ANGELO RAFAEL DE VITO BORDIN

Estudo do *shelf life* da quitosana armazenada em diferentes tipos de embalagem, por meio da colorimetria e análise da microdureza dentinária

Dissertação apresentada ao Curso de Odontologia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto para obtenção do título de Mestre em Odontologia, área de concentração Endodontia.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Miranda da Cruz Filho

“versão corrigida”

Ribeirão Preto

2014

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

Assinatura do autor: _____

Data: ____/____/2012

Ficha Catalográfica

Bordin, Ângelo Rafael de Vito

Estudo do *shelf life* da quitosana armazenada em diferentes tipos de embalagem, por meio da colorimetria e análise da microdureza dentinária. Ribeirão Preto, 2014.

“Versão corrigida da Dissertação. A versão original se encontra disponível na Unidade que aloja o Programa”

55p.: il.; 30 cm

Dissertação de mestrado, apresentada na Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FORP-USP), área de concentração: Odontologia Restauradora-Endodontia.

Orientador: Cruz Filho, Antonio Miranda da

1. Quitosana. 2. *Shelf life*. 3. Microdureza.

BORDIN, A.R.V. Estudo do *shelf life* da quitosana armazenada em diferentes tipos de embalagem, por meio da colorimetria e análise da microdureza dentinária. 2014. 55 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. Antonio Miranda da Cruz Filho (Orientador)

Instituição: Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Esse trabalho foi realizado no Laboratório de Pesquisa em Endodontia,
Laboratório de Pesquisa no Departamento de Odontologia Restauradora e no
Laboratório de Gerenciamento de Resíduos Odontológicos da Faculdade de
Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Dedicatória

*Aos meus pais, **Regina** e **Darwin**, pelos conselhos, amor e apoio incondicional aos meus objetivos e sonhos. Sempre guiando meus passos e me amparando nos momentos difíceis dessa jornada. Devo a vocês tudo que conquistei.*

*À minha namorada **Vannessa**, pelo carinho, apoio e incentivo em todos os momentos. Sempre compartilhando as dificuldades dessa caminhada e me erguendo os momentos de dificuldade.*

Agradecimentos

A **Deus** por estar sempre presente em minha vida, guiando meus passos.

Ao meu orientador **Prof. Dr. Antonio Miranda da Cruz Filho**, pelos ensinamentos transmitidos, disponibilidade e pela imensa paciência e compreensão em todos os momentos. Obrigado por me orientar e ajudar a conquistar mais esse objetivo.

Ao **Prof. Dr. Jesus Djalma Pécora** e ao **Prof. Dr. Manoel Damião de Sousa Neto** pelo constante incentivo à pesquisa e conhecimentos científicos transmitidos.

Aos **Professores do Departamento de Odontologia Restauradora** da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, que por meio das disciplinas ministradas, contribuíram para meu crescimento profissional.

Ao **Prof. Dr. Silvio Rocha Corrêa da Silva** pela disponibilidade, paciência e ajuda na realização da análise estatística deste estudo.

À **Profª. Drª Débora Fernandes Costas Guedes** pela imensa ajuda e participação.

*Aos meus colegas de mestrado, **Diego, Ivan, Amanda, Keila, Vanessa**, pela amizade, convivência e colaboração.*

*Ao Técnico do Laboratório de Endodontia da FORP-USP, **Reginaldo Santana**, pelo apoio e amizade.*

*À Técnica do Laboratório de Endodontia da FORP-USP, **Luiza Godoi Pitol**, pela gentileza.*

*Ao secretário do Departamento de Odontologia Restauradora FORP-USP, **Carlos Feitosa dos Santos**, pela disponibilidade à todo momento e amizade.*

*Ao meu padrinho e tio **Wagner** e minha madrinha e avó **Angela**, pelo carinho e apoio nessa jornada.*

*Às minhas tias **Angela** e **Ana Rosa**, pelo apoio e incentivo que foram de fundamental importância para a conclusão desse objetivo.*

*Ao meu tio **Walter** pela imensa ajuda na correção e tradução do resumo da dissertação para o inglês.*

*À **Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo**, pela oportunidade de formação profissional.*

*À **CAPES**, pela bolsa outorgada.*

*Aos **meus familiares e amigo** que sempre torceram pelo meu sucesso.*

Meus sinceros agradecimentos!

BORDIN, A. R. V. Estudo do *shelf life* da quitosana armazenada em diferentes tipos de embalagem, por meio da colorimetria e análise da microdureza dentinária. 2014. 55p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

O objetivo do presente trabalho foi estudar, por meio da técnica de titulação colorimétrica e análise da microdureza dentinária, o *shelf life* da solução de quitosana 0,2% armazenada em frascos de vidro e plástico. Trinta caninos superiores humanos tiveram as coroas desprezadas e a porção cervical das raízes seccionada, obtendo-se 3 cortes. O segundo e terceiro cortes foram divididos ao meio e incluídos em resina acrílica resultando em 4 corpos de prova por dente. A solução de quitosana 0,2% (pH 3,2) foi preparada e distribuída em 3 frascos iguais de vidro (v1, v2 e v3) e em 3 de plástico (p1, p2 e p3) para realização dos testes em triplicata. Os testes de microdureza e colorimetria foram realizados durante seis meses nos períodos de 0, 7, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150 e 180 dias após o aviamento da solução. Para a mensuração da microdureza Knoop utilizou-se carga de 10 gramas por 15 segundos. O corpo de prova recebeu 50 µL da solução teste por 5 minutos e, após lavagem e secagem foi levado para mensuração. A análise foi realizada com as soluções v1, p1, EDTA 17% e água destilada (controle); v2, p2, EDTA 17% e controle; v3, p3, EDTA 17% e controle, para cada tempo proposto. Foram realizadas 3 endentações com espaço de 200 µm. As mensurações foram anotadas e arquivadas em um banco de dados. Para o teste da colorimetria utilizou-se uma solução padrão de carbonato de cálcio 0,3%, na qual gotejava-se por meio de micropipeta a solução de quitosana com volume pré determinado. A alteração da coloração da solução de carbonato, do violeta para azul, indicava quelação dos íons cálcio, detectada por meio de espectrofotometro Ultravioleta Visível. O aparelho emitia um valor da absorbância para cada análise da coloração, expressa por meio de gráfico (comprimento de onda/absorbância). Empregou-se Análise de Variância (*one-Way ANOVA*) ($\alpha = 0,05$) para comparar a microdureza entre as soluções, os diferentes tempos para cada solução, bem como a interação microdureza/tempo para cada solução. Houve semelhança entre as soluções testadas no que se refere ao tempo de estudo ($p=0,113$), bem como em relação à interação microdureza/tempo ($p=0,329$). As soluções testadas apresentaram, individualmente, o mesmo efeito sobre a microdureza da dentina, desde o tempo zero até os 180 dias. Quando comparadas entre si foram diferentes ($p<0,0001$). O teste de Tukey

evidenciou que a quitosana (v1, v2, v3, p1, p2 e p3) e EDTA reduziram a microdureza de forma semelhante entre si ($p>0,05$) e diferente do controle ($p<0,001$). Os gráficos da análise colorimétrica mostraram que tanto a quitosana em vidro como a em plástico apresentaram valores médios de absorbância no mesmo comprimento de onda (234nm) para todos os tempos, enquanto que para a solução padrão de carbonato de cálcio o comprimento de onda foi de 206nm. Concluiu-se que independentemente da forma de armazenamento a quitosana apresenta propriedade quelante por um período mínimo de 6 meses.

ABSTRACT

BORDIN, A. R. V. **Study of the shelf life of chitosan stored at different flasks through colorimetry and dentine microhardness.** 2014. 55p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

The aim of this study was evaluate, through the colorimetric titration method and analysis of the dentine microhardness, the shelf life of the solution of chitosan 0,2% stored in flasks of glass and plastic. Thirty human superior canines had their crown discarded and the cervical portion of the root sectioned, obtaining 3 sections. The second and the third sections were divided in half and included in acrylic resin resulting in 4 specimens per tooth. The chitosan solution 0,2% (pH 3,2) was prepared and distributed in 3 flasks of glass (v1, v2, v3) and in 3 of plastic (p1, p2, p3) to perform the test in triplicate. The tests of microhardness and colorimetry were performed during 6 months in the period of 0, 7, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150 and 180 days after the preparation of the solution. For the measurement of microhardness Knoop, it was used a load of 10 grams for 15 seconds. The test object received 50 μ L of the test solution for 5 minutes and after washing and drying, it was taken out for measurement. The analysis was performed with the solutions v1, p1, EDTA 17% and distilled water (control); v2, p2, EDTA 17% and control; v3, p3, EDTA 17% and control, for each proposed time. Three indentations were performed with a 200 μ m space. Measurements were noted and filed in a database. For the colorimetric test, a standard solution of calcium carbonate 0.3% was used and a predetermined volume of chitosan solution was inserted to it by using a micropipette. The color changes observed in the carbonate solution, from violet to blue, indicated the chelation of calcium ions, detected through visible ultraviolet absorbance spectrophotometry. The instrument generated a specific value of absorbance for each coloring solution analyzed, expressed through the graphic (wavelength/absorbance). Variation of analysis was used (One-Way ANOVA) ($\alpha = 0,05$) to compare the microhardness among the solutions, the different time for each solution, as well as the interaction microhardness/time for each solution. The time of study was similar among the tested solutions ($p=0,113$), as well as the interaction between microhardness/time ($p=0,329$). The tested solutions showed, individually, the same effect over the dentine

microhardness, from time zero until 180 days. When compared among each other the results were different ($p < 0,0001$). The Tukey test demonstrated that chitosan (v1, v2, v3, p1, p2 and p3) and EDTA reduced the microhardness in a similar pattern among them ($p > 0,05$) and different from the control ($p < 0,001$). The graphics of the colorimetric analysis showed that either chitosan in glass or plastic presented medium values of absorbance in the same wave length (234nm) for all the different times, meanwhile the standard solution of calcium carbonate wavelength was 206 nm. It was concluded that independently of storing methods, the chitosan presents chelating property for a minimum period of six months.

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

INTRODUÇÃO..... 01

REVISTA DA LITERATURA 05

PROPOSIÇÃO..... 18

MATERIAL E MÉTODO..... 19

RESULTADOS..... 30

DISCUSSÃO..... 36

CONCLUSÕES..... 42

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 43

ANEXOS..... 49

INTRODUÇÃO

A quitosana é um heteropolissacarídeo natural obtida a partir da reação de desacetilação da quitina, um dos biopolímeros mais abundantes depois da celulose, e que é extraída principalmente de carapaças de caranguejo e camarão (URAGAMI et al., 2003). Suas propriedades de biocompatibilidade, biodegradabilidade, bioadesão e atoxidade ao organismo humano (SENEL et al., 2000; AKNCBAY et al., 2007), tem despertado a atenção de pesquisadores de diferentes áreas.

Nos âmbitos farmacêutico e médico a quitosana tem sido utilizada como substância anti-tumor, acelerador do processo de cicatrização de feridas, carreador para drogas e agente antibacteriano. Na biotecnologia, como carreador para enzimas e células, resina para cromatografia e matéria básica para elaboração de membranas. No setor da agricultura adotam a quitosana na conservação de sementes e como agente antimicrobiano no combate de parasitas de plantas, além

do seu uso como facilitador da absorção de ferro e cálcio e fonte de fibras nas áreas da cosmética e alimentação (JEON et al., 2000; DASH et al., 2011; ZHANG et al., 2013).

Biologicamente, a quitosana promove a redução de peso corporal por ligar-se às gorduras, colabora para o controle do colesterol, acelera a cicatrização de tecido conjuntivo, atua no processo de hemostasia e induz a formação de tecido ósseo (MUZZARELLI et al., 1994; PARK et al., 2008; WALSH et al., 2013).

Sendo uma substância natural com aplicações em diferentes segmentos da área da saúde, não tardaram há surgir estudos voltados para a ciência odontológica.

A quitosana na apresentação em gel, bem como associada à membrana colágena ou à matriz de tecido ósseo desmineralizado apresentou resultados promissores na regeneração do periodonto nos casos de defeitos intra-ósseos (PARK et al., 2003; BOYNUEGRI et al. 2009).

Como medicação intra-canal promove a liberação prolongada de íons cálcio quando utilizada como veículo no preparo da pasta de hidróxido de cálcio, além de impedir a formação de biofilme na interface cimento/dentina quando incorporado no cimento endodôntico (BALLAL et al., 2010; Da SILVA et al., 2012).

O gel de quitosana 2% associado ao gel de clorexidina 2% apresenta atividade antibacteriana contra *Candida albicans* e *Enterococcus faecalis*, de forma mais eficiente que a aplicação das substâncias isoladamente (BALLAL et al., 2009). A incorporação do polissacarídeo a um agente de união auto-condicionante aumentou, significativamente, o efeito antibacteriano do composto sem alterar a propriedade de adesão (ELSAKA; ELNAGHY, 2012). Quando associada à resina composta conferiu ao compósito propriedade antibacteriana contra *Streptococcus*

mutans sem interferir, no entanto, nas propriedades mecânicas do material (KIM; SHIN, 2013). Estudo recente utilizou partículas de quitosana para a inibição do crescimento de patógenos e na modulação da resposta inflamatória em fibroblastos gengivais humanos (ARANCIBIA et al., 2013). A incorporação da quitosana ao enxaguatório bucal interferiu na aderência de microrganismos e impediu a formação de biofilme (COSTA et al., 2014).

Nota-se pelo exposto que a aplicação da quitosana no meio odontológico tem se expandido rapidamente diante das diferentes especialidades. Na endodontia, o efeito quelante do polissacarídeo chamou atenção dos pesquisadores, visto que a quitosana possui alta afinidade por vários íons metálicos em condições ácidas (KURITA, 1998). Tal informação fomentou a possibilidade dessa substância ser uma alternativa bastante viável à utilização do EDTA, devido ao fato desse ácido ser considerado poluente (SPANÓ et al., 2009).

Trabalhos mostraram que a quitosana promove a desmineralização do tecido dentinário de forma semelhante ao EDTA, além de apresentar capacidade de limpeza das paredes do canal radicular equivalente aos ácidos cítrico e diaminotetracético (SILVA et al., 2012a; PIMENTA et al., 2012). A capacidade quelante da quitosana foi verificada mesmo com a substância utilizada em baixíssima concentração e por curto período de tempo (SILVA et al., 2012b)

A eficiência dos agentes desmineralizantes esta associada ao tempo de aplicação, pH, concentração da substância e à quantidade de solução disponível (CRUZ-FILHO et al., 1996; ÇALT; SERPER, 2002; HÜLSMANN et al., 2003). No entanto, sabe-se que independentemente de qualquer fator que por ventura possa

interferir nas propriedades de determinada substância, essa quando empregada fora do prazo de validade, geralmente não atinge o resultado esperado.

A quitosana por se tratar de um políssacarídeo biodegradável torna-se interessante conhecer o seu *shelf life*, com intuito de identificar seu prazo de validade, proporcionando maior segurança e confiabilidade na utilização dessa substância em pesquisas futuras.

REVISTA DA LITERATURA

Devido a carência de trabalhos sobre o “shelf-life” de soluções quelantes utilizadas na Odontologia, neste capítulo foram listados alguns dos artigos que abordaram às propriedades físico-químicas, características e finalidades de uso da quitosana, bem como estudos sobre o efeito de agentes desmineralizantes sobre a microdureza dentinária. Tais referências bibliográficas foram utilizadas para embasar e justificar o presente estudo, como também para corroborar e discutir os resultados obtidos.

Em 1990, ONSØYEN; SKAUGRUD descreveram a quitosana como sendo um polímero policatiônico natural com diferentes propriedades. Dentre suas aplicações citam o tratamento de águas com remoção de metais pesados, recuperação de metais valiosos e purificação de água potável. Na agricultura é empregada no controle de metais utilizados para o cultivo de plantas e, na indústria alimentícia, na quelação de íons ferro para a melhora do sabor de alimentos cozidos e requeijados. Salientam que as interações dos metais com a quitosana são complexas e que o grau de polimerização, a desacetilação e a distribuição dos grupos acetil na cadeia do polímero é fundamental para definir as características de interação entre a substância e o íon metálico.

No ano seguinte, KLOKKEVOLD et al. avaliaram, por meio dos tempos de sangramento e de coagulação, a capacidade de hemostasia da quitosana sobre ferimentos de coelhos. Realizaram duas incisões nos animais, das quais tratou-se uma com um preparado à base de quitosana e a outra não aplicou-se medicação. Verificaram-se os tempos de sangramento e coagulação em três momentos, a saber: no pré e pós-operatório e antes do sacrifício dos animais. As feridas tratadas com o preparado de quitosana apresentaram hemostasia 32% maior que o grupo sem medicação.

MUZZARELLI et al. (1994) estudaram o efeito de uma solução de quitosana modificada sobre defeitos ósseo, confeccionados cirurgicamente, em côndilo femoral de ovelhas. Decorridos 40 dias da intervenção visualizaram-se neoformação óssea com aspecto de nódulo mineralizado e componentes fibrosos, ao passo que no grupo controle, nenhum processo reparativo foi observado. Concluíram que a quitosana apresenta alto potencial osteo-indutor.

Em 1996, CRUZ-FILHO et al. estudaram o efeito do EDTA associado ao Cetavlon sobre a microdureza dentinária, em diferentes tempos de aplicação. Os autores verificaram que o efeito da solução ocorre no primeiro minuto de aplicação e que a microdureza dentinária é reduzida em função do tempo de ação do agente quelante.

KURITA (1998), em seus trabalhos relacionados à solubilidade da quitina e susceptibilidade à lisozima, observaram que vários grupamentos podem ser introduzidos às estruturas químicas da quitina e quitosana, melhorando suas propriedades. Dentre os derivados de quitina obtidos, a β -quitina apresentou-se melhores resultados que a usual α -quitina.

GUIBAL et al. (1999) realizaram um estudo esclarecedor, por meio de vários procedimentos analíticos, sobre a forma pela qual ocorre o mecanismo de absorção da quitosana com íons molibdênio. Comentaram que embora as funções amina sejam os principais locais de interação com os diferentes metais, outros grupos funcionais podem estar envolvidos. Salientaram que devido a grande variedade de molibdênio polinuclear hidrolisado, a absorção pela quitosana pode envolver várias unidades resultando em ligações adicionais entre as cadeias poliméricas.

Em 2000, GUIBAL et al., seguindo a mesma linha de pesquisa, analisaram o processo de interação entre o molibidênio e quitosana, bem como os fatores que interferem nessa reação. Verificaram que a ligação entre ambas substâncias caracteriza-se pela “ancoragem” dos íons molibidênio nos grupos amino da quitosana. Ressaltaram que a reação depende do íon metálico, sua estrutura química e do pH da solução.

No mesmo ano, JEON et al. afirmaram que a quitosana possui várias propriedades funcionais de grande interesse. Justificaram tal afirmação baseados

nas atividades biológicas da substância e nas potenciais aplicações voltadas para as indústrias alimentar, farmacêutica, agrícola e ambiental. Destaque para as áreas farmacêutica e médica, nas quais desfruta-se das propriedades antibacteriana, anti-tumor e cicatrizante da quitosana; na biotecnologia, onde a substância é utilizada como matéria prima para membranas; meio ambiente, no tratamento de água; agricultura, visto à atividade antimicrobiana contra parasitas de plantas; e no setor de cosméticos e alimentação, devido à fonte de fibras.

Ainda em 2000, SENEL et al. relataram que a quitosana é um biomaterial bastante interessante para a Odontologia, e reforçaram que a substância é dotada de propriedades de biocompatibilidade, biodegradabilidade, bioadesão e atoxidade diante do organismo humano.

NOGUEIRA et al. (2001) verificaram a validação de estabilidade de diversas soluções químicas correntes utilizadas em laboratórios analíticos. Observaram que a solução de EDTA 0,1M apresenta estabilidade química acima de 6 meses, no entanto, a estabilidade diminui para menos de 3 meses quando a molaridade do quelante é reduzida para 0,01M. Os autores salientaram que o presente estudo é considerado pioneiro, visto que para a maioria dos laboratórios químicos não há documentação ou protocolo que estabeleçam prazos de validade para as soluções analíticas.

RHAZI et al. (2002) estudaram o grau de afinidade da quitosana por diferentes íons metálicos. Notaram que o agente quelante apresenta maior susceptibilidade para a seguinte sequência de íons: $\text{Cu (II)} \geq \text{Hg (II)} > \text{Zn (II)} > \text{Cd (II)} > \text{Ni (II)} > \text{Co (II)}$, $\text{Ca (II)} > \text{Eu (III)} \geq \text{Nd (III)} > \text{Pr (III)}$. Salientaram que a seletividade parece não apresentar relação com o tamanho e dureza dos íons, independentemente da forma de apresentação da quitosana (pó ou solução).

VOGEL (2002) descreve em seu livro que o EDTA é um poderoso agente complexante e facilmente obtido comercialmente. Ressalta que, em geral, os complexos de EDTA com íons metálicos com o número de carga 2 são estáveis em soluções alcalinas ou ligeiramente ácidas (pH 4-10), enquanto os complexos com íons de número de carga 3 ou 4 existem em soluções com acidez muito mais elevada (pH 1-3).

No mesmo ano, ÇALT; SERPER verificaram a ação da solução de EDTA na remoção da *smear layer* e seu efeito na estrutura dentinária. Seis dentes unirradiculares foram instrumentados e a porção referente ao terço médio cortada, longitudinalmente em dois segmentos iguais. Foram utilizados 10 mL de EDTA 17% para irrigação das metades pertencentes à mesma raiz, durante 1 e 10 minutos, respectivamente. Procedeu-se a irrigação final com 10 mL de hipoclorito de sódio 5%. Os resultados evidenciaram que com apenas 1 minuto de ação, o EDTA mostrou-se eficiente na remoção da *smear layer*. A aplicação da solução durante 10 minutos promoveu erosão excessiva da dentina peri e intertubular.

PARK et al. (2003) estudaram, por meio de análise histológica, o efeito da esponja de colágeno associada à quitosana em lojas ósseas confeccionadas, bilateralmente, na mandíbula de cães. Foram adotados três grupos, a saber: G1- no qual, realizou-se apenas o retalho na região (controle); G2- terapêutica por meio de esponja de colágeno associada a um tampão de fosfato; G3- terapêutica com esponja de colágeno associada à quitosana. Decorridas 8 semanas dos procedimentos, os animais foram sacrificados e realizada a análise histológica. O grupo da quitosana apresentou os melhores resultados diante da migração do epitélio juncional, sendo diferente estatisticamente dos grupos G1 e G3 ($p < 0,05$). Quanto à quantidade de cemento regenerado e reparação do tecido ósseo, o G3 foi

mais eficiente, sendo significativamente diferente dos demais grupos. Os autores concluíram que a quitosana induziu a regeneração periodontal no tratamento de defeitos intra-ósseos com inibição apical da migração do epitélio juncional e aumento nas quantidades neoformadas de osso e cimento.

URAGAMI et al. (2003) reforçam o fato de que a quitosana é um amino polissacarídeo obtida por meio do processo de desacetilação da quitina e, salientam que a substância pode ser utilizada para diferentes finalidades.

HÜLSMANN et al. (2003), por meio de revisão bibliográfica, descreveram o emprego e função das principais soluções quelantes empregadas na Endodontia. Ressaltaram que os agentes quelantes possuem capacidade de desmineralizar e limpar as paredes dentinárias, além de reduzir a microdureza e aumentar a permeabilidade dentinária.

YI et al. (2005), também por meio de revisão da literatura, relataram 3 principais processo de biofabricação e de uso de materiais biológicos, ressaltando os resultados com o emprego da quitosana aminopolissacarídeo. Segundo os autores essa substância apresenta propriedades adaptadas exclusivamente para o processo de biofabricação.

RINAUDO (2006) realizou uma revisão bibliográfica referente a produção de quitina e quitosana, com enfoque nos métodos de identificação, caracterização e modificações químicas das substâncias, bem como, nas dificuldades de utilização e processamento para as diferentes aplicações. O autor ressalta que o biopolímero é utilizado no setor alimentício, de cosmética, biomédico e farmacêutico.

AKNCBAY et al. (2007) avaliaram o efeito terapêutico da solução de quitosana 1% em gel e associada ao antimicrobiano metronidazol no tratamento coadjuvante da periodontite crônica. Pacientes que apresentavam a doença

receberam, inicialmente, tratamento periodontal básico por meio de raspagem e alisamento radicular. Na sequência foram distribuídos em grupos conforme a terapêutica utilizada: G1- quitosana gel 1%; G2- quitosana gel 1% associada ao metronidazol 15%; G3- sem medicação (grupo controle). Observaram-se melhorias significativas nos parâmetros clínicos (profundidade de sondagem, recessão gengival, índice de placa, sangramento gengival) entre o início e 24 semanas após o tratamento, em todos os grupos. As reduções nos valores da profundidade de sondagem foram 1,21 mm para o G1, 1,48 mm para o G2 e 0,94 mm para o grupo controle. Os autores concluíram que a quitosana isoladamente, bem como associada ao metronidazol foi eficiente no tratamento coadjuvante da periodontite crônica.

PARK et al. (2008) avaliaram o efeito de diferentes materiais utilizados no enxerto de defeitos ósseos confeccionados em ratos. Os animais foram distribuídos em quatro grupos experimentais, conforme o material utilizado: G1- partículas de dentina de porcos; G2- partículas de dentina com sulfato de cálcio hemi-hidratado; G3- partículas de dentina com quitosana; G4- quitosana. Os roedores foram sacrificados com 2, 4 e 8 semanas após a implantação. Os resultados revelaram que todos os grupos experimentais apresentaram maior formação óssea em relação ao controle. Todos os materiais exibiram maior crescimento ósseo no período de 8 semanas. Os pesquisadores concluíram que o uso de partículas de dentina associadas à quitosana pode promover, de forma bastante satisfatória, a neoformação de tecido em defeitos intra-ósseo.

SPANÓ et al. (2009) avaliaram a capacidade de limpeza das paredes dentinárias por diferentes soluções quelantes e desmineralizantes, bem como quantificaram a concentração de íons cálcio presentes nessas soluções após o uso.

Os grupos foram distribuídos conforme o agente utilizado na irrigação final: G1- EDTA 15%; G2 - ácido cítrico 10%; G3- citrato de sódio 10%; G4- vinagre de maçã; G5 - ácido acético 5%; G6 - ácido málico 5%; G7- sem irrigação final (controle). Os autores verificaram que o EDTA 15% e o ácido cítrico 10% removeram a *smear layer* de forma semelhante entre si. As demais soluções não foram eficientes para esta finalidade. A maior quantidade de íons cálcio removidos foi observada no grupo do EDTA 15%, seguido do ácido cítrico 10%. O citrato de sódio 10% apresentou as menores quantidades do íon.

BOYNUEĞRI et al. (2009) pesquisaram o efeito da quitosana isoladamente, associada à membrana colágena e à matriz óssea, no tratamento da periodontite crônica. Após os procedimentos periodontais básico, os pacientes foram distribuídos em quatro grupos, de acordo com o tratamento coadjuvante: GA- quitosana gel 1%; GB- quitosana gel + matriz óssea desmineralizada; GC- quitosana gel + membrana de colágeno; GD– sem complementação (grupo controle). Medidas clínicas e radiográficas foram registrados no início do estudo e nos períodos de 3 e 6 meses após a cirurgia. Os resultados mostraram que, clinicamente, não foram observados diferenças entre os grupos. No entanto, os dados radiográficos revelaram que, com exceção do grupo controle, todos os demais apresentaram neoformação óssea com valores estatisticamente significantes quando comparados aos valores basais. Os autores concluíram que o gel de quitosana utilizado isoladamente ou em associação à matriz óssea desmineralizada ou à membrana colágena foi eficiente como auxiliar na regeneração óssea.

BALLAL et al. (2009) investigaram a atividade antimicrobiana da clorexidina gel 2% e quitosana gel 2%, de forma isolada e associada, contra *Candida albicans* e *Enterococcus faecalis*. Foram utilizadas para a cultura das bactérias placas de Agar

de dextrose e agar de sangue. A combinação entre clorexidina e quitosana mostrou zona inibitória máxima para *C. albicans* (25,2 mm) e *E. faecalis* (26,0 mm). O gel de clorexidina isoladamente apresentou zona inibitória intermediária (20,6 e 21,4 mm, respectivamente), ao passo que a quitosana gel, zona inibitória mínima (16,6 e 11,0 mm, respectivamente).

No ano seguinte, BALLAL et al. avaliaram, *in vitro*, o tempo de liberação de íons cálcio e as alterações de pH provocadas por medicações à base de hidróxido de cálcio com diferentes veículos. Após a biomecânica, preencheu-se o canal radicular dos espécimes com pasta de hidróxido de cálcio preparada com os seguintes veículos: G1- propilenoglicol; G2- polietilenoglicol 6000; G3- quitosana; e G4- goma. Os dentes foram armazenados em frascos de vidro de forma a permitir que apenas o terço apical ficasse imerso em água destilada. Decorrido 30 dias a solução do frasco foi coletada e analisada por meio de espectrofotômetro ultravioleta. Os resultados mostraram que a formulação com quitosana apresentou a maior liberação de íons cálcio em comparação às demais. Os autores chamam a atenção de que a quitosana apresenta-se como um veículo para a pasta, bastante promissor.

SILVA et al. (2011) analisaram, por meio da microscopia eletrônica de varredura (MEV), as alterações estruturais do recipiente de vidro quando em contato com o EDTA. A metade inferior de 4 lamínulas de vidro permaneceu submersa na solução quelante nos tempos de 30 minutos, 6 horas, 24 horas e 7 dias. Amostras imersas parcialmente em água destilada por 24 horas foram utilizadas como controle. O estudo evidenciou que as lamínulas do grupo do EDTA apresentaram formação de bolhas e rachaduras, independentemente do tempo de avaliação.

DASH et al. (2011) descreveram as principais propriedades biológicas da quitosana de interesse para a área médica, bem como as diferentes formas de aplicação para a biomedicina e setor farmacêutico.

PIMENTA et al. (2012) estudaram o efeito das soluções de quitosana 0,2%, EDTA 15% e ácido cítrico 10% sobre a microdureza da dentina radicular humana. Baseados nos resultados obtidos os autores verificaram que todas as soluções avaliadas promoveram a redução da microdureza de forma semelhante entre elas.

SILVA et al. (2012a) verificaram a capacidade de limpeza das paredes do canal radicular, após irrigação final com as soluções de EDTA 15%, quitosana 0,2%, ácido cítrico 10% e ácido acético 1%. Os pesquisadores utilizaram duas metodologias para quantificar a capacidade de desmineralização das substâncias. Numa avaliaram, por meio da MEV, a capacidade de remoção da *smear layer* dos terços médio e apical do canal radicular. Em outra, quantificaram, por meio da espectrometria de absorção atômica com chama, a concentração de íons cálcio presentes nessas soluções após suas utilizações. Observaram que as soluções de EDTA, quitosana e ácido cítrico removeram a *smear layer*, de forma semelhante entre si. Já o ácido acético não foi eficiente na limpeza das paredes dentinárias. Acrescentaram que o EDTA e quitosana removeram a maior quantidade de íons cálcio, seguidos do ácido cítrico e acético.

SILVA et al. (2012b) analisaram os efeitos da quitosana, em diferentes concentrações, na remoção da *smear layer* e na estrutura da dentina, após 3 e 5 minutos de aplicação. Doze dentes caninos superiores, recém extraídos, foram instrumentados pela técnica Crown-Down e irrigados com hipoclorito de sódio 1%. Os espécimes foram distribuídos em seis grupos conforme o tempo e a concentração da solução irrigante final: G1- quitosana 0,1% por 3 minutos; G2-

quitosana 0,2% por 3 minutos; G3- quitosana 0,37% por 3 minutos; G4- quitosana 0,1% por 5 minutos; G5- quitosana 0,2% por 5 minutos; G6- quitosana 0,37% por 5 minutos. Posteriormente, todas as amostras foram irrigadas com 10 mL de hipoclorito de sódio 1% e preparadas para avaliação em MEV. Os resultados mostraram que o G1 apresentou remoção da *smear layer*, mas não da *smear plug*. O G2 mostrou túbulos visíveis e abertos com ligeira erosão da dentina peritubular. A limpeza no G3 foi semelhante a do G2, no entanto, o efeito erosivo foi maior. No G4 houve ampliação do diâmetro dos túbulos e no G5 e G6, severa erosão com deterioração da superfície dentinária. Concluíram que a quitosana 0,2% por 3 minutos foi eficiente na remoção da *smear layer*, com menor efeito erosivo.

ELSAKA; ELNAGHY (2012) avaliaram a propriedade antibacteriana de um *primer* dentinário acrescido de quitosana. O agente auto-condicionante foi preparado com a adição de solução de quitosana nas concentrações de 0,03%, 0,06%, 0,12% e 0,25%. Utilizou-se como controle o *primer* isoladamente. A atividade antibacteriana foi avaliada por meio do teste de contato direto da substância com o meio de cultura de *Enterococcus faecalis*. Os resultados mostraram que a adição de quitosana ao RealSeal proporcionou ao adesivo potente efeito antibacteriano contra o *Enterococcus*, sem alterar a resistência de união à dentina.

ARANCIBIA et al. (2013) estudaram o efeito de partículas de quitosana diante da inibição do crescimento de patógenos periodontais e modulação da resposta inflamatória em fibroblastos gengivais. As partículas foram obtidas por meio da geleificação iônica. Verificaram que a quitosana apresentou propriedade antibacteriana contra *Porphyromonas gingivalis* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, bem como, exerceu atividade predominantemente antiinflamatória por modulação dos níveis de prostaglandinas. Ressaltaram que esse

tipo de atividade pode ser útil na prevenção ou tratamento dos quadros de inflamação do periodonto.

KIM; SHIN (2013) avaliaram o efeito antibacteriano e as propriedades mecânicas de variadas marcas de resina composta associadas à quitosana com diferente peso molecular. Colônias de *S. mutans* foram inoculadas juntamente com discos de resina e, posteriormente, mensuradas as unidades formadoras de colônias para determinação da ação inibitória. Os efeitos sobre as propriedades mecânicas dos compósitos foram avaliados por meio de 3 pontos de flexão e teste de microdureza Vickers. Os resultados mostraram que independentemente do peso molecular todas as associações entre resina composta e quitosana apresentaram efeito inibitório contra *S. mutans*. No geral não houve alteração das propriedades mecânicas.

WALSH et al. (2013), por meio de 2 experimentos com suínos, determinaram o papel da quitosana na ingestão alimentar, ganho de peso e deposição de gordura, bem como, identificaram potenciais mecanismo relacionados ao efeito anti-obesidade da substância. Pelo presente experimento os autores deixam claro que a quitosana apresenta propriedade anti-obesidade.

Da SILVA et al. (2013) analisaram a formação de biofilme na interface cimento/dentina de canais radiculares obturados com guta-percha e cimento endodôntico contendo nanopartículas de quitosana. Os resultados mostraram que a incorporação do biopolímero ao cimento de óxido de zinco e eugenol inibiu a formação de biofilme.

ZHANG et al. (2013) demonstraram que a conjugação de um antibiótico aminoglicosídeo (estreptomicina) com quitosana pode desorganizar eficientemente biofilmes já estabelecidos e inibir a formação de novos. A quitosana conjugada torna

o antimicrobiano mais acessível ao biofilme, proporcionando maior disponibilidade para interagir com as bactérias.

COSTA et al. (2014) verificaram o efeito da quitosana incorporada à um enxaguatório bucal sobre a formação de biofilmes orais. O produto elaborado pelos autores foi comparado à dois outros enxaguatórios disponíveis no mercado. Os resultados mostraram que apenas a solução contendo quitosana foi capaz de interferir na aderência de microrganismos e impedir a formação de biofilme. Salientaram que a quitosana demonstra um grande potencial antisséptico, sendo uma alternativa natural e eficiente para os bochechos tradicionais.

CARVALHO; LUSSI (2014) avaliaram o efeito de um creme dental composto de flúor, estanho e quitosana na prevenção da erosão e abrasão do esmalte dental. Os autores utilizaram 150 pré-molares humanos, os quais foram distribuídos em 5 grupos, conforme o tratamento do esmalte: G1- placebo, G2- fluoreto de sódio, G3- composto de flúor, estanho e quitosana, G4- composto de flúor, estanho e quitosana seguido do enxágue com solução de estanho, G5- creme a base de fluoreto de sódio seguido do enxágue com flúor. Concluíram que o creme dental experimental apresentaram resultados promissores com redução da perda de tecido mineral promovido pela erosão e abrasão, principalmente quando seguido do enxágue com solução de estanho.

WANG; CHEN (2014) realizaram um extenso trabalho no qual os autores descrevem e discutem a forma de preparação e caracterização da quitosana natural e modificada, bem como, de compósitos de quitosana e suas aplicações para remoção ou recuperação de metais pesados tóxicos, metais preciosos e radionuclídeos de águas contaminadas.

PROPOSIÇÃO

O objetivo do presente trabalho foi estudar, por meio da técnica de titulação colorimétrica e análise da microdureza dentinária, a capacidade de quelação da solução de quitosana 0,2% armazenada em frascos de vidro e plástico nos períodos de 0, 7, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150 e 180 dias após o seu preparo.

MATERIAL E MÉTODO

O presente estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FORP-USP), conforme número CAAE: 06846712.8.0000.5419 (anexo 1).

Foram utilizados 30 dentes caninos superiores cedidos pelo Banco de Dentes da FORP-USP. Inicialmente os espécimes passaram pelo processo de seleção e padronização da amostra, pelo qual foi investigado, por meio de exame radiográfico, presença de calcificação da câmara e ou do canal radicular e reabsorção interna.

Pelo exame visual verificou-se a existência de rizogênese incompleta, restaurações, trincas e ou fraturas, abrasões e ou atrições e presença de cárie. O espécime que apresentou um ou mais dos itens supra citados foi substituído.

Após a seleção os dentes foram acondicionados em frascos plásticos contendo solução de timol 0,1% e armazenados em geladeira a 9°C até o momento de uso.

Preparo da solução de quitosana 0,2%

A solução de quitosana foi aviada com reagente de grau analítico e água purificada por sistema de Osmose Reversa com Luz Ultravioleta (Quimis, Diadema - SP - Brasil), com condutividade elétrica inferior a 1 $\mu\text{S}/\text{mm}^2$, da seguinte forma: em um béquer com volume de 500 mL, pesou-se 0,6g de quitosana (ACROS Organics) e posteriormente, adicionaram-se 300 mL de ácido acético 1%. A mistura foi agitada por meio de agitador magnético por aproximadamente 2 horas, até que a solução apresentasse coloração homogênea e cristalina. O pH final foi de 3,2 fornecido por meio de pHmetro digital.

O volume total de 300 mL da solução obtida de quitosana 0,2% foi dividido em 6 volumes iguais (50 mL) e acondicionado em 6 frascos distintos, sendo 3 de vidro âmbar 3 de plástico branco leitoso. Os frascos de vidro (v1, v2 e v3) e de plástico (p1, p2 e p3) foram identificados por meio de etiqueta adesiva e armazenados em armário de madeira, isento de luz e à temperatura ambiente.

Preparo dos espécimes

Os dentes foram removidos do recipiente contendo solução de timol e lavados em água corrente por 24h. Na sequência, cada espécime teve sua coroa

seccionada, transversalmente, na junção esmalte-cimento por meio de disco de carburundum acoplado à peça reta do micro motor (Dabi Atlante, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil). A porção remanescente da raiz foi colocada em um molde retangular de silicone, no qual inseriu-se resina acrílica auto-polimerizável, envolvendo toda estrutura radicular. Concluída a polimerização, o bloco formado resina/raiz foi levado à máquina de corte de tecido duro (Struers A/S, Copenhagen, Dinamarca), para secção transversal da porção cervical. Durante o corte o bloco recebeu jatos de água, proporcionado pela própria máquina de corte, com intuito de evitar a queima do acrílico e da dentina.

Foram obtidos 3 cortes da porção cervical com espessuras de 1mm. Desprezou-se o primeiro corte e os dois remanescentes foram divididos em duas metades iguais, por meio de lâmina de bisturi número 15. Cada metade teve a superfície cervical umectada com vaselina líquida e inserida no centro de um dispositivo de silicone, em forma de anel, disposto sobre uma lâmina de cera utilidade. O interior do “anel” de silicone foi preenchido com resina acrílica auto-polimerizável, obtendo-se assim, 4 corpos de prova originários de um único dente (Figura 1).

Figura 1- Esquema da sequência operatória para obtenção do corpo de prova.

O experimento foi realizado em triplicata, ou seja, para cada teste utilizaram-se três amostras de um mesmo grupo. Assim, para a análise da microdureza dentinária foram confeccionados 12 corpos de prova para avaliação do efeito quelante das soluções para cada período estabelecido. Cada dente, como já mencionado, proporcionou 4 corpos de prova, dessa forma, foram utilizados 3 dentes para o teste da microdureza para cada tempo proposto. No decorrer do experimento foram programados 10 intervalos de tempo, conforme a proposição do estudo, sendo que em cada intervalo foi necessário o uso de 12 corpos de prova (3 dentes). No total foram confeccionados 120 corpos de prova, originários dos 30 dentes empregados na pesquisa (Figura 2).

Tempo	CORPOS DE PROVA UTILIZADOS		
00
07
15
30
45
60
90
120
150
180

Figura 2- Esquema da quantidade de corpos de prova utilizados na avaliação da microdureza para cada tempo proposto.

A superfície do corpo de prova, após a inclusão no “anel” metálico foi lixada com lixas d’água de granulação 400, 500 e 600 sob água corrente e, na sequência,

polida em uma politriz (Arotec, São Paulo, SP, Brasil) dotada de um disco de feltro umedecido, associado a uma pasta de alumínio (Arotec, São Paulo, SP, Brasil). A lisura da superfície do espécime foi constatada por meio de lupa com aumento de 30X. Concluída esta fase, os espécimes foram colocados em uma placa de Petri contendo gaze umedecida, até o momento da realização do teste da microdureza.

Os 4 corpos de prova oriundos do mesmo dente foram colocados sempre na mesma placa de Petri. A placa foi identificada de tal forma que cada recipiente continha 4 espécimes originários do mesmo dente. Ao final, obtiveram-se 30 placas de Petri, referente aos 30 dentes utilizados no trabalho com os respectivos corpos de prova.

Distribuição dos grupos destinados à análise da microdureza

Os grupos a serem avaliados por meio do teste da microdureza dentinária consistiram da solução de quitosana 0,2% armazenada nos 3 frascos plásticos (p1, p2 e p3) e nos 3 vidros âmbar (v1, v2 e v3), além do EDTA 17% e água destilada (controle).

Análise do efeito quelante por meio da microdureza dentinária

Por meio de micropipeta automática depositaram-se 50 µL da solução teste sobre o corpo de prova. A solução permaneceu por 5 minutos, quando então, os espécimes foram lavados em água corrente e secos com gaze. O tempo de aplicação foi quantificado por meio de cronômetro digital (Casio, Tóquio, Japão).

Para a realização do teste em triplicata procedeu-se da seguinte forma: com 4 corpos de prova provenientes de um único dente, testou-se as soluções v1, p1, o EDTA e grupo controle. Outros 4 corpos de prova de um segundo dente foram

utilizados para avaliar as soluções v2, p2, EDTA e controle. Mais 4 espécimes oriundos de um terceiro dente foram empregados para o estudo das soluções v3, p3, EDTA e controle (Figura 3).

Figura 3- Esquema dos tratamentos dos corpos de prova, em triplicata, para cada tempo estudado.

Para a mensuração da microdureza utilizou-se um microdurômetro de dureza Knoop (Shimadzu HVM-2000, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão) (Figura 4), com carga de 10 gramas durante 15 segundos. Foram obtidas, para cada espécime, 3 endentações com espaço pré-programado de 200 μm entre elas. Iniciou-se a mensuração a partir da porção de dentina mais próxima ao cimento seguindo trajetória retilínea em direção ao canal radicular (Figura 5). Os 3 valores fornecidos pelo aparelho foram anotados e somados, estabelecendo-se uma média para cada espécime, por meio das quais montou-se um arquivo de dados para cada tratamento. O protocolo descrito anteriormente referente à análise da microdureza foi realizado, sempre da mesma forma, nos períodos propostos de 0, 7, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150 e 180 dias após o aviamento da solução de quitosana 0,2%.

Figura 4- Imagem do aparelho utilizado para mensuração da microdureza dentinária.

Figura 5- Esquema das 3 endentações realizadas no corpo de prova.

Análise do efeito quelante da quitosana 0,2% por meio do teste Colorimétrico (Colorimetria)

Inicialmente, foram depositados em um recipiente de vidro (cela), 300µL de solução padrão de carbonato de cálcio 0,3% (CaCO_3). A essa solução acrescentaram-se 600µL de água deionizada, 50µL de solução tampão e 5µL de indicador de íons cálcio (negro de eriocromo T). Cada uma dessas substâncias foram adicionadas à solução de CaCO_3 com objetivos específicos. A água deionizada, por exemplo, foi acrescentada para preencher o volume mínimo de líquido da cela. Já a solução tampão mantém os íons cálcio do carbonato

disponíveis ao corante, facilitando o processo de coloração. O eriocromo T, por sua vez, promove a identificação dos íons cálcio, colorindo-os, resultando em um complexo de coloração violeta. Esta fase inicial teve como meta estabelecer a quantidade de solução de quitosana 0,2% (analito) necessária para complexar todo o cálcio compreendido no volume total da cela. A quantidade de analito foi denominada de volume padrão de quitosana, sendo obtida da seguinte forma: logo após o preparo da solução de quitosana 0,2% e antes de acondicioná-la nos frascos plásticos e nos de vidros foram depositados na cela volumes de 10 em 10 μL do quelante, por meio de uma micropipeta automática de 100 μL . O micro gotejamento foi realizado até que a solução de carbonato de cálcio, de coloração violeta, se tornasse azul, indicando quelação completa de todo íon cálcio. A alteração da coloração foi detectada por meio de espectrofotometro Ultravioleta Visível (UV/Vis), no qual adaptava-se a cela, imediatamente após cada micro gotejamento, para mensuração da absorbância (Figura 6). O volume padrão de quitosana foi determinado em 400 μL .

A análise colorimétrica preliminar, pela qual identificou-se o volume padrão foi considerado o ponto inicial para a determinação do *shelf-life* da quitosana. Assim, para cada período de tempo estipulado para o experimento (0, 7, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150 e 180 dias após o aviamento) depositavam-se 400 μL de quitosana no interior da cela contendo CaCO_3 , e levava-se o recipiente para a realização da espectrofotometria. Após cada análise da coloração da solução, o aparelho emitia um valor da absorbância, expressa por meio de gráfico (comprimento de onda/absorbância). Após a análise colorimétrica das três amostras de cada grupo (v1, v2, v3 e p1, p2, p3) realizou-se uma média dos valores de absorbância por grupo e para cada período estudado.

Análise estatística

Para análise comparativa entre os fatores de variação foram montados 3 arquivos. Um contendo as diferentes soluções, outro com os tempos propostos para análise e um terceiro com os valores médios da microdureza dentinária para os 4 grupos. A análise comparativa entre os períodos e a microdureza da dentina foi realizada utilizando-se análise de variância, por meio do software SPSS Statistic, versão 17.0.

Figura 6- Esquema do método utilizado para determinação do volume padrão de quitosana.

RESULTADOS

Os 120 dados amostrais utilizados neste experimento representam os valores médios referentes as três mensurações da microdureza Knoop da dentina (dados originais – anexos 2 a 11) obtidas para cada um dos grupos experimentais nos diferentes tempos (Tabela 1). O total de dados resulta do produto fatorial de três médias por solução (teste em triplicata), quatro soluções (quitosana armazenada em frasco de vidro, quitosana armazenada em frasco plástico, EDTA e controle) e 10 tempos: $3 \times 4 \times 10 = 120$.

As médias da Tabela 1 foram submetidas à análise estatística, por meio do software SPSS Statistic 17.0, com nível de significância de 5% ($\alpha = 0,05$). O programa evidenciou que a amostra testada apresentou distribuição normal. Tal informação aliada ao modelo matemático do experimento faculta a realização do teste paramétrico de Análise de Variância (*one-Way* ANOVA) (Tabela 2). Comparou-se por meio do referido teste a microdureza dentinária entre os diferentes grupos, os diferentes tempos para cada grupo, bem como a interação microdureza/tempo para cada grupo.

A análise de variância mostrou haver semelhança entre os grupos testados no que se refere ao tempo de estudo ($p=0,113$), bem como em relação à interação microdureza/tempo ($p=0,329$). Tal resultado evidenciou que ao longo dos 180 dias, as soluções avaliadas (quitosana em vidro, quitosana em plástico, EDTA, água) mantiveram, individualmente, o mesmo efeito sobre a microdureza da dentina. Desde o dia de aviamento das soluções (tempo zero) até 180 dias após, não houve alteração no comportamento para cada grupo isoladamente. No caso da quitosana, em particular, verificou-se que tanto o quelante armazenado em vidro quanto o acondicionado em frasco plástico mantiveram a propriedade de quelação ao longo do tempo.

Tabela 1 – Valores médios da microdureza dentinária para cada grupo conforme o tempo.

Tempo	Soluções				
		Quitosana (vidro)	Quitosana (plástico)	EDTA	Controle
00	$\bar{x} \pm DP$	35,4	37,9	29,1	42,9
		36,6	36,8	28,2	43,3
		25,3	37,8	22,8	43,0
		32,4	37,5	26,7	43,1
07	$\bar{x} \pm DP$	32,0	42,4	25,7	51,3
		26,4	20,6	20,3	41,6
		30,9	29,3	25,2	43,8
		29,8	30,8	23,7	45,6
15	$\bar{x} \pm DP$	33,6	45,3	45,8	41,3
		26,5	25,5	23,4	27,0
		20,6	23,7	31,7	32,7
		26,9	31,5	33,6	33,7
30	$\bar{x} \pm DP$	31,3	27,6	34,3	35,2
		44,7	22,7	29,5	47,8
		28,5	28,3	21,8	31,6
		34,8	26,2	28,5	38,2
45	$\bar{x} \pm DP$	28,6	24,3	29,3	38,7
		27,3	31,2	30,3	42,3
		25,9	26,6	25,7	29,4
		27,3	27,4	28,4	36,8
60	$\bar{x} \pm DP$	28,1	24,6	28,8	39,3
		26,9	29,2	29,9	40,5
		26,2	25,0	24,3	32,2
		27,1	26,2	27,7	37,3
90	$\bar{x} \pm DP$	27,6	27,3	28,8	41,8
		26,1	27,7	25,6	38,6
		26,8	22,5	23,8	34,1
		26,9	25,8	26,1	38,2
120	$\bar{x} \pm DP$	29,8	30,0	27,0	41,0
		28,3	27,9	24,1	40,7
		25,4	25,0	22,8	41,3
		27,8	27,6	24,6	41,0
150	$\bar{x} \pm DP$	32,1	35,4	32,2	42,2
		30,8	30,5	27,9	41,0
		30,4	28,2	30,8	41,0
		31,1	31,4	30,3	41,4
180	$\bar{x} \pm DP$	28,9	29,1	24,8	36,9
		31,2	30,3	28,4	41,2
		29,5	31,0	28,2	36,2
		29,8	30,2	27,1	38,1

Tabela 2 – Resultados da análise de variância.

Fontes de variação	Soma dos quadrados	Grau de liberdade	Quadrado médio	Valor de F	Valor de p
Microdureza	2534,948	3	844,983	35,303	<0,0001
Tempo	356,923	9	39,658	1,657	0,113
Microd/Tempo	730,296	27	27,048	1,130	0,329
Resíduos	1914,807	80	23,935		
Total	5536,974	119			

O teste estatístico mostrou haver diferença significativa, apenas entre a microdureza dentinária, visto que o valor de p calculado foi muito inferior a 0,05 ($p < 0,0001$). Tal resultado evidenciou que a capacidade quelante entre os grupos foi diferente um do outro. Com a finalidade de esclarecer quais dentre as soluções quelantes foram diferentes entre si, realizou-se o teste complementar de Tukey-Kramer, o qual pode ser visto na Tabela 3.

Tabela 3 – Teste de Tukey entre as soluções (comparação duas a duas).

Solução X Solução	Diferença entre as médias	Signific.
quitosana (vidro) X (plástico)	-0,067	1,000
quitosana (vidro) X EDTA	1,707	0,534
quitosana (vidro) X controle	-9,940	0,000*
quitosana (plástico) X EDTA	1,773	0,501
quitosana (plástico) X controle	-9,873	0,000*
EDTA X controle	-11,647	0,000*

(*) representa soluções estatisticamente diferentes (Valor crítico $\alpha = 0,05$)

A análise do teste complementar de Tukey-Kramer mostrou que os grupos formados pela quitosana (vidro), quitosana (plástico) e EDTA reduziram a microdureza dentinária de forma semelhante entre si ($p>0,05$), porém diferente do grupo controle ($p<0,001$).

A análise colorimétrica das soluções de quitosana resultou em dois gráficos (comprimento de onda/ absorbância). Um referente à quitosana armazenada em frasco plástico (Figura 1) e outro à armazenada em vidro (Figura 2), ambos emitidos diretamente pelo espectrofotometro UV/Vis. As médias dos valores de absorbância por período de tempo para cada uma das formas de armazenamento da quitosana podem ser vistas na Tabela 4. As médias registradas foram obtidas dos valores de absorbância verificados no mesmo comprimento de onda (234nm) para todos os tempos estudados.

Figura 7- Espectrofotometria UV/Vis das soluções de quitosana armazenada em frasco plástico nos diferentes tempos.

Figura 8- Espectrofotometria UV/Vis das soluções de quitosana armazenada em vidro nos diferentes tempos.

Tabela 4 - Médias das absorbâncias das quitosanas conforme o tempo (dias)

Tempo/ Solução	00	07	15	30	45	60	90	120	150	180
Quitosana (vidro)	3,5755	3,7706	3,3745	3,0228	3,0228	2,6999	2,5384	2,3771	1,4385	1,2178
Quitosana (plástico)	2,9300	2,6254	2,6322	2,4496	2,7544	2,4496	2,8837	2,2409	3,0027	3,0027

DISCUSSÃO

A quitina e quitosana tem sido largamente utilizadas em estudos devido as características de biodegradabilidade, biocompatibilidade e hidrofiliidade, além do fato de que provem de recurso natural renovável e abundante. Suas principais aplicações vão desde a agricultura (mecanismos defensivos e adubos para plantas), tratamento de água (remoção de íons metálicos, redução de odores), indústria alimentícia (redução de colesterol, fungicida e bactericida), indústria de cosméticos (esfoliante para pele, hidratante capilar, creme dental), biofarmacêutica (hemostático e anticoagulante), área biomédica (suturas cirúrgicas, implantes dentários, reconstituição óssea), bem como utilizados como agentes quelantes de metais, adsorventes de anions metálicos e outras aplicações (RINAUDO; DOMARD, 1989; ONSØYEN; SKAUGRUD, 1990; KLOKKEVOLD et al., 1991; GUIBAL et al., 1999;

GUIBAL et al., 2000; JEON et al., 2000; PARK, 2003; AKNCBAY et al., 2007; BOYNUEĞRI et al., 2009; CARVALHO; LUSI, 2014; WANG; CHEN, 2014).

As estruturas da quitina e da quitosana são constituída por unidades de 2-acetamido-2-deoxi-D-glicopiranoose e 2-amino-2-deoxi-D-glicopiranoose, respectivamente, unidas por ligações glicosídicas $\beta(1-4)$. A distinção básica entre ambas deve-se a substituição do grupo acetamino na posição 2 pelo grupo amino. As substâncias diferem também quanto a solubilidade, sendo a quitina insolúvel na maioria dos solventes testados, ao passo que a quitosana é solúvel em soluções aquosas diluídas de ácidos orgânicos e inorgânicos (KHOR, 2001; YI et al., 2005).

A produção de quitosana ocorre por meio do processo de desacetilação alcalina da quitina (N-acetilglucosamina), pelo qual o grupo funcional acetil da molécula da quitina é substituído pelo grupo amina. As condições dessa reação conferem a quitosana suas características principais, tais como o peso molecular médio do biopolímero, o qual varia entre 1.000.000 a 3.000.000 e o grau de desacetilação (RINAUDO, 2006). A partir de tais características determinam-se as diferentes formas de utilização da quitosana.

A partir das informações gerais e conscientização dos benefícios, importância e aplicações da quitosana, as pesquisas sobre suas características, bem como o processo de aviamento tem se tornado cada vez mais facilitado.

No presente estudo, houve a preocupação em se utilizar produto comercial com garantia de pureza e grau de desacetilação acima de 90% (Quitosana - ACROS Organics, Bélgica). O grau de pureza, solubilidade, viscosidade, grau de desacetilação e massa molecular das quitosanas comerciais variam conforme o processo de aviamento. A desacetilação homogênea da quitina resulta em quitosana

com maior capacidade de adsorção de metais (LI et al., 1992). Essa propriedade, bem como a troca iônica e a capacidade de quelação são os prováveis mecanismos responsáveis pela formação de complexos entre quitosana e íons metálicos (GUIBAL et al., 2000; RHAZI et al., 2002).

O pH da solução de quitosana 0,2% aqui avaliada foi estabelecido em 3,2. Estudos anteriores mostraram que a solução de quitosana nesta concentração e pH promove a limpeza das paredes do canal radicular e a redução da microdureza dentinária de forma semelhante ao EDTA 15% (PIMENTA et al., 2012; SILVA et al., 2012a; Silva et al., 2012b). Baseado nessa informação, no estudo do “shelf-life” da solução de quitosana 0,2% por meio da microdureza dentinária, acrescentou-se aos grupos experimentais o EDTA 15%, para efeito comparativo.

Conforme estudo sobre a validação de estabilidade de diferentes soluções analíticas, o EDTA 0,1M ($\approx 2,9\%$) mantém-se estável por um período superior a 6 meses. Quando a concentração é reduzida para 0,01M ($\approx 0,2\%$) o período de estabilidade diminui, permanecendo abaixo de 3 meses. Os autores discutem que soluções contendo o mesmo analito, mas diferente molaridade, a de menor concentração é geralmente menos estável (Boletim da SPQ, 2001). Devido a carência de estudos e da falta de obrigatoriedade legal, a maioria dos fabricantes de EDTA não estabelece o prazo de validade do produto. Dessa forma, para maior garantia da qualidade da solução, o EDTA empregado no presente experimento foi aviado por químico responsável, no Laboratório de pesquisa da própria Universidade.

A análise estatística dos resultados mostrou que o efeito quelante da solução de quitosana 0,2% armazenada em frasco plástico e de vidro foi semelhante a do EDTA 15% e diferente a do grupo controle (água destilada). A similaridade da

capacidade de desmineralização entre os agentes quelantes, durante os 180 dias de análise, permitiu concluir que a quitosana 0,2% mantém-se estável por um período de pelo menos 6 meses.

A quitosana, em condições ácidas, apresenta afinidade por vários íons metálicos incluindo Ni^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} e Cu^{2+} (KURITA, 1998). Não seria surpresa se a quitosana armazenada em frasco de vidro reagisse com a sílica comprometendo sua propriedade quelante. Porém, os resultados mostraram que no período estudado, a quitosana acondicionada nessas condições não apresentou alteração significativa em relação à capacidade de desmineralização da dentina. Paralelamente, o cuidado em se adotar embalagens plásticas para armazenar o EDTA e a recomendação do uso de seringas plásticas durante o seu emprego clínico deve-se à possível reação de quelação entre a solução e os componentes metálicos do vidro. Apesar das medidas preventivas nenhuma evidência científica comprova a existência dessa reação. Estudo prévio demonstrou que o EDTA é capaz de promover alterações estruturais no vidro, como bolhas e fissuras, no entanto, não estão comprovadas se essas modificações podem comprometer a reação de descalcificação dentinária (SILVA et al., 2011).

A ausência da reação de quelação da quitosana com o vidro pode estar relacionada com o pH, ou ainda, associada à afinidade seletiva da substância (RHAZI et al., 2002). O EDTA, por exemplo, apresenta maior afinidade por íons Ca^{+2} , Sr^{+2} , Ba^{+2} e Mg^{+2} em pH alcalino entre 8 e 10. Para os íons Pb^{+2} , Cu^{+2} , Zn^{+2} , Mn^{+2} , Al^{+2} e Sn^{+2} , o pH ideal é ligeiramente ácido, entre 4 e 6 (VOGEL, 2002). A solução de quitosana avaliada foi preparada com pH 3,2, ou seja, bastante ácido. Provavelmente nesse pH, semelhante ao que ocorre com o EDTA, a quitosana não estava no meio mais adequado para quelar os íons metálicos do vidro, como o Mg^{+2} .

e Zn^{+2} , mantendo assim seu efeito desmineralizante sobre a dentina. Como complemento, a análise colorimétrica evidenciou que tanto a quitosana armazenada em frasco plástico, quanto em vidro (Figuras 1 e 2) quelaram íons cálcio da solução de carbonato de cálcio durante os 6 meses de avaliação. Em outras palavras, o teste mostrou que a quitosana manteve sua propriedade quelante durante os 180 dias de estudo, independentemente, da forma de armazenamento.

A análise colorimétrica é o meio pelo qual determina-se a quantidade de certa substância baseado na capacidade de absorção da luz. No presente experimento utilizou-se uma solução padrão de carbonato de cálcio, a qual foi corada com eriocromo T, assumindo coloração violeta. A variação de cor desta solução para uma coloração azulada significava ausência de íons cálcio. Dessa forma, nos diferentes tempos programados para o estudo adicionava-se uma quantidade padrão de quitosana à solução de carbonato de cálcio e mensurava-se a alteração da coloração, dada em valores de absorbância, por meio do espectrofotômetro UV/Vis.

O comprimento de onda (λ) identificado pelo espectrofotômetro para a coloração violeta é de 206nm, no qual a solução de carbonato de cálcio apresenta-se com todo íons cálcio disponíveis para a quelação. Quando o cálcio da solução é quelado, a coloração passa do violeta para o azul, na qual o comprimento de onda evidenciado pelo aparelho é de 234nm. De acordo com as Figuras 1 e 2, para todos os tempos propostos visualizou-se um valor de absorbância no comprimento de onda de 234nm. Caso não houvesse a quelação do cálcio em um dos tempos propostos o aparelho emitiria uma banda com comprimento de onda igual ou muito próximo ao da cor violeta (206nm). Na Tabela 4 verifica-se que a quitosana armazenada em frasco plástico manteve sua capacidade quelante durante os 6

meses de estudo com valores médios de absorbância bastante próximos desde o tempo zero (2,93) até os 180 dias (3,00). Quando o polissacarídeo foi acondicionado em frasco de vidro, os valores médios de absorbância desde o dia do aviamento (3,57) até o final dos 6 meses (1,21), também evidenciaram estabilidade da capacidade quelante durante todo período do experimento. Vale salientar que a análise realizada foi qualitativa, o que possibilitou constatar se houve ou não quelação de íons cálcio pelas soluções testes. Os resultados visualizados por meio da colorimetria foram corroborados pelo teste de microdureza.

Baseado na metodologia empregada e nas condições do presente experimento foi possível constatar que a quitosana 0,2% mantém sua propriedade quelante sobre o tecido dentinário por um período de, pelo menos, seis meses. Tal informação, apesar de garantir o prazo de validade do produto para futuros estudos “ex vivo”, não assegura suas propriedades biológicas e nem autoriza seu uso para a terapêutica clínica.

CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos nesse estudo, pode-se concluir que:

- 1- A solução de quitosana 0,2% mantém estável seu efeito quelante sobre o tecido dentinário por um período mínimo de 6 meses.
- 2- A quitosana armazenada em embalagem plástica ou de vidro apresenta propriedade quelante semelhante, no período supra-citado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKNCBAY, H.; SENEL, S.; AY, Z. Y. Application of chitosan gel in the treatment of chronic periodontitis. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater.**, v. 80, n. 2, p. 290–296, 2007.

ARANCIBIA, R.; MATURANA, C.; SILVA, D.; TOBAR, N.; TAPIA, C.; SALAZAR, J. C.; MATÍNEZ, J.; SMITH, P. C. Effects of chitosan particles in periodontal pathogens and gingival fibroblasts. **J Dent Res.** v. 92, n. 8, p. 740–5, 2013.

BALLAL, N. V.; KUNDABALA, M.; BHAT, K. S.; ACHARYA, S.; BALLAL, W.; KUMAR, R.; PRAKASH, P. Y. Susceptibility of *Candida albicans* and *Enterococcus faecalis* to chitosan, chlorhexidine gluconate and their combination *in vitro*. **Austr Endod J.**, v. 35, n.1, p. 29–33, 2009.

BALLAL, N. V.; SHAVI, G. V.; KUMAR, R.; KUNDABALA, M.; SEETHARAMA, K. *In Vitro* Sustained Release of Calcium Ions and pH Maintenance from Different Vehicles Containing Calcium Hydroxide. **J Endod.**, v. 36, n.5, p. 862–866, 2010.

BOYNUEĞRI, D; ÖZCAN, G.; ŞENEL, S.; UÇ, D.; URAZ, A.; ÖĞÜŞ, E.; ÇAKILCI, B.; KARADUMAN, B. Clinical and radiographic evaluations of chitosan gel in periodontal intraosseous defects: a pilot study. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater.**, v. 90, n. 1, p.461-466, 2009.

ÇALT, S.; SERPER, A. Time dependent effects of EDTA on dentin structures. **J. Endod.**, v. 28, n. 1, p. 17-19, 2002.

CARVALHO, T. S.; LUSSI, A. Combined effect of a fluoride-, stannous- and chitosan-containing toothpaste and stannous-containing rinse on the prevention of initial enamel erosion-abrasion. **J. Dentistry**, In Press, 2014.

COSTA, E. M.; SILVA, S.; MADUREIRA, A. R.; CARDELLE-COBAS, A.; TAVARIA, F. K.; PINTADO, M. M. A comprehensive study into the impact of a chitosan mouthwash upon oral microorganism's biofilm formation in vitro. **Carbohydrate Polymers**, v. 101, p. 1081-1086, 2014.

CRUZ-FILHO, A. M.; SILVA, R. G.; PÉCOR, J. D. Acción Del EDTAC en La microdureza de La dentina radicular em diferentes tiempos de aplicación. **Rev. Odont. Federal Latino Americana (FOLA)**, v. 2, n. 2, p. 82-90, 1996.

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

DASH, M.; CHIELLINI, F.; OTTENBRITE, R. M.; CHIELLINI, E. Chitosan – a versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. **Progress in Polymer Science**. v. 36, p. 981-1014, 2011.

ELSAKA, S.; ELNAGHY, A. Effect of addition of chitosan to self-etching primer: antibacterial activity and push-out bond strength to radicular dentin. **J Biomed Res**. v. 26, n. 4, p. 288-94, 2012.

GUIBAL, E.; MILOT, C.; ETERRADOSSI, O.; GAUFFIER, C.; DOMARD, A. Study of molybdate ion sorption on chitosan gel beads by different spectrometric analyses. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 24, p. 49-59, 1999.

GUIBAL, E.; MILOT, C.; ROUSSY, J. Influence of hydrolysis mechanisms on molybdate sorption isotherms using on chitosan. **Separation Science and Technology**, v. 35, n. 7, p. 1021-1038, 2000.

HÜLSMANN, M.; HECKENDORFF, M.; LENNON, A. Chelating agents in root canal treatment: mode of action and indications for their use. **Int. Endod. J.**, v. 36, n. 12, p. 810-830, 2003.

JEON, Y. J.; SHAHID, F.; KIN, S. K. Preparation of chitin and chitosan oligomers and their applications in physiological functional foods. **Food Reviews International**, v. 16, n. 2, p.159-176, 2000.

KHOR E. Chitin: fulfilling a biomaterials promise. Amsterdam: Elsevier Science, 2001.

KIM, J. S.; SHIN, D. H. Inhibitory effect on *Streptococcus mutans* and mechanical properties of the chitosan containing composite resin. **Restor Dent Endod**. v. 38, n. 1, p. 36–42, 2013.

KLOKKEVOLD, P. R.; LEW, D. S.; ELLIS, D. G.; BERTOLAMI, C. N. Effect of chitosan on lingual hemostasis in rabbits. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 49, n.8, p. 858–863, 1991.

KURITA, K. Chemistry and application of chitin and chitosan. **Polymer Degradation and Stability**, v. 59, n.1-3, p. 117–120, 1998.

LI, Q.; DUNN, E. T.; GRANDMAISON, E. W.; GOOSEN, M. F. A. Applications and properties of chitosan. **Journal of Bioactive and compatible polymers**. v. 7, n. 4, p. 370-397, 1992.

MUZZARELLI, R. A.; MATTIOLI-BELMONTE, M.; TIETZ, C.; BIAGINI, R.; FERIOLI, G.; BRUNELLI, M. A.; FINI, M.; GIARDINO, R.; ILARI, P.; BIAGINI, G. Stimulatory effect on bone formation exerted by a modified chitosan. **Biomaterials**, v. 15, n.13, p. 1075–1081, 1994.

NOGUEIRA, J. M. F.; SERÓDIO, P.; AGUDO, R. Validação de estabilidade de soluções. **Boletim da Sociedade Portuguesa de Química**, v. 81, p. 51–53, 2001.

ONSØYEN, E.; SKAUGRUD, O. Metal recovery using chitosan. **J. Chem Technol Biotechnol**. v. 49, n.4, p. 395–404, 1990.

PARK, J. S.; CHOI, S. H.; MOON, I. S.; CHO, K. S.; CHAI, J. K.; KIM, C. K. Eight week histological analysis on the effect of chitosan on surgically created one-wall intrabony defects in beagle dogs. **J Clin Periodontol.**, v. 30, n. 5, p. 443–53, 2003.

PARK, S. S.; KIM, S. G.; LIM, S. C.; ONG, J. L. Osteogenic activity of the mixture of chitosan and particulate dentin. **J Biomed Mater Res A**. v. 87, n. 3, p. 618-23, 2008.

PIMENTA, J. A.; ZAPAROLLI, D.; PÉCORA, J. D.; CRUZ-FILHO, A. M. Chitosan: effect of a new chelating agent on the microhardness of root dentin. **Braz. Dent. J.**, v. 23, n. 3, p. 212-17, 2012.

RHAZI, M; DESBRIÈRES, J.; TOLAIMATE, A.; RINAUDO, M.; VOTTERO P.; ALAGUI, A.; MERAY M. EL. **European Polymer Journal**. v. 38 , p. 1523–1530, 2002.

RINAUDO, M.; DOMARD, A. Solution properties of chitosan. In: Skjak-Braek G, Anthonsen T, Sandford P, editors. Chitin and chitosan. Sources, chemistry, biochemistry, physical properties and applications. London and New York: Elsevier. p. 71–86, 1989.

RINAUDO, M. Chitin and chitosan: Properties and applications. **Prog Polym. Sci**, v. 31, n. 7, p. 603-632, 2006.

SENEL, S.; KAS, H. S.; SQUIER, C. A. Application of chitosan in dental drug delivery and therapy. In: Muzzarelli RAA, editor. **Chitosan Per os: From Dietary Supplement to Drug Carrier**. Italy: Atec, Grottammare; p. 241–256, 2000.

SILVA, B. C. B.; IRALA, L. E. D.; GRAZZIOTIN-SOARES, R.; SALLES, A. A. Verificação de alterações estruturais do vidro quando em contato com o EDTA 17%. **RSBO**. v.8, n.1, p.48-53, 2011.

SILVA, P. V.; COSTA GUEDES, D. F.; NAKADA, F. V.; PÉCORA, J. D. CRUZ-FILHO, A. M. Chitosan: a new solution for removal of smear layer after root canal instrumentation. **Int Endod J**. v.46, n.4, p.332-8, 2012a.

SILVA, P. V.; COSTA GUEDES, D. F.; PÉCORA, J. D. CRUZ-FILHO, A. M. Time-dependent effects of chitosan on dentin structures. **Braz Dent J**. v.23, n.4, p.357-61, 2012b.

SPANÓ, J. C. E.; SILVA, R. G.; GUEDES, D. F. C.; SOUSA-NETO, M. D.; ESTRELA, C.; PÉCORA, J. D. Atomic absorption spectrometry and scanning electron microscopy evaluation of concentration of calcium ions and smear layer removal with root canal chelators. **J Endod.**, v. 35, n. 5, p. 727-730, 2009.

URAGAMI, T.; YAMAMOTO, S.; MIYATA, T. Dehydration from alcohols by polyion complex cross-linked chitosan composite membranes during evaporation. **Biomacromolecules**, v. 4, n. 1, p. 137–144, 2003.

VOGEL, A. I. **Análise química quantitativa**. 6º Ed., Rio de Janeiro, LTC – livros técnicos e científicos editora SA, p. 26-27, 2002.

WALSH, A. M.; SWEENEY, T.; BAHAR, B.; O'DOHERTY, J. V. Multi-functional roles of chitosan as a potential protective agent against obesity. **PLoS One**. v. 8, n. 1, e53828, 2013.

WANG, J.; CHEN, C. Chitosan-based biosorbents: modification and application for biosorption of heavy metals and radionuclides. **Bioresource Technology**. In Press. 2014.

YI, H.; WU, L. Q.; BENTLEY, W. E.; GHODSSI, R.; RUBLOFF, G. W.; CULVER, J. N.; PAYNE, G. F. Biofabrication with chitosan. structures. **J. Endod.**, v. 28, n. 1, p. 17-19, 2002..

ZHANG, A.; MU, H.; ZHANG, W.; CUI, G.; ZHU, J.; DUAN, J. Chitosan coupling makes microbial biofilms susceptible to antibiotics. **Sci. Rep.**, v. 28, n. 3, p. 3364, 2013.

ANEXOS

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO
PRETO/ FORP/ USP

COMPROVANTE DE ENVIO DO PROJETO

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo do shelf life da quitosana armazenada em diferentes tipos de embalagem, por meio da colorimetria e análise da microdureza dentinária.

Pesquisador: ANTONIO MIRANDA DA CRUZ FILHO

Versão:

3

CAAE: 06846712.8.0000.5419

Instituição Proponente: Universidade de São Paulo

DADOS DO COMPROVANTE

Número do Comprovante: 034602/2012

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

Projeto de Pesquisa:

Tipo	Número CAAE	Título da Pesquisa	Pesquisador Responsável	Versão	Última Modificação	Situação	Gestão da Pesquisa
P	06846712.8.0000.5419	Estudo do shelf life da quitosana armazenada em diferentes tipos de embalagem, por meio da(...)	ANTONIO MIRANDA DA CRUZ FILHO	3	21/02/2014	Aprovado

Anexo 2- Dados originais da microdureza dos diferentes grupos no tempo zero

Tempo	Espécime (dente)	Grupos			
00	01	V1	P1	EDTA	controle
		33,8	34,0	23,7	39,6
		35,7	32,8	30,9	44,6
		36,8	47,0	32,8	44,6
		$\bar{x}$	35,4	37,9	42,9
	02	V2	P2	EDTA	controle
		33,8	32,8	25,0	45,0
		35,1	35,1	33,1	40,0
		41,0	42,4	26,5	45,0
		$\bar{x}$	36,6	28,2	43,3
	03	V3	P3	EDTA	controle
		24,2	33,6	16,8	46,6
		26,9	33,2	24,5	38,3
		24,7	46,6	27,1	44,2
		$\bar{x}$	25,2	22,8	43,0

Anexo 3- Dados originais da microdureza dos diferentes grupos no tempo 07

Tempo	Espécime (dente)	Grupos			
07	04	V1	P1	EDTA	controle
		28,0	38,3	22,6	53,6
		33,8	42,4	22,8	51,1
		34,3	33,6	31,6	49,2
		$\bar{x}$	32,0	25,6	51,3
	05	V2	P2	EDTA	controle
		26,2	20,3	14,8	38,4
		24,5	18,0	19,8	36,8
		28,6	23,4	26,2	49,7
		$\bar{x}$	26,4	20,2	41,6
	06	V3	P3	EDTA	controle
		32,6	27,6	30,3	45,4
		26,2	30,7	23,0	44,2
		33,8	29,6	22,2	41,7
		$\bar{x}$	30,8	25,1	43,7

Anexo 4- Dados originais da microdureza dos diferentes grupos no tempo 15

Tempo	Espécime (dente)	Grupos			
15	07	V1	P1	EDTA	controle
		33,6	43,8	43,8	40,6
		33,6	45,0	47,0	42,7
		33,6	47,0	46,6	40,6
	$\bar{x}$	33,6	45,2	45,8	41,3
	08	V2	P2	EDTA	controle
		28,0	22,2	22,4	25,5
		25,2	26,3	22,2	28,4
		26,3	28,0	25,5	27,1
	$\bar{x}$	26,5	25,5	23,3	27,0
	09	V3	P3	EDTA	controle
		19,8	26,0	30,9	33,1
		21,6	21,6	33,6	34,1
		20,5	23,4	30,7	31,0
	$\bar{x}$	20,6	23,6	31,7	32,7

Anexo 5- Dados originais da microdureza dos diferentes grupos no tempo 30

Tempo	Espécime (dente)	Grupos			
30	10	V1	P1	EDTA	controle
		33,1	26,9	33,1	34,9
		27,3	29,2	35,6	36,6
		33,6	26,7	34,3	34,1
	$\bar{x}$	31,3	27,6	34,3	35,2
	11	V2	P2	EDTA	controle
		45,7	25,3	28,2	48,8
		44,2	21,2	29,1	46,2
		44,2	21,5	31,2	48,3
	$\bar{x}$	44,7	22,6	29,5	47,7
	12	V3	P3	EDTA	controle
		26,0	29,2	20,4	33,6
		28,6	27,4	22,7	31,4
		30,9	28,2	22,2	29,8
	$\bar{x}$	28,5	28,2	21,7	31,6

Anexo 6- Dados originais da microdureza dos diferentes grupos no tempo 45

Tempo	Espécime (dente)	Grupos			
45	13	V1	P1	EDTA	controle
		29,2	23,9	29,6	40,0
		28,0	25,0	30,5	40,0
		28,6	24,0	27,8	36,0
		$\bar{x}$	28,6	29,3	38,6
	14	V2	P2	EDTA	controle
		27,3	29,8	29,8	41,5
		28,8	31,6	30,7	42,3
		25,8	32,1	30,3	43,1
		$\bar{x}$	27,3	30,2	42,3
	15	V3	P3	EDTA	controle
		25,2	25,8	25,0	30,1
		27,3	28,1	26,2	29,4
		25,1	26,0	25,9	28,7
		$\bar{x}$	25,8	25,7	29,4

Anexo 7- Dados originais da microdureza dos diferentes grupos no tempo 60

Tempo	Espécime (dente)	Grupos			
60	16	V1	P1	EDTA	controle
		28,2	24,4	28,6	40,1
		28,0	24,0	29,3	38,8
		28,1	25,3	28,4	38,9
		$\bar{x}$	28,1	28,7	39,2
	17	V2	P2	EDTA	controle
		26,4	28,8	30,1	40,2
		27,8	29,6	29,7	40,2
		26,6	29,2	30,0	41,0
		$\bar{x}$	26,9	29,9	40,4
	18	V3	P3	EDTA	controle
		26,4	24,8	24,0	32,1
		27,1	25,1	25,0	31,4
		25,0	25,0	23,9	33,0
		$\bar{x}$	26,1	24,3	32,1

Anexo 8- Dados originais da microdureza dos diferentes grupos no tempo 90

Tempo	Espécime (dente)	Grupos			
90	19	V1	P1	EDTA	controle
		27,4	28,3	29,0	42,6
		27,0	27,0	28,8	41,7
		28,4	26,5	28,6	41,2
		$\bar{x}$ 27,6	27,2	28,8	41,8
	20	V2	P2	EDTA	controle
		27,0	28,2	26,4	38,4
		27,2	28,2	24,8	39,5
		24,2	26,8	25,6	38,0
		$\bar{x}$ 26,1	27,7	25,6	38,6
	21	V3	P3	EDTA	controle
		28,0	24,0	24,4	34,5
		27,1	22,5	23,2	34,1
		25,4	21,0	23,7	33,8
		$\bar{x}$ 26,8	22,5	23,7	34,1

Anexo 9- Dados originais da microdureza dos diferentes grupos no tempo 120

Tempo	Espécime (dente)	Grupos			
120	22	V1	P1	EDTA	controle
		30,1	30,0	26,0	42,0
		29,6	28,9	26,5	41,0
		29,6	31,2	28,5	40,1
		$\bar{x}$ 29,7	30,0	27,0	41,0
	23	V2	P2	EDTA	controle
		28,9	28,1	25,1	40,8
		27,0	28,7	25,3	40,0
		28,9	26,8	22,0	41,2
		$\bar{x}$ 28,2	27,8	24,1	40,6
	24	V3	P3	EDTA	controle
		25,3	26,0	23,6	40,0
		25,0	24,2	23,0	41,1
		26,0	24,9	21,8	42,9
		$\bar{x}$ 25,4	25,0	22,8	41,3

Anexo 10- Dados originais da microdureza dos diferentes grupos no tempo 150

Tempo	Espécime (dente)	Grupos			
150	25	V1	P1	EDTA	controle
		33,2	35,6	33,4	42,0
		30,1	34,9	33,1	42,5
		33,0	35,6	30,0	42,2
		$\bar{x}$ 32,1	35,3	32,1	42,2
	26	V2	P2	EDTA	controle
		29,4	30,4	29,4	40,3
		32,0	30,0	28,0	42,3
		31,1	31,1	26,2	40,5
		$\bar{x}$ 30,8	30,5	27,8	41,0
	27	V3	P3	EDTA	controle
		30,0	28,8	28,9	41,0
		30,0	28,2	31,0	40,1
		31,2	27,6	32,4	41,8
		$\bar{x}$ 30,4	28,2	30,7	40,9

Anexo 11- Dados originais da microdureza dos diferentes grupos no tempo 180

Tempo	Espécime (dente)	Grupos			
180	28	V1	P1	EDTA	controle
		30,4	28,4	21,1	38,0
		25,4	30,8	26,6	37,8
		30,8	28,2	26,7	35,0
		$\bar{x}$ 28,8	29,1	24,8	36,9
	29	V2	P2	EDTA	controle
		30,3	30,9	28,0	40,1
		30,0	30,1	28,7	40,3
		33,3	30,0	28,5	43,3
		$\bar{x}$ 31,2	30,3	28,4	41,2
	30	V3	P3	EDTA	controle
		28,8	30,5	27,3	35,0
		30,0	32,0	27,5	34,0
		29,6	30,6	29,9	39,6
		$\bar{x}$ 29,4	31,0	28,2	36,2