PATRICIA VERÓNICA AULESTIA VIERA

**Complexação de guaiacol com β -ciclodextrina para tratamento de alveolite
seca: avaliação *in vitro* e *in vivo***

São Paulo
2015

PATRICIA VERÓNICA AULESTIA VIERA

**Complexação de guaiacol com β -ciclodextrina para tratamento de alveolite
seca: avaliação *in vitro* e *in vivo***

Versão Corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas.

Área de Concentração: Clínica Integrada

Orientador: Prof. Dr. Rodney Garcia Rocha

São Paulo
2015

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo-na-Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Viera, Patricia Verónica Aulestia.

Complexação de guaiacol com β -ciclodextrina para tratamento de alveolite seca: avaliação *in vitro* e *in vivo*/ Patricia Verônica Aulestia Viera ; orientador Rodney Garcia Rocha. -- São Paulo, 2015.

114 p. : fig., tab., graf.; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) -- Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas. Área de Concentração: Clínica Integrada. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão corrigida

1. Alvéolo seco. 2. Guaiacol. 3. Ciclodextrinas. I. Rocha, Rodney Garcia. II. Título.

Viera PVA. Complexação de guaiacol com β -ciclodextrina para tratamento de alveolite seca: avaliação *in vitro* e *in vivo*. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas.

Aprovado em: 21 / 04 / 2016

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). Sélio Morato de Saavedra Gontijo

Instituição: UFMG Julgamento: Aprovado

Prof(a). Dr(a). Maria Aparecida Boratti

Instituição: FOUSP Julgamento: Aprovada

Prof(a). Dr(a). RODNEY GARCIA ROCHA

Instituição: FOUSP Julgamento: Aprovado

A Deus, que ilumina cada dia meu caminho, me levanta depois de cada tropeço e me dá forças para seguir em frente.

Aos meus pais, Angel e Patricia, com muito amor e gratidão, porque me deram a vida e me ensinaram a vivê-la. Vocês são meu maior apoio, meu melhor exemplo e os donos de cada uma das minhas conquistas.

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer ao Prof. Dr. Rodney Garcia Rocha, por ter me dado a oportunidade de ingressar na pós-graduação. Muito obrigada pelo apoio, pelos ensinamentos e o exemplo de profissionalismo.

Desejo agradecer muito especialmente à Profa. Dra. Maria Aparecida Borsatti, por todo o conhecimento, a paciência, a dedicação, os conselhos e o carinho. Obrigada pelo seu tempo, pela sua companhia, pela “cultura inútil” (que é sempre útil), por me ensinar a ensinar e a aprender, e por ter confiado em mim desde o início. Espero não tê-la decepcionado em nenhum momento.

À Profa. Dra. Marinella Holzhausen Caldeira, por ter me colocado pela primeira vez no caminho da ciência. Obrigada pelos ensinamentos e a paciência.

À Profa. Dra. Maria Esperanza Cortés, que me abriu as portas do seu laboratório na UFMG e me acolheu como uma orientada, e aos seus pós-graduandos, Sávio, Karina, Alinne e Alfonso com os quais aprendi muito.

À Profa. Dra. Marinelce F. dos Santos, que também abriu as portas do seu laboratório no ICB e colaborou com meu trabalho. E aos técnicos, Fernando, Gabriella e Gisela, que sempre estiveram dispostos a me ajudar.

A todos os docentes da USP e da Clínica Integrada, que contribuíram muito para o meu crescimento profissional, e especialmente à Profa. Dra. Sibele Sarti Penha e à Profa. Dra. Carina Domaneschi que me acolheram durante todo este tempo na sua sala. Obrigada pelo convívio!

Aos Professores Doutores Atlas Nakamae, Mário Sérgio Soares e Waldyr Antônio Jorge: obrigada pelos conselhos, apoio e confiança.

Às colegas de pós-graduação, Fernanda e Solange pela colaboração, a companhia e a amizade.

As secretárias, Regina, Cátia, Alexandra, Cecília, Marília e Nina, que sempre estão dispostas a ajudar e a fazer as nossas vidas mais fáceis.

À Adriana e ao Martín, pela força dentro e fora da faculdade, pela parceria, pelas risadas e o tempo compartilhado.

Ao Roger, a quem não tenho como agradecer por tanto apoio, paciência e esforço para me fazer feliz. Ter você ao meu lado torna esta vida mais bonita!

À minha família e amigos que amo muito, especialmente aos meus pais que sempre acreditaram em mim e souberam entender a minha ausência durante todo este tempo. Obrigada pelo incentivo, carinho e exemplo. Vocês são a minha fortaleza!

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pelo fornecimento da bolsa de mestrado.

E finalmente, mas não menos importante, agradeço a Deus e à sua bondade, porque sem sua luz nada disto seria possível.

*Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa,
nunca tem medo e nunca se arrepende.*

Leonardo da Vinci

RESUMO

Viera PVA. Complexação de guaiacol com β -ciclodextrina para tratamento de alveolite seca: avaliação *in vitro* e *in vivo* [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2015.

A alveolite seca (AS) é uma das complicações pós-operatórias mais comuns e sintomáticas na odontologia, porém, até o momento não há um protocolo de tratamento definido. O composto fenólico guaiacol (Gu) é um dos materiais utilizados para revestimento intra-alveolar devido às suas propriedades analgésicas, antioxidantes e antimicrobianas. Contudo, sua desvantagem é a dificuldade de manipulação decorrente da sua baixa estabilidade, alta volatilidade e sensibilidade à oxidação. Para melhorar suas propriedades e aumentar sua aplicabilidade clínica, um complexo de inclusão de Gu com β -ciclodextrina (β cd) foi desenvolvido. A formação do complexo supramolecular de Gu: β cd foi caracterizada mediante a ressonância magnética nuclear (RMN), nos experimentos de ^1H e 2D ROESY. A atividade antibacteriana do Gu e Gu: β cd frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* foi analisada pelo método da microdiluição e sua citotoxicidade em osteoblastos de calvária de rato, foi estudado com o ensaio do MTT. O processo de reparo alveolar induzido pelo Gu: β cd foi avaliado histologicamente após tratamento de alveolite seca em molares inferiores de ratos. A RMN mostrou correlações espaciais entre os hidrogênios internos (H_3 e H_5) da β cd e os hidrogênios aromáticos, H(a) e H(b) do Gu, confirmando a formação do complexo. A complexação do Gu na β cd potencializou seu efeito antibacteriano e reduziu sua citotoxicidade em osteoblastos. O estudo *in vivo* evidenciou a ocorrência de ossificação no ápice alveolar dos ratos tratados com Gu: β cd, no 7º dia. No 14º dia, as trabéculas ósseas ocuparam também o terço médio do alvéolo e no 21º dia, todo o alvéolo se encontrava preenchido por osso neoformado. Estes resultados foram similares ao controle negativo e superiores ao controle positivo (Alvogyl®). Os benefícios obtidos pela inclusão do Gu na β cd foram demonstrados pela melhora das propriedades biológicas do Gu *in vitro* e o adequado reparo alveolar *in vivo*.

Palavras-chave: Alvéolo seco. Guaiacol. Ciclodextrina.

ABSTRACT

Viera PVA. β -cyclodextrin complexation of guaiacol for the treatment of dry socket: *in vitro* and *in vivo* evaluation [dissertation]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2015.

Dry socket is one of the most common and symptomatic complications in dentistry, however, there is still not a settled treatment for this condition. The phenolic compound guaiacol (Gu) is one of several alveolar dressings used in dry socket because it has analgesic, antioxidant and antimicrobial properties. Nevertheless, its disadvantage is the difficulty of manipulation due to its low stability, high volatility and sensitivity to oxidation. To improve its properties and increase its clinical applicability, an inclusion complex of Gu with β -cyclodextrin (β cd) was developed. The Gu: β cd supramolecular complex was characterized by Nuclear Magnetic Resonance (NMR), in the ^1H and 2D ROESY experiments. The antibacterial activity of Gu and Gu: β cd over *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* was analyzed using the microdilution method and its cytotoxicity in rat calvaria-derived osteoblast was evaluated with the MTT assay. The alveolus repair process induced by Gu: β cd was histologically studied after the treatment of dry socket in rat mandibular molars. The NMR showed spatial correlations between internal hydrogens (H_3 and H_5) of β cd and aromatic hydrogens, H(a) and H(b), of Gu confirming the inclusion complex formation. Gu: β cd complex potentiated Gu antibacterial effect and reduced its cytotoxicity in osteoblasts. The *in vivo* study revealed that ossification occurred in the alveolar apex of rats treated with Gu: β cd, by day 7. In the 14th day, the trabecular bone occupied the apical and middle thirds of the socket and on the 21st day, the entire alveolus was filled by newly formed bone. These results were similar to the negative control and superior to the positive control (AlvogylTM). Benefits gained from inclusion of Gu in cyclodextrin have been particularly demonstrated by the improvement in Gu biological properties *in vitro* and the appropriate alveolus repair *in vivo*.

Keywords: Dry socket. Guaiacol. Cyclodextrin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 - Esquema representativo do processo de desenvolvimento do quadro de alveolite seca segundo Birn.	26
Figura 2.2 - Esquema ilustrativo do perfil da concentração do fármaco em função do tempo, comparando a administração pela via convencional e em sistema de liberação controlada.....	39
Figura 2.3 - Representação esquemática da estrutura das ciclodextrinas naturais: α -, β - e γ -ciclodextrina.....	40
Figura 2.4 - Representação esquemática da estrutura tronco cônica das ciclodextrinas.....	41
Figura 4.1 - Liofilizador	46
Figura 4.2 - Pó de Gu: β cd obtido após a liofilização	46
Figura 4.3 - Sequência de remoção de calvária de rato para isolamento de osteoblastos primários	49
Figura 4.4 - Ilustração das células vistas ao microscópio de luz na câmara de Neubauer.....	51
Figura 4.5 - Jarra de anaerobiose com bactérias microaerófilas	56
Figura 4.6 - Dinâmica de montagem das microplacas para o teste da microdiluição em caldo	60
Figura 4.7 - Leitora de microplacas.....	60
Figura 4.8 - Mesa de cirurgia para exodontia de molar de rato	63
Figura 4.9 - Luxação do primeiro molar inferior direito	63

Figura 4.10 - Alvéolos após avulsão de molar	63
Figura 4.11 - Remoção de fragmento mandibular para análise histológica	65
Figura 4.12 - Hemimandíbula de rato com primeiro molar removido	67
Figura 5.1 - Microplaca proveniente do teste da microdiluição em caldo para <i>S. mutans</i>	74
Figura 5.2 - Placa de Petri com a cultura do conteúdo dos poços da microplaca de <i>S. mutans</i> proveniente do teste da microdiluição em caldo, após 24h de crescimento	75
Figura 5.3 - Aspecto histológico do terço apical dos alvéolos no 7º, 14º e 21º dias após a exodontia	79
Figura 5.4 - Aspecto histológico do terço cervical dos alvéolos tratados com Gu:βcd no 7º e 21º dias após a exodontia.....	80

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 5.1 - Espectro de ^1H para o guaiacol puro a 400 MHz	70
Gráfico 5.2 - Mapa de contorno 2D-ROESY do complexo Gu: β cd	71
Gráfico 5.3 - Média $\pm$ DP da viabilidade celular de osteoblastos segundo o tipo de fármaco e sua concentração após 48h de exposição	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 -Propriedades físico-químicas dos componentes	45
Tabela 5.1 -MIC ₉₀ , MIC ₅₀ e MBC do Gu e Gu:βcd em mg/mL	74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AL	Alveolite seca
ATCC	American Type Culture Collection
Bact	Controle de 100% crescimento bacteriano
β cd	β -ciclodextrina
BHIB	Brain Heart Infusion Broth (Caldo Infusão Cérebro e Coração)
C+	Controle positivo
C-	Controle negativo
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CD	Ciclodextrina
CFU	Colony-forming unit (Unidade formadora de colônia)
CI	Complexo de inclusão
COX-2	Ciclooxigenase-2
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CO ₂	Dióxido de carbono
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid (Ácido etilenodiamino tetra-acético)
FGF	Fator de crescimento de fibroblastos
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FOUSP	Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo
g	Grama
Gu	Guaiacol
Gu: β cd	Complexo de inclusão de guaiacol com β -ciclodextrina

h	Hora
IC ₅₀	Concentração que inibe 50% do crescimento
ICB	Instituto de Ciências Biomédicas
kg	Quilograma
L	Litro
LC ₅₀	Concentração letal 50
M	Molar
MBC	Concentração bactericida mínima
mg	Miligrama
MHA	Mueller-Hinton Agar (Ágar Mueller-Hinton)
MHB	Mueller-Hinton Broth (Caldo Mueller-Hinton)
MHz	Megahertz
MIC ₅₀	Concentração que inibe 50% de crescimento
MIC ₉₀	Concentração que inibe 90% de crescimento
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mm	Milímetro
mm ³	Milímetro cúbico
mRNA	Ácido ribonucleico do tipo mensageiro
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
N ₂	Gás nitrogênio
nm	Nanômetro
NOE	Efeito Nuclear Overhauser
Osteob	Controle de 100% de crescimento de osteoblastos
OZE	Pasta de óxido de zinco e eugenol
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas

PFA	Paraformaldehído
PGE2	Prostaglandina E2
PGI2	Prostaciclina
PBS	Phosphate buffered saline (Tampão fosfato-salino)
PM	Peso molecular
ppm	Partes por milhão
RANK	Receptor ativador do fator nuclear kappa-B
RANKL	Ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa-B
RMN	Ressonância magnética nuclear
rpm	Rotações por minuto
S/alv	Sem alveolite
SDS	Sodium dodecyl sulfate (Dodecil sulfato de sódio)
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
USP	Universidade de São Paulo
μL	Microlitro
TGF-β	Fator de crescimento transformador beta
TNF-α	Fator de necrose tumoral do tipo alfa
TRPV1	Transient receptor potential cation channel subfamily V member 1 (Receptor Vanilóide de Potencial Transitório do Tipo 1)
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

LISTA DE SÍMBOLOS

%	porcentagem
x	vezes
>	maior
<	menor
≥	maior ou igual
≤	menor ou igual
=	igual
α	alfa
β	beta
γ	gamma
°C	graus Celsius
n°	número
™	trademark
®	marca registrada

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
2 REVISÃO DA LITERATURA	22
2.1 REPARO NORMAL DO ALVÉOLO DENTÁRIO	22
2.2 ALVEOLITE SECA	23
2.2.1 Etiologia	25
2.2.2 Fatores de risco	27
2.2.3 Condutas profiláticas	31
2.2.4 Tratamento	32
2.3 COMPOSTOS DE INCLUSÃO COM CICLODEXTRINAS	38
3 PROPOSIÇÃO	43
4 MATERIAL E MÉTODOS	44
4.1 FASE I: PREPARO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO COMPLEXO DE INCLUSÃO	44
4.1.1 Preparo do complexo guaiacol:β-ciclodextrina (1:1)	44
4.1.2 Caracterização do complexo guaiacol:β-ciclodextrina (1:1)	47
4.2 FASE II: ENSAIOS <i>IN VITRO</i>	48
4.2.1 Ensaios de citotoxicidade	48
4.2.2 Ensaios microbiológicos	54
4.3 FASE III: TESTES <i>IN VIVO</i>	61
5 RESULTADOS	69
5.1 FASE I: CARACTERIZAÇÃO DO COMPLEXO DE INCLUSÃO	69
5.2 FASE II: ENSAIOS <i>IN VITRO</i>	72
5.2.1 Ensaios de citotoxicidade	72
5.2.2 Ensaios microbiológicos	73
5.3 FASE III: TESTES <i>IN VIVO</i>	76

6 DISCUSSÃO.....	81
7 CONCLUSÕES.....	95
REFERÊNCIAS	96
APÊNDICES	111
ANEXOS.....	113

1 INTRODUÇÃO

A cirurgia de extração dentária é um procedimento realizado rotineiramente nos consultórios odontológicos. Regularmente este procedimento não traz complicações, porém em certos casos pode ocorrer uma alteração do processo normal de reparo alveolar, sendo a alveolite seca (AS) uma das complicações mais comuns após este procedimento (Kolokythas et al., 2010). A AS é caracterizada pela perda prematura, total ou parcial do coágulo sanguíneo que se forma no interior do alvéolo após a exodontia (Bortoluzzi et al., 2008), e acredita-se que seja causada principalmente pelo aumento da atividade fibrinolítica local (Birn, 1970; Birn 1972a; Birn 1972b; Birn, Myhre-Jensen, 1972; Birn, 1973). Clinicamente apresenta-se com dor intensa que começa de 24 a 72 horas após a exodontia e responde pouco aos analgésicos. Por ser um quadro altamente sintomático o paciente requer atenção profissional para controle da dor e da infecção até o retorno ao processo normal de cicatrização (Fazakerley; Field, 1991; Kolokythas et al., 2010).

Ao longo dos anos, vários tipos de materiais têm sido utilizados para o cuidado da AS, principalmente os curativos intra-alveolares na forma de pastas ou géis contendo diversos princípios ativos tais como anestésicos tópicos, antibióticos, compostos antimicrobianos e inclusive fatores de crescimento obtidos do próprio sangue do paciente (Fazakerley; Field, 1991; Blum, 2002; Burgoyne et al., 2010; Pal et al., 2013). Não obstante, o emprego de certos protocolos de tratamento ainda é empírico e têm sua eficácia relatada em reduzir o desconforto do paciente baseada principalmente na experiência clínica pessoal, faltando evidência experimental que comprove sua ação (Alexander, 2000).

Um dos princípios ativos que têm sido recomendados na literatura como materiais obtundentes é o composto fenólico guaiacol (Gu) (Ciancio; Bourgault, 1984; Figueiredo; Aguiar, 2001; Gregori; Campos, 2004;) que possui propriedades analgésicas (Hirafuji, 1984; Park et al., 2009), antioxidantes (Mimura et al., 2005; Galano et al., 2012), osteoindutoras (Kato et al., 2010) e antimicrobianas (Burt, 2004; Fitzgerald et al., 2005; Ouwehand et al., 2010; Liu et al., 2011). A pesar dos diversos benefícios, o Gu é de difícil manipulação por ser sensível à oxidação e altamente volátil (National Center for Biotechnology Information, 2004a; Kayaci et al., 2013),

surgindo a necessidade de incorporá-lo numa matriz ou carreador com a capacidade de protegê-lo composto e facilitar seu uso.

Um exemplo de molécula que cumpre esta função carreadora é a ciclodextrina (CD), a qual tem a capacidade de formar complexos de inclusão com diversas moléculas hóspede. A indústria farmacêutica utiliza os complexos de inclusão de fármacos com CDs para melhorar suas características físico-químicas e biológicas, como a solubilidade, a estabilidade, reduzir a volatilidade, proteger contra oxidação, reduzir a toxicidade, facilitar a absorção dos princípios ativos e até realçar o efeito de certos antimicrobianos (Cortés et al., 2001; Macaev et al., 2013; Bilia et al., 2014; Suárez et al., 2014; Teixeira et al., 2015).

A fim de melhorar a estabilidade, preservar as propriedades biológicas e favorecer a aplicabilidade clínica do Gu, foi proposta a formulação de um complexo de inclusão de guaiacol com β -cyclodextrin (Gu: β cd), visando seu uso no tratamento da alveolite seca. Com este trabalho pretendeu-se preparar o composto Gu: β cd, comprovar a inclusão química do Gu na β cd, verificar a citotoxicidade e o efeito antimicrobiano do Gu, puro e complexado, e analisar o processo de reparo tecidual induzido pelo composto Gu: β cd em alvéolos de molar de ratos com alveolite.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 REPARO NORMAL DO ALVÉOLO DENTÁRIO

O reparo do alvéolo dental começa logo após a exodontia e termina quando este é totalmente preenchido por osso e a sua entrada é fechada por tecido mole epitelizado. A duração do processo varia de indivíduo para indivíduo e depende do tamanho do alvéolo. Em média, são necessários de 3 a 6 meses para culminar este processo (Hupp, 2014; Araújo et al., 2015).

O processo de reparo é dividido em 3 fases sequenciais e que muitas vezes se sobrepõem: fase inflamatória, proliferativa e de remodelação (Araújo et al., 2015). A fase inflamatória começa imediatamente após a exodontia, quando a trombina e o fibrinogênio formam um coágulo de fibrina sobre o qual o epitélio migra. Leucócitos invadem o alvéolo desencadeando uma resposta inflamatória aguda e osteoclastos se acumulam na crista óssea onde começa a remodelação do osso cortical (Hupp, 2014). Durante os primeiros três dias, o coágulo sanguíneo ocupa a maior parte do alvéolo (Cardaropoli et al., 2003; Araújo et al., 2015) e progressivamente vai sofrendo um processo de maturação no qual é substituído por tecido de granulação, caracterizado por uma delicada matriz de colágeno tipo III, fibroblastos e capilares neoformados (Yugoshi et al., 2002). A dilatação de vasos pré-existentes e a formação de novos vasos (angiogênese) permitem um aporte sanguíneo suficiente para suprir a demanda nutricional do processo de regeneração (Hing et al., 2004).

O início da fase proliferativa, ainda na primeira semana, é caracterizado por um rápido depósito de uma matriz provisória rica em fibras colágenas, que é progressivamente invadida por capilares e células osteoprogenitoras (Araújo et al., 2015). As células osteoprogenitoras podem ser derivadas do ligamento periodontal remanescente, da medula óssea (Devlin; Sloan, 2002) ou do periósteo (Rasubala et al., 2004). A segunda semana é marcada pelo começo da deposição de osteóide e formação de osso primário ao longo do osso que reveste o alvéolo (Hupp, 2014).

Na fase de remodelação, o osso primário vai sendo gradualmente substituído por osso trabecular maduro (a partir da terceira e quarta semanas). Neste tempo a epitelização do alvéolo geralmente está completa e os osteoclastos continuam atuando na remodelação óssea das margens do alvéolo e dos septos interradiculares presentes após a extração de dentes multirradiculares (Hupp, 2014). De 4 a 6 meses após a cirurgia culmina a reabsorção do osso cortical e o preenchimento do alvéolo com osso trabecular e medula óssea (Hupp, 2014; Araújo et al., 2015).

Todo este processo é guiado por moléculas sinalizadoras, fatores de crescimento e macromoléculas da matriz extracelular como o colágeno, a fibronectina, a sialoproteína óssea, a osteopontina, dentre outras (Siqueira-Junior; Dantas, 2000). Alguns fatores de crescimento tais como o fator de crescimento transformador beta (TGF- β), fator de crescimento de fibroblastos (FGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) são expressos de modo temporal nos processos de cicatrização tecidual e, provavelmente, também devem estar envolvidos na sinalização, controle e indução durante o processo de reparo ósseo (Street et al., 2002; Lalani et al., 2005).

2.2 ALVEOLITE SECA

A alveolite seca (AS) é uma inflamação aguda do osso alveolar ao redor do dente extraído (Akinbami; Godspower, 2014), caracterizada pela perda prematura, total ou parcial, do coágulo sanguíneo que se forma no interior do alvéolo dentário.

Esta constitui uma das complicações mais comuns após uma exodontia (Colby, 1997; Kolokythas et al., 2010), com maior incidência em pessoas ao redor de 40 anos de idade e ocorrendo até dez vezes mais na mandíbula do que na maxila (Colby, 1997). Estudos indicam que a ocorrência de AS é de 1 a 4% nas exodontias de rotina e de 5 a 30% nas extrações de terceiros molares inferiores inclusos (Blum, 2002; Bowe et al., 2011/2012; Akinbami; Godspower, 2014). Trabalhos mais recentes mostram uma incidência menor em relação aos trabalhos mais antigos, o

que pode estar relacionada ao desenvolvimento de técnicas cirúrgicas mais apuradas, aos processos de antisepsia, ao uso de antibióticos, ao cumprimento dos cuidados pós-operatórios por parte dos pacientes (Akinbami; Godspower, 2014) e à redução da indicação de exodontias.

Apesar da taxa de incidência não ser alta, as cirurgias de extração dentária (incluindo as mais complexas como a extração de terceiros molares) são procedimentos tão frequentes, que sua morbidade pode ser facilmente percebida na população e se torna uma preocupação para os profissionais da área (Rakhshan, 2015; Tarakji et al., 2015).

Tipicamente, a AS começa de 1 a 3 dias após a extração do dente e a duração usualmente é de cinco a dez dias (Blum, 2002). Os sinais clínicos são severos, caracterizados por dor forte latejante que começa de 24 a 72h após a exodontia, não responde bem aos analgésicos e pode-se irradiar à região do temporal, orelha e pescoço. Esta pode ser muito debilitante, causando perda de sono e afetando as atividades diárias do paciente (Blum, 2002; Faizel et al., 2015). O alvéolo é visto desprovido de coágulo, com osso exposto que pode estar preenchido por debris de alimentos. Halitose, gosto ruim na boca, edema na gengiva que circunda o alvéolo e linfadenite também podem ser vistos algumas vezes, enquanto que a presença de febre é rara (Blum, 2002). A condição geralmente é autolimitante, exceto quando o paciente apresenta comprometimento do sistema imunológico ou em pacientes que receberam radioterapia na região (Fazakerley; Field, 1991).

Histologicamente é vista uma resposta inflamatória intensa, que pode se disseminar aos espaços medulares e subepiteliais adjacentes, com presença de células polimorfonucleares e mononucleares. Por causa da inflamação acentuada, o processo de reparo alveolar é atrasado e é precedido por atividade osteoclástica abundante que por vezes leva à formação de sequestros ósseos. Com o passar dos dias, o alvéolo começa a ser preenchido por tecido de granulação que penetra através de perfurações na lâmina dura e a superfície começa a ser epitelizada. A partir deste momento, o processo de reparo segue seu curso natural (Birn, 1973).

2.2.1 Etiologia

Existem algumas teorias que tentam explicar a etiologia da AS, incluindo a infecção bacteriana, o trauma e a presença de agentes bioquímicos (Vezeau, 2000). A teoria mais clássica vem da série de estudos de Birn que descreveu como principal fator etiológico o aumento da atividade fibrinolítica local (Birn, 1970, 1972a,b; Birn; Myhre-Jensen, 1972; Birn, 1973) (Figura 2.1).

Birn (1973) mostrou que na alveolite seca existe uma atividade fibrinolítica maior que num alvéolo com cicatrização normal, o que afetaria a integridade do coágulo formado após a extração dentária. Este aumento seria provocado por uma liberação acentuada do ativador tecidual de plasminogênio, durante o processo inflamatório consequente de trauma ou infecção (Birn, 1972a). Quando este ativador é liberado, o plasminogênio é convertido em plasmina, causando a ruptura do coágulo pela desintegração da fibrina.

Ao mesmo tempo, o aumento da fibrinólise não pode dissolver o coágulo sanguíneo antes do segundo dia após a cirurgia, pois este contém antiplasmina, a qual deve ser neutralizada antes de ocorrer a dissolução do coágulo (Birn, 1970). Isto explicaria porque os sintomas da AS não aparecem logo após a cirurgia.

Os ativadores teciduais também liberam bradicininas e cininogenases, enzimas que têm um papel importante na geração de dor porque ativam terminações aferentes dos nervos, que podem ter sido previamente sensibilizados por outros mediadores inflamatórios e substâncias algôgenas (Birn, 1972b; 1973; Blum, 2002). A plasmina também está envolvida na conversão de calicreína em cinina na medula óssea alveolar, o que faz com que plasmina seja considerada a causante das duas características principais da AS, a desintegração do coágulo e a dor (Cardoso et al., 2010).

Figura 2.1 – Esquema representativo do processo de desenvolvimento do quadro de alveolite seca segundo Birn. Adaptado de Birn (1973).

Outros ativadores e proativadores de plasminogênio também podem contribuir com a produção de plasmina. Estes são classificados em diretos (fisiológicos) e indiretos (não fisiológicos), e subclassificados em intrínsecos e extrínsecos (Vezeau, 2000). Os ativadores diretos intrínsecos são originários de componentes do plasma, como o ativador dependente de fator XII ou fator Hageman e uroquinase. Já, ativadores diretos extrínsecos se originam fora do plasma e incluem ativadores de tecido e plasminogênio endotelial. Os ativadores indiretos incluem estreptoquinases e estafiloquinases, substâncias produzidas por bactérias que interagem com o plasminogênio e formam um complexo ativador que converte plasminogênio em plasmina (Vezeau, 2000; Blum, 2002; Serratì et al., 2006).

Outra teoria sobre a etiologia da AS foi proposta por Nitzan (1983). Ele apontou que a plasmina descrita por Birn não seria ativada por ativadores teciduais, e sim por um produto independente. Em particular, Nitzan disse que a bactéria *Treponema denticola* podia se multiplicar e fazer lise dos coágulos sanguíneos sem produzir os sintomas característicos da infecção, como vermelhidão, inchaço e

formação de pus e que já tinha sido isolada de alvéolos dentais doentes. *T. denticola* também possui atividade fibrinolítica parecida à da plasmina (Nitzan et al., 1978) e pode produzir odor fétido e sabor desagradável (Triegeer; Schlagel, 1991), como o que acontece na AS.

Diversas outras bactérias podem causar mudanças na formação e estabilidade do coágulo pela ativação da fagocitose e geração de mediadores inflamatórios, como o fator de necrose tumoral e interleucina-1, citocinas inflamatórias que interferem no processo de reparo (Hooley; Golden, 1995).

Outros estudos utilizando modelos experimentais de alveolite têm identificado outras espécies como o *Enterococcus* do grupo D, *Streptococcus viridians*, *Streptococcus* sem ser do grupo A, B e D, *Bacillus corineforme*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli* (De Melo Jr et al., 2002), *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus lactis*, *Neisseria*, *Corynebacterium* (MacGregor; Hart, 1970) e *Streptococcus mutans* (Rozanis et al., 1997).

Alem disso, fragmentos de osso e dente deixados no alvéolo, podem causar a atração leucocitária e a liberação de citocinas inflamatórias (Silva et al., 2004; Silva et al., 2007).

2.2.2 Fatores de risco

Vários fatores locais e sistêmicos têm sido descritos na literatura como fatores predisponentes, incluindo cirurgia traumática ou prolongada, infecção local pré-existente, fumo, uso de anticoncepcionais orais, desordens ósseas, radiação doenças sistêmicas como diabetes mellitus, problemas de coagulação, negligência dos cuidados pós-operatórios, higiene oral pobre, uso de vasoconstritores e quadros prévios de alveolite (Cardoso et al., 2010; Akinbami; Godspower, 2014; Rakhshan, 2015; Tarakji et al., 2015).

2.2.2.1 Sexo

Mediadores endócrinos poderiam interferir no reparo ósseo pós-exodontia e predispor a ocorrência da AS. Sweet e Butler (1978) observaram que alveolite seca ocorre em 4,1% das mulheres e em 0,5% dos homens que se submetem a exodontias. Outros estudos também têm mostrado que a AS parece ser menos frequente do 23º ao 28º dia do ciclo menstrual (Hooley; Golden, 1995) ou durante o período de menstruação (primeiros 7 dias do ciclo), quando o nível de estrogênios é baixo. O contrário acontece durante o período de ovulação (dia 13 ao 15 do ciclo menstrual), quando ocorre um pico no nível de estrogênio (Eshghpour; Nejat, 2013).

Além disso, o uso de anticoncepcionais orais parece aumentar em 1,8 vezes a incidência de AS em comparação a mulheres que não utilizam estes hormônios devido ao fato dos estrogênios poderem ativar o sistema fibrinolítico, causando lise do coágulo (Xu et al., 2015).

2.2.2.2 Trauma

Vários autores apoiam a relação entre o trauma cirúrgico e a alveolite seca (Birn, 1973; Colby, 1997; Vezeau, 2000). A curetagem excessiva ou a osteotomia sem os devidos cuidados são manobras cirúrgicas que podem acabar traumatizando o tecido ósseo alveolar (Bortoluzzi et al., 2008).

O trauma pode resultar em compressão do osso superficial do alvéolo e possível trombose do leito sanguíneo subjacente, reduzindo a perfusão. Este também pode reduzir a resistência do tecido e consequentemente gerar uma infecção por anaeróbios (Blum, 2002). Birn (1973) relaciona o dano celular à inflamação do osso alveolar e consequente liberação de mediadores químicos que aumentam a atividade fibrinolítica.

2.2.2.3 Tabagismo

Meechan et al. (1988) observou que o hábito de fumar diminui significativamente o preenchimento imediato do alvéolo com sangue, causando uma maior incidência de AS em fumantes “pesados” (>20 cigarros/dia) comparado com não fumantes. Sweet e Butler (1979) viram que a incidência de AS pode aumentar em 40% se o paciente fumar no dia da cirurgia ou durante as primeiras 24h após o procedimento.

O cigarro pode ter efeitos químicos e físicos. A nicotina, droga ativa do cigarro, é absorvida pela mucosa oral, atua como vasoconstrictor e aumenta a agregação plaquetária, aumentando o risco de trombozes microvasculares e isquemia periférica. O monóxido de carbono forma carboxihemoglobina no sangue, causando a redução do transporte de oxigênio e alterações no endotélio (Lawrence et al., 1984; Meechan et al. 1988). Fumar também pode causar a introdução de substâncias nocivas que podem agir como contaminantes da ferida cirúrgica (Cardoso et al., 2010) e remover o coágulo pela sucção e pressão negativa durante a inalação (Sweet; Butler, 1979).

2.2.2.4 Pericoronarite

Estudos revelaram que há maior risco de ocorrência de AS em pacientes que apresentaram episódios prévios de pericoronarite, em comparação a pacientes que nunca apresentaram este quadro e, além disso, há uma redução da incidência de AS quando é usada profilaxia antibiótica nestes pacientes (Vezeau, 2000; Peñarrocha et al., 2001; Cardoso et al., 2010).

2.2.2.5 Anestésicos com vasoconstritores

Os vasoconstritores adrenérgicos presentes em anestésicos locais também têm sido considerados fatores que contribuem com a etiopatologia da AS, e a literatura apresenta divergências com respeito a este assunto (Noroozi; Philbert, 2009; Cardoso et al., 2010).

Alguns estudos mostraram que pacientes que receberam anestesia local intraligamentar não apresentaram maior incidência de alveolite seca comparado com pacientes que receberam anestesia exclusivamente regional, e que, inclusive pacientes que se submeteram a cirurgia sob anestesia geral, desenvolveram este tipo de alveolite (Tsirlis et al., 1992; Blum, 2002). Porém, outros estudos mostraram que a injeção intraligamentar repetida de anestésicos aumenta o risco de AS, comparado ao risco em pacientes que receberam apenas anestesia por bloqueio regional (Meechan et al., 1987).

Os autores argumentam que os vasoconstritores, como a epinefrina, podem reduzir o sangramento e a tensão de oxigênio, prejudicando o reparo. Também citam que a epinefrina aumenta a fibrinólise, devendo-se evitar as injeções intraligamentares repetidas de anestésicos locais com vasoconstritores adrenérgicos (Noroozi; Philbert, 2009).

2.2.2.6 Higiene oral inadequada

Uma higiene oral ineficiente e a consequente contaminação do alvéolo também são fatores que favorecem a instalação de AS (Peñarrocha et al., 2001; Akinbami; Godspower, 2014). Por outro lado, Tjernberg (1979) provou no seu estudo, que um bom controle da placa bacteriana e higiene oral podem prevenir a incidência de AS após a remoção de terceiros molares mandibulares.

2.2.3 Conduas profiláticas

O cumprimento do protocolo para manutenção do campo operatório asséptico e o emprego de técnicas cirúrgicas atraumáticas são medidas universais para a prevenção de complicações como a AS. No entanto, o emprego de fármacos de uso local e sistêmico, como os antifibrinolíticos, antibióticos, analgésicos e antissépticos também têm sido sugeridos para a prevenção de AS (Cardoso, 2010).

Os antibióticos têm a habilidade de reduzir a incidência de alveolite seca e sua administração pré-operatória parece ser mais efetiva que a administração pós-operatória (Noroozi; Philbert, 2009). Apesar dos resultados positivos obtidos com o uso destes fármacos, não se recomenda o uso de antibióticos sistêmicos em todos os pacientes, mas apenas em aqueles que se encontram imunocomprometidos, com sintomatologia de doença sistêmica, linfadenopatia e história previa de AS e pericoronarite (Fazakerley; Field, 1991; Noroozi; Philbert, 2009).

Outros fármacos utilizados com o objetivo de evitar a lise do coágulo sanguíneo são os antifibrinolíticos. Um exemplo é o ácido para-hidroxibenzoico, que quando aplicado de forma tópica no alvéolo, conseguiu reduzir a incidência de alveolite seca, porém, seu efeito antibacteriano pode ter contribuído mais que seu efeito antifibrinolítico. Outro antifibrinolítico é o ácido tranexâmico que apresenta resultados mistos de efetividade (Vezeau, 2000; Blum, 2002). Dada à falta de comprovação científica das suas vantagens parece não ser recomendado o uso racional destes agentes (Blum, 2002).

Objetivando evitar o uso indiscriminado de antibióticos, as pesquisas também foram direcionadas à descoberta da eficácia dos antissépticos, como a clorexidina, na prevenção de AS. Haraji e Rakhshan (2014) recomendam a aplicação intra-alveolar de gel de clorexidina 0,2% para reduzir o risco de AS especialmente em pacientes com idade avançada, devido ao seu efeito antisséptico contra bactérias que realizam fibrinólise.

Outros autores recomendam a aplicação de curativos de revestimento intra-alveolares (Bloomer, 2000), porém, a ação local irritante de certos princípios ativos e

o atraso do reparo alveolar são bem documentados na literatura pelo qual esta conduta não seria indicada (Alexander, 2000).

Finalmente, um estudo recente demonstrou que a aplicação de fibrina rica em plaquetas obtida do sangue do próprio paciente, pode diminuir em até 90% a ocorrência de AS ao melhorar a retenção do coágulo, e ainda tem a vantagem de ser um material autógeno, solúvel e de baixo custo (Hoaglin; Lines, 2013), não obstante, ainda é pouco acessível.

2.2.4 Tratamento

Apesar de certos autores considerarem a alveolite seca como um processo autolimitante que evolui para a cura em um período de 5 a 10 dias (Navas; Mendoza, 2010), a sua ocorrência traz grande mal estar e necessidade de visitas frequentes ao dentista (45% dos casos requer até 4 visitas após a exodontia), o que se traduz em perdas econômicas para a sociedade (Vezeau, 2000; Kolokythas et al., 2010; Eshghpour; Nejat, 2013; Faizel et al., 2015). Isto exige que se tomem medidas para evitar a ocorrência de AS, e que sejam desenvolvidos tratamentos que, uma vez instalada a complicação, esta possa ser controlada o mais rápido possível mediante o manejo da dor e da infecção. Além da necessidade de proporcionar condições de bem estar para o paciente, o controle da AS é importante para evitar a ocorrência de complicações decorrentes da falta de tratamento, como a evolução para um quadro de osteomielite, especialmente em pacientes imunocomprometidos (Navas; Mendoza 2010).

Ao longo dos anos têm sido utilizados diversos materiais e fármacos para o tratamento da AS, porém não há evidência suficiente para afirmar que algum deles seja o melhor para esse fim (Kaya et al., 2011; Daly et al., 2012). Algumas condutas tópicas envolvem o uso de curativos de revestimento intra-alveolares. Outros autores apenas indicam a irrigação local com solução salina estéril, concomitante ao uso de analgésicos e antibióticos sistêmicos (Blum, 2002). A eleição do analgésico varia de antiinflamatórios não esteroidais à preparações baseadas em opioides, como o paracetamol com codeína, a hidrocodona ou a oxicodona (Noroozi; Philbert, 2009).

A maioria dos autores não sugerem a curetagem do alvéolo na tentativa de causar sangramento, porque isto pode aumentar a dor e levar à contaminação das camadas ósseas mais profundas (Betts et al., 1995; Colby, 1997; Blum, 2002).

Outra alternativa para o tratamento de AS é o uso do laser de baixa potência (Kaya et al., 2011; Eshghpour et al., 2015). Kaya et al. (2011) compararam o uso dos curativos Alvogyl® (eugenol, iodofórmio e butamben) e SaliCept® (acemannan - Aloe vera), com a aplicação de laser de baixa potência após anestesia, irrigação e curetagem. Eles encontraram que o SaliCept e o Alvogyl tiveram um efeito analgésico aceitável, porém, a aplicação de laser de baixa potência (7,64 J/cm², 0,1W, 60 seg, 6 J) teve o melhor efeito. Eshghpour et al. (2015) também afirmam que o laser de baixa potência é melhor que o Alvogyl para proporcionar um efeito analgésico nos dias posteriores ao início da alveolite.

O plasma rico em fatores de crescimento, obtido após a centrifugação do sangue do paciente, também já foi utilizado com o intuito de acelerar o reparo ósseo em pacientes com AS. Este plasma contém plaquetas, fatores de crescimento e fibrinogênio (Pal et al., 2013). No seu estudo, Pal et al. (2013) compararam a aplicação da pasta de óxido de zinco e eugenol (OZE) com o plasma rico em fatores de crescimento para o tratamento de AS e encontraram que o reparo ósseo foi mais rápido nos pacientes que receberam o plasma rico em fatores de crescimento, porém, o alívio de dor aconteceu mais rapidamente nos pacientes que receberam OZE.

2.2.4.1 Curativos Intra-alveolares

Os curativos de revestimento intra-alveolares podem conter substâncias antimicrobianas (como antibióticos e antissépticos) ou analgésicas (como anestésicos tópicos e compostos fenólicos) (Burgoyne et al., 2010; Bowe et al., 2011/2012; Daly et al., 2012). Algumas vantagens da aplicação de curativos intra-alveolares incluem (Alexander, 2000; Blum, 2002):

- Maior concentração local dos princípios ativos quando comparado àquela de uso sistêmico.
- Menos efeitos colaterais e desenvolvimento de resistência ao princípio ativo.
- Alívio mais rápido da dor, reduzindo o consumo de analgésicos.
- Desinfecção local e tamponamento mecânico para impedir que restos alimentares e outros debris penetrem no alvéolo.

Apesar das vantagens, o uso de muitos curativos intra-alveolares ainda é empírico e sua eficácia relatada em reduzir o desconforto do paciente muitas vezes é baseada na experiência clínica pessoal circunstancial, sendo a evidência experimental fraca pela falta de estudos (Alexander, 2000). Ainda, a incidência de lesões secundárias ao uso de curativos intra-alveolares para tratar alveolite é desconhecida. Existem relatos de casos que descrevem a ocorrência de complicações locais como celulite (Wegenast, 2013), neurite (Zuniga; Leist, 1995), reações de corpo estranho (Mainous, 1974; Moore, Brekke, 1990), miosferulose (complicação do reparo dos tecidos pela ação de lipídeos em eritrócitos que extravazaram) (Lynch et al., 1984; Belfiglio et al., 1986; Houston et al., 2002) e osteomielite crônica (Navas; Mendoza, 2010).

2.2.4.1.1 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são encontrados espalhados na natureza e constituem uns dos mais potentes antioxidantes presentes nos alimentos (Haghighat et al., 2012). Estes são amplamente utilizados na odontologia como sedativos da polpa dentária, desinfetantes, medicação intracanal e no tratamento de AS (Chang et al., 2000).

Todos os fenóis têm efeito bactericida e bacteriostático de forma dose dependente, e em geral as bactérias Gram positivas são mais suscetíveis que as Gram negativas, e estas últimas mais suscetíveis que as micobactérias devido à diferença estrutural da parede celular (Block, 2001). Os fenóis atuam

predominantemente aumentando a permeabilidade da membrana celular, a qual constitui uma barreira entre o citoplasma e o ambiente extracelular e regula a entrada e saída de moléculas da célula. A interação destes agentes com a membrana celular se deve à interação das moléculas com a porção hidrofóbica da bicamada fosfolipídica (Denyer, 1995). Em concentrações maiores, além do dano à membrana celular, os fenóis podem causar inibição enzimática e finalmente produzir a quebra, coagulação e liberação dos constituintes intracelulares, o início da autólise e a morte celular (Denyer, 1995; Block, 2001; Park et al., 2001).

Sua ação analgésica é devido à inibição dos canais de cálcio de alta voltagem nos neurônios primários aferentes (Lee et al., 2005), a inibição das correntes elétricas dos canais de sódio voltagem dependentes (Park et al., 2006), à inibição da biossíntese de PGI₂ (Hirafuji, 1984), à inibição da lipoxigenase e ciclooxigenase (Dohi et al., 1991), pela possível ação modulatória da neurocinina substância P e da citocina pró-inflamatória TNF-alfa (fator de necrose tumoral alfa) (Daniel et al., 2009) e pelo mecanismo de dessensibilização nervosa feita pelos agonistas vanilóides que se ligam ao receptor vanilóide do tipo 1 (TRPV1, *transient receptor potential vanilloid 1*) (Yang et al., 2003; Kissin, 2008; Daniel et al., 2009; Park et al., 2009).

O bloqueio da condução de potenciais de ação em neurônios sensoriais via ligação a receptor vanilóide, parece ser uma explicação plausível e cada vez melhor estudada e comprovada. A estrutura similar do eugenol, guaiacol e outros compostos fenólicos com a capsaicina, sugere que estes agentes devem compartilhar os mecanismos que produzem efeitos analgésicos (Yang et al., 2003). Agonistas vanilóides liberam uma variedade de neuropeptídeos pró-inflamatórios (peptídeo relacionado ao gene de calcitonina, colecistocinina, substância P, galanina e somatostatina) de terminações de nervos sensoriais e iniciam uma inflamação neurogênica. A excitação destes neurônios por agonistas vanilóides é seguida por um estado refratário no qual os neurônios não respondem a vários estímulos, incluindo outro desafio com vanilóides. O efeito analgésico dos vanilóides é dose dependente, e pode durar de algumas horas a algumas semanas (Kissin, 2008).

O composto fenólico mais utilizado como princípio ativo de curativos intra-alveolares é o eugenol, encontrado, por exemplo, na pasta de óxido de zinco e eugenol (OZE) (Fazakerley; Field, 1991; Pal et al., 2013) e no Alvogyl® (eugenol,

butamben, iodofórmio e fibras de Penghawar djambi) (Bowe et al., 2011/2012). O eugenol é um óleo essencial extraído do cravo-da-Índia que tem sido utilizado na odontologia como antisséptico e analgésico (Daniel et al., 2009). Segundo Moon et al. (2011) o eugenol pode ser usado como agente natural antibacteriano contra bactérias cariogênicas e periodontopatógenos.

O guaiacol (Gu) ou 2-Methoxyphenol é outro composto fenólico que tem sido utilizado na odontologia como antisséptico e como coadjuvante no tratamento de dor de origem pulpar (Mimura et al., 2005). É encontrado no café torrado, vanilina, ácido vanílico e outros extratos da baunilha (Haghighat et al., 2012). Igualmente a outros compostos fenólicos, possui propriedades analgésicas (Hirafuji, 1984; Park et al., 2009), antioxidantes (Mimura et al., 2005; Galano et al., 2012), antimicrobianas (Burt, 2004; Fitzgerald et al., 2005; Ouwehand et al., 2010; Liu et al., 2011) e possivelmente osteoindutoras (Kato et al., 2010). Seu uso no tratamento de alveolite seca tem sido relatado em guias terapêuticos (Erickson; Wilkison, 1960; Bazerque, 1976; Alexander, 2000; Ciancio; Bourgault, 1984; Figueiredo; Aguiar, 2001; Gregori; Campos, 2004), porém sem evidências científicas que corroborem ou contraindiquem seu uso para o tratamento de AS.

Pela baixa frequência de exposição e dosagem, o uso clínico de compostos fenólicos como a guaiacol, é geralmente seguro. Chang et al. (2000) encontraram que a concentração de guaiacol que diminui 50% do conteúdo de DNA celular em fibroblastos da polpa humana é de 9,8 mM (1,22 mg/mL), superior à do eugenol que é de 0,9 mM (0,15 mg/mL). Além disso, o guaiacol não causa quebra nas cadeias de DNA nestas células, mostrando que pode ser citotóxico dependendo da concentração, mas não é genotóxico. Já Kobayashi et al. (2013) acharam uma concentração letal 50 (LC₅₀) de 0,78 mM (0,1 mg/mL), o que também foi significativamente superior à do eugenol que foi de 0,5 mM (0,08 mg/mL) em células da polpa humana (D824).

Kato et al. (2010) observaram que nas células D824, o guaiacol (0,24 - 2,43 mM ou 0,03 - 0,3 mg/mL) estimula a expressão de mRNA de genes associados à osteogênese e dentinogênese reparativa, especificamente dos genes que codificam a fosfatase alcalina, sialoproteína óssea e colágeno tipo I, e que isto acontece já nas primeiras 24 h após o início do tratamento das células com guaiacol. O colágeno tipo

I é o principal componente da matriz extracelular óssea e é responsável pela integridade estrutural e a resistência mecânica do tecido. A fosfatase alcalina e a sialoproteína óssea são componentes não colágenos que participam na formação e remodelação óssea e são consideradas marcadores iniciais da diferenciação osteoblástica (Alford; Hankenson, 2006; Silva et al., 2008; Alford; Hankenson, 2015)

Este efeito osteoindutor ainda pode ter várias explicações. Acredita-se que graças ao seu efeito antioxidante o guaiacol aumenta a incorporação de [^3H] timina em células murina de linhagem osteoblástica MC3T3-E1 (Yazaki et al., 1993), diminui o nível de radicais hidroxila gerados pela reação de Fenton *in vitro* (Mimura et al., 2005) e mostra efeito limpador de radicais em osteoblastos da calvária de ratos (Moriguchi et al., 2007).

Além disso, o guaiacol consegue inibir a ativação do receptor ativador do fator nuclear kappa-B (RANK), que quando induzido por RANKL (Ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa-B) produz diferenciação osteoclástica de células da medula óssea de ratos (Moriguchi et al., 2007), assim como inibir a ativação induzida por lipopolissacarídeo bacteriano do mesmo fator kappa-B e a expressão de ciclooxigenase-2 (COX-2) em linhagem de células de macrófago murina (Murakami et al., 2007). Como a prostaglandina E2 (PGE2) parece estimular osteoclastogênese mediante a ação dupla de inibir a produção de osteoprotegerina (proteína com potente ação anti-osteoclastogênica) e de estimular a produção de RANK (Aubin; Bonnellye, 2000), a diminuição na produção de PGE2 via inibição da COX-2 pelo guaiacol pode afetar a osteoclastogênese. O guaiacol também pode estimular diretamente, em maior proporção, a atividade osteogênica que a osteoclastogênica (Kato et al., 2010).

O efeito antioxidante do guaiacol também é muito importante já que é conhecido que o estresse oxidativo pode contribuir com o desenvolvimento de certas doenças nos indivíduos. Este estresse é desencadeado por um excesso de radicais livres que atingem as células por mecanismos exógenos ou endógenos, como a ativação de células do sistema imune, isquemia, infecção, câncer e envelhecimento precoce (Galano et al., 2012). Galano et al. (2012) estudaram as propriedades antioxidantes do guaiacol e seus derivados e comprovaram que a maior responsável

pela ação de limpeza de radicais peroxil em solução aquosa ($\text{pH} \geq 6$) é a sua capacidade de induzir a transferência sequencial de prótons e elétrons.

Por outra parte, a literatura aponta que o mecanismo de ação antibacteriano do guaiacol livre deve ser similar ao dos outros compostos fenólicos, o qual é influenciado pela característica hidrofóbica intrínseca da molécula e que leva a uma alteração da membrana citoplasmática dos microrganismos, perturbando a força motriz de prótons, o fluxo de elétrons, transporte ativo e coagulação do conteúdo das células (Liu et al., 2011). Ouwehand et al. (2010) observaram que certas bactérias patogênicas do trato gastro intestinal são sensíveis ao guaiacol, incluindo *Escherichia coli*. Liu et al. (2011) encontraram que a bactéria Gram positiva *Bacillus subtilis* também apresenta sensibilidade ao guaiacol, assim como dezoito diferentes cepas de leveduras e bolores testados por Fitzgerald et al. (2005).

Apesar de todas as propriedades benéficas do Gu, ele é de difícil manipulação devido a sua baixa estabilidade, alta volatilidade e sensibilidade à oxidação (National Center for Biotechnology Information, 2004a; Kayaci et al., 2013), podendo necessitar de um carreador ou adjuvante que melhore sua estabilidade e prolongue seus efeitos.

2.3 COMPOSTOS DE INCLUSÃO COM CICLODEXTRINAS

Os sistemas de liberação controlada estão sendo amplamente utilizados pela indústria farmacêutica porque oferecem inúmeras vantagens, dentre elas a liberação de fármacos de forma mediata durante um tempo pré-estabelecido, a manutenção da concentração dentro da faixa terapêutica durante um tempo maior, a redução do número de doses necessárias (Figura 2.2), aumentando a adesão do paciente ao tratamento, e a diminuição de efeitos colaterais. Além disso, pode proporcionar uma entrega mais eficiente do fármaco, atingindo áreas com barreiras de difícil acesso, como a barreira hematoencefálica e as junções epiteliais oclusivas (ex: epitélio intestinal), e locais onde a solubilidade de fármacos hidrofóbicos esteja prejudicada. Exemplos comuns de sistemas de liberação controlada são as nanopartículas,

lipossomas, micelas, dendrímeros e macromoléculas, como as ciclodextrinas (CDs) (Cortés, 1999; Bawa, 2008; Felice et al., 2014).

Figura 2.2 – Esquema ilustrativo do perfil da concentração do fármaco em função do tempo, comparando a administração pela via convencional e em sistema de liberação controlada. Adaptado de Celanese Corporation (2015).

As ciclodextrinas (CD), também conhecidas como cicloamiloses, cicloglucanos ou dextrinas de Schardinger, são oligossacarídeos cíclicos compostos por unidades de glicose. Foram descobertas por Villiers em 1891, no entanto, sua descrição, preparação e isolamento se devem a Schardinger que fez a primeira descrição detalhada em 1903 (Barreto; Cunha-Filho, 2008; Zhang; Ma, 2013). Estruturalmente são produzidos pela ciclização enzimática do amido, catalizada pela ação da enzima ciclodextrina-glicosil-transferase, que apresenta a propriedade de transformar a cadeia linear de amido em moléculas cíclicas, obtendo as ciclodextrinas naturais α , β , e γ -ciclodextrinas (compostas por 6, 7 e 8 unidades de glicose, respectivamente) e pequenas quantidades de outras dextrinas (Davis; Brewster, 2004; Barreto; Cunha-Filho, 2008; Venturini et al., 2008; Zhang; Ma, 2013) (Figura 2.3).

Fonte: Venturini et al. (2008, p. 360)

Figura 2.3 – Representação esquemática da estrutura das ciclodextrinas naturais: α-, β- e γ-ciclodextrina

Entre os três derivados, a β-ciclodextrina (βcd) parece ser a mais vantajosa para a complexação de agentes contendo anéis aromáticos devido ao tamanho da sua cavidade, além de ser a mais barata. Porém, a β-ciclodextrina é a menos solúvel em água (Davis; Brewster, 2004; Pinho et al., 2014). Esta CD foi considerada uma substância não-tóxica quando administrada oralmente, porém não pode ser administrada por via parenteral devido à sua baixa solubilidade, que pode causar a precipitação de microcristais nos rins, e porque tem alta afinidade pelo colesterol, formando complexos que se acumulam nos rins (Irie; Uekama, 1997; Davis; Brewster, 2004).

As cadeias de glicose das CDs formam estruturas tronco-cônicas com cavidades hidrofóbicas, devido à presença dos esqueletos de carbono no seu interior, e com uma superfície externa hidrofílica devido à presença de grupos OH. Dentro das cavidades ocorre o aprisionamento de uma molécula ou radical lipofílico (hóspede), pouco solúvel em água, formando um complexo solúvel (Figura. 2.4). Esta estrutura permite a formação de complexos de inclusão não covalentes, porém, estáveis com grande diversidade de moléculas (Rajewski et al., 1996; Venturini et al., 2008; Zhang; Ma, 2013).

Figura 2.4 – Representação esquemática da estrutura tronco cônica das ciclodextrinas, sua cavidade interna apolar e superfície externa polar. A molécula hóspede será aprisionada dentro da cavidade hidrofóbica. Adaptado de Barreto e Cunha-Filho (2008, p. 631).

As forças responsáveis pela formação do complexo de inclusão são basicamente do tipo não covalente incluindo ligações eletrostáticas, pontes de hidrogênio, forças de van der Waals, interações hidrofóbicas e transferência de cargas. A formação do complexo fármaco:CD é um processo reversível, no qual a velocidade de reversão depende principalmente da força de interação entre os componentes, do tipo de ligação entre o fármaco e a CD e da razão molar entre os compostos (Rajewski; Stella, 1996; Kurkov; Loftsson, 2013). A dissolução simples dos complexos sólidos e a diluição do meio aquoso de complexação são as principais forças que levam à liberação do fármaco do complexo de inclusão (Kurkov; Loftsson, 2013).

A formação de compostos de inclusão oferece uma nova conformação espacial que pode conferir diferentes propriedades ao fármaco encapsulado (Venturini et al., 2008). A indústria farmacêutica utiliza a formação de complexos de inclusão com CD com o objetivo de melhorar as características finais dos fármacos como a solubilidade, estabilidade e fotoestabilidade, mascarar odores e sabores desagradáveis, reduzir a volatilidade, proteger contra oxidação, reduzir a toxicidade, assim como para facilitar a absorção e liberação dos princípios farmacologicamente ativos (Davis; Brewster, 2004; Barreto; Cunha-Filho, 2008; Macaev et al., 2013; Zhang; Ma, 2013; Bilia et al., 2014). Além disso, a utilização de CDs é muito atraente

devido a seu baixo custo, baixa toxicidade e baixa imunogenicidade (Irie; Uekama; 1997; Kurkov; Loftsson, 2013; Zhang; Ma, 2013).

Recentemente, também foi observado que as CDs influenciam positivamente no efeito antimicrobiano de certos fármacos (Cortés et al., 2001; Zhang et al., 2008; Ragle et al., 2010; Teixeira et al., 2013, Macaev et al., 2013; Bilia et al., 2014; Suárez et al., 2014; Teixeira et al., 2015). Estudos feitos com o complexo de inclusão clorexidina: β cd demonstraram que o efeito antimicrobiano do complexo foi maior que o efeito da clorexidina pura frente à *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Streptococcus mutans*, *Eubacterium lentum*, *Fusobacterium nucleatum*, *Bacteroides fragilis* e *Candida albicans*.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo principal deste estudo foi verificar a formação de um complexo de inclusão entre o guaiacol e a β -ciclodextrina (Gu: β cd), e ainda avaliar, *in vitro* e *in vivo* (rato), as propriedades biológicas do guaiacol puro e complexado visando seu uso no tratamento de alveolite seca.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Realizar o preparo do complexo de inclusão Gu: β cd e sua caracterização físico-química, através da análise dos espectros de ressonância magnética nuclear, para comprovação da complexação das duas moléculas.

Avaliar as propriedades bacteriostáticas e bactericidas do Gu puro e complexado frente a *E. coli*, *S. aureus*, *S. mitis*, *S. mutans*, *S. sanguis* e *A. actinomycetemcomitans* pelo método da microdiluição em caldo.

Verificar a citotoxicidade do Gu puro e complexado em osteoblastos isolados de calvária de ratos pelo ensaio colorimétrico MTT.

Observar os aspectos histológicos do processo de reparo do alvéolo de molar de ratos com alveolite seca induzida, sob ação do complexo Gu: β cd.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 FASE I: PREPARO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO COMPLEXO DE INCLUSÃO

O preparo e a caracterização do composto foram realizados no Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química (Laboratório de Encapsulamento Molecular e Biomateriais) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

4.1.1 Preparo do composto de inclusão guaiacol: β -ciclodextrina (1:1)

O preparo do complexo de inclusão na razão molar de 1:1, seguiu o método de liofilização previamente descrito na literatura (Cortés et al., 2001; Teixeira et al., 2013). Para isto, em primeiro lugar foram realizados cálculos estequiométricos para determinar a quantidade necessária de cada componente a ser utilizado, levando em conta o peso molecular (124,1 g) e densidade (1,112 g/mL) do guaiacol (Gu) e o peso molecular (1135 g/Mol) da β cd (Tabela 4.1).

Definimos que utilizando 500 mg de Gu seria possível obter uma quantidade suficiente de composto para a realização dos próximos testes, e a partir desta quantidade de Gu, com uma regra de três foi determinada a quantidade de β cd a ser utilizada para obter um complexo de inclusão na razão molar de 1:1:

$$\begin{array}{ll} 124,1 \text{ g Gu} & 1135 \text{ g } \beta\text{cd} \\ 500 \text{ mg Gu} & X \text{ mg } \beta\text{cd} \end{array}$$

$$X = \frac{500 \text{ mg} \times 1135 \text{ g}}{124,1 \text{ g}}$$

$$X = 4572,92 \text{ mg de } \beta\text{cd}$$

	Guaiacol	β-ciclodextrina
Fórmula molecular	C ₇ H ₈ O ₂	C ₄₂ H ₇₀ O ₃₅
Estrutura molecular
Massa molecular	124,1 g/mol	1135 g/mol
Solubilidade em H ₂ O	1 g / 60-70 mL	18,5 mg/mL (25 °C)
Ponto de fusão	27-29 °C	290 °C
Ponto de ebulição	204-206 °C	-
Densidade	1,112 g/mL	-

Tabela 4.1 – Propriedades físico-químicas dos componentes

National Center for Biotechnology Information (2004a, b), Sigma-Aldrich (2005); U.S. Pharmacopeial Convention (2007), Barreto; Cunha-Filho (2008, p.630).

Uma vez determinada a quantidade de βcd (Mchem Farma Group Ltd., Xiamen, China), esta foi pesada em balança analítica (Denver Instrument, Bohemia, NY, USA) e colocada em Béquer de vidro, onde foram adicionados 100 mL de água Milli-Q (EMD Millipore Corporation, Billerica, MA, USA). Esta mistura permaneceu no agitador magnético Biomixer 78HW-1 (Biogen, São Paulo, SP, Brasil) sob agitação constante durante 1 h a 50 °C, até a dissolução completa da βcd na água. Posteriormente, o Béquer foi protegido externamente com papel alumínio para receber o Gu (fotossensível). Já que o Gu (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA) se encontrava na forma líquida, foi obtida a equivalência de 500 mg em mL:

$$Volume = \frac{massa}{densidade}$$

$$Volume = \frac{500 \text{ mg}}{1112 \text{ mg/mL}}$$

$$Volume = 0,44964 \text{ mL} = 449 \text{ } \mu\text{L}$$

Desta forma foi adicionada a quantidade de 449 μ L de Gu na solução de β cd com ajuda de micropipeta (LabMate Soft, Varsóvia, Polônia). Em continuação, o Béquer foi tampado com duas camadas de parafilm (Bemis, Oshkosh, WI, USA) e papel alumínio. Esta mistura permaneceu em agitação constante durante 24 h a temperatura ambiente.

Após 24 h, a suspensão formada foi colocada em tubos de Falcon de 50 mL (Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Suíça) utilizando no máximo 60% da sua capacidade, protegidos com papel alumínio e tampados com papel filtro (VWR International, Radnor, PA, USA). Estes tubos foram congelados com nitrogênio líquido (8 min) e colocados no liofilizador (Liotop K105, Liobras Ind. Com., São Carlos, SP, Brasil) (Figura 4.1), onde permaneceram durante 5 dias para secagem por sublimação, obtendo um pó de Gu: β cd (Figura 4.2).

Figura 4.1 - Liofilizador Liotop K105

Figura 4.2 - Pó de Gu: β cd após a liofilização

4.1.2 Caracterização do composto de inclusão: comprovação da complexação molecular

4.1.2.1 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A ressonância magnética nuclear é uma técnica analítica utilizada para determinar a estrutura dos compostos químicos, permitindo a distinção entre os átomos contidos numa mesma molécula ou conjunto de moléculas, sua interação e disposição espacial (Hore, 2015). No presente trabalho, a RMN foi utilizada com a finalidade de comprovar a inclusão do guaiacol na molécula de β -ciclodextrina. Os espectros de RMN foram obtidos utilizando o experimento unidimensional de ^1H e o bidimensional $^1\text{H}/^1\text{H}$ 2D-ROESY (*Rotating-frame Overhauser Spectroscopy*).

O experimento do ^1H permite observar as distintas frequências de ressonância dos átomos de hidrogênio presentes na molécula. O $^1\text{H}/^1\text{H}$ 2D-ROESY permite estabelecer a interação espacial entre o Gu e a ciclodextrina no composto de inclusão.

Para os dois experimentos foi utilizado o espectrômetro Bruker® Advance DRX-400 (Bruker Corporation, Billerica, MA, USA) de 400 MHz, pertencente ao Departamento de Química/UFMG. Utilizou-se DMSO- d_6 como solvente de preparação das amostras, TMS como padrão interno, bobina de gradiente z e temperatura de 300 K. O solvente deuterado utilizado possui pureza isotópica mínima de 99,5 % de deutério (D) fornecido pela Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, USA). As amostras foram preparadas em tubos próprios de 8,00 polegadas de comprimento e 5 mm de diâmetro externo.

O experimento unidimensional de ^1H foi realizado em sonda de 5 mm dual $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ de detecção direta e o bidimensional de 2D-ROESY em sonda de 5 mm multinuclear de detecção inversa. Prévio a análise do experimento bidimensional 2D-ROESY, o espectro de ^1H da βcd foi atribuído segundo o trabalho de Schneider et al. (1998).

4.2 FASE II: ENSAIOS *IN VITRO*

4.2.1 Ensaios de citotoxicidade

O experimento de citotoxicidade foi realizado no Departamento de Química da UFMG. A utilização de células de origem animal está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal e tem a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA – UFMG) sob o protocolo n° 109/2014 de maio de 2014 (Anexo A).

4.2.1.1 Isolamento de osteoblastos primários

Todos os procedimentos foram realizados dentro de capela de fluxo laminar Tipo II (Labconco, Kansas City, MO, USA). Foram sacrificados 5 ratos Wistar neonatos (até 5 dias de vida) provenientes do Biotério da Faculdade de Farmácia da UFMG, com dose letal de quetamina Dopalen® (200 mg/kg de peso) associada a xilazina Anasedan® (CEVA, Paulínia, SP, Brasil) (30 mg/kg de peso) por via intraperitoneal. Após a morte do animal, os corpos foram depositados em Béquer com solução de polivinilpirrolidona-iodo (Indústria Farmacêutica Rioquímica, São José do Rio Preto, SP, Brasil) para antissepsia durante 5 min.

A incisão na pele dos animais foi realizada com uma tesoura Iris, começando na orelha direita, passando pela região supraorbital e terminando na orelha esquerda. O retalho mucoperiosteal foi deslocado em direção caudal, expondo a calvária do rato. Com outra tesoura Iris foi removida a parte óssea correspondente à região dos ossos parietais e frontal. Os fragmentos removidos foram colocados em placa de Petri estéril contendo tampão fosfato salino PBS (LGC Biotecnologia, Cotia, SP, Brasil) com ajuda de pinça Adson. As superfícies foram friccionadas com espátula estéril a fim de remover os restos de periósteo aderidos ao osso e os fragmentos de calvária foram fracionados em pedaços menores (Figura 4.3).

Figura 4.3 – Sequência de remoção de calvária de rato para isolamento de osteoblastos primários. (A) Rato Wistar neonato; (B) Anestesia intraperitoneal; (C) Antissepsia; (D) Incisão orelha-orelha; (E) Descolamento do retalho e exposição de osso de calvária; (F) Remoção de fragmento de calvária

Os pequenos fragmentos foram colocados em tubo de Falcon contendo tripsina 1% - EDTA (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA), onde permaneceram durante 15 min. Após este tempo, foi descartado o sobrenadante e foram feitos banhos sequenciais de 20 min com uma solução de collagenase 0,2%, contendo 0,06 g de collagenase (Gibco™ Invitrogen Co., Grand Island, NY, USA) e 30 mL de PBS. O primeiro sobrenadante foi descartado porque contém alta proporção de fibroblastos e hemácias. O segundo sobrenadante foi colhido e centrifugado durante 5 min a 1400 rpm em centrífuga (Sorvall™ RC6 Plus, Thermo Fisher Scientific, Asheville, NC, USA). Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi recolhido.

Repetiu-se o processo de cultura com collagenase e centrifugação por mais 2 vezes. Após a obtenção do terceiro pellet, foram adicionados 5 mL de meio RPMI suplementado e colocado em garrafa para cultura de células (TPP, Trasadingen, Suíça). Este meio suplementado contém 10% de soro fetal bovino, 1% de solução de antibiótico/antimicótico (penicilina, estreptomicina e anfotericina B) (Gibco™, Invitrogen Co., Grand Island, NY, USA) e 89% de meio RPMI (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA). A garrafa foi levada à incubadora de CO₂

Heracell™ 150i (Thermo Scientific, Langenselbold, Alemanha), onde permaneceu durante 72 h para crescimento a 37 °C, com 5% de CO₂ e com troca do meio de cultura a cada 24 h.

Após o tempo de crescimento, a garrafa foi retirada da estufa, e o sobrenadante foi descartado. Posteriormente foi feita a adição de PBS para lavagem das células, seguida da colocação de tripsina na quantidade suficiente para cobrir o fundo da garrafa. A garrafa com tripsina foi deixada na incubadora durante 3 min para estimular a separação das células. Em continuação o conteúdo da garrafa foi colocado em tubo de Falcon, onde foram adicionados 3 mL de meio de cultura para inativar a tripsina. Em seguida procedeu-se à nova centrifugação da amostra (1400 rpm durante 5 min), descarte do sobrenadante e ressuspensão do pellet com 1 mL de meio de cultura para contagem em câmara de Neubauer.

4.2.1.2 Contagem de células em câmara de Neubauer

50 µL da suspensão celular de osteoblastos, previamente homogeneizada, foram transferidos para um Eppendorf onde também foram adicionados 150 µL do corante Azul de Tripano 0,2% (Dinâmica, Diadema, SP, Brasil), obtendo uma diluição de 1/4. Após misturar o conteúdo do Eppendorf, colheu-se uma alíquota de 10 µL e depositada na câmara de Neubauer (Polylabo, Strasbourg, França) com a ponteira da pipeta encostada na borda da lamínula que a cobre (preenchimento por capilaridade). Mediante observação no microscópio de luz (Bel Photonics, Osasco, SP, Brasil), as células foram contadas nos quatro quadrantes externos da câmara, sem considerar as células que encostaram nas bordas externas (linhas em vermelho na Figura 4.4).

Para obter o número de células por mL, utilizou-se a fórmula do fabricante da câmara de Neubauer:

$$n^{\circ} \text{ de células/mL} = \frac{n^{\circ} \text{ total de células}}{n^{\circ} \text{ de quadrantes contados}} \times \text{fator de diluição} \times 10.000$$

Figura 4.4 - Ilustração das células vistas ao microscópio de luz na câmara de Neubauer Volume/quadrante= $0,1 \text{ mm}^3$. As células em azul foram consideradas na contagem, enquanto que as células com borda vermelha foram excluídas por estarem fora dos quadrantes de contagem ou encostando nas linhas externas (vermelhas). As setas e os números em roxo representam a ordem em que foi feita a contagem. Adaptado de Celeromics (2008).

A câmara de Neubauer mostra o número de células por $0,1 \text{ mm}^3$ ($0,0001 \text{ mL}$), de tal forma que para determinar o número de células por mL é necessário multiplicar por 10000.

Para obter uma suspensão com o número de células desejadas, utilizou-se a seguinte fórmula:

$$\frac{n^{\circ} \text{ de células/mL da solução original}}{\text{concentração de células desejada/mL}} \times \text{volume inicial} = \text{volume final}$$

Assim, a suspensão inicial de células foi diluída com meio de cultura RPMI suplementado para chegar na concentração desejada de 9×10^3 células/ mL . Destaca-se que a contagem em câmara de Neubauer foi realizada apenas para obter uma solução com um número conhecido de células.

4.2.1.3 Preparação das placas

Em primeiro lugar foram preparadas soluções com os fármacos Gu, Gu:βcd e βcd na concentração de 10 mM:

- Solução de guaiacol:
 - (1) 20 μL de guaiacol + 1980 μL de meio de cultura RPMI suplementado;
 - (2) 1,115 mL da solução (1) + 8,885 mL de meio de cultura RPMI suplementado;
- Solução de β-ciclodextrina: 113,5 mg de βcd + 10 mL de meio de cultura RPMI suplementado;
- Solução de guaiacol:β-ciclodextrina: 125,9 mg de Gu:βcd + 10 mL de meio de cultura RPMI suplementado;

A partir das soluções de 10 mM obtiveram-se soluções com as concentrações de 2 mM, 1 mM, 0,5 mM, 0,25 mM e 0,125 mM de cada fármaco.

Em placas de 96 poços (TPP, Trasadingen, Suíça) foram colocados 100 μL da suspensão de células preparada no item 4.2.1.2 (9×10^3 células/mL) em cada poço. Posteriormente, foram colocados 100 μL/poço das soluções dos fármacos nas diferentes concentrações. Cada concentração foi testada em hexaplicata, em dois momentos independentes. Poços com células, sem a presença de nenhum fármaco, também foram incorporados na placa (controle de crescimento), além de poços contendo unicamente meio de cultura (brancos). Os poços não utilizados foram preenchidos com 100 μL de PBS. O apêndice A mostra a distribuição dos fármacos e dos controles nas placas de cultura. As placas permaneceram na incubadora durante 48 horas (37 °C e 8% de CO₂) para posteriormente ser realizado o teste de MTT.

4.2.1.4 Ensaio de viabilidade celular MTT

O ensaio de viabilidade celular MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-brometo de difeniltetrazólio) é baseado na captação do MTT apenas por células viáveis, onde ocorre a redução dos sais de tetrazolium a cristais de formazan pela ação das desidrogenases mitocondriais. Os cristais de formazan são compostos púrpuras que podem ser detectados por espectrofotometria e a quantidade de cristais presente é diretamente proporcional ao número de células viáveis (van Meerlo et al., 2011).

Para realizar o ensaio, em primeiro lugar foi preparada uma solução de MTT (Invitrogen Molecular Probes, Eugene, OR, USA) solubilizado em PBS (5 mg/mL). A seguir, o meio de cultura das placas retiradas da incubadora foi desprezado e as células foram lavadas 2 vezes com PBS (100 µL/poço) para remoção dos fármacos e do meio de cultura RPMI. Em seguida foram colocados 100 µL de meio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA) sem vermelho de fenol em todos os poços. Foram acrescentados 10 µL da solução de MTT em cada poço (inclusive nos brancos). As placas foram envolvidas em papel alumínio devido à fotossensibilidade do MTT e permaneceram novamente na incubadora durante 3 h.

Para dissolução dos cristais de formazan e permitir a visualização da coloração púrpura, foi preparada uma solução contendo 1 g de dodecil sulfato de sódio (SDS) (Biotecnologia, Cotia, SP, Brasil) em 10 mL de ácido clorídrico 0,01 M. Após as 3 h de tratamento com a solução de MTT, 100 µL da solução de SDS foram colocados em cada poço e esperadas 18 horas para realizar a leitura das placas em espectrofotômetro Multiskan Spectrum (Thermo Fisher Scientific, Vantaa, Finlândia) a 570 nm. O aparelho captou a absorbância de cada poço e automaticamente fez a subtração da absorbância dos brancos (absorbância dos reagentes: meio de cultura + MTT + SDS).

Para obtenção da percentagem de viabilidade celular, os grupos teste foram comparados aos controles de crescimento:

$$\% \text{ de viabilidade celular} = \frac{\text{absorbância do grupo teste}}{\text{média de absorbâncias controle de crescimento}} \times 100$$

A citotoxicidade foi avaliada tal como descrito por Dahl et al. (2006) e Kong et al. (2009), baseada na viabilidade celular em relação aos controles, com os seguintes critérios:

- Não-citotóxico: > 90% de viabilidade celular
- Levemente citotóxico: 60-90% de viabilidade celular
- Moderadamente citotóxico: 30-59% de viabilidade celular
- Severamente citotóxico: ≤30% de viabilidade celular

4.2.1.5 Análise estatística

Uma distribuição normal e homogênea dos dados foi assumida após a aplicação dos testes de Kolmogorov-Smirnov e de Bartlett. Para comparar as diferentes concentrações de Gu (10 mM – 0,125 mM) foi utilizado ANOVA 1 fator de variação com o teste auxiliar de Tukey ($\alpha = 5\%$). Para comparar os diferentes fármacos nas diferentes concentrações (1 mM – 0,125 mM) foi utilizado ANOVA 2 fatores de variação e o teste auxiliar de Bonferroni ($\alpha = 5\%$), tendo como fatores de variação o fármaco e a sua concentração (GraphPad Prism 5, GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA).

4.2.2 Ensaios microbiológicos

Os testes microbiológicos foram feitos no Laboratório de Pesquisa da Faculdade de Odontologia da UFMG. Neste estudo foi utilizada a técnica da microdiluição em caldo para a obtenção da concentração inibitória 90 e 50 (MIC₉₀ e MIC₅₀), seguindo as recomendações do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2006). O MIC₉₀ é definido como a concentração necessária para inibir 90%

do crescimento bacteriano comparado a um controle não tratado que apresenta 100% de crescimento. O MIC₅₀ é a concentração necessária para inibir 50% do crescimento bacteriano comparado a esse controle.

As cepas bacterianas utilizadas foram provenientes da coleção biológica da Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ (Rio de Janeiro, RJ, Brasil): *Escherichia coli* (*E. coli*) ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) ATCC 29213, *Streptococcus mitis* (*S. mitis*) ATCC 49456, *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) ATCC 25175, *Streptococcus sanguis* (*S. sanguis*) ATCC 10557 e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A.a*) ATCC 29522.

4.2.2.1 Preparo de meios de cultura e solução salina

Todos os meios foram preparados seguindo as proporções recomendadas pelo fabricante:

- Caldo Brain Heart Infusion (**BHIB**) (Himedia, Mumbai, India): 3,7 g de caldo + 100 mL de água destilada. Este caldo foi suplementado com 1% de menadiona (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA) e 1% de hemina (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA) para a cultura de *A.a*.
- Caldo Mueller-Hinton (**MHB**) (Difco, Detroit, MI, USA): 2,1 g de caldo + 100 mL de água destilada;
- Agar Mueller-Hinton (**MHA**) (Difco, Detroit, MI, USA): 3,8 g de agar + 100 mL de água destilada;
- Solução salina 0.9%: 0,9 g de cloreto de sódio P.A. (Cromoline Química Fina Ltda., Diadema, SP, Brasil) + 100 mL de água destilada.

Os meios desidratados e o cloreto de sódio foram pesados em balança analítica (Ohaus Corporation, Parsippany, NJ, USA) e colocados em garrafas de vidro com tampa, onde foi adicionada a água destilada. As misturas permaneceram em agitador magnético até a dissolução do pó. Posteriormente foram esterilizados em autoclave (Cristófoli, Novo Hamburgo, RS, Brasil) e armazenados a 4 °C.

4.2.2.2 Preparo de inóculos bacterianos

Inicialmente todas as cepas bacterianas se encontravam na forma de liófilos. Para a reidratação dos liófilos, uma quantidade de aproximadamente 10 mg de bactéria liofilizada foi colocada em tubo de ensaio com BHIB (suplementado com hemina e menadiona para a *A.a.*). As bactérias permaneceram em crescimento durante 24 h a 37 °C em estufa bacteriológica (Tecnal, Piracicaba, SP, Brasil).

Figura 4.5 - Jarra de anaerobiose com bactérias microaerófilas. Foi colocada uma vela acesa para remoção parcial de oxigênio

S. aureus e *E. coli* foram cultivadas em ambiente aeróbio (colocadas diretamente na estufa). *S. mitis*, *S. mutans* e *S. sanguis* cresceram em ambiente microaerófilo, pelo qual foram colocadas em jarra de anaerobiose (Agatec, São José do Rio Preto, SP, Brasil) com uma vela acesa no interior para remoção parcial de oxigênio (Figura 4.5). *A.a.* cresceu em ambiente anaeróbio, para o qual foi colocada dentro de uma jarra de anaerobiose, que foi conectada a uma bomba a vácuo TE-058 (Tecnal, Piracicaba, SP, Brasil) para remoção total do oxigênio interno. Posteriormente esta jarra foi preenchida com 10% de CO₂ e 90% de N₂. As jarras foram levadas à estufa bacteriológica a 37 °C.

Após o crescimento de 24 h, a turbidez dos inóculos foi ajustada em 0,5 na escala de McFarland, obtendo uma solução com aproximadamente 1×10^8 CFU/mL. Para isto, as bactérias em caldo foram diluídas com solução salina, e as soluções resultantes foram analisadas em espectrofotômetro Spectrumlab 22PC (Spectrum Laboratories Inc., Houston, TX, USA) a 625 nm, onde a absorbância devia estar entre 0,08 e 0,13 correspondente a 0,5 na escala de McFarland. Para calibrar o aparelho foi utilizada solução salina pura, cuja absorbância devia ser 0.

4.2.2.3 Preparo dos fármacos

Todas as cepas bacterianas foram tratadas com guaiacol puro, complexo de inclusão Gu:βcd e βcd pura (controle negativo). Para isto, prepararam-se soluções “mãe” de cada fármaco, a partir das quais foram realizadas diluições seriadas, sendo as concentrações testadas de 10 a 0,0048 mg/mL. Os fármacos foram diluídos em caldo MHB.

Soluções “mãe”:

- Guaiacol 20 mg/mL: 40 mg de Gu em 2 mL de caldo. Para obter a equivalência de 40 mg de Gu em mL, utilizamos sua densidade (1,112 g/mL).

$$\begin{aligned} \text{Volume} &= \frac{\text{massa}}{\text{densidade}} \\ \text{Volume} &= \frac{40 \text{ mg}}{1112 \text{ mg/mL}} \\ \text{Volume} &= 0,03597 \text{ mL} = 35,97 \mu\text{L} \end{aligned}$$

Portanto, foram colocados 35,97 μL de Gu em 1,964 mL de meio.

- Complexo de inclusão Gu:βcd onde o Gu está a 20 mg/mL: 40 mg de Gu em 2 mL de meio. Para achar a quantidade de Gu:βcd que contém 40 mg de Gu,

utilizamos o peso molecular (PM) do Gu (124,1 g/L) e da β cd (1135 g/L) e consideramos que os 2 componentes se encontravam na proporção de 1:1.

$$PM \text{ Gu: } \beta\text{cd} = PM \text{ Gu} + PM \beta\text{cd}$$

$$PM \text{ Gu: } \beta\text{cd} = 124,1 + 1135$$

$$PM \text{ Gu: } \beta\text{cd} = 1259,1 \text{ g/L}$$

$$\frac{124,1 \text{ g Gu}}{40 \text{ mg Gu}}$$

$$\frac{1259,1 \text{ g Gu: } \beta\text{cd}}{X \text{ mg Gu: } \beta\text{cd}}$$

$$X = \frac{40 \text{ mg} \times 1,259 \text{ mg}}{0,124 \text{ mg}}$$

$$X = 406,1 \text{ mg de Gu: } \beta\text{cd}$$

Portanto, foram colocados 406,1 mg de Gu: β cd em 2 mL de caldo.

- β -ciclodextrina 20 mg/mL: 40 mg de β cd em 2 mL de caldo.

4.2.1.4 Preparação de placas e leitura de resultados

Este processo foi realizado dentro de cabine de fluxo laminar Tipo II (Buzzatto's Equip. Científicos, Contagem, MG, Brasil). Foram utilizadas duas microplacas de 96 poços (TPP®, Trasadingen, Suíça) para cada microrganismo.

Com o uso de micropipeta multicanal (LabMate Soft, Varsóvia, Polônia) foram colocados 100 μ L/poço de caldo nas colunas 2 à 12. Na primeira coluna da placa foram adicionados 200 μ L/poço das soluções contendo os fármacos, preparadas no item 4.2.2.3 (em triplicata). Posteriormente foram recolhidos 100 μ L/poço da primeira coluna e depositados na segunda coluna. Após misturar, com auxílio da pipeta foram colhidos 100 μ L/poço da segunda coluna e depositados na terceira coluna, e este procedimento foi repetido até chegar na décimo segunda coluna. Foram desprezados 100 μ L/poço da décimo segunda coluna, de forma que todos os poços

mantiveram um volume final de 100 µL. Finalmente foram colocados 90 µL de meio de cultura e 10 µL da suspensão de bactérias preparadas no item 4.2.2.2 em todos os poços.

Desta forma, as colunas de 1 a 12 continham os fármacos nas diferentes concentrações, começando com 10 mg/mL na coluna 1 e terminando com 0,0048 mg/mL na coluna 12. Ainda, 3 poços não receberam nenhum fármaco (apenas bactérias), sendo considerados como um controle de crescimento bacteriano (grupo Bact.), e outros 3 poços receberam apenas caldo, sendo considerados os brancos (ausência de crescimento). O apêndice B mostra a distribuição dos fármacos teste e controles nas microplacas.

As placas foram tampadas e colocadas para incubar à 37 °C durante 24h, em ambiente aeróbio, anaeróbio ou microaerófilo, segundo a bactéria. Após o tempo de incubação, as placas foram removidas da estufa e a absorbância de cada poço foi lida em leitora de microplacas TP Reader (Thermoplate, Palm City, FL, USA) a 580 nm. A figura 4.6 mostra um resumo do processo de montagem das microplacas e a figura 4.7 mostra a leitora de microplacas.

As absorbâncias dos grupos teste foram comparadas ao branco e ao grupo de controle de crescimento (que não recebeu nenhuma droga) para obter a MIC₉₀ e MIC₅₀:

$$\% \text{ crescimento} = \frac{\text{absorbância do grupo teste} - \text{branco}}{\text{absorbância do grupo Bact.} - \text{branco}} \times 100$$

Para comprovar a ausência ou presença de crescimento e determinar a concentração bactericida mínima (MBC) (ou se houve unicamente ação bacteriostática), 2 µL de líquido de cada poço foram recolhidos e depositados em placa de Petri com Agar Mueller Hinton, que foram cultivadas à 37 °C por 24 h.

Figura 4.6 – Dinâmica de montagem das microplacas de 96 poços para o teste da microdiluição em caldo. MHB= Caldo Mueller Hinton; B= branco (apenas meio de cultura); C= controle de crescimento (bactéria em meio de cultura s/fármaco). Procedimento repetido para cada cepa bacteriana avaliada

Figura 4.7 – Leitora de microplacas TP Reader Thermoplate realizando a leitura de uma placa, com registro automático dos resultados

4.3 FASE III: TESTES *IN VIVO*

A utilização de animais está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal e tem a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA – FOUSP) sob o protocolo nº 013/2014 de junho de 2014 (Anexo B). Os experimentos *in vivo* (análise histológica) foram realizados no Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento - Laboratório de Biologia do Movimento Celular do Instituto de Ciências Biomédicas da USP.

4.3.2.1 Animais experimentais

No presente estudo foram utilizados 60 ratos (*Rattus norvegicus*, albinus, Wistar) machos adultos pesando entre 300-350 g, provenientes do Biotério Central do ICB-USP. Os animais foram alimentados com ração sólida e água “*ad libitum*”, porém, no pós-operatório foi fornecida ração triturada. Os animais foram acondicionados em gaiolas previamente desinfetadas (com água sanitária) e forradas com maravalha. O ambiente permaneceu com luz controlada com ciclo claro-escuro de 12 horas e com temperatura de 21 °C no Biotério do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento do ICB-USP.

Os animais foram aleatoriamente divididos em quatro grupos segundo o tratamento que iriam receber:

- **C-** → Controle negativo: exodontia + indução de alveolite seca (AS) sem tratamento (n=15);
- **C+** → Controle positivo: exodontia + indução de AS + Alvogyl® (Septodont, Saint-Maur-des-Fossés Cedex, França) (n=15);
- **Gu:βcd** → Exodontia + indução de AS + Complexo de inclusão guaiacol:β-ciclodextrina 1:1na concentração de 10 mM (n=15);
- **βcd** → Exodontia + indução de AS + β-ciclodextrina pura (n=15).

Considerando o dia da extração como sendo o dia 0 (zero), os animais foram sacrificados em três tempos (5 animais em cada tempo): 7, 14, e 21 dias após a exodontia.

4.3.2.2 Exodontia e indução de alveolite

Exodontia

Previamente à cirurgia, os animais foram anestesiados com uma injeção intramuscular de cloridrato de quetamina (Dopalen[®], CEVA, Paulínia, SP, Brasil) (90 mg/kg) associada a xilazina (Anasedan[®], CEVA, Paulínia, SP, Brasil) (10 mg/kg) e marcados com pincel atômico na cauda conforme o número do rato no grupo. Os ratos foram posicionados na mesa cirúrgica em decúbito dorsal com a ajuda de barbantes nas quatro extremidades presos à mesa e também nos incisivos para manter a abertura bucal, conforme a figura 4.8. Para antissepsia da área cirúrgica foi utilizada gaze com iodopovidona 10% (Povidine[®], Vic Pharma Ind e Comercio Ltda, Taquaritinga, SP, Brasil).

Todos os animais foram submetidos à exodontia de primeiro molar inferior direito com instrumental estéril. Foi utilizada uma pinça mosquito curva para afastamento lingual, uma pinça anatômica sem dente para afastamento da mucosa jugal e um esculpador de Hollembach para luxação e avulsão do dente (Figuras 4.9 e 4.10).

Figura 4.8 – Mesa de cirurgia para exodontia de molar de rato. Os animais foram posicionados com a ajuda de barbantes nas extremidades e nos incisivos

Figura 4.9 – Luxação do primeiro molar inferior direito com Hollembach

Figura 4.10 – Alvéolos após avulsão de molar

Indução de alveolite seca

Imediatamente após a avulsão dental, os alvéolos das raízes foram preenchidos com 0,1 mL de solução de epinefrina 1 mg/mL (Ariston Ltda, São Paulo, SP, Brasil) e o animal permaneceu em observação por 2 min para certificar que o

alvéolo se encontrava sem coágulo. Após a cirurgia, todos os animais receberam o analgésico paracetamol (Germed Pharma, Vinhedo, SP, Brasil) na dose de 200 mg/Kg dissolvido na água disponível no bebedouro a vontade.

4.3.2.3 Tratamento

No dia 2 após a cirurgia, foi realizada nova anestesia para verificação do quadro de AS e em caso afirmativo (alvéolo ainda vazio), realizava-se a aplicação dos fármacos.

Após limpeza da região com soro fisiológico e gaze, os alvéolos foram preenchidos com um dos materiais embotadores (exceto no grupo C-), na quantidade suficiente para conseguir ocupar todo o espaço deixado pelas raízes, com a ajuda de uma cureta de dentina. O complexo Gu: β cd e a β cd foram diluídos em soro fisiológico estéril, no momento da aplicação, para chegar na concentração de 10 mM.

4.3.2.4 Obtenção e preparo das amostras

No 7º, 14º ou 21º dia após a exodontia foi realizado o procedimento de eutanásia em câmara de CO₂. Imediatamente após a eutanásia, foram removidas a pele e a camada muscular superficial da região submandibular e submentual do lado direito utilizando uma tesoura. Com o mesmo instrumento foi feito um corte na região de sínfise mandibular para separar os 2 lados da mandíbula (Figura 4.11A). Foram divulsionados os músculos masseter e pterigoideo medial do lado direito, e desarticulado o côndilo do mesmo lado para realizar a remoção da hemimandíbula direita (Figura 4.11B e C).

Posteriormente foi cortada a peça próximo ao alvéolo de interesse e o fragmento foi depositado em frasco com solução fixadora de paraformaldeído (PFA) 4% pH 7,4 (descrito adiante no item 4.3.2.4.1) preparada no mesmo dia dos

sacrifícios. As peças permaneceram sob agitação (Barnstead LabLine Multi-Purpose Rotator, Dabucke, IA, USA) durante 6 horas à temperatura ambiente e posteriormente foram colocadas na geladeira (DAKO, Campinas, SP, Brasil) onde permaneceram por mais 24 horas (4 °C).

Figura 4.11 – Remoção de fragmento mandibular para análise histológica. (A) Separação da hemimandíbula na região de sínfise, após remoção de pele na região submandibular; (B) Hemimandíbula direita removida; (C) Maior aumento da área de interesse (alvéolo do primeiro molar).

Em continuação, as peças foram lavadas em PBS 1X, colocadas em cassetes histológicos (EasyPath, São Paulo, Brazil) devidamente identificados e depositadas em Béquer contendo solução de EDTA 4,13% (descrito adiante no item 4.3.2.4.2) para descalcificação.

4.3.2.4.1 Preparo da solução fixadora 4% PFA em PBS 1X pH 7,4

Para o volume final de 100 mL de solução fixadora, foram agitados 10 mL de PBS 10X (pH 7,4), 80 mL de água destilada, 4 g de PFA (Paraformaldeído, Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA) e 1 pastilha de hidróxido de sódio (Synth, Diadema, SP, Brasil) a 65 °C até conseguir uma solução transparente. Após a completa dissolução, o líquido é resfriado para atingir a temperatura ambiente (25 °C) e o pH é ajustado em 7,4 com pH-metro (Orion 410A, Thermo Scientific, Beverly,

MA, USA). Depois de conseguir o pH desejado, foi colocada mais água destilada para completar 100 mL de solução. Trinta mL de solução fixadora foram colocados em cada pote para receber os fragmentos ósseos.

4.3.2.4.2 Preparo da solução descalcificadora EDTA 4,13%

Para o volume final de 1 L, foram agitados 900 mL de água destilada, 41,3 g de EDTA (Synth, Diadema, SP, Brasil) e 4,3 g de hidróxido de sódio (Synth, Diadema, SP, Brasil) à temperatura ambiente. Foram acrescentadas pastilhas de hidróxido de sódio até conseguir uma solução transparente. Após a completa dissolução, o pH foi ajustado em 7,4 em pH-metro. Após ajuste do pH o volume foi completado para 1 L com água destilada. As peças permaneceram na solução de EDTA com agitação constante durante cinco semanas, sendo trocada a solução 3 vezes por semana.

4.3.2.5 Processamento das amostras

Após a desmineralização, as peças foram levadas no processador automático de tecido Leica TP1020 (Leica Microsystems, Nussloch, Alemanha), para desidratação e inclusão das amostras, na seguinte cronologia:

1) Solução de EDTA	10) Álcool 100%..... 40 min
2) PBS.....40 min	11) Álcool 100%.....40 min
3) PBS.....40min	12) Álcool 100%..... 40 min
4) Álcool 70%..... Overnight	13) Xilol..... 40 min
5) Álcool 70%..... 40 min	14) Xilol..... 40 min
6) Álcool 70%..... 40 min	15) Xilol..... 40 min
7) Álcool 95%..... 40 min	16) Parafina.....40 min
8) Álcool 95%..... 40 min	17) Parafina.....40 min
9) Álcool 95%..... 40 min	18) Parafina.....40 min

Posteriormente, foi feita a inclusão dos cortes em parafina (Histosec® Pastilhas, Merck, Darmstadt, Alemanha) em central de inclusão (Leica EG1160, Leica Microsystems, Nussloch, Alemanha). Os blocos foram submetidos a cortes longitudinais, perpendiculares ao plano oclusal, com 6 micrômetros de espessura em micrótomo rotativo manual (820 Spencer, American Optical Corp., New York, NY, USA), utilizando navalha descartável de alto perfil (Leica 818, Leica Microsystems, Nussloch, Alemanha).

Os cortes foram montados em lâminas de vidro lapidadas, com bordas foscas, 26x76 mm (Knittel, Braunschweig, Alemanha) previamente tratadas com solução de poli-L-lisina 0,1% (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA). Os cortes foram corados com hematoxilina e eosina em montador (Leica Stainer LX, Leica Microsystems, Nussloch, Alemanha) e cobertos com lamínulas de vidro 22x22 mm (Knittel, Braunschweig, Alemanha) utilizando-se o meio de montagem DPX (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA).

4.3.2.6 Área a ser analisada

Na peça anatômica, a área de escolha do alvéolo do molar inferior para ser principalmente analisada no microscópio foi a dos alvéolos mesial e distal, já que estes representam as cavidades alveolares de maior volume e poderiam ser captado em um mesmo corte, como observado na figura 4.12.

Figura 4.12 – Hemimandíbula de rato com primeiro molar removido. Observar o maior volume da cavidade alveolar das raízes mesial e distal por onde passa o corte. Note-se também que os alvéolos das raízes são independentes devido à posição supraóssea da furca. Adaptado de foto cedida pela pesquisadora Maria Stella Moreira (Departamento de Dentística – FOU SP)

4.3.2.7 Análise histológica

Um avaliador experiente, de forma cega (sem que fosse possível identificar o grupo), avaliou os cortes histológicos em microscópio de luz com aumento de 5x, 10x e 40x (Olympus BX40F4, Olympus Optical Co., Japão). Foi realizada uma descrição detalhada dos achados mais representativos encontrados em cada grupo e em cada tempo, considerando especialmente a presença de infiltrado inflamatório, de tecido conjuntivo e a neoformação óssea. As lâminas foram fotografadas com câmera AxioCam HR (Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha) e adquiridas através do programa Zen Software (2011, Carl Zeiss, Thornwood, NY, USA).

5 RESULTADOS

5.1 FASE I: CARACTERIZAÇÃO DO COMPLEXO DE INCLUSÃO

O espectro de hidrogênio ^1H , obtido por ressonância magnética nuclear (RMN), permitiu identificar os hidrogênios da molécula de guaiacol, assinalados na estrutura química como (a), (b) e (c). Como o carbono é tetravalente (faz 4 ligações), observa-se que os carbonos do anel completam as quatro ligações com os hidrogênios H(a) e H(b), que possuem deslocamento químico iguais a $\delta(\text{a}) = 6,756$ e $\delta(\text{b}) = 6,891$, respectivamente. Esses valores de deslocamento químico são altos e muito próximos entre si devido à blindagem exercida pelo campo magnético da ressonância. Além disso, os hidrogênios assinalados por (a) são equivalentes entre si e possuem um único valor de deslocamento químico, distinto ao deslocamento do hidrogênio denominado (b). O valor de deslocamento químico diferente para H(a) e H(b) deve-se, principalmente, à diferença de átomos vizinhos a eles.

Os hidrogênios do grupo CH_3 (c) são equivalentes e alifáticos, ou seja, não pertencem ao anel aromático, e, por isso, possuem um único e menor valor de deslocamento químico, $\delta(\text{c}) = 3,748$. Esse menor deslocamento se deve à menor blindagem exercida pelo campo magnético da ressonância (Song et al., 2007). As integrais correspondem à quantidade de hidrogênios de cada sinal do espectro (Gráfico 5.1).

Gráfico 5.1 – Espectro de ^1H para o guaiacol puro a 400 MHz

Os picos indicam a presença de diferentes tipos de átomos de hidrogênio na molécula. As integrais (linhas verdes) indicam a quantidade de prótons que produzem o sinal.

Os mapas de contorno 2D-ROESY para o composto Gu: β cd estão ilustrados no Gráfico 5.2. Nos dois eixos do gráfico temos os espectros de ^1H do composto de inclusão Gu: β cd. É possível observar várias manchas de correlação entre as porções das duas moléculas, que podem ser relativas à interações entre ciclodextrina-ciclodextrina, guaiacol-guaiacol e ciclodextrina-guaiacol, sendo as últimas indicativas de formação do composto de inclusão. As manchas que se encontram na diagonal, e que são de maior intensidade, indicam interação entre moléculas iguais (Gu-Gu e CD-CD). As manchas de nosso interesse (destacadas em cinza no Gráfico 5.2) mostram que as moléculas de guaiacol estão espacialmente interagindo com as moléculas de CD e ainda mostram o local exato de interação entre elas. Os hidrogênios H_3 e H_5 da ciclodextrina, localizados na cavidade (internos), estão interagindo com os H(a) e H(b) do guaiacol.

A partir das informações obtidas no experimento de 2D-ROESY, foi possível esquematizar a estrutura química do composto de inclusão, mostrado na Figura 5.2C.

Gráfico 5.2 – Mapa de contorno 2D-ROESY do complexo Gu: β cd

Os espectros de ^1H do Gu: β cd se encontram nos dois eixos do gráfico. (A) mapa completo com todas as manchas de correlação existentes; (B) ampliação da região (cinza) que contém a interação espacial Gu: β cd; (C) desenho esquemático que mostra o arranjo do composto de inclusão.

5.2 FASE II: ENSAIOS *IN VITRO*

5.2.1 Ensaios de citotoxicidade

A viabilidade celular dos osteoblastos, após 48h de cultura com as diferentes concentrações dos fármacos Gu e Gu:βcd, está apresentada no Gráfico 5.4. A viabilidade do composto de inclusão Gu:βcd foi maior que a do Gu livre em todos os casos. A análise estatística (ANOVA two-way e Bonferroni) demonstrou que houve diferença significativa entre o grupo Gu e Gu:βcd em todas as concentrações testadas ($p < 0,001$), exceto na concentração de 1 mM ($p > 0,05$).

Gráfico 5.3 – Média ± DP da viabilidade celular de osteoblastos segundo o tipo de fármaco e sua concentração, após 48h de exposição, no ensaio do MTT. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os fármacos, dentro da mesma concentração ($p < 0,001$; ANOVA two-way + Bonferroni). Classificação de citotoxicidade (Dahl et al., 2006; Kong et al., 2009): NC= não citotóxico; LC=levemente citotóxico; MC= moderadamente citotóxico; SC= severamente citotóxico.

A viabilidade dos grupos Gu: β cd e β cd nas concentrações de 10 mM e 2 mM não pode ser determinada devido a que as células foram removidas mecanicamente durante a lavagem com PBS, prévia à aplicação do MTT (item 4.2.1.4), provavelmente por causa da alta densidade do fármaco nestas concentrações. A viabilidade do Gu nas concentrações de 2 e 10 mM foram de $53,0 \pm 2,3$ e $52,9 \pm 1,9$, respectivamente. Os grupos tratados com Gu puro nas concentrações de 1, 2 e 10 mM não apresentaram diferença significativa entre eles (ANOVA one-way + Tukey; $p > 0,05$)

Segundo a classificação de citotoxicidade (Dahl et al., 2006; Kong et al., 2009), na concentração de 1 mM o complexo Gu: β cd é considerado moderadamente citotóxico, a 0,5 e 0,25 mM é levemente citotóxico e a 0,125 mM este é não citotóxico. O grupo Gu é moderadamente citotóxico nas concentrações de 1–10 mM, e levemente citotóxico nas outras concentrações. O grupo β cd não apresentou efeito citotóxico nas concentrações testadas.

5.2.2 Ensaio microbiológicos

As concentrações que inibem 50% e 90% do crescimento bacteriano (MIC_{50} e MIC_{90} , respectivamente) foram obtidas a partir da absorbância dos poços (Figura 5.1) e estão apresentadas na tabela 5.1.

O complexo de inclusão Gu: β cd teve um efeito antibacteriano melhor que o Gu puro contra todas as cepas testadas, exceto contra a *E. coli* com a qual houve diferença apenas para o MIC_{50} . A β cd pura não foi capaz de inibir o crescimento de nenhum microrganismo em nenhuma das concentrações testadas.

Figura 5.1 – Microplaca proveniente do teste da microdiluição em caldo para *S. mutans*. A concentração dos fármacos (Gu e Gu:βcd) se encontra em ordem decrescente (10-0,0048 mg/mL) da coluna 1 à 12. Em azul os poços branco (sem bactéria), e em vermelho os controles de crescimento (sem fármaco).

	Guaiacol			Gu:βcd		
	MIC ₉₀	MIC ₅₀	MBC	MIC ₉₀	MIC ₅₀	MBC
<i>E. coli</i> (G-) _a	0,625	0,312	1,25	0,625	0,156	1,25
<i>S. aureus</i> (G+) _a	0,625	0,156	1,25	0,078	0,039	0,156
<i>S. mitis</i> (G+) _m	1,25	0,625	2,5	0,625	0,312	1,25
<i>S. sanguis</i> (G+) _m	1,25	0,312	2,5	0,312	0,078	0,625
<i>S. mutans</i> (G+) _m	2,5	0,625	2,5	0,625	0,156	1,25
<i>A. a</i> (G-) _{an}	2,5	0,625	5,0	0,625	0,312	1,25

Tabela 5.1 – MIC₉₀, MIC₅₀ e MBC do Gu e Gu:βcd em mg/mL.
(G-) = Bactéria Gram negativa; (G+) = Bactéria Gram positiva; crescimento em ambiente:
a = aeróbio, m = microaerófilo, an = anaeróbio.

No grupo Gu:βcd, as maiores concentrações testadas produziram uma alta absorbância (poços 1D a 4F na figura 5.1), isto provavelmente se deve à alta densidade do próprio fármaco e não ao crescimento bacteriano nesses poços. Este fato foi posteriormente confirmado com o repique do conteúdo dos poços em placas de Petri com Agar Mueller-Hinton, que permaneceram em cultura durante 24 h.

Nestes poços com alta concentração de Gu:βcd, mesmo apresentando uma alta absorbância, não houve crescimento bacteriano (Figura 5.2).

Figura 5.2 – Placa de Petri com a cultura do conteúdo dos poços da microplaca de *S. mutans* proveniente do teste da microdiluição em caldo, após 24h de crescimento. É possível observar as diferentes concentrações de Gu testadas (da maior à menor): G1 (10 mg/mL) a G12 (0,0048 mg/mL), além dos controles. A menor concentração, onde não foi observado crescimento é considerada como a concentração bactericida mínima (MBC).

A partir da semeadura de 2 μ L do líquido de cada poço da microplaca em placa de Petri, também foi possível observar a concentração bactericida mínima (MCB) para cada microrganismo (Tabela 5.1). A MBC foi considerada a menor concentração onde não houve crescimento bacteriano após 24h de cultura (Figura 5.2).

Utilizando a concentração de guaiacol de 10 mM (1,24 mg/mL), concentração que permite mais de 50% de viabilidade celular de osteoblastos (Gráfico 5.3), seria possível inibir 90% do crescimento bacteriano de todas as cepas (MIC_{90}), exceto a *S. mutans* e a *A.a.* nas quais haveria uma inibição menor que 90%, porém, maior que 50%, com o Gu na forma livre. Já, utilizando o Gu na forma complexada (Gu:βcd), é possível atingir a concentração bactericida mínima (MBC) para todas as bactérias testadas (1,25 mg/ml, Tabela 5.1).

5.3 FASE III: TESTES *IN VIVO*

A análise histológica dos diferentes grupos em cada tempo experimental mostrou os resultados descritos a seguir e podem ser visualizados na Figura 5.3 e 5.4:

Grupo C- (controle negativo)

No dia 7, o alvéolo foi completamente preenchido por uma matriz de tecido conjuntivo frouxo, com presença de abundantes fibroblastos, vasos neoformados e células inflamatórias características de fase tardia da inflamação (ex: macrófagos). O terço cervical do alvéolo foi infiltrado por grande quantidade de células típicas de inflamação aguda (neutrófilos). Muitos osteoclastos foram observados ao longo de todo o osso alveolar. Finas trabéculas de osso neoformado (imaturo e desorganizado) na região apical do alvéolo completam o quadro.

No dia 14, o infiltrado inflamatório no terço cervical do alvéolo ainda era visível. A neoformação óssea avançou do terço apical para o terço médio, estando em estágio mais evoluído na região apical (confluência de trabéculas). A matriz de tecido conjuntivo continuou presente entre as trabéculas ósseas e no terço cervical, e menos osteoclastos foram observados.

No dia 21, o alvéolo foi quase totalmente preenchido por osso neoformado, restando apenas a região mais superficial para ser completada. As trabéculas ainda eram imaturas, porém os espaços entre elas estavam menores. Foi observada uma grande quantidade de osteoblastos, osteócitos e vasos sanguíneos, e poucos osteoclastos que sugerem remodelação óssea. Na superfície do alvéolo, poucas células inflamatórias foram encontradas.

Grupo C+ (controle positivo - Alvogyl®)

No dia 7, restos do material obtundente foram encontrados principalmente no terço cervical (mas também observados nos terços médio e apical). O alvéolo

apresentou infiltrado inflamatório muito intenso, concentrado principalmente nas proximidades do material, além de grande presença de osteoclastos ao longo do osso alveolar. Uma matriz de tecido conjuntivo frouxo preenchia o alvéolo e ainda não foi observada formação óssea.

No dia 14, a presença de restos de material ainda era visível. Grande quantidade de células inflamatórias, principalmente neutrófilos, circundava estes debris. A matriz de tecido conjuntivo foi observada, com muitos vasos sanguíneos e numerosas células gigantes, possivelmente osteoclastos. Pouca formação óssea foi observada (unicamente na região apical). Um dos animais do grupo desenvolveu um abscesso.

No dia 21, ocorreu formação óssea ainda em estágio muito imaturo que foi observada nos terços médio e apical. A formação óssea neste grupo foi muito semelhante à formação óssea no grupo C- aos 14 dias. O restante do alvéolo (terço cervical e espaços entre as trabéculas ósseas) continuou preenchido por tecido conjuntivo. Na entrada do alvéolo, permaneceram ainda debris de material e vários macrófagos foram detectados nas proximidades.

Grupo βcd

No dia 7, o alvéolo estava completamente preenchido por matriz de tecido conjuntivo frouxo muito vascularizado. O terço cervical apresentou inflamação intensa. Abundantes osteoclastos foram vistos ao longo do osso alveolar. Na região apical, finas trabéculas ósseas e numerosos osteoblastos foram observados. Um animal deste grupo apresentou formação de abscesso.

No dia 14, houve formação de trabéculas ósseas no terços apical e médio. Estas trabéculas se encontravam em estágio inicial de formação, sendo finas, espaçadas e circundadas por matriz de tecido conjuntivo. Na entrada do alvéolo foi observado infiltrado inflamatório intenso, relacionado a restos de material. Um animal deste grupo também apresentou formação de abscesso.

No dia 21, a formação óssea foi superior a dois terços, porém as trabéculas ainda eram finas e espaçadas. Na superfície permaneceram restos de material e

uma reação tecidual inflamatória relacionada a estes debris. Em comparação aos grupos C- e Gu:βcd, a formação óssea estava atrasada e a inflamação superficial mais intensa.

Grupo Gu:βcd

No dia 7, restos do material foram encontrados unicamente na entrada do alvéolo, seguidos por uma região rica em células inflamatórias, principalmente neutrófilos. O alvéolo foi preenchido por uma matriz de tecido conjuntivo frouxo contendo numerosos vasos sanguíneos, sendo estes de maior calibre no fundo do alvéolo. Na região apical foram observados osteoblastos e o surgimento de ilhas de osso neoformado. Foram observados também osteoclastos ao longo do osso alveolar.

No dia 14, aproximadamente dois terços do alvéolo já haviam sido preenchidos por trabéculas ósseas, sendo estas mais espessas e menos espaçadas no ápice. Este osso juntava-se ao osso alveolar circundante. A matriz de tecido conjuntivo encontrava-se presente principalmente no terço cervical. Uma camada superficial contendo células inflamatórias foi vista, relacionada a restos de material.

No dia 21, os três terços do alvéolo foram preenchidos por trabéculas ósseas mais espessas, contendo numerosos osteócitos e vasos sanguíneos no interior. Tornou-se difícil identificar os limites anteriores do alvéolo dental (Figura 5.3 e 5.4).

Figura 5.3 – Aspecto histológico do terço apical dos alvéolos tratados com Alvogyl (C+), β -ciclodextrina pura (β cd), complexo de inclusão Gu: β cd ou não tratados (C-, controle negativo) no 7º, 14º e 21º dias após a exodontia de molar de rato
 * Sinaliza a porção mais cervical do alvéolo dentro do corte. Escala (canto inferior direito) representa 100 μ m.

Figura 5.4 – Aspecto histológico do terço cervical dos alvéolos tratados com Gu:βcd no 7º e 21º dias após a exodontia de molar de rato
Note-se que a matriz de tecido conjuntivo e infiltrado inflamatório presentes no 7º dia, foram substituídos por trabéculas de osso neoformado que preenchem até a superfície do alvéolo no 21º dia. * Sinaliza a porção mais cervical do alvéolo dentro do corte. Escala (canto inferior direito) representa 100 µm.

6 DISCUSSÃO

A alveolite seca é uma complicação pós-operatória frequente, altamente sintomática, debilitante e que altera as atividades normais dos pacientes (Blum, 2002; Akinbami; Godspower, 2014; Faizel et al., 2015). Embora vários tratamentos tenham sido empregados para o controle de AS, existe uma falta de evidências clínicas e laboratoriais que permitam determinar qual é o melhor protocolo, e inclusive alguns deles são baseados na experiência clínica pessoal dos profissionais (Alexander, 2000; Daly et al., 2012).

Os compostos fenólicos têm sido amplamente utilizados na odontologia como desinfetantes e sedativos da polpa dentária (Chang et al., 2000). O guaiacol é um composto natural que possui propriedades biológicas vantajosas para o tratamento de alveolite seca, tais como a ação analgésica (Hirafugi, 1984; Park et al., 2009), antioxidante (Mimura et al., 2005), osteoindutora (Kato et al., 2010) e antimicrobiana (Fitzgerald et al., 2005; Ouwehand et al., 2010; Liu et al., 2011). Seu uso no tratamento de alveolite seca tem sido relatado em livros e guias terapêuticos (Bazerque, 1976; Ciancio; Bourgault, 1984; Figueiredo; Aguiar, 2001; Gregori; Campos, 2004) que não justificam cientificamente as vantagens da sua utilização, não especificam a sua concentração e às vezes nem a sua forma de uso.

Em um estudo clínico mais recente, Haghighat et al. (2012) compararam a pasta de óxido de zinco e eugenol (OZE) com uma pastilha contendo eugenol 3%, guaiacol 3% e clorambutamol 1,6 % para o tratamento de AS. Observaram que esta pastilha apresentou melhor efeito analgésico que a pasta de OZE e ressaltaram que, já que os dois medicamentos possuíam eugenol na sua composição, a vantagem da pastilha sobre o OZE foi dada pela presença do guaiacol. Este estudo poderia corroborar o efeito analgésico do guaiacol, entretanto, não foi discutido o possível efeito analgésico / anestésico ou antimicrobiano do clorambutamol. Além disto, o estudo não apresenta o embasamento de estudos pré-clínicos importantes, como a determinação prévia da citotoxicidade do composto na concentração utilizada.

Apesar de todas as propriedades atribuídas ao Gu, este apresenta limitações e dificuldades de uso devido a sua baixa estabilidade físico-química (National Center for Biotechnology Information, 2004a; Kayaci et al., 2013).

No presente estudo, o Gu foi testado tanto puro, como dentro de um complexo supramolecular com β -ciclodextrina, como uma possível alternativa para o tratamento de alveolite seca. Este encapsulamento molecular foi considerado com o objetivo de melhorar sua estabilidade físico-química e sua ação biológica, prolongando o efeito analgésico, reduzindo a contaminação microbiana do alvéolo, e inclusive acelerando o processo de reparo ósseo.

Os estudos de Divakar e Maheswaran (1997) e Song et al. (2007) descrevem a síntese do composto de inclusão Gu: β cd, não obstante, estes trabalhos eram focados na caracterização físico-química do composto e não relatam qual é a aplicação ou uso do mesmo. O complexo Gu: β cd nunca foi utilizado na área odontológica e foi achado apenas um relato que descreve sua aplicação na área da saúde, como antidiarréico, onde a complexação do Gu à β cd foi empregada com o objetivo de mascarar seu sabor (Vummaneni; Nagpal, 2012).

Mesmo que o complexo de inclusão Gu: β cd já tenha sido sintetizado com sucesso anteriormente, antes de proceder à realização dos testes biológicos, era necessário demonstrar que a partir da nossa metodologia (protocolo, equipamento, materiais) houve formação do complexo de inclusão, diferente à mistura física dos materiais de partida. Portanto, a proposta inicial do trabalho foi comprovar a complexação química do Gu com a β cd, pela determinação do deslocamento químico dos prótons da CD e do guaiacol através da ressonância magnética nuclear (RMN).

Os sistemas supramoleculares do tipo hóspede-hospedeiro, como o formado entre a β -ciclodextrina e o guaiacol, podem ser avaliados por técnicas como a RMN que explicam as interações dipolares entre as espécies através do Efeito Nuclear Overhauser (NOE). Este efeito surge a partir da interação entre os spins nucleares que envolvem direto acoplamento através do espaço. Este fenômeno é uma consequência da ocorrência de interações entre moléculas ou grupos funcionais que estejam trocando energia eletromagnética. NOE implica em proximidade espacial

entre núcleos e, no caso de moléculas-hóspede e ciclodextrinas, pode indicar a formação de compostos de inclusão e/ou associação. Uma vez que esse efeito não se propaga através de ligações químicas, mas apenas através do espaço, ele está diretamente relacionado ao processo de relaxação *spin-rede* (recuperação da distribuição de equilíbrio de um núcleo atômico após um pulso de radiofrequência devido aos campos magnéticos produzidos pela sua vizinhança), e pode ser extremamente proveitoso na informação da proximidade espacial de núcleos, a uma distância inferior a 5 Ångstrom (Å) (Kiemle et al., 2006).

A inclusão do guaiacol dentro da cavidade hidrofóbica da β cd produziu alterações dos deslocamentos químicos dos prótons internos da CD, H₃ e H₅, provando que parte do anel aromático do Gu se localiza no interior da cavidade da β cd e seu grupo metóxi está projetado para o exterior da cavidade (Gráfico 5.2). Esta configuração espacial está em concordância com aquela descrita por Song et al. (2007), que utilizaram os espectros de ¹H-RMN dos compostos sólidos e as titulações de RMN dos compostos em solução. Segundo Divakar e Maheswaran (1997), a polaridade relativa da molécula hóspede determina qual das suas extremidades ficará dentro da cavidade da CD que tem características hidrofóbicas. No caso do guaiacol, a extremidade contendo o anel aromático (menos polar que a extremidade que contém os grupos OH e OCH₃) possui maior interação com a cavidade da β cd.

Uma vez comprovada a complexação do Gu na β cd, procedemos à avaliação das características biológicas do composto de inclusão, importantes para prever a sua aplicabilidade como curativo intra-alveolar, através da análise da citotoxicidade, da ação antimicrobiana e o efeito no reparo tecidual após tratamento de alveolite induzida em ratos.

Os testes microbiológicos demonstraram que o guaiacol, nestas concentrações, tem efeito antimicrobiano contra todas as bactérias testadas, sendo as aeróbias mais sensíveis que as microaerófilas, e por sua vez, as microaerófilas mais sensíveis que a bactéria anaeróbia *A.a* (Tabela 5.1). Dentro do grupo das aeróbias, a Gram negativa *E. coli* precisou de maiores concentrações de Gu para inibir o crescimento bacteriano, fato que está de acordo com observações prévias que detectaram que as bactérias Gram negativas são menos sensíveis que as Gram

positivas (Burt, 2004; Ouwehand et al., 2010). Isto acontece devido à presença de uma membrana externa que circunda a parede celular das Gram negativas, formando uma camada de lipopolissacarídeo que limita a difusão de substâncias, dificultando o alcance da membrana citoplasmática (Burt, 2004). Dentre todas as bactérias, a menos suscetível foi a Gram negativa, anaeróbia facultativa, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (MBC de Gu = 5 mg/mL, Tabela 1). Segundo Maillard (2013), as bactérias anaeróbias facultativas parecem ser menos suscetíveis ao fenol quando cultivadas em ambiente anaeróbio. Possivelmente este fato se repete com outros compostos fenólicos como o Gu.

Na literatura não foram encontrados outros estudos avaliando a concentração inibitória mínima (MIC) do Gu, com ou sem β cd, nas mesmas bactérias testadas no presente estudo. No trabalho de Ouwehand et al. (2010), uma das bactérias testadas foi a *E. coli*, a qual foi sensível ao Gu, confirmando nosso resultado, porém, o valor de MIC não foi apresentado no artigo. Liu et al. (2011) encontraram uma MIC de 35 mM (4,3 mg/mL) de Gu contra a bactéria Gram positiva *Bacillus subtilis*, sendo maior que os valores de MIC₉₀ observados com as bactérias Gram positivas testadas em nosso estudo (0,625 - 2,5 mg/mL, Tabela 1).

Fitzgerald et al. (2005) avaliaram o efeito do Gu em 18 diferentes bolores e leveduras causadores da deterioração de alimentos. Evidenciaram que a média total de MIC após 4 dias de incubação foi de 11,66 mM (1,44 mg/mL) e que os bolores foram mais sensíveis que as leveduras. Isto sugere que nas concentrações testadas neste trabalho acima de 1,44 mg/mL, o Gu teria propriedades tanto antibacterianas quanto antifúngicas.

Os nossos resultados também demonstraram que a complexação do Gu na β cd diminui as concentrações inibitórias mínimas para bactérias Gram positivas e Gram negativas, exceto para *E. coli* onde a diminuição aconteceu apenas no MIC₅₀ (Tabela 5.1). A β cd pura não foi capaz de inibir o crescimento microbiano, mostrando que a β -ciclodextrina apenas tem um efeito potencializador sobre a ação antibacteriana do guaiacol, mas não tem efeito antibacteriano *per se*. Este resultado confirma o observado por outros estudos de que a formação de complexos de inclusão de agentes antimicrobianos com ciclodextrinas potencializa sua ação antimicrobiana quando comparados aos fármacos não complexados (Cortés et al.,

2001; Zhang et al., 2008; Ragle et al., 2010; Teixeira et al., 2013; Hill et al., 2013; Macaev et al., 2013; Bilia et al., 2014; Suarez et al., 2014; Teixeira et al., 2015).

Hill et al. (2013) explicam que o antimicrobiano complexado é capaz de inibir o crescimento bacteriano em concentrações menores que o antimicrobiano puro devido ao aumento da solubilidade em água do fármaco, o qual aumenta o contato com o microrganismo. Ao mesmo tempo a ciclodextrina poderia estar atrasando a liberação da droga (Cortes et al. 2001). No caso do Gu:βc, ainda precisa ser comprovado se a complexação prolonga o tempo de liberação do Gu através de testes de cinética.

A ciclodextrina também pode aumentar a adesão da droga à parede celular bacteriana devido à alta afinidade dos seus grupos OH dispostos no exterior da cavidade que se ligam à bactéria através de pontes de hidrogênio (Suárez et al., 2014; Imperiale; Sosnik, 2015). Outra explicação é a formação de uma matriz auto agregante que aprisiona drogaS, bactérias e debris celulares e eleva o grau de inibição do composto (Teixeira et al., 2013).

O rompimento da membrana dos microrganismos por extração lipídica, resultante da formação de complexos de inclusão da CD com estes componentes de membrana (Macaev, 2013) também pode acontecer e isto causa um aumento do gradiente de concentração da droga carregada na membrana (Teixeira et al., 2013). Para confirmar que esses mesmos eventos ocorreram com o complexo Gu:βcd, a interação do complexo com a membrana bacteriana deverá ser futuramente observada através de microscopia eletrônica.

A seguir, foi realizado o ensaio de citotoxicidade MTT em osteoblastos isolados de calvária de ratos neonatos. Optou-se pelo uso de células do tecido ósseo, por ser um dos tipos celulares que entram em contato com o material obtundente durante sua aplicação *in vivo* dentro do alvéolo dentário.

O mecanismo de ação do guaiacol que produz efeitos citotóxicos em células animais não está claramente definido, mas, acredita-se que seja similar ao mecanismo de ação antisséptica dos compostos fenólicos e que seu coeficiente fenólico também deva influenciar, já que foi visto que os compostos que têm coeficientes fenólicos mais elevados, também são mais citotóxicos (Chang et al.,

2000). Segundo Kingzett e Woodcock (1913), o coeficiente fenólico do guaiacol é menor que o do eugenol, pelo qual na mesma concentração, o Gu teria menos potência antimicrobiana mas também seria menos citotóxico.

Segundo a classificação de Dahl et al. (2006) e Kong et al. (2009), nas concentrações de 0,125 a 0,5 mM o Gu seria considerado levemente citotóxico, e moderadamente citotóxico nas concentrações de 1 a 10 mM (Gráfico 5.3). A viabilidade de mais 50% das células utilizando Gu 10 mM poderia permitir a recuperação do tecido, não obstante, isto só poderá ser confirmado em testes *in vivo*.

Ainda que esta seja uma cultura primária de células, que tende a ter as características morfológicas e bioquímicas similares ao tecido original, a sensibilidade das células *in vivo* pode ser diferente (Czekanska et al., 2012). Esta sensibilidade depende de uma série de características que estão parcialmente preservadas *in vitro*, como a biotransformação química, adesão, permeabilidade de membrana, determinantes de superfície, vias de síntese intracelular, mecanismos adaptativos e de recuperação (Ekwall et al., 1990). Além disso, o nicho doador destas células (a calvária) é diferente do nicho receptor do material embotador (o alvéolo dentário), onde existem outros tipos celulares interagindo entre si, como fibroblastos do ligamento periodontal remanescente, células da medula óssea e osteoclastos, assim como matriz extracelular mineralizada e não mineralizada (Devlin; Sloan, 2002; Hupp, 2014).

Isto poderia explicar parcialmente o fato de Haghighat et al. (2012) não terem relatado efeitos adversos (como necrose óssea) no seu estudo clínico de alveolite, mesmo tendo utilizado uma concentração de guaiacol de 3% (241,74 mM), mais de 20 vezes maior que 10 mM, que foi a maior concentração testada neste estudo e que permitiu uma viabilidade de 52,96% das células.

Os resultados da citotoxicidade (Gráfico 5.3) também mostram que a concentração de Gu que causa a inibição de 50% do crescimento celular (IC_{50}) é muito próxima de 10 mM (10 mM permitem 52,96% de viabilidade celular). Na literatura não foram encontrados estudos avaliando a citotoxicidade do guaiacol em osteoblastos, porém, quando comparado a outras células, este resultado é similar ao

encontrado por Chang et al. (2000) em fibroblastos isoladas da polpa de pré-molares humanos, cuja IC_{50} foi 9,8 mM (obtida através do teste de fluorescência de Hoechst 33258 que permite a quantificação de DNA).

O trabalho de Chang et al. (2000) também mostrou que o Gu não tem efeitos genotóxicos. Isto se deve à sua propriedade antioxidante que promove a limpeza dos radicais de oxigênio livres que induziriam mutações nas células. Esse trabalho ainda evidencia que o Gu é menos citotóxico que o eugenol (material muito utilizado em curativos intra-alveolares) que apresenta uma IC_{50} de 0,9 mM nas mesmas células, enquanto que a IC_{50} do guaiacol é 9,8mM, ou seja, o eugenol é citotóxico em concentrações dez vezes menores que o guaiacol.

Kobayashi et al. (2013) avaliaram a citotoxicidade do Gu em células da polpa humana através da quantificação da formação de colônias celulares, e encontraram que o IC_{50} do Gu é 0,78 mM. Este resultado obtido no trabalho de Kobayashi et al. difere muito do trabalho do Chang et al. e do nosso, provavelmente devido à diferença na metodologia utilizada em cada estudo. Na mesma pesquisa, os autores apontam que os níveis de inibição de crescimento não estão relacionados aos níveis de morte celular, já que esta mesma concentração (0,78 mM) causou apoptose em menos de 2% das células. Isto sugere que o Gu pode causar certo nível de inibição da divisão celular, mas que causa pouca morte celular. Ainda em células de polpa, Kobayashi et al. (2013) também demonstraram que o Gu é significativamente menos citotóxico que o eugenol e o óxido de zinco, cujos valores de IC_{50} foram de 0,5 e 0,2 mM, respectivamente.

Ao mesmo tempo, o ensaio de MTT revelou que a complexação de Gu em β cd diminuiu significativamente sua citotoxicidade nas concentrações de 0,5 a 0,125 mM (Gráfico 5.4), e que esta tendência citoprotetora também acontece na concentração de 1 mM, mesmo não sendo estatisticamente significativo. Apesar de não ter sido possível determinar a viabilidade celular do complexo de inclusão nas concentrações de 2 e 10 mM (por problemas técnicos, descolamento das células da placa), acredita-se que a toxicidade do Gu, quando complexado, não estaria sendo aumentada ou ainda poderia estar sendo diminuída já que a β cd pura não foi citotóxica (ainda deve ser comprovado em estudos futuros).

Além da baixa toxicidade da β cd em células *in vitro*, foi provado que esta ciclodextrina não é tóxica quando utilizada por via oral, bucal, retal ou tópica (Brewster; Loftsson, 2007).

A diminuição da citotoxicidade de um fármaco complexado em comparação ao fármaco livre acontece pela diminuição do seu contato direto com as membranas biológicas e pelo incremento da sua estabilidade química, o que aumenta a efetividade do fármaco mesmo em doses menores (Rasheed et al., 2008; Sofian et al., 2014). Rajewski e Stella (1996) explicam que as ciclodextrinas e seus derivados podem reduzir a irritação local dos tecidos devido a uma diminuição na fração de fármaco livre resultante do equilíbrio de inclusão.

Como em nossos resultados, outros estudos observaram a diminuição da citotoxicidade de certas drogas na presença de ciclodextrinas. Teixeira et al. (2015) viram que a complexação de clorexidina em α - e β -ciclodextrina, em diferentes razões molares, diminuiu a citotoxicidade deste antimicrobiano em cultura de fibroblastos e osteoblastos, e que o complexo clorexidina- β cd foi menos citotóxico que clorexidina- α cd, especialmente na razão molar de 1:4. Corrêa et al. (2005) observaram que a β cd foi capaz de reduzir a citotoxicidade do fármaco desidrocrotina em fibroblastos e hepatócitos de ratos *in vitro*. Ainda, Sofian et al. (2014) provaram que a complexação de levodopa com Hp- β -ciclodextrina diminui a toxicidade da droga em astrócitos.

A presença concomitante de um efeito protetor em células eucariontes e um efeito prejudicial em células procariontes exercido pelas ciclodextrinas, pode ser explicada pelas diferenças estruturais nas membranas biológicas que interagem com a superfície externa hidrofílica da CD (Teixeira et al., 2015). As células eucariontes possuem na sua membrana celular, regiões extremamente organizadas, pouco fluídas (mais rígidas) e altamente empacotadas, chamadas de balsas lipídicas ou *lipid rafts*, ricas em colesterol e esfingolipídeos (LaRocca, 2013). Já, a membrana das células procariontes é composta principalmente por fosfolipídeos, com grandes quantidades de lipídeos aniônicos e sem colesterol. As cadeias acil se localizam entre os fosfolipídeos e se mantêm unidos por forças de van der Waals. Estas forças são consideravelmente mais fracas que as pontes de hidrogênio presentes nos *lipid rafts* dos eucariontes, sendo as responsáveis pela perda do empacotamento das

membranas procariontes e das regiões de membrana não pertencentes aos *lipid rafts* nos eucariontes. (Teixeira et al. 2015).

Durante este estudo não foram realizados testes físico-químicos específicos para comprovar, de forma direta, se houve um aumento da estabilidade do Gu após a formação do complexo de inclusão. Não obstante, os estudos de Kayaci e Uyar (2012) e Kayaci et al. (2013), feitos com os compostos fenólicos vanilina e eugenol, mostraram que a complexação destes ativos com β e γ -ciclodextrina melhoram sua estabilidade térmica e reduzem sua volatilidade, atrasando sua liberação e aumentando sua durabilidade. Ademais, os ensaios de citotoxicidade e microbiológicos apresentados neste trabalho (Gráfico 5.4 e Tabela 5.1) também mostram, porém indiretamente, que houve uma alteração positiva no fármaco complexado, sugerindo que a β cd está melhorando a estabilidade do guaiacol, como ocorre com o eugenol e a vanilina. Estudos futuros deverão ser realizado para comprovar a alteração na estabilidade.

Também foi avaliado neste estudo, o efeito do complexo Gu: β cd no reparo tecidual, através de análise histológica em modelo experimental em ratos. Nosso estudo difere de outros na literatura (de Melo Júnior et al., 2002; Cardoso et al., 2011; Rodrigues et al., 2011) porque utiliza o molar do rato em lugar do incisivo central. Apesar de ser mais fácil sua manipulação, o incisivo do rato não apresenta a mesma estrutura de sustentação que os dentes humanos. O incisivo central do rato é um dente de erupção e crescimento contínuo e seu ligamento periodontal possui uma organização diferenciada. Unicamente as faces linguais e mesiais apresentam ligamento periodontal propriamente dito, e as faces distais e vestibulares apresentam um tecido conjuntivo correspondente ao folículo dental, entre o órgão do esmalte e o osso alveolar (Merzel; Salmon, 2008) e, portanto, não se assemelha a um dente humano.

O molar do rato, por apresentar maior semelhança com os dentes humanos, foi escolhido para este estudo como modelo experimental. E ao igual que no estudo de de Melo Júnior et al. (2002), a alveolite seca foi induzida unicamente com o uso de adrenalina, simulando a situação de não formação ou perda do coágulo sanguíneo, com presença de osso exposto que pode chegar a ser infectado, evoluindo para quadros de alveolite supurativa, abscesso ou osteomielite (Navas; Mendoza, 2010).

O alvéolo humano (sem alveolite) leva de 4 a 6 meses para culminar o processo de cicatrização com preenchimento com osso trabecular e medula óssea (Hupp, 2014; Araújo et al., 2015). Já no alvéolo de molar de rato, o preenchimento ósseo está quase finalizado aos 21 dias (Vieira et al., 2015). Porém, embora existam estas diferenças referentes ao tamanho do alvéolo, à cronologia de cicatrização e à resistência do animal (Rodrigues et al., 2011), este modelo é importante para corroborar as evidências observadas nos estudos *in vitro* e pode simular os eventos de reparo alveolar em humanos em poucos dias.

A formação de coágulo sanguíneo é considerada um passo fundamental para o processo de reparo alveolar ao proporcionar fibrina e fatores de crescimento (Vieira et al., 2015). No presente estudo (Figura 5.3) foi observado que, mesmo na ausência de coágulo, o reparo acontece em todas suas fases, comprovando a teoria de que a alveolite seca é autolimitante (Fazakerley, Field, 1991; Navas; Mendoza, 2010). Além disso, o grupo C- (controle negativo) foi um dos grupos que apresentou reparo alveolar mais acelerado. Estes dois fatos sugerem que, do ponto de vista histológico, não seria necessária a aplicação de algum material obtundente para promover a cura do quadro, porém, clinicamente a AS traz tanto desconforto para o paciente, que não é indicado deixá-lo sem um curativo intra-alveolar que promova analgesia local, evite infecção, previna halitose e o acúmulo de alimentos (menos crítico no rato onde o alvéolo é muito menor) (Kaya et al., 2011).

O reparo alveolar acontece por segunda intenção, através de uma resposta fibroproliferativa e seu início é marcado por uma fase inflamatória em resposta à agressão tecidual da exodontia, independente da presença de alveolite (Rodrigues et al., 2011; Araújo et al., 2015). No nosso estudo, todos os grupos apresentaram infiltrado inflamatório, facilmente observado no dia 7, e que foi sendo eliminado com o passar dos dias, exceto nos grupos onde houve permanência do material obtundente, isto é especialmente no grupo C+ (Alvogyl) e na formação de abscessos (grupo β cd e C+).

Também no dia 7, o alvéolo foi preenchido por tecido conjuntivo caracterizado por numerosos fibroblastos, vasos sanguíneos neoformados e células inflamatórias, o que corresponde aos achados de estudos prévios (Rodrigues et al., 2011; Vieira et al., 2015). Na região apical, foi observado o início da osteogênese, exceto no grupo

C+ (Alvogy) onde a formação óssea encontrava-se menos evoluída. Em comparação a alvéolos sadios do estudo de Vieira et al. (2015), o reparo no sétimo dia estaria ligeiramente atrasado, já que nos animais sem alveolite a formação óssea não é vista unicamente na região apical e se encontra em fase mais avançada, com grande quantidade de osteócitos e confluência de trabéculas ósseas.

No 14º dia, a quantidade de tecido conjuntivo diminuiu e a ossificação se estendeu para o terço médio do alvéolo, chegando ao terço cervical no 21º dia. A formação óssea, em todos os tempos, foi mais intensa nos grupos Gu:βcd e C-. No grupo C-, a inexistência de restos de materiais, a ausência de infecção no alvéolo e a consequente menor reação inflamatória, podem ter favorecido a formação óssea. Entretanto, como mencionado anteriormente, este grupo também não teria proteção mecânica do osso exposto, controle de infecção em caso de contaminação alveolar (por exemplo, causada pela entrada de restos de alimento no alvéolo associada à presença de microrganismos) e principalmente, analgesia.

Cardoso et al. (2011) observaram que nos alvéolos de incisivos de ratos que não receberam nenhum tratamento para a alveolite seca (induzida com adrenalina e inserção de secreção purulenta), a presença de infiltrado inflamatório polimorfonuclear ainda era bastante visível no 28º dia e que a formação óssea encontrava-se significativamente atrasada em relação aos grupos que receberam tratamento, porém, este estudo difere do nosso porque estes alvéolos apresentavam alveolite supurativa. Rodrigues et al. (2011) também observaram as mesmas características em alvéolos contaminados com secreção purulenta, portanto, demonstram que o controle da infecção é extremamente importante para não atrasar a continuidade do processo de reparo alveolar.

Já no grupo Gu:βcd, mesmo com a permanência de certos restos de materiais na superfície do alvéolo, o controle da infecção proporcionado, provavelmente, pelo Gu deve ter contribuído. Outro fato que pode ter favorecido a formação óssea é o possível efeito osteogênico do Gu, observado *in vitro* por Kato et al. (2010). Este fato não pode ser claramente comprovado com o nosso estudo histológico já que, mesmo o grupo Gu:βcd tendo apresentado completa formação óssea aos 21 dias, este resultado foi muito similar ao grupo C-. Outros estudos serão necessários para comprovar se a taxa de atividade osteogênica é clinicamente relevante, se esta

propriedade permanece depois da complexação do Gu dentro da β cd, e se isto acontece tanto *in vivo* como *in vitro*. Testes de imunohistoquímica ou da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) poderiam ser utilizados para este fim.

A comprovação da atividade osteogênica do complexo de inclusão Gu: β cd traria perspectivas futuras, não apenas no tratamento de alveolite seca, mas também no campo da engenharia tecidual para regeneração de defeitos ósseos.

Neste estudo, o Alvogyl[®] foi utilizado como controle positivo por sua ampla divulgação ao redor do mundo e por ser de fácil inserção. Alvogyl[®] é uma marca comercial fabricada pela Septodont (França) para o tratamento da alveolite seca, que contém eugenol, iodofórmio e butamben como princípios ativos (Kaya et al., 2011). Apesar de o fabricante indicar que o material é autoeliminado do alvéolo, tem sido visto que em muitos casos ele permanece durante dias (Wegenast, 2013) e ao conter fibras vegetais (celulose) este também não pode ser reabsorvido pelo organismo.

Esta pesquisa mostrou que o grupo tratado com Alvogyl (C+) apresentou uma maior quantidade de infiltrado inflamatório em comparação aos outros grupos, assim como atraso no preenchimento ósseo tanto no dia 7, como nos dois tempos posteriores. Isto se deve, provavelmente, à permanência de material no alvéolo que pode acumular grande número de microrganismos, gerar reações de corpo estranho e promover inflamação acentuada. Este fato também tem sido observado em diversos estudos clínicos, revisões e relatos de caso (Kaya et al., 2011; Wegenast, 2013; Faizel et al., 2015; Taberner-Vallverdú et al., 2015).

Kaya et al. (2011) observaram que após 3 dias de tratamento de alveolite seca, nenhum dos pacientes do grupo teste (laser de baixa potência) apresentava o alvéolo vazio, já no grupo Alvogyl, só a metade dos pacientes tinham iniciado o processo de reparo e a exposição óssea era maior. Faizel et al. (2015) viram que o grupo teste Neocon (contendo sulfato de neomicina e benzocaína) promoveu um reparo alveolar mais rápido que o Alvogyl. Wegenast (2013) relata ter observado grande número de casos de infecção após a colocação de Alvogyl para tratamento de AS em humanos. Ryalat et al. (2011) utilizaram Alvogyl para prevenção de

alveolite, e também observaram uma prevalência maior de infecção nestes pacientes.

A única vantagem do Alvogyl sobre outros tratamentos parece ser o alívio da dor proporcionado nas primeiras horas de uso. Estudos tem observado que no primeiro dia de aplicação, o Alvogyl proporciona um efeito analgésico maior que outros tratamentos, porém, nos dias subsequentes seu efeito acaba sendo inferior (Kaya et al., 2011; Eshghpour et al., 2015; Faizel et al., 2015). Isto pode ser um reflexo do atraso no curso do reparo alveolar.

Esta perda rápida do efeito analgésico, o atraso no reparo alveolar (Figura 5.3) e a formação de abscessos no grupo Alvogyl (que possui componentes antimicrobianos), sugerem que o material parece perder suas propriedades mais precocemente que o Gu:βcd e possivelmente se torne um nicho para o acúmulo de microrganismos.

No grupo que recebeu βcd pura, também foi observada a presença de abscessos e a formação óssea aconteceu de forma mais lenta que no grupo Gu:βcd. Este fato comprova que o efeito antimicrobiano do Gu permanece *in vivo* e que este efeito influencia positivamente no reparo alveolar. Além disso, a complexação do Gu na βcd pode estar prolongando sua liberação e superando o efeito do Alvogyl.

Devido à falta de um parâmetro quantitativo na avaliação histológica, e às diferenças no modelo experimental de alveolite, principalmente relacionadas ao dente utilizado e aos tempos de avaliação, se torna difícil comparar os eventos de reparo alveolar que aconteceram no nosso estudo com os de outros encontrados na literatura (Cardoso et al., 2011; Rodrigues et al., 2011; de Melo Júnior et al., 2002).

Correlacionando aos dados de citotoxicidade, utilizando o Gu na concentração de 10 mM o tecido se mostrou viável e conseguiu completar todas as etapas da cicatrização (Figuras 5.3 e 5.4). Mesmo estando presente a atividade osteoclástica no grupo Gu:βcd, considera-se que a reabsorção das paredes alveolares e dos septos interradiculares seja um processo normal (Hupp, 2014; Vieira et al., 2015) e foi observado em todos os grupos do nosso estudo.

Estes resultados encorajam a hipótese de que o Gu:βcd pode ser explorado como uma alternativa nova, eficaz e segura para o tratamento de alveolite seca. Como discutido nos parágrafos anteriores, sua ação antimicrobiana em doses baixas, a menor citotoxicidade em comparação a outros princípios ativos conhecidos, como o eugenol e o óxido de zinco (Chang et al., 2000; Kobayashi et al., 2013), o reparo alveolar adequado e quase sem atraso e a combinação do efeito antimicrobiano e analgésico (Hirafugi, 1984; Fitzgerald et al., 2005; Park et al., 2009; Ouwehand et al., 2010) no mesmo curativo, representam as maiores vantagens do complexo.

Além disso, devido à possível liberação lenta do princípio ativo, o curativo intra-alveolar não precisaria ser trocado com frequência e reduziria as visitas do paciente ao dentista. Ainda, por ser de uso tópico, poderá gerar menos efeitos colaterais e resistência ao princípio ativo, e promover um tamponamento mecânico do alvéolo dentário. Contudo, ressaltamos a necessidade de realizar estudos complementares, como testes de cinética de liberação do ativo ao longo do tempo, testes de citotoxicidade em outros tipos celulares (ex: fibroblastos), imunoensaios para quantificação de citocinas inflamatórias e proteínas relacionadas à osteogênese, comportamento do complexo na presença de veículos, e testes experimentais para avaliação de dor em animais, antes da sua aplicação em ensaios clínicos em humanos.

7 CONCLUSÕES

Baseados nos resultados obtidos, podemos verificar que:

1. O guaiacol forma um complexo supramolecular com a β -ciclodextrina (Gu: β cd), na razão molar de 1:1.
2. O complexo Gu: β cd e o guaiacol puro apresentam efeito bacteriostático e bactericida, concentração-dependente, frente a *E. coli*, *S. aureus*, *S. mitis*, *S. mutans*, *S. sanguis* e *A. actinomycetemcomitans*.
3. A complexação do Gu em β cd potencializa seu efeito bacteriostático e bactericida, exceto frente a *E. coli*.
4. As maiores concentrações de Gu testadas no presente estudo (10 a 1 mM) são moderadamente citotóxicas em osteoblastos isolados de calvária de rato. As demais concentrações (0,5 a 0,125) são levemente citotóxicas.
5. A formação do complexo de inclusão com β cd protegeu os osteoblastos da citotoxicidade do Gu nas concentrações de 0,5 a 0,125 mM.
6. O tratamento de alveolite seca em alvéolos de molares de rato, utilizando o complexo de inclusão Gu: β cd, permitiu a regeneração tecidual do alvéolo quase em sua totalidade até o 21^o dia.
7. A cronologia de regeneração tecidual com o complexo Gu: β cd foi muito similar ao controle negativo (alveolite sem tratamento), mais rápida que a β cd pura e esta última mais rápida que o controle positivo (Alvogyl).

Assim, podemos concluir que o complexo de inclusão Gu: β cd tem potencial para ser utilizado como alternativa futura no tratamento de alveolite seca devido à melhora das propriedades biológicas do guaiacol quando complexado à ciclodextrina e à não interferência no processo de regeneração tecidual.

REFERÊNCIAS¹

Akinbami BO, Godspower T. Dry socket: incidence, clinical features, and predisposing factors. *Int J Dent*. 2014;2014:796102. doi: 10.1155/2014/796102.

Alexander RE. Dental extraction wound management: A case against medicating postextraction sockets. *J Oral Maxillofac Surg*. 2000 May;58(5):538-51.

Alford AI, Hankenson KD. Matricellular proteins: Extracellular modulators of bone development, remodeling, and regeneration. *Bone*. 2006 Jun;38(6):749-57.

Alford AI, Kozloff KM, Hankenson KD. Extracellular matrix networks in bone remodeling. *Int J Biochem Cell Biol*. 2015 May 18;65:20-31.

Araújo MG, Silva CO, Misawa M, Sukekava F. Alveolar socket healing: what can we learn? *Periodontol 2000*. 2015 Jun;68(1):122-34. doi: 10.1111/prd.12082.

Aubin JE, Bonnelye E. Osteoprotegerin and its ligand: a new paradigm for regulation of osteoclastogenesis and bone resorption. *Osteoporos Int*. 2000;11:905–13.

Barreto L, Cunha-Filho M. Ciclodextrina: importante excipiente farmacêutico funcional. *Latin Am J Pharm*. 2008;27(4):629-36.

Bawa R. Nanoparticle-based therapeutics in humans: a survey. *Nanotechnol Law Bus*. 2008 Summer;5(2):135-55.

Bazerque P. *Farmacologia odontológica*. 1ª ed. Buenos Aires: Editora Mundi S.A.I.C y F; 1976. 879 p.

Belfiglio EJ, Wonderlich ST, Fox LJ. Myospherulosis of the alveolus secondary to the use of Terra-Cortril and Gelfoam. Report of a case. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1986 Jan;61(1):12-4.

Betts NJ, Makowski G, Shen YH, Hersh EV. Evaluation of topical viscous 2% lidocaine jelly as an adjunct during the management of alveolar osteitis. *J Oral Maxillofac Surg*. 1995 Oct;53(10):1140–4.

¹ De acordo com estilo Vancouver

Bilia AR, Guccione C, Isacchi B, Righeschi C, Firenzuoli F, Bergonzi MC. Essential oils loaded in nanosystems: a developing strategy for a successful therapeutic approach. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2014;2014:651593.

Birn H. Bacteria and fibrinolytic activity in "dry socket". *Acta Odontol Scand*. 1970 Dec;28(6):773–83.

Birn H. Etiology and pathogenesis in fibrinolytic alveolitis (dry socket). *Int J Oral Surg*. 1973;2(5):211–63.

Birn H. Fibrinolytic activity of the alveolar bone in dry socket. *Acta Odontol Scand*. 1972a Mar;30(1):23-3.

Birn H. Kinines and pain in dry socket. *Int J Oral Surg*. 1972b;1(1):34-42.

Birn H, Myhre-Jensen O. Cellular fibrinolytic activity of human alveolar bone. *Int J Oral Surg*. 1972;1(3):121-5.

Block SS. Disinfection, sterilization and preservation. 5th ed. Philadelphia (PA): Lippincott Williams and Williams; 2001. Chapter 13, Phenolic Compounds; p. 255-82.

Bloomer CR. Alveolar osteitis prevention by immediate placement of medicated packing. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2000 Sep;90:282–4.

Blum IR. Contemporary views on dry socket (alveolar osteitis): a clinical appraisal of standardization, aetiopathogenesis and management: a critical review. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg*. 2002 Jun;31(3):309-17.

Bortoluzzi MC, Manfro R, Poggere V, Silva RD. Incidence of fibrinolytic alveolitis, acute infection, edema, and pain longer than two days after dental extraction. *Rev Odonto Ciênc*. 2008;23(2):111-4.

Bowe D C, Rogers S, Stassen L. The management of dry socket/alveolar osteitis. *J Ir Dent Assoc*. 2011 Dec- 2012 Jan;57(6):305–10.

Brewster ME, Loftsson T. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. *Adv Drug Deliv Rev*. 2007;59(7):645-66.

Burgoyne CC, Giglio JA, Reese SE, Sima AP, Laskin DM. The efficacy of a topical anesthetic gel in the relief of pain associated with localized alveolar osteitis. *J Oral Maxillofac Surg*. 2010 Jan;68:144–8. doi: 10.1016/j.joms.2009.06.033.

Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *Int J Food Microbiol*. 2004 Aug;94(3):223-53.

Cardaropoli G, Araújo M, Lindhe J. Dynamics of bone tissue formation in tooth extraction sites. An experimental study in dogs. *J Clin Periodontol*. 2003 Sep;30(9):809-18.

Cardoso CL, Rodrigues MTV, Ferreira O Jr, Garlet GP, Carvalho. Clinical concepts of dry socket. *J Oral Maxillofac Surg*. 2010 Aug;68:1922-32.

Cardoso CL, Ferreira Júnior O, Carvalho PS, Dionísio TJ, Cestari TM, Garlet GP. Experimental dry socket: microscopic and molecular evaluation of two treatment modalities. *Acta Cir Bras*. 2011 Oct;26(5):365-72.

Celanese Corporation [homepage on the Internet]. Irving: EVA-009_VitalDoseOverview_BRO_EN_0615; c2015 [cited 2015 May 6]. Available from: http://www.vitaldose.com/utilizing/delivery_systems.htm.

Celeromics [homepage on the Internet]. Valencia: Technical Note - Neubauer Chamber Cell Counting; 2008 [cited 2015 Nov 16]. Available from: <http://www.celeromics.com/es/resources/Technical%20Notes/Como-contar-celulas-con-camara-de-Neubauer-Paso1.php>.

Chang YC, Tai KW, Huang FM, Huang MF. Cytotoxic and Nongenotoxic Effects of Phenolic Compounds in Human Pulp Cell Cultures. *J Endod*. 2000 Aug;26(8):440-3.

Ciancio S, Bourgault P. Clinical pharmacology for dental professionals. 2nd ed. Littleton: PSG Publishing Company; 1984. 392 p.

Clinical Laboratory Standard Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved standard. 7th ed. CLSI document M7-A7. 2006;26(2):14-8.

Colby RC. The general practitioner's perspective of the etiology, prevention, and treatment of dry socket. *Gen Dent* 1997 Sep-Oct;9:461–7.

Corrêa DH, Melo PS, de Carvalho CA, de Azevedo MB, Durán N, Haun M. Dehydrocrotonin and its beta-cyclodextrin complex: cytotoxicity in V79 fibroblasts and rat cultured hepatocytes. *Eur J Pharmacol*. 2005 Mar 7;510(1-2):17-24.

Cortés ME, Sinisterra RD, Avila-Campos MJ, Tortamano N, Rocha RG. The Chlorexidine: β -Cyclodextrin inclusion compound: Preparation, characterization and microbiological evaluation. *J Incl Phenom Macrocycl Chem*. 2001;40:297-302.

Cortés ME. Estudo dos compostos de inclusão tipo hospedeiro convidado entre a clorexidina e a β -ciclodextrina: Avaliação in vitro [Tese]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo; 1999.

Czekanska EM, Stoddart MJ, Richards RG, Hayes JS. In search of an osteoblast cell model for in vitro research. *Eur Cell Mater*. 2012 Jul 9;24:1-17.

Dahl JE, Frangou-Polyzois MJ, Polyzois GL. In vitro biocompatibility of denture relining materials. *Gerodontology*. 2006;23:17–22.

Daly B, Sharif MO, Newton T, Jones K, Worthington HV. Local interventions for the management of alveolar osteitis (dry socket). *Cochrane Database Syst Rev*. 2012 Dec;12:CD006968. doi: 10.1002/14651858.CD006968.

Daniel AN, Sartoretto SM, Schmidt G, Caparroz-Assef SM, Bersani-Amado CA, Cuman RKN. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of eugenol essential oil in experimental animal models. *Rev Bras Farmacogn*. 2009;19(1b):212-7.

Davis ME, Brewster ME. Cyclodextrin-based pharmaceuticals: past, present and future. *Nat Rev Drug Discov*. 2004 Dec;3(12):1023-35.

De Melo Júnior EJ, Raposo MJ, Lisboa Neto JA, Diniz MF, Marcelino Júnior CA, Sant'Ana AE. Medicinal plants in the healing of dry socket in rats: Microbiological and microscopic analysis. *Phytomedicine*. 2002 Mar;9(2):109-16.

Denyer SP. Mechanisms of action of antibacterial biocides. *Int Biodeterior Biodegradation*. 1995;36(3):227-45.

Devlin H, Sloan P. Early bone healing events in the human extraction socket. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2002 Dec;31(6):641-5.

Divakar S, Maheswaran MM. Structural Studies on Inclusion Compounds of β -Cyclodextrin with Some Substituted Phenols. *J Incl Phenom Mol Recognit Chem*. 1997;27:113–26.

Dohi T, Anamura S, Shirakawa M, Okamoto H, Tsujimoto A. Inhibition of Lipoxygenase by Phenolic Compounds. *Japan J Pharmacol*. 1991 Apr;55:547-50.

Ekwall B, Silano V, Paganuzzi-Stammati A, Zucco F. Toxicity tests with mammalian cell cultures. In: Bourdeau P, Somers E, Richardson GM, Hickman JR, editors. *Short-term toxicity tests for non-genotoxic effects*. 1st ed. New York: John Wiley & Sons Ltd; 1990. p. 75-97.

Erickson RI, Wilkison RH. A study of dry sockets. *Oral Surg, Oral Med, Oral Pathol*. 1960;13(9):1046–50.

Eshghpour M, Nejat AH. Dry socket following surgical removal of impacted third molar in an Iranian population: incidence and risk factors. *Niger J Clin Pract*. 2013 Oct-Dec;16(4):496-500. doi: 10.4103/1119-3077.116897.

Eshghpour M, Ahrari F, Najjarkar NT, Khajavi MA. Comparison of the effect of low level laser therapy with alvogyl on the management of alveolar osteitis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2015 May;20(3):e386-92.

Faizel S, Thomas S, Yuvaraj V, Prabhu S, Tripathi G. Comparison between neocone, alvogyl and zinc oxide eugenol packing for the treatment of dry socket: a double blind randomised control trial. *J Maxillofac Oral Surg*. 2015 Jun;14(2):312-20.

Fazakerley M, Field EA. Dry socket: A painful post-extraction complication (a review). *Dent Update*. 1991 Jan-Feb;18(1):31-4.

Felice B, Prabhakaran MP, Rodríguez AP, Ramakrishna S. Drug delivery vehicles on a nano-engineering perspective. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2014;41:178-95.

Figueiredo IMB, Aguiar ASW. *Emergências odontológicas ambulatoriais*. 1^a ed. São Paulo: Santos Livraria Editora; 2001. 185 p.

Fitzgerald DJ, Stratford M, Gasson MJ, Narbad A. Structure-function analysis of the vanillin molecule and its antifungal properties. *J Agric Food Chem*. 2005 Mar 9;53(5):1769-75.

Galano A, Leo JR, Galano A, León-Carmona JR, Alvarez-Idaboy JR. Influence of the environment on the protective effects of guaiacol derivatives against oxidative stress: Mechanisms, kinetics, and relative antioxidant activity. *J Phys Chem B*. 2012 Jun;116(24):7129–37.

Gregori C, Campos AC. *Cirurgia buco-dento-alveolar*. 2ª ed. São Paulo: Sarvier; 2004. 281 p.

Haghighat A, Bahri Najafi R, Bazvand M, Badrian H, Khalighinejad N, Goroohi H. The effectiveness of GECB pastille in reducing complications of dry socket syndrome. *Int J Dent*. 2012;2012:587461. doi: 10.1155/2012/587461.

Haraji A, Rakhshan V. Single-dose intra-alveolar chlorhexidine gel application, easier surgeries, and younger ages are associated with reduced dry socket risk. *J Oral Maxillofac Surg*. 2014 Feb;72(2):259-65.

Hill LE, Gomes C, Taylor TM. Characterization of beta-cyclodextrin inclusion complexes containing essential oils (trans-cinnamaldehyde, eugenol, cinnamon bark, and clove bud extracts) for antimicrobial delivery applications. *Food Sci Technol*. 2013;51(1):86–93

Hing KA, Best SM, Tanner KE, Bonfield W, Revell PA. Mediation of bone ingrowth in porous hydroxyapatite bone graft substitutes. *J Biomed Mater Res A*. 2004 Jan;68(1):187-200.

Hirafuji M. Inhibition of prostaglandin 12 biosynthesis in rat dental pulp by phenolic dental medicaments. *Japan J Pharmacol*. 1984 Dec;36:544-6.

Hoaglin DR, Lines GK. Prevention of localized osteitis in mandibular third-molar sites using platelet-rich fibrin. *Int J Dent*. 2013;2013:875380. doi: 10.1155/2013/875380.

Hooley JR, Golden DP. The effect of polylactic acid granules on the incidence of alveolar osteitis after mandibular third molar surgery: A prospective randomized study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1995 Sep;80(3):279-83.

Hore PJ. *Nuclear magnetic resonance*. 2nd ed. Oxford: Oxford University Press; 2015. 128 p.

Houston JP, McCollum J, Pietz D, Schneck D. Alveolar osteitis: a review of its etiology, prevention, and treatment modalities. *Gen Dent*. 2002;50(5):457-63.

Hupp JR. Wound repair. In: Hupp JR, Ellis E, Tucker MR, editors. Contemporary oral and maxillofacial surgery. 6th ed. St. Louis (MO): Elsevier Mosby; 2014. p. 43-53.

Imperiale JC, Sosnik AD. Cyclodextrin complexes for treatment improvement in infectious diseases. *Nanomedicine (Lond)*. 2015 May;10(10):1621-41. doi: 10.2217/nnm.15.16.

Irie T, Uekama K. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. III. Toxicological issues and safety evaluation. *J Pharm Sci*. 1997 Feb;86(2):147-62.

Kato T, Shirayama K, Takeo W, Tsutsui TW. Induction of mRNA expression of osteogenesis-related genes by guaiacol in human dental pulp cells. *Odontology*. 2010 Jul; 98:165–9. doi: 10.1007/s10266-010-0129-0.

Kaya GS, Yapıcı G, Savas Z, DDS, Güngörmüş M. Comparison of alvogyl, salicept patch, and low-level laser therapy in the management of alveolar osteitis. *J Oral Maxillofac Surg*. 2011 Jun;69:1571-7.

Kayaci F, Uyar T. Encapsulation of vanillin/cyclodextrin inclusion complex in electrospun polyvinyl alcohol (PVA) nanowebs: Prolonged shelf-life and high temperature stability of vanillin. *Food Chem*. 2012 Aug 1;133(3):641-9.

Kayaci F, Ertas Y, Uyar T. Enhanced thermal stability of eugenol by cyclodextrin inclusion complex encapsulated in electrospun polymeric nanofibers. *J Agric Food Chem*. 2013 Aug 28;61(34):8156-65. doi: 10.1021/jf402923c.

Kiemle DJ, Silverstein RM, Webster FX. Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos. 7^o ed. Rio de Janeiro: LTC; 2006. 490p.

Kingzett CT, Woodcock RC. The bacterial testing of disinfectants: a practical criticism. *Analyst*. 1913;38(446):190-200.

Kissin I. Vanilloid-induced conduction analgesia: selective, dose-dependent, long-lasting, with a low level of potential neurotoxicity. *Anesth Analg*. 2008;107(1):271-81.

Kobayashi M, Tsutsui TW, Kobayashi T, Ohno M, Higo Y, Inaba T, Tsutsui T. Sensitivity of human dental pulp cells to eighteen chemical agents used for endodontic treatments in dentistry. *Odontology*. 2013 Jan;101(1):43-51.

Kolokythas A, Olech E, Miloro M. Alveolar Osteitis: A Comprehensive Review of Concepts and Controversies. *Int J Dent*. 2010;2010:249073. doi: 10.1155/2010/249073. Epub 2010 Jun 24.

Kong N, Jiang T, Zhou Z, Fu J. Cytotoxicity of polymerized resin cements on human dental pulp cells in vitro. *Dent Mater*. 2009;25:1371–5.

Kurkov SV, Loftsson T. Cyclodextrins. *Int J Pharm*. 2013 Aug 30;453(1):167-80.

Lalani Z, Wong M, Brey EM, Mikos AG, Duke PJ, Miller MJ, Johnston C, Montufar-Solis D. Spatial and temporal localization of FGF-2 and VEGF in healing tooth extraction sockets in a rabbit model. *J Oral Maxillofac Surg*. 2005 Oct;63(10):1500-8.

LaRocca TJ, Pathak P, Chiantia S, Toledo A, Silvius JR, Benach JL, London E. Proving lipid rafts exist: membrane domains in the prokaryote *Borrelia burgdorferi* have the same properties as eukaryotic lipid rafts. *PLoS Pathog*. 2013;9(5):e1003353. doi: 10.1371/journal.ppat.1003353. Epub 2013 May 16.

Lawrence WT, Murphy RC, Robson MC, Hegggers JP. The detrimental effect of cigarette smoking on flap survival: An experimental study in the rat. *Br J Plast Surg*. 1984 Apr;37(2):216-9.

Lee MH, Yeon KY, Park CK, Li HY, Fang Z, Kim MS, Choi SY, Lee SJ, Lee S, Park K, Lee JH, Kim JS, Oh SB. Eugenol inhibits calcium currents in dental afferent neurons. *J Dent Res*. 2005 Sep;84(9):848-51.

Liu H, Lepoittevin B, Roddier C, Guerineau V, Bech L, Herry JM, Bellon-Fontaine MN, Roger P. Facile synthesis and promising antibacterial properties of a new guaiacol-based polymer. *Polymer*. 2011 Apr;52(9):1908-16

Lynch DP, Newland JR, Mc Clendon J. Myospherulosis of oral hard and soft tissues. *J Oral Maxillofac Surg* 1984 Jun;42:349–55.

Macaev F, Boldescu V, Geronikaki A, Sucman N. Recent advances in the use of cyclodextrins in antifungal formulations. *Curr Top Med Chem*. 2013;13(21):2677-83.

Macgregor J, Hart P. Bacteria of the extraction wound. *J. Oral Surg*. 1970;28:885–7.

Maillard JY. Factors affecting the activities of microbicides. In: Fraise A, Maillard JY, Sattar S, editors. Russell, Hugo & Ayliffe's: Principles and practice of disinfection, preservation and sterilization. 5th ed. Oxford (UK): Wiley-Blackwell; 2013. p. 71-86.

Mainous EG. Foreign body reaction after zinc oxide eugenol packing in localized osteitis. *J Oral Surg.* 1974;32(3):207-8.

Meechan JG, MacGregor ID, Rogers SN, Hobson RS, Bate JP, Dennison M. The effect of smoking on immediate post-extraction socket filling with blood and on the incidence of painful socket. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 1988;26:402-9.

Meechan JG, Venchard GR, Rogers SN, Hobson RS, Prior I, Tavares C, Melnicenko S. Local anaesthesia and dry socket. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 1987;16:279-84.

Merzel J, Salmon CR. Growth and the modeling/remodeling of the alveolar bone of the rat incisor. *Anat Rec (Hoboken).* 2008 Jul;291(7):827-34. doi: 10.1002/ar.20703.

Mimura T, Yazaki K, Sawaki K, Ozawa T, Kawaguchi M. Hydroxyl radical scavenging effects of guaiacol used in traditional dental pulp sedation: reaction kinetic study. *Biomed Res.* 2005;26:139-45.

Moon SE, Kim HY, Cha JD. Synergistic effect between clove oil and its major compounds and antibiotics against oral bacteria. *Arch Oral Biol.* 2011;56(9):907-16.

Moore JW, Brekke JH. Foreign body giant cell reaction related to placement of tetracycline-treated polylactic acid: Report of 18 cases. *J Oral Maxillofac Surg* 1990 Aug;48:808-12.

Moriguchi N, Hinoi E, Takarada T, Matsushima N, Uno K, Yoneda Y. Oral administration of phenolic antidiarrheic ingredients prevents ovariectomy-induced bone loss. *Biochem Pharmacol.* 2007 Feb;73:385-93.

Murakami Y, Hirata A, Ito S, Shoji M, Tanaka S, Yasui T, Machino M, Fujisawa S. Re-evaluation of cyclooxygenase-2 inhibiting activity of vanillin and guaiacol in macrophages stimulated with lipopolysaccharide. *Anticancer Res* 2007;27:801-7.

National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database. [database on the Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US); 2004a [updated 2015 Apr 9; cited 2015 May 15]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/460>.

National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database. [database on the Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US); 2004b [updated 2015 Apr 9; cited 2015 May 15]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/444041>.

Navas RMA, Mendoza MGM. Case report: late complication of a dry socket treatment. *Int J Dent*. 2010;2010:479306. doi: 10.1155/2010/479306.

Nitzan DW. On the genesis of "dry socket." *J Oral Maxillofac Surg*. 1983 Nov;41:706-10.

Nitzan D, Sperry JF, Wilkins TD. Fibrinolytic activity of oral anaerobic bacteria. *Arch Oral Biol*. 1978;23:465-70.

Noroozi AR, Philbert RF. Modern concepts in understanding and management of the "dry socket" syndrome: comprehensive review of the literature. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009 Jan;107(1):30-35.

Ouwehand AC, Tiihonen K, Kettunen H, Peuranen S, Schulze H, Rautonen N. In vitro effects of essential oils on potential pathogens and beneficial members of the normal microbiota. *Vet Med*. 2010;55(2):71-78.

Pal US, Singh BP, Verma V. Comparative evaluation of zinc oxide eugenol versus gelatin sponge soaked in plasma rich in growth factor in the treatment of dry socket: An initial study. *Contemp Clin Dent*. 2013 Jan;4(1):37-41. doi: 10.4103/0976-237X.111592.

Park CK, Kim K, Jung SJ, Kim MJ, Ahn DK, Hong SD, Kim JS, Oh SB. Molecular mechanism for local anesthetic action of eugenol in the rat trigeminal system. *Pain*. 2009 Jul;144(1-2):84-94.

Park CK, Li HY, Yeon KY, Jung SJ, Choi SY, Lee SJ, Lee S, Park K, Kim JS, Oh SB. Eugenol inhibits sodium currents in dental afferent neurons. *J Dent Res*. 2006 Oct;85(10):900-4.

Park ES, Moon WS, Song MJ, Kim MN, Chung KH, Yoon JS. Antimicrobial activity of phenol and benzoic acid derivatives. *Int Biodeterior Biodegradation*. 2001;47(4):209-14.

Peñarrocha M, Sanchis JM, Sáez U, Gay C, Bagán JV. Oral hygiene and postoperative pain after mandibular third molar surgery. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2001 Sep;92(3):260-4.

Pinho E, Grootveld M, Soares G, Henriques M. Cyclodextrins as encapsulation agents for plant bioactive compounds. *Carbohydr Polym*. 2014 Jan 30;101:121-35. doi: 10.1016/j.carbpol.2013.08.078. Epub 2013 Sep 1.

Ragle BE, Karginov VA, Wardenburg JB. Prevention and treatment of *Staphylococcus aureus* pneumonia with a β -cyclodextrin derivative. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010 Jan;54(1):298-304. doi: 10.1128/AAC.00973-09. Epub 2009 Oct 5.

Rajewski RA, Stella VJ. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 2. In vivo drug delivery. *J Pharm Sci*. 1996 Nov;85(11):1142-69.

Rakhshan V. Common risk factors for postoperative pain following the extraction of wisdom teeth. *J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg*. 2015 Apr;41(2):59-65. doi: 10.5125/jkaoms.2015.41.2.59. Epub 2015 Apr 23.

Rasheed A, Ashok Kumar CK, Sravanti VVNNS. Cyclodextrins as drug carrier molecule: A review. *Sci Pharm*. 2008;76:567–98. doi: 10.3797/scipharm.0808-05 .

Rasubala L, Yoshikawa H, Islam AA, Nagata K, Iijima T, Ohishi M. Comparison of the healing process in plated and non-plated fractures of the mandible in rats. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2004 Aug;42(4):315-22.

Rodrigues MT, Cardoso CL, Carvalho PS, Cestari TM, Feres M, Garlet GP, Ferreira O Jr. Experimental alveolitis in rats: microbiological, acute phase response and histometric characterization of delayed alveolar healing. *J Appl Oral Sci*. 2011;19(3):260-8.

Rozanis J, Schofield ID, Warren BA. Is dry socket preventable? *Dent J*. 1977 May;43(5):233-6.

Ryalat ST, Al-Shayyab MH, Marmash A, Sawair FA, Baqain ZH, Khraisat AS. The effect of AlvogylTM when used as a post extraction packing. *Jordan J Pharm Sci*. 2011;4:149–53.

Schneider HJ, Hacket F, Rüdiger V, Ikeda H. NMR studies of cyclodextrins and cyclodextrin complexes. *Chemical Reviews*. 1998;98(5):1755-85.

Serrati S, Margheri F, Bruschi S, D'Alessio S, Pucci M, Fibbi G, Tonelli P, Del Rosso M. Plasminogen activators and inhibitor type-1 in alveolar osteitis. *Eur J Oral Sci*. 2006 Dec;114(6):500-3.

Sigma-Aldrich [homepage on the Internet]. Saint Louis: Product Information Sheet G5502; 2005 [cited 2016 Feb 29]. Available from: http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/2/g5502pis.pdf.

Silva RAB, Leonardo MR, da Silva LAB, de Castro LMS, Rosa AL, de Oliveira PT. Effects of the association between a calcium hydroxide paste and 0.4% chlorhexidine on the development of the osteogenic phenotype in vitro. *J Endod* 2008;34:1485–9.

Silva TA, Garlet GP, Fukada SY, Silva JS, Cunha FQ. Chemokines in oral inflammatory diseases: Apical periodontitis and periodontal disease. *J Dent Res*. 2007 Apr;86(4):306-19.

Silva TA, Lara VS, Silva JS, Garlet GP, Butler WT, Cunha FQ. Dentin sialoprotein and phosphoprotein induce neutrophil recruitment: A mechanism dependent on IL-1beta, TNF-beta, and CXC chemokines. *Calcif Tissue Int*. 2004 Jun;74(6):532-41.

Siqueira-Junior JF, Dantas CJS. Mecanismos celulares e moleculares da inflamação. 1ª ed. Rio de Janeiro: Medsi; 2000. 238p.

Sofian ZM, Shafee SS, Abdullah JM, Osman H, Razak SA. Evaluation of the cytotoxicity of levodopa and its complex with hydroxypropyl-β-cyclodextrin(HP-β-CD) to an astrocyte cell line. *Malays J Med Sci*. 2014 Dec;21(Spec Issue):6-11.

Song LX, Wang HM, Yang Y, Xu P. Preparation and characterization of two solid supramolecular inclusion complexes of guaiacol with β- and γ-cyclodextrin. *Bull. Chem. Soc. Jpn*. 2007;80(11):2185-95.

Street J, Bao M, deGuzman L, Bunting S, Peale FV Jr, Ferrara N, Steinmetz H, Hoeffel J, Cleland JL, Daugherty A, van Bruggen N, Redmond HP, Carano RA, Filvaroff EH. Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002 Jul;99(15):9656-61.

Suárez DF, Consuegra J, Trajano VC, Gontijo SM, Guimarães PP, Cortés ME, Denadai ÂL, Sinisterra RD. Structural and thermodynamic characterization of doxycycline/ β -cyclodextrin supramolecular complex and its bacterial membrane interactions. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2014 Jun 1;118:194-201. doi: 10.1016/j.colsurfb.2014.01.028. Epub 2014 Apr 19.

Sweet JB, Butler DP. Predisposing and operative factors: effect on the incidence of localized osteitis in mandibular third molar surgery. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1978 Aug;46:206–15.

Sweet JB, Butler DP. The relationship of smoking to localised osteitis. *J Oral Surg* 1979 Oct;37:(10)732–5.

Taberner-Vallverdú M, Nazir M, Sánchez-Garcés MÁ, Gay-Escoda C. Efficacy of different methods used for dry socket management: A systematic review. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2015;20(5):e633-9.

Tarakji B, Saleh LA, Umair A, Azzeghaiby SN, Hanouneh S. Systemic review of dry socket: aetiology, treatment, and prevention. *J Clin Diagn Res*. 2015 Apr;9(4):ZE10-3. doi: 10.7860/JCDR/2015/12422.5840.

Teixeira KI, Araújo PV, Neves BR, Mahecha GA, Sinisterra RD, Cortés ME. Ultrastructural changes in bacterial membranes induced by nano-assemblies β -cyclodextrin chlorhexidine: SEM, AFM, and TEM evaluation. *Pharm Dev Technol*. 2013;18(3):600-8.

Teixeira KI, Denadai AM, Sinisterra RD, Cortés ME. Cyclodextrin modulates the cytotoxic effects of chlorhexidine on microorganisms and cells in vitro. *Drug Deliv*. 2015 May;22(3):444-53. doi: 10.3109/10717544.2013.879679.

Tjernberg A. Influence of oral hygiene measures on the development of alveolitis sicca dolorosa after surgical removal of mandibular third molars. *Int J Oral Surg*. 1979 Dec;8:430–4.

Trieger N, Schlagel GD. Preventing dry socket: a simple procedure that works. *J Am Dent Assoc* 1991;122:67–8.

Tsirlis AT, Lakovidis DP, Parissis NA. Dry socket: Frequency of occurrence after intraligamentary anesthesia. *Quintessence Int*. 1992;23(8):575-7.

U.S. Pharmacopeial Convention [homepage on the Internet]. Rockville: Safety Data Sheet: Beta Cyclodextrin; 2007 [cited 2016 Feb 29]. Available from: <http://www.uspmsds.com/msds/controller>.

van Meerloo J, Kaspers GJ, Cloos J. Cell sensitivity assays: the MTT assay. *Methods Mol Biol*. 2011;731:237-45. doi: 10.1007/978-1-61779-080-5_20.

Venturini CG, Nicolini J, Machado C, Machado VG. Propriedades e aplicações recentes das ciclodextrinas. *Quim Nova*. 2008;31(2):360-8.

Vezeau PJ. Dental extraction wound management: medicating postextraction sockets. *J Oral Maxillofac Surg*. 2000 May;58(5):531-7.

Vieira AE, Repeke CE, Ferreira Junior S de B, Colavite PM, Biguetti CC, Oliveira RC, Assis GF, Taga R, Trombone AP, Garlet GP. Intramembranous bone healing process subsequent to tooth extraction in mice: micro-computed tomography, histomorphometric and molecular characterization. *PLoS One*. 2015;10(5):e0128021.

Vummaneni V, Nagpal D. Taste masking technologies: an overview and recent updates. *Int J Res Pharm Biomed Sci*. 2012;3(2):510-24.

Wegenast S. Observe the healing process. *Br Dent J*. 2013;214(5):217.

Xu JL, Sun L, Liu C, Sun ZH, Min X, Xia R. Effect of oral contraceptive use on the incidence of dry socket in females following impacted mandibular third molar extraction: a meta-analysis. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2015;44(9):1160-5.

Yang BH, Piao ZG, Kim YB, Lee CH, Lee JK, Park K, Kim JS, Oh SB. Activation of vanilloid receptor 1 (VR1) by eugenol. *J Dent Res*. 2003 Oct;82(10):781-5.

Yazaki K, Mimura T, Kawaguchi M. Activating effects of phenolic compounds on the osteogenic cell line. *Bull Tokyo Dent Coll*. 1993;34:141-5.

Yugoshi LI, Sala MA, Brentegani LG, Lamano Carvalho TL. Histometric study of socket healing after tooth extraction in rats treated with diclofenac. *Braz Dent J*. 2002;13(2):92-6.

Zhang HM, Li Z, Uematsu K, Kobayashi T, Horikoshi K. Antibacterial activity of cyclodextrins against *Bacillus* strains. *Arch Microbiol*. 2008;190(5):605-9.

Zhang J, Ma PX. Cyclodextrin-based supramolecular systems for drug delivery: recent progress and future perspective. *Adv Drug Deliv Rev.* 2013;65(9):1215-33.

Zuniga JR, Leist JC. Topical tetracycline-induced neuritis: A case report. *J Oral Maxillofac Surg* 1995;53:196–9.

APÊNDICE A – Distribuição dos fármacos nas microplacas durante o ensaio de citotoxicidade

	Gu 10mM	Gu 2mM	Gu 1mM	Gu 0,5mM	Gu 0,25 mM	Gu 0,125 mM	Gu:βcd 10mM	Gu:βcd 2mM	Gu:βcd 1mM	Gu:βcd 0,5mM	
	Gu 10mM	Gu 2mM	Gu 1mM	Gu 0,5mM	Gu 0,25 mM	Gu 0,125 mM	Gu:βcd 10mM	Gu:βcd 2mM	Gu:βcd 1mM	Gu:βcd 0,5mM	
	Gu 10mM	Gu 2mM	Gu 1mM	Gu 0,5mM	Gu 0,25 mM	Gu 0,125 mM	Gu:βcd 10mM	Gu:βcd 2mM	Gu:βcd 1mM	Gu:βcd 0,5mM	
	Gu 10mM	Gu 2mM	Gu 1mM	Gu 0,5mM	Gu 0,25 mM	Gu 0,125 mM	Gu:βcd 10mM	Gu:βcd 2mM	Gu:βcd 1mM	Gu:βcd 0,5mM	
	Gu 10mM	Gu 2mM	Gu 1mM	Gu 0,5mM	Gu 0,25 mM	Gu 0,125 mM	Gu:βcd 10mM	Gu:βcd 2mM	Gu:βcd 1mM	Gu:βcd 0,5mM	
	Gu 10mM	Gu 2mM	Gu 1mM	Gu 0,5mM	Gu 0,25 mM	Gu 0,125 mM	Gu:βcd 10mM	Gu:βcd 2mM	Gu:βcd 1mM	Gu:βcd 0,5mM	
							Branco	Branco	Branco	Branco	

	Gu:βcd 0,25 mM	Gu:βcd 0,125 mM	βcd 10mM	βcd 2mM	βcd 1mM	βcd 0,5mM	βcd 0,25 mM	βcd 0,125 mM	Osteob	Osteob	
	Gu:βcd 0,25 mM	Gu:βcd 0,125 mM	βcd 10mM	βcd 2mM	βcd 1mM	βcd 0,5mM	βcd 0,25 mM	βcd 0,125 mM	Osteob	Osteob	
	Gu:βcd 0,25 mM	Gu:βcd 0,125 mM	βcd 10mM	βcd 2mM	βcd 1mM	βcd 0,5mM	βcd 0,25 mM	βcd 0,125 mM	Osteob	Osteob	
	Gu:βcd 0,25 mM	Gu:βcd 0,125 mM	βcd 10mM	βcd 2mM	βcd 1mM	βcd 0,5mM	βcd 0,25 mM	βcd 0,125 mM	Osteob	Osteob	
	Gu:βcd 0,25 mM	Gu:βcd 0,125 mM	βcd 10mM	βcd 2mM	βcd 1mM	βcd 0,5mM	βcd 0,25 mM	βcd 0,125 mM	Osteob	Osteob	
	Gu:βcd 0,25 mM	Gu:βcd 0,125 mM	βcd 10mM	βcd 2mM	βcd 1mM	βcd 0,5mM	βcd 0,25 mM	βcd 0,125 mM	Osteob	Osteob	
							Branco	Branco	Branco	Branco	

Distribuição dos grupos (hexaplicata) em placas de 96 poços para o ensaio de citotoxicidade MTT com os fármacos nas diferentes concentrações. Gu= guaiacol; Gu:βcd= complexo de inclusão guaiacol:β-ciclodextrina (1:1); βcd= β-ciclodextrina; Osteob= osteoblastos em meio de cultura sem nenhuma droga (controle de crescimento); Branco= apenas meio de cultura.

APÊNDICE B – Distribuição dos fármacos nas microplacas durante o ensaio microbiológico

Gu 10*	Gu 5*	Gu 2,5*	Gu 1,25*	Gu 0,625*	Gu 0,312*	Gu 0,156*	Gu 0,078*	Gu 0,039*	Gu 0,019*	Gu 0,0095 *	Gu 0,0048 *
Gu 10*	Gu 5*	Gu 2,5*	Gu 1,25*	Gu 0,625*	Gu 0,312*	Gu 0,156*	Gu 0,078*	Gu 0,039*	Gu 0,019*	Gu 0,0095 *	Gu 0,0048 *
Gu 10*	Gu 5*	Gu 2,5*	Gu 1,25*	Gu 0,625*	Gu 0,312*	Gu 0,156*	Gu 0,078*	Gu 0,039*	Gu 0,019*	Gu 0,0095 *	Gu 0,0048 *
Gu:βcd 10*	Gu:βcd 5*	Gu:βcd 2,5*	Gu:βcd 1,25*	Gu:βcd 0,625*	Gu:βcd 0,312*	Gu:βcd 0,156*	Gu:βcd 0,078*	Gu:βcd 0,039*	Gu:βcd 0,019*	Gu:βcd 0,0095 *	Gu:βcd 0,0048 *
Gu:βcd 10*	Gu:βcd 5*	Gu:βcd 2,5*	Gu:βcd 1,25*	Gu:βcd 0,625*	Gu:βcd 0,312*	Gu:βcd 0,156*	Gu:βcd 0,078*	Gu:βcd 0,039*	Gu:βcd 0,019*	Gu:βcd 0,0095 *	Gu:βcd 0,0048 *
Gu:βcd 10*	Gu:βcd 5*	Gu:βcd 2,5*	Gu:βcd 1,25*	Gu:βcd 0,625*	Gu:βcd 0,312*	Gu:βcd 0,156*	Gu:βcd 0,078*	Gu:βcd 0,039*	Gu:βcd 0,019*	Gu:βcd 0,0095 *	Gu:βcd 0,0048 *
				Branco	Branco	Branco	Bact.	Bact.	Bact.		
βcd 10*	βcd 5*	βcd 2,5*	βcd 1,25*	βcd 0,625*	βcd 0,312*	βcd 0,156*	βcd 0,078*	βcd 0,039*	βcd 0,019*	βcd 0,0095 *	βcd 0,0048 *
βcd 10*	βcd 5*	βcd 2,5*	βcd 1,25*	βcd 0,625*	βcd 0,312*	βcd 0,156*	βcd 0,078*	βcd 0,039*	βcd 0,019*	βcd 0,0095 *	βcd 0,0048 *
βcd 10*	βcd 5*	βcd 2,5*	βcd 1,25*	βcd 0,625*	βcd 0,312*	βcd 0,156*	βcd 0,078*	βcd 0,039*	βcd 0,019*	βcd 0,0095 *	βcd 0,0048 *
				Branco	Branco	Branco	Bact.	Bact.	Bact.		

Distribuição dos grupos (triplicata) em placa de 96 poços no teste da microdiluição em caldo. Gu = guaiacol; Gu:βcd = complexo de inclusão guaiacol:β-ciclodextrina (1:1); βcd = β-ciclodextrina (controle negativo); Bact. = bactéria em meio de cultura s/fármaco; Branco = apenas meio de cultura; *mg/mL.

ANEXO A – Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais da UFMG

UFMG**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS****CEUA****COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS****CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo nº. 109 / 2014, relativo ao projeto intitulado "Composto fenólico em sistemas de liberação controlada: avaliação da resposta biológica, antimicrobiana e citotoxicidade.", que tem como responsável Maria Esperanza Cortes Segura, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 20/05/2014. Este certificado expira-se em 20/05/2019.

CERTIFICATE

We hereby certify that the Protocol nº. 109 / 2014, related to the Project entitled "A phenolic compound in control delivery systems: evaluation of the biological effect, antimicrobial activity and cytotoxicity.", under the supervision of Maria Esperanza Cortes Segura, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 20/05/2014. This certificates expires in 20/05/2019.

Jacqueline Isaura Alvarez Leite
Coordenador(a) da CEUA/UFMG
Belo Horizonte, 20/05/2014.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG

<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

ANEXO B - Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais da FOUSP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA
Tel. (11) 3091 7887/7863

Certificado

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **013/2014** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a). **Maria Aparecida Borsatti** Coordenador(a) da Linha de Pesquisa "**Agente fenólico carregado em diferentes matrizes para tratamento de alveolite seca em ratos**" do qual participa(am) o(s) pesquisador(es) **Profa. Dra. Marinilce Fagundes dos Santos e Patricia Verónica Aulestia Viera**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)** em **16/06/2014**, com validade de **03 (três)** anos.

São Paulo, 16 de junho de 2014.

Prof. Dr. João Gualberto de Cerqueira Luz
Coordenador do CEUA-FOUSP