

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA
E ENGENHARIA DE MATERIAIS**

Glória Tamiris Farias da Silva Furtado

**PARTÍCULAS DE QUITOSANA/FLÚOR COMO POTENCIAL APLICAÇÃO NA
ODONTOLOGIA PREVENTIVA**

Campina Grande – PB

2018

Glória Tamiris Farias da Silva Furtado

**PARTÍCULAS DE QUITOSANA/FLÚOR COMO POTENCIAL APLICAÇÃO NA
ODONTOLOGIA PREVENTIVA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais como requisito parcial à obtenção do título de **Doutor em Ciência e Engenharia de Materiais**.

Orientador: Prof. Dr. Marcus Vinicius Lia Fook

Orientador (externo): Dr. José Renato Cavalcanti de Queiroz

Agência Financiadora: CAPES

Campina Grande – PB

2018

F992p

Furtado, Glória Tamiris Farias da Silva.

Partículas de quitosana/flúor como potencial aplicação na odontologia preventiva / Glória Tamiris Farias da Silva Furtado. – Campina Grande, 2018.

66 f : il. color.

Tese (Doutorado em Ciência e Engenharia de Materiais) - Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Ciências e Tecnologia, 2018.

"Orientação: Prof. Dr. Marcus Vinicius Lia Fook, Prof. Dr. José Renato Cavalcanti de Queiroz".

Referências.

1. Quitosana. 2. Flúor. 3. Partículas de Quitosana/Flúor. 4. Odontologia Preventiva. I. Fook, Marcus Vinicius Lia. II. Queiroz, José Renato Cavalcanti de. III. Título.

CDU 351(043)

VITAE DO CANDIDATO

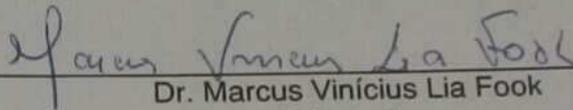
- Graduada em Engenharia de Materiais pela Universidade Federal de Campina Grande (2012).
- Especialista em Engenharia de Segurança do Trabalho pela Faculdade Mauricio de Nassau (2016).
- Mestre em Ciência e Engenharia de Materiais pela Universidade Federal de Campina Grande (2014).

GLORIA TAMIRIS DA SILVA FURTADO

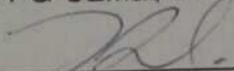
PARTÍCULAS DE QUITOSANA/FLÚOR COMO POTENCIAL APLICAÇÃO NA
ODONTOLOGIA PREVENTIVA

Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Ciência e Engenharia de
Materiais como requisito parcial à
obtenção do título de **Doutor em Ciência
e Engenharia de Materiais**.

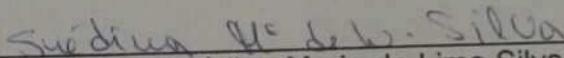
Aprovado em: 15/06/2018



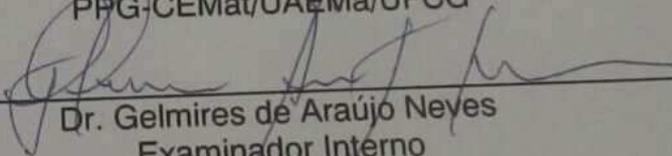
Dr. Marcus Vinícius Lia Fook
Orientador
PPG-CEMat/UFCG



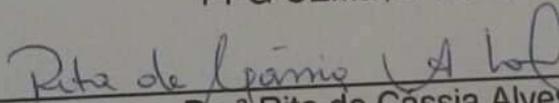
Dr. José Renato Calvalcanti de Queiroz
Orientador Externo
CCBS-UEPB



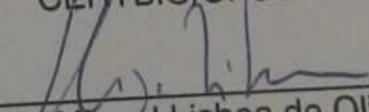
Dr.ª Suédina Maria de Lima Silva
Examinadora Interna
PPG-CEMat/UAEMA/UFCG



Dr. Gelmires de Araújo Neyes
Examinador Interno
PPG-CEMat/UAEMA/UFCG



Dr.ª Rita de Cassia Alves Leal
Examinadora Externa
CERTBIO/UFCG



Dr. Hugo Miguel Lisboa de Oliveira
Examinador Externo
UAELI/UFCG

Dedico este trabalho aos meus pais Minervino e Marinalva, a minha irmã Jéssica, e ao meu esposo Thiago pelo amor e apoio.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por me dar força, coragem e capacidade para chegar até aqui, superando todos os desafios encontrados.

A meus pais **Minervino** e **Marinalva**, pelo amor, paciência e apoio incondicional em todas as etapas da minha vida.

A toda a minha família, em especial a minha irmã **Jéssica** e meu cunhado **Felipe**, que contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional.

Ao meu amigo, companheiro e esposo, **Thiago**, por acreditar na minha capacidade para superar os desafios profissionais e pessoais, sempre me incentivando e me ajudando com muito amor e paciência.

Ao Professor Dr. **Marcus Vinicius Lia Fook**, pela orientação e oportunidade dada, confiança a mim dirigida e por ter sempre acreditado na minha capacidade para as realizações dos desafios proposto por ele.

Ao Professor **Dr. José Renato Cavalcanti de Queiroz**, pela orientação e troca de conhecimento durante toda essa caminhada.

Ao Laboratório de Avaliação e Desenvolvimento de Biomateriais do Nordeste (CERTBIO) pela oportunidade e estrutura concedida, que foram essenciais para a execução deste trabalho.

Ao Instituto de Cerâmica e Vidro (CSIC) na pessoa do Dr. Miguel Angel Rodríguez pela caracterização inicial, que foram essenciais para a execução deste trabalho.

Ao professor Dr. Hugo Miguel Lisboa Oliveira pela contribuição científica e acadêmica, ideias propostas e companheirismo.

Ao Dr. Raúl Garcia Carrodegua e Dra. Rita de Cássia Alves Leal Cruz pela contribuição científica e acadêmica.

Aos queridos amigos Isabel Rabello, Greyce Sampaio, Hugo Yves, Ivna Daniele, Luciane, Hudson, Daniel, Silvia, Bruna, Ana Carolina, Anna Silvia e Thiago pelo o apoio, incentivo, companheirismo, ajuda, contribuição, de cada um, na realização deste trabalho.

A todos os colegas do **CERTBIO** em especial, Sr.Sergio, Antônio, Katilayne, Josilene, Dona Val, Dailma, Tania, Paulinha, Rita, Pedro Queiroz, Milena, Imarally, Willams (Baú), Silvia, Daniel, Kladyson, Bruna, Kleilton,

Rossemberg, Josué, Gislaine, Vitor, Paloma, Lívia, José Wilian, Francivandi, Alecsandra e Francisco (Toninho) por todo o auxílio prestado durante o desenvolvimento deste trabalho e por todos esses anos de convivência.

À coordenação do curso de Pós-Graduação, na pessoa do Professor Dr. Romualdo Menezes.

Ao Ministério da Saúde, pelos recursos destinados ao CERTBIO, que possibilitaram a execução deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pelo suporte financeiro.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

(Martin Luther King)

RESUMO

A cárie é uma das principais causas de perda dentária, e o principal contribuinte para o desenvolvimento desta doença é o consumo excessivo de açúcares e a presença da placa bacteriana no dente. A problemática encontrada na área da odontologia é a incidência de infecções microbianas orais somadas à resistência dos agentes patogênicos ao fármaco/antibiótico e dos agentes microbianos, associado a efeitos secundários. Neste contexto, a proposta deste trabalho foi associar as propriedades da quitosana ao flúor em escala nanométrica, apontando uma perspectiva inovadora na odontologia preventiva. As partículas estudadas foram preparadas pelo método de gelificação ionotrópica, variando a adição de Tripolifosfato de sódio (TPP) (4:1; 5,8:1; 7:1) mg/mg, e a velocidade de rotação (5.000; 10.000; 15.000 e 20.000) RPM para determinar os parâmetros de processamento. Uma vez definido os parâmetros de processamento, partículas de quitosana, e Fluoreto de Sódio (NaF) (Quitosana/NaF/TPP) nas concentrações de 0,05%, 0,2% e 2% foram obtidas. Estas foram caracterizadas por FTIR, DLS, Potencial zeta, MEV, EDS, Citotoxicidade, Atividade antibacteriana e Estabilidade. Os resultados obtidos mostram partículas de quitosana/TPP com tamanhos entre 641nm-252nm, e que com o aumento da razão Q:TPP e velocidade de rotação houve redução dos tamanhos de partícula. Para as amostras quitosana/NaF/TPP o aumento da concentração de NaF resultou na redução do tamanho de partícula. Não houve modificações na morfologia das partículas, exceto para amostra com 2% de NaF. As amostras apresentaram tamanho de partícula estável durando o período estudado de 80 dias quando caracterizadas por DLS, porém, após caracterização por MEV, no período de 21 dias, todas as amostras apresentaram coalescências das partículas. As amostras com NaF indicaram a inibição do crescimento bacteriano e as amostras com 0,05% e 0,2% de NaF não são tóxicas. Assim, as partículas quitosana/NaF/TPP obtidas foram satisfatórias, sugerindo uma possível aplicação na odontologia preventiva.

Palavras-chave: Quitosana. Flúor. Partículas.

ABSTRACT

Caries is one of the main causes of tooth loss, and the main contributor to the development of this disease is the excessive consumption of sugars and the presence of plaque in the tooth. The dentistry issue is about the incidence of oral microbial infections associated to the resistance of pathogens to drug / antibiotic and microbial agents, associated with side effects. In this context, the proposal of this work was associated the properties of chitosan with fluorine at the nanoscale, pointing out an innovative perspective in preventive dentistry. The particles studied were prepared by the ionotropic gelation method, varying the addition of sodium tripolyphosphate (TPP) (4: 1; 5.8: 1; 7: 1) mg / mg, and the rotational speed (5000; 15,000 and 20,000 RPM) to determine the processing parameters. Once the processing parameters were determined, chitosan particles and NaF (NaF / TPP) at concentrations of 0.05%, 0.2% and 2% was obtained. The samples were characterized by FTIR, DLS, Zeta Potential, MEV, EDS, Cytotoxicity, Antibacterial Activity and Stability. The results obtained show chitosan / TPP particles with sizes between 641nm-252nm, and with these increase on Q: TPP ratio and spin speed, induced a reduction in particle sizes. For the chitosan / NaF / TPP samples the increase in NaF concentration resulted in the reduction of particle size. There were no changes in particle morphology, except for 2% NaF sample. The samples had a stable particle size during the studied period of 80 days when characterized by DLS, but after characterization by SEM, in the period of 21 days, all samples showed coalescence of the particles. Samples with NaF indicated inhibition of bacterial growth and samples with 0.05% and 0.2% NaF were non-toxic. Thus, the obtained chitosan / NaF / TPP particles were satisfactory, suggesting a possible application in preventive dentistry.

Keywords: Chitosan. Fluorine. Particles.

PUBLICAÇÕES

FURTADO, G. T. F. S.; FIDELES, T. B.; CRUZ, R. C. A. L.; SOUZA, J. W. L.; BARBERO, M. A. R.; FOOK, M. V. L. Chitosan/NaF particles prepared via ionotropic gelation: evaluation of particles size and morphology. **Materials Research**, v.21, n.4, 2018.

FURTADO, G.T.F.S. ; CRUZ, R. A. L. ; RODRIGUEZ, M. A. ; ALMEIDA, K. V. ; QUEIROZ, J. R. ; FOOK, M.V.L. . **Nanopartículas de quitosana: síntese e caracterização**. In 14º Congresso da Sociedade Latino Americana de Biomateriais, Orgãos Artificiais e Engenharia de Tecidos - SLABO 5ª Edição do Workshop de Biomateriais, Engenharia de Tecidos e Orgãos Artificiais - OBI, 2017. p. 487-487.

FURTADO, G. T. F. S.; FIDELES, T. B. ; LISBOA, H. M. ; RODRIGUEZ, M. A. ; FOOK, M. V. L. **Otimização da produção de partículas de Quitosana-TPP**. In: 4ª Edição do Workshop de Biomateriais, Engenharia de Tecidos e Orgãos Artificiais, 2015, Campina Grande. 4ª Edição do Workshop de Biomateriais, Engenharia de Tecidos e Orgãos Artificiais, 2015.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Partes do dente	21
Figura 2 - Os fatores etiológicos determinantes (círculo interno) e modificadores	23
Figura 3 - Esquema do desenvolvimento da cárie. (a) Diminuição do pH - desmineralização; (b) Reestabelecimento do pH- remineralização.....	24
Figura 4 - Tipos de lesão da cárie dentária.	25
Figura 5 - a) Estrutura da quitosana; (b) grupo amino sendo protonado	27
Figura 6 - Métodos para obtenção de partículas de quitosana.	30
Figura 7- Obtenção de partículas de quitosana.....	31
Figura 8 - Esquema do desenvolvimento da lesão de cárie na presença do flúor na saliva (a) Ingestão de sacarose – perda de Ca e P. (b) Presença do flúor reduzindo a desmineralização.....	36
Figura 9 - Esquema do processo utilizado para obtenção das partículas de quitosana.....	41
Figura 10 - Amostra obtidas com a razão Q/TPP (4:1, 5.8:1 e 7:1) e velocidade de rotação (5.000, 10.000, 15.000 e 20.000) RPM	47
Figura 11 - Amostra obtidas com a razão Q/TPP 4:1 com velocidade de rotação: (a) 5.000RP; (b) 10.000RPM; (c) 15.000RPM e (d) 20.000RPM.....	48
Figura 12- Espectro de FTIR das amostras SQ e SQNaOH	49
Figura 13 - Espetros de FTIR do TPP puro e das as razões Q:TPP(m/m) 4:1, 5.8:1 e 7:1 com velocidade de 10.000RPM.....	50
Figura 14 - Tamanho de partículas das amostras estudadas.....	51
Figura 15 - Espectro de FTIR das amostras S, TPP, Q, Q 0,05%, Q0,2% e Q2%.....	56
Figura 16 - Tamanho de partícula e índice de polidispersão das Amostras Q , Q0,05%, Q0,2% e Q2%	58
Figura 17 - Potencial zeta e pH das Amostras S (solução de quitosana), Q , Q0,05%, Q0,2% e Q2%	59
Figura 18 - Micrografias (10.000X) e EDS: (a) Q e (b) Q0,05%.	62
Figura 19 - Micrografias e EDS: (a) Q0,2% (20.000X) e (b) Q2%(10.000X).	62
Figura 20 - Micrografias (30.000X) e EDS de Q2.....	64

Figura 21 - Histograma do diâmetro das partículas: (a)Q; (b)Q0,05; (c)Q0.2 e (d)Q2	65
Figura 22 - Viabilidade celular das amostras S, S0,05%, S0,2%, S2% Q, Q0,05%, Q0,2% e Q2%.	67
Figura 23 - Placa inoculada com meio de cultura contendo Staphylococcus aureus ATCC 25923 para as amostras: (a) TTP, S, S0,05%, S0,2% e S2% e (b) NaF, Controle positivo, Q, Q0,05%, Q0,02% e Q2%.	68
Figura 24 - Diâmetro de partícula e IP das amostras Q, Q0,05%, Q0,2% e Q2% no período de 24h, 40 e 80 dias.....	70
Figura 25 - Diâmetro de partícula e IP das amostras Q, Q0,05%, Q0,2% e Q2% no período de 24h, 40 e 80 dias.....	71
Figura 26 - Micrografias (10.000X) e EDS após 21 dias: (a) Q e (b) Q0,05% em 21 dias.....	72
Figura 27 - Micrografias e EDS após 21 dias: (a) Q0,2%(20.000X) e (b) Q2% (10.000X) 21 dias.....	72
Figura 28 - Micrografias (30.000X) e EDS após 21 dia de Q2% em 21 dias.....	73
Figura 29 - Histograma do diâmetro das partículas após 21 dias: (a)Q; (b)Q0,05; (c)Q0.2 e (d)Q2 em 21 dias.....	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Exemplos de biomateriais disponíveis comercialmente	29
Tabela 2 - Formas de aplicação tópica do flúor.....	37
Tabela 3 - Identificações das amostras.....	42
Tabela 4 - Diâmetro médio das partículas, IP e Potencial Zeta , pH para NQ (0,14%) e NQ(0,75%).....	54

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
2.1	Dente.....	21
2.2	Cárie.....	22
2.3	Quitosana.....	26
2.4	Técnicas de fabricação de partículas.....	29
2.5	Gelificação ionotrópica.....	31
2.6	Nanopartículas de quitosana.....	34
2.7	Flúor.....	35
2.8	Nanopartículas de flúor.....	38
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	40
3.1	Materiais.....	40
3.2	Procedimentos experimentais.....	40
3.2.1	1ª Etapa - Estudo exploratório.....	40
3.2.2	2ª Etapa - Preparação das partículas de quitosana sem NaOH.....	41
3.2.3	3ª Etapa - Preparação das partículas de quitosana com flúor.....	41
3.2.4	Caracterização.....	42
4	RESULTADOS.....	47
4.1	1ª Etapa: estudo exploratório partículas de quitosana com NaOH.....	47
4.1.1	Análise visual e condições de processamento.....	47
4.1.2	Espectroscopia na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier – FTIR.....	48
4.1.3	Tamanho de partículas.....	51
4.2	2ª Etapa: estudo exploratório das partículas de quitosana sem NaOH.....	53
4.2.1	Tamanho de partícula e Potencial Zeta.....	54
4.3	3ª Etapa: partículas de quitosana com flúor.....	55
4.3.1	Espectroscopia na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier – FTIR.....	56

4.3.1	Tamanho de partícula e Potencial Zeta	58
4.3.2	Microscopia Eletronica de Varredura- MEV e Espectroscopia de raios X por Energia Dispersiva – EDS.....	61
4.3.3	Ensaio Citotoxicidade	66
4.3.4	Atividade Antibacteriana.....	67
4.3.5	Caracterização da estabilidade	70
5	CONCLUSÕES.....	76
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	78
	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	83

1 INTRODUÇÃO

Dentre as doenças que afetam a saúde bucal da população, a que mais se destaca é a cárie, devido ao consumo frequente de carboidratos fermentáveis, que contribuem para o desenvolvimento de defeitos e erosões no esmalte dentário, além da má higienização bucal, associados a fatores físicos e biológicos, tais como o fluxo e a composição da saliva, favorecendo o desenvolvimento dessa doença (Moynihan e Petersen, 2004; Keegan et al., 2012; Costa et al., 2013).

A cárie dentária é uma das principais causas da perda dentária. Para que ocorra o desenvolvimento desta doença são necessários dois componentes: bactérias e açúcares. Dentre as bactérias, o *Streptococcus mutans*, é o principal contribuinte para o desenvolvimento de doenças bucais e tem papel fundamental no início da formação do biofilme bacteriano associado à cárie (Costa et al., 2013).

O desafio em que se encontra a odontologia é a necessidade de desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos, já que há uma incidência de infecções microbianas orais, somadas à resistência dos agentes patogênicos, antibióticos e agentes microbianos, além dos efeitos secundários (Costa et al., 2013; Samiei et al., 2016).

Nesse sentido, produtos naturais têm sido estudados, com o propósito de se obter esses novos agentes, eliminando efeitos secundários e a possibilidade do uso em longo prazo na cavidade oral. Um dos produtos naturais com potencial de aplicação é o biopolímero quitosana, que é obtida de fontes renováveis, além de possuir propriedades tais como: atóxico, biocompatível, biodegradável, analgésica, coagulante, cicatrizante e possui atividade antimicrobiana (Keegan et al., 2012; Sipoli et al., 2015).

Dentre as pesquisas realizadas, as nanopartículas de quitosana têm se destacado por apresentar propriedades antibacterianas, e isso pode ser atribuída ao seu menor tamanho que confere maior área superficial e densidade de cargas (Qi et al., 2004; Antoniou et al., 2015). O método mais utilizado para obtenção dessas partículas de quitosana é a gelificação ionotrópica, que consiste em submeter a quitosana protonada, em contato com poliânions multivalentes, a qual gelifica rapidamente, devido à formação das ligações cruzadas inter e intramolecular entre o

grupo amino da quitosana com poliânions multivalentes. O poliânions multivalente que tem sido vastamente usado é o tripolifosfato de sódio (TPP) (Gan et al., 2005; Dash et al., 2011; Antoniou et al., 2015; Nguyen et al., 2017).

Para o método de gelificação ionotrópica, há diversos fatores que podem influenciar na distribuição e tamanho da partícula tais como: concentração das soluções, proporção quitosana/TPP, pH, massa molar (Antoniou et al., 2015; Sipoli et al., 2015) e condições de mistura (agitação ou sonificação) (Tsai; Bai e Chen, 2008)

Diante dessas variáveis, diversos estudos têm sido realizados a fim de investigar a influência de diferentes parâmetros relativos às partículas de quitosana/TPP. Estudos recentes relataram que ao adicionar quantidades moderadas de sal é possível obter uma distribuição do tamanho de partículas mais estreitas (Huang e Lapitsky, 2011; Jonassen; Kjønksen e Hiorth, 2012a; Nguyen, et.al, 2017)

Huang e Lapitsky (2011) investigaram a influência da adição de NaCl na obtenção de microgel de quitosana/TPP, e puderam observar que a adição de quantidades moderadas de NaCl provocou um aumento na estabilidade coloidal e obtiveram uma distribuição do tamanho de partículas mais estreitas. Antoniiou e colaboradores (2015), avaliaram a otimização das nanopartículas de quitosana pelo método de gelificação ionotrópica, e observaram que ao diluir a solução de NaCl na composição iônica, diminui o tamanho da partícula em 25%, como também resulta numa distribuição de tamanho de partícula estreita.

Outro sal monovalente que pode ser utilizado e que tem sido pouco explorado na obtenção dessas partículas é o fluoreto de sódio (NaF). O fluoreto de sódio é um agente anticárie, utilizado como uma estratégia para obter materiais dentários com propriedades antibiofilmes e capazes de liberar o flúor. Os materiais que apresentam essa atividade são: cimentos de ionômero de vidro, resina composta, pastas de dentes, dentre outros (Wang; Shen e Haapasalo, 2014; Nguyen et al., 2017), e que em altas concentrações possui efeitos bactericidas (Moynihan e Petersen, 2004; Conceição et al., 2007; Keegan et al., 2012).

Diante do exposto, ao associar as propriedades da quitosana ao flúor em escala nanométrica, apontam uma perspectiva inovadora na odontologia preventiva. Neste contexto, este trabalho se propõe a desenvolver partículas de quitosana com diferentes razões (quitosana/TPP) e caracterizá-las quanto a sua composição

química e tamanho de partícula. A partir destas, estabelecer os parâmetros para obtenção das partículas de quitosana com diferentes concentrações de fluoreto de sódio (NaF) e avaliar sua composição química, tamanho de partícula, morfologia e atividade antimicrobiana *in vitro*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Dente

Os dentes são importantes para permitir uma alimentação variada e inserção social (Arnaud, Barros Neto e Diniz, 2010; Moynihan e Petersen, 2004), sendo formados por uma estrutura rígida e de coloração branca. Do ponto de vista anatômico, é dividido em raiz e coroa, conforme apresentado na Figura 1.

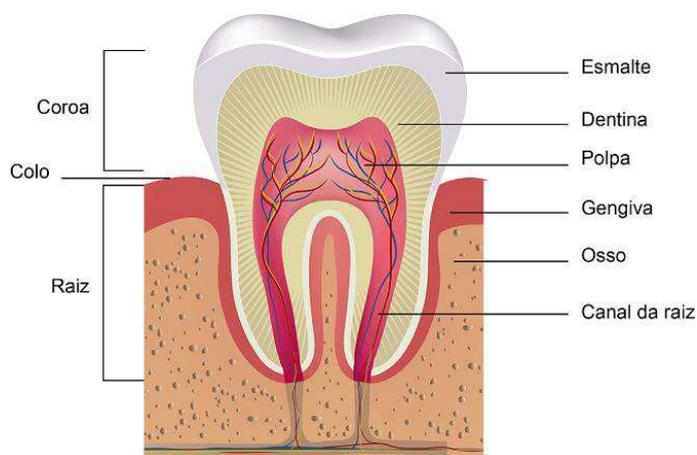


Figura 1- Partes do dente(Tamaki; Ramos e Peixinho, 2016)

A Raiz está inserida no osso, e nela encontra-se a polpa (preenchida por tecido conjuntivo, vasos sanguíneos e nervo) que é responsável pela nutrição do dente, e sob ela a dentina, a qual é extremamente sensível devido às terminações dos filetes nervosos que penetram no seu interior. A coroa é a parte visível na cavidade oral, em contato com a dentina e recobrendo toda a coroa tem-se o esmalte dentário (Lippert; Parker e Jandt, 2004; Arnaud, 2008)

O esmalte dentário apresenta 95 % de minerais, 4 % de água e 1% de matriz orgânica, é uma estrutura rígida e porosa, organizado por prismas (3-6 μm de diâmetro), que são compostos de cristais de hidroxiapatita hexagonais ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), com uma largura média de 68,3 nm, e uma espessura média de 26,3 nm, os quais são circundados por uma camada de água firmemente ligada. A presença dessa película de hidratação indica que o cristal do esmalte está eletricamente carregado. A superfície externa do esmalte é composta por uma camada fina e homogênea na qual os cristais de hidroxiapatita estão paralelos entre

si. Esta camada é dita aprismática e exibe uma dimensão em torno de 100 μm (Lippert; Parker e Jandt, 2004; Arnaud, 2008).

2.2 Cárie

A perda total dos dentes (edentulismo) afeta diretamente a qualidade de vida de crianças e adultos, pois esta reduz a capacidade mastigatória, dificulta e limita o consumo de diversos alimentos, afeta a fonação e causa danos estéticos que podem originar alterações psicológicas. Estes fatores são agravados em sociedades em que o controle da dor e tratamento, não está disponível a população e esse fator tem impulsionado estudos sobre novos métodos de prevenção (Arnaud, Barros Neto e Diniz, 2010; Barbato et al., 2007; Moynihan e Petersen, 2004).

No Brasil, a população busca os serviços de urgências odontológicas, em sua grande maioria ocasionada por dores, resultando em perda dentária, que na maioria das vezes, poderiam ser evitadas (Barbato et al., 2007). Segundo os resultados divulgados pelo Projeto SB Brasil (2010), de acordo com a classificação adotada pela Organização Mundial da Saúde - OMS, à cárie dentária, usualmente avaliada a partir do índice CPO (dentes cariados, perdido e obturado), o Brasil saiu de uma condição de média prevalência de cárie em 2003 (CPO entre 2,7 e 4,4), para uma condição de baixa prevalência em 2010 (CPO entre 1,2 e 2,6). Estas reduções estão associadas aos programas de prevenção e tratamento, apesar desses esforços a cárie ainda é a principal responsável pela perda dentaria (Brasil, 2011; Moynihan e Petersen, 2004 ;Barbato et al., 2007).

A cárie é definida como uma doença infecciosa que resulta em uma perda localizada de miligramas de minerais dos dentes afetados, causada por ácidos orgânicos provenientes da fermentação microbiana dos carboidratos da dieta e na ausência de tratamento, progride até destruir totalmente a estrutura dentária (Pereira et al., 2003; Fejerskov e Kidd, 2005; Cerqueira, 2015). O tratamento usado para essa doença é a remoção do tecido cariado seguindo de uma restauração. Este procedimento não cura a cárie já que as causas continuam a agir, e a lesão poderá progredir em qualquer sitio dos dentes. A cura realmente só irá ocorrer se o paciente souber lidar com os fatores etiológicos, (Pereira et al., 2003) apresentados na Figura 2 .

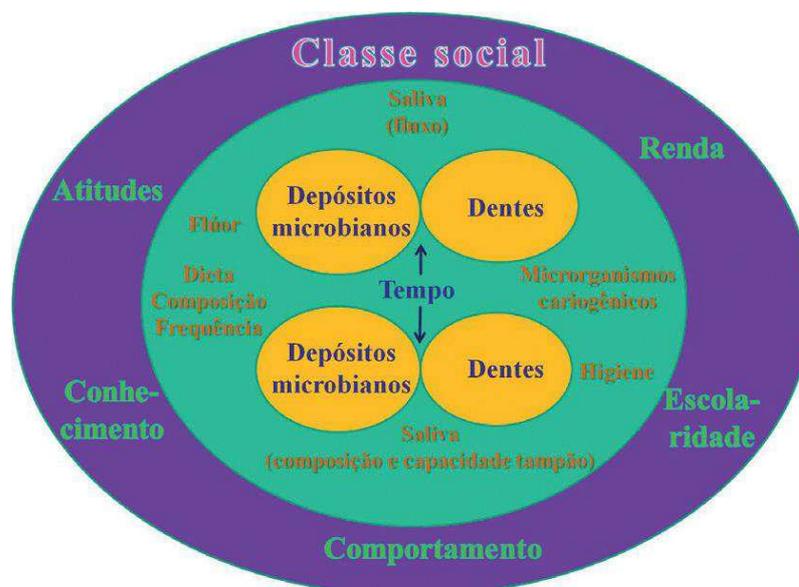


Figura 2- Os fatores etiológicos determinantes (círculo interno) e modificadores (Cerqueira, 2015)

Os fatores etiológicos determinantes que contribuem para o desenvolvimento da cárie, conforme ilustrado na Figura 2, são dietas ricas em carboidratos (sacarose, frutose, glucose), perfil das bactérias para a formação do biofilme (placa bacteriana) sensibilidade/morfologia do dente, quantidade e qualidade da saliva, e o tempo que os carboidratos estão disponíveis para a fermentação bacteriana (Moynihan e Petersen, 2004). Além dos fatores mencionados, devem-se considerar os fatores etiológicos modificadores que são o comportamento, escolaridade, renda, atitude e conhecimento, pois estudos demonstram que as diferenças nos níveis de saúde podem ser explicadas pelas diferenças socioeconômicas (Cerqueira, 2015).

O consumo frequente de carboidratos fermentáveis e na presença do biofilme, favorece a desmineralização dos tecidos duros dentais, este fenômeno ocorre quando ácidos orgânicos derivados do metabolismo bacteriano, obtidos através do metabolismo anaeróbio de carboidratos fermentáveis derivados da dieta, reduz o pH dos fluidos adjacentes resultando no aumento da solubilidade da hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$). Ao atingir o pH crítico 5.5, para o esmalte e a dentina, os mesmos perdem íons de cálcio e fosfato, conforme ilustrado na Figura 3 (a) (Pereira et al., 2003; Moynihan e Petersen, 2004; Keegan et al., 2012)

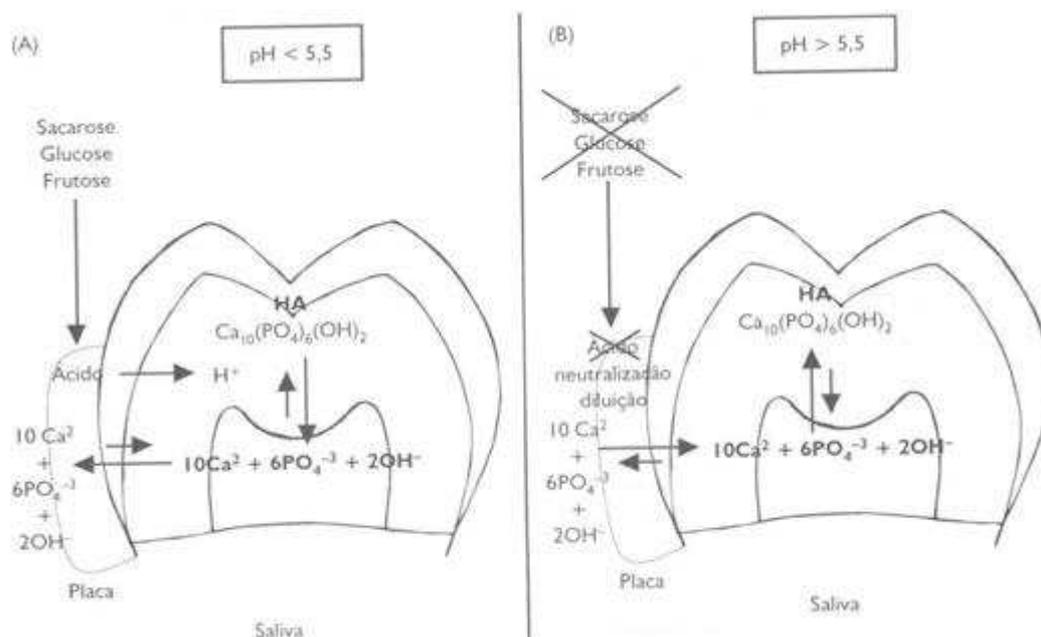


Figura 3 -Esquema do desenvolvimento da cárie. (a) Diminuição do pH -desmineralização; (b) Reestabelecimento do pH- remineralização (Pereira et al., 2003)

A saliva é uma das defesas naturais presente na boca, pois contém cálcio e fósforo supersaturados com pH 7. Ao atingir o pH crítico (5.5) a saliva tentará realizar a neutralização através da reposição dos minerais perdidos pelo dente ocorrendo a remineralização, ilustrada na Figura 3 (b). Em indivíduos saudáveis, os ácidos são neutralizados de forma rápida pela ação da saliva, e uma possível desmineralização é neutralizada e reparada (remineralizada). Este processo é contínuo e natural, desde que não haja perda mineral durante um período prolongado. No entanto, em períodos prolongados, desvia o equilíbrio, favorecendo as bactérias acidofílicas e acidogênicas, tais como, *Streptococcus mutans* e a desmineralização, o que leva a uma lesão cariosa (Moynihan e Petersen, 2004; Keegan et al., 2012). Essa lesão pode ser classificada em quatro tipos e estão exemplificadas na Figura 4 (Conceição et al., 2007):

- (a) Lesão de carie ativa: apresenta-se clinicamente opaca, rugosa, encontrada preferencialmente em locais de maior dificuldade de limpeza, podendo estar associada à gengivite.
- (b) Lesão de cárie inativa (mancha branca): pode apresentar-se pigmentada ou com coloração clara, superfície de esmalte brilhante, lisa ou polida.

- (c) Lesão da carie ativa com cavitação: coloração clara, fundo amolecido e apresentando mancha branca ativa nos bordos.
- (d) Lesão da carie inativa com cavitação: coloração escurecida, fundo endurecido a sondagem, margens definidas e sem o halo de mancha branca ativa nas bordas da cavidade.



Figura 4- Tipos de lesão da cárie dentária. Adaptação (Conceição et. al, 2007; Google, 2018)

O principal contribuinte para o desenvolvimento de doenças bucais é *Streptococcus mutans*, pois apesar de não ser o colonizador primário, tem papel fundamental no início da formação do biofilme associado à cárie. Além disso, *Streptococcus mutans* possui a capacidade de produzir exopolissacarídeos (EPS) da sacarose dietética, que atuam como pontos de fixação para outras bactérias como, *Lactobacillus acidophilus* e *Actinobacillus aggregatibacter* (Costa et al., 2013). Assim, a problemática encontrada na área da odontologia é incidência de infecções microbianas orais associadas à resistência dos micróbios patogênicos, à droga e dos agentes microbianos, logo, há uma procura para desenvolver novos produtos para combatê-las (Samiei et al., 2016).

Inúmeras substâncias foram testadas a fim de obter o controle do biofilme oral, incluindo óleos essenciais, fluoreto de amina e triclosan. O agente clorexidina é o antibiofilme mais eficaz, entretanto, tem apresentado alguns efeitos secundários como redução do paladar e pigmentação dos tecidos orais, o que limita sua

aplicação necessitando do desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos. Portanto, produtos naturais têm sido estudados para este fim, devido à ausência de efeitos secundários e a possibilidade do uso em longo prazo na cavidade oral (Costa et al., 2013). Um dos produtos naturais que tem sido pesquisado é a quitosana, a fim de atuar como agente antimicrobiano e inibidor da desmineralização do esmalte dentário (Keegan et al., 2012).

2.3 Quitosana

A quitosana é um biopolímero, extraído da casca do camarão, do caranguejo e da parede celular de leveduras, o seu uso é considerado uma estratégia promissora, por ser obtido de fontes renováveis, além de possuir propriedades que permitem sua aplicação nas áreas farmacêuticas e médicas, como: não tóxico, biocompatível, biodegradável, exibir comportamento biológico favorável, tais como bioadesão, permeabilidade, mucoadesividade e a característica físico-química interessante, onde a quitosana possui grupos funcionais potencialmente reativos como grupamentos amina (-NH₂). Além das propriedades apresentadas, possui atividade antimicrobiana, analgésica, coagulante e cicatrizante (Dash et al., 2011; Sipoli et al., 2015).

A quitosana é um polímero semicristalino, formado a partir de unidades de 2-desoxi-N-acetil-D-glucosamina e 2-desoxi-D-glucosamina ligadas por meio de ligações glicosídica β (1 \rightarrow 4) Figura 5 (a), o qual é obtido a partir da hidrólise alcalina da quitina. O grau de desacetilação (GD) da quitosana comercial geralmente é entre 70% e 95%, e o massa molecular entre 10 e 1000 kDa. Este polímero quando é submetido a um meio ácido o grupo amino da glucosamina fica carregada positivamente havendo a solubilização da mesma (Figura 5 (b)) o que possibilita o seu uso de diversas formas, como exemplos, implantes, esponjas, filmes, grânulos, xerogéis, micro e nanopartículas, (Antoniou et al., 2015; Sipoli et al., 2015) bem como, confere capacidade bioadesiva para superfícies carregadas negativamente (o esmalte dos dentes, tecido mole, membrana celular) (Arnaud; Barros Neto e Diniz, 2010), a atividade antibacteriana (Chang et al., 2015) e inibidor da desmineralização do esmalte onde o efeito protetor foi atribuído à ligação e formação de uma camada barreira no dente (Keegan et al., 2012).

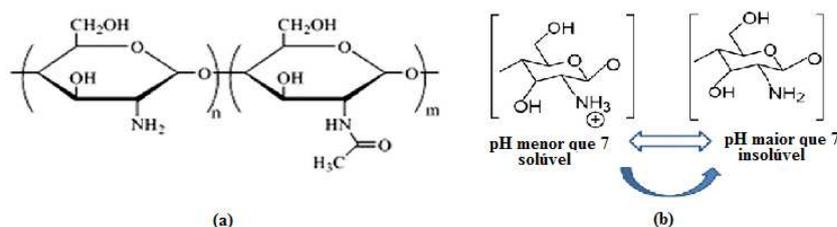


Figura 5-(a) Estrutura da quitosana; (b) grupo amino sendo protonado (Dash et al., 2011)

Estudo realizado por Qi e colaboradores (2004), sugere que a interação da quitosana com as bactérias ocorre de duas formas: (1) a quitosana interage com grupos aniônicos na superfície da bactéria e forma complexos de polieletrólito com a superfície da bactéria, formando assim uma camada sobre a célula impedindo o transporte de solutos essenciais para a célula. Outro mecanismo sugerido, (2) a quitosana poderia atuar como um agente quelante, capturando os nutrientes essenciais, de modo que inibiria o crescimento da bactéria (Qi et al., 2004).

A quitosana por apresentar baixa solubilidade em pH's acima de 6,5 sua atividade antibacteriana se dá em pH ácido. A atividade bactericida é afetada por alguns fatores tais como, grau de desacetilação, massa molar, solvente, concentração das soluções, temperatura e pH (com elevada atividade para menores valores de pH) (Chang et al., 2015; Qi et al., 2004). A quitosana apresenta um melhor desempenho antibacteriano para as bactérias Gram negativas do que para as Gram positivas (Qi et al., 2004).

Costa e colaboradores (2013) avaliaram o uso da quitosana de alta e baixa massa molar como potenciais agentes antimicrobianos orais, particularmente como agentes para o biofilme de *Streptococcus mutans*. Os resultados indicaram que a quitosana foi capaz de interferir na formação do biofilme primário, e essa ação foi observada por uma semana e não houve decréscimo na eficiência. A quitosana conseguiu inibir a formação de biofilmes compostos por diferentes microrganismos (*S. mutans* e *L. acidophilus*; *S. mutans* e *A. actinomycetemcomitans*) e atuou sobre o biofilme maduro apresentando uma redução de 94% da sobrevivência do biofilme. Dentre as massas molares estudadas, a quitosana de alto massa molar apresentou maior eficiência. Portanto, o estudo realizado evidencia o uso da quitosana como uma alternativa para aplicação antimicrobiana em saúde bucal (Costa et al., 2013).

Estudos realizados por Chang e colaboradores (2015) observaram o efeito das massas molares (300, 156, 72,1, 29,2, 7,1, e 3,3 kDa) e do pH na atividade

antibacteriana (*Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*) da quitosana preparadas por degradação de celulase de quitosana (300 kDa) e técnicas de ultrafiltração. Os resultados obtidos indicaram que a atividade antibacteriana aumenta para a quitosana de elevada massa molar e pH ácido, independente da temperatura e do tipo de bactéria. A atividade antibacteriana da quitosana aumenta à medida que o valor do pH diminui, pois a presença de mais NH_3^+ favorece a ligação com células bacterianas, causando desestabilização estrutural da bactéria (Chang et al., 2015)

Além do feito antibacteriano da quitosana, estudos realizados por Arnaud e colaboradores (2010), no qual utilizaram diferentes amostras de dentes humanos expostos a desmineralização, mostraram que os resultados obtidos para a microdureza Vickers foram maiores para as amostras tratadas com a quitosana para as concentrações de 2,5 mg / ml e 5,0 mg / ml, com melhor tempo de ação entre 60 s e 90 s. A inibição máxima da perda mineral foi de 81%. Também foi observado que a quitosana apresentou baixo efeito sobre a remineralização, entretanto houve a penetração da quitosana até a junção esmalte-dentina agindo como barreira contra a penetração do ácido, portando a quitosana pode inibir a desmineralização do esmalte dentário (Arnaud; Barros Neto e Diniz, 2010).

Uma nova área que tem sido estudada para o desenvolvimento de agentes antibacteriano é a nanotecnologia, pois com a diminuição das dimensões ao nível atômico conduz a aumento significativo na área superficial consequentemente potencializa a interação dessas partículas com o patógeno (Samiei et al., 2016).

A nanotecnologia se refere a uma ampla gama de tecnologias que mensura, manipula ou incorpora, materiais ou elementos, ou ambos, com pelo menos uma dimensão entre aproximadamente 1 e 100 nm. As aplicações exploram as propriedades distintas dos sistemas massa/macrosscópica, de componentes em nanoescala” (ASTM E2456-06-2012, 2012). A diminuição do tamanho dos materiais em escala nano, são chamados de nanomateriais, resultam no aumento da área superfície e na rugosidade da superfície, podendo gerar propriedades físico-química superiores, ou seja, propriedades mecânicas, elétricas, ópticas, magnéticas, entre outros. Portanto, como os nanomateriais têm apresentado excelentes propriedades têm sido extensivamente investigados em aplicações biomédicas (Zhang e Webster, 2009). Um dos nanomateriais que se tem destacado comercialmente conforme apresentado na Tabela 1, são as nanopartículas, logo são conceituadas como uma

sub-classificação das partículas ultrafinas (tamanho menores que 2,5 μm e maiores do que 0,1 μm) com comprimentos de duas ou três dimensões maiores do que 0.001 μm (1 nm) e menor que 0,1 μm (100 nm) e que podem ou não apresentar uma dimensão relacionada propriedade intensiva (ASTM E2456-06-2012, 2012).

Tabela 1 -Exemplos de biomateriais disponíveis comercialmente

Biomateriais			
Produto	Material	Aplicação	Empresa
Ceram X duo	Nanopartículas compósitas	Material de enchimento dentário	Dentsply (Weybridge, UK)
Mondial	Próteses dentárias contendo nanopartículas	Restauração dentária	Heraeus Kulzer (Hanau, Germany)
Ostim	Nano-hidroxiapatita	Reparação de defeitos ósseos	Osartis (Obernburg, Germany)
Acticoat	Nanopartículas de prata	Curativo anti-microbiano	Nucryst (Wakefield, MA, USA)
Tetric EvoCeram	Nanopartículas compósitas	Restauração dentária	Ivoclar Vivadent

Fonte: Guterres e Pohlmann, 2013

2.4 Técnicas de fabricação de partículas

Nos últimos anos, as técnicas de microfluído têm sido usadas para a fabricação de micro e nanopartículas poliméricas, especialmente utilizando quitosana. Os métodos usados são três tipos: coacervação, micela reversa e gelificação ionotrópica, as etapas desses métodos estão apresentados na Figura 6 (Sipoli, 2015).

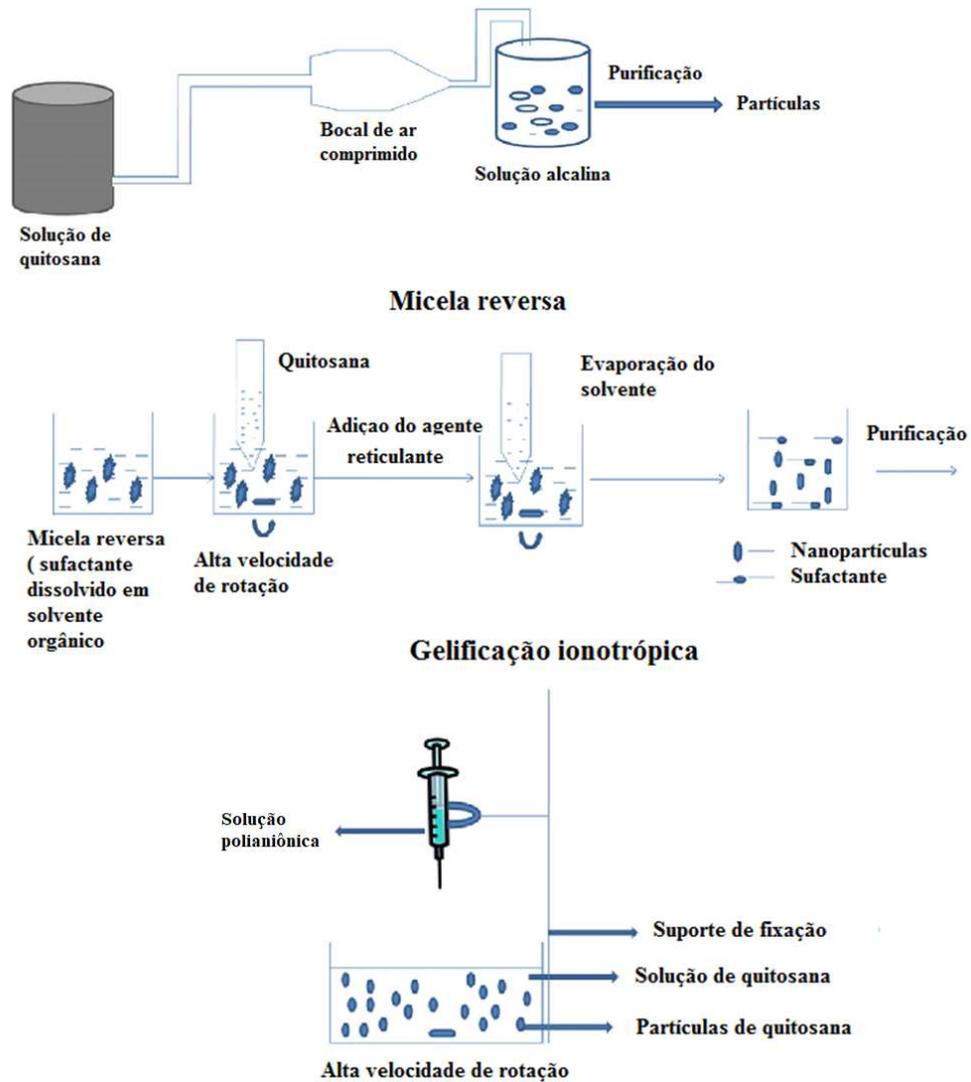


Figura 6 - Métodos para obtenção de partículas de quitosana. Adaptação (Dash et al., 2011).

O método coacervação (Figura 6), utiliza uma solução de quitosana, que é soprada por um orifício através de ar comprimido em uma solução alcalina com hidróxido de sódio ou NaOH-metanol, para formar as gotículas coacervadas. A separação e purificação das partículas são realizadas por filtração/centrifugação, seguidas por lavagens sucessivas com água quente e fria (Dash et al., 2011).

Para obter as partículas pelo método de micela reversa, o agente tensoativo é dissolvido em um solvente orgânico, em seguida é adicionado na solução de quitosana sob agitação constante. A solução transparente é obtida, um agente de reticulação é adicionado e estes permanecem sob agitação constante, até obter uma solução translúcida (Figura 6) (Dash et al., 2011).

O método de gelificação ionotrópica (Figura 6), consiste em submeter à quitosana protonada, em contato com poliânions multivalentes como CaCl_2 , ZnCl_2 e Tripolifosfato de sódio (TPP), a qual gelifica rapidamente, devido à formação das ligações cruzadas inter e intramolecular entre o grupo amino da quitosana com poliânions multivalentes, esse processo ocorre sob agitação de alta rotação formando as nanopartículas (Gan et al., 2005; Dash et al., 2011; Antoniou et al., 2015; Nguyen et al., 2017).

2.5 Gelificação ionotrópica

O método de gelificação ionotrópica é bastante utilizado, pois diminui a toxicidade dos reagentes e outros efeitos indesejáveis, já que a reticulação é por interação eletrostática que é reversível. O poliânion multivalente que tem sido vastamente usado é o tripolifosfato de sódio (TPP) por não ser tóxico, apresentar rápida capacidade de gelificação (Figura 7) (Gan et al., 2005; Dash et al., 2011; Antoniou et al., 2015) e por ser reconhecido pela U.S. Food and Drug Administration como um aditivo alimentar aceitável (Lin et al., 2008; Jonassen; Kjøniksen e Hiorth, 2012a)

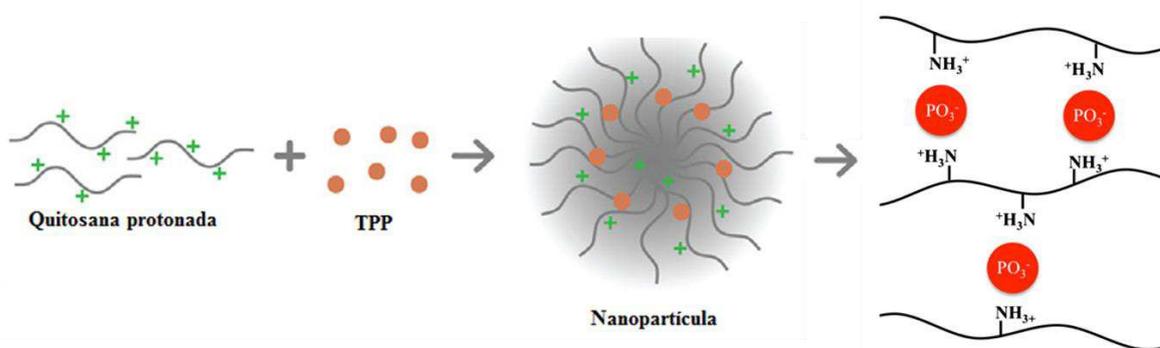


Figura 7-Obtenção de partículas de quitosana. Adaptação (Croisier e Jérôme, 2013; Antoniou et al., 2015).

Para o método de gelificação ionotrópica, há diversos fatores que podem influenciar na distribuição e tamanho da partícula, pois quando a quitosana está solubilizada há repulsão eletrostática entre as cargas ao longo das cadeias de quitosana, que afeta a flexibilidade local de modo que a cadeia tenderá a adotar uma conformação estendida, conforme apresentado na Figura 7, quando as moléculas de quitosana protonada entram em contato com o TPP, e são homogeneizadas, formam gel. Portanto, o estado inicial da quitosana na solução de ácido acético tem

um grande efeito sobre as propriedades físicas do produto final, considerando que a suspensão quitosana/TPP é um sistema metaestável, a mudança da força iônica e o valor do pH altera drasticamente o comportamento de agregação das moléculas de quitosana (Bao; Li e Zhang, 2008).

Há inúmeros fatores que influenciam nesse sistema tais como: concentração das soluções, proporção quitosana /TPP, pH, massa molar e condições de mistura (agitação ou sonificação) (Gan et al., 2005; Antoniou et al., 2015). Perante essas variáveis, diversos estudos têm sido realizados a fim de investigar a influência de diferentes parâmetros relativos às nanopartículas de quitosana/ TPP empregados em escala de laboratório, incluindo vortex e mistura manual, utilizando baixas concentrações de solução de quitosana (0,5mg/ml a 2mg/ml) (Sipoli et al., 2015).

Gan e colaboradores (Gan et al., 2005) descobriram que uma solução de concentração mais elevada de quitosana poderia levar a formação de partículas de tamanho maior. As variações de massa molar da quitosana, a concentração de quitosana, a proporção quitosana para TPP, e pH pode afetar as propriedades físico-químicas tais como, tamanho das partículas, a intensidade da carga de superfície, e a tendência de agregação da partícula. Assim, a fabricação rápida das nanopartículas quitosana pode ser atingida com propriedades pré-determinadas (Gan et al., 2005; Bao; Li e Zhang, 2008).

Outro estudo realizado por Sipoli e colaboradores (2015), investigaram a produção de nanopartículas quitosana/ TPP utilizando uma concentração elevada (5 mg/mL) de quitosana com três valores de pH diferentes (4, 5 e 5,5) em um processo escalável utilizando um reator. O menor tamanho de partícula obtido foi com o pH 4, entretanto, o índice de polidispersão foi mais elevado, já para o pH 5,5 apresentou comportamento oposto. As nanopartículas de quitosana/TPP também foram estudadas com relação à estabilidade físico-química em duas situações extremas: o aumento do pH para 7 e a adição de tampão PBS (pH 7,4) nas nanopartículas. As nanopartículas em ambos os pH's submetidas a água (pH 7,0) apresentaram aumento no tamanho de partícula e Índice de Polidispersão (IP). Para as nanopartículas produzidas em pH baixo (4 e 5) para as condições fisiológicas (PBS, pH 7,4) são estáveis por mais tempo em comparação com as produzidas em pH 5,5. Em ambos os casos, o tempo e as condições de tampão submetidas (pH 7,0 e 7,4)

são parâmetros importantes para as propriedades das nanopartículas (Sipoli et al., 2015)

Estudo realizado por Huang e Lapitsky (2012) investigaram a influência da adição de NaCl na obtenção de microgel de quitosana/TPP. Ao adicionar quantidades moderadas de NaCl aumenta a estabilidade coloidal e obtiveram uma distribuição do tamanho de partículas mais estreitas.

Antoniou e colaboradores (2015), estudaram a otimização das nanopartículas de quitosana pelo método de gelificação ionotrópica. O comportamento da partícula, em função do tamanho, Índice de Polidispersão (IP) e carga superficial foram analisados alterando os parâmetros chaves, como: massa molar (PM) da quitosana, concentração da solução de quitosana, proporção em massa quitosana/TPP, e condições externas, como: pH e salinidade (NaCl) nos processos iniciais da solução de quitosana. Para obter as nanopartículas, foram aplicados os processos de centrifugação e ultra-sonicação, com o objetivo de isolar aglomerados de nanopartículas e partículas grandes. Foram obtidas partículas com tamanhos inferiores a 120 nm as quais foram produzidas em diferentes proporções em massa quitosana/TPP, dependendo da concentração da solução de quitosana. Ao diluir a solução de NaCl na composição iônica, observou uma diminuição no tamanho da partícula em 25% e também resultou numa distribuição de tamanho de partícula estreita. O tamanho e a dispersão (IP) das nanopartículas de quitosana foram afetados pela massa molar da quitosana; concentração, proporção em massa da quitosana/TPP, pH e salinidade (NaCl) da solução inicial de quitosana. Controlando estes parâmetros, resulta no controle do tamanho e IP, oferecendo uma oportunidade para manipular e otimizar as nanopartículas. O uso da centrifugação e ultra-sonicação foi capaz de reduzir significativamente o tamanho de partícula por romper as agregações, embora a ultra-sonicação causou fragmentação severa na estrutura (Antoniou et al., 2015).

Dentre as pesquisas realizadas, as nanopartículas de quitosana tem se destacado por apresentar propriedades antibacteriana, e isso pode ser atribuída ao seu menor tamanho que confere a maior área superficial e densidade de cargas (Qi et al., 2004; Antoniou et al., 2015).

Devido à biodegradabilidade, baixa toxicidade e biocompatibilidade as nanopartículas de quitosana tem sido frequentemente desenvolvida como sistema

de entrega de compostos bioativos, tais como medicamentos, proteínas, flavonoides, óleos essenciais, e genes. Segundo alguns estudos que foram realizados para examinar a eficiência de encapsulação, perfil de liberação e atividade microbiana (Antoniou et al., 2015).

2.6 Nanopartículas de quitosana

As nanopartículas de quitosana apresentam maior atividade antibacteriana do que a quitosana em suas diferentes formas de aplicação, devido ao caráter espacial das nanopartículas (maior área superficial e densidade de carga), aliada à sua característica policatiónica, que são atraídas pela a superfície celular da bactéria que é carregada negativamente. As nanopartículas por apresentar menor tamanho podem ser adsorvidas sobre a superfície da célula da bactéria de modo a romper a membrana, conduzindo a fuga de componentes intracelulares matando a bactéria (Qi et al., 2004).

Estudos realizados por Qi e colaboradores (2004), desenvolveram nanopartículas de quitosana e nanopartículas de quitosana carregadas com cobre pelo método de gelificação ionotrópica utilizando o TPP, a fim de avaliar a atividade antibacteriana. Para o estudo eles utilizaram as nanopartículas desenvolvidas, solução de quitosana (0,5% m/v) e doxiciclina, com as seguintes bactérias: *E. coli*, *S. choleraesuis*, *S. typhimurium*, e *S. aureus*. As nanopartículas de quitosana apresentaram diâmetros menores que 40nm, e potencial zeta 51mV, já as carregadas com cobre apresentaram diâmetros médio 257nm e potencial zeta 96mV. De acordo com os dados obtidos, as nanopartículas de quitosana e as nanopartículas de quitosana carregadas com cobre apresentaram uma atividade antibacteriana mais elevada que a solução de quitosana e doxiciclina. Para algumas bactérias como *S. choleraesuis*, *S. typhimurium* e *S. aureus* as nanopartículas de quitosana apresentaram uma atividade antibacteriana maior (Qi et al., 2004).

Estudos realizados por Du e colaboradores (2009), avaliaram nanopartículas de quitosana obtidas pelo método de gelificação inotrópica e os íons metálicos, Ag^+ , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} foram incorporados em nanosuspensões respectivamente, e foram analisados o potencial zeta, tamanho de partícula e atividade antibactericida *in vitro* por concentração inibitória mínima (MIC) e concentração bactericida mínima (MBC) contra *Escherichia coli* 25922, *Salmonella choleraesuis* ATCC 50020 e

Staphylococcus aureus 25923. Os resultados obtidos indicaram que a atividade antibacteriana da quitosana aumentou com a presença dos íons metálicos com destaque para a prata com MIC de 3 e 6 µg / ml contra *E. coli* e *S. aureus*, respectivamente. Também foi possível observar que a atividade antibacteriana foi diretamente proporcional ao potencial zeta e que as bactérias Gram-negativas foram mais sensíveis à presença das nanopartículas do que as Gram-positivas, pois a carga negativa na superfície da bactéria Gram-negativa favorece a interação das bactérias com as nanopartículas.

Outros estudos utilizando nanopartículas de quitosana como carreadores de drogas antibactericida, como a clorexidina, tem sido investigado por Barreras e colaboradores (2016), onde utilizaram diferentes combinações de nanopartículas de quitosana contendo clorexidina e testaram-nas com *Enterococcus faecalis* em Culturas BHI-ágar e membranas de colágeno infectadas. Os resultados obtidos indicam que as nanopartículas de quitosana com a clorexidina agem, inibindo e eliminando significativamente as unidades formadoras de colônias em ambas as situações (Culturas BHI-ágar e membranas de colágeno infectadas) (Barreras et al., 2016).

Uma substância que tem sido bastante estudada como ação antibacteriana e também é usada como tratamento e agente preventivo da cárie, é o flúor.

2.7 Flúor

Suplementos de flúor têm sido recomendados para a prevenção de cáries por mais de três décadas. A presença do flúor na água de abastecimentos públicos e produtos orais como comprimidos, gotas com flúor, pastas de dentes, aplicação tópica por profissionais, tem exercido um efeito significativo na incidência da cárie (Moynihan e Petersen, 2004; Ismail e Hasson, 2008). A incorporação de íons antimicrobiano em diferentes composições é uma estratégia usada para obter materiais dentários com propriedades antibiofilmes. O flúor é um agente anticárie, possui efeito positivo em relação ao desenvolvimento de lesões cariosas e pode ser liberado a partir de cimentos de ionômero de vidro, resina composta, pastas de dentes, dentre outras fontes (Wanga; Shen e Haapasalo, 2013).

Em mais de 800 ensaios clínicos tem mostrado que o flúor é o agente preventivo mais eficaz contra a cárie (Moynihan e Petersen, 2004). O uso diário de

suplementos com flúor impede a cárie dentária, e há redução de 47,2 % da cárie dentária em dentes decíduos de crianças nos três primeiros anos de vida (Ismail e Hasson, 2008). Comparando os níveis de flúor na saliva dos indivíduos usando dentifrícios fluoretados (como exemplo, creme dental) é tipicamente o dobro de indivíduos usando dentifrícios sem flúor (Keegan et al., 2012).

O flúor irá atuar como um elemento cariostático, interferindo no equilíbrio dinâmico da interface entre a superfície mineral e os fluidos orais, reduzindo a tensão superficial da superfície dentária e conseqüentemente a adesão de microrganismos ao dente. Ainda, possui efeito antienzimático e antimicrobiano, pois mesmo em baixas concentrações de flúor na fase fluida em torno dos dentes, inibe o metabolismo bacteriano de açúcar, reduzindo assim a produção de ácidos através da inibição das enzimas envolvidas na glicólise, redução da síntese de protease de IgA1, rompimento da aderência bacteriana e redução da produção extracelular de polissacarídeos. E possui efeitos bactericidas em altas concentrações (Moynihan; Petersen, 2004; Keegan et al., 2012; Conceição et al., 2007).

Além das ações mencionadas, o flúor também reduz e inibe a desmineralização, pois o mesmo é incorporado na estrutura do dente desmineralizado pela substituição total ou parcial das hidroxilas da hidroxiapatita, formando compostos quimicamente mais estáveis como a fluorapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$) ou flúorhidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_{2-x}\text{F}_x$), reduzindo a solubilidade do esmalte dentário, conforme apresentado na Figura 8 (Moynihan e Petersen, 2004; Keegan et al., 2012).

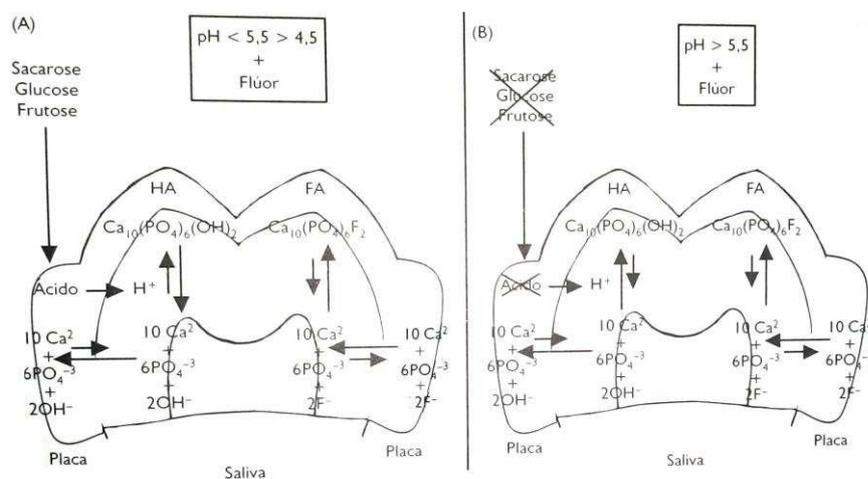


Figura 8- Esquema do desenvolvimento da lesão de cárie na presença do flúor na saliva (a) Ingestão de sacarose – perda de Ca e P. (b) Presença do flúor reduzindo a desmineralização (Pereira et al., 2003).

Embora o flúor seja tóxico, o seu uso é permissível pelo os benefícios que ele apresenta conforme mencionados, logo a dose provavelmente tóxica é 5mg/kg (Baratieri et al., 2002). Os métodos de aplicação de flúor mais utilizados pelos profissionais ou pacientes estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Formas de aplicação tópica do flúor.

Concentração de Flúor	ppm F (partes por milhão)	Apresentação
0,05% NaF (0,023% F)	230	Solução para bochecho- uso caseiro
0,1 -0,15% F	1.000 -1.500	Dentifrícios
0,2% NaF (0,091%F)	910	Solução para bochecho- uso caseiro
0,4% SnF ₂ (0,097%F)	970	Solução para bochecho- uso caseiro
0,7% NaF (0,31%F)	3.100	Verniz uso profissional
1,23%	12.300	Gel com pH ácido para aplicação profissional
2% NaF (0,90% F)	9.040	Gel com pH neutro para aplicação profissional
2% NaF (0,90% F)	9.040	Solução uso profissional
5% NaF (2,26%F)	22.600	Verniz uso profissional
8% SnF ₂ (1,94%F)	19.400	Gel- uso profissional

Fonte: (Conceição et al., 2007)

Estudos realizados por Keegan e colaboradores (2012) fabricaram micropartículas de quitosana/flúor por spray drying a fim de avaliar a utilização da quitosana como carreador de liberação controlada de flúor, utilizando o glutaraldeído como agente reticulante. As micropartículas obtidas apresentaram baixa polidispersividade e com volume médio de diâmetros menores que 6 µm. Ao duplicar as concentrações de quitosana/flúor houve um aumento no volume médio de diâmetros independente das proporções do agente reticulante. O perfil de liberação do flúor foi bifásico, nos primeiros 600s foram liberados 40-60% do fluoreto total, seguido por uma fase de liberação prolongada de 6 horas. As micropartículas podem

fornecer o aumento da absorção de fluoreto em produtos de higiene bucal para proporcionar uma maior proteção contra a cárie, no entanto necessitam de estudos *in vivo* (Keegan et al., 2012).

Pandit et al, (2011) e Sousa et al, (2009) avaliaram compósitos de resina contendo flúor e os resultados demonstraram que a libertação de flúor pode contribuir para a diminuição da composição cariogênica dos biofilmes, se uma quantidade apropriada de flúor for libertada no estágio inicial da formação do biofilme (Sousa et al., 2009; Pandit et al., 2011; Wang; Shen e Haapasalo, 2013)

2.8 Nanopartículas de flúor

A potencialidade do flúor e dos demais agentes antimicrobiano/ anti-placa que são colocados em enxaguantes bucais e pasta de dente, foram amplamente estudados. As nanopartículas surgem como potencial agente de controle de biofilmes orais que requerem recurso biocidas ou anti-adesivas (Allaker e Memarzadeh, 2014).

A obtenção de biofilmes intactos é possível pelo dispositivo modelo Leeds, esse método indica que o biofilme possui vazios e canais, que se estende completamente pela biomassa do esmalte, indicando que as nanopartículas podem penetrar/transferir pelo biofilme. A utilização de biofilmes intactos seria importante para o estudo da penetração das nanopartículas e liberação de íons. As principais características físicas e químicas das nanopartículas, incluindo carga superficial, grau de hidrofobicidade, área superficial, capacidade de serem adsorvidas e penetrarem na superfície do biofilme, portanto, as nanopartículas apresenta potencial para alterar a superfície de carga, hidrofobicidade e outras características físicas e químicas do biofilme (Allaker e Memarzadeh, 2014).

Estudo realizado por Xu e colaboradores (2008), investigaram um nanocompósito de resina dentária com nanopartículas de CaF_2 (0 a 40%), e avaliaram a propriedade mecânica pelo o ensaio de flexão e a liberação do flúor. Os resultados revelaram que os nanocompósitos desenvolvidos apresentaram uma resistência alta, bem como a liberação sustentada de flúor, uma combinação que não está disponível nos materiais atuais, portanto, estes compósitos podem produzir restaurações e reduzir a ocorrência de cáries secundárias (Xu et al., 2008).

Kulshrestha e colaboradores estudaram a capacidade das nanopartículas de fluoreto de cálcio (NP- CaF_2) sob a formação de biofilmes de *S. mutans* *in vivo* e *in vitro*. Os resultados *in vitro* revelaram uma redução de 89% e 90% da formação do biofilme e da produção do exopolisacarídeo (EPS), respectivamente, e que houve uma redução da produção de ácido da *S. mutans* na presença das nanopartículas. Para o estudo *in vivo* utilizando dente de ratos ocorreu uma redução das cáries quando comparado ao sem cáries, sugerindo que as nanopartículas de CaF_2 são candidatos ao uso tópico contra *S. mutans* afim de reduzir as caries dentárias (Kulshrestha et al., 2015).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

- Quitosana, média massa molar (150-390 KDa) com grau de desacetilação 75 – 85%, Sigma Aldrich.
- Ácido Acético, Sigma Aldrich;
- Hidróxido de sódio – PA, Vetec;
- Tripolifosfato de sódio - TPP, Sigma Aldrich;
- Fluoreto de sódio – NaF, Vetec.

3.2 Procedimentos Experimentais

3.2.1 1ª Etapa - Estudo exploratório

3.2.1.1 Preparação das partículas de quitosana com NaOH

As partículas de quitosana foram preparadas mediante a diluição do polímero em pó, em uma solução aquosa de ácido acético (0,75% v/v), sob temperatura ambiente e agitação mecânica, obtendo uma solução de quitosana de concentração final de 5 mg/ml. A esta solução foi adicionado o hidróxido de sódio a 1M para obter o pH 5.5. A solução de quitosana com pH 5.5 foi submetida a um dispersador de alta rotação (IKA ultra-turrax T25 digital) e simultaneamente, adicionado uma solução de TPP (2 mg/mL) gota-a-gota, conforme apresentado na Figura 9. Após a adição do TPP, a solução final ficou sob alta rotação por 10 minutos e mais 20 minutos em agitação magnética a 300 rpm. Posteriormente, o material foi centrifugado a 3.500 RPM por 30 minutos. A metodologia adotada é uma adaptação do método utilizado/aplicado por Sipoli e colaboradores (2015).

A fim de estabelecer os parâmetros iniciais, foram realizadas as variações na adição de TPP para obter a razão das massas (quitosana (m) /TPP (m) de 4:1; 5,8:1 e 7:1, e na velocidade (5.000, 10.000, 15.000 e 20.000) rpm. Após a obtenção das partículas, estas passaram pelas caracterizações de FTIR e DLS.

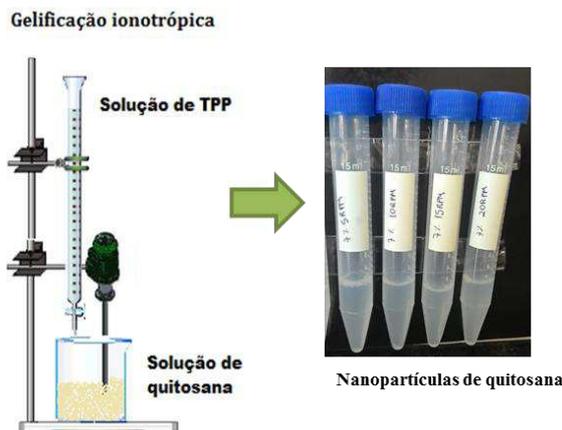


Figura 9- Esquema do processo utilizado para obtenção das partículas de quitosana.

Após essa etapa foram definidas a velocidade de rotação e a razão quitosana/TPP. Considerando os seguintes requisitos: não formar aglomerados visíveis, espuma e perda de material durante o processo, e possuir menor tamanho de partícula.

3.2.2 2ª Etapa - Preparação das partículas de quitosana sem NaOH

As partículas de quitosana foram preparadas mediante a diluição do polímero em pó, em duas soluções aquosa de ácido acético (0,75% e 0,14% v/v) sob temperatura ambiente e agitação mecânica, obtendo duas soluções de quitosana com concentração final de 5mg/ml. As soluções de quitosana foram submetidas a um dispersador de alta rotação (IKA ultra-turrax T25 digital) e simultaneamente a solução de TPP (2mg/mL) foi adicionada gota-a-gota. Após a adição total do TPP a solução final ficou sob alta rotação por 30 minutos. Posteriormente o material foi centrifugado a 3.500 RPM por 30 minutos. Após a obtenção das partículas foram caracterizadas por DLS e potencial zeta.

3.2.3 3ª Etapa - Preparação das partículas de quitosana com flúor

Após diluir o pó da quitosana em uma solução aquosa de ácido acético (0,14% v/v) sob temperatura ambiente e agitação mecânica, o fluoreto de sódio foi adicionado na solução de quitosana nas concentrações de 0,05% (230 ppm F), 0,2% (900 ppm F) e 2% (9.040 ppm F) de NaF sob agitação mecânica constante por 30 minutos. Após a realização dessa etapa, a solução de quitosana/flúor passaram pelo

processo gelificação ionotrópica para obter as partículas descrito no ponto 3.2.2, e foram submetidas à caracterização apresentadas no ponto 3.3.

As concentrações de NaF escolhidas para desenvolver esta pesquisa foram baseadas nas formas de aplicação tópica disponíveis comercialmente, apresentadas Tabela 2, solução para bochecho de uso caseiro (0,05% e 0,2% de NaF) e gel para aplicação profissional (2% de NaF).

Tabela 3 - Identificações das amostras

Amostras	Identificação
Solução de quitosana (0,14% de ácido acético)	S
Partícula de quitosana	Q
Partícula de quitosana com NaF a 0,05%	Q0,05%
Partícula de quitosana com NaF a 0,2%	Q0,2%
Partícula de quitosana com NaF a 2%	Q2%

3.2.4 Caracterização

3.2.4.1 Espectroscopia na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier – FTIR

A caracterização por FTIR foi realizada para identificar os grupos funcionais que correspondem aos níveis de energia da molécula das partículas de quitosana. As amostras foram vertidas em placas Petri (90 cm X 15 cm), congeladas um freezer (-18 °C) por 48h e liofilizadas por 48h. Utilizou-se um espectrofotômetro Spectrum 400, FT-IR/ FT-NIR Spectrometer Perkin Elmer (com resolução de 4 cm⁻¹ e 20 varreduras, e com varredura de 4000 a 650 cm⁻¹, sem a necessidade de preparação de pastilhas de KBr, por via da utilização do dispositivo ATR (attenuated total reflectance).

3.2.4.2 Tamanho de partícula de quitosana

O espalhamento dinâmico de luz (DLS) foi a técnica usada para analisar o tamanho e distribuição das partículas. Antes de iniciar o ensaio, todas as amostras foram submetidas ao ultrassom (UP 400S Ultraschallprozessor -Hielscher ultrasound technology) por 1 minuto. Após esse processo, foi realizado o ensaio nas amostras, para identificar o tamanho de partículas, onde utilizou a célula DTS0012, a uma temperatura de 25°C, com os parâmetros índice de refração (RI) de 1.700 e índice de absorção 0.010 da quitosana, e para solvente água RI:1.330, com viscosidade de 0.8872cP. O equipamento usado foi Zetasizer nanoseries - Malvern instruments por espalhamento dinâmico de luz (DSL) / Instituto de Cerâmica e Vidro (CSIC). Este equipamento foi utilizado na Primeira etapa do trabalho.

A partir da segunda etapa utilizou Zetapals - Brookhaven por espalhamento dinâmico de luz (DSL) para determinar o tamanho das partículas e índice de polidispersão (IP). Utilizou-se a célula BI-SCP, a uma temperatura de 25°C, com os parâmetros de índice de refração (RI) de 1.700 e índice de absorção 0.010 da quitosana e para solvente água RI:1.330, com viscosidade de 0.8872cP. Todas as leituras foram caracterizadas em triplicatas e após 24h da preparação das amostras.

3.2.4.3 Potencial Zeta (ζ)

O potencial zeta foi realizado para mensurar a carga eletrostática presente na superfície das partículas e estudar as modificações das cargas devido a presença do flúor. O equipamento usado foi Zetapals - Brookhaven com o eletrodo AQ-1214. Todas as leituras foram realizadas em triplicata (n=3) e após 24h da preparação das amostras.

3.2.4.4 Microscopia de Eletrônica de Varredura – MEV

A Microscopia Eletrônica de Varredura foi utilizada para avaliar a morfologia e tamanho das partículas obtidas. As amostras foram colocadas no porta amostras de alumínio e deixadas por 24h no dessecador para retirar toda umidade, em seguida as mesmas foram recobertas com ouro em vácuo durante 3 minutos com

corrente de 10mA. As amostras foram caracterizadas utilizando um microscópio eletrônico de bancada, Phenom modelo Pro-X com profundidade de foco de 1 mm, resolução de 30 nm, e tensão de 15 kV, baixo vácuo e pressão variada (1 à 270Pa).

3.2.4.5 Espectroscopia de raios X por Energia Dispersiva – EDS

As amostras foram caracterizadas utilizando um microscópio eletrônico de bancada, Phenom modelo Pro-X neste é acoplado a Espectroscopia de raios X por Energia Dispersiva (EDS) que foi utilizado para identificar a presença dos elementos químicos nas regiões estudadas.

3.2.4.6 Ensaio Citotoxicidade

As amostras (n=5) foram auto clavadas em autoclave da marca Odontotec modelo AV05, a temperatura de 121°C e pressão de 1,1atm por 16 minutos e manipuladas em ambiente estéril utilizando cabine de segurança biológica da marca Quimis modelo Q216F21RA1.

A citotoxicidade das amostras foi avaliada seguindo a norma ISO 10993-5, através da determinação da porcentagem da viabilidade celular, utilizando o método da redução do MTT [brometo de 3- (4,5-dimetiliazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio], que estabelece uma correlação entre a atividade metabólica celular e o número de células viáveis em cultura *in vitro*.

Neste ensaio, o MTT é acumulado pelas células por endocitose e a redução do anel tetrazólico deste sal resulta na formação de cristais de formazan de cor azul que se acumulam em compartimentos endossomais e/ou lisossomais, sendo depois transportados para fora das células por exocitose. Sendo a endocitose um mecanismo fundamental das células vivas, o ensaio do MTT tem sido usado frequentemente como ensaio de viabilidade celular.

Foi utilizada uma concentração de 5×10^5 células/mL RPMI e adicionados 100 μ L em uma placa de 96 poços. A placa foi transferida para a estufa de CO₂ (5%) a 37 °C por 1 hora. Após este período, foram adicionadas 10 μ L das amostras e mais 200 μ L de RPMI 1640-C. RPMI 1640-C foi utilizado como controle negativo. A placa foi incubada novamente em estufa de CO₂ (5%) a 37 °C por 24 horas.

Após as 24 horas, foram adicionados 100 µL de solução de MTT (0,5 mg/mL) em RPMI 1640-C. Novamente, as placas foram incubadas em estufa de CO₂ (5%) a 37 °C por 3 horas. Depois disso, o sobrenadante foi descartado e adicionado 100 µL de álcool isopropílico.

A leitura da densidade ótica foi determinada em um leitor de microplacas (Victor3 – PerkinElmer), a 540 nm com filtro de referência de 620 nm. A viabilidade celular foi calculada em porcentagem, considerando o controle negativo com 100% de viabilidade.

3.2.4.7 Atividade antibacteriana

A análise microbiológica foi realizada para avaliar a capacidade de inibição de crescimento bacteriano pelos compostos estudados. Para a análise da atividade antimicrobiana foi utilizada a cepa ATCC 25923 *Staphylococcus aureus*. As culturas foram estocadas em meio Brain Heart Infusion (BHI) e mantidas sobre refrigeração. As amostras a serem testadas foram autoclavadas em autoclave (Odontotec modelo AV05) a temperatura de 121°C e pressão de 1,1atm por 16 minutos e manipuladas em ambiente estéril, utilizando cabine de segurança biológica (Quimis modelo Q216F21RA1).

Para o inóculo bacteriano foi utilizado crescimento em placa de BHI (Brain Heart Infusion) após 24h de incubação a 37°C e após o crescimento e confirmação da pureza da cultura as cepas, foram diluídas em solução salina estéril a 0,9% até atingir a escala 0,5 de McFarland. Em seguida, diluído em escala de 1:10 de forma a se obter, aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. A partir desta solução, foram transferidos 10 µl para cada poço a ser testado da placa de microtitulação 96 poços fundo em U.

Cada poço da placa de microtitulação foi preenchido com 100µl de meio de cultura Mueller Hinton Broth (Caldo Mueller Hinton- Kasvi - Italy), 100µl das amostras testada e 10 µl do inóculo bacteriano. A placa foi incubada a 37 °C a leitura do teste foi realizada com 24h.

O teste em placa ágar foi realizado após a incubação de 24h a 37 °C, foi feito, foram retiradas alíquotas de 100 µl das diluições das amostras e foram espalhadas em placas de petri com meio (ajustados com 0,25% de ácido acético conforme

metodologia proposta por Chang (2015) estéril e incubadas a 37°C por 48h. O controle positivo usado foi para obter atividade bacteriana.

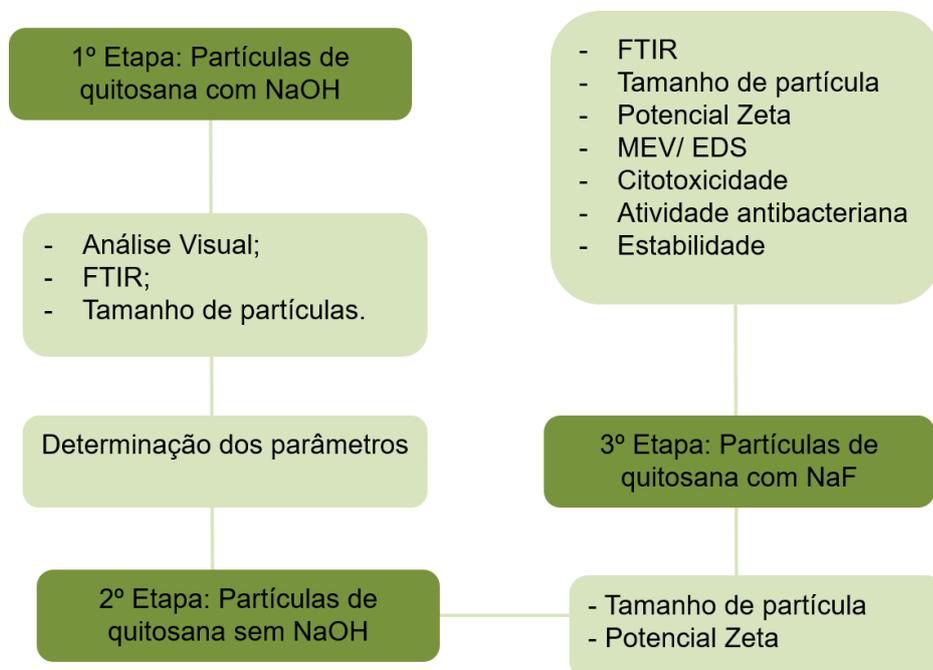
3.2.4.8 Estabilidade das partículas

As amostras Q, Q0,05%, Q0,2% e Q2% foram armazenadas na temperatura de 4°C, em geladeira comercial e analisadas da seguinte forma: após 21 dias, as amostras foram retiradas para análise por MEV e EDS, retornando para a armazenagem e mantidas por 40 e 80 dias, respectivamente. Após cada um destes períodos, foram realizadas caracterizações para avaliar o tamanho de partícula, potencial zeta e pH.

3.2.4.9 Etapas da pesquisa

O Fluxograma 1 apresenta de forma resumida as etapas que foram desenvolvidas nesta pesquisa.

Fluxograma 1 - Resumo das etapas desenvolvidas na pesquisa.



4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 1ª Etapa: estudo exploratório partículas de quitosana com NaOH

4.1.1 Análise visual e condições de processamento

No presente estudo, foi tomado como parâmetro duas variáveis: a razão das massas Q/TPP (4:1, 5.8:1 e 7:1) e condições de mistura -velocidade de rotação (5.000, 10.000, 15.000 e 20.000) RPM.

A Figura 10 ilustra as amostras obtidas com as variáveis: razão Q/TPP e velocidade de rotação.

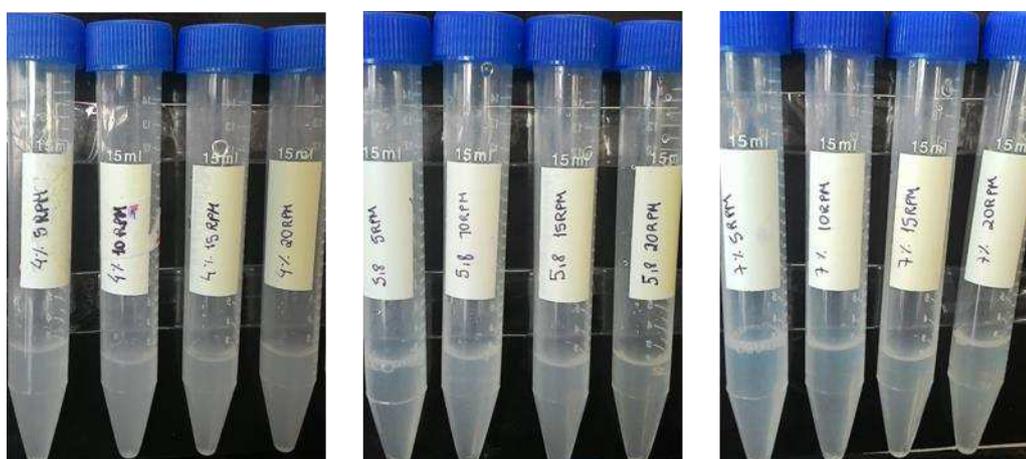


Figura 10 - Amostras obtidas com a razão Q/TPP (4:1, 5.8:1 e 7:1) e velocidade de rotação (5.000, 10.000, 15.000 e 20.000) RPM

Na Figura 10 é possível notar que as amostras obtidas se apresentaram translúcidas, indicando a presença de material em suspensão e que, mesmo com variações na velocidade de rotação, não houve mudanças nesta característica. Já com relação as diferentes razões de Q/TPP, foi possível notar que a razão Q:TPP 4:1 se apresentou mais translúcida que as demais, e isso pode ser atribuído a maior quantidade de TPP formando partículas na suspensão, corroborando com os resultados apresentados por Antoniou e colaboradores (2015).

Estudos realizados por Antoniou e colaboradores (2015) relatam que os tamanhos de partículas foram maiores para a menor razão quitosana/TPP e diminuí linearmente 3:1 até 6:1, pois o aumento da quantidade de TPP tornou a suspensão mais translúcida.

A Figura 11 apresenta as condições de processamento para velocidade as estudadas.

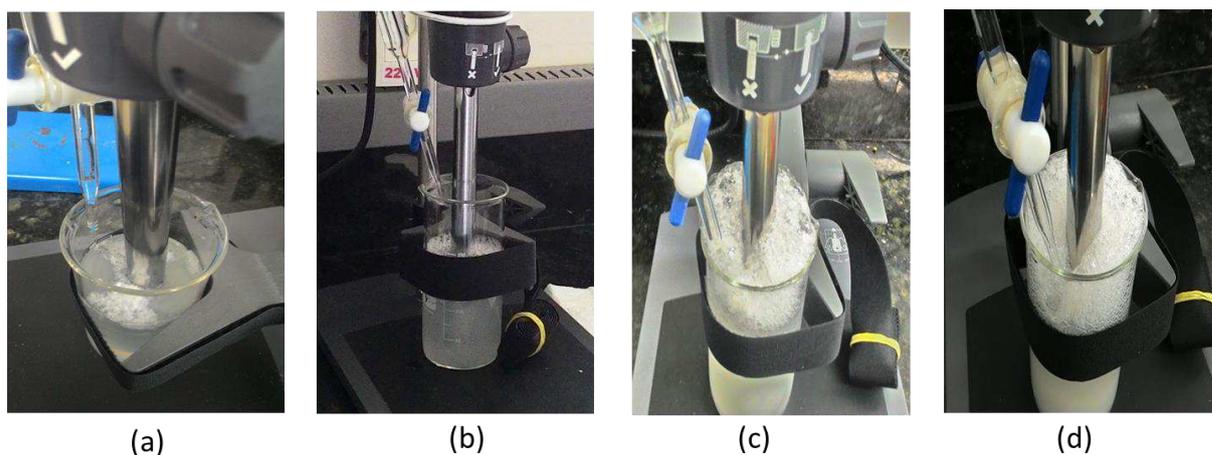


Figura 11 - Amostras obtidas com a razão Q/TPP 4:1 com velocidade de rotação: (a) 5.000RP; (b) 10.000RPM; (c) 15.000RPM e (d) 20.000RPM.

Durante o processo de obtenção das partículas, foram percebidas algumas dificuldades no que tange à variação das velocidades. Quando aplicada a velocidade de rotação de 5.000RPM, já foi possível detectar que a mesma não foi suficiente para homogeneizar o TPP e a solução de quitosana, apresentando formação de aglomerados, conforme apresentado na Figura 11 (a). Para as amostras obtidas sob as velocidades de rotação de 15.000 RPM e 20.000RPM, ocorreu a formação de espuma como apresentado na Figura 14 (c) e (d), resultando na perda de material. Logo, as amostras obtidas a 10.000 RPM se mostraram eficaz pois apresentou pouca formação de espuma e sem a presença de aglomerados visíveis (Figura 11 (b)).

4.1.2 Espectroscopia na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier – FTIR

O espectro de FTIR da solução de quitosana (SQ) e solução de quitosana com NaOH (SQNaOH) estão ilustradas na Figura 12.

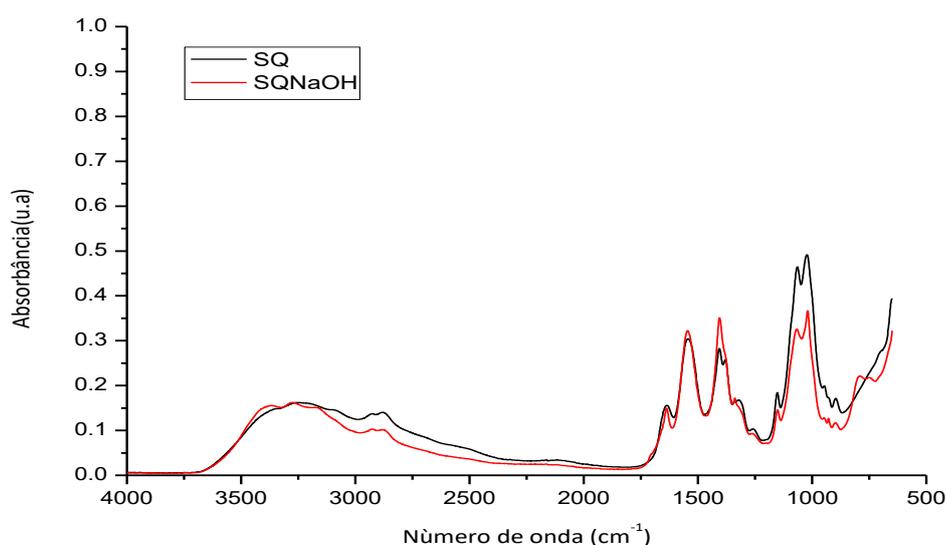


Figura 12- Espectro de FTIR das amostras SQ e SQNaOH

O espectro da amostra SQ (Figura 12) mostra absorções típicas da quitosana, que estão localizadas na região entre 3661 a 3000 cm^{-1} e são atribuídas às vibrações de estiramento dos grupos OH e NH. Na região de 2972 a 2235 cm^{-1} há uma sobreposição no estiramento dos grupos funcionais OH e NH_2 , devido à formação de pontes de hidrogênio. A banda localizada na região de 1638 cm^{-1} é atribuída à absorção do C=O, relativas ao alongamento dos grupos carbonilas ($-\text{NHCOCH}_3$, e em 1537 cm^{-1} corresponde ao grupo amina (NH_2), e a presença dessas duas bandas comprova que a quitosana não é totalmente desacetilada. Bandas fortes localizadas em 1537 cm^{-1} e 1405 cm^{-1} (vibração da deformação N-H do grupo amina) são atribuídas aos alongamentos assimétricos e simétricos do ânion carboxilado, indicando que uma interação ocorreu entre o ácido acético e os nitrogênios doadores da quitosana, produzindo acetato de quitosana. Em 1376 cm^{-1} e 1319 cm^{-1} é atribuída a vibração do alongamento C-N. A banda em 1062 cm^{-1} é referente ao álcool primário (OH) e por fim as bandas nas regiões de 1150 , 1025 e 905 cm^{-1} são atribuídas ao alongamento C-O-C (Fideles, 2014; Furtado, 2014; Antoniou et al., 2015).

Para a amostra SQNaOH observa-se bandas características da quitosana, porém as bandas que correspondem ao íon carboxilato (1537 cm^{-1} e 1405 cm^{-1}), comportamento já esperado, uma vez que o mesmo o pH sendo ajustado para 5,5, ainda há presença de ácido no sistema, e conseqüentemente, íons carboxilados.

O espectro de FTIR do tripolifosfato de sódio (TPP) puro e das amostras com razão Q:TPP 4:1, 5.8:1 e 7:1, obtidas com velocidade de 10.000RPM estão ilustradas na Figura 13.

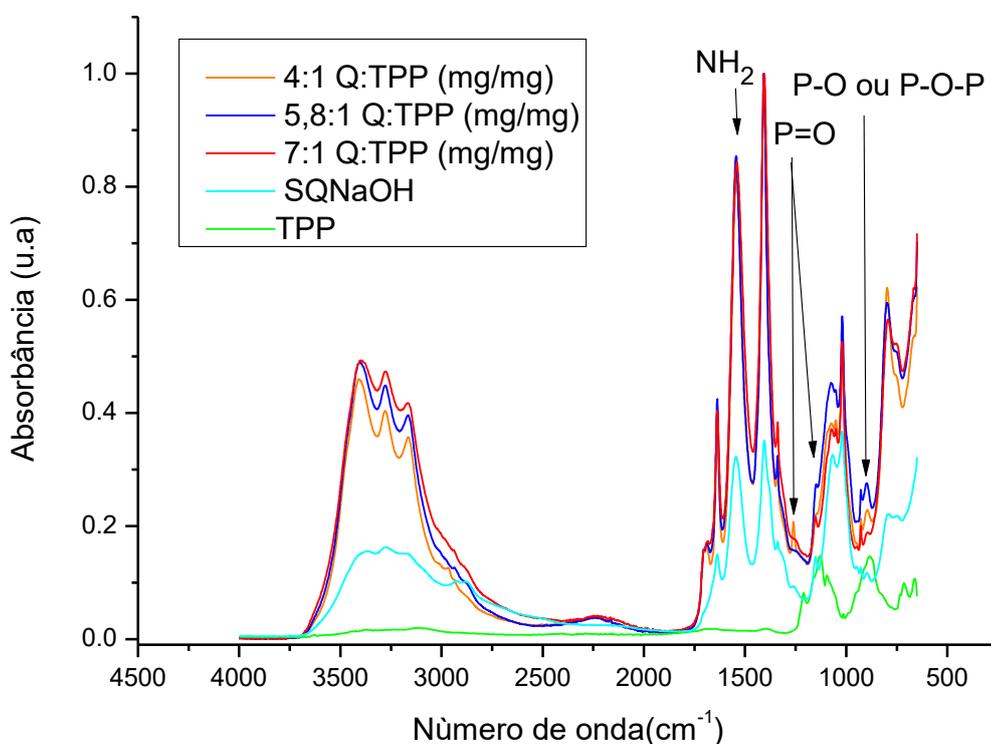


Figura 13 - Espectros de FTIR do TPP puro e das as razões Q:TPP(m/m) 4:1, 5.8:1 e 7:1 com velocidade de 10.000RPM.

O espectro de FTIR do TPP puro (Figura13) apresentou bandas em 1207 cm^{-1} , característica do alongamento P=O, em 1128 cm^{-1} , característica da vibração simétrica e assimétrica de alongamento dos grupos PO_2 , em 1092 cm^{-1} relativa à vibração simétrica e assimétrica de alongamento dos grupos PO_3 e 887 cm^{-1} , característica do alongamento assimétrico da ligação P-O-P (Antoniou et al., 2015).

A Figura 13 apresenta os espectros das amostras estudadas, onde é possível identificar as bandas entre 1257-1074 cm^{-1} correspondem ao estiramento P=O e a banda na região de 899 cm^{-1} a P-O com P-O-P que indica à presença do TPP. Em 1638 cm^{-1} corresponde a amida (NH_2CH_3), e em 1543 cm^{-1} corresponde ao grupo amina (NH_2). Ao comparar os espectros de quitosana, com as amostras obtidas, é possível verificar modificações nos espectros de Q:TPP indicando que há

interação entre o grupo amino da quitosana protonada com o grupo fosfato do TPP, sugerindo a formação das partículas e que as ações inter e intra-moleculares são reforçadas em partículas de quitosana, corroborando com os resultados obtidos por Antoniou e colaboradores (2015). Estes resultados indicam que o material em suspensão ilustrado na Figura 10 possivelmente são partículas de quitosana em escala nano.

4.1.3 Tamanho de partículas

A Figura 14 mostra a relação entre o tamanho de partícula e a velocidade de agitação para cada razão Q/TPP.

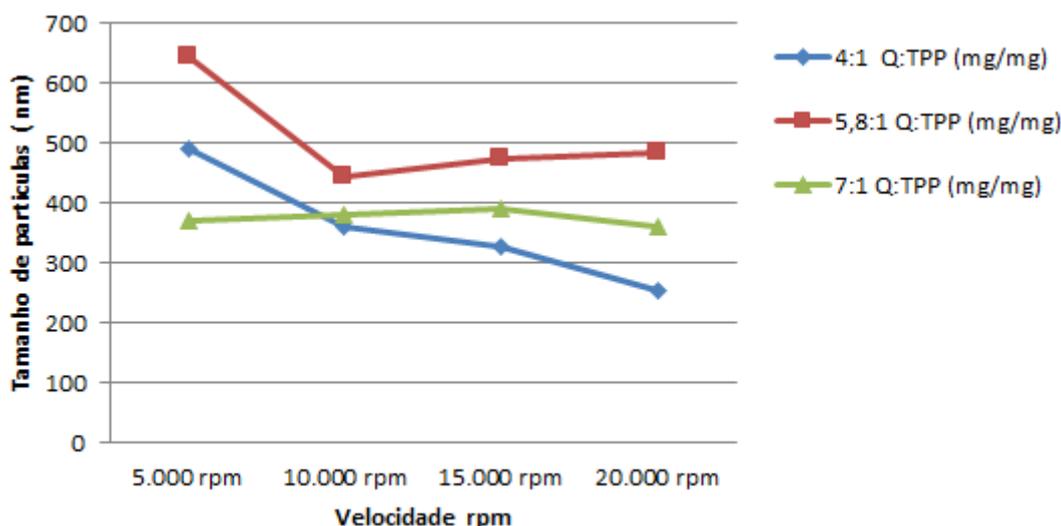


Figura 14- Tamanho de partículas das amostras estudadas.

Na Figura 14 é possível identificar que, na razão 4:1 (Q:TPP), com o aumento da velocidade de rotação ocorre a redução do tamanho da partícula de 489 nm para 252nm, o que corresponde a uma diminuição em 48 % do tamanho. Para a razão 5,8:1 (Q:TPP), há uma redução no tamanho de partícula de 641 nm para 444nm, com o aumento da velocidade de rotação de 5.000RPM para 10.000RPM, o que corresponde a uma diminuição em 31% do tamanho. Com o aumento da velocidade de 10.000RPM para 15.000RPM, houve um aumento no tamanho de partículas de 5,9% (de 444 nm para 472nm). Já para o aumento da velocidade de 20.000RPM foi de 8,5% (de 472 nm para 484nm), apresentando um comportamento praticamente constante com o aumento da velocidade de rotação. Já para a razão 7:1 (Q:TPP), é

possível observar que um aumento do tamanho de partícula de 370 nm para 390 nm (que corresponde à 5,1%) e que para a velocidade de 20.000RPM há uma redução para 358nm (que corresponde à 3,2%).

Ao comparar as razões Q:TPP, é possível notar um comportamento bem definido: uma relação inversamente proporcional entre tamanho de partícula e velocidade de rotação. Há uma redução no tamanho de partículas com o aumento da velocidade, e isso pode ser atribuído aos dois parâmetros estudados: velocidade de rotação e concentração do TPP. Ao aumentar a velocidade de rotação, ocorre a fragmentação/separação das cadeias poliméricas da quitosana em tamanhos menores, que interagem com o TPP livre no sistema (não reagiram) resultando em partículas menores. Esse comportamento é nítido para a razão 4:1 (Q:TPP). Para as razões 5,8:1 (Q:TPP) e 7:1 (Q:TPP) também observa-se uma redução do tamanho de partícula com o aumento da velocidade de rotação porém, apresentam maior tamanho de partículas, sugerindo a formação de aglomerados. Essa formação de aglomerados pode ser favorecida pela quantidade de TPP usada, que pode não ter sido o suficiente para evitar que as partículas aglomerassem. Com menor concentração de TPP, obteve-se maior tamanho de partículas, o que sugere maior formação de aglomerados. Outros fatores que podem ter influenciado a formação dos aglomerados são as interações eletrostáticas, forças intra e intermoleculares, área superficial e colisões.

Sipoli e colaboradores (2015) investigaram a produção de nanopartículas quitosana/ TPP utilizando uma concentração de (5 mg/mL) de quitosana com pH 5,5 em um reator e observou que o aumento da proporção de massa quitosana/TPP de 4 a 8 corresponde ao aumento no diâmetro médio, de 300 a 600nm, corroborando com os resultados obtidos nesta pesquisa. O aumento no diâmetro médio de 300 a 600nm ocorre da seguinte forma: quando a quitosana está solubilizada, há repulsão eletrostática entre as cargas ao longo das cadeias do polímero, mas quando o pH aumenta para 5.5 cadeia tenderá a adotar uma conformação arco (*tends to loop*) reduzindo os números de sítios para reagir com o TPP. Logo, a conformação espiral é adotada, resultando em tamanhos de partículas maiores.

Tsai e colaboradores (2008) avaliaram o diâmetro médio de nanopartículas de quitosana obtidas pelo método de gelificação ionotrópica com dois tipos de condições de misturas: ultrassom e agitação mecânica. Os resultados obtidos

indicaram que, com o aumento da potência do ultrassom (10, 30 e 50 watts) e agitação mecânica (60, 300 e 1000) rpm, houve a redução do tamanho de partícula e que com o aumento da temperatura de 25°C a 45°C para o ultrassom houve uma redução do tamanho de partículas, mas para agitação mecânica permaneceu praticamente constante. Isso ocorre porque, quando a quitosana é submetida ao ultrassom ou agitação mecânica, as cadeias poliméricas podem ser fragmentadas/separadas em metade ou menor do seu tamanho original, resultando em diferentes tamanhos de partículas (Tsai; Bai e Chen, 2008).

Assim, diante desses dois estudos mencionados acima, fica um embasamento maior que sugere uma possível explicação para o tamanho de partícula obtido nesta pesquisa. A quitosana quando está solubilizada, há repulsão eletrostática entre as cargas ao longo das cadeias de quitosana, porém, quando o pH aumenta para 5.5, essa repulsão é reduzida, a cadeia polimérica tenderá a adotar uma conformação arco (*tends to loop*) reduzindo os números de sítios para reagir com o TPP. A força cisalhante tenderá a quebrar essa conformação de arco adotando a conformação estendida, e, o TPP que está livre no sistema, pode interagir e formar partículas menores. Entretanto, quando há pouco TPP livre no sistema, a cadeia polimérica pode retornar à conformação de arco e interagir com o TPP disponível no sistema, adotando uma conformação em espiral resultando em tamanhos de partículas maiores. Além desses parâmetros, outros fenômenos devem ser considerados, como: interações eletrostáticas, forças intra e intermoleculares, área superficial e colisões.

A partir do estudo preliminar realizado, foram escolhidos os parâmetros razão de 4:1 (Q/TPP) e velocidade de rotação de 10.000 rpm pois, apresentaram melhores condições de processamento e menor tamanho de partícula.

4.2 2ª Etapa: estudo exploratório das partículas de quitosana sem NaOH

Após os estudos desenvolvidos na 1ª etapa, foi avaliada a necessidade de adicionar o NaOH (pH~13) para ajustar o pH de 3.5 para 5.5 da solução de quitosana. Logo em seguida seriam adicionados o NaF (pH~10.2) e o TPP (pH~9,5), duas substâncias que possuem o pH básico. Assim, foi realizado o segundo estudo exploratório, reduzindo a concentração da solução do ácido acético para obter uma solução de quitosana com o pH próximo de 5 e excluir a adição do NaOH.

Com o objetivo de reduzir a quantidade de materiais utilizados e excluir a adição do NaOH na solução, foram avaliadas duas novas concentrações de ácido acético (0,75% e 0,14%) para preparar as soluções de quitosana. Nessa etapa também foram obtidas partículas de quitosana com NaF com concentração de 0,2% para as concentrações de ácido acético estudadas, com o objetivo de avaliar a influência da adição no NaF.

4.2.1 Tamanho de partícula e Potencial Zeta (ζ)

Para avaliar influência da concentração do ácido acético (0,14% e 0,75%) e do NaF no tamanho de partícula e pH final das partículas obtidas, foi realizada a caracterização por DLS, potencial zeta, e pH. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 - Diâmetro médio das partículas, IP e potencial zeta (ζ), pH para NQ (0,14%) e NQ(0,75%).

Amostra	Média diâmetro (nm)	Média IP	Média (ζ) (mV)	pH final
Q (0,14%)	1579,71	0,38	41,16	5,4
Q (0,75%)	1070,19	1,68	57,68	4,6
Q (0,14) NaF(0,2%)	439,14	0,28	20,27	5,6
Q (0,75)NaF(0,2%)	1332,24	0,38	35,64	4,7

Com os dados apresentados na Tabela 4 percebe-se que a amostra Q (0,14%) apresentou maior tamanho de partícula, sugerindo a formação de agregados. As amostras Q (0,14%) e Q (0,14%)NaF(0,2%) apresentam índice de polidispersão (IP) inferior a 0,40, potencial zeta 41,16 mV e 20,27 mV, respectivamente, e pH final próximo a 5,5. Porém, com a adição do NaF, o tamanho de partícula teve uma redução de 72,2%.

Ao considerar a suspensão de quitosana/TPP como um sistema metaestável, e ao modificar a força iônica (NH_3^+), é possível alterar o comportamento das moléculas, favorecendo a agregação das mesmas (Bao; Li; Zhang, 2008). Os resultados obtidos nesta fase se apresentaram distintos quando comparados com os resultados encontrados por Sipoli e colaboradores (2015) e Gan

e colaboradores (2005) pois, com a redução do pH, ocorre a redução no tamanho de partícula.

Gan e colaboradores (2005) estudaram os efeitos da variação do pH (4,0; 4,5; 5,0; 5,5 e 6) no tamanho de nanopartículas e potencial zeta das nanopartículas de quitosana/TPP com diferentes razões quitosana/TPP. Para o pH 4 sem adição de NaOH obtiveram tamanho de partícula próximo a 135 nm e potencial zeta de 37 mV.

Estudo realizado por Sipoli e colaboradores (2015), investigaram a produção de nanopartículas quitosana/TPP utilizando uma concentração de 5 mg/mL de quitosana e 2mg/ml de TPP, com três valores de pH diferentes (4,0, 5,0 e 5,5) em um processo escalável, utilizando um reator. Para a 4:1 Q/TPP com pH 4, o tamanho foi 150 nm, índice de polidispersão elevado (próximo de 1,0) e Potencial zeta com valor de 43 mV.

Para aplicação odontológica, o pH deve ser superior ou igual a 5,5 e o tamanho de partícula deve estar entre 100-500 nm, pois a camada orgânica formada, que exerce uma função biológica de atuar como barreira protetora para exposição a ácidos e desgaste erosivo dos tecidos dentários duros, apresenta capacidade de se associar em glóbulos tipo micela, com tamanho de 100-500 nm. Assim, para ter sucesso na aplicação, deve-se obter partículas dentro desta faixa de tamanho para obter uma bioadesão ideal na superfície do esmalte dentário (Keegan et al., 2012; Nguyen et al., 2017).

Assim, dentro dos resultados obtidos e, com base na literatura, a concentração da solução de ácido acético escolhida para continuar a pesquisa foi 0,14%.

4.3 3ª Etapa: partículas de quitosana com flúor

Nesta etapa foram obtidas partículas de quitosana com NaF nas concentrações de 0,05% (m/v) (230 ppm, F), 0,2% m/v (900 ppm, F) e 2% m/v (9.040 ppm, F), conforme ilustrado na Tabela 3.

4.3.1 Espectroscopia na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier – FTIR

O espectro de FTIR das amostras solução de quitosana (0,14% de ácido acético) (S), Q, Q 0,05%, Q0,2% e Q2% estão ilustradas na Figura 15.

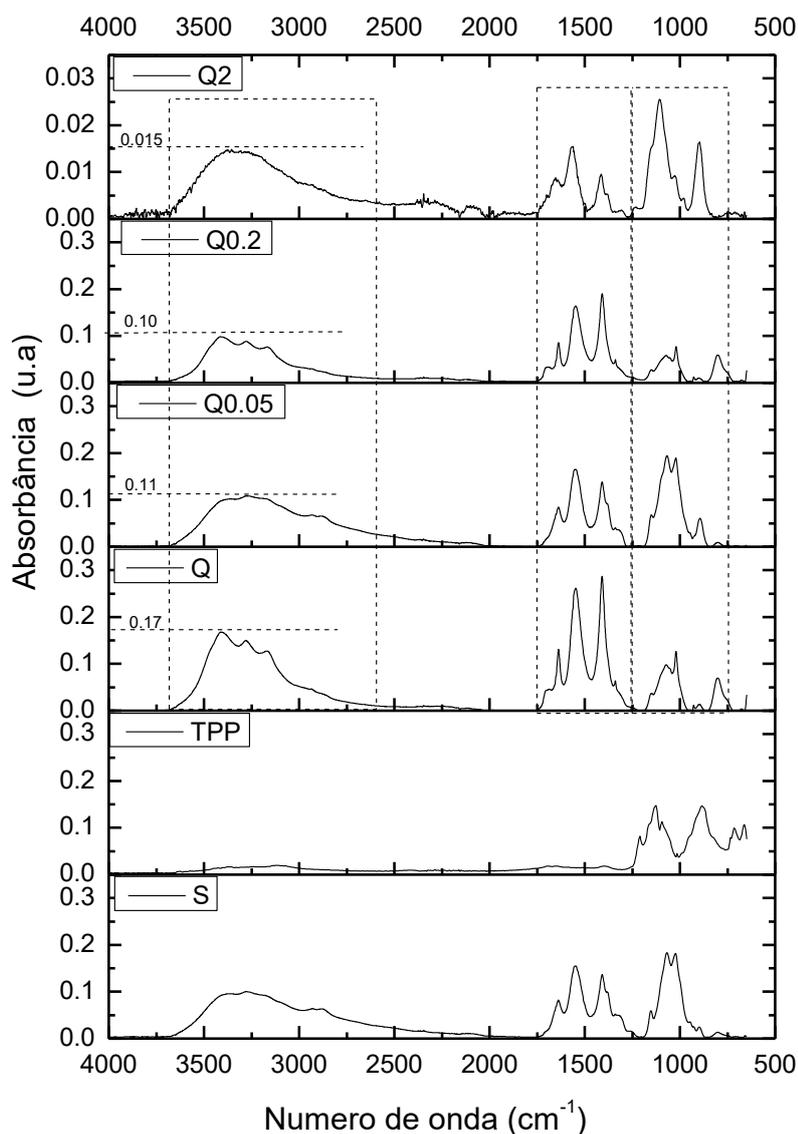


Figura 15- Espectro de FTIR das amostras S, TPP, Q, Q 0,05%, Q0,2% e Q2%

Ao analisar os espectros apresentados na Figura 15 das amostras Q, Q0,05%, Q0,2% e Q2% é possível observar a região entre 3700 cm^{-1} a 3000 cm^{-1} que corresponde ao alongamento na vibração dos grupos O–H e N–H. Para a região de 2999 cm^{-1} a 2969 cm^{-1} são atribuídas a sobreposição no estiramento dos grupos

funcionais OH e NH₂ encontrados na quitosana. Na mesma região, nota-se uma redução de intensidade das pontes de hidrogênio, que é causada tanto pela protonação dos grupos -NH₂, a banda mais ampla que apareceu representa o alongamento da vibração do grupo amina protonado (-NH₃⁺), como também pode ser relacionada à presença de reticulações no sistema, já que as pontes de hidrogênio são diretamente relacionadas à estrutura cristalina da quitosana. É possível identificar uma modificação na região entre 1127-1076 cm⁻¹ que pode ser atribuída a sobreposição do P=O do TPP, ao álcool primário (1062 cm⁻¹) (OH) e alongamento C-O-C (1027 cm⁻¹). A banda na região de 899 cm⁻¹ a P-O com P-O-P que indica à presença do TPP (Fideles, 2014; Antoniou et al., 2015; Anitha et al., 2011).

A região em 1638 cm⁻¹ corresponde a amida (NH₂CH₃), e em 1543 cm⁻¹ corresponde ao grupo amina (NH₂). Ao comparar os espectros de S, com as amostras obtidas, é possível verificar modificações no espectro de Q, indicando que há interação entre o grupo amino da quitosana protonada com o grupo fosfato do TPP, corroborando com os resultados obtidos por Antoniou e colaboradores (2015) e Anitha e colaboradores (2011).

Anitha e colaboradores (2011) estudaram o desenvolvimento de nanopartículas de quitosana tioladas mucoadesivas para aplicações biomédicas. Obtiveram nanopartículas de quitosana por gelificação ionotrópica utilizando TPP como agente de reticulação. Os resultados mostraram características das bandas de quitosana e modificações nas regiões de 1637 cm⁻¹ indicando a reação de reticulação entre quitosana e TPP.

Antoniou e colaboradores (2015) também investigaram as nanopartículas de quitosana-tripolifosfato obtidas pelo método de gelificação ionotrópica. Os resultados mostraram alterações na região de 3421 cm⁻¹, 1568 cm⁻¹ e 1630 cm⁻¹ indicando a interação entre o grupo amino da quitosana e TPP.

Contudo ao adicionar o NaF houve redução na intensidade na região 1547 cm⁻¹. Estudos realizados por Huang e Lapitsky (2012) investigaram a influência da adição de NaCl na obtenção de microgel de quitosana/TPP. Eles observaram que ao adicionar quantidades moderadas de NaCl enfraquece a força de ligação entre quitosana/TPP e também as tornam mais lentas, devido a competição entre o TPP e

NaCl, ao reduzir a taxa de reticulação quando comparada com ausência de NaCl, provavelmente resultam em uma distribuição uniforme de TPP ligada a quitosana.

4.3.1 Tamanho de partícula e Potencial Zeta (ζ)

A Figura 16 apresenta os dados obtidos do diâmetro médio das partículas e das amostras Q, Q(0,05%), Q(0,2%) e Q2%.

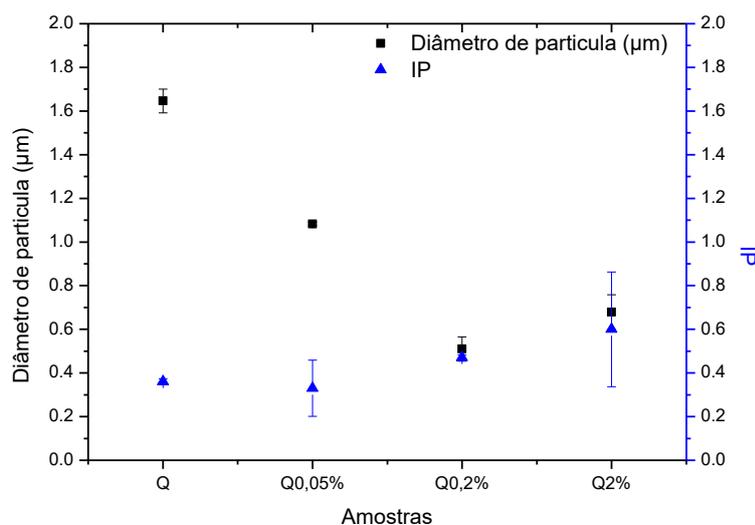


Figura 16 - Tamanho de partícula e índice de polidispersão das amostras Q , Q0,05%, Q0,2% e Q2%

De acordo com os resultados apresentados na Figura 16, foi observado que o diâmetro obtido para amostra Q é de 1,646 µm. Esse já era um resultado esperado, pois as cadeias poliméricas da quitosana quando solubilizadas em meio ácido adotam conformação rígida e estendida, devido a repulsão eletrostática entre grupos amina (NH_3^+). Uma vez que o TPP, carregado negativamente, entra em contato com -NH_3^+ , há atração eletrostática, e ocorre a reticulação (Bao; Li e Zhang, 2008; Jonassen; Kjøniksen e Hiorth, 2012), porém devido a repulsão eletrostática entre grupos amina (NH_3^+) podem resultar em partículas maiores e maior formação de agregados (Bao; Li e Zhang, 2008; Jonassen; Kjøniksen e Hiorth, 2012; Antoniou, et.al, 2015)

Para Q0,05%, Q0,2% e Q2%, houve uma redução no diâmetro da partícula de 34%, 69% e 58%, respectivamente comparado com Q. Foram obtidas partículas na escala nano, corroborando com estudos realizados por Huang e Yan Lapitsky,

2011; Jonassen; Kjøniksen e Hiorth, 2012; Antoniou et al., 2015; Nguyen et al., 2017. Essa redução pode ser atribuída a presença do sal monovalente (NaF), pois o mesmo é adicionado antes do TPP. Uma vez que o flúor (F^-) está presente no sistema, pode se ligar ao NH_3^+ reduzindo a quantidade os grupos aminos protonados livres, diminuindo a disposição das reticulações, resultando em partículas menores e mais compactas, devido à redução da repulsão eletrostática aumentando a flexibilidade da cadeia polimérica e ao efeito de blindagem (*screening of charges*) (Jonassen; Kjøniksen e Hiorth, 2012; Nguyen et al., 2017). Também é possível observar na Figura 16 que, para a amostra Q2, há um aumento 0,169 μm quando comparado com a amostra Q0,2.

Ao observar o índice de polidispersão (IP) na Figura 16, é possível identificar que para a amostra Q0,05 e Q0,2, há uma leve redução e para Q2, há aumento sutil no IP. Entretanto, esse aumento não é significativo seguindo as tendências dos estudos realizados por Huang e Yan Lapitsky, 2011; Antoniou et al., 2015; Nguyen et al., 2017. Além disso, essa redução pode ser atribuída a presença do F^- que pode reduzir as direções das ligações iônicas (NH_3^+), sugerindo que o rearranjo estrutural das partículas pode influenciar parcialmente no IP (Huang e Yan Lapitsky, 2011).

A Figura 17 apresenta o Potencial zeta e pH das amostras, S (solução de quitosana) Q, Q,05%, Q0,2% e Q2%.

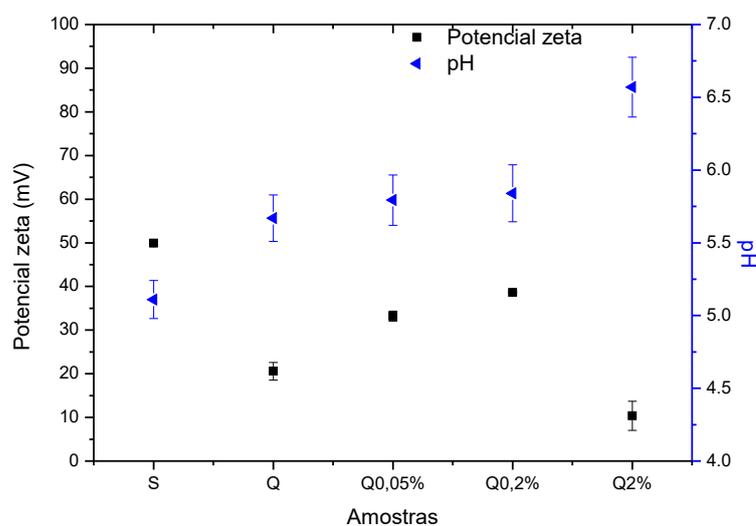


Figura 17- Potencial zeta e pH das amostras S (solução de quitosana), Q, Q0,05%, Q0,2% e Q2%.

É possível observar também na Figura 17, que a amostra S apresentou valores de potencial zeta de +49,93 mV, conforme já reportado na literatura (Bao; Li e Zhang, 2008; Huang e Yan Lapitsky, 2011; Jonassen; Kjøniksen e Hiorth, 2012; Antoniou et al., 2015; Nguyen et al., 2017). Com a adição do TPP à quitosana, há uma redução para +20,57 mV, resultado já esperado, uma vez que o TPP é atraído pelo grupo amina protonado da quitosana (NH_3^+) ocupando as cargas positivas conforme apresentado na literatura (Bao; Li e Zhang, 2008; Huang e Yan Lapitsky, 2011). Para as amostras Q0,05 e Q0,2, houve um aumento no potencial zeta +33,2mV e +38,64mV respectivamente, enquanto para Q2, houve uma redução de corroborando com os dados encontrado por Antoniou et al., 2015. Isso pode ser atribuído a adição do flúor, pois o mesmo foi adicionado antes do TPP reduzindo o número de cargas positivas, de acordo com os estudos realizados por Huang e Yan Lapitsky, 2011; Antoniou et al., 2015; Nguyen et al., 2017. Essa possível redução de cargas positivas, pode ser observada com o aumento do pH, conforme apresentado na Figura17.

Com relação à análise de pH, a amostra S apresentou valores de pH 5,1. Com a adição do TPP, o pH elevou para 5,6 (Amostra Q). Para as amostras Q0,05 e Q0,2, o pH permanece praticamente constante. Para Q2, aumentou para 6,5, valor próximo ao pKa (6,3-6,5) da quitosana (Sipoli et al., 2015). O aumento do pH próximo do pKa sugere a diminuição da protonação da quitosana que pode contribuir para a formação de aglomerados (Mattu; Li e Ciardelli, 2013; Sipoli et al., 2015).

Huang e Lapitsky (2011) investigaram a influência da adição de NaCl na obtenção de microgel de quitosana/TPP. Ao adicionar quantidades moderadas de NaCl revelou um impacto direto no tamanho e distribuição das partículas. Os resultados obtidos apresentaram menor distribuição de tamanho de partícula, IP e diminuição no potencial zeta.

Antoniou e colaboradores (2015) investigaram a adição de NaCl na composição iônica antes de obter nanopartículas de quitosana pelo método de gelificação ionotrópica. Como resultado, obtiveram uma distribuição de tamanho de partícula estreita (~150nm) e redução no tamanho da partícula em 25% quando comparado as partículas sem NaCl, devido mudança da força iônica na cadeia de quitosana, que durante o processo de gelificação ionotrópica, reduziu a carga do grupo amina protonado (NH_3^+) produzindo partículas com tamanhos menores. Com

o aumento da concentração de NaCl, não foram observadas alterações significativas ($P > 0,05$) na IP das partículas. Para o Potencial Zeta houve uma diminuição devido a redução das interações entre a quitosana e TPP.

Nguyen e colaboradores (2017) desenvolveram nanopartículas de quitosana/TPP com NaF (0,2% e 0,4%) pelo método de gelificação ionotrópica e obtiveram tamanho de partícula de 101nm e 112 nm e baixo índice de polidispersão (0,16 e 0,14) para as concentrações de NaF 0,2% e 0,4%, respectivamente. Esses resultados podem ser atribuídos a presença do flúor, que é o mais eletronegativo e reativo de todos os elementos da tabela periódica, que permitem ligações com outros átomos de caráter iônico. Assim, o mesmo atrai as cadeias de quitosana, favorecendo a ação de reticulação do TPP e resultando em uma matriz de nanopartícula menor e compactada.

Jonassen e colaboradores (2012) estudaram a concentração de nanopartículas de quitosana produzidas via gelificação ionotrópica com e sem adição de NaCl. A presença do sal monovalente induziu a um valor de potencial zeta positivo e baixo, podendo estar relacionado ao efeito de blindagem (*screening of charges*), uma vez que a presença de cargas negativas do sal monovalente, pode preencher algumas cargas positivas da quitosana antes da reação com TPP.

4.3.2 Microscopia Eletrônica de Varredura- MEV e Espectroscopia de raios X por Energia Dispersiva – EDS

As Figuras 18 e 19 ilustram as micrografias e EDS das amostras apresentadas nas Figuras 16 e 17.

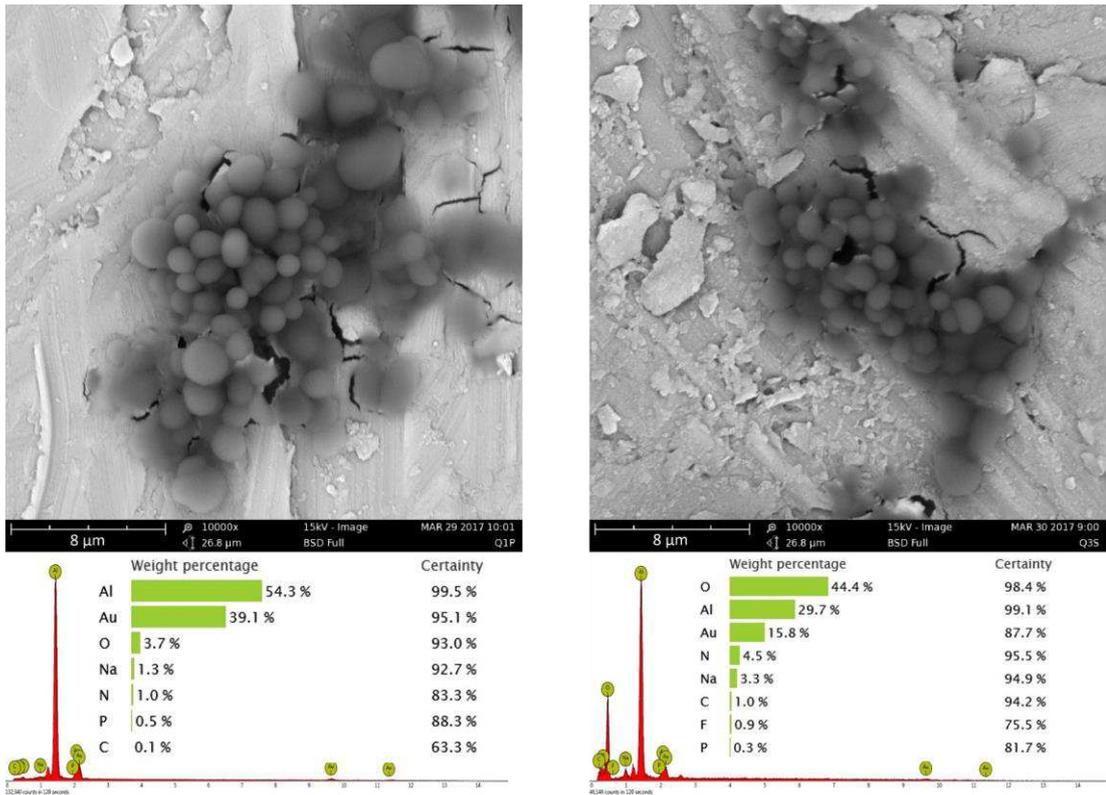


Figura 18 - Micrografias (10.000X) e EDS: (a) Q e (b) Q0,05%.

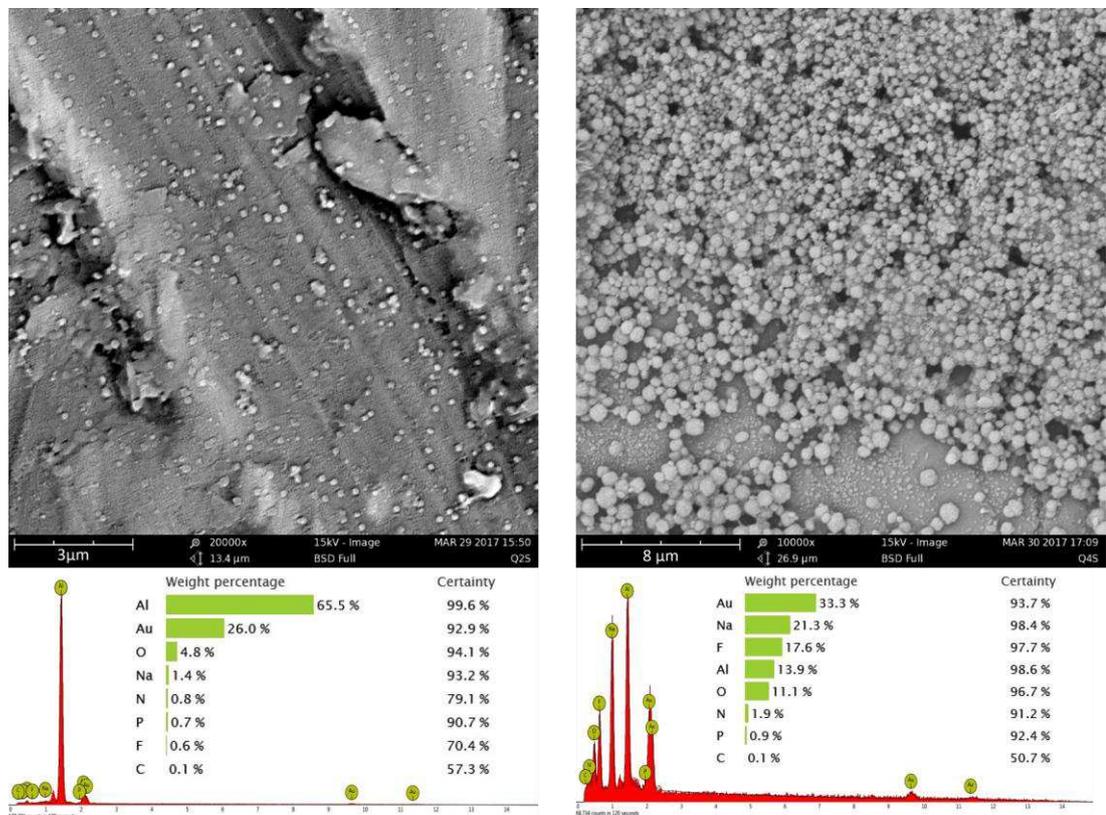


Figura 19- Micrografias e EDS: (a) Q0,2% (20.000X) e (b) Q2%(10.000X).

Na micrografia apresentada na Figura 18 (a), observa-se partículas aglomeradas, com formato esférico e superfície lisa conforme descrito na literatura (Gan et al., 2005; Bao; Li; e Zhang, 2008; Antoniou et al., 2015). Para as Figuras 18(b) e 19, também é possível notar que as partículas são esféricas, com superfície lisa e aglomeradas conforme apresentado na literatura (Liu, et. al, 2007; Huang e Lapitsky, 2011; Huang e Lapitsky, 2012), exceto para Q0,2, corroborando com resultados obtidos por Liu et al., 2007. A ausência de aglomerados na amostra Q0,2 comprova que o sistema se apresentou de forma estável, o que já tinha sido identificado nos resultados de Potencial zeta (+38.64 mV), conforme Figura 17. Uma vez que valores de potencial zeta maiores que +30 mV são atingidos, os sistemas são considerados mais estáveis, prevenindo assim, a formação de aglomerados (Jonassen; Kjøniksen e Hiorth, 2012; Bao; Li e Zhang, 2008). A presença do NaF não modificou a superfície das partículas e também não houve a formação de cristais de NaF na superfície das partículas, resultados semelhantes foram encontrados por Keegan et al., 2012, exceto para Q2 (Figura 20).

Ao observar os espectros das amostras Q, Q0,05, Q0,2 e Q2 (Figura 18 e 19) é possível visualizar a presença dos picos de carbono, oxigênio e nitrogênio típicos da quitosana. Para todas as amostras foi possível confirmar a presença do sódio e fosforo, atribuídos ao TPP, bem como alumínio referente ao porta amostra e ouro atribuído ao recobrimento. Para as amostras Q0,05, Q0,2 e Q2 percebe-se à presença do flúor.

A Figuras 20 apresenta a micrografia e EDS da amostra Q2 com aumento de 30.000X.

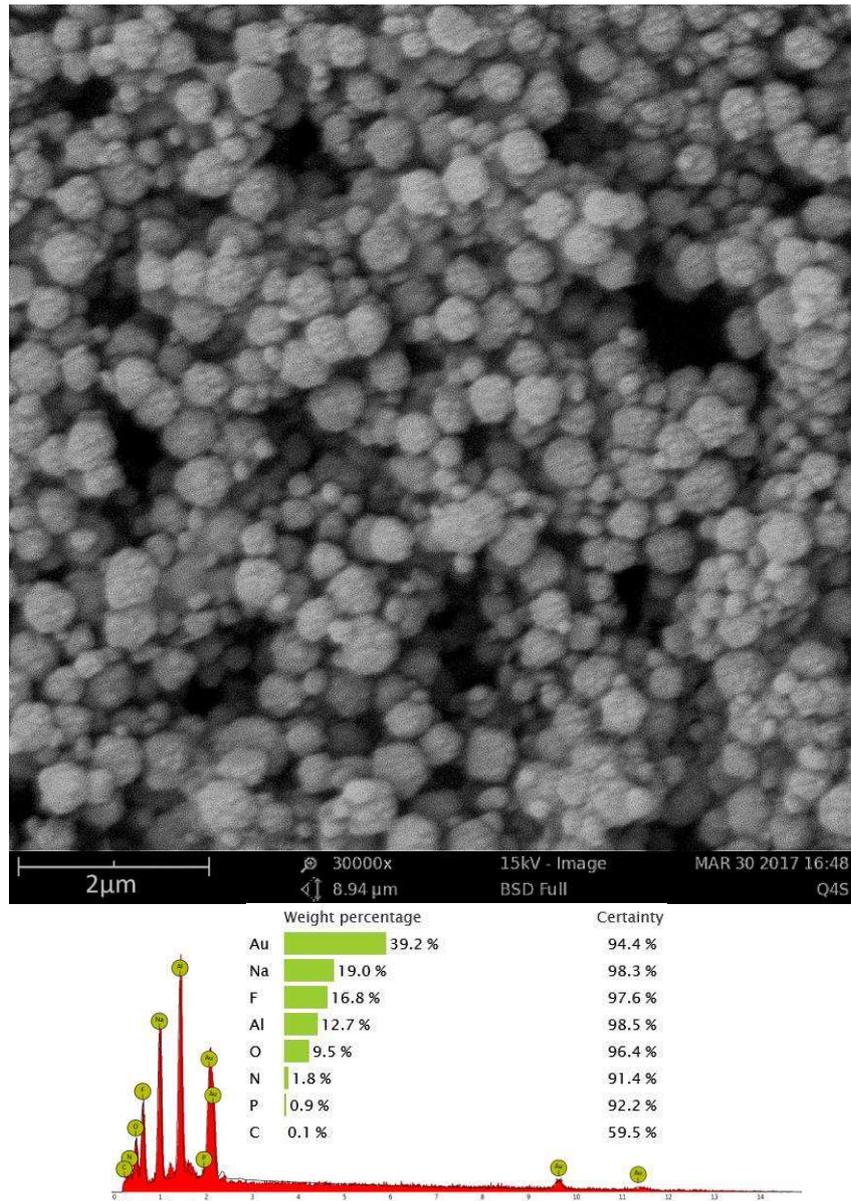


Figura 20- Micrografias (30.000X) e EDS de Q2

Na Figura 20 é possível perceber partículas com formato esférico, porém com superfícies rugosas quando comparada com as demais amostras ((Figura 18 (b) e 19 (a)), isso sugere-se que o NaF pode estar em excesso recobrando as partículas ou ainda o F^- migrou ou acumulou, já que Q2 contém maior quantidade de NaF.

A Figura 21 apresenta o histograma do diâmetro das partículas obtidas das micrografias apresentadas nas Figuras 18 e 19.

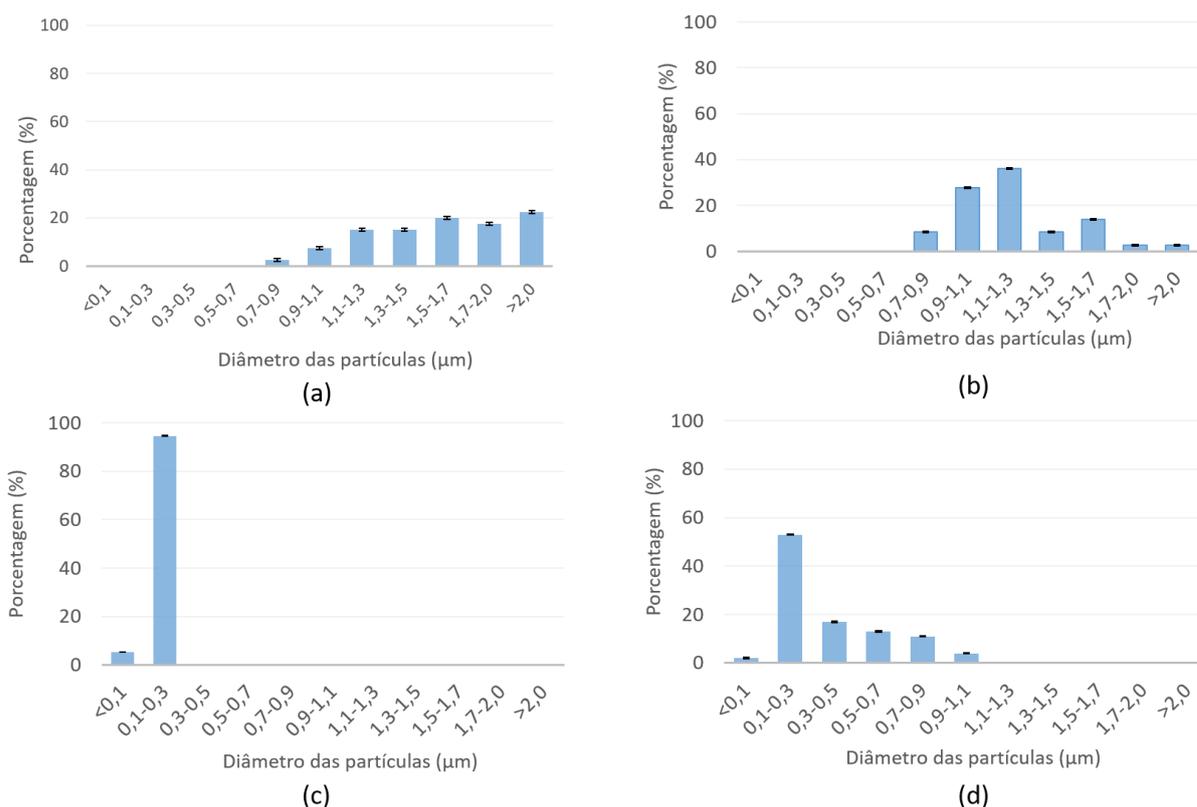


Figura 21- Histograma do diâmetro das partículas: (a)Q; (b)Q0,05%; (c)Q0,2% e (d)Q2%

É possível observar na Figura 21 os histogramas referentes aos diâmetros médios obtidos através das micrografias apresentadas nas Figuras 18 e 19, com médias de $1,71 (\pm 0,599) \mu\text{m}$, $1,23 (\pm 0,344) \mu\text{m}$, $0,17 (\pm 0,042) \mu\text{m}$ e $0,38 (\pm 0,239) \mu\text{m}$, respectivamente. Na Figura 21 (b), (c) e (d), é possível observar que a adição do NaF proporcionou uma redução de 28,1%, 90,1% e 77,7%, nos diâmetros das partículas de Q0,05, Q0,2 e Q2 respectivamente, indicando uma redução significativa, corroborando com os resultados obtidos por DLS apresentados na Figura 16, indicando um comportamento diretamente proporcional entre o diâmetro da partícula e a concentração do NaF no sistema.

Na Figura 21 (c) e (d) é possível identificar também, que há um aumento no diâmetro das partículas Q2 quando comparadas com Q0,2, corroborando com os resultados do tamanho de partícula apresentados na Figura 19. Esse aumento pode ser atribuído ao excesso de NaF, que pode ter depositado na superfície das partículas resultando no aumento do tamanho das partículas conforme apresentado na Figura 20.

As amostras submetidas à caracterização por MEV podem apresentar uma retração volumétrica, uma vez que as amostras analisadas por MEV estão

desidratadas e as submetidas à caracterização por DLS estão intumescidas (Sawtarie; Cai; Lapitsky, 2017). Esse comportamento foi apresentado para as amostras Q0,2 e Q2 com a retração volumétrica de 66,7% e 44,1%, respectivamente. Porém, para Q e Q0,05, foi identificado aumento volumétrico de 3,82% e 11,9%, respectivamente, sugerindo que nesse intervalo de 24 horas algumas partículas podem ter coalescidos.

Na Figura 21 (c) é possível identificar que Q0,2 apresentou 94,7% das partículas na faixa de tamanho entre 0,1-0,3 μm mostrando uma distribuição de partículas estreita. Resultados semelhantes foram obtidos por Huang e Lapitsky, 2011.

A quitosana é extremamente sensível às variações ambientais como: pH, força iônica, ou carga oposta por ser um polieletrólito. A adição de um tampão (NaF) antes da adição do agente reticulante, pode modificar as interações moleculares com íons de reticulação (TPP) conforme estudos realizados por Huang e Lapitsky (2011) onde eles avaliaram influência da adição de um sal monovalente (NaCl) na formação, estrutura e estabilidade coloidal de microgéis de quitosana, obtidos por gelificação ionotrópica, utilizando o tripolifosfato de sódio com agente reticulante. Este estudo revelou que quantidades moderadas de NaCl aumentam a estabilidade coloidal de microgéis de quitosana/TPP e produz uma distribuição de tamanho de partícula menor e mais estreita durante a sua formação, devido ao enfraquecimento da ligação de quitosana/TPP que inibe a formação de “pontes” (*bridging*) entre os microgéis recém formados (Huang e Yan Lapitsky, 2011).

4.3.3 Ensaio Citotoxicidade

A Figura 22 mostra os resultados de viabilidade celular para a solução de quitosana (0,14%) (S), solução de quitosana com 0,05%, 0,2% e 2%, de NaF, S0,05%, S0,2% e S2%, respectivamente e as partículas de quitosana avaliadas nesta etapa.

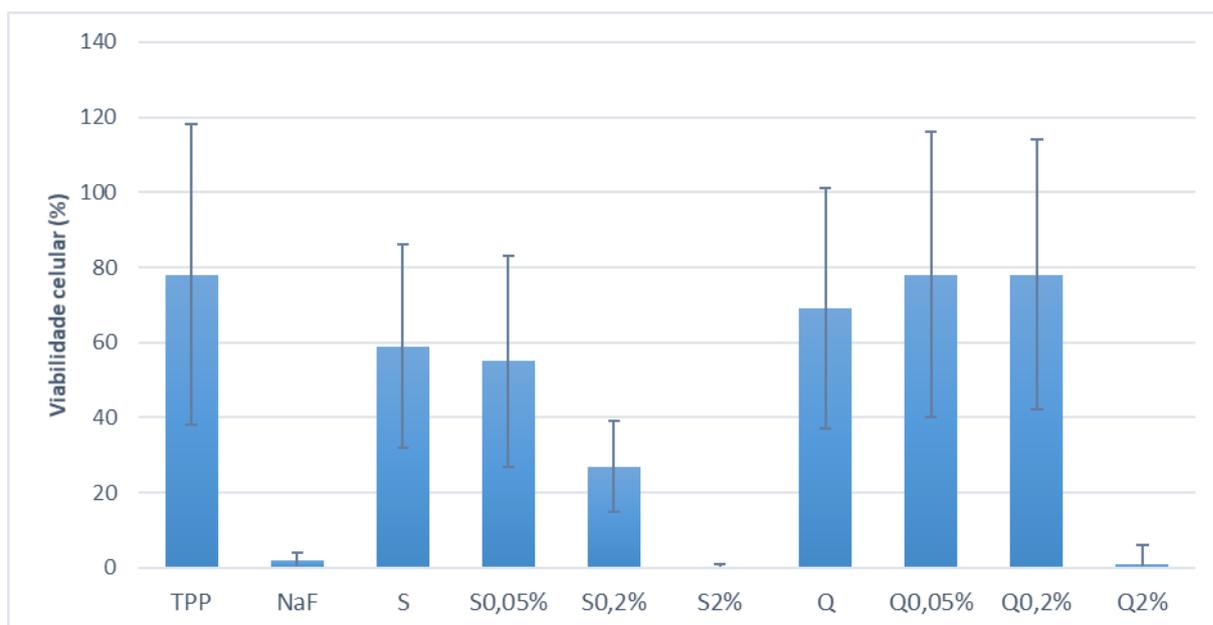


Figura 22- Viabilidade celular das amostras S, S0,05%, S0,2%, S2% Q, Q0,05%, Q0,2% e Q2%.

Ao observar a Figura 22, nota-se que a viabilidade celular para a solução de quitosana é de 59% e com a adição de NaF, essa viabilidade é reduzida. Logo, essas amostras apresentam toxicidade relevante, prejudicial ao metabolismo celular. Já para as partículas de quitosana (Q) apresentam viabilidade em 69% e mesmo com a adição do NaF, as amostras Q0,05% e Q0,2% apresentaram viabilidade celular de 78%, sugerindo que as amostras não apresentam toxicidade a níveis de prejudicar o metabolismo celular, pois de acordo com a norma ISO 10993-5, os materiais que possuem viabilidade a partir de 70% são considerados viáveis.

Liu e colaboradores (2007) avaliaram citotoxicidade das nanopartículas obtidas pelo método de emulsão água-óleo utilizando o glutaraldeído como agente reticulante. Os resultados demonstram que as nanopartículas de quitosana reticuladas não apresentaram toxicidade.

4.3.4 Atividade Antibacteriana

A Figura 23 apresenta placa inoculada com meio de cultura contendo *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 para as amostras estudadas.

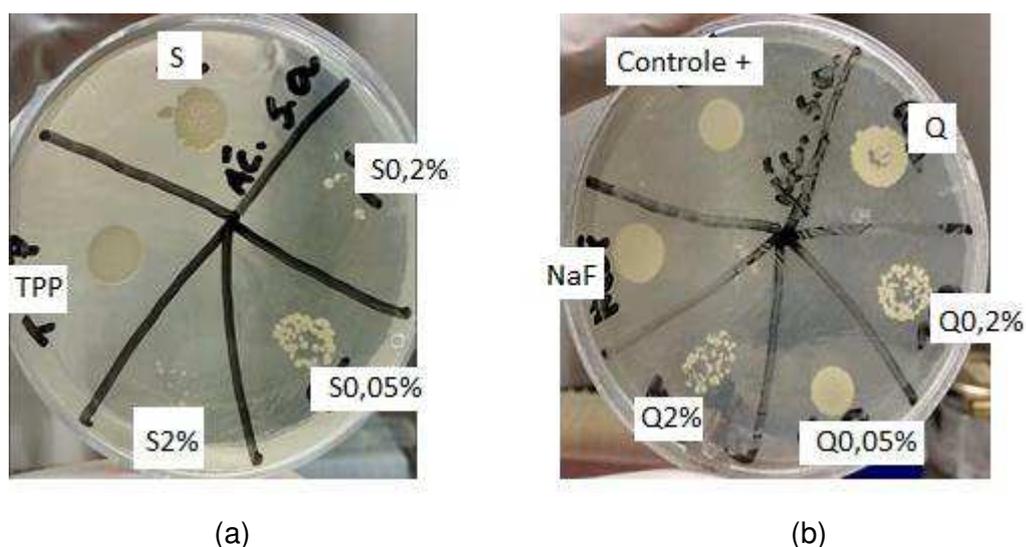


Figura 23- Placa inoculada com meio de cultura contendo *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 para as amostras: (a) TPP, S, S0,05%, S0,2% e S2% e (b) NaF, Controle positivo, Q, Q0,05%, Q0,02% e Q2%.

Conforme apresentado na Figura 23, é possível perceber que para o NaF e TPP houve crescimento bacteriano, e isso já era um resultado esperado, uma vez que o TPP não apresenta propriedade antibacteriana. Já para o NaF, o mesmo possui efeitos bactericidas em altas concentrações (Moynihan; Petersen, 2004; Conceição et al., 2007; Keegan et al., 2012).

Para as amostras S e Q há crescimento bacteriano, diferindo dos resultados apresentados na literatura (Qi et al., 2004; Chang et al., 2015). Isso pode ser atribuído ao pH das amostras 5,1 e 5,6 respectivamente, conforme apresentado na Figura 17, já que atividade antibacteriana da quitosana aumenta à medida que o valor do pH diminui, pois, a presença de mais NH_3^+ favorece a ligação com células bacterianas, causando desestabilização estrutural da bactéria (Chang et al., 2015).

É possível observar, qualitativamente, na Figura 23 que para as amostras: S0,05%, S0,2%, S2%, Q0,2 e Q2%, ocorreu inibição do crescimento bacteriano, e isso pode ser atribuído a presença do flúor.

Também foi possível observar que a atividade antibacteriana foi diretamente proporcional ao potencial zeta uma vez que a *Staphylococcus aureus* é gram-positiva, e as partículas de quitosana são menos eficazes à presença das bactérias Gram-positivas. A carga negativa na superfície da bactéria Gram-negativa favorece a interação das bactérias com as partículas de quitosana (Du et. al, 2009)

Estudos realizados por Chang e colaboradores (2015) observaram o efeito das massas molares (300, 156, 72,1, 29,2, 7,1, e 3,3 kDa) e do pH na atividade antibacteriana (*Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*) da quitosana preparadas por degradação de celulase de quitosana (300 kDa) e técnicas de ultrafiltração. Os resultados obtidos indicaram que a atividade antibacteriana aumenta para a quitosana de elevada massa molar e pH ácido, independente da temperatura (45°C, 37°C, 15°C e 4°C) e do tipo de bactéria (*Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*). A atividade antibacteriana da quitosana aumenta à medida que o valor do pH diminui, pois a presença de mais NH_3^+ favorece a ligação com células bacterianas, causando desestabilização estrutural da bactéria (Chang et al., 2015)

Estudos realizados por Qi e colaboradores (2004), desenvolveram nanopartículas de quitosana e nanopartículas de quitosana carregadas com cobre pelo método de gelificação ionotrópica utilizando o TPP, a fim de avaliar a atividade antibacteriana. Para o estudo eles utilizaram as nanopartículas desenvolvidas, solução de quitosana (0,5% m/v) e doxiciclina, com as seguintes bactérias: *E. coli*, *S. choleraesuis*, *S. typhimurium*, e *S. aureus*. De acordo com os dados obtidos, as nanopartículas de quitosana e as nanopartículas de quitosana carregadas com cobre apresentaram uma atividade antibacteriana mais elevada que a solução de quitosana e doxiciclina. Para algumas bactérias como *S. choleraesuis*, *S. typhimurium* e *S. aureus* as nanopartículas de quitosana apresentaram uma atividade antibacteriana maior (Qi et al., 2004).

Estudos realizados por Du e colaboradores (2009), avaliaram nanopartículas de quitosana obtidas pelo método de gelificação inotrópica e os íons metálicos, Ag^+ , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} foram incorporados em nanosuspensões respectivamente, e foram analisados o potencial zeta, tamanho de partícula e atividade bactericida *in vitro* por concentração inibitória mínima (MIC) e concentração bactericida mínima (MBC) contra *Escherichia coli* 25922, *Salmonella choleraesuis* ATCC 50020 e *Staphylococcus aureus* 25923. Os resultados obtidos indicaram que a atividade antibacteriana da quitosana aumentou com a presença dos íons metálicos com destaque para a prata com MIC de 3 e 6 $\mu\text{g} / \text{ml}$ contra *E. coli* e *S. aureus*, respectivamente.

4.3.5 Caracterização da estabilidade

A Figura 24 apresenta o estudo de estabilidade do diâmetro de partícula e IP das amostras Q, Q0,05%, Q0,2% e Q2% no período de 24h, 40 e 80 dias.

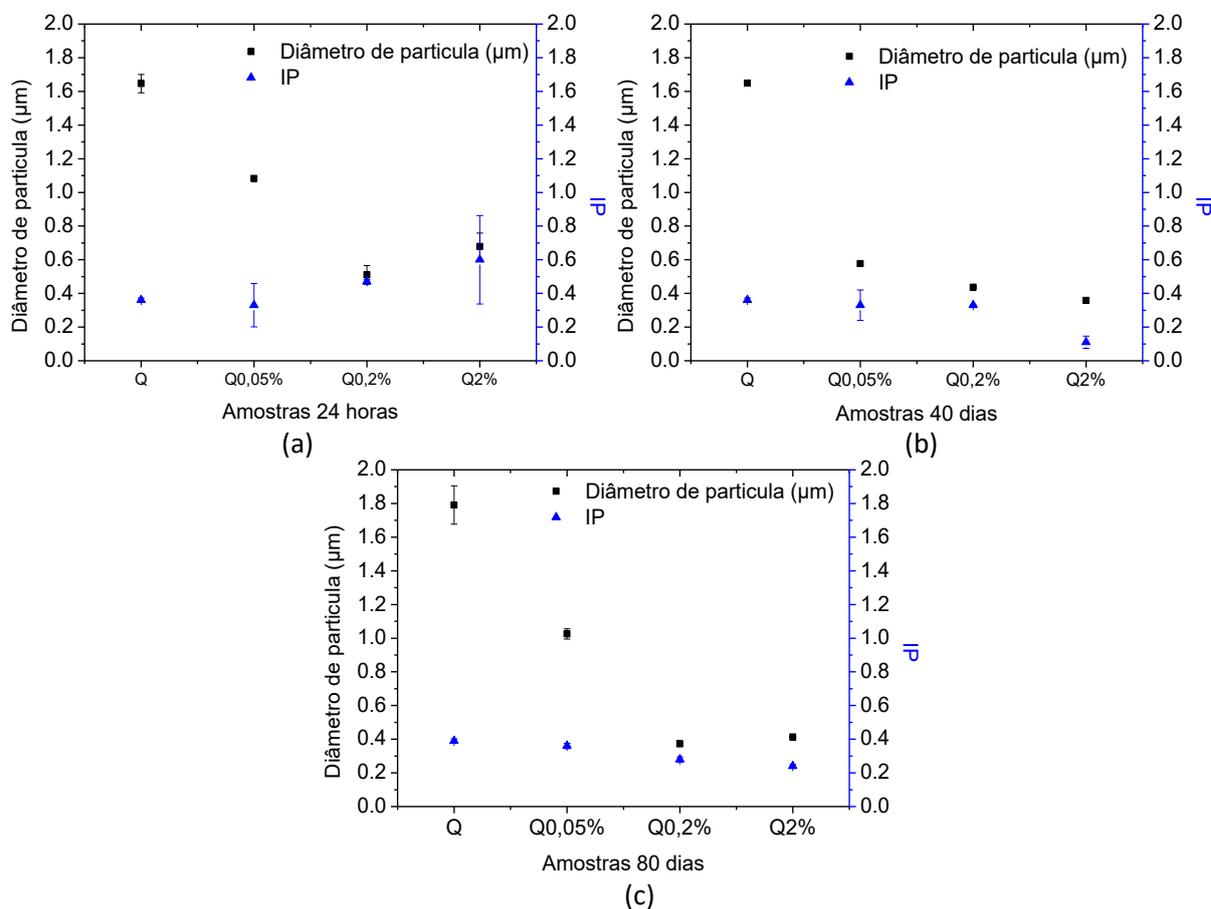


Figura 24- Diâmetro de partícula e IP das amostras Q, Q0,05%, Q0,2% e Q2% no período de 24h, 40 e 80 dias.

Na Figura 24 a, quando compara-se os tamanhos de partículas das amostras armazenadas e avaliadas por 40 e 80 dias, é possível observar que não houve modificações significativas no tamanho de partícula e IP, mostrando que o sistema permaneceu estável corroborando com os resultados obtidos por Nguyen e colaboradores (2017), exceto a amostra Q(0,05%) para 40 dias.

A Figura 25 apresenta o estudo de estabilidade do potencial zeta e pH das amostras Q, Q0,05%, Q0,2% e Q2% no período de 24h, 40 e 80 dias.

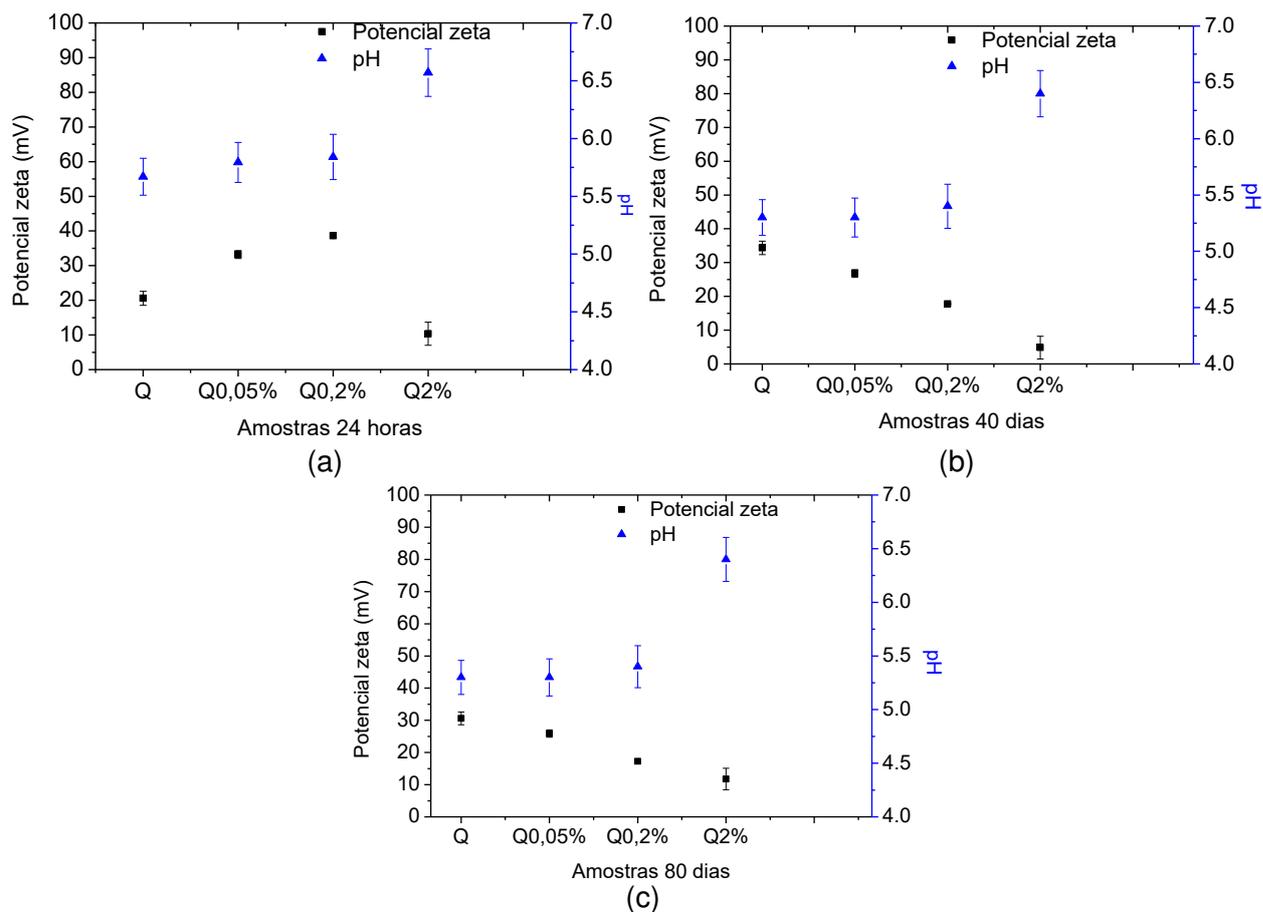


Figura 25- Potencial zeta e pH das amostras Q, Q0,05%, Q0,2% e Q2% no período de 24h, 40 e 80 dias.

Na Figura 25 observa-se que no período de 24 horas quando comparado com os resultados obtidos no período de 40 dias houve redução no potencial zeta para as amostras Q0,05% e Q0,2% com 19,33% e 53,95% respectivamente. Já para o período de 80 dias não houve modificações significativas. Durante o período estudado, os valores de pH das amostras não apresentaram modificações significativas.

A Figura 26 e 27 apresenta as micrografias e EDS das amostras após 21 dias.

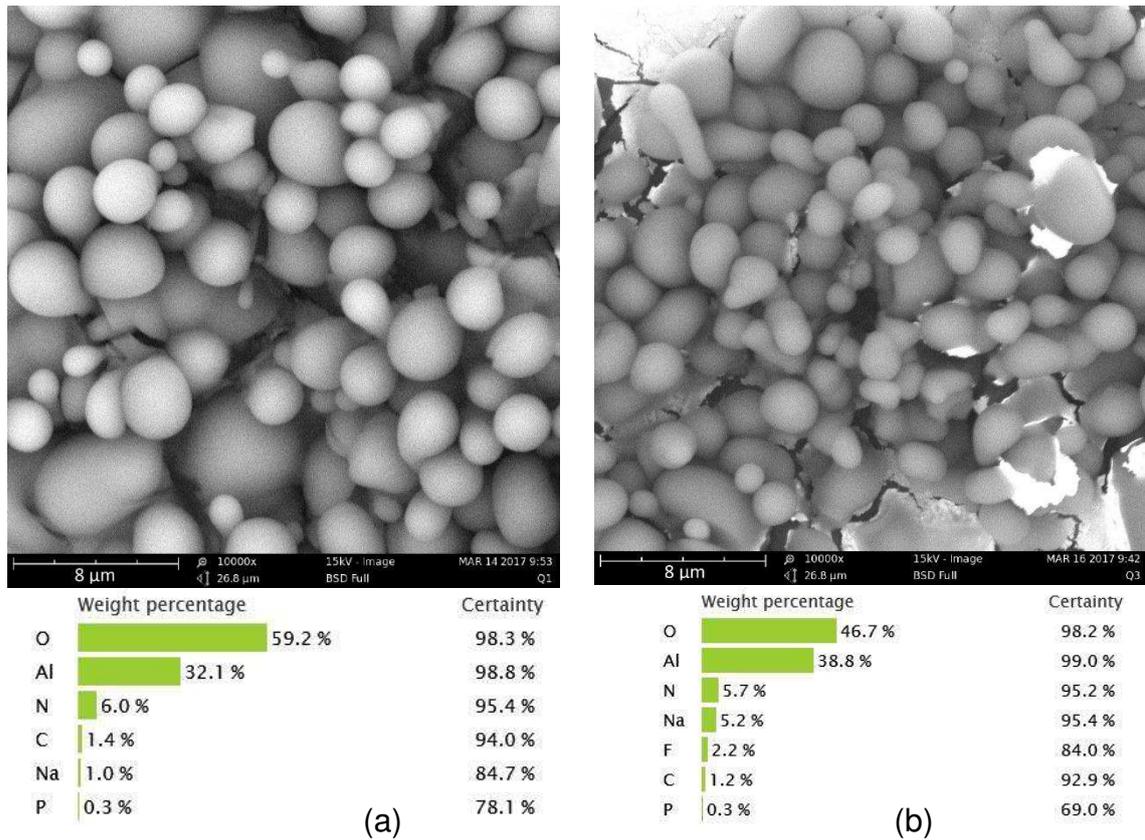


Figura 26- Micrografias (10.000X) e EDS após 21 dias: (a) Q e (b) Q0,05% em 21 dias.

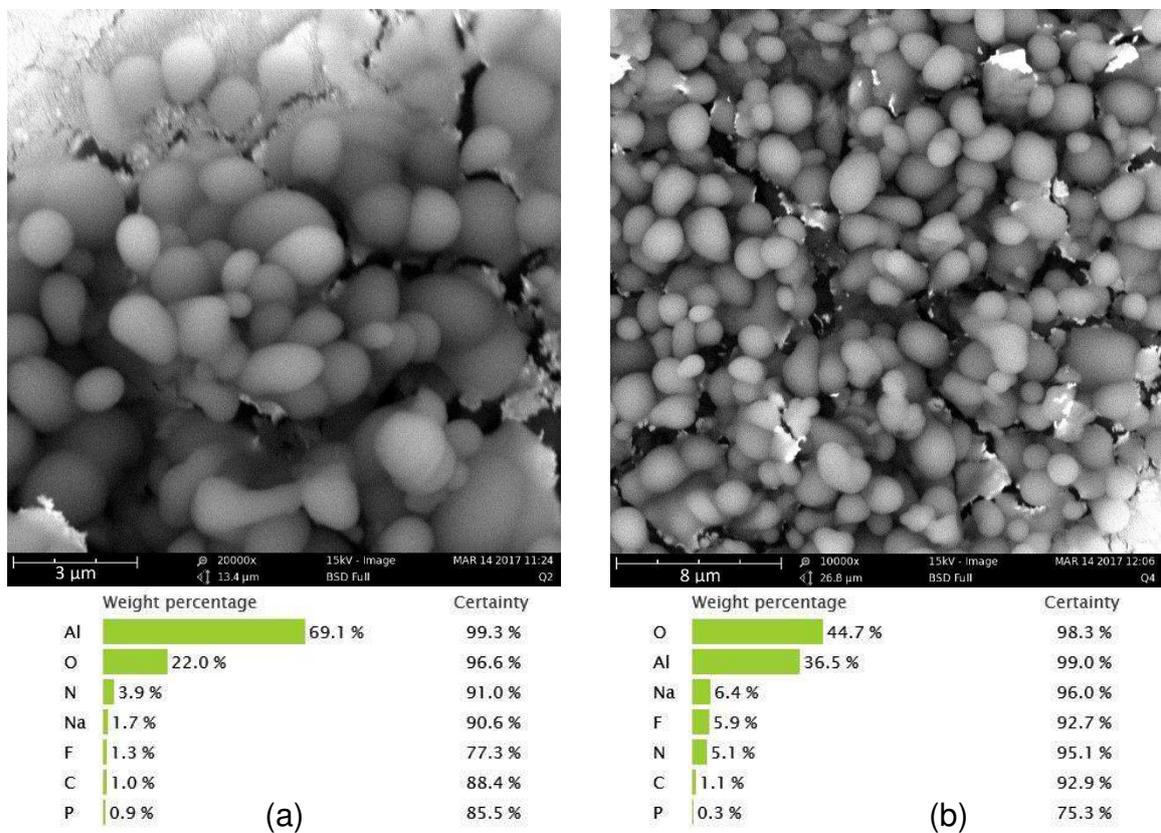


Figura 27- Micrografias e EDS após 21 dias: (a) Q0,2%(20.000X) e (b) Q2% (10.000X) 21 dias.

Na Figura 26 e 27 é possível identificar partículas com formato esférico, superfície lisa, corroborando com os dados apresentados nas Figuras 18 e 19, exceto para amostra Q2%, conforme apresentado na Figura 28.

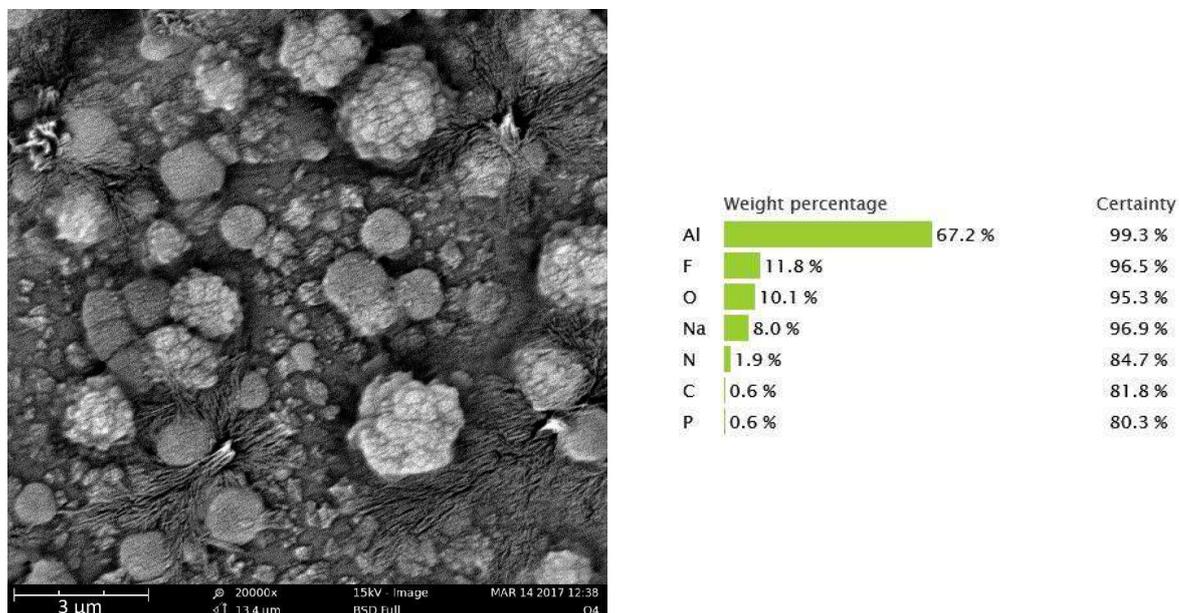


Figura 28- Micrografias (30.000X) e EDS após 21 dia de Q2% em 21 dias.

Por outro lado, apenas Q2% apresentou regiões divergentes quando comparado com outras amostras com NaF (Figura 26 e 27). As partículas mantiveram o formato esférico, embora com superfícies rugosas e maior porcentagem de flúor quando comparadas às demais regiões (Figura 26 (b), e 27(c) e (d)). Como Q2% possui maior quantidade de NaF, pode estar relacionada a um excesso ou a um efeito migratório do F^- na superfície das partículas, corroborando com os dados apresentados na Figura 20.

A Figura 29 apresenta o histograma do diâmetro das partículas obtidas das micrografias apresentadas nas Figuras 26 e 27.

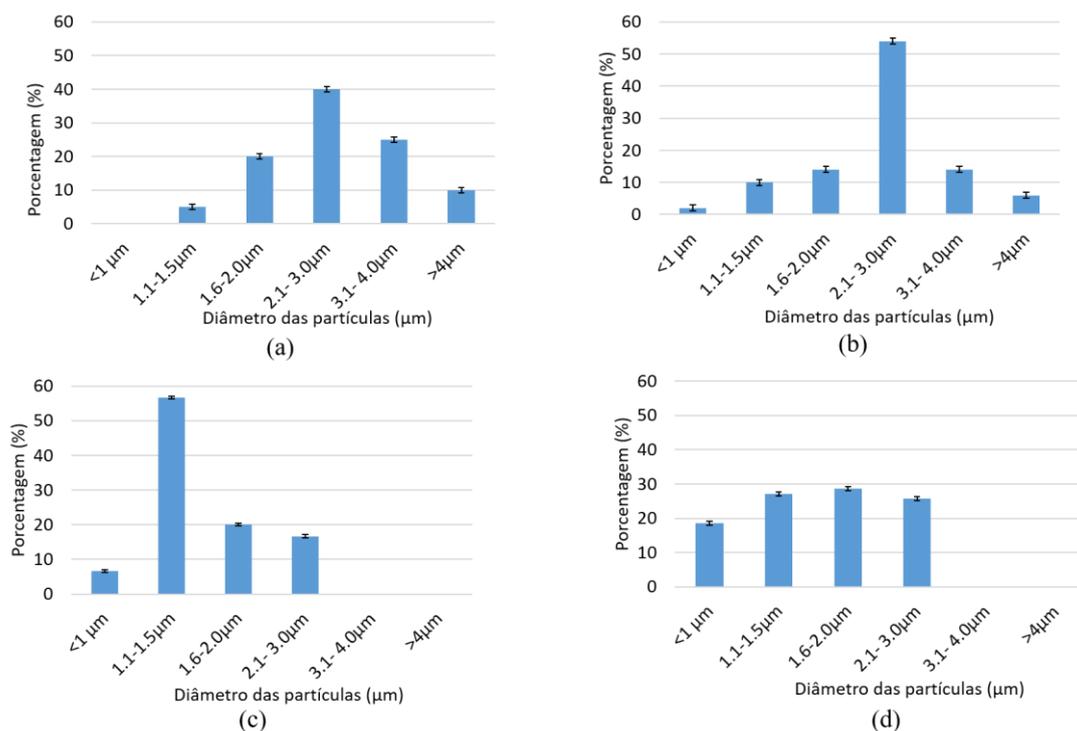


Figura 29- Histograma do diâmetro das partículas após 21 dias: (a)Q; (b)Q0,05; (c)Q0,2 e (d)Q2 em 21 dias.

Ao analisar a Figura 29, pode-se observar que o diâmetro médio obtido pela micrografia da amostra Q foi de 2,78 μm . Para as amostras Q0,05, Q0,2% e Q2% possível observar diâmetros médios de 2,67 μm , 1,61 μm e 1,68 μm , respectivamente. Ao comparar com o diâmetro médio da amostra Q (2,78 μm), as partículas mencionadas apresentaram valores de diâmetro menores.

Na Figura 26 (a) é possível observar que houve coalescência significativa de 69% das partículas para a amostra Q quando comparas com as amostras apresentadas na Figura 24. No entanto, é possível observar na Figura 26 (b) e 27 que a presença de NaF não impediu a coalescência das partículas após o período de 21 dias, 59,4% , 68,32% e 59,6% respectivamente, diferente dos resultados de Nguyen e colaboradores (2017), mas corroborando com os estudos Liu e colaboradores (2007). Isso pode ser atribuído ao aumento do pH e à redução do potencial zeta, com aumento da concentração de NaF, como mostrado na Figura 25, resultando em um sistema instável, corroborando com os dados obtidos por (Liu et al., 2007; Mattu; Li e Ciardelli, 2013) que com aumento de pH e a redução do potencial zeta favorece a formação de agregados.

Embora para a análise do tamanho de partícula apresentada na Figura 24 nos períodos de 40 e 80 dias não houve mudanças significativas, sugerindo que a coalescência das partículas ocorreu durante a etapa de preparação das amostras para realização do MEV, uma vez que as amostras em DLS são intumescidas e no MEV estão desidratadas .

Nguyen e colaboradores (2017) desenvolveram nanopartículas de quitosana/TPP com NaF (0,2% e 0,4% m/v) pelo método de gelificação ionotrópica, para avaliar a estabilidade dessas amostras. As amostras foram armazenadas na geladeira por um período de 30 dias e caracterizadas por DLS para obter o tamanho de partícula e IP. Os resultados obtidos mostram que não houve alterações significativas no tamanho de partícula e IP, para ambas as amostras.

Liu e colaboradores (2007) avaliaram a estabilidade das nanopartículas obtidas pelo método de emulsão água-óleo utilizando o glutaraldeído como agente reticulante com NaF, e foram caracterizadas por DLS. As amostras armazenadas a 4° C por 20 dias apresentaram o tamanho duplicado, porém durante o tempo estudado de 251 dias os tamanhos foram mantidos.

5 CONCLUSÕES

A partir dos estudos realizados nesta tese pode-se concluir que:

- A técnica desenvolvida e adaptada nessa pesquisa demonstrou ser efetiva para a obtenção de partículas de quitosana e partículas de quitosana com NaF.
- De acordo com a literatura, foram obtidos tamanho de partículas que se enquadram na faixa que proporcione uma bioadesão na superfície do esmalte dentário, favorecendo futuras aplicações na área.
- Com os parâmetros experimentais que foram avaliados, três tiveram influência direta no tamanho de partículas obtidas: (1) a razão Q:TPP, (2) velocidade de rotação aplicada, que apresentaram comportamento inversamente proporcional aos valores de tamanho das partículas obtidas; e (3) a presença do NaF nas concentrações estudadas reduziu significativamente o diâmetro médio das partículas proporcionando obtenção de partículas em escala nanométrica, indicando um comportamento inversamente proporcional entre o diâmetro da partícula e a concentração do NaF no sistema.
- A adição do NaF contribuiu para diminuir os valores de potencial zeta, sendo a amostra Q2% que apresentou menor valor, o que deixou o sistema mais instável, favorecendo a formação de aglomerados. De maneira inversa, a adição do NaF elevou os valores de pH próximo à neutralidade.
- Com relação à morfologia das partículas, a adição de NaF não provocou alterações significativas, com exceção da amostra Q2%, que apresentou um excesso de NaF na superfície.
- Do ponto de vista dos testes realizados antevendo futuras aplicações, amostras se mostraram estáveis mesmo após o período de 80 dias armazenadas; as partículas de quitosana com 0,05% e 0,2% de NaF apresentam valores acima do limite estabelecido pela norma ISO 10993-5 no comportamento citotóxico, o que

indica uma possibilidade de ser aplicado em sistemas biológicos, muito embora o caminho regulatório ainda seja longo.

- Para os ensaios microbiológicos iniciais, houve indícios preliminares e qualitativos de que a presença do NaF possibilitou a inibição do crescimento bacteriano para as amostras S0,5%, S0,2%, S2%, Q0,2 e Q2%, o que endossa mais uma vez o potencial de aplicação do material estudado.
- Dentro do universo estudado, a amostra que apresentou resultados mais promissores foi a amostra com 0,2% de NaF, indicando uma estabilidade no sistema, com um controle maior da faixa de tamanho de partícula e probabilidade de uma atividade antibacteriana frente ao biofilme bacteriano. Portanto, sugere-se a continuidade dos testes e futuros estudos, e também uma futura aplicação na área odontológica, para essa amostra.

Os estudos descritos apresentaram aspectos sobre obtenção de partículas de quitosana, destacando três pontos: variáveis de processamento, tamanho de partícula e morfologia. De maneira geral, com o presente trabalho foi possível obter partículas de quitosana e quitosana/NaF de forma satisfatória, cumprindo os objetivos traçados, necessitando de adaptações e sugerindo uma possível aplicação na odontologia preventiva.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLAKER, R. P.; MEMARZADEH, K. International Journal of Antimicrobial Agents Nanoparticles and the control of oral infections. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 43, n. 2, p. 95–104, 2014.

ANITHA, A. DEEPA, N. CHENNAZHI, K. P. NAIR, S. V. TAMURA, H. JAYAKUMAR, R. Development of mucoadhesive thiolated chitosan nanoparticles for biomedical applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, n. 1, p. 66–73, 2011.

ANTONIOU, JOHN LIU, F.; MAJEED, HAMID QI, JING YOKOYAMA, WALLACE ZHONG, F. Physicochemical and Engineering Aspects Physicochemical and morphological properties of size-controlled chitosan – tripolyphosphate nanoparticles. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 465, p. 137–146, 2015.

ARNAUD, T. M. S. **Caracterização e aplicação da quitosana nos processos de des-remineralização do esmalte dentário**. Dissertação, 2008 (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais). Programa de Pós- Graduação em Ciências de Materiais. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco.

ARNAUD, T. M. S.; BARROS NETO, B.; DINIZ, F. B. Chitosan effect on dental enamel de-remineralization : An in vitro evaluation. **Journal dentistry**, v. 38, p. 848–852, 2010.

ASTM E2456-06-2012. **Standard Terminology Relating to Standard Terminology Relating to Nanotechnology 1**, 2012.

BAO, H.; LI, L.; ZHANG, H. Influence of cetyltrimethylammonium bromide on physicochemical properties and microstructures of chitosan – TPP nanoparticles in aqueous solutions. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 328, n. 2, p. 270–277, 2008.

BARATIERI, L. N. A.; CALDEIRADA JÚNIOR, M. A., CARDOSO, S. M.; POLIDORO, A. C.; ANDRADE, J. S. C. A. **Dentística: Procedimentos Preventivos e Restauradores**. 8. ed. Santos: 2002, 2002.

BARBATO, P. R.; NAGANO, H. C. M.; ZANCHET, F. N.; BOING, A. F.; PERES, M. A. Perdas dentárias e fatores sociais, demográficos e de serviços associados em adultos brasileiros: Uma análise dos dados do Estudo Epidemiológico Nacional (Projeto SB Brasil 2002-2003). **Cadernos de Saude Publica**, v. 23, n. 8, p. 1803–1814, 2007.

BARRERAS, U. S. Méndez, F. T.; Martínez, R. E. Valencia, C. S.; Rodríguez, P. R.M. R.; Rodríguez, J. P.L. Chitosan nanoparticles enhance the antibacterial activity of chlorhexidine in collagen membranes used for periapical guided tissue regeneration. **Materials Science and Engineering C**, v. 58, p. 1182–1187, 2016.

BRASIL, M. D. S. **Projeto SBBrasil 2010: Pesquisa nacional de saúde bucal -**

resultados principais, 2011.

CERQUEIRA, D. F. **Fundamentação Teórica: Etiologia e epidemiologia da cárie dentária**. Disponível em:

<http://www.unasus.unifesp.br/biblioteca_virtual/esf/1/casos_complexos/Amelia/Complexo_05_Amelia_Etiologia.pdf>. Acesso em: 5 jun. 2016.

CHANG, S.; LIN, H. V.; WU, J., Tsai, G.J. pH Effects on solubility , zeta potential , and correlation between antibacterial activity and molecular weight of chitosan. **Carbohydrate Polymers**, v. 134, p. 74–81, 2015.

CONCEIÇÃO, E. N.; GONÇALVES, A. M. DILLENBURG, Á. L. K.; CONCEIÇÃO, A. B. CANEPPELE, T. M. F. **Dentística Saúde e estética**. 2. ed. Porto Alegre: 2007, 2007.

COSTA, E M SILVA, S TAVARIA, F K PINTADO, M. M. Study of the effects of chitosan upon Streptococcus mutans adherence and biofilm formation. **Anaerobe**, v. 20, p. 27–31, 2013.

CROISIER, F.; JÉRÔME, C. Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. **European Polymer Journal**, v. 49, n. 4, p. 780–792, 2013.

DASH, M. CHIPELLINI, F. OTTENBRITE, R. M. CHIPELLINI, E. Chitosan - A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. **Progress in Polymer Science (Oxford)**, v. 36, n. 8, p. 981–1014, 2011.

DU, WEN-LI NIU SHAN-SHAN, XU YING-LEI , XU ZI-RONG, F. C. ... FAN, C. L. Antibacterial activity of chitosan triphosphate nanoparticles loaded with various metal ions. **Carbohydrate Polymers**, v. 75, n. 3, p. 385–389, 2009.

FEJERSKOV, O.; KIDD, E. **Cárie dentária: a doença e seu tratamento clínico**. São Paulo: Santos: 2005, 2005.

FIDELES, T. B. **Scaffolds de quitosana para aplicação na engenharia de tecidos**. Tese (Doutorado em Ciência e Engenharia de Materiais). Programa de Pós-graduação em Ciência e Engenharia de Materiais, Universidade Federal de Campina Grande-UFCG, Campina Grande-Paraíba., 2014.

FURTADO, G. T. F. DA S. **Quitosana/Curcumina: membranas de liberação controlada para tratamento de melanoma**. [Dissertação de Mestrado apresentado ao Departamento de Ciência e Engenharia de Materiais da Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande- Paraíba, 2014.

GAN, Q.; WANG, T. COCHRANE, C. McCARRON, P. Modulation of surface charge, particle size and morphological properties of chitosan-TPP nanoparticles intended for gene delivery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 44, n. 2–3, p. 65–73, 2005.

GUTERRES S. S.; POHLMANN A. R. **Nanotecnologia na área de saúde : mercado segurança e regulamentação**. Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial – ABDI. p. 1-50, 2013.

HUANG, R YANG, B LIU, Q DING, K. Removal of fluoride ions from aqueous solutions using protonated cross-linked chitosan particles. **Journal of Fluorine Chemistry**, v. 141, p. 29–34, 2012.

HUANG, Y.; LAPITSKY, Y. Monovalent salt enhances colloidal stability during the formation of chitosan/tripolyphosphate microgels. **Langmuir**, v. 27, n. 17, p. 10392–10399, 2011.

HUANG Y, LAPITSKY Y. Salt-Assisted Mechanistic Analysis of Chitosan/Tripolyphosphate Micro- and Nanogel Formation. **Biomacromolecules**. 13, 3868–3876, 2012.

ISMAIL, A. I.; HASSON, H. Fluoride supplements, dental caries and fluorosis: a systematic review. **The Journal of the American Dental Association**, v. 139, n. 11, p. 1457–1468, 2008.

JONASSEN, H.; KJØNIKSEN, A. L.; HIORTH, M. Effects of ionic strength on the size and compactness of chitosan nanoparticles. **Colloid and Polymer Science**, v. 290, n. 10, p. 919–929, 2012a.

JONASSEN, H.; KJØNIKSEN, A. L.; HIORTH, M. Stability of chitosan nanoparticles cross-linked with tripolyphosphate. **Biomacromolecules**, v. 13, n. 11, p. 3747–3756, 2012b.

KEEGAN, GEMMA M. SMART, JOHN D. INGRAM, MATTHEW J. BARNES, LARA MARIE R., BURNETT GARY REES, G. D. Chitosan microparticles for the controlled delivery of fluoride. **Journal of Dentistry**, v. 40, n. 3, p. 229–240, 2012.

KULSHRESTHA, SHATAVARI KHAN, SHAKIR HASAN, SADAF KHAN, M. E. Calcium fluoride nanoparticles induced suppression of *Streptococcus mutans* biofilm : an in vitro and in vivo approach. **Appl Microbiol Biotechnol**, 2015.

LIN, Y. H.; SONAJE, K. LIN, K. M.; JUANG, J.; MI, F.; YANG, H.; SUNG, H. W. Multi-ion-crosslinked nanoparticles with pH-responsive characteristics for oral delivery of protein drugs. **Journal of Controlled Release**, v. 132, n. 2, p. 141–149, 2008.

LIPPERT, F.; PARKER, D. M.; JANDT, K. D. In vitro demineralization/remineralization cycles at human tooth enamel surfaces investigated by AFM and nanoindentation. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 280, n. 2, p. 442–448, 2004.

LIU, HUI, BO CHEN, MAO, ZHENGWEI, GAO, C. Chitosan Nanoparticles for Loading of Toothpaste Actives and Adhesion on Tooth Analogs. **Polymers and Polymer Composites**, v. 21, n. 7, p. 449–456, 2007.

MATTU, C.; LI, R.; CIARDELLI, G. Chitosan Nanoparticles as Therapeutic Protein Nanocarriers: the Effect of pH on Particle Formation and Encapsulation Efficiency. **Polymer Composites**, v. 16, n. 2, p. 101–113, 2013.

MOYNIHAN, P.; PETERSEN, P. E. Diet, nutrition and the prevention of dental diseases. **Public Health Nutrition**, v. 7, p. 201–226, 2004.

NGUYEN, SANKO ESCUDERO, C.; SEDIQI, NADIA SMISTAD, GRO HIORTH, M. Fluoride loaded polymeric nanoparticles for dental delivery. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 104, p. 326–334, 2017.

PANDIT, SANTOSH KIM, GA-RAM LEE, MIN-HO JEON, J. Evaluation of Streptococcus mutans biofilms formed on fluoride releasing and non fluoride releasing resin composites. **Journal of Dentistry**, v. 39, n. 11, p. 780–787, 2011.

PEREIRA, A. C. ASSAF, A. V. A RONCALLI, A. GIUSEPPEPERES, A. S. **Odontologia em saude coletiva: planejando acoes e promovendo saude**. Artmed ed. Porto Alegre: 2003, 2003.

QI, LIFENG XU, ZIRONG JIANG, X.; HU, CAIHONG ZOU, X. Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles. **Carbohydrate Research**, v. 339, p. 2693–2700, 2004.

SAMIEI, MOHAMMAD FARJAMI, AFSANEH MALEKI, SOLMAZ LOT, F. Nanoparticles for antimicrobial purposes in Endodontics: A systematic review of in vitro studies. **Materials Science and Engineering C**, v. 58, p. 1269–1278, 2016.

SAWTARIE, N.; CAI, Y.; LAPITSKY, Y. Preparation of chitosan/tripolyphosphate nanoparticles with highly tunable size and low polydispersity. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 157, p. 110–117, 2017.

SIPOLI, C. C. SANTANA, N SHIMOJO, A. A. M. AZZONIB, A. TORRE, L. G. D. L. Scalable production of highly concentrated chitosan / TPP nanoparticles in different pHs and evaluation of the in vitro transfection efficiency. **Biochemical Engineering Journal**, v. 94, p. 65–73, 2015.

SOUSA, R P ZANIN, I. C. J.; LIMA, J P M VASCONCELOS, S M L C MELO, M A S BELTRA, H C P RODRIGUES, L. K. A. In situ effects of restorative materials on dental biofilm and enamel demineralisation. **Journal of dentistry**, v. 37, p. 44–51, 2009.

TAMAKI, C. H.; RAMOS, L. F.; PEIXINHO, R. **Bebeu algo gelado ou quente ? Isso tem nome : sensibilidade dentinária!** Disponível em: <<http://blogdaseguros.com.br/ja-sentiu-aquela-dorzinha-quando-bebeu-algo-gelado-ou-quente-isso-tem-nome-sensibilidade-dentinaria/>>. Acesso em: 21 jul. 2016.

TSAI, M. L.; BAI, S. W.; CHEN, R. H. Cavitation effects versus stretch effects resulted in different size and polydispersity of ionotropic gelation chitosan-sodium tripolyphosphate nanoparticle. **Carbohydrate Polymers**, v. 71, n. 3, p. 448–457, 2008.

WANG, Z.; SHEN, Y.; HAAPASALO, M. Dental materials with antibiofilm properties. **Dental Materials**, v. 30, n. 2, p. e1–e16, 2014.

WANGA Z; SHENA, Y.; HAAPASALOA, M. Dental materials with antibiofilm properties. **Dental Materials**, v. 30, n. 2, p. e1–e16, 2013.

XU, HOCKIN H K MOREAU, JENNIFER L SUN, LIMIN CHOW, L. C. Biomaterials Strength and fluoride release characteristics of a calcium fluoride based dental nanocomposite. **Biomaterials**, v. 29, p. 4261–4267, 2008.

ZHANG, LIJIE WEBSTER, T. J. Nanotechnology and nanomaterials : Promises for improved tissue regeneration. **Nano Today**, v. 4, p. 66–80, 2009.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Dentro do trabalho desenvolvido nesta tese, surgiram novas possibilidades de estudo para serem realizadas em futuras pesquisas:

- Realizar o ensaio de liberação controlada das partículas de quitosana com NaF;
- Realizar ensaios microbiológicos quantitativos, especialmente o teste de Concentração inibitória mínima (CIM) com diferentes concentrações das amostras e Concentração bactericida mínima (CBM), e utilizando a *Streptococcus mutans* entre outras bactérias e leveduras;
- Realizar o teste de desmineralização *in vitro* e *in vivo*;
- Realizar ensaios citotóxicos com células extraídas da mucosa oral.