UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

MARIANA DOS SANTOS SILVA CAVERSAN

**Desenvolvimento e análise de bandagem de
bioestimulação dentino/pulpar (“BBio”)**

BAURU
2017

MARIANA DOS SANTOS SILVA CAVERSAN

**Desenvolvimento e análise de bandagem de
bioestimulação dentino/pulpar (“BBio”)**

Tese apresentada a Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências no Programa de Ciências Odontológicas Aplicadas, na área de concentração Biologia Oral.

Orientador: Profa. Dra. Maria Aparecida de Andrade
Moreira Machado

Versão Corrigida

BAURU

2017

C315d

Silva Caversan, Mariana dos Santos

Desenvolvimento e Análise de Bandagem de Bioestimulação Dentino/Pulpar ("BBio") / Mariana dos Santos Silva Caversan - Bauru, 2017.

103 p. : il. ; 31cm.

Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo

Orientador: Profa. Dra. Maria Aparecida de Andrade Moreira Machado

Nota: A versão original desta tese encontra-se disponível no serviço de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia de Bauru – FOB/USP.

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação/tese, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Data:

Comitê de Ética da FOB-USP
CAAE: 31091014.7.0000.5417
Data: 25/06/2014

FOLHA DE APROVAÇÃO

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho para as pessoas mais importantes da minha vida,
que sempre estiveram ao meu lado me apoiando e me incentivando.
Meus pais Marcos Lupércio e Terezinha Dulce,
Meu esposo Anderson.
Meu filho Matheo
Obrigada pela força e dedicação, amo vocês.
Essa vitória é nossa...

AGRADECIMENTOS

Este trabalho resume uma fase de grande crescimento acadêmico e pessoal da minha vida. Um sonho alcançado e realizado. Durante esses 4 anos muitas mudanças aconteceram. Nesse período me tornei mãe e sou muito grata primeiramente a Deus por me dar forças e discernimento durante esse trabalho.

Sou grata também a todos os que participaram direta ou indiretamente da minha trajetória na Faculdade de Odontologia de Bauru, e da realização desta pesquisa, dentre os quais destaco:

Profa. Dra. Maria Aparecida de Andrade Moreira Machado; me lembro até hoje quando me chamou para fazer o mestrado. A senhora é mais que uma professora, é uma amiga verdadeira que não só nos ensina a teoria científica como nos ensina a viver. A senhora é dinâmica, inovadora, criativa e prática. Sempre nos motivando para sermos melhores. Obrigada por esse jornada partilhada. Serei sempre muito agradecida a senhora.

Profa. Dra. Sílvia Aparecida da Costa; toda sua sabedoria é partilhada, a senhora não esconde o que sabe, e sabe muito. Muito obrigada por todo o apoio, ajuda e parceria. Obrigada por poder sempre contar com a senhora em todos os momentos que precisei, seja uma carona ou uma informação científica. Sempre pronta a ajudar, sem preguiça de colocar a “mão na massa”. Muito obrigada.

Prof. Dr. Rodrigo Cardoso de Oliveira; uma surpresa pra mim foi poder conviver, mesmo que por pouco tempo com o senhor. Sempre disponível, paciente e tranquilo essas qualidades hoje em dia são raras de serem encontradas. Esse trabalho não teria terminado sem sua preciosa colaboração. Muito obrigada.

Aos demais docentes e funcionários da Faculdade de Odontologia de Bauru- USP que de alguma forma me ensinaram e incentivaram durante esta caminhada, muito obrigada.

A Faculdade de Odontologia de Bauru - USP por ter possibilitado a realização deste trabalho.

Agradeço a CAPES pelo apoio financeiro sem o qual esta pesquisa não poderia ter sido realizada, muito obrigada.

Profa. Dra. Silvana Torossian Coradi que me apoiou durante minha graduação de Farmácia e durante todo o meu desenvolvimento científico me levantando e estimulando pra que eu nunca desistisse. Muito obrigada.

Tia Valdir muito obrigada por me acolher na casa da senhora sempre com um cafezinho fresco e um pãozinho. Sem essa ajuda meu trabalho teria sido muito mais difícil. Muito obrigada.

Natalino Lourenço Neto que me ajudou muito e compartilhou os seus conhecimentos comigo, me ajudou desde a pratica até o desenvolvimento escrito, sempre com paciência e tranquilidade, mostrando o caminho nunca fazendo por mim. O meu muito obrigada.

Quero agradecer minha amiga irmã Soraia Veloso da Costa por sua sincera amizade, sempre sorridente e preocupada, sempre atenta e calada, mas uma menina de coração puro e sentimentos verdadeiros. Uma amiga pra toda a vida. Amiga distância não separou nossa amizade. Te adoro. Muito obrigada por tudo.

A minha sempre amiga Marina Menegazzo muito obrigada pelo apoio e palavras sempre amigas.

O meu muito obrigada para Vera e Dalva, que sempre tiraram as minhas dúvidas e me protegeram de possíveis embaraços, serei sempre muito grata.

Agradeço a todos os meus familiares que de alguma forma ajudaram: pai, mãe, esposo, filho, sogro, sogra, cunhado, cunhada, avós, tios, primos, que são muito importantes na minha vida.

Gostaria de me desculpar se esqueci de alguém que de alguma forma auxiliou no meu crescimento.

E a todos que estiveram ao meu lado colaborando e ensinando muito durante essa caminhada.

“O futuro pertence àqueles que acreditam na
beleza de seus próprios sonhos.”

Eleanor Roosevelt

RESUMO

O desenvolvimento de biomateriais com aplicações na área da saúde mostram-se cada vez mais importantes e a procura por novos polímeros com propriedades bioativas, biodegradabilidade, atoxicidade são o foco das principais pesquisas em diferentes aplicações médicas e odontológicas. Os materiais capeadores pulpare evoluíram rapidamente na última década, sendo que são disponibilizadas atualmente diversas alternativas para uso clínico odontológico. Este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de um novo produto bioestimulador e capeador dentino/pulpar que poderá ser base para o desenvolvimento e recobrimento de “scaffolds” para reparo das diferentes estruturas dentárias. O desenvolvimento das bandagens BBio e os resultados obtidos nos testes das propriedades físico-químicas (absorção de água, perda de massa e pH), bem como as análises biológicas da morfologia celular e viabilidade celular com MTT a BBio apresentaram dados favoráveis e desejáveis para sua aplicação clínica. A propriedade de liberação de cálcio foi bastante promissora, sendo esta uma condição que dará a diferenciação positiva da BBio como um produto bioestimulador pulpar. Com esses dados pode-se concluir que a mesma se encontra dentro dos parâmetros desejados para o produto final e com propriedades semelhantes aos produtos existentes no mercado, de qualidade e aprovados pelas agências reguladoras.

Palavras-chave: biopolímeros. quitosana. Material capeador.

ABSTRACT

DEVELOPMENT AND ANALYSIS OF DENTAL / PULPAR BIO-STIMULATION BANDAGE ("BBio")

The development of biomaterials with applications in the health area are increasingly important and the search for new polymers with bioactive properties, biodegradability and toxicity are the focus of the main researches in different medical and dental applications. The pulp capping materials evolved rapidly in the last decade, and several alternatives are now available for clinical dental use. This project aimed to develop a new biostimulating and dentin / pulp capping product that could be the basis for the development and recoating of " scaffolds for repair of different dental structures. The development of the BBio bandages and the results obtained in the physical-chemical properties tests (water absorption, loss of mass and pH), as well as the biological analyzes of the cellular morphology and cell viability with MTT to BBio presented favorable and desirable data for its clinical application. The calcium release property was quite promising, and this is a condition that will give BBio a positive differentiation as a pulp biostimulator product. With this data it can be concluded that it is within the parameters desired for the final product and with properties similar to the products on the market, of quality and approved by the regulatory agencies.

Key words: Biopolymers. Chitosan. Capping material.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURAS

- Figura 1** - Desenvolvimento da bandagem BBio. (A) Preparo dos géis. (B) Banho de ultrasson. (C) Bisnagas prontas para pesagem. (D) Pesagem dos géis. (E) Secagem das camadas. (F) Polvilhamento do cimento. (G) Secagem Final. (H) Retirada da bandagem.46
- Figura 2** - Teste de perda de massa e absorção de água. (A) Preparo das amostras. (B) Amostras em água ultrapura e em estufa sob agitação. (C) Pesagem bandagem umida. (D) Secagem em estufa por 24h. (E) Pesagem bandagem seca.....48
- Figura 3** - Medida de pH. (A) Preparo das amostras. (B) Amostras em água ultrapura e em estufa sob agitação. (C) Leitura em pHmetro.....49
- Figura 4** - Leitura de liberação de cálcio. (A) Preparo das amostras. (B) Amostras em água ultrapura em estufa sob agitação. (C) Espectrofotometro de absorção de massa.....50
- Figura 5** - Diferentes espessuras de bandagens e distância foco/filme constante no momento da radiografia.....51
- Figura 6** - A – Poços contendo solução de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio); B – Cristais de formazan dissolvidos após adicionar o DMSO (Dimetil Sulfóxido).53
- Figura 7** - A – Aparelho espectrofotômetro; B – Posicionamento da placa no espectrofotômetro.53
- Figura 8** - Bandagem do grupo cimento Portland.....57
-
-

Figura 9 - A - Grupo controle (sem cimento) aumento de 250X; B - Grupo controle (sem cimento) aumento de 1000X; C - Bandagem com cimento Portland puro aumento de 250X; D – Bandagem com cimento Portland puro aumento de 1500X; E - Bandagem com cimento Portland e Iodofórmio aumento de 250X; F - Bandagem de cimento Portland e Iodofórmio aumento de 1500X; G - Bandagem com cimento Portland e Zircônia aumento de 250X; H - Bandagem com cimento Portland e Zircônia aumento de 1500X.....59

Figura 10 - (A) Grupo de bandagem sem adição de cimentos 5 bandagens de espessura (0,24mm); (B) 10 bandagens de espessura (0,46mm); (C) Grupo de bandagem com cimento Portland sem adição de radiopacificadores 5 bandagens de espessura (1,1mm); (D) 10 bandagens de espessura (2,3mm); (E) Grupo de bandagem com cimento Portland + Iodofórmio 5 bandagens de espessura (1,0mm); (F) 10 bandagens de espessura (1,95mm); (G) Grupo de bandagem com cimento Portland + Iodofórmio 5 bandagens de espessura (1,0mm); (H) 10 bandagens de espessura (2,0mm);67

Figura 11 - Morfologia celular após o contato por 24 horas para os grupos das Bandagens confeccionadas: A – Bandagem sem cimento; B – Bandagem + Port; C – Bandagem + Port/Iodofórmio; D – Bandagem + Port/Zircônia. E 72 horas para os grupos das Bandagens confeccionadas: E – Bandagem sem cimento; F – Bandagem + Port; G– Bandagem + Port/Iodofórmio; H – Bandagem + Port/Zircônia.....73

- GRÁFICOS

Gráfico 1 - % de absorção de água pelas bandagens nos tempos experimentais de 24, 48 e 72 horas.	61
Gráfico 2 - % de perda de massa das bandagens nos tempos experimentais de 24, 48 e 72 horas.	62
Gráfico 3 - Perfil de pH das bandagens nos tempos experimentais de 24, 48 e 72 horas.	63
Gráfico 4 - Liberação de cálcio (mg/L) X tempos experimentais.....	64
Gráfico 5 - Avaliação da viabilidade celular pelo ensaio MTT entre os diferentes grupos testados no período de 24 horas.	70
Gráfico 6 - Avaliação da viabilidade celular pelo ensaio MTT entre os diferentes grupos testados no período de 48 horas.	70
Gráfico 7 - Avaliação da viabilidade celular pelo ensaio MTT entre os diferentes grupos testados no período de 72 horas.	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Grupos de bandagens a serem analisadas.....	52
Tabela 2	- Valores de pH decorridos os períodos experimentais em solução.....	62
Tabela 3	- Quantidade de cálcio liberado (mg/L) decorridos os períodos experimentais em solução.....	64
Tabela 4	- Valores de absorbância (média e desvio padrão) dos grupos após o ensaio MTT com densidade celular de 1×10^3 nos períodos de 24, 48 e 72 horas	69

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1	BIOMATERIAIS	23
2.2	BIOMATERIAIS A BASE DE POLÍMEROS	26
2.3	POLÍMEROS NATURAIS.....	27
2.4	BANDAGEM E FILMES	28
2.5	QUITINA E QUITOSANA	29
2.5.1	PROPRIEDADES DA QUITOSANA.....	31
2.6	CARBOXIMETILCELULOSE	32
2.7	BIOMATERIAIS NA ODONTOLOGIA	33
2.8	MATERIAL CAPEADOR PULPAR.....	36
3	PROPOSIÇÃO.....	39
4	MATERIAL E MÉTODOS	43
4.1	DESENVOLVIMENTO DA BANDAGEM “BBIO”	45
4.1.1	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA	46
4.1.2	ENSAIOS DE ABSORÇÃO DE ÁGUA E PERDA DE MASSA.....	47
4.1.3	DOSAGEM DE PH.....	48
4.1.4	TESTE DE LIBERAÇÃO DE CÁLCIO	49
4.1.5	AVALIAÇÃO DA RADIOPACIDADE	50
4.2	CULTURA DE CÉLULAS	51
4.2.1	COMITÊ DE ÉTICA.....	51
4.2.2	ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR PELO MÉTODO MTT.....	52
4.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	54

5	RESULTADOS	55
5.1	BANDAGEM BBIO	55
5.2	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA	55
5.3	ABSORÇÃO DE ÁGUA E PERDA DE MASSA.....	61
5.4	MEDIDAS DE PH.....	62
5.5	TESTE DE LIBERAÇÃO DE CÁLCIO.....	63
5.6	AVALIAÇÃO DA RADIOPACIDADE	65
5.7	VIABILIDADE CELULAR PELO MÉTODO MTT	69
5.8	MORFOLOGIA CELULAR	71
6	DISCUSSÃO	75
6.1	ABSORÇÃO DE ÁGUA E PERDA DE MASSA.....	77
6.2	MEDIDAS DE PH.....	78
6.3	TESTE DE LIBERAÇÃO DE CÁLCIO.....	79
6.4	AVALIAÇÃO DA RADIOPACIDADE	80
6.5	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA	80
6.6	VIABILIDADE CELULAR PELO MÉTODO MTT	80
7	CONCLUSÕES.....	83
	REFERÊNCIAS	87
	ANEXOS.....	99

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de biomateriais com aplicações na área da saúde mostram-se cada vez mais importantes e a procura por novos polímeros com propriedades bioativas, biodegradabilidade, atoxicidade são o foco das principais pesquisas em diferentes aplicações médicas e odontológicas. (SILVA et al., 2017; GEMINI-PIPERNI et al., 2014).

Alguns polímeros naturais como: quitosana, colágeno, alginato, amido, celulose, hidrocelulose, entre outros, possuem propriedades biofísicas e bioquímicas importantes para aplicações em produtos biotecnológicos (STAMATIALIS et al., 2008). Estudos sugerem o desenvolvimento de materiais que possam substituir de forma apropriada os tecidos danificados, sendo biocompatíveis e com a resistência necessária. Os materiais usados para substituir tecidos se enquadram na classe de biomateriais, cujas propriedades biofísicas e químicas devem estimular a resposta necessária para tecidos vivos. (JAYAKUMAR et al., 2011; DUCEPPE e TABRIZIAN, 2010; SPIN NETO et al., 2010).

A quitosana é um polímero natural derivado da N-desacetilação da quitina, principal constituinte do exoesqueleto de artrópodes, que possui propriedade hemostática, fungicida, antibacteriana e antitumoral, além da capacidade de estimular a migração e proliferação celular reorganizando a histoarquitetura das células. (TAVARIA et al., 2013; PAUL & SHARMA, 2004; MI et al., 2003).

Esses polímeros têm atraído o interesse de áreas da saúde como a farmacêutica, médica e odontológica por suas características de biodegradabilidade, biocompatibilidade e atoxidade (JAYAKUMAR et al., 2007; KUMAR, 2000; KURITA et al., 2000). A quitosana pode ser moldada em várias formas como hidrogéis, esponjas, membranas, nanofibras, micropartículas, apresentando também capacidade para formar fios e filmes. (CROISIER & JEROME, 2013).

As literaturas científicas atuais encontram-se bem documentadas com publicações que empregaram a quitosana em diversas aplicações na engenharia

tecidual, na liberação controlada de fármacos e também como biossensores para diagnóstico clínico (PARK & KIM, 2010; JAYAKUMAR et al., 2011).

A quitosana apresenta propriedades promissoras para a formação de *scaffolds* usados em engenharia de tecidos pelas suas características que são: mínima reação com corpo estranho, ausência de resposta inflamatória crônica, ausência de encapsulamento fibroso, favoráveis efeitos quimioatrativos, acompanhado por excelentes recursos tecnológicos que permitem processá-la em estruturas porosas ou nanofibrilares (SPIN NETO et al., 2010; MUZZARELLI et al., 2012).

Em 2017 Silva e colaboradores estudaram as propriedades físico-químicas de uma bandagem bucal para tecidos moles tendo resultados promissores quanto a liberação medicamentosa.

Os materiais capeadores pulpares evoluíram rapidamente na última década, sendo que são disponibilizadas atualmente diversas alternativas para uso clínico odontológico. Os principais resultados esperados destes materiais são: a biocompatibilidade, boas propriedades físico-químicas e, além disso, que sejam capazes de promover a formação de uma barreira dentinária com capacidade bioindutora, modulando a resposta de reparo do dente e preservando o tecido pulpar sadio. (LOURENÇO NETO et al., 2016; GOMES CORNÉLIO et al. 2011; PARANJPE et al. 2011).

Muitos dos materiais disponíveis e recomendados para realização de pulpotomias em dentes decíduos e/ou permanentes não possuem todos os requisitos preconizados para um material ideal, gerando muitas discussões em torno da escolha do medicamento mais apropriado (MORETTI et al. 2008; SAKAI et al. 2009). Esta discussão se torna ainda mais intensa quando se trata da escolha de um medicamento para o tratamento conservador pulpar de dentes decíduos (MORETTI et al., 2008; SAKAI et al., 2009; CARDOSO-SILVA et al., 2011; LOURENÇO-NETO et al., 2013; OLIVEIRA TM et al., 2013), pois existem várias opções com divergências quanto à eficácia clínica, radiográfica e histológica (LOURENÇO-NETO et al., 2016). Na atualidade, talvez seja o tema que suscite maior discussão na odontopediatria mundial.

A odontologia busca um elemento terapêutico que possa ser aplicado na cavidade oral que facilite o tratamento do canal dentário, sendo que este possa favorecer o desenvolvimento celular a fim de regenerar o tecido lesado. Esta questão se faz particularmente significativa quando relacionada ao tratamento de crianças com lesões orais deste tipo, onde o tratamento muitas vezes não é realizado adequadamente, principalmente por dificuldades da realização de curativos e/ou aplicação de medicamentos, devido ao comportamento infantil.

A incorporação de fármacos em biomateriais pode potencializar o efeito medicamentoso através do desenvolvimento de novos sistemas de liberação como os sistemas mucoadesivos. Estes sistemas permanecem em contato íntimo com o tecido de absorção, liberando o fármaco no local de ação, com o conseqüente aumento da biodisponibilidade, podendo promover efeitos locais e sistêmicos. (SILVA et al., 2017).

A mucoadesão, atualmente, é explicada por seis teorias: a eletrônica, a adsorção, a molhabilidade, a difusão, a fratura e a mecânica (CARVALHO et al., 2010).

Considerando que o tratamento de uma criança poderá ser mais ou menos complexo em função do manejo do comportamento dela, fica evidente que se neste tratamento o fator dor estiver presente, o manejo do comportamento poderá ser uma condição limitante para a realização do mesmo de forma adequada. Diante disso, se faz premente pesquisar e desenvolver um material de capeamento e tratamento pulpar com primeiro foco em dentes decíduos, que se adeque aos quesitos apresentados, agregando custo compatível para aplicação em Saúde Pública, fator este de grande impacto social, pois contribuirá para melhorar a qualidade de vida da população infantil no que tange a minimizar episódios de dor de dente em idade precoce e mais que isto, possibilitar a manutenção do dente decíduo até a sua substituição pelo sucessor permanente.

O desenvolvimento da BBio segue uma tendência mundial, a pesquisa translacional, pois a partir de uma necessidade da prática clínica odontopediátrica a pesquisa básica irá avaliar a composição e os mecanismos de ação dos componentes bioindutores de reparo, com a formação e regeneração tecidual, nos

tecidos da dentina e polpa. Para isso é necessário a comprovação dos testes “in vitro” com todas as suas interações celulares para o sucesso destes tratamentos “in vivo”, sendo realizados estudos em culturas celulares. (KOULAOUZIDOU et al. 2008).

Atualmente existem inúmeras linhagens de células que podem ser estudadas e avaliadas, porém para avaliação da citotoxicidade e resposta biológica de materiais odontológicos e bioindutores são usadas células humanas como: fibroblastos do ligamento periodontal, odontoblastos (BRACKETT et al. 2010) entre outras, que permitem maior aproximação dos resultados obtidos na prática clínica, uma vez que estas células estão diretamente envolvidas no processo de reparo no tecido dental (SZPALSKI et al., 2012). Pesquisas recentes têm mostrado um grande potencial também para as células pulpares de dentes decíduos em exfoliação, por serem tecidos ricos em células mesênquimais indiferenciadas despertando grande interesse para avaliação de seu potencial bioativo. (LUFTI et al., 2010; TELLES et al., 2011; GALLER & D’SOUZA, 2011; CHATZISTAUROU et al., 2012; SUJESH et al., 2012; RIZK & RABIE, 2013).

Considerando esses fatores e objetivando novas perspectivas, se faz oportuno o desenvolvimento da BBio numa proposta de pesquisa translacional, com foco em um produto de fácil acesso e manipulação, que atue preliminarmente nas células pulpares estimulando o processo de reparo e regeneração dos tecidos dentinário e pulpar.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 BIOMATERIAIS

Os grandes marcos para o desenvolvimento dos biomateriais foram as duas grandes guerras mundiais. Surgiram para tentar evitar a amputação ou promover a recuperação dos membros que tiveram suas funções comprometidas. As pesquisas por materiais que não fossem nocivos e não induzissem rejeição foram intensas. Próximo a I Guerra Mundial, apesar de avanços consideráveis na ciência dos biomateriais, nenhum dos materiais aplicados apresentava biocompatibilidade. Os maiores avanços iniciam após a II Guerra Mundial, com importante papel da Odontologia, principalmente após o advento da osseointegração, conceito introduzido por pesquisadores liderados pelo médico ortopedista sueco Per-Ingvar Brånemark (1983).

A pesquisa com biomateriais cresceram graças ao desenvolvimento científico e tecnológico multidisciplinar de diversas áreas como Medicina, Odontologia, Biologia, Engenharia, Física e Química. Nas últimas décadas observa-se um significativo aumento na utilização dos biomateriais, os motivos sugeridos são: o aumento da expectativa de vida da população, aumentando o índice de traumas e patologias que necessitam de tratamentos cada vez mais eficazes. (GUASTALDI & APARECIDA, 2010; CAMARGO ET AL., 2009).

Os polímeros usados a partir de recursos renováveis (PFRR) têm atraído cada vez mais atenção no mercado, por duas razões principais: por preocupações ambientais e a percepção de que os recursos de petróleo podem se tornar escassos. Outra razão para o interesse crescente em polímeros a partir de recursos renováveis, refere-se a agregação de valor aos produtos agrícolas, sendo economicamente importante para muitos países. Os polímeros produzidos a partir de recursos renováveis são classificados em três grupos: (1) polímeros naturais, tais como amido, proteínas, celulose; (2) polímeros sintéticos naturais a partir de monômeros, tais como poli (ácido láctico); (3) polímeros obtidos pela fermentação microbiana como poli (hidroxibutirato). A grande vantagem de todos estes materiais

é que eles são biodegradáveis, e que os produtos finais de degradação são ecologicamente corretos (YU & CHEM, 2008).

As pesquisas de aplicações dos polímeros naturais é uma ciência antiga. Os exemplos primários são: papel, seda, pele e osso que podem ser encontrados em museus ao redor do mundo. Estes polímeros naturais podem exercer um conjunto diversificado de funções como, por exemplo, os polissacarídeos que podem funcionar como membranas para comunicação intracelular; as proteínas atuam como materiais estruturais e catalisadores, e os lipídios atuam como reservas de energia e assim por diante. A natureza fornece uma grande variedade de polímeros que podem ser utilizados em fibras, adesivos, revestimentos, géis, espumas, filmes, termoplásticos e resinas (YU & CHEN, 2008).

Os polímeros naturais surgiram muitas décadas atrás pela necessidade da época, pois o petróleo, que era matéria prima para a produção de polímeros mais utilizada na época estava escassa. A tecnologia moderna produz ferramentas poderosas para compreender as relações entre as estruturas e suas propriedades. Estes níveis de compreensão trazem oportunidades para desenvolver novos materiais e novas aplicações (BRITO et al., 2011; YU & CHEN, 2008).

Com o avanço da ciência surgiram os biomateriais que são classificados como substâncias ou a combinações delas, sintéticas ou naturais, que podem ser usadas por um certo período de tempo, completa ou parcialmente, como parte de um sistema para tratar, aumentar ou substituir qualquer tecido, órgão ou função do corpo (RATNER, 1996).

O desenvolvimento de pesquisas na área de biomateriais tem sido classificado em três gerações: primeiramente os materiais bioinertes, seguido dos materiais bioativos e biodegradáveis e posteriormente os materiais que estimulam respostas mais específicas na área molecular (SPIN NETO et al., 2008; NAVARRO et al., 2008).

Os biomateriais são desenvolvidos a medida que surge a necessidade, elas variam de acordo com a sua aplicação específica. Diversas situações clínicas, dentre elas as queimaduras, traumatismos, infecções, doenças autoimunes e as feridas complexas necessitam desses produtos. As feridas complexas podem

resultar na perda parcial ou completa do revestimento cutâneo sendo necessária a reposição tecidual (FERREIRA et al., 2011).

Para os problemas citados acima, inicialmente utilizava-se a enxertia de pele autógena (tecido de cadáveres), porém com essa técnica pode haver escassez de doadores. Por conta do fator “doador” surge a necessidade de um material sintético ou biológico como alternativa. Os substitutos cutâneos são classificados em três critérios: curativo temporário e impermeável, substitutos cutâneos duráveis com única camada, substitutos de pele compostos (FERREIRA et al., 2011).

Para o desenvolvimento de curativos específicos o maior obstáculo é a adequação do material ao tipo da lesão. Para isso é necessário saber o comportamento corporal na cura das lesões, pois cada lesão apresenta diferentes fases cicatriciais que exigem diferentes composições de curativos (JAYAKUMAR et al., 2011; BOATENG et al., 2008).

Os produtos utilizados para construir estruturas de biomateriais podem ser divididos em três classes: metais, cerâmicos (inclusive vidro) e polímeros (COOKE et al., 1996). No caso dos polímeros, observam-se características como: biodegradabilidade, biocompatibilidade, facilidade de absorção de secreções (BORSCHIVER et al., 2008). Produtos como membranas poliméricas, materiais compostos, grades e redes extrudadas desafiam as noções tradicionais de biomateriais e muitas vezes se enquadram no mercado de engenharia de materiais flexíveis, com inovações nos produtos, materiais, tecnologias de processos e mercados (BYRNE, 2000).

Os polímeros bioreabsorvíveis mais estudados são o poli (ácido láctico) ou PLA, poli (ácido glicólico) ou PGA, poli p-dioxanona ou PDS, poli (hidroxibutirato) ou PHB e poli (hidroxibutirato)-co-poli (hidroxivalerato) ou PHVB. Todos são substâncias que sofrem degradação principalmente por hidrólise através da cisão das ligações ésteres, formando grupos terminais carboxila e hidroxila. Os produtos da degradação são incorporados ao ciclo dos ácidos tricarboxílicos e eliminados pelo organismo como dióxido de carbono e água (DUEK et al., 1999).

2.2 BIOMATERIAIS A BASE DE POLÍMEROS

Biomateriais com aplicação na área da saúde são inseridos no mercado constantemente, as causas desse crescimento é o aumento da expectativa de vida e os desafios gerados por este fato (HÖFER e SWEREV, 2003).

A engenharia de tecidos consiste na regeneração de órgãos e tecidos vivos, através do uso de tecido do próprio paciente, sendo dissociados em células e cultivadas sobre suportes biológicos ou sintéticos. Esses suportes são denominados *scaffolds*, para posterior reinserção do tecido no paciente. O suporte polimérico é dimensionado com propriedades mecânicas e tempo de degradação adequado para a inoculação das células até sua inserção no bioreator onde ocorrerá a formação do tecido maduro. As células semeadas proliferam e secretam a matriz extracelular, e o polímero é degradado e reabsorvido gradualmente liberando espaço para a proliferação celular e formação do tecido biologicamente produzido em laboratório. Somente após essa formação tecidual o implante é colocado no paciente (SPIN NETO et al., 2010; BARBANTI et al., 2005).

Para os biomateriais aplicados na área da saúde serem biocompatíveis são necessárias algumas características como a biodegradabilidade e a bioabsorção. Segundo VERT et al. (1992) o termo biodegradável é utilizado para polímeros e dispositivos sólidos que sofrem dispersão *in vivo*, mas não ocorre a eliminação dos produtos e subprodutos pelo organismo. Os materiais bioabsorvíveis são polímeros ou dispositivos que podem se dissolver em fluidos corpóreos sem diminuir a massa molecular. Acredita-se que em poucos anos muitos dispositivos permanentes destinados à aplicações terapêuticas temporárias ou permanentes serão substituídos por dispositivos biodegradáveis podendo reparar e regenerar os tecidos danificados.

Os polímeros biodegradáveis sintéticos ou naturais estão sendo desenvolvidos para aplicações biomédicas resultantes de pesquisas nas áreas de engenharia tecidual, liberação controlada de fármacos e bionanotecnologia, todos necessitam de materiais biodegradáveis na sua composição (NAIR e LAURENCIN, 2007).

Os compostos bioreabsorvíveis são materiais poliméricos ou dispositivos sólidos que mostram sua degradação através da diminuição de tamanho, são absorvidos *in vivo* e secretados por vias metabólicas do organismo (SANTOS JR. e WADA, 2007).

Dentre os polímeros sintéticos biodegradáveis e bioreabsorvíveis estão os poli (α -hidróxi ácidos), classe de poliésteres alifáticos sintéticos, os quais fazem parte o poli-ácido láctico (PLA), poliglicolide (PGA), policaprolactona (PCL) e seus copolímeros (ELKE et al., 2003).

Por esses motivos os materiais destinados a interagir com sistemas biológicos caracterizam-se na categoria de biomateriais que será estudado no presente trabalho.

2.3 POLÍMEROS NATURAIS

Os primeiros polímeros usados na história foram produtos naturais como: algodão, amido, proteínas e lã. No início do século XX os polímeros sintéticos começaram a surgir. Os polímeros de importância na época são o baquelite e o nylon, mostrando a possibilidade do surgimento de novos materiais (SPERLING, 2006).

O consumo global de polímeros biodegradáveis aumentou de 14.000 mil kg em 1996 para 68.000 mil kg em 2001. As vantagens desses polímeros incluem recursos renováveis e biodegradabilidade (YU et al., 2007).

As preocupações ecológicas resultaram no interesse de novos materiais com características como biodegradabilidade, segurança ambiental e produtos compostáveis. O desenvolvimento de novos produtos de âmbito sustentável ou eco-design é uma tendência que está sendo aplicada aos materiais (AVE'ROUS e BOQUILLON, 2004).

A classificação desses materiais está relacionada com sua estrutura como polissacarídeos. São obtidos com frequência a partir de fontes de carbono renováveis. Os exemplos dessa fonte são: carboidratos derivados de cana-de-

açúcar, milho, batata e os óleos vegetais que podem ser extraídos de soja, girassol entre outras sementes (PRADELLA, 2006).

A celulose e a quitina são polímeros que possuem grande importância para o desenvolvimento de novos produtos pois a celulose é o polímero mais encontrado na natureza, e a quitina o segundo mais abundante (DASH et al, 2011; PILLAI et al., 2009; KUMAR, 2000).

2.4 BANDAGEM E FILMES

Para a área da saúde o uso de bandagens é muito importante, a área farmacêutica tem desenvolvido pesquisas para melhorar o sistema de liberação de fármacos (drug delivery), a área médica se preocupa com a hemodiálise e o desenvolvimento de órgãos artificiais através da engenharia tecidual (STAMATIALIS et al., 2008).

Pesquisas recentes descreveram o uso de filmes de quitosana com insulina incorporados tendo resultados promissores por conta da bioadesão do material ao tecido mole facilitando sua liberação. (GIOVINO et al., 2013).

O uso de bandagens e filmes como biomaterial precisa ter algumas características como biocompatibilidade e biodegradabilidade. Filmes produzidos em base protéica como proteína de soja, colágeno, proteínas do soro do leite, ou polissacarídeos contribuem para a biocompatibilidade e apresentam boas propriedades físicas, resistência a compostos de baixa polaridade, hidrofiliade, atoxicidade, biodegradabilidade e baixo custo (SEBRÃO et al., 2007).

Várias técnicas podem ser utilizadas para a produção de filmes e membranas, o que define qual a melhor técnica é a característica do gel e seus componentes dissolvidos, podendo ser obtidos através do escoamento do gel sobre uma superfície plana para sua completa secagem ou por uma técnica mais elaborada denominada automontagem. Os filmes obtidos por automontagem tem algumas vantagens pois são homogêneos, mais finos e com menos irregularidade na

superfície diferindo dos filmes produzidos obtidos por escoamento (ASSIS E SILVA, 2003).

As primeiras tentativas de produção de filmes ultrafinos de moléculas orgânicas foram feitas ainda no começo do século XX por Langmuir e mais tarde por Blodgett, o que levou ao nome da técnica de Langmuir-Blodgett (LB). A técnica consiste em dissolver moléculas como os ácidos graxos em solvente orgânico volátil apropriado (incompatível com a água) e, posteriormente, dispersadas sobre a superfície da água contida em uma cuba, conhecida como cuba de Langmuir. Com a compressão do filme formado, as moléculas tomam a conformação mais estável, ou seja, sua porção hidrofílica (cabeça) interage com a superfície da água, enquanto que a sua parte hidrofóbica (cauda) é projetada acima dela. A cuba é dotada de um sistema de compressão, o qual pressiona horizontalmente as moléculas dispersas, até que uma camada compacta seja formada. Essa camada possui a espessura igual ao comprimento da molécula dispersa, ou seja, é monomolecular, e pode ser transferida lentamente para um substrato adequado. Para a produção de filmes com multicamadas é necessária a realização de imersões e retiradas subseqüentes do polímero em um mesmo substrato (LANGMUIR, 1917; BLODGETT, 1935; MATTOSO et al., 1996).

2.5 QUITINA E QUITOSANA

A quitina é um dos mucopolissacarídeos mais abundantes na natureza, atuando como uma substância estrutural para crustáceos, insetos e algumas espécies de fungos, sendo degradada pela enzima quitinase. Na natureza a quitina é encontrada como um material esbranquiçado, duro e anelástico, com baixíssima solubilidade e reatividade química, sendo também não inflamatório. Por ser altamente nitrogenada é utilizada como material quelante em reações químicas (MUZZARELLI et al., 1973).

A quitina é separada dos outros componentes da carapaça através de um processamento químico denominado desmineralização e desproteínização com soluções diluídas de HCl e NaOH, seguida de descoloração com KMnO₄ e ácido oxálico. Por ano são produzidas aproximadamente 100 bilhões de toneladas de

quitina, a mesma produção ocorre com a celulose por plantas de grande porte (KONG, 2010; REGE & BLOCK, 1999; MUZZARELLI et al., 1973).

A quitosana é um polímero derivado da quitina, sua obtenção de dá pela desacetilação quando atinge valores ao redor de 50% tornando-se solúvel em meio ácido aquoso. A solubilização ocorre por protonação da função-NH₂ na posição da unidade de repetição de D-glucosamina, em que o polissacarídeo é convertido para um polieletrólito em meios ácidos. Suas características são: coloração branca, dura e inelástica (ALONSO et al., 2010; HOVEN et al., 2007; DUTTA et al., 2004; HIRANO, 1999)

A quitosana é barata, biodegradável e atóxica para mamíferos, sendo adequada para utilização na indústria alimentar (KOIDE, 1998). Pode ser usada também como agente hidratante em cosméticos, e mais recentemente como um agente farmacêutico (DODANE & VILIVALAM, 1998; ILLUM, 2003; KHOR e LIM, 2003). A quitina ocorre na natureza como ordenadas microfibrilas cristalinas que formam componentes estruturais nos exoesqueletos de artrópodes ou nas paredes das células de fungos, tais como *Aspergillus* e também em algas e leveduras (QIN et al., 2006).

É um polímero com característica química não ramificado formado por unidades de N-acetil-Dglucosaminas, unidas por ligações (1 e 4) e formando cadeias de várias centenas de unidades (CANELLA e GARCIA, 2001; HOVEN et al., 2007). Possui estrutura química semelhante à da celulose, onde os grupos hidroxila da celulose na posição C-2 são substituídos pelo grupo acetamida (PILLAI, et al., 2009). A quitosana é solúvel somente em soluções aquosas de ácidos orgânicos como acético, fórmico, cítrico e também inorgânicos. (SANTOS et al., 2003). Um dos problemas do uso da quitosana diz respeito a sua solubilidade, pois dificulta o uso em aplicações industriais (JAYAKUMAR et al., 2011; KUMAR, 2000).

Os polímeros naturais têm despertado muito interesse à área da saúde com ênfase na quitosana pelo seu baixo custo de produção, quantidade de matéria-prima disponível, boa absorção, maleabilidade, biocompatibilidade, assim como atividade antimicrobiana e hemostática, biodegradabilidade e atoxicidade (ABDOU et al.,

2008; KUMAR, 2000). Desse modo, observa-se que, nos últimos anos, a quitosana tem sido objeto de estudo em diversas pesquisas.

2.5.1 PROPRIEDADES DA QUITOSANA

A quitosana possui propriedades interessantes para o mercado e para a saúde com inúmeras aplicações médicas e odontológicas como:

- atividade antimicrobiana: provocam a inibição do crescimento de microorganismos, este mecanismo está relacionado com as propriedades físico-químicas do polímero e as características da membrana dos microorganismos.
 - efeito coagulante: possuem papel importante na hemóstase, independente da cascata de coagulação, reduzindo o tempo de coagulação sanguínea de forma dose-dependente. Possui também efeito positivo sobre plaquetas.
 - efeito analgésico: potente ação analgésica tópica (a quitosana pode ter a capacidade de absorver a bradicinina liberada no sítio da inflamação)
 - aceleração da cicatrização: tem capacidade imunomoduladora, pois consegue ativar o macrófago, o que explica não só seu papel de cicatrização como sua biodegradabilidade.
 - efeito hipocolesterolêmico e hipolipidêmico: uso via oral promove a redução dos níveis de colesterol e triglicerídeos devido a capacidade de se ligar aos lipídeos da dieta.
 - latenciação e pró-farmacos: é um processo que transforma o fármaco inativo que mediante a reações químicas ou enzimáticas liberam a porção ativa no local de ação. Auxiliando no direcionamento da ação para o SNC, sendo seletivo, prolongado, com melhor biodisponibilidade, reduzindo a instabilidade e a baixa solubilidade em preparações farmacêuticas.
-
-

- microesferas: utilizada para o mesmo fim que os pró-farmacos sendo mais viáveis, com menos interações garantindo hidrofobicidade, lipofilicidade e estabilidade térmica. Facilitando também a compressão dos pós para o comprimido.
- liberação transdérmica: a quitosana promove a penetração transepitelial com diversos agentes terapêuticos como: insulina, morfina, hidrocortisona (SILVA et al., 2006).

As membranas de quitosana com finalidade cirúrgica possuem uma peculiaridade, pois ambos os lados possuem a mesma composição, portanto tanto a região lesionada quanto a sadia entram em contato com o polímero. Uma alternativa são as membranas assimétricas, estas possuem tal denominação pois são caracterizadas por superfícies diferentes, entrando em contato apenas com a superfície lesionada (RIKIMARU et al., 2003). Segundo pesquisa realizada por Rikimaru e colaboradores (2003) a membrana assimétrica desenvolvida por eles consistia de uma membrana comum de quitosana com uma camada de DNA, com avaliação mecânica da membrana constatou-se que são adequadas ao uso como curativo cirúrgico.

2.6 CARBOXIMETILCELULOSE

A carboximetilcelulose, mais conhecida por CMC, é um polímero aniônico obtido a partir do processamento da celulose do algodão ou polpa de celulose. É um polímero solúvel em água em temperatura ambiente, sendo muito utilizado como espessante de emprego geral. Tem como características ser biodegradável, fisiologicamente inerte e forma um hidrocolóide com elevada porosidade tendo propriedade mucoadesiva com diversas aplicações na indústria alimentícia e farmacêutica. (LIAKOS et al., 2014; PAUL & SHARMA, 2004; FAN et al., 2006).

A utilização da carboximetilcelulose (CMC) na área da saúde é muito ampla, pois tem importância no tratamento de feridas de difícil cicatrização. Essa característica está relacionada com sua capacidade de ativar os macrófagos, gerar

uma resposta inflamatória e iniciar o processo de reparo da lesão. (LIAKOS et al., 2014; PAUL & SHARMA, 2004; FAN et al., 2006).

As propriedades da CMC dependem da viscosidade de suas soluções aquosas, do grau médio de substituição e da distribuição dos grupos carboximetila. O grau médio de substituição é o número médio de grupos hidroxila substituída por unidades D-glicopiranosil da cadeia polimérica. A distribuição dos grupos carboximetila ao longo das cadeias influencia tanto as propriedades, quanto o comportamento reológico de suas soluções e a abrangência de suas aplicações. (CARASCHI e CAMPANA FILHO, 1999).

Na área da saúde a CMC sódica reticulada é utilizada em cápsulas, comprimidos e grânulos de desintegração rápida, também é empregada como mucoadesivo, utilizada em sistemas de liberação de fármacos. A bioadesão é uma propriedade que permite aumentar o tempo de permanência do medicamento no organismo, melhorando a biodisponibilidade dos fármacos e reduzindo o número de doses diárias do medicamento. (VILLANOVA et al., 2010).

2.7 BIOMATERIAIS NA ODONTOLOGIA

Na odontologia existem várias condições onde as perdas ósseas prejudicam a função dental, como nas periodontites, ou até mesmo impedem a reabilitação bucal, fazendo com que o paciente necessite de reabilitação com implantes osseointegráveis, porém em alguns casos não há quantidade ou qualidade óssea adequadas. Diante deste quadro surgiu a necessidade de novos materiais sintéticos para o tratamento dessas alterações do volume ósseo. (SPIN NETO, 2008; SPIN NETO, 2010).

Os biomateriais poliméricos sintéticos foram utilizados pela primeira vez na Odontologia no século 19, quando a guta-percha, material derivado do látex, foi utilizada como material para moldagem. Atualmente a guta-percha é um material de extrema relevância clínica sendo utilizada nos tratamentos endodônticos. (BHADURI & BHADURI, 2009).

O primeiro polímero rígido introduzido na Odontologia foi o polimetil metacrilato (PMMA), que é utilizado desde 1930 para as mais diversas situações clínicas, principalmente a confecção de dentes e próteses dentárias artificiais, além de aparelhos ortodônticos. A molécula de Bis-GMA (Bisfenol Glicidil Metacrilato) foi desenvolvida em 1963, sendo um importante passo no desenvolvimento dos biomateriais poliméricos, sendo que até hoje, o Bis-GMA e várias outras moléculas continuam sendo desenvolvidas e estudadas para serem empregadas na Odontologia Restauradora. (BOWEN, 1963).

A partir dos biomateriais sintéticos surge uma nova busca, os biomateriais naturais, com grande potencial comercial. Os produtos desenvolvidos à base de quitosana tiveram utilização sugerida como bioadesivo, agente cicatrizador, agente antimicrobiano, material de bandagem, molde para enxerto de pele, agente hemostático, material para sutura, e até mesmo material para lentes de contato na forma de filmes, géis, cápsulas, micro cápsulas e soluções. Dentre a variedade dos polímeros naturais que podem ser utilizados para aplicações médicas a quitina e a quitosana têm sido muito utilizadas (GEMINI-PIPERNI et al., 2014; JAYAKUMAR et al., 2011; JAYAKUMAR et al., 2007; HOVEN et al., 2007; LI et al., 2005; YAMAMOTO et al., 2005).

A quitosana tem se mostrado como alternativa muito atraente para o desenvolvimento de novos materiais para aplicações biomédicas. As aplicações de quitosana são variadas, tais como sistemas de liberação de fármacos com base em matrizes de quitosana, engenharia tecidual, quitosana como analgésico e glicosamina no combate à artrite (LARANJEIRA e FÁVERE, 2009).

Com a crescente necessidade de produtos que possam ser aplicados na assistência ao paciente, diversos ramos da medicina realizam pesquisas que visam oferecer a melhor resposta terapêutica e os estudos com quitosana tem oferecido futuro promissor em pesquisas (PARK e KIM, 2010; SHI et al., 2006; MAJETI e KUMAR, 2000).

Em razão da biocompatibilidade e da biodegradabilidade da quitosana, têm sido realizados estudos como excipiente em formulações farmacêuticas (géis,

hidrogéis, comprimidos, microesferas, lipossomas, micro e nanopartículas) (PARK e KIM, 2010; FURTH et al., 2007; SILVA et al., 2006).

Jayakumar et al. (2011) consideram que o curativo é uma das aplicações médicas mais promissoras para o uso da quitosana. A natureza adesiva da quitosana, associada ao seu aspecto antifúngico e bactericida e a permeabilidade ao oxigênio é uma propriedade importante, quando associada ao tratamento de feridas e queimaduras.

Na ortopedia, a preocupação com a substituição de articulações e reparação e regeneração de defeitos ósseos, dor lombar, osteoporose, escoliose e outros problemas músculo-esqueléticos precisam ser resolvidos com o uso de modo permanente ou temporário de dispositivos, e a quitosana também tem sido objeto de estudo (NAVARRO et al., 2008).

As infecções que se desenvolvem em feridas traumáticas e cirúrgicas continuam a ser um problema, apesar de décadas de avanços em antibióticos e antissépticos (BURKATOVSKAYA et al., 2006). Esses autores realizaram testes in vitro para analisar as propriedades antibacterianas de curativo em ratos com feridas muito contaminadas. Os pesquisadores verificaram que o acetato de quitosana eliminou rapidamente a bioluminescência na ferida, conforme a atividade bactericida in vitro ofereceu melhor resposta que o curativo de alginato e sulfadiazina de prata.

Membranas de quitosana e outros materiais são empregados em áreas como engenharia tecidual e em dispositivos de liberação de fármacos (DASH et al., 2011; STAMATIALIS et al., 2008).

Shi et al. (2006) consideram que a medicina regenerativa é um campo de pesquisa promissor, em especial, pela possibilidade de restauração ou substituição de órgão perdidos ou danificados, transplante de novo tecido com a combinação de suportes (matrizes) e biomoléculas.

Na área odontológica, este biomaterial foi apresentado primeiramente na forma de gel, obtido a partir de diferentes granulações e concentrações do pó da quitosana, e passou-se a avaliar a possibilidade de sua utilização em sítios cirúrgicos ou em terapia periodontal não cirúrgica. Nos casos de sítios fechados,

bolsas periodontais, defeitos infra-ósseos, o gel pode ser levado com uma seringa sem a necessidade de anestesia e pode ser adicionada solução hidroalcoólica para diminuir sua viscosidade. Já para o preenchimento de defeitos ósseos, essa fluidez deve ser ajustada para que haja um completo preenchimento da cavidade e portanto, não deve ter um alto grau de escoamento (GERENTES et al., 2002).

Foi proposta a utilização da quitosana como material para a entrega de antibióticos para a redução bacteriana local em aplicações orais. A aplicação do gel de quitosana pode promover uma permanência longa nos tecidos designados, penetração de drogas associadas, aliados à alta eficácia e aceitabilidade (IKINCI et al., 2002).

Além disso somente a quitosana parece apresentar ação bacteriostática e vem sendo testada na odontologia no tratamento de infecções bacterianas (BAE et al., 2006). Na área medica, o crescimento de *Escherichia coli* foi inibido na presença de concentrações superiores a 0,025% de quitosana, que também inibiu o crescimento de *Fusarium*, *Alternaria* e *Helminthosporium*, provavelmente pela ação dos grupos amino catiônicos da quitosana sobre os grupos aniônicos da parede celular desses microorganismos (HIRANO et al., 1976).

Biomateriais de quitosana também tem sido considerados como acelerador da reparação tecidual, capazes de aumentar a produção de matriz extracelular através do aumento de produção de fatores de crescimento. Também acelerariam a infiltração de linfócitos polimorfonucleares nas fases iniciais de cicatrização tecidual, aumentando consideravelmente a osteopontina, uma fosfoproteína capaz de aumentar a ligação celular na ferida em cicatrização (UENO et al., 2001).

2.8 MATERIAL CAPEADOR PULPAR

O material capeador pulpar deve ter algumas características: bactericida, não provocar injúria ao complexo dentinopulpar, regenerar e manter as funções da polpa formando uma barreira de tecido mineralizado, não interferir no processo fisiológico de reabsorção radicular, apresentar propriedades dimensionais estáveis, ser radiopaco, ser insolúvel no meio bucal, não ser reabsorvível, ser adesivo às

estruturas dentárias, apresentar boa capacidade de vedar as margens cavitárias, mantendo isolado e saudável o tecido pulpar remanescente (CHACKO & KURIKISE, 2006; MALEKAFZALI & SHEKARCHI & ASGARY, 2011; HAGHGOO; ABBASI, 2012; LOURENÇO NETO et al., 2016).

Um biomaterial sintético com grande destaque em pesquisas científicas e de ampla utilização na Odontologia é o MTA (agregado de trióxido mineral). Os cimentos à base de MTA são materiais bioativos e biocompatíveis que tomam presa em contato com a água, sangue ou outros fluidos, formando hidróxido de cálcio. O hidróxido de cálcio eleva o pH do meio promovendo a ativação da fosfatase alcalina e, conseqüentemente, iniciando o processo de mineralização. Em contato com fluidos teciduais esse hidróxido de cálcio se dissocia em íons cálcio e hidroxila. (GANDOLFI et al., 2009).

Esses materiais tem sido de extrema importância na literatura, visando os testes laboratoriais e clínicos a fim de ampliar a gama de conhecimentos sobre o mecanismo de ação e suas possíveis interações com os tecidos pulpare. (AEINEHCHI et al., 2007; SAKAI et al., 2009; CARDOSO-SILVA et al., 2011; OLIVEIRA TM, 2013; LOURENÇO NETO et al., 2016).

Um dos principais materiais capeadores é o Cimento Portland, sendo um material utilizado na Engenharia Civil, que apresenta constituintes similares aos do MTA. Seus constituintes são: silicato tricálcio, silicato dicálcio, aluminato tricálcio, ferro aluminato, tetracálcio e sulfato de cálcio hidratado (FUNTEAS et al., 2003; CAMILLERI et al., 2005; SONG et al., 2006). Por suas características químicas ele desperta grande interesse científico sendo uma alternativa compatível e de custo inferior ao MTA, produto já consagrado no mercado e na literatura (ESTRELA et al., 2000; MENEZES et al., 2004; SAKAI et al., 2009; LOURENÇO NETO et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2013).

Pesquisas relatam a similaridade existente entre o MTA com o cimento Portland. (ESTRELA et al., 2000; HOLLAND et al., 2001; DUARTE, 2005; ISLAM, 2006; BORTOLUZZI, 2006; MIN, 2007; SHAYEGAN; PETEIN; ABBEELE, 2008). As características principais do cimento Portland são: propriedades macroscópicas, microscópicas, radiográficas, comportamento biológico, composição, ação

antimicrobiana e o pH semelhante ao MTA, porém não apresenta óxido de bismuto, ativo que gera radiopacidade ao MTA (HOLLAND et al., 2001; BORTOLUZZI et al., 2006; SHAYEGAN; PETEIN; ABBEELE, 2008;).

Para a utilização do cimento Portland foram realizados testes de toxicidade, características físico-químicas, estudos *in vivo* e *in vitro* para a confirmação, comparando com o MTA. Estes estudos também permitiram a neoformação de tecido mineralizado e a manutenção da vitalidade do remanescente pulpar, favorecendo o uso do material. (ESTRELA et al., 2000; HOLLAND et al., 2001; CONTI et al., 2009; LOURENÇO NETO et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2013).

3 PROPOSIÇÃO

3 PROPOSIÇÃO

Objetivos Gerais:

Elaborar e desenvolver a bandagem bioestimuladora (BBio) dos tecidos dentinário e pulpar de dentes decíduos e/ou permanentes,

Objetivos Específicos:

Avaliar as características químicas e físicas da composição da bandagem bioestimuladora (BBio) em relação a:

- Adequação da composição da bandagem;
- Desempenho quanto à liberação controlada de material capeador;
- Absorção de água com análise de perda de massa;
- Citotoxicidade da bandagem em cultura de células;

4 MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 DESENVOLVIMENTO DA BANDAGEM “BBIO”

As bandagem foram desenvolvidas com diferentes composições. O grupo I são bandagens de quitosana pura, o grupo II possui a incorporação do cimento Portland puro, o grupo III tem em sua composição o cimento com o acréscimo do radiopacificador iodofórmio e o grupo IV também apresenta o cimento com outro radiopacificador a zircônia.

Foram desenvolvidas bandagens a partir do gel de quitosana associando cimento Portland, sendo o mesmo incorporado as bandagens puro e em duas constituições com a adição de agentes radiopacificadores, a zircônia e o iodofórmio. As concentrações utilizadas seguiram estudos prévios (SILVA et al., 2017).

O gel de quitosana foi preparado dissolvendo-se 100 gramas da quitosana (2%) (Sigma-Aldrich, St. Louis USA) em 100 mL de uma solução de ácido acético 2% (v/v), e para cada 50 gramas de gel preparado foram incorporados 1,25 gramas de glicerol para conferir maior plasticidade ao material produzido. Após o preparo dos géis estes foram acondicionados em bisnagas plásticas com bico dosador para facilitar a manipulação dos mesmos, as bisnagas foram deixadas em cuba ultrassônica por 1 hora para remoção de bolhas de oxigênio dos géis preparados.

O gel de carboximetilcelulose foi preparado por meio da dissolução de 1,4% (m/v) de CMC em água destilada. A mistura foi mantida em agitação por 24 horas. Posteriormente, o gel foi colocado em banho de ultrassom, com temperatura de 30°C, por uma hora e armazenado a 4°C, também para posterior utilização.

Cada unidade de bandagem foi feita em camada tripla (quitosana/cimento/quitosana), com proporções fixas de cada material incorporado (polímero e material capeador), as proporções utilizadas seguiram estudos prévios e serão mantidas em sigilo devido processo de patente envolvendo as bandagens desenvolvidas.

A camada de cimento foi incorporada através do “polvilhamento” do cimento sobre a segunda camada da bandagem, em gel de carboximetilcelulose (CMC), para melhor adesão do cimento e também por suas características peculiares de não reatividade deste material com o cimento (Figura 1).

Para o desenvolvimento do modelo da bandagem foi utilizada como molde placa de petri de 60X15mm, onde os géis foram acondicionados por deslizamento com o auxílio de bisnagas plásticas. Em seguida entre cada camada foram levadas para estufa por 15 minutos com temperatura de 30° C para evaporação da água, ao final do processo as bandagens foram deixadas 24 horas em estufa para a completa secagem. Após a secagem as bandagens foram retiradas das placas de petri com auxílio de bisturi e pinça e embaladas em papel manteiga (Figura 1).

Figura 1 – Desenvolvimento da bandagem BBio. (A) Preparo dos géis. (B) Banho de ultrasson. (C) Bisnagas prontas para pesagem. (D) Pesagem dos géis. (E) Secagem das camadas. (F) Polvilhamento do cimento. (G) Secagem Final. (H) Retirada da bandagem.

4.1.1 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi realizada com o objetivo de analisar a superfície e a textura das bandagens confeccionadas, avaliando a distribuição do cimento Portland incorporado. Para esta leitura em MEV foi realizada a metalização das amostras, as mesmas foram cortadas em formato e tamanho compatíveis com a base de leitura do microscópio, 5mm X 5mm para serem analisadas. As leituras foram realizadas no equipamento de microscopia eletrônica

de varredura PSEM/Express (Fei Europe, Eindhoven, The Netherlands) que realiza imagens em alto e baixo vácuo capaz de alcançar uma resolução de 30 nm.

Para esta leitura em MEV foram utilizadas uma membrana de cada grupo sendo: Controle (sem cimento); Portland Puro; Portland + Zircônia; e Portland + Iodofórmio.

4.1.2 ENSAIOS DE ABSORÇÃO DE ÁGUA E PERDA DE MASSA

Os experimentos foram realizados em triplicatas. As bandagens foram cortadas em quadrados de 10cm², e imersas em 10 ml de água miliq (ultra pura), respeitando a norma ISO 10993-12/2004, sendo 1 cm² por ml. Os frascos com as amostras foram colocados em estufa a 37°C sob uma cuba agitadora. As bandagens em solução foram retiradas nos períodos de tempo experimentais de 24, 48 e 72 horas. As bandagens foram pesadas e os respectivos valores anotados. Após as pesagens as membranas foram colocadas na estufa por 24h a 37°C, e foram pesadas novamente (Figura 2). Os tubos foram mantidos sob agitação de 50 rpm a temperatura de 37°C. A quantidade de água absorvida foi calculada pela Equação 1.

Equação 1:

$$\% \text{água absorvida} = \left(\frac{m_w - m_i}{m_i} \right) \times 100$$

Em que:

m_i = massa inicial da amostra

m_w = massa da amostra úmida

Ao fim de cada teste as amostras foram submetidas à secagem a 37°C e foram novamente pesadas para se determinar a massa seca final de modo a ser calculada a perda de massa segundo a Equação 2.

Equação 2:

$$\% \text{perda de massa} = \left(\frac{m_f - m_i}{m_i} \right) \times 100$$

Em que:

m_f = massa final da amostra após a secagem

m_i = massa inicial da amostra.

Figura 2 – Teste de perda de massa e absorção de água. (A) Preparo das amostras. (B) Amostras em água ultrapura e em estufa sob agitação. (C) Pesagem bandagem úmida. (D) Secagem em estufa por 24h. (E) Pesagem bandagem seca.

4.1.3 DOSAGEM DE pH

Para a dosagem do pH foi utilizada água ultrapura e deionizada (água MiliQ) nos períodos de 24, 48 e 72 horas imersas em solução, visando observar se o pH ficaria próximo ao fisiológico 7.0 após a liberação do cimento na solução de imersão. Novamente as bandagens foram secas em estufa por 24 horas a 37°C, e então recortadas com área de 10cm² para cada bandagem e imersas em 10mL de água ultrapura, respeitando a proporção de 1cm²/mL de solução, segundo a norma ISO 10993-12:2004. Os frascos com as amostras foram colocados em estufa a 37°C sob uma cuba agitadora. As bandagens em solução foram retiradas para leitura do pH em phmetro previamente calibrado (Figura 3). Os tubos contendo os materiais em solução foram colocados em vortex para agitação por 30 segundos antes de cada medição, estas foram realizadas em triplicata. Os dados anotados durante a realização do ensaio foram tabulados e expressos em gráficos.

Figura 3 - Medida de pH. (A) Preparo das amostras. (B) Amostras em água ultrapura e em estufa sob agitação. (C) Leitura em pHmetro.

4.1.4 TESTE DE LIBERAÇÃO DE CÁLCIO

Foram realizados testes *in vitro* de liberação de cálcio para os cimentos incorporados as bandagens, visando à comprovação de que a combinação dos materiais da bandagem e do cimento não alteram as propriedades do mesmo.

Baseado na norma ISO 10993-12:2004, como nos testes anteriores, as bandagens foram secas em estufa por 24 horas a 37°C, e então recortadas respeitando uma área de 10cm² para cada bandagem e imersas em 10mL de água ultrapura, respeitando a proporção de 1cm²/mL. Os frascos com as amostras foram colocados em estufa a 37°C sob uma cuba agitadora por 24, 48 e 72 horas. Decorridos estes períodos, as bandagens foram retiradas da solução e as mesmas levadas ao laboratório para a leitura da liberação de cálcio (Figura 4).

Para leitura da liberação do cálcio foi empregado um espectrofotômetro de absorção atômica (Thermo/Série M/Cambridge/Reino Unido) equipado com uma lâmpada de cátodo oco específica para o cálcio. As condições de operação foram: corrente da lâmpada: 5 mA; combustível: Acetileno; suporte: Oxigênio; estequiometria: Redutor.

Para prevenir possíveis interferências de metais alcalinos, foi preparado uma solução de lantânio, diluindo-se 9,8 g de cloreto de lantânio em 250 mL de solução ácida.

Uma solução estoque de cálcio foi preparada diluindo-se 2,4972 g de carbonato de cálcio em 50mL de água deionizada. A essa solução foi adicionada,

gota a gota, 10mL de ácido clorídrico concentrado. Posteriormente diluiu-se em 1000 mL de água ultrapura. Após o preparo, 1,00mL deste preparado correspondia a 1mg de cálcio. Com esta solução, preparou-se soluções padrões de cálcio, por diluição seriada, sendo elas: 5, 10, 20, 40 e 80 mg/L, para elaboração da curva de liberação de cálcio.

Para a leitura, tomou-se 6mL de cada padrão e adicionou-se 2mL da solução de cloreto de Lantânio, enquanto que para as amostras, após o contato com as bandagens nos períodos experimentais, tomou-se 0,6mL e completou-se seu volume para 6mL, acrescentando-se de 2mL de solução de cloreto de lantânio. Para o branco, tomou-se 6 mL de água ultrapura e 2mL de solução de cloreto de lantânio.

Os cálculos da liberação foram efetuados por meio da equação da reta da curva padrão.

Figura 4 – Leitura de liberação de cálcio. (A) Preparo das amostras. (B) Amostras em água ultrapura em estufa sob agitação. (C) Espectrofotometro de absorção de massa.

4.1.5 AVALIAÇÃO DA RADIOPACIDADE

Para avaliar a radiopacidade das bandagens foram realizadas radiografias, sendo utilizado como referência de item radiopaco cones de guta percha, que foram radiografados nas mesmas condições, utilizando filmes radiográficos oclusais (Nº4) Insight de sensibilidade E-F da marca KODAK (Eastman Kodak Company, Rochester, N.Y.), com tempo de exposição 0,6 segundos e distância foco filme de 15cm, em um aparelho de raios X odontológico com 70kV e 10mA. As bandagens foram radiografadas em diferentes quantidades, para avaliar a espessura ideal para uma boa radiopacidade das mesmas, sendo radiografadas 1 bandagem

(aproximadamente 0,20mm de espessura), 5 bandagens sobrepostas (aproximadamente 1,0mm de espessura) e 10 bandagens sobrepostas (aproximadamente 2,1mm de espessura) (Figura 5). As radiografias foram reveladas pelo método temperatura/tempo em soluções reveladoras e fixadoras, com lavagem intermediária entre soluções de 20 segundos e fixação de 10 minutos seguida de lavagem final em tanque de água corrente por 10 minutos e secagem, permitindo uma imagem final com bom controle de qualidade.

Figura 5 - diferentes espessuras de bandagens e distância foco/filme constante no momento da radiografia.

4.2 CULTURA DE CÉLULAS

4.2.1 COMITÊ DE ÉTICA

Seguindo princípios éticos e jurídicos, este estudo foi submetido e considerado aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Humanos da Faculdade de Odontologia de Bauru – Universidade de São Paulo (CAAE 31091014.7.0000.5417) (Anexo A). As células utilizadas foram fibroblastos provenientes da polpa de dentes decíduos previamente estocadas em um biorrepositório. As mesmas foram descongeladas e expandidas para o uso nos experimentos de viabilidade celular.

4.2.2 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR PELO MÉTODO DE MTT

Os grupos foram divididos visando a comparação das bandagens, foco de patente e o material existente no mercado atualmente tido como o mais indicado para as mesmas situações onde a bandagem será indicada, neste caso o MTA (Angelus; Lindóia, SP, Brasil).

Tabela 1 - Grupos de bandagens a serem analisadas.

GRUPO	MATERIAL
I	sem cimento
II	cimento Portland
III	cimento Portland+Iodofórmio
IV	cimento Portland+Zircônia
V	MTA

O ensaio de MTT (Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio - Sigma-Aldrich Co., St. Louis, EUA) é utilizado para determinar a viabilidade celular, quantificada pela redução deste sal a cristais de formazan (cor azul/púrpura), pela atividade metabólica celular de enzimas mitocondriais (desidrogenases mitocondriais) (Mosmann, 1983).

Os meios condicionados com as bandagens foram preparados em meio de cultura DMEM sem SFB, na concentração 1cm²/1mL (material/meio de cultura DMEM), durante 24 h, a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ (adaptado da ISO 10993-12). Uma vez que a ISO (10993-12) preconiza a proporção de 0,1g/1mL.

Para o teste de viabilidade celular (MTT) foi feito o plaqueamento celular em placas de 96 poços (1x10³ células/poço). Após 24 horas de adesão celular houve a troca do meio de cultura para os meios condicionados preparados anteriormente com as bandagens. Os ensaios de viabilidade foram realizados nos períodos de 24, 48 e 72 horas após o contato com meio condicionado. Ao final da incubação os sobrenadantes foram removidos, as células foram lavadas com PBS 1x e em seguida, foi adicionado 110 uL/poço da solução de MTT às células.

A solução de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) foi dissolvida em DMEM na proporção de 0,5 mg/mL. As placas foram envoltas por papel alumínio, sob o abrigo da luz, e incubadas a 37°C e 5% de CO₂ por 4 horas. Em seguida, as placas foram retiradas da incubadora, e então, a solução de MTT foi aspirada e 200 µL/poço de DMSO (Dimetil Sulfóxido - Fisher Scientific, Hampton, VA, EUA) foi adicionado (Figura 6). A absorbância foi determinada em aparelho de espectrofotômetro (Synergy H1 Multi-Mode Reader, BioTek, Winooski, Vermont, USA) com comprimento de onda de 570 nm.

Figura 6- A – Poços contendo solução de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio); B – Cristais de formazan dissolvidos após adicionar o DMSO (Dimetil Sulfóxido).

Figura 7 - A – Aparelho espectrofotômetro; B – Posicionamento da placa no espectrofotômetro.

4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Nos testes de caracterização físico-química de pH, perda de massa, absorção de água e liberação de cálcio, os resultados fornecidos após as leituras foram tabulados em gráficos e tabelas com a utilização do programa de estatística Origin®.

Os testes de viabilidade celular (MTT) tiveram seus resultados analisados utilizando o programa Statistica 5.1 (StatSoft). Para a avaliação da viabilidade celular foi utilizado o teste ANOVA 3 critérios, seguido pelo teste de Tukey. Foi adotado o nível de significância de 5% para que as diferenças fossem consideradas estatisticamente significativas.

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 BANDAGEM “BBIO”

As características sensoriais das bandagens são de um produto com maleabilidade e resistência adequada para aplicação em diversos tipos de preparos cavitários, em diferentes tamanhos tendo como objetivo a proteção e a bioestimulação do complexo dentino-pulpar de dentes afetados.

Figura 8 – Bandagem do grupo cimento Portland.

5.2 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

O grupo controle (bandagem sem cimento) apresentou uma homogeneidade da superfície, não apresentando irregularidades (Figura 9A). Por conta das características do material analisado a imagem é clara devido a sua transparência, portanto o feixe de luz atravessa a amostra (Figura 9B).

O grupo das bandagens com cimento Portland puro, foi possível observar a uniformidade da distribuição do cimento pela bandagem, muito semelhante ao que

se observa no grupo controle (Figura 9C), com pequenas “granulações” do cimento. Em maior aumento pode notar-se a distribuição uniforme do cimento, porém a presença de alguns cristais maiores do cimento que talvez não se separaram durante o processo de “povilamento” do cimento sobre a bandagem (Figura 9D).

No grupo de cimento Portland com Iodofórmio observou-se uma distribuição homogênea do cimento na superfície da bandagem (Figura 9E), com imagem aumentada foi possível observar algumas bolhas do polímero, mas a olho nú não são possíveis de serem detectadas. Em maior aumento é possível notar os cristais de iodofórmio que não se mantiveram intactos no processo de homogeneização com o cimento (Figura 9F).

Para o grupo de bandagens com cimento Portland e Zircônia, as amostras demonstraram boa distribuição superficial (Figura 9G), nas imagens em maior aumento notou-se a presença de cristais de zircônia na superfície da bandagem (Figura 9H).

Figura 9 – Microscopia eletrônica de Varredura: A - Grupo controle (sem cimento) aumento de 250X; B - Grupo controle (sem cimento) aumento de 1000X; C - Bandagem com cimento Portland puro aumento de 250X; D – Bandagem com cimento Portland puro aumento de 1500X; E - Bandagem com cimento Portland e Iodofórmio aumento de 250X; F - Bandagem de cimento Portland e Iodofórmio aumento de 1500X; G - Bandagem com cimento Portland e Zircônia aumento de 250X; H - Bandagem com cimento Portland e Zircônia aumento de 1500X.

5.3 ABSORÇÃO DE ÁGUA E PERDA DE MASSA

Os testes de absorção de água e perda de massa demonstraram que todas as bandagens apresentam capacidade de absorver água, pelas características encontradas no material utilizado como base, as bandagens com a adição de cimento apresentaram uma menor absorção quando comparadas as bandagens puras. Outra característica foi a variação de tempo, esse fator não altera a absorção de forma significativa, não possui picos de absorção nos diferentes períodos analisados, apresentando pico apenas após 24 horas em solução, depois manteve-se constante (Gráfico 1).

As mesmas características foram observadas com relação a perda de massa e a variável tempo. Para o grupo das bandagens puras há uma grande perda de massa nas primeiras 24 horas e depois uma constância. Já para os grupos com a incorporação dos cimentos a perda de massa é menor quando comparada ao grupo das bandagens pura (Gráfico 2).

Gráfico 1 - % de absorção de água pelas bandagens nos tempos experimentais de 24, 48 e 72 horas.

Gráfico 2 - % de perda de massa das bandagens nos tempos experimentais de 24, 48 e 72 horas.

5.4 MEDIDAS DE pH

As bandagens de quitosana pura apresentaram um pH ácido fraco, valores oscilando próximo à 6,7. As bandagens com o cimento incorporado apresentaram um pH mais básico variando de 9,51 a 9,73. As bandagens com cimento e iodofórmio tiveram um aumento gradativo 8,35 a 8,50. Já as bandagens com cimento e zircônia tiveram uma redução no valor do pH 8,33 para 7,72 e um leve aumento para 7,88.

Tabela 2 – Valores de pH decorridos os períodos experimentais em solução.

GRUPO	pH	pH	pH
	24H	48H	72H
Bandagem Quitosana Pura	6.76	6.78	6.60
Bandagem Quitosana+Portland	9.73	9.55	9.51
Bandagem Quitosana+Portland Iodofórmio	8.35	8.49	8.50
Bandagem Quitosana+Portland Zircônia	8.33	7.72	7.88

Gráfico 3 – Perfil de pH das bandagens nos tempos experimentais de 24, 48 e 72 horas.

5.5 TESTE DE LIBERAÇÃO DE CÁLCIO

Para o teste de liberação de cálcio a leitura das amostras foi realizada em espectrofotômetro de massa, sendo necessário a curva da liberação de cálcio em mg por litro de solução (mg/L).

Em todos os grupos analisados a variável tempo foi relevante, sendo que no tempo 1 (24h) a bandagem pura liberou 11,7, a com cimento 211,2, com iodofórmio 116,3 e com zircônia 109,3. Já no tempo 2 (48h) a bandagem pura liberou 12,2, com cimento 258,8, com iodofórmio 130,8 e com zircônia 112,9. No tempo 3 (72h) a bandagem pura liberou 16,5, com cimento 290,6, com iodofórmio 144,8 e com zircônia 114,0.

Tabela 3 – Quantidade de cálcio liberado (mg/L) decorridos os períodos experimentais em solução.

GRUPO	Ca+ (mg/L)	Ca+ (mg/L)	Ca+ (mg/L)
	24H	48H	72H
Quitosana Pura	11,7	12,2	16,5
Quitosana+Portland	211,2	258,8	290,6
Quitosana+Portland+Iodofórmio	116,3	130,8	144,8
Quitosana+Portland+Zircônia	109,3	112,9	114,0

Gráfico 4 – Liberação de cálcio (mg/L) X tempos experimentais.

Os resultados obtidos demonstraram uma curva crescente de liberação de cálcio para todas as bandagens testadas, sendo observado uma maior taxa de liberação de cálcio das bandagens com cimento Portland puro, seguidas pelas bandagens com cimentos acrescidos de radiopacificadores (iodofórmio e zircônia).

5.6 AVALIAÇÃO DA RADIOPACIDADE

A avaliação da radiopacidade das bandagens desenvolvidas foi realizada através de radiografias, demonstrando que as bandagens na espessura em que foi constituída não apresenta boa radiopacidade. Este fato pode ser comprovado aumentando a espessura entre 1,0mm e 2,0mm onde se obtiveram bons resultados radiográficos. Para a análise foram utilizadas 5 bandagens de quitosana pura com espessura de 0,24mm e 10 bandagens de espessura 0,46mm, não demonstrando radiopacidade. Já os grupos com 5 bandagens de cimento Portland puro apresentaram a espessura de 1,1mm e 10 bandagens com espessura de 2,3mm com leve radiopacidade. Para os grupos com radiopacificador o grupo de 5 bandagens com cimento Portland e Iodofórmio com espessura de 1,0mm e com 10 bandagens com espessura de 1,95mm apresentaram boa radiopacidade. No grupo de 5 bandagens com cimento Portland + zircônia apresentaram espessura de 1,0mm e 10 bandagens espessura de 2,0mm tendo boa radiopacidade e visualização radiográfica.

Figura 10 – RADIOGRAFIA:(A) Grupo de bandagem sem adição de cimentos 5 bandagens de espessura (0,24mm); (B) 10 bandagens de espessura (0,46mm); (C) Grupo de bandagem com cimento Portland sem adição de radiopacificadores 5 bandagens de espessura (1,1mm); (D) 10 bandagens de espessura (2,3mm); (E) Grupo de bandagem com cimento Portland + Iodofórmio 5 bandagens de espessura (1,0mm); (F) 10 bandagens de espessura (1,95mm); (G) Grupo de bandagem com cimento Portland + zircônia 5 bandagens de espessura (1,0mm); (H) 10 bandagens de espessura (2,0mm);

5.7 VIABILIDADE CELULAR PELO MÉTODO DE MTT

Para o ensaio do MTT as médias dos valores de absorbância obtidos pela leitura no espectrofotômetro foram realizados em triplicata com densidade celular de 1×10^3 células por poço e agrupadas de acordo com os períodos do estudo e composições dos materiais (Tabela 4).

Tabela 4 – Valores de absorbância (média e desvio padrão) dos grupos após o ensaio MTT com densidade celular de 1×10^3 nos períodos de 24, 48 e 72 horas

PERÍODOS (h)	24	48	72
GRUPOS			
BAND	0,153 $\pm$ 0,05	0,261 $\pm$ 0,06	0,435 $\pm$ 0,10
BAND + PORTLAND	0,126 $\pm$ 0,04	0,210 $\pm$ 0,07	0,238 $\pm$ 0,07
BAND + PORT/IOD	0,138 $\pm$ 0,05	0,243 $\pm$ 0,09	0,319 $\pm$ 0,09
BAND + PORT/ZIRC	0,144 $\pm$ 0,05	0,237 $\pm$ 0,09	0,264 $\pm$ 0,15
MTA	0,252 $\pm$ 0,22	0,103 $\pm$ 0,07	0,171 $\pm$ 0,12
CONTROLE +	0,187 $\pm$ 0,07	0,261 $\pm$ 0,10	0,373 $\pm$ 0,14
CONTROLE -	0,134 $\pm$ 0,06	0,164 $\pm$ 0,08	0,173 $\pm$ 0,06

Para os resultados obtidos no ensaio do MTT houve diferença estatística significativa entre os períodos ($P=0,02$), sendo que o período de 48 horas apresentou maior viabilidade celular dentre os três períodos avaliados ($P=0,02$). Na comparação entre os grupos avaliados houve diferença estatisticamente significativa ($P=0,031$) de todos os grupos testados frente ao grupo MTA no período de 48 horas, sendo que este grupo apresentou valores menores quanto a viabilidade celular. No período de 24 e 72 horas não houve diferença significativa entre os grupos (Gráficos 5, 6 e 7).

Gráfico 5 – Avaliação da viabilidade celular pelo ensaio MTT entre os diferentes grupos testados no período de 24 horas.

Gráfico 6 – Avaliação da viabilidade celular pelo ensaio MTT entre os diferentes grupos testados no período de 48 horas.

* Diferença estatística significativa entre o grupo MTA e os demais dentro do período.

Gráfico 7 – Avaliação da viabilidade celular pelo ensaio MTT entre os diferentes grupos testados no período de 72 horas.

5.8 MORFOLOGIA CELULAR

Durante o testes de cultura de células foram realizados acompanhamentos microscópicos das células visando observar a presença ou não de alterações na morfologia celular dos fibroblastos antes e após os tratamentos com os materiais testados. Ao longo de todos os experimentos não se observou nenhum tipo de alteração na morfologia celular (Figura 11).

Figura 11 – Morfologia celular após o contato por 24 horas para os grupos das Bandagens confeccionadas: A – Bandagem sem cimento; B – Bandagem + Port; C – Bandagem + Port/Iodofórmio; D – Bandagem + Port/Zircônia. E 72 horas para os grupos das Bandagens confeccionadas: E – Bandagem sem cimento; F – Bandagem + Port; G– Bandagem + Port/Iodofórmio; H – Bandagem + Port/Zircônia.

6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

6.1 ABSORÇÃO DE ÁGUA E PERDA DE MASSA

Segundo Costa e colaboradores (2012) a absorção de água dos biomateriais com quitosana é em média 40%, porém em diferentes composições essa absorção pode chegar a 70%. Porém se a proporção dos polímeros for igual a absorção é reduzida, quando as concentrações são diferentes a absorção é maior. Este fato pode estar relacionado com um maior numero de ligações cruzadas entre o colágeno e a quitosana, as cadeias tornam-se mais próximas dificultando a penetração de solvente (COSTA et al., 2012).

No teste de absorção de água em blendas de quitosana e colágeno foi possível observar que quanto maior a concentração de quitosana maior é a absorção de água, o que está relacionado com a maior hidrofiliidade da quitosana (GA=24%) quando comparado com colágeno (TONHI & PLEPIS, 2002).

A hidrofiliidade da quitosana se dá em função dos grupos desacetilados que se associam aos grupos hidroxila e amino naturalmente, caracterizando sua forte afinidade por moléculas polares. Esses grupamentos têm grande influência sobre a quantidade de água retida, considerando que o aumento da concentração de quitosana no filme interfere significativamente na quantidade de água absorvida. (ASSIS & SILVA, 2003).

Os dados obtidos no trabalho corroboram com os dados das membranas de quitosana e CMC, a membrana de quitosana com CMC e glicerol foi a que mais absorveu água (MELIN, 2012).

Os dados obtidos demonstram que as bandagens em contato com soluções podem dissolver a quitosana ou o CMC que é solúvel em água, podendo facilitar a liberação dos cimentos quando em contato com os tecidos, essa característica é desejada para as bandagens BBIO.

Esses dados estão de acordo com alguns relatos da literatura (FAN et al., 2006; GAMIZ-GONZALEZ et al., 2015) relacionados ao material utilizado como

base das bandagens a quitosana, que demonstram essa absorção e ganho de massa inicial e a estabilidade em seguida, os autores relacionam estes fatos as interações iônicas realizadas entre os materiais incorporados e a quitosana.

Para a avaliação da perda de massa é necessário saber sobre sua estabilidade e cinética de degradação. (YAN et al., 2000; LI et al., 2009).

Com relação aos dados obtidos no presente trabalho pode se concluir que perda de massa ocorreu nas primeiras 24h, corroborando com os dados obtidos por Silva et al. (2017). A perda de massa é parcialmente independente da natureza dos meios aquosos, podendo ser atribuída pela remoção de moléculas que não reagiram durante o processamento (YAN et al., 2000).

Para o produto desenvolvido estas propriedades são favoráveis, já que poderá entrar em contato com tecido pulpar na presença de sangramento, e esta absorção inicial pode auxiliar no processo de hemostasia do tecido. Além disso, a perda de massa pode estar relacionada a solubilização da quitosana, o que acarreta na BBio um contato direto do cimento com o tecido pulpar, favorecendo o processo de indução de reparo fato demonstrado na literatura (LOURENÇO NETO et al., 2016).

6.2 MEDIDAS DE pH

SUN et al., 2013 testou a liberação de fármacos em dois diferentes pH 2,1 e 7,4 e observou que liberação de fármacos com pH 7,4 era de 81,5% após 10 horas enquanto em pH 2,1ª liberação foi de 12,1% a liberação.

Os valores de pH encontrados são diferentes dos descritos na literatura referente ao cimento Portland puro, bem como com a adição de agentes radiopacificadores para a bandagem BBio, os resultados da leitura de pH demonstraram um equilíbrio de pH valores bem próximos de 7,0, esses dados são de extrema importância e conferem as bandagens desenvolvidos um potencial menos agressivo aos tecidos pulpares, auxiliando no processo de reparo, uma vez que o pH básico causa uma cauterização dos tecidos em contato com o material

dificultando o reparo, como se observa no caso quando do contato direto do hidróxido de cálcio com o tecido pulpar (LOURENÇO NETO et al., 2016).

Os dados analisados quanto ao pH a variável tempo não foi relevante em todas as amostras pode estar relacionada com a capacidade do polímero absorver água, facilitando a liberação do fármaco por pressão osmótica. Nos dados obtidos no presente trabalho foi possível observar que a variação de pH ocorreu nas primeiras 24h. Os dados obtidos são diferentes do encontrado por Silva e colaboradores (2017) que tiveram alterações nas primeiras 48h.

6.3 TESTE DE LIBERAÇÃO DE CÁLCIO

A associação dos cimentos em filmes de quitosana apresentou resultados de liberação semelhantes aos observados por IKINCI et al., (2002), que afirmou que enquanto os filmes estão intactos, estes continuam a liberar o fármaco associado.

A liberação de cálcio pelas bandagens é uma propriedade importante e desejável uma vez que este íon é fundamental no processo de remineralização dentária, função esta desejada para a bandagem que está sendo desenvolvida.

A elaboração e o uso de filmes ou membranas de quitosana tem liberação prolongada, fato que pode ser percebido nos resultados, pois durante os 3 dias de experimento foi possível avaliar que o cálcio estava sendo liberado. Ikinci e colaboradores (2002) dizem que a liberação é prolongada estando o filme intacto até 4 horas após a aplicação.

6.4 AVALIAÇÃO DA RADIOPACIDADE

A radiopacidade é uma propriedade muito importante para a bandagem BBio, uma vez que ao ser aplicada sobre os tecidos pulpare e o dente ser restaurado, facilita o acompanhamento do material pelo cirurgião dentista, verificando a correta adaptação do mesmo sobre a área de exposição na imagem radiográfica.

Com relação a radiopacidade os dados indicam a necessidade de reavaliar a espessura do produto BBio pela concentração de radiopacificadores presentes, pois nos exames radiográficos após o uso clínico, existe a necessidade da observação do comportamento do material. A zircônica apresentou melhor resultado corroborando como o melhor agente radiopacificador a ser adicionado ao produto (HUNGARO DUARTE et al., 2009).

6.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Ao final das análises, pode-se notar que a superfície das bandagens de uma maneira geral em menores aumentos se apresentou regular, lisa e homogênea, semelhante ao observado no grupo controle. Sugere-se uma trituração manual do cimento com os radiopacificadores antes da mistura visando a diminuição do tamanho dos cristais observados, salvo que o que se observa nas imagens está na escala micrométrica.

Conforme achados na literatura endodôntica e de materiais dentários (BARANWAL et al., 2015) a observação desses cristais de zircônia é normal quando da MEV de outros cimentos endodônticos contendo esse radiopacificador.

6.6 VIABILIDADE CELULAR PELO MÉTODO DE MTT

A viabilidade das células nos tratamentos das membranas de quitosana/CMC/glicerol em todas as suas variações de composição não apresentaram toxicidade celular (MELIN, 2012).

SILVA et al., 2017 também obtiveram bons resultados em cultura de células quando do emprego de bandagens de quitosana, corroborando com os resultados encontrados em nosso trabalho.

De acordo com os resultados obtidos, foi possível constatar que as bandagens desenvolvidas com e sem a adição do cimento Portland não induzem efeitos negativos na viabilidade celular de fibroblastos pulpare de dentes decíduos humanos. Esses dados estão em concordância com o que se observou nos estudos de Ribeiro et al., 2009, que também observaram a viabilidade celular em culturas de células variadas frente a diferentes tipos de cimentos endodônticos, sendo sempre um deles uma formulação de cimento Portland acrescido de um agente radiopacificador.

Esses resultados corroboram com outros resultados encontrados indicando que a adição dos radiopacificadores ao cimento Portland, bem como a incorporação destes a bandagem de quitosana, formaram um produto mais biocompatível em diversos aspectos, aqui demonstrados pela visualização de uma maior proliferação celular quando comparada ao produto (MTA) já existente no mercado (SILVA et al., 2017;).

7 CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

O desenvolvimento das bandagens BBio e os resultados obtidos dos testes das propriedades físico-químicas (absorção de água, perda de massa e pH), bem como as análises biológicas da morfologia celular e viabilidade celular com MTT a BBio apresentaram dados favoráveis e desejáveis para sua aplicação clínica. A propriedade de liberação de cálcio foi bastante promissora, sendo esta uma condição que dará a diferenciação positiva da BBio como um produto bioestimulador pulpar.

Com esses dados pode-se concluir que a mesma se encontra dentro dos parâmetros desejados para o produto final e com propriedades semelhantes aos produtos existentes no mercado, de qualidade e aprovados pelas agências reguladoras.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ABDOU ES, NAGY KSA, ELSABEE MZ. Extraction and characterization of chitin and chitosan from local sources. *Biores Technol.* 2008;99:1359-67.

ALONSO D, GIMENO M, SÁNCHEZ SJD, SHIRAI K. Chitosan-based microcapsules containing grapefruit seed extract grafted onto cellulose fibers by a non-toxic procedure. *Carbohydr Res.* 2010;345:854-59.

AVE´ROUS L.,BOQUILLON N. Biocomposites based on plasticized starch: thermal and mechanical behaviours. *Carbohydr Polym.* 2004; 56:111-122.

ASSIS OBG, SILVA VL. Caracterização estrutural e da capacidade de absorção de água em filmes finos de quitosana processados em diversas concentrações. *Polímeros.* 2003;13(4):223-28.

BARBANTI SH, ZAVAGLIA CAC, DUEK EAR. Polímeros biorreabsorvíveis na engenharia de tecidos. *Polímeros.* 2005;15(1):13-21.

BAE K., JUN EJ., LEE SM., PAIK DI., KIM JB., Effect of water-soluble reduced chitosan on *Streptococcus mutans*, plaque regrowth and biofilm vitality. *Clinical oral Investigations.* 2006; 10:102-7.

BHADURI SB, BHADURI S. Biomaterials for dental apliccations. In: Narayan R. *Biomedical Materials.* 1st ed. New York, Springer, 2009:295-326

BLODGETT KJ. *Am. Chem. Soc.* 1935; 57, 1007.

BRÅNEMARK PI. Osseointegration and its experimental background. *J Prosthet Dent* 1983;50:399-410

BRITO MKM, SCHELLINI SA, PADOVANI CR, PELLIZON CH, TRINDADE NETO CG. Inclusões de quitosana no subcutâneo de rato: avaliação clínica, histológica e morfométrica. *Anais Brasileiros de Dermatologia.* 2011;84(1):35-40.

BOATENG JS, MATTHEWS KH, STEVENS HNE, ECCLESTON GM. Wound healing dressings and drug delivery systems: a review. *J Pharm Sci.* 2008;97(8):2892-923.

BORSCHIVER S, ALMEIDA LFM, ROITMAN T. Monitoramento tecnológico e mercadológico de biopolímeros. *Polímeros*. 2008;18(3):256-61.

BOWEN RI. Properties of a silica-reinforced polymer for dental restorations. *J Am Dent Assoc* 1963;66:57-64.

BURKATOVSKAYA M, TEGOS GP, SWIETLIK E, DEMIDOVA TN, CASTANO AP, HAMBLIN MR. Use of chitosan bandage to prevent fatal infections developing from highly contaminated wounds in mice. *Biomaterials*. 2006;27:4157-64.

BYRNE C. Technical textiles market – an overview. In: HORROCKS AR, ANAND SC. *Handbook of technical textiles*. Cambridge: Woodhead Publishing. 2000, P.1-23.

CAMILLERI J, MONTESIN FE, DI SILVIO L, PITT FORD TR. The chemical constitution and biocompatibility of accelerated Portland cement for endodontic use. *Int Endod J* 2005; 38: 834-842.

CARDOSO-SILVA C, BARBERIA E, MAROTO M, GARCIA-GODOY F. Clinical study of Mineral Trioxide Aggregate in primary molars. Comparison between Grey and White MTA- A long-term follow-up (84months). *J Dent*. 2011; 39:187-193.

CARVALHO FC, BRUSCHI ML, EVANGELISTA RC, GREMIÃO MPD. Mucoadhesive drug delivery systems. *Braz. J. Phar. Sci.*, 2010: 46, n.1.

CARASCHI JC, CAMPANA FILHO SP. Influência do grau de substituição e da distribuição de substituintes sobre as propriedades de equilíbrio de carboximetilcelulose em solução aquosa. *Polímeros*. 1999;9(2)70-7.

CANELLA KMC, GARCIA RB. Caracterização de quitosana por cromatografia de permeação em gel – influência do método de preparação e do solvente. *Quim Nova*. 2001;24:13-7.

COOKE FW, LEMONS JE, RATNER BD. Properties of materials. In: RATNER BD, HOFFMAN AS, SCHOEN FJ, LEMONS JE. *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine*. San Diego: Academic Press; 1996, P.11-35.

COSTA MO, SADER MS, SOARES GA. Produção e caracterização de membranas de colágeno-quitosana para aplicações biomédicas. Trabalho apresentado Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais. 2012.

CROISIER F, JÉRÔME C. Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. *European Polymer Journal*. 2013;49(4):780-92.

DASH M, CHIELLINI F, OTTENBRITE RM, CHIELLINI E. Chitosan – a versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. *Prog Polym Sci*. 2011;36:981-1014.

DODANE V., VILIVALAM VD. Pharmaceutical applications of chitosan. *Pharm Sci Technol Today*. 1998; 1:246–253.

DUCEPPE N, TABRIZIAN M. Advances in using chitosan-based nanoparticles for in vitro and in vivo drug and gene delivery. *Expert Opin Drug Deliv*. 2010;7(10):1191-207.

DUTTA P K, DUTTA J, TRIPATHI VS. Chitin and chitosan: chemistry, properties and applications. *J Sci Ind Res*. 2004;63:20-31.

DUEK E A R., ZAVAGLIA C A C., BELANGERO W D. *Polymer*. 1999; 40:6465.

ELKE M., ROLF-JOACHIM M., WOLF-DIETER D. *Polym. Degrad. Stabil*. 2003, 80, 489.

ESTRELA C, BAMMANN LL, ESTRELA CRA, SILVA RS, PÉCORA JD. Antimicrobial and Chemical Study of MTA, Portland Cement, Calcium Hydroxide Paste, Sealapex and Dycal Braz Dent J (2000) 11(1): 3-9.

FAN L., DU Y., ZHANG B., YANG J., ZHOU J., KENNEDY JF. Preparation and properties of alginate/carboxymethyl chitosan blend fibers. *Carbohydrate Polymers* 2006; 65:447-452.

FERREIRA, MC, PAGGIARO AO, ISAAC C, TEIXEIRA NETO N, SANTOS GB. Substitutos cutâneos: conceitos atuais e proposta de classificação. *Rev Bras Cir Plast*. 2011;26(4):696-702.

FUNTEAS UR, WALLACE JA, FOCHTMAN EW. A comparative analysis of mineral trioxide aggregate and Portland cement. *Aust Endod J*. 2003; 29:43-4.

FURTH ME, ATALA A, VAN DYKE ME. Smart biomaterials design for tissue engineering and regenerative medicine. *Biomaterials*. 2007;28:5068-73.

GANDOLFI MG, IACONO F, AGEE K, SIBONI F, TAY F, PASHLEY DH, et al. Setting time and expansion in different soaking media of experimental accelerated calcium-silicate cements and ProRoot MTA. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009;108:39-45.

GERENTES P., VACHOUD L., DOURY J., DOMARD A. Study of a chitin-based gel as injectable material in periodontal surgery. *Biomaterials*. 2002; 23:1295-302.

GEMINI- PIPERNI S, MILANI R, BERTAZZO S, PEPPELENBOSCH M, TAKAMORI ER, GRANJEIRO JM, FERREIRA CV, TETI A, ZAMBUZZI W. Kinome profiling of osteoblasts on hydroxyapatite opens new avenues on biomaterial cell signaling. 2014; 111(9):1900–1905

GUASTALDI AC, APARECIDA AH. Fosfatos de cálcio de interesse biológico: importância como biomateriais, propriedades e métodos de obtenção de recobrimentos. *Quim Nova* 2010;33(6):1352-8.

GIOVINO C, AYENSU I, TETTEH J, BOATENG J. An integrated buccal delivery system combining chitosan films impregnated with peptide loaded PEG-b-PLA nanoparticles. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces* .2013; 112: 9-15.

GOMES CORNÉLIO AL, SALLES LP, CAMPOS DA PAZ M, CIRELLI JA, GUERREIRO-TANOMARU JM, TANOMARU FILHO M. Cytotoxicity of Portland cement with different radiopacifying agents: a cell death study. *J Endod*. 2011; 37(2):203-10.

HIRANO S., OHE Y.,ONO H. Selective N-acylation of chitosan. *Carbohydr Res*. 1976; 70:526-35.

HIRANO S. Chitin and chitosan as novel biotechnological materials. *Polym Int*. 1999;48:732-4.

HÖFER D, SWEREW M. Medical textile and skin equivalents. *J Textile Apparel Tech Manag*. 2003;3(2):1-4.

HOLLAND R, SOUZA V, NERY MJ, FARACO IM JR, BERNABE PF, OTOBONI JA FILHO. Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tube filled with mineral trioxide aggregate, portland cemento r calcium hydroxide. *Braz Dent J*. 2001; 12(1):3-8.

HOVEN VP, TANGPASUTHADOL V, ANGKITPAIBOON Y, VALLAPA N, KIATKAMJORNWONG S. Surface-charged chitosan: preparation and protein adsorption. *Carbohydr Polym*. 2007;68(1):44-53.

IKINCI G., SENEL S., AKINCIBAY H., KAS S., ERCIS S., WILSON CG., HINCAL AA. Effect of chitosan on a periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis*. *International Journal of Pharmaceutics*. 2002; 235:121-7.

ILLUM L. Nasal drug delivery-possibilities, problems and solutions. *J Control Release*. 2003, 87:187–198.

ISLAM I, CHNG HK, IAP AU. Comparison of the physical and mechanical properties of MTA and Portland cements. *J Endod*. 2006; 32(3):193-7.

ISO 10993-12. Biological evaluation of medical devices. Part 12: Sample preparation and referente materials. 2012.

JAYAKUMAR R, NWE N, TOKURA S, TAMURA H. Sulfated chitin and chitosan as novel biomaterials. *Int J Biol Macromol*. 2007;40(3):175-81.

JAYAKUMAR R, PRABAHARAN M, SUDHEESH KUMAR PT, NAIR SV, TAMURA H. Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications. *Biotechnol Adv*. 2011;29(3):322-37.

JI QX, ZHONG DY, LU R, ZHANG WQ, DENG J, CHEN XG. In Vitro evaluation of the biomedical properties of chitosan and quaternized chitosan for dental applications. *Carbohydrate Research*, 2009; 344:1297-303 .

KHOR E., LIM LY. Implantable Applications of chitin and chitosan. *Biomaterials*, 2003; 24: 2339-49.

KOULAOUZIDOU EA, HELVATJOGLU-ANTONIADES M, PALAGHIAS G, KARANIKA-KOUMA A, ANTONIADES D. Cytotoxicity evaluation of an antibacterial dentin adhesive system on established cell lines. 2008; 84B (1): 271–276.

KONG M, CHEN XG, XING K, PARK HJ. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. *Int J Food Microbiol*. 2010;144:51-63.

KUMAR MNV. A review of chitin and chitosan applications. *React Funct Polym*. 2000;46(1):1-27.

KURITA K, KAJI Y, MORI T, NISHIYAMA Y. Enzymatic degradation of b chitin: susceptibility and the influence of deacetylation. *Carbohydr Polym*. 2000;(42):19-21.

LARANJEIRA MCM, FÁVERE VT. Quitosana: biopolímero funcional com potencial industrial biomédico. *Quim Nova*. 2009;32(3):672-8.

LANGMUIR I J. *Am. Chem. Soc*. 1917; 39, 1848.

LI Z, RAMAY HR, HAUCH KD, XIAO D, ZHANG M. Chitosan - alginate hybrid scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 2005;26(18):3919-28.

LIAKOS I, RIZZELLO L, SCURR DJ, POMPA PP, BAYER IS, ATHANASSIOU A. All-natural composite wound dressing films of essential oils encapsulated in sodium alginate with antimicrobial properties. *International Journal of Pharmaceutics*. 2014; 463(2): 137–145

LOURENÇO-NETO N, FERNANDES AP, MARQUES NCT, SAKAI VT, MORETTI ABS, MACHADO MAAM, ABDO RCC, OLIVEIRA TM. Terapia pulpar em dentes decíduos: Possibilidades terapêuticas baseadas em evidências. *Rev Odontol UNESP*. 2013;41(2):1-8.

LOURENÇO NETO N, MARQUES NCT, FERNANDES AP, RODINI CO, SAKAI VT, ABDO RC, MACHADO MAAM, SANTOS CF, OLIVEIRA TM. Immunolocalization of dentin matrix protein-1 in human primary teeth treated with different pulp capping materials. 2016; 104(1): 165–169

MAJETI NV, KUMAR R. A review of chitin and chitosan applications. *React Funct Polym*. 2000;46:1-27.

MALEKAFZALI B, SHEKARCHI F, ASGARY S. Treatment outcomes of pulpotomy in primary molars using two endodontic biomaterials. A 2-year randomised clinical trial. *Affiliations European Journal of Paediatric Dentistry : Official Journal of European Academy of Paediatric Dentistry* 2011, 12(3):189-193.

MELIN GR, Desenvolvimento de bandagem a partir de polímeros naturais para aplicações médicas. DISSERTAÇÃO DE MESTRADO. USP-EACH. 2012.

MI FL., WU YB., SHYU SS., CHAO AC., LAI JY., SU CC. Asymetric chitosan membranes prepared by dry/wet phase separation: a new type of wound dressing for controlled antibacterial release. *Journal of Membrane Science*. 2003; 212: 237-54.

MORETTI AB, SAKAI VT, OLIVEIRA TM, FORNETTI AP, SANTOS CF, MACHADO MAAM, ABDO RC. The effectiveness of mineral trioxide aggregate, calcium hydroxide and formocresol for pulpotomies in primary teeth. *Int Endod J*. 2008 Jul;41(7):547-55.

MUZZARELLI RA, ROCCHETTI R. The determination of molybdenum in sea water by hot graphite atomic absorption spectrometry after concentration on p-aminobenzylcellulose or chitosan. *Anal Chim Acta*. 1973; 64:371-9.

MUZZARELLI, R.A.A. Chitins and Chitosans as Immunoadjuvants and Non- Allergic Drug Carriers. *Marine Drugs*, v. 8, n. 2, 292-313, 2012.

MATTOSO LHC., FERREIRA M., OLIVEIRA Jr ON. Conjugated polymers for Langmuir-Blodgett films fabrication, In: J.C. Salamone, *The Polymeric Materials Encyclopedia*, Boca Raton, CRC Press Inc. 1996; 2:1432-1439.

MOSMANN T. *Methods, J. Immunol.* 1983; 65:55-63.

NAIR LS, LAURENCIN CT. Biodegradable polymers as biomaterials. *Prog Polym Sci.* 2007;32:762-98.

NAVARRO M, MICHIARDI A, CASTAÑO O, PLANELL JA. Biomaterials in orthopaedics. *J Roy Soc Interface.* 2008;5(27):1137-58.

OLIVEIRA TM, MORETTI AB, SAKAI VT, LOURENÇO NETO N, SANTOS CF, MACHADO MA, ABDO RC. Clinical, radiographic and histologic analysis of the effects of pulp capping materials used in pulpotomies of human primary teeth. *Eur Arch Paediatr Dent.* 2013 Apr;14(2):65-71.

PARANJPE A, SMOOT T, ZHANG H, JOHNSON JD. Direct Contact with Mineral Trioxide Aggregate Activates and Differentiates Human Dental Pulp Cells *Journal of Endodontics.* 2011;37 (12): 1691-1695.

PARK BQ, KIM MM. Applications of chitin and its derivatives in biological medicine. *Int J Mol Sci.* 2010;11:5152-64.

PILLAI CKS, PAUL W, SHARMA CP. Chitin and chitosan polymers: chemistry, solubility and fiber formation. *Prog Polym Sci.* 2009;34:641-78.

PRADELLA JGC. Biopolímeros e intermediários químicos. Relatório técnico nº 84396-205, Centro de Tecnologia de Processos e Produtos, Laboratório de Biotecnologia Industrial – LBI/CTPP (2006).

PAUL W., SHARMA CP. Chitosan and alginate wound dressing: a short review. *Trends in biomaterials & artificial organs.* 2004; 18:18-23.

QIN C, LI H, XIAO Q, LIU Y, ZHU J, DU Y. Water-solubility of chitosan and its antimicrobial activity. *Carbohydr Polym.* 2006; 63:367–374.

RATNER BD. Biomaterials science: an interdisciplinary endeavor. In: RATNER BD, HOFFMAN AS, SCHOEN FJ, LEMONS JE. Biomaterials science: an introduction to materials in medicine, San Diego: Academic Press; 1996, P.1-8.

RIBEIRO MP, ESPIGA A, SILVA D, BAPTISTA P, HENRIQUES J, FERREIRA C. Development of a new chitosan hydrogel for wound dressing. Wound Repair regen. 2009; 17:817-24.

RIKIMARU S., WAKABAYASHI Y., NOMIZU M., NISHI N., Polym. J. 2003, 35, 255.

RIZK A, RABIE BM. Human dental pulp stem cells expressing transforming growth factor β 3 transgene for cartilage-like tissue engineering. Cytotherapy 2013,15(6): 712-725.

REGE PR, BLOCK LH. Chitosan processing sequence on the resultant chitosans properties. Carbohydr Res. 1999;321:235-45.

SAKAI VT, MORETTI AB, OLIVEIRA TM, FORNETTI AP, SANTOS CF, MACHADO MA. Pulpotomy of human primary molars with MTA and Portland cement: a randomized controlled trial. Br Dent J. 2009; 207: 128-129.

SANTOS JE, SOARES JP, DOCKAL ER, CAMPANA FILHO SP, CAVALHEIRO ETG. Caracterização de quitosanas comerciais de diferentes origens. Polímeros. 2003;13:242-49.

SANTOS JUNIOR AR, WADA MLF. Polímeros biorreabsorvíveis como substrato para cultura de células e engenharia tecidual. Polímeros. 2007;17(4);308-17.

SEBRÃO D, SILVA VD, NASCIMENTO MG, MOREIRA MA. Imobilização de lipases em filme de caseinato de sódio/glicerol. Quim Nova. 2007;30(5);1182-7.

SILVA MS, LOURENÇO NETO N, COSTA SA, COSTA SM, OLIVEIRA TM, OLIVEIRA RC, MACHADO MAAM. Biophysical and biological characterization of intraoral multilayer membranes as potential carriers: A new drug delivery system for dentistry. Materials Science & Engineering. C, Biomimetic Materials, Sensors and Systems , 2017.

SPIN NETO R, MORENO DE FREITAS R, PAVONE C, CARDOSO MB, CAMPANA-FILHO SP, MARCANTONIO RAC, MARCANTONIO JR E. Histological evaluation of chitosan-based biomaterials used for the correction of critical size defects in rat's calvaria. 2010; 93(1):107–114.

SPIN-NETO R, PAVONE C, FREITAS RM, MARCANTONIO R, MARCANTONIO-JUNIOR E. Biomateriais à base de quitosana com aplicação médica e odontológica: revisão de literatura. *Revista de Odontologia da unesp* . 2008; 37:155-61.

SHI C, ZHU Y, RAN X, WANG M, SUY, CHENG T. Therapeutic potential of chitosan and its derivatives in regenerative medicine. *J Surg Res*. 2006;133:185-92.

SILVA HRSC, SANTOS KSCR, FERREIRA EI. Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. *Quim Nova*. 2006;29(4):776-85.

SZPALSKI C, WETTERAU M, BARR J, WARREN SM. *Tissue Engineering Part B: Reviews*. 2012, 18(4): 246-257.

SPERLING LH. *Introduction to physical polymer science*. Chapter I. Introduction to polymer science 4th Ed. New York; Wiley. 2006.

STAMATIALIS DF, PAPENBURG BJ, GIRONÉS M, SAIFUL S, BETTAHALLI SNM, SCHMITMEIR S, WESSLING M. Medical applications of membranes: drug delivery, artificial organs and tissue engineering. *J Membrane Sci*. 2008;308;1-34.

SONG JS, MANTE FK, ROMANOW WJ, KIM S. Chemical analysis of Power and set forms of portland cement, Gray ProRoot MTA, White ProRoot MTA and gray MTA-Angelus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2006; 102(6)809:15.

SUN X, SHI J, XU X, SHAOKUI C. Chitosan coated alginate/poly(N-isopropylacrylamide) beads for dual responsive drug delivery. *Int. Journal of Bio. Macromolecules*. 2013.

TAHTAT D, MAHLOUS M, BENAMER S, KHODJA AN, OUSSEDIK-OUMEHD H, LARABA-DJEBARI F. Oral delivery of insulin from alginate/chitosan cross linked by glutaraldehyde. *Int. Journal of Bio. Macromolecules*. 2013; 58:160-68.

TAVARIA FK, COSTA EM, PINA-VAZ I, CARVALHO MF, PINTADO MM. A quitosana como biomaterial odontológico: estado da arte. *Rev Bras Eng Biom*. 2013;29(1):110-20.

TONHI E, PLEPIS AMG. Obtenção e caracterização de blendas colágeno-quitosana. *Quim. Nova*. 2002; 25, 6:943-48.

UENO H., NAKAMURA F., MURAKAMI M., OKUMURA M., KADOSAWA T., FIJINAGA T. Evaluation effects of chitosan for the extra-cellular matrix production by

fibroblasts and the growth factors production by macrophages. *Biomaterials*. 2001; 22:2125-30.

VILLANOVA JCO, ORÉFICE RL, CUNHA AS. Aplicações farmacêuticas de polímeros. *Polímeros*. 2010;20(1):51-64.

VERT M., LI MS., SPENLEHAUER G., GUERIN P. *J.Mater. Sci*. 1992, 3, 432.

YAMAMOTO H, KUNO Y, SUGIMOTO S, TAKEUCHI H, KAWASHIMA Y. Surface-modified PLGA nanosphere with chitosan improved pulmonary delivery of calcitonin by mucoadhesion and opening of the intercellular tight junctions. *J Control Release*. 2005;102(2):373-8

YAN X., KHOR E., LIM LY. PEC Films prepared from chitosan-alginate coacervantes. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 2000; 48:941-46.

YU L., CHEN L. Biodegradable polymer blends and composites from renewable resources 2008. Chapter 1, 1-14.

ANEXOS

ANEXO A

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE BAURU-
USP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Desenvolvimento e análise da bandagem de bioestimulação dentino/pulpar (BBio)

Pesquisador: Natalino Lourenço Neto

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 31091014.7.0000.5417

Instituição Proponente: Universidade de São Paulo - Faculdade de Odontologia de Bauru

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 718.213

Data da Relatoria: 25/06/2014

Apresentação do Projeto:

Este estudo discute sobre o material ideal a ser empregado como material capeador para utilização sobre os tecidos pulpaes, sua interação com os tecidos, biocompatibilidade e citotoxicidade, e mais importante sua capacidade bioindutora de reparo. Este projeto tem como objetivo o desenvolvimento de um novo produto bioestimulador e capeador dentino/pulpar que poderá ser base para o desenvolvimento e recobrimento de "scaffolds" para reparo das diferentes estruturas dentárias. É um estudo "in vitro" com avaliações por cultura de células e expressão gênica de fatores indutores de mineralização em células oriundas de polpa de dentes extraídos por motivos ortodônticos.

Este estudo será desenvolvido em duas etapas: Etapa 1 - Elaboração e desenvolvimento da bandagem bioestimuladora (BBio) dos tecidos dentário e pulpar de dentes deciduos e/ou permanentes, sendo que nesta etapa serão realizados testes pertinentes à estruturação físico-química da bandagem. Etapa 2 – Após serem definidas as propriedades físico-químicas da BBio serão realizados testes: crescimento e viabilidade celular

em cultura de células de polpa de dentes deciduos humanos; cinética de expressão de RNAm para DMP-1, DPP, TNAP, FGF-2 e Nestin, cinética de expressão das proteínas DMP-1, DPP, TNAP, FGF-2 e Nestin e detecção da produção de DMP-1, DPP, TNAP, FGF-2 e Nestin por

Endereço: DOUTOR OCTAVIO PINHEIRO BRISOLLA 75 QUADRA 9
Bairro: VILA NOVA CIDADE UNIVERSITARIA CEP: 17.012-901
UF: SP Município: BAURU
Telefone: (14)3235-9356 Fax: (14)3235-9356 E-mail: cep@fob.usp.br

**FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE BAURU-
USP**

Continuação do Parecer: 718.213

imunofluorescência. As técnicas utilizadas para as análises serão MTT, RT-PCR, Elisa e Imunofluorescência. Os dados serão devidamente descritos por meio de gráficos e tabelas, sendo utilizado o Teste ANOVA, seguido do Teste de Tukey. Caso necessário, outros testes poderão ser aplicados. Será adotado nível de significância de 5% para que as diferenças sejam consideradas estatisticamente significativas.

Objetivo da Pesquisa:

Desenvolvimento e avaliação das propriedades biológicas, físicas e químicas de um novo produto bioestimulador e capeador dentino / pulpar (BBio). Hipótese 0 - A bandagem BBio apresenta capacidade bioindutora para os tecidos pulpaes; Hipótese 1 - A bandagem BBio não apresenta biocompatibilidade aceitável aos tecidos pulpaes.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:**Riscos:**

Não há riscos eminentes ao paciente.

Benefícios: Desenvolvimento de um novo material capeador pulpar com capacidade de induzir o reparo dos tecidos pulpaes e que possa vir a ser utilizado em dentes decíduos e permanentes.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Atualmente uma grande quantidade de materiais capeadores está disponível para utilização sobre os tecidos pulpaes, porém muito se discute sobre o material ideal a ser empregado, sua interação com os tecidos, biocompatibilidade e citotoxicidade, e mais importante sua capacidade bioindutora de reparo. Este projeto tem como objetivo o desenvolvimento de um novo produto bioestimulador e capeador dentino/pulpar que poderá ser base

para o desenvolvimento e recobrimento de "scaffolds" para reparo das diferentes estruturas dentárias. Este estudo será desenvolvido em duas etapas: Etapa 1 - Elaboração e desenvolvimento de bandagem bioestimuladora (BBio) dos tecidos dentinário e pulpar de dentes decíduos e/ou permanentes, sendo que nesta etapa serão realizados testes pertinentes à estruturação físico/química da bandagem. Etapa 2 – Após serem definidas as propriedades físico-químicas da BBio serão realizados testes: crescimento e viabilidade celular em cultura de células de polpa de dentes decíduos humanos; cinética de expressão de RNAm para DMP-1, DPP, TNAP, FGF-2 e Nestin, cinética de expressão das proteínas DMP-1, DPP, TNAP, FGF-2 e Nestin e detecção da produção de DMP-1, DPP, TNAP, FGF-2 e Nestin por imunofluorescência. As técnicas utilizadas para as análises serão MTT, RT-PCR, Elisa e Imunofluorescência. Os dados serão devidamente

Endereço: DOUTOR OCTAVIO PINHEIRO BRISOLLA 75 QUADRA 9
Bairro: VILA NOVA/CIDADE UNIVERSITÁRIA CEP: 13.012-901
UF: SP Município: BAURU
Telefone: (14)3235-8355 Fax: (14)3235-8355 E-mail: osp@fob.usp.br

**FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE BAURU-
USP**

Continuação do Parecer: 718.213

descritos por meio de gráficos e tabelas, sendo utilizado o Teste ANOVA, seguido do Teste de Tukey. Caso necessário, outros testes poderão ser aplicados. Será adotado nível de significância de 5% para que as diferenças sejam consideradas estatisticamente significativas.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

A pesquisa ficou pendente anteriormente com recomendações que foram atendidas na nova submissão.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não se aplica.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Esse projeto foi considerado APROVADO na reunião extraordinária do CEP de 14.7.2014, com base nas normas éticas da Resolução CNS 466/12. Ao término da pesquisa o CEP-FOB/USP exige a apresentação do relatório final. Os relatórios parciais deverão estar de acordo com o cronograma e/ou parecer emitido pelo CEP. Alterações na metodologia, título, inclusão ou exclusão de autores, cronograma e quaisquer outras mudanças que sejam significativas deverão ser previamente comunicadas a este CEP sob risco de não aprovação do relatório final. Quando da apresentação desta, deverão ser incluídos todos os TCLEs e/ou termos de doação assinados e rubricados.

BAURU, 15 de Julho de 2014

Assinado por:
Isabel Regina Fischer Rubira Bullen
(Coordenador)

Endereço: DOUTOR OCTAVIO PINHEIRO BRISOLLA 15 QUADRA 9
Bairro: VILA NOVA CIDADE UNIVERSITÁRIA CEP: 17.012-901
UF: SP Município: BAURU
Telefone: (14)3235-8356 Fax: (14)3235-8356 E-mail: cep@fob.usp.br