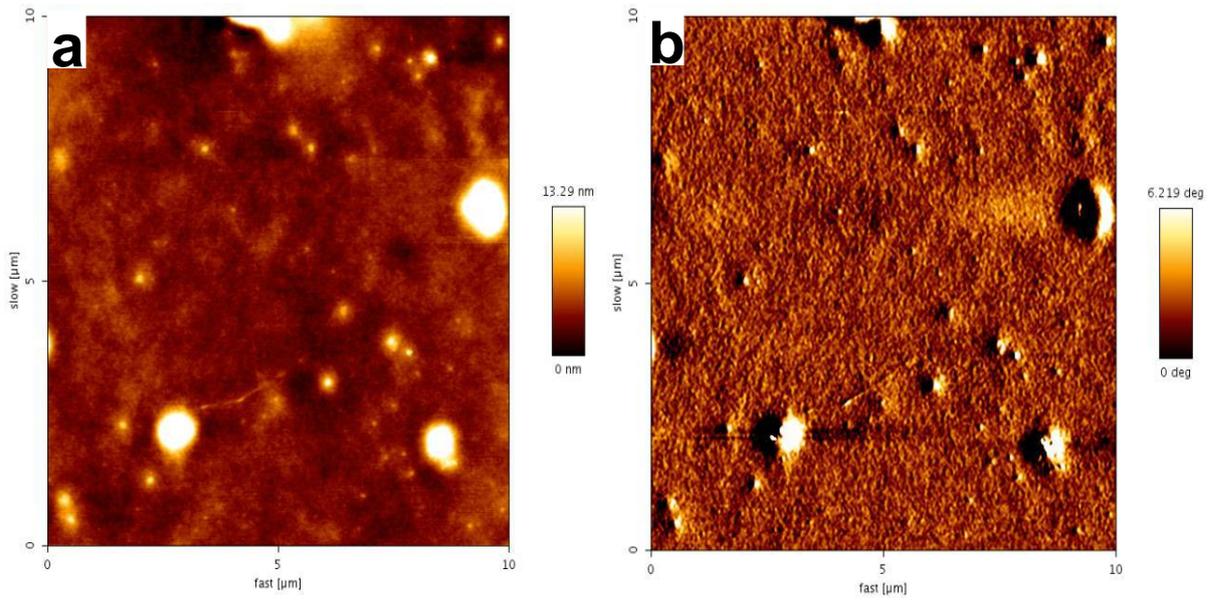


Figura 27. 10 nm x 10 nm. a) Height trace. b) Phase trace.

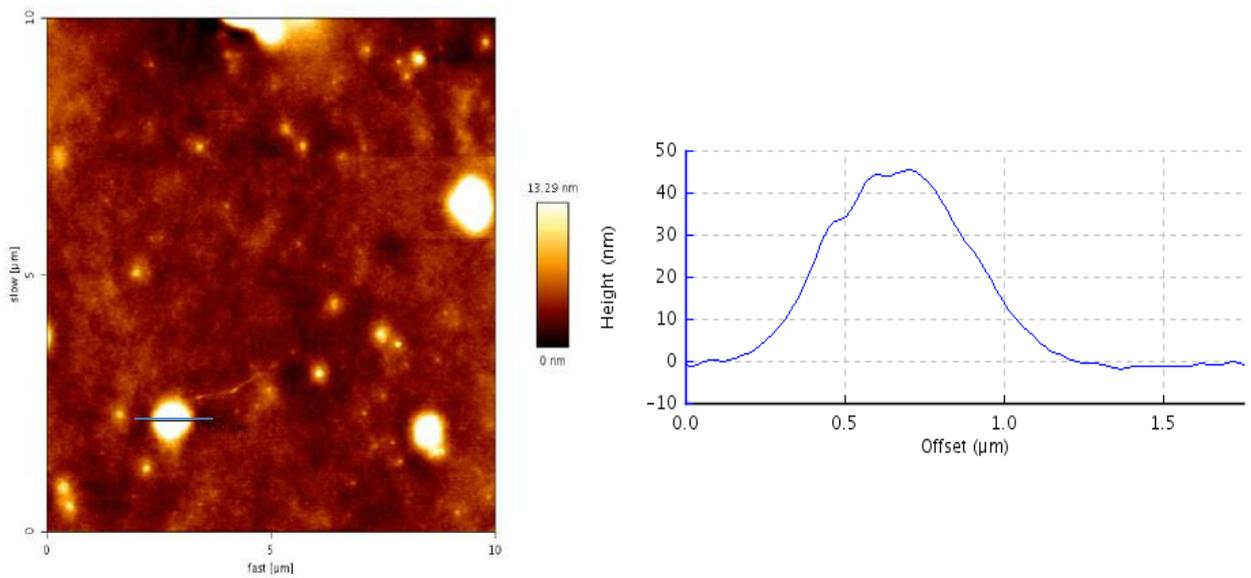


Figura 28. Height trace 10 nm x 10 nm. Perfil de linha traçado sobre uma partícula de aproximadamente 50 nm.

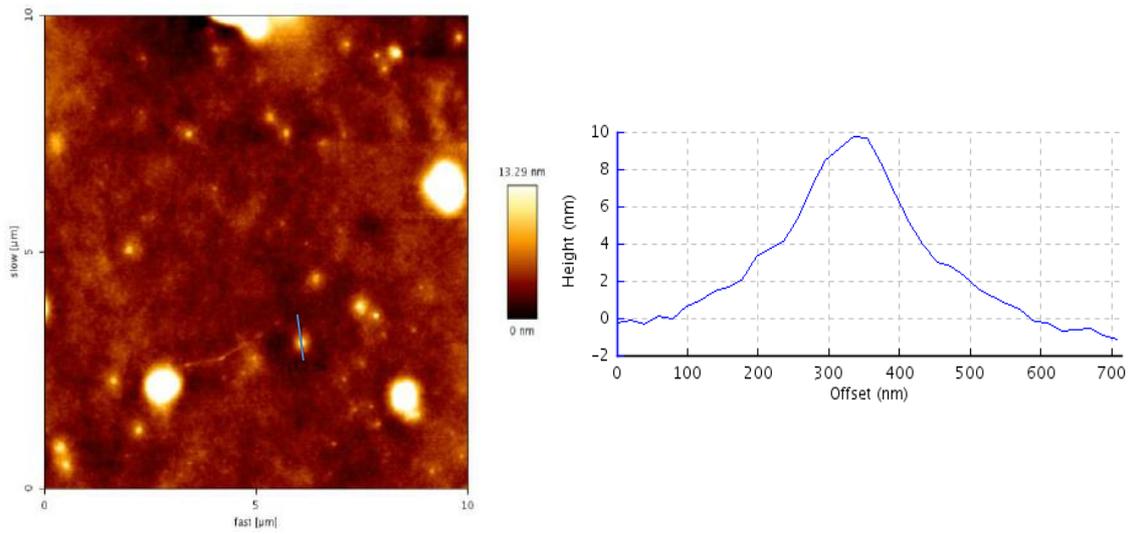


Figura 29. Height trace 10 nm x 10 nm. Perfil de linha traçado sobre uma partícula de aproximadamente 10 nm.

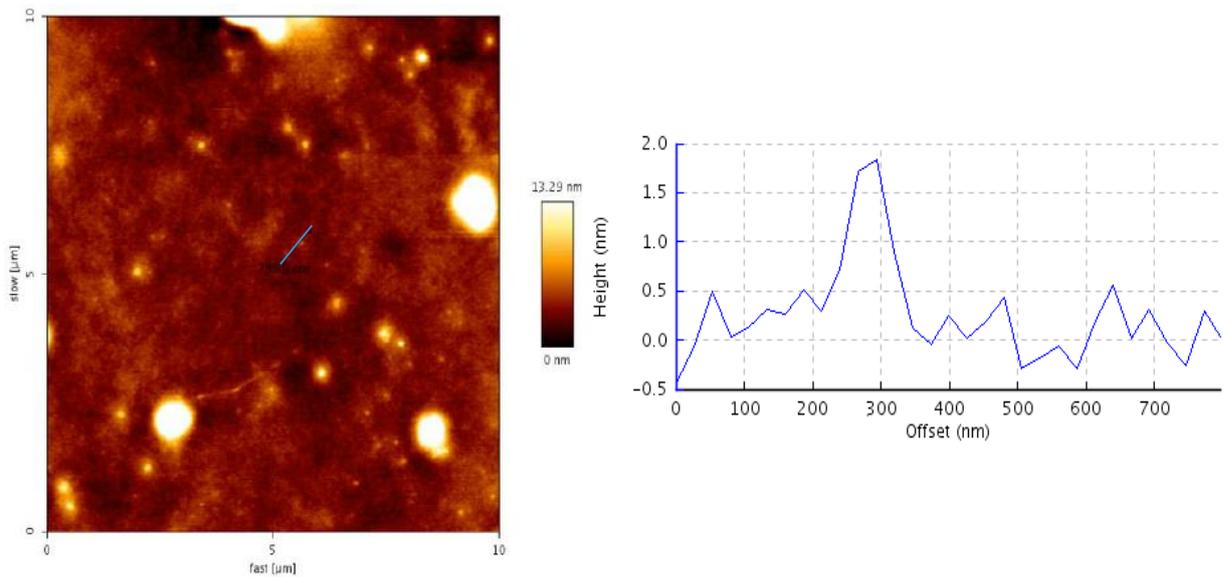


Figura 30. Height trace 10 nm x 10 nm. Perfil de linha traçado sobre uma partícula de aproximadamente 2 nm.

5.1.2. Difração de Raios-X (DRX)

A DRX é uma técnica na qual os raios-X monocromáticos são incididos sobre a amostra, interagindo com os átomos que estão dispostos na estrutura do material. Os padrões de DRX do AA, da vicilina e das NP-MP são exibidos na **Figura 31**.

O AA mostrou um difratograma típico da substância cristalina, com picos mais intensos entre 15° e 50°.

A vicilina resultou em um difratograma típico de substância amorfa com a presença de um pico largo, possuindo um ponto mais alto na região de 20° e intensidade por volta de 150 u.a. A vicilina não apresentou cristalinidade devido à sua desnaturação parcial, uma vez que a secagem de cristais com concomitante partida parcial da água e encolhimento da célula unitária invariavelmente levaram a defeitos cristalinos (COSTA, 2014).

Já o padrão de difração de raios-X das NP-MP, o difratograma demonstrou um comportamento semelhante ao da vicilina, padrão típico de substância amorfa. Nenhum pico semelhante ao AA foi encontrado no difratograma das NP-MP. Este mesmo resultado foi encontrado nos estudos de COSTA (2014) e DE SOUZA *et al.* (2015) que afirmaram que a ausência do perfil cristalino do AA no difratograma das partículas confirma a completa internalização do fármaco, possibilitando apenas a obtenção do padrão do material de parede.

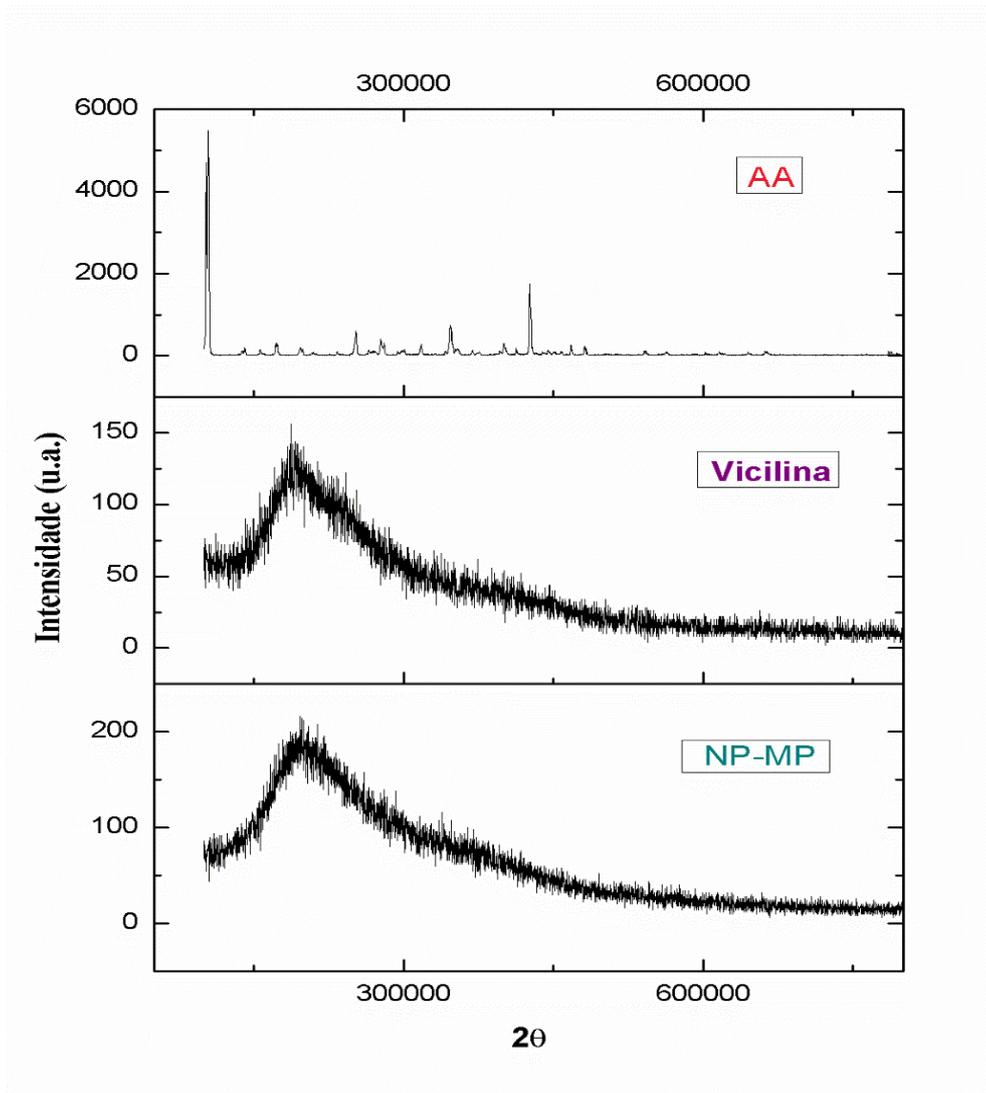


Figura 31. Difrátograma das amostras de AA, vicilina e NP-MP.

5.1.3. ATR/FTIR (ATR - Attenuated total reflectance / FTIR- Fourier transform infrared spectroscopy)

A espectroscopia de infravermelho é utilizada para realizar análises qualitativas e quantitativas de compostos orgânicos e inorgânicos. A espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) se baseia no fato de que cada ligação química vibra com frequências específicas, em níveis de energia bem definidos. A radiação no infravermelho atravessa a amostra a ser analisada, a radiação transmitida é comparada com aquela transmitida na ausência de amostra. O espectrômetro registra o resultado na

forma de uma banda de absorção. As leituras das bandas de absorção em função do comprimento de onda auxiliam na identificação dos constituintes do material.

Na **Figura 32** são apresentados os espectros das NP-MP, vicilina e do AA. Estes espectros foram cruzados na **Figura 33** para melhor observação das semelhanças entre os picos de cada amostra.

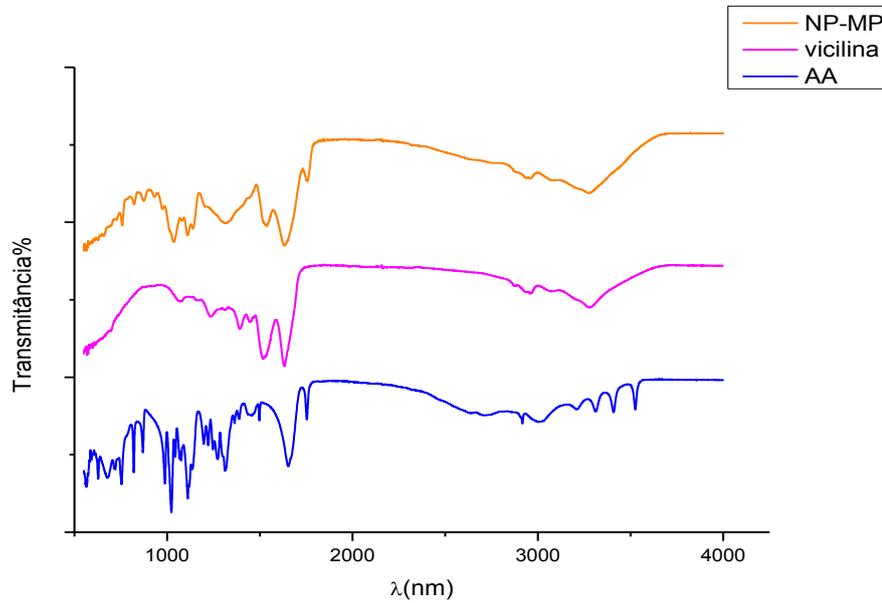


Figura 32. Espectros das amostras de NP-MP, vicilina e do AA, respectivamente.

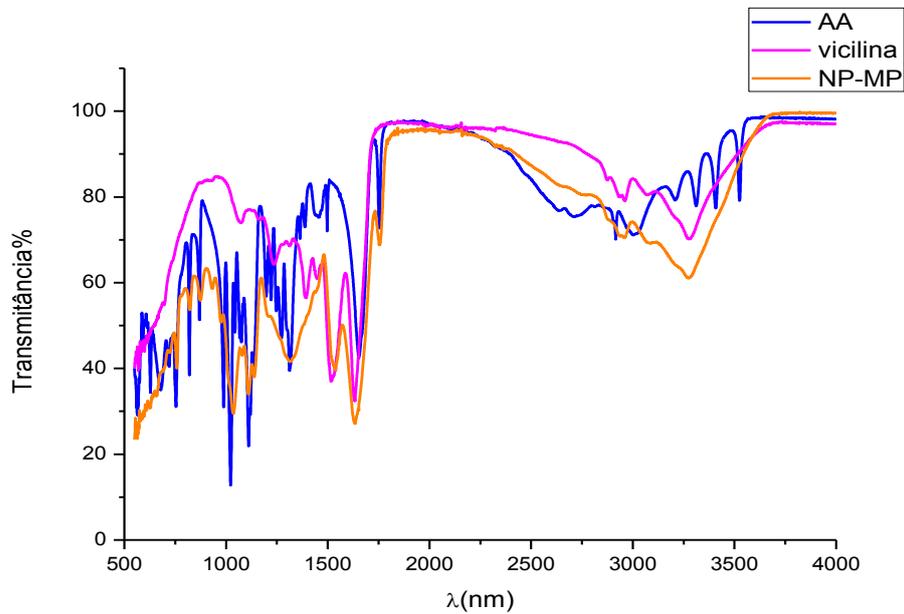


Figura 33. Sobreposição dos espectros de todas as amostras analisadas.

Na **Figura 34** a identificação das bandas e ligações químicas são apresentadas. As bandas em 3304 cm^{-1} e $2950,7\text{ cm}^{-1}$ estão presentes nas amostras de NP-MP e da vicilina, região caracterizada por um estiramento de OH.

Entre 1200 nm e 1650 nm , há bandas atribuídas ao estiramento C=C, sendo o pico 1665 cm^{-1} presente em todas as amostras.

A banda em $1765,87\text{ cm}^{-1}$ é atribuída às ligações C=O presente no espectro das NP-MP e no espectro do AA. Além desta banda, outras semelhantes ao AA aparecem em $1186,5\text{ cm}^{-1}$, $1060,3\text{ cm}^{-1}$, e entre 883 e $757,9\text{ cm}^{-1}$.

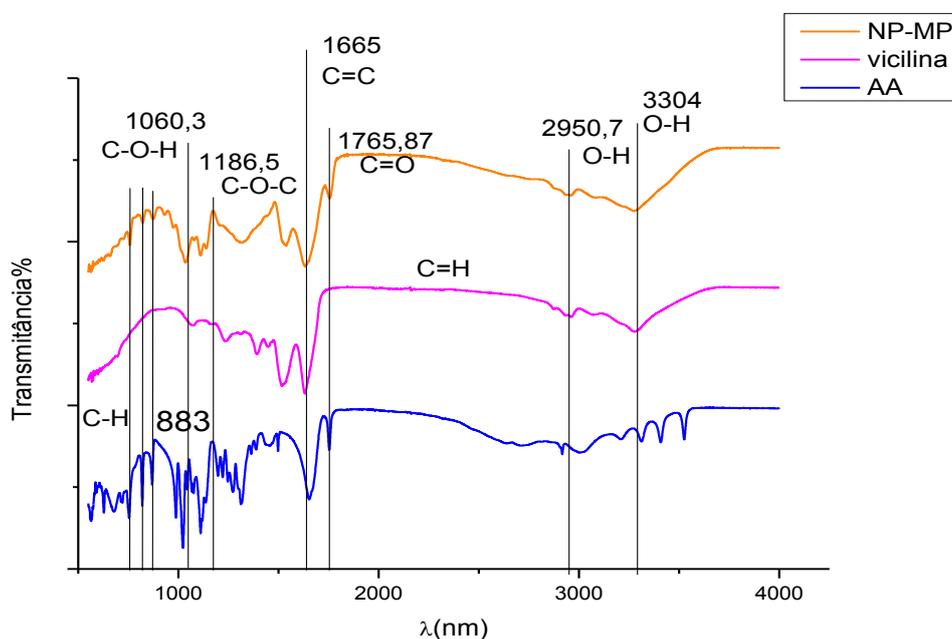


Figura 34. Identificação das bandas e suas respectivas ligações químicas.

Através desta análise demonstrou-se que o microencapsulamento por *spray drying* é um processo físico que não altera a estrutura química das substâncias de interesse, uma vez que não foram observadas ligações extras ou formação de novas entidades químicas. Também não ocorreram deslocamentos dos picos referidos ao material encapsulante. Tais afirmações indicam que não há ligação química forte entre o material da parede e o material do núcleo. É possível que a retenção do núcleo de AA nas partículas seja induzida por interações eletrostáticas entre as proteínas e o material encapsulado (PIERUCCI *et al.*, 2006).

A presença de picos do AA no espectro das NP-MP confirma a presença do fármaco nas amostras das NP-MP.

5.1.4. Análise da liberação das nano e micropartículas

O método da espectroscopia na região do espectro ultravioleta e visível, chamada espectroscopia UV-VIS, consiste em um processo que utiliza radiação eletromagnética com comprimentos de onda entre 190 nm e 1100 nm. Quando a radiação entra em contato com a matéria ocorrem transições eletrônicas ou excitação molecular. De acordo com a quantidade de radiação emitida é possível identificar a quantidade de radiação absorvida pelo conteúdo da solução experimental, e assim poder relacionar a absorbância com a concentração da substância que interagiu com a radiação e proporcionou a realização deste fenômeno. A absorbância é diretamente proporcional a concentração da espécie que absorve radiação segundo a Lei de Lambert-Beer. Para evitar possíveis desvios na lei de Beer as soluções foram diluídas para que a absorbância fosse menor que 1 u.a. No presente estudo esta técnica foi empregada para análise de liberação do AA.

Curva de Calibração do AA

Através da curva de calibração foi encontrado o comprimento de onda que o AA tem absorção, e este valor foi de aproximadamente 261 nm (**Figura 35**). A vicilina seca obtida pelo *spray drying*, que foi misturada a água destilada, não produziu nenhum pico na faixa de varredura realizada. Estes resultados confirmam que ambos materiais não absorvem no mesmo comprimento de onda, o que permite dizer que qualquer uma das substâncias de NP-MP que foram analisadas no UV-Vis, terão resultados referentes somente ao AA. Os gráficos da curva de calibração do AA são apresentados na **Figura 35** e na **Tabela 5** são apresentados os valores da absorbância de cada solução analisada.

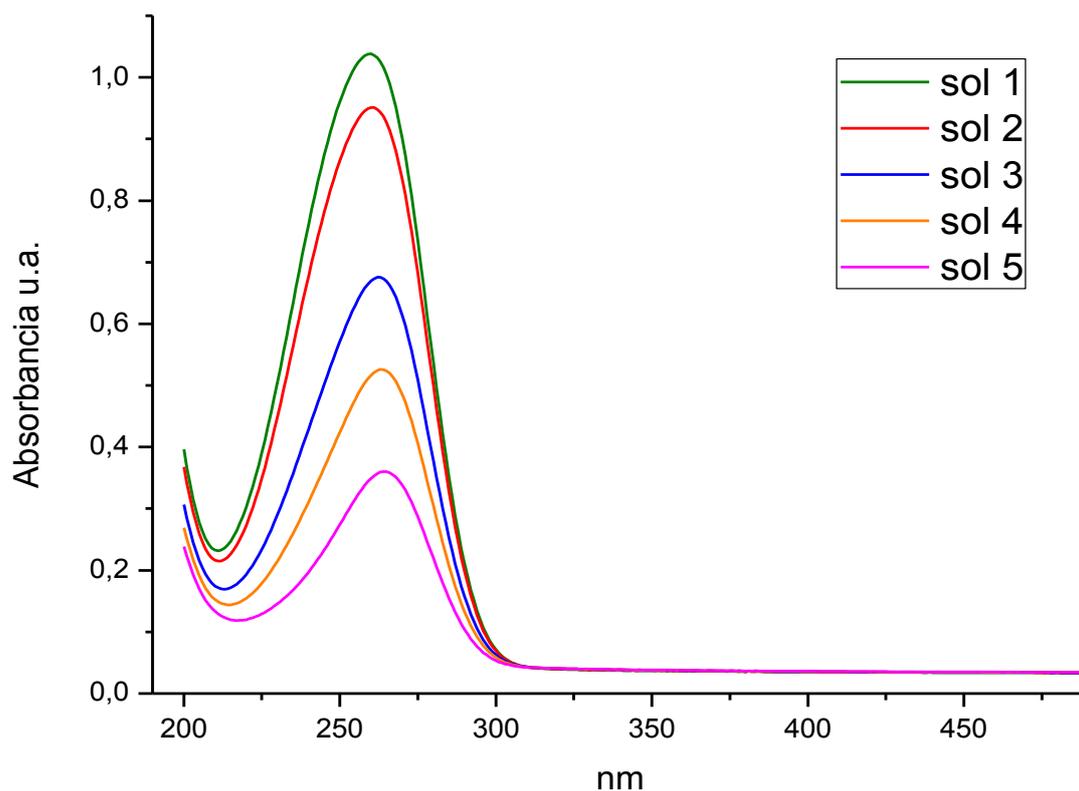


Figura 35. Curva de calibração do AA.

Tabela 5. Absorbâncias das soluções, obtidas através do gráfico da curva de calibração.

Solução (sol)	Concentração AA (ppm)	Absorbância (u.a.)
1	1,82	0,3586
2	3,33	0,524
3	4,62	0,6742
4	5,71	0,9500
5	6,66	1,0013

Pelo procedimento da curva de calibração foi possível determinar a equação de reta e o coeficiente de regressão linear da reta (R^2) (**Gráfico 1**). A incerteza da curva de calibração é determinada pelo R^2 , que foi 0,9703, considerado um valor elevado de confiabilidade por ser $R^2 > 9$ e mais próximo a 1, caracterizando uma boa relação das medidas efetivadas. O comportamento da curva foi considerado linear com leve desvios dos pontos, não sendo necessária a exclusão destes durante a análise. De modo geral, os erros foram pequenos, indicando a alta reprodutibilidade da análise. Tal característica mostra que esta curva pode ser utilizada para a determinação da concentração de soluções que estejam dentro dos limites mostrados na curva de calibração, com um bom nível de certeza e confiança.

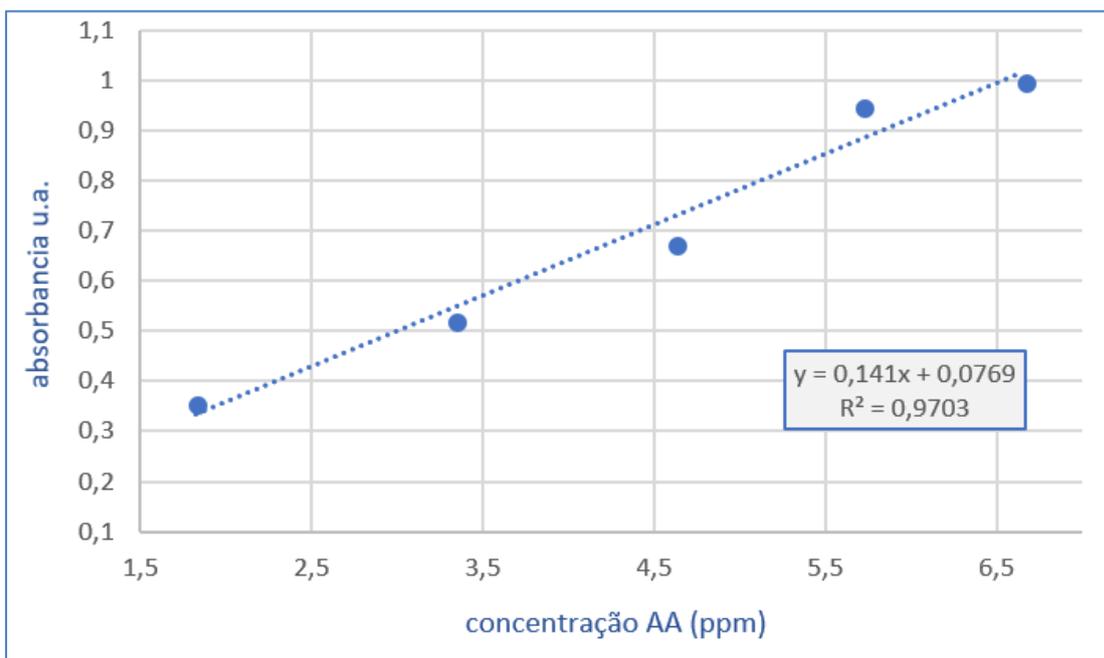


Gráfico 1. Curva de calibração de absorbância do AA em função da concentração em ppm.

A análise do perfil de liberação *in vitro* do AA encapsulado foi obtido através da leitura da absorbância em função do tempo, para uma solução com concentração de NP-MP de 0,5% (**Figura 36**).

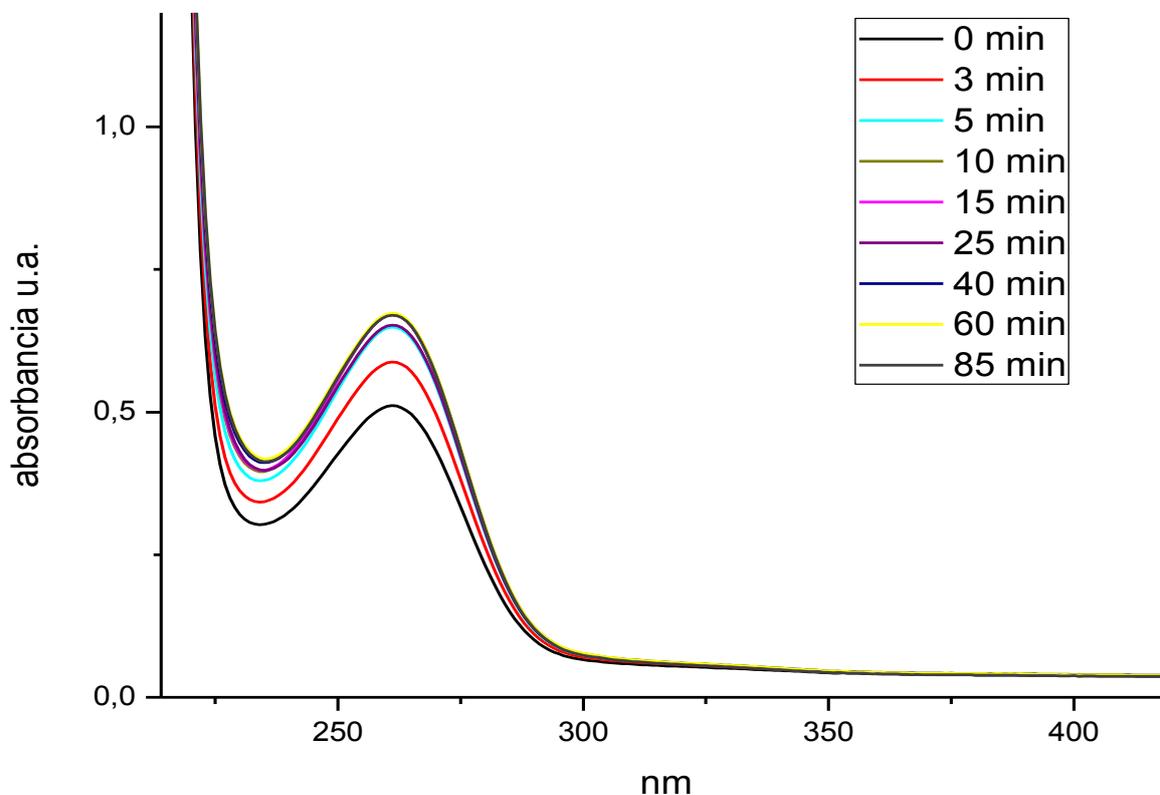


Figura 36. Curvas de liberação de AA com análises feitas em diferentes tempos. Amostra de concentração de 0,5% de NP-MP.

A absorvância foi crescente confirmando que há uma liberação gradual a cada análise realizada. Através da equação da reta com os valores conhecidos (**Gráfico 1**) e com as absorvâncias também conhecidas (**Figura 36**), pôde-se determinar a concentração x (equação da reta) (ppm) de AA liberado por tempo (min) (**Tabela 6**).

Tabela 6. Concentração de AA liberado por unidade de tempo das NP-MP 0,5%.

Tempo (min)	Absorbância (u.a.)	Concentração (ppm)
0	0,510	4,16
3	0,587	4,70
5	0,648	5,14
10	0,653	5,17
15	0,653	5,17
25	0,653	5,18
40	0,670	5,30
60	0,674	5,32
85	0,670	5,30

Uma relação de absorbância versus concentração (**Gráfico 2**) foi feita para a melhor visualização dos resultados. Foi obtida uma liberação rápida e gradual nos primeiros 5 min. Entre 5 e 25 min observa-se um platô na liberação onde não houve um aumento significativo nesse espaço tempo. Após os 25 min, há um aumento da liberação que logo em seguida, tende a diminuir após os 60 min. O ensaio mostrou que a liberação do AA em ADA foi efetiva.

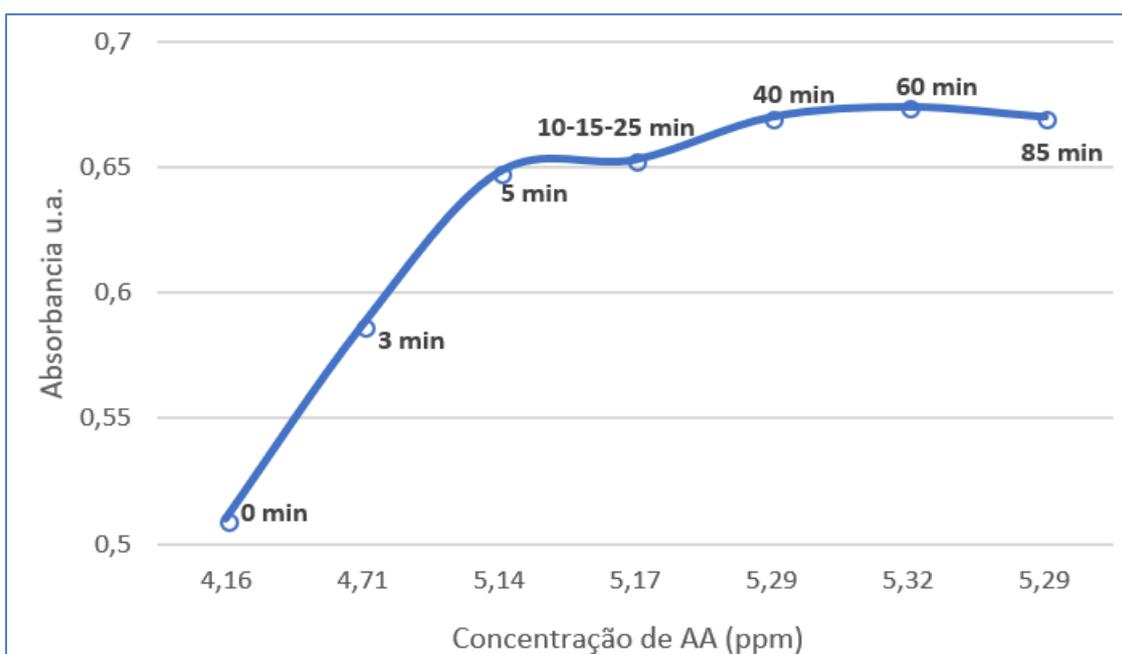


Gráfico 2. Concentração do AA nos tempos analisados. Amostra de 0,5% de NP-MP.

De acordo com a **Tabela 6**, a concentração de AA liberada nos 5 min iniciais foi de 5,1141 ppm que é aproximadamente 21% do total de partículas adicionadas na solução com 0,5% de concentração. Analisando o **Gráfico 2**, é possível afirmar que há uma liberação rápida nos primeiros 5 min de análise.

Os perfis de liberação dos fármacos dependem da natureza do sistema de liberação formado, ou seja, a matriz encapsulante e da morfologia destas (NESTERENKO *et al.*, 2013). Uma vez que a vicilina é solúvel em ampla faixa de pH, sendo praticamente insolúvel apenas entre pH 5-6 (PEREIRA *et al.*, 2009; PIERUCCI *et al.*, 2006; RANGEL *et al.*, 2003), a água destilada acidificada utilizada influenciou diretamente na velocidade de liberação, além da permanência das soluções teste em agitação constante.

Neste estudo é possível dizer que o mecanismo de liberação ocorre principalmente por erosão da matriz, uma vez que no início houve uma liberação rápida. A difusão do fármaco pela matriz resultaria em liberações mais lentas e sustentadas (SOPPIMATH *et al.*, 2001). Também é possível afirmar que a liberação inicial rápida não está atribuída à alguma fração do fármaco que está adsorvido na superfície ou dissolvida na matriz pois, as análises da morfologia das partículas não localizou a presença de AA nas superfícies das NP-MP ou misturadas a estas.

Muitos padrões podem ser controlados para que diferentes liberações de fármacos ocorram, sendo possível a produção de sistemas de liberação lenta ou uma liberação mais rápida. Este estudo produziu partículas capazes de liberar AA em menos de 10 min. Desta maneira o AA pode ser protegido e armazenado com estabilidade por 45 dias em temperatura ambiente (COSTA, 2014), e liberado no local de interesse.

5.2. Análise da atividade antimicrobiana

Na endodontia, a presença do *E. faecalis* no interior de canais tem sido associada as infecções endodônticas persistentes. (JR SIQUEIRA; RÔÇAS, 2008). Dentre as espécies de fungos relatadas a *C. albicans* é uma das mais encontradas, podendo estar isolada em culturas puras ou associadas a bactérias como *E. faecalis* (BAUMGARTNER; WATTS; XIA, 2000). Com isto, pesquisas para avaliar a efetividade da ação antimicrobiana de soluções intracanaís diante desses microrganismos constantemente são desenvolvidas.

A metodologia de difusão radial em ágar, em sistema de bicamada por poço foi realizado conforme atualizações do Clsi (2009), com adaptações, que se diferencia do

teste de disco pela realização de poços no meio de cultura, onde as soluções são depositadas.

No presente estudo avaliou-se a atividade antimicrobiana de soluções contendo NP-MP de AA. Para as placas com *E. faecalis* não foram encontrados halos para nenhuma amostra analisada (**Figura 37**), assim como para as placas inoculadas com *C. albicans* (**Figura 38**).



Figura 37. Placa de *E. faecalis*. Crescimento difuso e homogêneo da bactéria, sem a presença de halos de inibição.

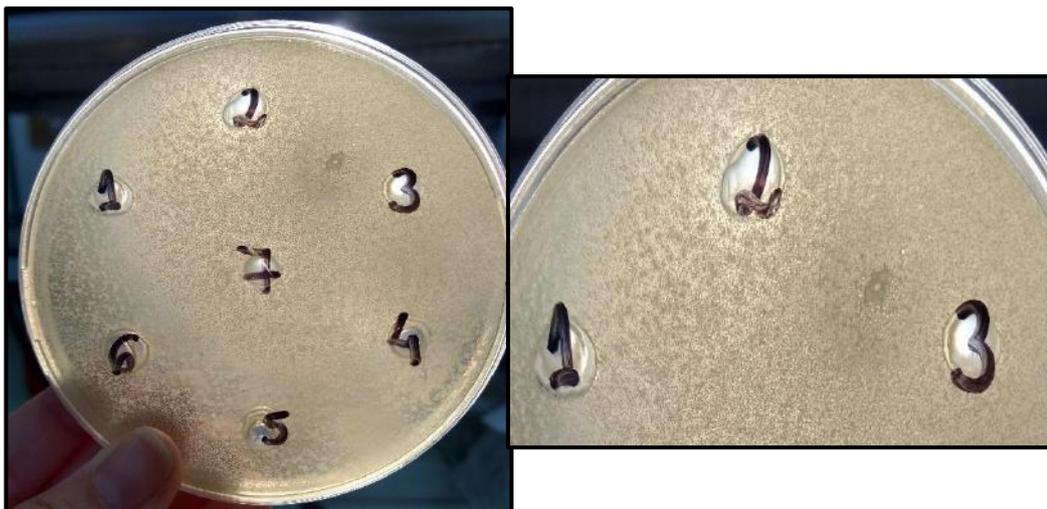


Figura 38. Placa de *C. albicans*. Crescimento difuso e homogêneo do fungo, sem a presença de halos de inibição.

A análise antimicrobiana realizada neste trabalho se justifica devido à ausência de dados avaliando a vicilina, material de encapsulamento utilizado no presente estudo, e o efeito do AA sobre *C. Albicans*. Em relação a atividade antimicrobiana frente ao *E. Faecalis*, estudos prévios mostram que o AA não apresenta tal atividade para esse microrganismo. Ainda, em um estudo foi relatado que este microrganismo tem a capacidade de usar o ascorbato como fonte de energia e replicação (MEHMETI; SOLHEIM; NES, 2013). Alguns estudos afirmam que a presença de certos aminoácidos no meio de cultura, permitem a utilização aeróbia de L-ascorbato pelas células de *Escherichia coli* (YEW; GERLT, 2002; ZHANG *et al.*, 2003). O ácido ascórbico também foi relatado na literatura como sendo um regulador no transcriptoma de *Streptococcus pneumoniae*, o que pode aumentar a patogenicidade desse microrganismo (AFZAL; SHAFEEQ; KUIPERS, 2015). Já em um estudo que objetivou avaliar as propriedades biológicas e físico-químicas do ácido ascórbico etilado comparado ao ácido ascórbico, encontraram atividade antimicrobiana do AA etilado contra *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis* e agia mais fortemente contra *C. albicans* do que AA (GOLONKA *et al.*, 2017).

Somente um estudo que relatou a atividade antimicrobiana de ascorbato contra bactérias orais foi encontrado. Os resultados mostraram uma atividade bactericida contra *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *Porphyromonas gingivalis*, *Candida albicans* e *Enterococcus faecalis*. A concentração inibitória mínima estimada para o ascorbato foi de 10 mg / ml. A 20 mg / ml, o ascorbato foi capaz de inibir a formação de biofilme oral quando adicionado no momento da inoculação. Os autores concluíram que o ascorbato é uma alternativa terapêutica natural para prevenir doenças bucais (ISELA; SERGIO; JOSÉ, 2013).

Durante toda a análise não foi verificada contaminação do meio, confirmando que apesar de se tratar de produtos não estéreis, as NP-MP produzidas por *spray drying* não exibem contaminação. Como o produto do *spray drying* possui baixo teor de umidade, e é conduzido a altas temperaturas, este aspecto pode ter garantido além da estabilidade físico-química a sua sanitização. A limpeza e higienização foram fundamentais nos processos produtivos. Mais estudos são necessários para melhor entender os mecanismos envolvidos com a atividade antimicrobiana dessas partículas.

5.3. Análise do teste de push-out

Diferentes métodos são propostos para avaliar a força de adesão entre pinos de fibra de vidro endodônticos e a estrutura dentária. No presente estudo, o teste de push-out foi escolhido por simular melhor as condições clínicas uma vez que, forças de cisalhamento são aplicadas em todas as interfaces (dentina/cimento/pino) (DA CUNHA *et al.*, 2010).

A força de adesão de materiais adesivos pode ser comprometida pelo uso da solução de NaOCl durante o tratamento endodôntico (DA CUNHA *et al.*, 2010; FARINA *et al.*, 2011; KUL *et al.*, 2016). O NaOCl altera os componentes orgânicos da dentina, especialmente o colágeno. Ele se decompõe em cloreto de sódio e oxigênio, sendo este oxigênio livre relacionado ao efeito negativo na polimerização do sistema adesivo impedindo a correta penetração do mesmo resultando em uma polimerização incompleta (ABUHAIMED; NEEL, 2017).

Soluções de ácido ascórbico e o seu sal, ascorbato de sódio, vêm sendo utilizadas na Odontologia com o objetivo de reduzir os componentes oxidados das estruturas dentinárias pelo oxigênio residual do hipoclorito de sódio e restabelecer os valores de resistência de união da dentina (CELIK *et al.*, 2010; EBRAHIMI-CHAHAROM *et al.*, 2015; FURUSE *et al.*, 2014; GÖNÜLOL; KALYONCUOĞLU; ERTAŞ, 2015; KHOROUSHI; KACHUEI, 2014; MOREIRA *et al.*, 2011; PRASANSUTTIPORN *et al.*, 2011; RABI; CAI; VADERHOBLI, 2017; REDDY *et al.*, 2018; STEVENS, 2014; WESTON *et al.*, 2007)

Essas soluções podem apresentar instabilidade química, pequena vida útil e dificuldade de armazenamento (COSTA, 2014; PALMA-RODRIGUEZ *et al.*, 2013; PEREIRA *et al.*, 2009; PIERUCCI *et al.*, 2006). A fim de sanar tais deficiências, no presente estudo foram desenvolvidas NP-MP para aumentar a estabilidade do AA. Como diferentes materiais são comercializados na odontologia na forma de pó, e tais partículas são produzidas como pó, no presente estudo optou-se por solubilizar as NP-MP no momento do uso, com solução de água destilada acidificada, para que o fármaco fosse liberado pela mudança do pH e pudesse se tornar ativo somente no momento da aplicação, evitando assim a oxidação do mesmo.

No presente estudo a resistência de união de pinos de fibra de vidro cimentados com cimento autoadesivo na dentina foi avaliada. Os valores de resistência de união obtidos com o teste de push-out são apresentados na **Tabela 7**. O grupo controle, com ADA, e o grupo de AS 10% tiveram resultados estatisticamente superiores ao emprego dos irrigantes contendo NP-MP ($P < 0,05$). Em relação ao padrão de fratura observado, a

Tabela 8 mostra em porcentagens os tipos de fraturas que mais foram obtidos em cada grupo.

Tabela 7. Valores da análise estatística da resistência de união de todos os grupos independente do terço analisado.

Grupo	Mediana	Mínimo	Máximo
1 - ADA	8,6750 ^a	2,61	17,86
2 - AS 10%	9,2250 ^a	2,32	14,73
3 - 0,5% NP-MP	3,2150 ^b	0,69	18,41
4 - 1% NP-MP	3,9100 ^b	0,86	11,62
5 - 1,5% NP-MP	2,4100 ^b	0,30	21,69

Tabela 8. Padrão de fratura expresso em porcentagem.

Grupo	Tipo I	Tipo II	Tipo III	Tipo IV	Tipo V
1 - ADA	23%	57%	3%	10%	7%
2 - AS 10%	23%	37%	3%	7%	30%
3 - 0,5% NP-MP	30%	54%	7%	3%	6%
4 - 1% NP-MP	27%	50%	7%	6%	10%
5 - 1,5% NP-MP	30%	50%	7%	6%	7%

É importante ressaltar que no grupo controle foi utilizada água destilada acidificada (pH 2), a solução base utilizada para a preparação das soluções de NP-MP. Os valores da resistência de união encontrados nos grupos com NP-MP foram inferiores aos valores do grupo controle o que torna evidente que a presença das partículas provocou um efeito

oposto ao desejado. Possivelmente, a água destilada acidificada pura possa ter removido uma porção da *smear layer* e ter auxiliado nos processos de adesão permitindo uma adesão mais resistente. Os valores reduzidos de resistência de união nos grupos de NP-MP pode estar associada a formação de uma camada de detritos constituída por restos da matriz de vicilina ao longo do canal ou ainda, devido ao tempo de utilização da solução pós agitação, que pode não ter sido suficiente para a total liberação e partículas não solubilizadas estarem presentes na solução, sedimentando-se sobre a superfície dentinária. Com a formação de uma possível camada superficial na parede dentinária, semelhante a uma *smear layer*, a adesão foi dificultada.

Além disso, um outro fator que pode justificar o presente resultado é que o tempo para liberação pode não ter sido suficiente para atingir uma concentração que apresente atividade antioxidante eficaz. Estes resultados estimulam a necessidade de estudos posteriores com maior investigação do papel das partículas na falha da adesão.

A análise do padrão de fratura mostrou que a maioria das falhas em todos os grupos foram do tipo II, adesivas, na interface cimento-dentina. Para as NP-MP, este resultado está de acordo com a justificativa exposta anteriormente quanto a impossibilidade de realizar uma adesão correta. A formação de uma camada de detritos de vicilina formada na superfície da dentina pode estar relacionada com a maior porcentagem de fraturas nessa interface uma vez que a adesão foi prejudicada.

A principal vantagem defendida para este sistema é a preservação do fármaco com estabilidade através do encapsulamento. No presente estudo optou-se pela utilização de uma solução produzida pelo cirurgião-dentista, a partir das partículas desenvolvidas, no momento de uso. No entanto, diante dos resultados obtidos, concluiu-se que a dissociação das partículas em água acidificada, seguida pelo uso imediato, por 5 minutos, não foi eficaz. Assim, são necessários ajustes no protocolo de utilização. Novos estudos são necessários para avaliar a estabilidade de soluções contendo NP-MP de AA, como aquelas de AA e AS, comercializadas atualmente, e o efeito do emprego dessas soluções como agente antioxidante, na cimentação de pinos de fibra de vidro à dentina.

6. Conclusão

Nano e micropartículas de ácido ascórbico foram produzidas com sucesso através da técnica de *spray drying*. Estas partículas apresentaram excelente estrutura e morfologia de superfície resultando em um pó fino e de fácil armazenamento.

O encapsulamento do ácido ascórbico foi confirmado e não foram encontrados traços da presença do fármaco na parte externa das partículas. Esse processo assume um papel importante na estabilidade química do fármaco.

Também foi possível avaliar e confirmar a possibilidade de liberação do fármaco contido no interior das partículas, formando um excelente sistema de proteção e liberação.

Não foram encontradas atividades antimicrobiana nas nano e micropartículas de AA e na vicilina desidratada.

Quanto a resistência de união, os resultados das soluções de nano e micropartículas nas concentrações testadas produziram menores resultados do que as soluções o grupo controle composto somente de água destilada acidificada e o grupo de solução de ascorbato de sódio 10%. A liberação de ácido ascórbico não alcançou uma concentração necessária para a realização da reação antioxidante efetiva. Novos estudos são necessários para determinar a concentração atingida e a ideal.

Portanto, mesmo havendo dificuldades e divergências reportadas na literatura para realização da extração da vicilina e processos que antecedem a passagem da solução alimentadora pelo *spray drying*, foi possível obter um resultado eficiente na produção de nano e micropartículas de ácido ascórbico.

Desta forma, o trabalho proporcionou uma elaboração de um nanomaterial que necessita de mais estudos quanto a aplicação odontológica a nível laboratorial, uma vez que não há na literatura estudos que tenham testados tais materiais, sendo pioneiro na área da Odontologia.

7. Sugestões para trabalhos futuros

- Desenvolver mais soluções com outras concentrações de sólidos totais para aumentar a quantidade de AA liberado;
- Acompanhar e analisar as amostras durante o tempo de envelhecimento;
- Realizar testes e análises que possam confirmar a quantidade de AA liberado com relação ao AA encapsulado;
- Estudar as características da parede dentinária após aplicação das partículas;
- Estudar outros meios de dissolução das partículas que possam ser utilizados nos dentes;
- Deve-se salientar que este estudo avaliou a força de adesão a curto prazo. Considerando o papel protetor dos antioxidantes nas fibras de colágeno com efeito sobre a durabilidade da interface adesiva, é importante ser avaliada essa força de adesão a longo prazo.

8. Referências Bibliográficas

ABBASZADEGAN, A. et al. Positively charged imidazolium-based ionic liquid-protected silver nanoparticles: A promising disinfectant in root canal treatment. **International Endodontic Journal**, v. 48, n. 8, p. 790–800, 2015.

ABRAMOVITZ, I. et al. In vitro biocompatibility of endodontic sealers incorporating antibacterial nanoparticles. **Journal of Nanomaterials**, v. 2012, 2012.

ABUHAIMED, T. S.; NEEL, E. A. A. Sodium Hypochlorite Irrigation and Its Effect on Bond Strength to Dentin. **BioMed Research International**, v. 2017, 2017.

AFZAL, M.; SHAFEEQ, S.; KUIPERS, O. P. Ascorbic acid-dependent gene expression in *Streptococcus pneumoniae* and the activator function of the transcriptional regulator UlaR2. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. FEB, p. 1–9, 2015.

ANVISA. Farmacopeia Brasileira. v. 1, 2010.

ASMUSSEN, E.; PEUTZFELDT, A.; HEITMANN, T. Stiffness, elastic limit, and strength of newer types of endodontic posts. **Journal of Dentistry**, v. 27, n. 4, p. 275–278, 1999.

BALDEA, B. et al. Push-out bond strength and SEM analysis of two self-adhesive resin cements: An in vitro study. **Journal of Dental Sciences**, v. 8, n. 3, p. 296–305, 2013.

BARROS, J. et al. Antibacterial, physicochemical and mechanical properties of endodontic sealers containing quaternary ammonium polyethylenimine nanoparticles. **Journal of Endodontics**, v. 40, n. 8, p. 1149–1155, 2014a.

BARROS, J. et al. Response of human osteoblastic and osteoclastic cells to AH plus and pulp canal sealer containing quaternary ammonium polyethylenimine nanoparticles. **Journal of Endodontics**, v. 40, n. 8, p. 1149–1155, 2014b.

BATEMAN, G.; RICKETTS, D. N. J.; SAUNDERS, W. P. Fibre-based post systems: A review. **British Dental Journal**, v. 195, n. 1, p. 43–48, 2003.

BAUMGARTNER, J. C.; WATTS, C. M.; XIA, T. Occurrence of *Candida albicans* in Infections of Endodontic Origin. **Journal of Endodontics**, v. 26, n. 12, p. 695–698,

2000.

BO, D. et al. Effect of Nanosilver Gel, Chlorhexidine Gluconate, and Camphorated Phenol on *Enterococcus faecalis* Biofilm. **International Scholarly Research Notices**, v. 2014, p. 1–5, 2014.

BOUILLAGUET, S. et al. Initial In Vitro Biological Response to Contemporary Endodontic Sealers. **Journal of Endodontics**, v. 32, n. 10, p. 989–992, 2006.

CELIK, C. et al. Effect of sodium ascorbate on bond strength of different adhesive systems to NaOCl-treated dentin. **Australian Endodontic Journal**, v. 36, n. 1, p. 12–18, 2010.

COSTA, C. S. C. Micropartículas de ácido ascórbico : estudo da absorção e efeito antioxidante em jogadores. Tese de Mestrado, **Universidade Federal do Rio de Janeiro**, 2009.

COSTA, C. S. C. Aplicação de proteínas de reserva da ervilha verde (*pisum sativum*, l.) no encapsulamento de ácido ascórbico por spray drying, obtenção de nano e micropartículas e avaliação da biodisponibilidade in vitro. Tese de Doutorado, **Universidade Federal do Rio de Janeiro**, 2014.

DA CUNHA, L. F. et al. Compromised Bond Strength after Root Dentin Deproteinization Reversed with Ascorbic Acid. **Journal of Endodontics**, v. 36, n. 1, p. 130–134, 2010.

DE SOUZA, C. A. G. et al. Encapsulação do ácido L-ascórbico no biopolímero natural galactomanana por spray-drying: Preparação, caracterização e atividade antioxidante. **Quimica Nova**, v. 38, n. 7, p. 877–883, 2015.

DEL CARPIO-PEROCHENA, A. et al. Antibacterial Properties Associated with Chitosan Nanoparticle Treatment on Root Dentin and 2 Types of Endodontic Sealers. **Journal of Endodontics**, v. 41, n. 8, p. 1353–1358, 2015.

EBRAHIMI-CHAHAROM, M. E. et al. Effect of sodium ascorbate on the bond strength of all-in-one adhesive systems to NaOCl-treated dentin. **Journal of Clinical and Experimental Dentistry**, v. 7, n. 5, p. e595–e599, 2015.

ELNAGHY, A. M. Effect of QMix irrigant on bond strength of glass fibre posts to

root dentine. **International Endodontic Journal**, v. 47, n. 3, p. 280–289, 2014.

FAN, W. et al. Calcium-silicate mesoporous nanoparticles loaded with chlorhexidine for both anti- *Enterococcus faecalis* and mineralization properties. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 14, n. 1, p. 1–12, 2016.

FARINA, A. P. et al. Influence of endodontic irrigants on bond strength of a self-etching adhesive. **Australian Endodontic Journal**, v. 37, n. 1, p. 26–30, 2011.

FURUSE, A. Y. et al. Bond strength of fiber-reinforced posts to deproteinized root canal dentin. **Journal of Contemporary Dental Practice**, v. 15, n. 5, p. 581–586, 2014.

GHARSALLAOUI, A. et al. Utilisation of pectin coating to enhance spray-dry stability of pea protein-stabilised oil-in-water emulsions. **Food Chemistry**, v. 122, n. 2, p. 447–454, 2010.

GHARSALLAOUI, A. et al. Pea (*Pisum sativum*, L.) Protein Isolate Stabilized Emulsions: A Novel System for Microencapsulation of Lipophilic Ingredients by Spray Drying. **Food and Bioprocess Technology**, v. 5, n. 6, p. 2211–2221, 2012.

GOLONKA, I. et al. Selected Physicochemical and Biological Properties of Ethyl Ascorbic Acid Compared to Ascorbic Acid. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 40, n. 8, p. 1199–1206, 2017.

GÖNÜLOL, N.; KALYONCUOĞLU, E.; ERTAŞ, E. Effect of sodium ascorbate on dentin bond strength after treatment with oxidizing root canal irrigants. **Journal of Dental Sciences**, v. 10, n. 2, p. 139–144, 2015.

GONZÁLEZ-LUNA, P. I. et al. Bactericide Effect of Silver Nanoparticles as a Final Irrigation Agent in Endodontics on *Enterococcus faecalis*: An Ex Vivo Study. **Journal of Nanomaterials**, v. 2016, 2016.

HASEEB, R. et al. Synthesis and characterization of new chlorhexidine-containing nanoparticles for root canal disinfection. **Materials**, v. 9, n. 6, 2016.

ISELA, S. R.; SERGIO, N.; JOSÉ, M. J. Ascorbic Acid On Oral Microbial Growth and Biofilm. **the Pharma Innovation - Journal**, v. 2, n. 4, p. 103–109, 2013.

JAVIDI, M. et al. Efficacy of a combined nanoparticulate/calcium hydroxide root

canal medication on elimination of *Enterococcus faecalis*. **Australian Endodontic Journal**, v. 40, n. 2, p. 61–65, 2014.

JR SIQUEIRA, J. F.; RÔÇAS, I. N. Clinical Implications and Microbiology of Bacterial Persistence after Treatment Procedures. **Journal of Endodontics**, v. 34, n. 11, p. 1291–1301e3, 2008.

KARLSEN, A.; BLOMHOFF, R.; GUNDERSEN, T. E. High-throughput analysis of Vitamin C in human plasma with the use of HPLC with monolithic column and UV-detection. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 824, n. 1–2, p. 132–138, 2005.

KHOROUSHI, M.; KACHUEI, M. Pull-out bond strength of a self-adhesive resin cement to NaOCl-treated root dentin: effect of antioxidizing agents. **Restorative dentistry & endodontics**, v. 39, n. 2, p. 95–103, 2014.

KISHEN, A. et al. An Investigation on the Antibacterial and Antibiofilm Efficacy of Cationic Nanoparticulates for Root Canal Disinfection. **Journal of Endodontics**, v. 34, n. 12, p. 1515–1520, 2008.

KUL, E. et al. Effect of different post space irrigation procedures on the bond strength of a fiber post attached with a self-adhesive resin cement. **Journal of Prosthetic Dentistry**, v. 115, n. 5, p. 601–605, 2016.

LOTFI, M. et al. Antimicrobial efficacy of nanosilver, sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate against *Enterococcus faecalis*. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 35, p. 6799–6803, 2011.

MAZZONI, A. et al. MMP-2 assay within the hybrid layer created by a two-step etch-and-rinse adhesive: Biochemical and immunohistochemical analysis. **Journal of Dentistry**, v. 39, n. 7, p. 470–477, 2011.

MEHMETI, I.; SOLHEIM, M.; NES, I. F. *Enterococcus faecalis* Grows on Ascorbic Acid. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 15, p. 4756–4758, 2013.

MOHN, D. et al. Composites made of flame-sprayed bioactive glass 45S5 and polymers: Bioactivity and immediate sealing properties. **International Endodontic Journal**, v. 43, n. 11, p. 1037–1046, 2010.

MOREIRA, D. M. et al. Effects of reducing agents on birefringence dentin collagen after use of different endodontic auxiliary chemical substances. **Journal of Endodontics**, v. 37, n. 10, p. 1406–1411, 2011.

NESTERENKO, A. et al. Vegetable proteins in microencapsulation: A review of recent interventions and their effectiveness. **Industrial Crops and Products**, v. 42, n. 1, p. 469–479, 2013.

PALMA-RODRIGUEZ, H. M. et al. Ascorbic acid microencapsulation by spray-drying in native and acid-modified starches from different botanical sources. **Starch/Staerke**, v. 65, n. 7–8, p. 584–592, 2013.

PEREIRA, H. V. R. et al. Legumes seeds protein isolates in the production of ascorbic acid microparticles. **Food Research International**, v. 42, n. 1, p. 115–121, 2009.

PIERUCCI, A. P. T. R. et al. New microencapsulation system for ascorbic acid using pea protein concentrate as coat protector. **Journal of Microencapsulation**, v. 23, n. 6, p. 654–662, 2006.

PRASANSUTTIPORN, T. et al. Effect of reducing agents on bond strength to NaOCl-treated dentin. **Dental Materials**, v. 27, n. 3, p. 229–234, 2011.

RABI, R. M.; CAI, J.; VADERHOBLI, R. M. Annals of Dentistry and Oral Disorders Effect of 8 . 25 % Sodium Hypochlorite on Shear Bond Strength and the Ability of Ascorbic Acid to Reverse it. **Ann Dentist Oral Disord**, v. 1, n. 1, p. 11–13, 2017.

RANDALL, R. J.; LEWIS, A. The folin by oliver. **Readings**, v. 193, n. 1, p. 265–275, 1951.

RANGEL, A. et al. Functional properties of purified vicilins from cowpea (*Vigna unguiculata*) and pea (*Pisum sativum*) and cowpea protein isolate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 19, p. 5792–5797, 2003.

REDDY, P. et al. Effect of irrigant neutralizing reducing agents on the compromised dislocation resistance of an epoxy resin and a methacrylate resin-based root canal sealer in vitro. **International Journal of Adhesion and Adhesives**, v. 82, n. January, p. 206–210, 2018.

SAGHIRI, M. A. et al. Nanomodification of mineral trioxide aggregate for enhanced

physiochemical properties. **International Endodontic Journal**, v. 45, n. 11, p. 979–988, 2012.

SHRESTHA, A.; KISHEN, A. Antibacterial Nanoparticles in Endodontics: A Review. **Journal of Endodontics**, v. 42, n. 10, p. 1417–1426, 2016.

SOPPIMATH, K. S. K. et al. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. **Journal of Controlled Release**, v. 70, n. 1–2, p. 1–20, 2001.

STEVENS, C. D. Immediate shear bond strength of resin cements to sodium hypochlorite-treated dentin. **Journal of endodontics**, v. 40, n. 9, p. 1459–1462, 2014.

TABAK, M. et al. Diverse effects of ascorbic acid and palmitoyl ascorbate on *Helicobacter pylori* survival and growth. **FEMS Microbiology Letters**, v. 224, n. 2, p. 247–253, 2003.

TELLES, I. S. F.; PRADO, M. DO; SIMÃO, R. A. Nanopartículas e aplicações endodônticas: uma revisão da literatura. **Rev. Bras. Odontol.**, v. 74, n. 2, p. 167–75, 2017.

WESTON, C. H. et al. Effects of Time and Concentration of Sodium Ascorbate on Reversal of NaOCl-Induced Reduction in Bond Strengths. **Journal of Endodontics**, v. 33, n. 7, p. 879–881, 2007.

YEW, W. S.; GERLT, J. A. Utilization of L-Ascorbate by *Escherichia coli* K-12: Assignments of Functions to Products of the *yjf-sga* and *yia-sgb* Operons. **Journal of Bacteriology**, v. 184, n. 1, p. 302–306, 2002.

ZHANG, Z. et al. The Ascorbate Transporter of *Escherichia coli* The Ascorbate Transporter of *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 185, n. 7, p. 2243–2250, 2003.

ZHOU, J. et al. The incorporation of chlorhexidine in a two-step self-etching adhesive preserves dentin bond in vitro. **Journal of Dentistry**, v. 37, p. 807–812, 2009.

Anexo I

UFRJ - HOSPITAL
UNIVERSITÁRIO CLEMENTINO
FRAGA FILHO DA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOESTRUTURAS PARA FINS ODONTOLÓGICOS

Pesquisador: Íris Sol Figueiredo Telles

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 70458617.0.0000.5257

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

Patrocinador Principal: UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.236.710

Apresentação do Projeto:

Protocolo 174-17 do grupo III. Respostas recebidas em 9.8.2017

As informações colocadas nos campos denominados "Apresentação do Projeto", "Objetivo da Pesquisa" e "Avaliação dos Riscos e Benefícios" foram retiradas do documento intitulado

"PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_914425.pdf" (submetido na Plataforma Brasil em 10/08/2017).

Introdução:

A tecnologia de liberação controlada de fármacos possui aplicação multidisciplinar e pode contribuir para o avanço da saúde humana. Os sistemas de liberação ou drug delivery systems, oferecem inúmeras vantagens quando comparados a outros sistemas de dosagem convencional. Os sistemas de liberação controlada têm como objetivo prolongar e melhorar o controle da administração de fármacos, objetivos estes possibilitados devido a técnica de nanoencapsulamento, que consiste em envolver o fármaco por uma matriz polimérica (GHARSALLAOUI et al., 2007). A eficácia do fármaco encapsulado dependerá da preservação de sua biodisponibilidade no local desejado. Assim, a encapsulação é uma tecnologia proposta para a

Endereço: Rua Prof. Rodolpho Paulo Rocco Nº255 Sala 01D-46
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 21.941-913
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3938-2480 **Fax:** (21)3938-2481 **E-mail:** cep@hucff.ufrj.br

Anexo I

UFRJ - HOSPITAL
UNIVERSITÁRIO CLEMENTINO
FRAGA FILHO DA



Continuação do Parecer: 2.236.710

Outros	Declaracao_instituicao_co_participante.doc	07/06/2017 17:27:56	Iris Sol Figueiredo Telles	Aceito
Outros	carta_de_apresentacao.doc	07/06/2017 17:21:48	Iris Sol Figueiredo Telles	Aceito
Outros	carta_de_apresentacao.pdf	07/06/2017 17:21:24	Iris Sol Figueiredo Telles	Aceito
Outros	Curriculum_lattes_dos_pesquisadores.doc	06/06/2017 01:18:34	Iris Sol Figueiredo Telles	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIO DE JANEIRO, 28 de Agosto de 2017

Assinado por:
Carlos Alberto Guimarães
(Coordenador)

Nanopartículas e aplicações endodônticas: uma revisão da literatura

Nanoparticles and endodontics applications: a literature review

Iris Sol Figueiredo Telles,¹ Maira do Prado,¹ Renata Antoun Simão¹

¹Programa de Engenharia Metalúrgica e de Materiais, Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ, Brasil

• Os autores declaram que não há conflito de interesse.

RESUMO

Objetivo: este artigo pretende apresentar uma revisão da literatura quanto ao conhecimento científico disponível sobre a aplicação de nanopartículas na Endodontia. **Material e Métodos:** foram avaliadas as seguintes propriedades: atividade antimicrobiana, prevenção contra formação de biofilmes bem como sua eliminação, compatibilidade, resistência ao envelhecimento, resistência mecânica, dispersão para as regiões de anatomia complexa e regeneração dos tecidos. Foi realizada uma pesquisa bibliográfica de estudos publicados entre 2004 e junho de 2017, coletados através das bases de dados SciELO e Medline. **Resultados:** um total de 50 artigos foi selecionado. A maior parte dos estudos que avalia a atividade antimicrobiana mostra resultados positivos em relação a incorporação das nanopartículas. A maior parte dos estudos que avalia a atividade antimicrobiana mostra resultados positivos em relação a incorporação das nanopartículas nos materiais. Os que avaliaram as propriedades mecânicas e estruturais dos materiais encontraram aumento na rigidez, microdureza e uma menor porosidade, que está relacionada com aumento da resistência destes materiais. Quando adicionadas aos materiais, a maioria dos estudos conclui que não foram modificadas as propriedades e quando houverem modificações, causaram um efeito positivo. Quanto à biocompatibilidade, pode haver um aumento da toxicidade em altas concentrações de nanopartículas, no entanto, outros estudos afirmam biocompatibilidade e propriedades osteogênicas, sendo esta característica associada ao tipo de nanopartícula. **Conclusão:** concluiu-se que as nanopartículas estão até o presente momento sendo avaliadas em nível laboratorial, com resultados promissores para práticas clínicas futuras.

Palavras-chave: Endodontia; Nanoestruturas; Nanopartículas.

ABSTRACT

Objective: the purpose of this article was to present a review of the literature on available scientific knowledge about the application of nanoparticles in endodontics. **Material and Methods:** the following properties were evaluated: antimicrobial activity, prevention against biofilms formation as well as their elimination, compatibility, resistance to aging, mechanical resistance, dispersion to complex anatomy regions and tissue regeneration. A bibliographic research of studies was performed from 2004 to June 2017, collected through the SciELO and Medline databases. **Results:** a total of 50 articles were selected. Most of the studies that evaluated the antimicrobial activity showed positive results regarding the incorporation of nanoparticles. Most of the studies that evaluated the antimicrobial activity showed positive results regarding the incorporation of nanoparticles in the materials. Those that evaluated the mechanical and structural properties of the materials, found an increase in stiffness, microhardness, and a lower porosity, which is related to increased resistance of these materials. When added to materials, most studies conclude that the properties were not modified and when there were adjustments, they caused a positive effect. Regarding biocompatibility, there are an increase in toxicity in high concentrations of nanoparticles, however, other studies affirm biocompatibility and osteogenic properties, being this characteristic associated with the type of nanoparticle. **Conclusion:** it was concluded that nanoparticles are currently being evaluated at the laboratory level, with promising results for future clinical practices.

Keywords: Endodontia; Nanostructures; Nanoparticles.

Introdução

A nanotecnologia é um novo campo na ciência que vem crescendo nas últimas décadas. Trata-se de uma tecnologia promissora e inovadora, por projetar novos materiais com novas funções e também conceder àqueles existentes melhorias nas suas propriedades.^{1,2} Na engenharia de materiais, na química e na indústria farmacêutica, esta ciência já tem seu campo consolidado e continua em grande expansão.^{1,3-5} É considerado um nanomaterial aquele que, após sua síntese, apresenta partículas que atinjam dimensões entre 1 e 100 nanômetros (nm).^{1,3,6,7}

O conjunto de aplicações dos nanomateriais na Endodontia abrangem transporte de fármacos,⁸⁻¹⁰ estratégias antimicrobianas,^{2,5,8-38} propriedades mecânicas,^{2,38,39-45} e propriedades osteogênicas.^{10,46,47} Porém, há o desafio científico de formular nanopartículas (NPs) que ao serem adicionadas aos produtos comerciais existentes não alterem substancialmente suas propriedades biológicas, físico-químicas e

mecânicas.² Outra condição importante é a segurança biológica, para que sejam aplicadas sem aumentarem os efeitos citotóxicos, e de preferência com efeitos colaterais mínimos.^{4,38,39,48-50}

Este artigo tem como objetivo fazer uma revisão da literatura científica publicada sobre o uso das nanopartículas na área da Endodontia, bem como descrever as diferentes novas estratégias terapêuticas testadas nos estudos.

Material e Métodos

A revisão da literatura foi realizada por meio de consulta às bases de dados bibliográfica SciELO via Bireme e Medline via PubMed. A estratégia de busca foi através da inserção de DeCS (Descritores e Ciências da Saúde) e termos livres, como "Endodontia", "Nanomateriais", "Nanopartículas" e "Nanotecnologia". Foram selecionados 50 artigos entre 2004 e junho de 2017, dentre revisões de literatura e artigos científicos, que abordaram os tópicos de interesse para esta revisão.