



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Odontologia de Bauru

MARIANA DOS SANTOS SILVA

Análise Bioquímica e Funcional de Bandagem Bucal
Antimicrobiana



BAURU
2013

MARIANA DOS SANTOS SILVA

**Análise Bioquímica e Funcional de Bandagem Bucal
Antimicrobiana**

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

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

Versão Corrigida

BAURU
2013

Si38a Silva, Mariana dos Santos
 Análise bioquímica e funcional de bandagem
 bucal antimicrobiana./Mariana dos Santos Silva. –
 Bauru, 2013.
 90p. : il. ; 31cm.

 Dissertação (Mestrado) – Faculdade de
 Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo

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

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

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

Assinatura:

Data:

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho para as pessoas mais importantes da minha vida,
que sempre estiveram ao meu lado me apoiando e me incentivando.

Meus pais Marcos Lupércio e Terezinha Dulce,

Meu esposo Anderson.

Obrigada pela força e dedicação, amo vocês.

Essa vitória é nossa...

AGRADECIMENTOS

Este trabalho resume uma fase de grande crescimento acadêmico e pessoal da minha vida. Um sonho realizado. Durante esses 2 anos muitas mudanças aconteceram. Sou muito grata primeiramente a Deus por me dar forças e discernimento durante esse trabalho.

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

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

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

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

Profa. Dra. Marília Afonso Rabelo Buzalaf; obrigada por acreditar em mim e por possibilitar os meus estudos e a minha qualificação profissional nesses anos. A senhora sempre foi muito pronta e atenciosa. Sempre que me encontrava perguntava do meu trabalho, obrigada pela atenção.

Prof. Dr. Gustavo Pompermaier Garlet; obrigada por toda atenção dedicada durante minha defesa. Foi uma surpresa poder contar com toda sua inteligência e atenção. Obrigada por todas as colocações e sugestões. Sempre te admirei e agora com esse contato mais próximo minha admiração aumentou ainda mais. Muito obrigada.

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

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

Agradeço primeiramente a CAPES, e depois a FAPESP pelo apoio financeiro N. FAPESP 2011/14667-1, sem o qual esta pesquisa não poderia ter sido realizada, muito obrigada.

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

Tia Valdir muito obrigada por fazer da casa da senhora a minha casa. Sem essa ajuda meu trabalho teria sido muito mais difícil. Muito obrigada.

Quero agradecer minha amiga de todas as horas Soraia Veloso da Costa por sua sincera amizade, sempre sorridente e preocupada, sempre atenta e calada, mas uma menina de coração puro e sentimentos verdadeiros. Uma amiga pra toda a vida. Amiga que a distância não separe a amizade que construímos. Te adoro. Muito obrigada por tudo. Tia Rose e D. Lourdes obrigada pela amizade e dedicação.

As minhas amigas: Marina Menegazzo, Natália Trovijo, Maria Beatriz Faria, Luciana Casemiro, Athena Vaz muito obrigada pelo apoio e palavras sempre amigas.

Flávia Amadeu de Oliveira sua ajuda foi essencial, sem você minhas células não teriam saído da garrafa. MUITÍSSIMO obrigada pela atenção, disposição, cuidado, disponibilidade entre outros adjetivos. Jamais esquecerei sua maravilhosa ajuda. Muito obrigada

Camila e Lilian conhecer vocês e poder partilhar de sua amizade foi muito bom nesse período.

Aos meus colegas de mestrado Gabriel, Ana Cristina, Catarina, Juliherme, Priscila, Nádia, Gabriela, Adriana muito obrigada por dividir comigo alguns momentos acadêmicos.

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

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

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

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

*"A felicidade não está em viver, mas em saber viver. Não vive mais o que
mais vive, mas o que melhor vive."
(Mahatma Gandhi)*

RESUMO

O efeito de fármacos pode ser potencializado através do desenvolvimento de novos sistemas de liberação como os sistemas mucoadesivos. Estes sistemas permanecem em contato íntimo com o tecido de absorção, às mucosas, liberando o fármaco no local de ação, com o conseqüente aumento da biodisponibilidade, podendo promover efeitos locais e sistêmicos. Através do desenvolvimento da bandagem bucal antimicrobiana e testadas sua eficiência sobre a cultura de algumas bactérias bucais (*S. mutans* e *C. albicans*) se fez necessário continuar os estudos desse material. O objetivo deste trabalho foi analisar as propriedades bioquímicas e funcionais da bandagem bucal antimicrobiana no que tange a: degradação no meio salivar; adequação da composição para a melhoria da aderência à mucosa bucal; desempenho quanto à liberação controlada de fármacos; absorção de água, perda de massa; medida do pH do líquido residual em diferentes períodos de tempo; citotoxicidade da bandagem em cultura de fibroblastos. As bandagens avaliadas tinham diferentes composições quitosana, quitosana com glicerol, quitosana e alginato com/sem glicerol, e todas com/sem fármaco. Através das análises realizadas foi possível observar que as bandagens que absorveram mais água em tampão foi a membrana híbrida (203%) e em saliva foi a híbrida com glicerol (30%). A membrana que perdeu mais massa em tampão e em saliva foi a híbrida com glicerol (40% e 30%), isso quer dizer que elas se decompõe e liberam suas propriedades no meio. A liberação controlada do fármaco pode avaliar que a membrana híbrida liberou de forma crescente o fármaco (0,075%), facilitando sua liberação. No teste de citotoxicidade todas as bandagens com fármaco foram citotóxicas, já as bandagens de quitosana e quitosana com glicerol promoveram o crescimento celular.

Palavras-chave: Citotoxicidade celular anticorpo-dependente/ Quitosana/ Técnicas de cultura de células/ Alginato

ABSTRACT

Biochemical and functional analyses in antimicrobial oral-aid

The effect of drugs may be enhanced through the development of new delivery systems as mucoadhesive systems. These systems remain in intimate contact with the tissue absorption, in this case the mucosa, releasing the drug at the site of action, with the consequent increase in bioavailability and may promote local and systemic effects. Mucoadhesion is currently explained by six theories: electronics, adsorption, wetting, diffusion, fracture and mechanics (Carvalho et al., 2010). In 2011, Kloster et al. developed an oral bandage and tested antimicrobial efficiency in the culture of some oral bacteria (*Streptococcus mutans* and *C. albicans*), the results were promising. The aim of this study was to analyze the biochemical and functional properties of oral antimicrobial bandage with respect to: the salivary environment degradation; the composition adjustment for improving the adherence to the buccal mucous membrane; the performance as to the controlled releasing of drugs; water absorption while analyzing the mass loss; pH measurements of the residual liquid in different periods of time; the plaster cytotoxicity in cell and fibroblast culture. Through the analyzes it was observed that the bandages absorb water and lose mass, it means that they decompose and release their property in the middle. The bandages with drug in viability analysis were cytotoxic cell and different concentrations of drug should be study.

Key-words: Antibody-Dependent Cell Cytotoxicity/ Bandage/ Chitosan/ Cell Culture Techniques

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURAS

Figura 1 - Preparo dos géis de quitosana e alginato respectivamente	47
Figura 2 - Manipulação das culturas celulares em fluxo laminar e disposição das placas de 96 poços e garrafas na estufa de CO ₂	56
Figura 3 - Leitor de fluorescência (Fluostar Óptima – BMG LABTECH).....	57
Figura 4 - Microplaca com as bandagens (1 a 8 tipos de membranas, C+ (controle positivo), C- (controle negativo), B (blank) em octoplicatas.....	57
Figura 5 - Absorção de água (%) das membranas em PBS após o período de incubação de 5 dias.....	62
Figura 6 - Perda de massa (%) das membranas em PBS após o período de incubação de 5 dias.....	63
Figura 7 - Absorção de água (%) das membranas em solução de saliva artificial após o período de incubação de 3 dias.....	64
Figura 8 - Perda de massa (%) das membranas em solução de saliva artificial após o período de incubação de 3 dias.....	65
Figura 9 - Medida de pH das amostras em solução de PBS	66
Figura 10- Medida de pH das amostras em solução de saliva artificial.....	67
Figura 11- Ensaio de liberação controlada da clorexidina analisada no período de 5 dias.....	68
Figura 12- Média e desvio-padrão da densidade óptica (DO) do extrato puro das bandagens.....	69
Figura 13- Média e desvio-padrão da densidade óptica (DO) da diluição das bandagens 1:1.....	70

- GRÁFICO

Gráfico 1 - Espectro de absorção do fármaco preparado em água deionizada.....	49
Gráfico 2 - Curva padrão do agente da clorexidina preparada em água Milli-Q ultrapura ($Y = 0,0059 X + 0,01544$) e $R^2 = 0,99$	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Ordem de adição dos reagentes para o preparo do tampão PBS.....	51
Tabela 2 - Composição da solução de saliva artificial.....	52
Tabela 3 - Classificação dos grupos experimentais.....	54
Tabela 4 - Componentes do meio Dulbecco's MEM	54

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REVISÃO DE LITERATURA	25
2.1	BIOMATERIAIS	27
2.2	BIOMATERIAIS COM APLICAÇÃO NA ÁREA DA SAÚDE	29
2.3	POLÍMEROS NATURAIS	30
2.4	MEMBRANAS E FILMES	31
2.5	ALGINATO	32
2.6	QUITINA E QUITOSANA	33
2.6.1	<i>Propriedades da quitosana</i>	34
2.7	QUITOSANA NA ODONTOLOGIA	35
2.8	GLICEROL	37
2.9	CLOREXIDINA	38
3	PROPOSIÇÃO	41
4	MATERIAL E MÉTODOS	45
4.1	PREPARO DOS GÉIS	47
4.1.1	<i>Preparo do gel de quitosana</i>	47
4.1.2	<i>Preparo do gel de alginato</i>	47
4.2	PREPARO DAS MEMBRANAS DA QUITOSANA	48
4.3	PREPARO DAS MEMBRANAS HÍBRIDAS	48
4.4	INCORPORAÇÃO DO FÁRMACO	48
4.5	DETERMINAÇÃO DO FÁRMACO POR ESPECTROFOTÔMETRO	48
4.5.1	<i>Curva padrão de clorexidina</i>	49
4.6	TESTE DE LIBERAÇÃO CONTROLADA DA CLOREXIDINA	50
4.7	PREPARO DA SOLUÇÃO TAMPÃO (PBS)	51
4.8	PREPARO DA SOLUÇÃO DE SALIVA ARTIFICIAL	51
4.9	ENSAIOS DE ABSORÇÃO DE ÁGUA E PERDA DE MASSA	52
4.10	CITOTOXICIDADE DA BANDAGEM EM CULTURA DE CÉLULAS	53
4.10.1	<i>Cultura Celular</i>	53
4.10.2	<i>Preparo dos extratos com as bandagens solubilizadas</i>	53

4.10.3	<i>Ensaio de viabilidade celular</i>	55
4.10.4	<i>Redução do MTT</i>	56
5	RESULTADOS	59
	ENSAIOS DE ABSORÇÃO DE ÁGUA E DE PERDA DE MASSA EM	
5.1	PBS	61
	ENSAIOS DE ABSORÇÃO DE ÁGUA E PERDA DE MASSA EM	
5.2	SALIVA ARTIFICIAL	63
5.3	MEDIDA DE PH	65
5.3.1	<i>pH em tampão PBS</i>	65
5.3.2	<i>pH em solução de saliva artificial</i>	66
5.4	LIBERAÇÃO DO FÁRMACO	67
	CITOTOXICIDADE DA BANDAGEM EM CULTURA DE	
5.5	FIBROBLASTOS	68
6	DISCUSSÃO	71
6.1	ABSORÇÃO DE ÁGUA E PERDA DE MASSA	73
6.2	CITOTOXICIDADE E LIBERAÇÃO DE FÁRMACO	74
6.3	AVALIAÇÃO DO PH	75
7	CONCLUSÕES	77
	REFERÊNCIAS	81

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

As pesquisas e o desenvolvimento em biomateriais assim como suas aplicações na área da saúde mostram-se cada vez mais importantes e instigam a busca por novos polímeros com propriedades bioativas, biodegradabilidade, atoxicidade e com diferentes aplicações.

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

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

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

As literaturas científicas atuais encontram-se bem documentadas com publicações que empregaram a quitosana em diversas aplicações na engenharia tecidual, na liberação controlada de fármacos e também como biossensores para diagnóstico clínico (PARK et al., 2010; JAYAKUMAR et al., 2011).

A quitosana apresenta propriedades promissoras para a formação de *scaffolds* usados em engenharia de tecidos pelas suas características que são: mínima reação com corpo estranho, ausência de resposta inflamatória crônica, ausência de encapsulamento fibroso, favoráveis efeitos quimioatrativos,

acompanhado por excelentes recursos tecnológicos que permitem processá-la em estruturas porosas ou nanofibrilares (MUZZARELLI et al., 2012).

Além da quitosana outro polímero que vem recebendo destaque é o alginato que é solúvel em meio aquoso tornando-se interessante para aplicações biomédicas.

O alginato de sódio é um sal de sódio do ácido algínico, sendo um polímero aniônico solúvel em água. Pode ser extraído de diversos tipos de algas principalmente três espécies marrons a *Laminaria hyperborean*, *Ascophyllum nodosum* e *Macrocystis pyrifera*. A utilização deste polímero é de extrema importância para o tratamento de feridas de difícil cicatrização, pois é considerado relativamente inerte, biocompatível, biodegradável e possui a capacidade de formar matrizes de gel de elevada porosidade com boas propriedades mucoadesivas (PAUL & SHARMA, 2004; FAN et al., 2006).

A união desses dois polímeros (quitosana e alginato) proporciona o desenvolvimento de um complexo polieletrólítico no qual ocorre uma interação eletrostática entre os grupos amino da quitosana e os grupos carboxil do alginato, promovendo uma eficiência maior na liberação controlada de fármacos e na absorção dos fluídos das lesões (YAN et al., 2000; WANG et al., 2001).

Há tempos a odontologia busca um elemento terapêutico que possa ser aplicado na cavidade oral, que fique aderido à mucosa bucal para o tratamento de feridas cirúrgicas, áreas com feridas oriundas de traumatismos físicos e/ou químicos e em outros tipos de lesões bucais ulceradas. Esta questão se faz particularmente significativa quando relacionada ao tratamento de crianças com traumatismos bucais, onde o tratamento pós-trauma muitas vezes não é realizado adequadamente, principalmente por dificuldades da realização de curativos e/ou aplicação de medicamentos topicamente, devido ao comportamento das mesmas.

O uso de fármacos incorporados a esses biomateriais pode ser potencializado através do desenvolvimento de novos sistemas de liberação como os sistemas mucoadesivos. Estes sistemas permanecem em contato íntimo com o tecido de absorção, às mucosas, liberando o fármaco no local de ação, com o conseqüente aumento da biodisponibilidade, podendo promover efeitos locais e sistêmicos. A mucoadesão, atualmente, é explicada por seis teorias: a eletrônica, a adsorção, a molhabilidade, a difusão, a fratura e a mecânica (CARVALHO et al., 2010).

Com o desenvolvimento da bandagem bucal antimicrobiana e testada sua eficiência sobre a cultura de algumas bactérias bucais (*S. mutans* e *C. albicans*) com resultados promissores, suscitou alguns questionamentos que uma vez elucidados poderão contribuir para o aprimoramento deste dispositivo para sua utilização na prática clínica num futuro próximo (KLOSTER et al., 2011).

Sendo assim, se faz pertinente a realização de estudos que possam aprimorar a bandagem bucal antimicrobiana no que tange às suas propriedades bioquímicas e funcionais.

2 Revisão de Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Biomateriais

Nas duas últimas décadas, os polímeros usados a partir de recursos renováveis (PFRR) têm atraído cada vez mais atenção no mercado, por duas razões principais: por preocupações ambientais e a percepção de que os recursos de petróleo podem se tornar escassos. Outra razão para o interesse crescente em polímeros a partir de recursos renováveis, refere-se a agregação de valor aos produtos agrícolas, sendo economicamente importante para muitos países. Os polímeros produzidos a partir de recursos renováveis são classificados em três grupos: (1) polímeros naturais, tais como amido, proteínas, celulose; (2) polímeros sintéticos naturais a partir de monômeros, tais como poli (ácido láctico); (3) polímeros obtidos pela fermentação microbiana como poli (hidroxibutirato). A grande vantagem de todos estes materiais é que eles são biodegradáveis, e que os produtos finais de degradação são ecologicamente corretos (YU, 2008).

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

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

Com o avanço da ciência surgiram os biomateriais que são classificados como substâncias ou a combinações delas, sintéticas ou naturais, que podem ser usadas por um certo período de tempo, completa ou parcialmente, como parte de

um sistema para tratar, aumentar ou substituir qualquer tecido, órgão ou função do corpo (RATNER, 1996).

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

Os biomateriais são desenvolvidos a medida que surge a necessidade, elas variam de acordo com a sua aplicação específica. Diversas situações clínicas, dentre elas as queimaduras, traumatismos, infecções, doenças autoimunes e as feridas complexas necessitam desses produtos. As feridas complexas podem resultar na perda parcial ou completa do revestimento cutâneo sendo necessária a reposição tecidual (FERREIRA et al., 2011).

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

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

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

Os polímeros bioreabsorvíveis mais estudados são o poli (ácido láctico) ou PLA, poli (ácido glicólico) ou PGA, poli p-dioxanona ou PDS, poli (hidroxibutirato) ou

PHB e poli (hidroxibutirato)-co-poli (hidroxivalerato) ou PHVB. Todos são substâncias que sofrem degradação principalmente por hidrólise através da cisão das ligações ésteres, formando grupos terminais carboxila e hidroxila. Os produtos da degradação são incorporados ao ciclo dos ácidos tricarbóxicos e eliminados pelo organismo como dióxido de carbono e água (DUEK et al., 1999).

2.2 Biomateriais com aplicação na área da saúde

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

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

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

Os polímeros biodegradáveis sintéticos ou naturais estão sendo desenvolvidos para aplicações biomédicas resultantes de pesquisas nas áreas de engenharia tecidual, liberação controlada de fármacos e bionanotecnologia, todos

necessitam de materiais biodegradáveis na sua composição (NAIR e LAURENCIN, 2007).

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

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

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

2.3 Polímeros naturais

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

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

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

A classificação desses materiais está relacionada com sua estrutura como polissacarídeos, poliésteres e poliamidas. São obtidos com frequência a partir de fontes de carbono renováveis. Os exemplos dessa fonte são: carboidratos derivados de cana-de-açúcar, milho, batata e os óleos vegetais que podem ser extraídos de soja, girassol entre outras sementes (PRADELLA, 2006).

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

2.4 Bandagem e filmes

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

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

Várias técnicas podem ser utilizadas para a produção de filmes e membranas, o que define qual a melhor técnica é a característica do gel e seus componentes dissolvidos, podendo ser obtidos através do escoamento do gel sobre uma superfície plana para sua completa secagem ou por uma técnica mais elaborada denominada automontagem. Os filmes obtidos por automontagem tem algumas vantagens pois são homogêneos, mais finos e com menos irregularidade na superfície diferindo dos filmes produzidos obtidos por escoamento (ASSIS E SILVA ,2003).

As primeiras tentativas de produção de filmes ultrafinos de moléculas orgânicas foram feitas ainda no começo do século XX por Langmuir e mais tarde por Blodgett, o que levou ao nome da técnica de Langmuir-Blodgett (LB). A técnica consiste em dissolver moléculas como os ácidos graxos em solvente orgânico volátil apropriado (incompatível com a água) e, posteriormente, dispersadas sobre a superfície da água contida em uma cuba, conhecida como cuba de Langmuir. Com a compressão do filme formado, as moléculas tomam a conformação mais estável, ou seja, sua porção hidrofílica (cabeça) interage com a superfície da água, enquanto que a sua parte hidrofóbica (cauda) é projetada acima dela. A cuba é dotada de um

sistema de compressão, o qual pressiona horizontalmente as moléculas dispersas, até que uma camada compacta seja formada. Essa camada possui a espessura igual ao comprimento da molécula dispersa, ou seja, é monomolecular, e pode ser transferida lentamente para um substrato adequado. Para a produção de filmes com multicamadas é necessária a realização de imersões e retiradas subseqüentes do polímero em um mesmo substrato (LANGMUIR, 1917; BLODGETT, 1935; MATTOSO et al., 1996).

2.5 Alginato

O alginato de sódio é um polissacarídeo linear obtido a partir de algas marron ou bactérias e é composto por resíduos dos ácidos β -D-manurônico e α -L-gulurônico na forma de sal de sódio, unidos por ligações glicosídicas (1 \rightarrow 4) e distribuídos em diferentes proporções ao longo da cadeia. Características como a ação gelificante e espessante, biodegradabilidade, biocompatibilidade e ausência de toxicidade tornam o alginato de sódio um material interessante para inúmeras aplicações (SMIDSROD & SKJAK- BRAEK, 1990; JOHNSON et al., 1997).

Filmes de alginato têm sido estudados com o objetivo de utilizá-los em embalagens, cobertura e proteção de diferentes materiais, matriz ou cobertura reticulada para sistemas de liberação de fármacos e no encapsulamento de células vivas (NAJAFPOUR et al., 2004; TZE et al., 1998).

Entretanto considerando que filmes de alginato de sódio não oferecem propriedades mecânicas adequadas para muitas das aplicações acima mencionadas, a adição de plastificantes tem sido uma alternativa para reduzir a fragilidade, melhorar o escoamento e aumentar a flexibilidade, tenacidade, tração e resistência ao impacto (BANKER, 1966).

A utilização deste polímero é de extrema importância para o tratamento de feridas de difícil cicatrização, pois é considerado relativamente inerte, biocompatível, biodegradável e tem capacidade de formar matrizes de gel de elevada porosidade com boas propriedades mucoadesivas (PAUL & SHARMA, 2004; FAN et al., 2006).

Como alternativa, filmes preparados a partir de polissacarídeos têm sido submetidos a processos de reticulação visando diminuir a solubilidade em água. Um exemplo são os filmes de alginato de sódio reticulados com íons cálcio (CaCl_2), têm sido utilizado na imobilização de células vivas e proteínas, tais como os peptídeos e em sistemas de liberação de fármacos. Filmes de alginato de sódio reticulados por

imersão em diferentes concentrações de solução aquosa de CaCl_2 mostraram-se insolúveis em água, mas permeáveis a vapores de água (LIM & SUN, 1980; KWOR et al., 1991; REMUÑÁN- LÓPEZ & BODMEIER, 1997).

2.6 Quitina e quitosana

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

A quitina é separada dos outros componentes da carapaça através de um processamento químico denominado desmineralização e desproteíntização com soluções diluídas de HCl e NaOH, seguida de descoloração com KMnO_4 e ácido oxálico (MUZZARELLI et al., 1973).

Por ano são produzidas aproximadamente 100 bilhões de toneladas de quitina, a mesma produção ocorre com a celulose por plantas de grande porte (KONG, 2010; REGE & BLOCK, 1999).

A quitosana é um polímero derivado da quitina, sua obtenção dá-se pela desacetilação quando atinge valores ao redor de 50% tornando-se solúvel em meio ácido aquoso. A solubilização ocorre por protonação da função- NH_2 na posição da unidade de repetição de D-glucosamina, em que o polissacarídeo é convertido para um polieletrólito em meios ácidos. Suas características são: coloração branca, dura e inelástica (ALONSO et al., 2010; HOVEN et al., 2007; DUTTA et al., 2004; HIRANO, 1999)

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

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

Os polímeros naturais têm despertado muito interesse à área da saúde com ênfase na quitosana pelo seu baixo custo de produção, quantidade de matéria-prima disponível, boa absorção, maleabilidade, biocompatibilidade, assim como atividade antimicrobiana e hemostática, biodegradabilidade e atoxicidade (ABDOU et al., 2008; KUMAR, 2000). Desse modo, observa-se que, nos últimos anos, a quitosana tem sido objeto de estudo em diversas pesquisas.

2.6.1 Propriedades da quitosana

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

- atividade antimicrobiana: provocam a inibição do crescimento de microorganismos, este mecanismo está relacionado com as propriedades físico-químicas do polímero e as características da membrana dos microorganismos.

- efeito coagulante: possuem papel importante na hemóstase, independente da cascata de coagulação, reduzindo o tempo de coagulação sanguínea de forma dose-dependente. Possui também efeito positivo sobre plaquetas.

- efeito analgésico: potente ação analgésica tópica (a quitosana pode ter a capacidade de absorver a bradicinina liberada no sitio da inflamação)

- aceleração da cicatrização: tem capacidade imunomoduladora, pois consegue ativar o macrófago, o que explica não só seu papel de cicatrização como sua biodegradabilidade.

- efeito hipocolesterolêmico e hipolipidêmico: uso via oral promove a redução dos níveis de colesterol e triglicerídeos devido a capacidade de se ligar aos lipídeos da dieta.

- latenciação e pró-farmacos: é um processo que transforma o fármaco inativo que mediante a reações químicas ou enzimáticas liberam a porção ativa no local de ação. Auxiliando no direcionamento da ação para o SNC, sendo seletivo, prolongado, com melhor biodisponibilidade, reduzindo a instabilidade e a baixa solubilidade em preparações farmacêuticas.

- microesferas: utilizada para o mesmo fim que os pró-farmacos sendo mais viáveis, com menos interações garantindo hidrofobicidade, lipofilicidade e estabilidade térmica. Facilitando também a compressão dos pós para o comprimido.

- liberação transdérmica: a quitosana promove a penetração transepitelial com diversos agentes terapêuticos como: insulina, morfina, hidrocortisona (SILVA et al., 2006).

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

2.7 Quitosana na Odontologia

Biomateriais à base de quitosana tiveram utilização sugerida como bioadesivo, agente cicatrizador, agente antimicrobiano, material de bandagem, molde para enxerto de pele, agente hemostático, material para sutura, e até mesmo material para lentes de contato na forma de filmes, géis, cápsulas, micro cápsulas e soluções. Dentre a variedade dos polímeros naturais que podem ser utilizados para aplicações médicas a quitina e a quitosana têm sido muito utilizadas (JAYAKUMAR et al., 2011; JAYAKUMAR et al., 2007; HOVEN et al., 2007; LI et al., 2005; YAMAMOTO et al., 2005).

A quitosana tem se mostrado como alternativa muito atraente para o desenvolvimento de novos materiais para aplicações biomédicas. As aplicações de quitosana são variadas, tais como sistemas de liberação de fármacos com base em

matrizes de quitosana, engenharia tecidual, quitosana como analgésico e glicosamina no combate à artrite (LARANJEIRA e FÁVERE, 2009).

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

Em razão da biocompatibilidade e da biodegradabilidade da quitosana, têm sido realizados estudos como excipiente em formulações farmacêuticas (géis, hidrogéis, comprimidos, microesferas, lipossomas, micro e nanopartículas) (PARK e KIM, 2010; FURTH et al., 2007; SILVA et al., 2006).

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

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

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

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

Shi et al. (2006) consideram que a medicina regenerativa é um campo de pesquisa promissor, em especial, pela possibilidade de restauração ou substituição

de órgão perdidos ou danificados, transplante de novo tecido com a combinação de suportes (matrizes) e biomoléculas.

Na área odontológica, este biomaterial foi apresentado primeiramente na forma de gel, obtido a partir de diferentes granulações e concentrações do pó da quitosana, e passou-se a avaliar a possibilidade de sua utilização em sítios cirúrgicos ou em terapia periodontal não cirúrgica. Nos casos de sítios fechados, bolsas periodontais, defeitos infra-ósseos, o gel pode ser levado com uma seringa sem a necessidade de anestesia e pode ser adicionada solução hidroalcoólica para diminuir sua viscosidade. Já para o preenchimento de defeitos ósseos, essa fluidez deve ser ajustada para que haja um completo preenchimento da cavidade e portanto, não deve ter um alto grau de escoamento (GERENTES et al., 2002).

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

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

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

2.8 Glicerol

O glicerol (1,2,3 propanotriol ou glicerina) é um composto orgânico, com função álcool, em 1779 foi descoberto pelo químico sueco Karl Wihelm Scheele pelo processo de saponificação (reação que produz o sabão) do azeite de oliva. Pode ser

encontrado em óleos de coco, dendê, soja, algodão e oliva, ou mesmo em animais, na combinação de glicerina com ácido graxo (RIVALDI et al., 2007).

Trata-se de um poliálcool, com três hidroxilas em sua fórmula estrutural. Os seus sinônimos são glicerina, trihidroxipropano, glicil álcool, gliceril e 1,2,3-trihidroxipropano. As características do glicerol são: incolor, viscosa, higroscópica (absorve umidade), oleosa, de sabor doce, solúvel em água e álcool, pouca solúvel em éter, acetato de etila e dioxano e insolúvel em hidrocarboneto (RIVALDI et al., 2007).

O processo de produção do glicerol não envolve tecnologia complexa, tornando seu acesso mais fácil. Porém tem custo elevado, o que é fator limitante para seu uso em algumas aplicações. O glicerol puro pode ser aplicado na indústria de cosméticos, farmacêutica, em detergentes, fabricação de resinas e também na indústria de alimentos (WANG et al., 2001).

O glicerol é seguro para o consumo humano desde 1959, podendo ser utilizado em diversos produtos alimentícios. Os níveis de DL50 em ratos são de 470 mg/kg e em porquinhos-da-índia de 7750 mg/kg. Vários estudos mostraram que grande quantidade de glicerol (sintético ou natural) pode ser administrada sem aparecimento de qualquer efeito adverso à saúde (YANG et al., 1999).

2.9 Clorexidina

A placa bacteriana é basicamente constituída por 70 a 80% de microrganismos e 30% de elementos não microbianos, como, por exemplo, polissacarídeos, mucina salivar, detritos alimentares, leucócitos, enzimas, sais minerais, proteínas e células epiteliais descamadas (CAUDURO NETO, 1978). A partir do momento que a placa dental foi considerada o fator causal principal da cárie e de doenças periodontais, é importante controlar e prevenir para diminuir a incidência dessas doenças bucais (CAUDURO NETO, 1978).

A resposta da clorexidina na placa varia entre as pessoas e a melhor alternativa é prevenir o desenvolvimento da doença periodontal. As medidas de higiene devem visar à inibição da formação da placa ou, a redução da quantidade de placa formada em concentrações tais que não se desenvolva doença inflamatória

destrutiva (LENDHE, 1992).

O uso prolongado da clorexidina, diminui o número de microrganismos salivares (aeróbicos, anaeróbicos e estreptococos) entre 50 a 90% e não há o crescimento de bactérias entéricas ou leveduras, demonstrando que a clorexidina mostrou uma potente atividade fungicida na cavidade oral e, após o seu uso na forma de colutório, por seis meses, amostras de placa mostraram uma redução de 54 a 97% de bactérias aeróbicas e anaeróbicas (LOE, 1973).

O uso da clorexidina foi autorizado tanto pela FDA (Food and Drug Administration) como pela ADA (American Dental Association) como agente efetivo para controle da placa, baseando-se em suas propriedades antiplaca e no combate à gengivite (CARRANZA & NEWMAN, 1997).

Na Odontologia clínica, a clorexidina é utilizada para limpar campos operatórios, desinfetar canais radiculares, inibir a formação da placa, cáries e gengivite. Outra propriedade importante é a sua capacidade de adsorção no esmalte dos dentes e na mucina salivar, com posterior liberação, exercendo assim um efeito residual.

A clorexidina é um composto que, na sua estrutura, contém dois anéis clorofenólicos e dois grupos bis-biguanida, ligados simetricamente por cadeias de hexametilenica. Essa bis-biguanida é uma base forte, carregada positivamente, praticamente insolúvel em água. Por isso, seu uso na Odontologia é preconizado em forma de sal digluconato, proporcionando maior solubilidade à substância (ARAUJO et al., 2001).

A clorexidina tem efeito antimicrobiano no tratamento de gengivite, dispersor da placa já formada e inibidor da recolonização da placa bacteriana (CURY et al., 2000), as ações podem ser atribuídas a uma redução do número de bactérias na saliva, evitando a gengivite (SCHIOTT et al. 1976).

A clorexidina é considerada bacteriostática em baixa concentração e em alta concentração, bactericida. A clorexidina é adsorvida sobre a hidroxiapatita do esmalte dos dentes, proteínas salivares, placa e macromoléculas ácidas das superfícies orais por ter carga positiva. O fármaco é gradualmente liberado por difusão e a concentração na boca é mantida em um nível suficiente para criar um meio bacteriostático por um período prolongado (VAHDATY et al., 1993).

A molécula catiônica (positiva) da clorexidina interage com a bactéria, possivelmente pela adsorção à parede celular aniônica (negativa), alterando sua

superfície e aumentando a permeabilidade na membrana bacteriana, facilitando a entrada da clorexidina no citoplasma. O equilíbrio osmótico é perdido e, em consequência, ocorre uma precipitação dos constituintes citoplasmáticos, o que impede a reparação da membrana celular, causando a morte da bactéria (HUGO & LONGWORTH, 1964).

A ação terapêutica da clorexidina tem papel fundamental na diminuição de doenças e agravos à saúde bucal, como no período de cicatrização após cirurgias orais ou periodontais, em terapias de ulcerações aftosas e de estomatite protética, de gengivite úlcero-necrosante aguda, de fraturas de mandíbula e maxilla (BUDTZ & KNUDSEN, 1978).

Outro aspecto importante para salientar é o uso na profilaxia e tratamento de infecções orais em pacientes com câncer e portadores da síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA). Em próteses contribui para a redução da formação do biofilme e melhora a condição da mucosa do paciente, combatendo a estomatite protética (BUDTZ & KNUDSEN, 1978). A clorexidina em solução com concentração de 0,02 a 0,05% é usada no tratamento de feridas, queimaduras, antissépticos do trato urinário e das mucosas, podendo ser também utilizada na cavidade oral. Seu uso pode ser como: bochechos (soluções de 0,12 a 0,2%) (DENARDI, 1994), irrigações (concentração de 0,02 a 0,5% por 1 minuto) (SINNES et al., 1997), géis (concentração de 0,5 a 1%) (BORER et al., 1978), dentifício (concentração entre 0,6 ou 0,8%) (PINHEIRO et al., 1985), spray é de fácil aplicação, porém depende da habilidade do operador em atingir todos os locais, assim como a dose empregada (DENARDI, 1994), goma de mascar sua vantagem é ficar retida na cavidade oral por um período de tempo mais prolongado em comparação com os outros métodos (PINHEIRO et al., 1985).

3 Proposição

3 PROPOSIÇÃO

Objetivos Gerais:

O principal objetivo deste trabalho foi estudar o desenvolvimento e a produção das bandagens a partir de polímeros naturais como quitosana e o alginato com incorporação do fármaco clorexidina e avaliar as propriedades bioquímicas e funcionais das bandagens.

Objetivos Específicos:

- Determinar as condições de preparação do gel dos polímeros para a produção das membranas;
- Preparar membranas de quitosana e híbridas (quitosana/alginato/quitosana) com e sem glicerol e clorexidina;
- Analisar a capacidade de absorção de água e perda de massa em tampão PBS e solução de saliva artificial.
- Estudar as condições de liberação controlada do fármaco clorexidina das membranas em tampão PBS e solução de saliva artificial;
- Testar a citotoxicidade das bandagens em cultura de fibroblastos.

4 Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

A quitosana e o alginato empregados neste estudo foram produtos comerciais (Sigma-Aldrich, St. Louis USA). Todos os solventes utilizados neste estudo foram de grau analítico.

4.1 Preparo dos Géis

4.1.1 Preparo do gel de quitosana

O gel de quitosana foi preparado dissolvendo-se a quitosana (2%) em 100 mL de uma solução de ácido acético 2% (v/v). A solução foi mantida sob agitação durante 24 h. Posteriormente, foi adicionado 250 mL de metanol na solução do gel de quitosana e esta foi filtrada com auxílio de uma bomba de vácuo. O gel filtrado foi dividido em duas partes iguais e foi feita a adição de glicerol 1% (m/m) em uma das partes. O gel de quitosana sem e com glicerol foram colocadas no banho de ultrassom por 1h para remoção das bolhas formadas durante o preparo. As soluções dos polímeros foram armazenadas a 4°C para posterior utilização (Figura 1).

4.1.2 Preparo do gel de alginato

O gel de alginato de sódio foi preparado dissolvendo 5g de alginato de sódio em 100 mL de água destilada. A solução foi mantida sob agitação por 24 horas. Após este período a solução foi dividida em duas partes e foi adicionado 1% (m/m) de glicerol a uma das partes. Os géis sem e com glicerol foram colocado em um banho de ultrassom, e mantido à temperatura de 30 °C por 1h para remoção das bolhas formadas durante o preparo. As soluções dos polímeros foram armazenadas a 4 °C, para posterior utilização (Figura 1).



Figura 1: Preparo dos géis de quitosana e alginato respectivamente.

4.2 Preparo das membranas da quitosana

O gel de quitosana que foi preparado nos itens 4.1.1 foi pesado em placas de Petri (6,5 cm de diâmetro) em uma balança analítica previamente tarada. Foram preparadas amostras de membranas contendo 3g de quitosana sem glicerol e com glicerol. As placas preparadas foram colocadas em uma estufa a 30°C durante 24h para a secagem das membranas. As membranas secas foram armazenadas em dessecador para posterior utilização.

4.3 Preparo das membranas híbridas de quitosana/alginato/quitosana

O preparo das membranas híbridas (1,5g quitosana/1,5g alginato/1,5g quitosana) se deu em três etapas. A placa de Petri foi colocada sob a balança e foi tarada. A seguir foi pesado 1,5g do gel de quitosana sem glicerol. As placas foram colocadas na estufa a 30°C durante 15 min. para previa secagem. A placa contendo o gel de quitosana foi colocada novamente na balança e a seguir foi adicionado 1,5 g de alginato sem glicerol. O gel de alginato foi espalhado sob o gel de quitosana e a placa foi colocada na estufa por 15 min. Após a secagem a placa foi colocada na balança que foi tarada e a seguir foi adicionado 1,5g de quitosana. O gel de quitosana foi espalhado sob o gel de alginato e a placa foi colocada na estufa por 24h para secagem final. As membranas de quitosana e híbridas com glicerol foram produzidas seguindo o mesmo procedimento descrito para a membrana sem glicerol.

4.4 Incorporação do fármaco

A clorexidina (digluconato de clorexidina 20%, EC 1907/2006, Evonik Industries) (foi incorporado nos géis preparados nos itens 4.1.1 na concentração de 1%(m/m). O gel de quitosana contendo a clorexidina sem e com glicerol foram pesados e secados segundo as membranas preparadas nos item 4.2 e 4.3.

4.5 Determinação do fármaco por espectrofotômetro

A solução de clorexidina a 1% (v/v) foi preparada água Milli-Q ultrapura (tipo I). A determinação do comprimento de onda máximo de absorção do fármaco foi realizada submetendo a amostra à varredura nos comprimentos de onda de 190 nm a 600 nm em espectrofotômetro (Beckman DU-640, EUA). O Gráfico 1 mostra o

espectro da clorexidina e o comprimento de onda que foi determinado para as análises de liberação controlada do fármaco (255,0 nm) (TABARY, 2007).

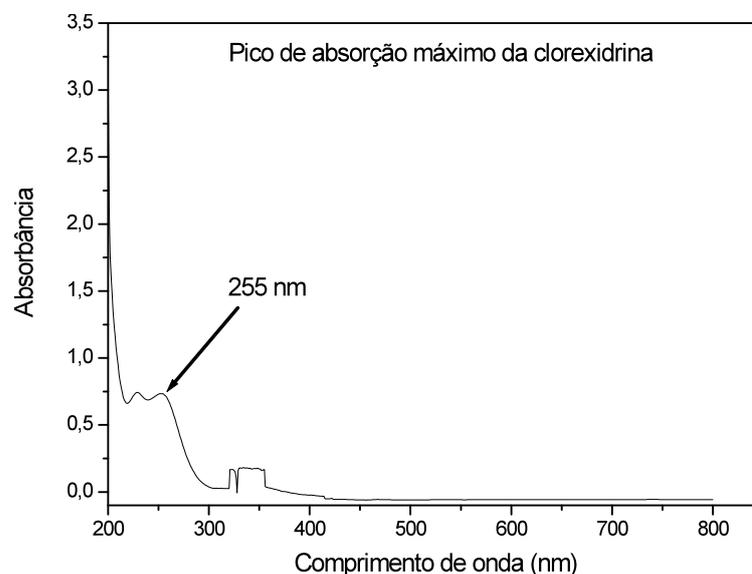


Gráfico 1: Espectro de absorção do fármaco preparado em água deionizada.

4.5.1 Curva padrão de clorexidina

A curva padrão da solução de clorexidina 1% (v/v) foi feita utilizando-se água Milli-Q ultrapura, para diluição do fármaco em concentrações variando entre 0,001% - 0,01% (v/v). As leituras das amostras foram feitas no comprimento de onda máximo determinado no item 4.5 que foi de 255nm utilizando um espectrofotômetro (Beckman DU-640, EUA). As leituras de absorbância para cada concentração foram utilizadas para obter a curva padrão (Gráfico 2).

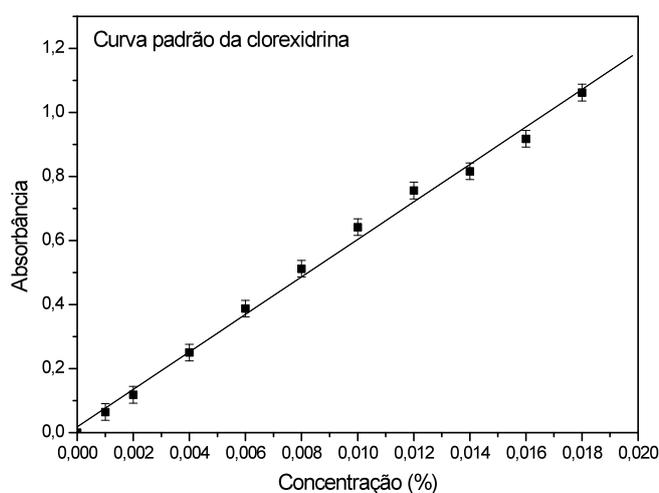


Gráfico 2: Curva padrão do agente da clorexidina preparada em água Milli-Q ultrapura ($Y = 0,0059 X + 0,01544$) e $R^2 = 0,9981$.

4.6 Teste de liberação controlada da clorexidina

Foram realizados testes de liberação *in vitro* para avaliar semi-quantitativamente a liberação do agente antibacteriano digluconato de clorexidina em tampão fosfato (PBS) pH 7,4±0,2, seguindo metodologia utilizada por AKAKI (2005) com algumas modificações. Para análise da liberação do fármaco, os filmes de quitosana e híbridos sem e com glicerol contendo clorexidina foram colocados em tubo de Falcon e 14 ml de tampão PBS, foi adicionado de forma a recobrir toda a membrana, todos os experimentos foram realizados em triplicata. Os tubos foram mantidos em banho a 37^o C. Foram retiradas amostras de 1,0 mL após 1, 2, 3, 4, 5 dias. Após a retirada das amostras foi adicionado 1,0 mL de tampão PBS em cada tubo de Falcon com a finalidade de manter o volume de 14 mL. As leituras de absorvância de cada amostra foram feitas a 255nm utilizado um espectrofotômetro (Beckman DU-640, EUA) e os valores foram devidamente anotados para a realização dos cálculos de concentração das amostras. O cálculo da concentração clorexidina liberada foi feito utilizando a equação da reta obtida a partir da curva padrão (Equação 1) feita no item 3.5 ($Y = a X + b$ ou seja $Y = 0,0059 X + 0,01544$, sendo: $y =$ Absorvância (ABS) e X a concentração do fármaco).

$$Y = a.X + b \quad \longrightarrow \quad C = \frac{ABS - 0,01544}{0,0059} \quad \text{Equação 1}$$

Devido a reposição da solução de PBS nos tubos de Falcon foi necessário a introdução de um fator de correção para ajustar a concentração determinada. Os cálculos do fator de correção para as mostras que foram retiradas dos tubos de Falcon foi feito através da Equação 2.

$$Fc = \left(\frac{14}{14 - 1,0} \right)^{n-1} \quad \text{Equação 2}$$

Sendo: 14 = O volume de tampão PBS no tubo de Falcon;

1,0 = O volume de amostra retirado durante os ensaios;

n = número do ensaio.

A concentração final corrigida foi calculada pela Equação 3.

$$C \text{ corrigida} = FC \times C \quad \text{Equação 3}$$

Sendo: Fc = O fator de correção calculado na Equação 2;

C = A concentração do fármaco obtida pela Equação 1.

4.7 Preparo da solução tampão (PBS)

Foram colocados aproximadamente 800 mL de água destilada em um Becker que foi mantido sob agitação com uma barra magnética. Os sais necessários para o preparo da solução foram adicionados na ordem apresentada na Tabela 1. Após a dissolução dos sais a solução foi transferida para um balão de 1000 mL e o volume foi completado com água destilada. A solução foi despejada novamente no Becker e o pH foi acertado para $7,4 \pm 0,02$. O valor de pH abaixo de 7,4 adicionar gotas de NaOH (6M) para acertar e se o pH estiver acima de 7,4 adicionar gotas de uma solução de HCl (6M). A solução foi filtrada no sistema Millipore, e foi autoclavada por 30 minutos a 121°C .

Tabela 1. Ordem de adição dos reagentes para o preparo do tampão PBS

Ordem de adição	Reagentes
1°	1,44g Na_2PO_4
2°	0,24g KH_2PO_4
3°	0,2g KCl
4°	8g NaCl

4.8 Preparo da solução de saliva artificial

A solução de saliva artificial foi preparada conforme Klimek et al. (1982). Foram colocados aproximadamente 500 mL de água destilada em um Becker que foi mantido sob agitação com uma barra magnética. Os reagentes necessários para o preparo da solução de saliva artificial foram adicionados na ordem apresentada na Tabela 2. Após a dissolução dos reagentes a solução foi transferida para um balão de 1000 mL e o volume foi completado com água destilada. A solução foi despejada novamente no Becker e o pH foi medido (pH 6,8).

Tabela 2 – Composição da solução de saliva artificial

Reagente	Massa (g)
Ácido ascórbico	0,002
Glicose	0,03
NaCl	0,58
CaCl ₂	0,17
NH ₄ Cl	0,32
NaSCN	0,32
KCl	1,27
KH ₂ PO ₄	0,33
Carbamida (uréia)	0,20
Mucina	2,70
NaHPO ₄	0,34

4.9 Ensaio de absorção de água e perda de massa

Os experimentos foram realizados em triplicatas. Os ensaios de absorção de água e perda de massa em solução de saliva artificial e solução salina de tampão fosfato (PBS) foram realizados no LPTT da EACH-USP. A membrana de alginato não foi incluída, pois ela é hidrossolúvel, não permaneceria íntegra para análise. As membranas foram secas por 24 horas a 40°C foram pesadas e imersas em 10mL de uma solução de saliva artificial pH6,8 e também em solução tampão de PBS com pH $7,4 \pm 0,02$. Os frascos com as amostras foram colocados em um banho a 37°C. As membranas em solução de saliva artificial foram retiradas nos períodos de tempo determinados (1, 2, 3 dias). As triplicatas das membranas foram retiradas nos seus respectivos dias foram colocadas entre papel vegetal para remover o excesso da solução de saliva artificial e a seguir foram pesadas e os respectivos valores anotados. Após as pesagens as membranas foram colocadas na estufa por 24h a 37°C, e foram pesadas novamente. Os dados anotados durante a realização do ensaio foram utilizados para o cálculo de absorção da solução de saliva (Equação 4) e perda de massa das membranas (Equação 5). O pH das soluções após a retirada das membranas foram medidos durante a realização do ensaio. As membranas em solução tampão de PBS com pH $7,4 \pm 0,02$ foram retiradas nos períodos de tempo determinados (1, 2, 3, 4 e 5 dias) e os procedimentos de pesagens e secagens foram idênticos ao da solução de saliva artificial.

Cálculo de absorção de água (%)

$$\% \text{ água absorvida} = \left(\frac{m_w - m_i}{m_i} \right) \times 100 \quad (\text{Equação 4})$$

Em que: m_i = massa inicial da amostra

m_w = massa da amostra úmida

Cálculo de perda de massa (%)

$$\% \text{ perda de massa} = \left(\frac{m_i - m_f}{m_i} \right) \times 100 \quad (\text{Equação 5})$$

Em que: m_f = massa final da amostra após a secagem

m_i = massa inicial da amostra

4.10 Citotoxicidade da Bandagem em Cultura de Células

4.10.1 Cultura celular

Para expansão, os fibroblastos da linhagem NIH3T3 foram cultivados em meio de cultura DMEM (sem ácido ascórbico), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). As células foram mantidas a 37°C em atmosfera contendo 5% CO₂ e 95% de ar.

4.10.2 Preparo dos extratos com as bandagens solubilizadas

Neste trabalho, os extratos das bandagens foram preparadas em meio de cultura DMEM sem SFB, na concentração 0,1g/10ml (material/meio de cultura DMEM), durante 24h, a 37° C em atmosfera de 5% de CO₂ (adaptado da ISO 10993-12). Uma vez que a ISO (10993-12) preconiza a proporção de 0,1g/1ml. Essa adaptação foi utilizada devido a necessidade de solubilizar algumas das bandagens que absorveram quase todo conteúdo do DMEM. Os grupos de cada bandagem ficaram assim definidos (Tabela 3):

Classificação	Tipo da membrana
1	Híbrida+glicerol+clorexidina
2	Híbrida+clorexidina
3	Quitosana+glicerol+clorexidina
4	Quitosana+clorexidina
5	Híbrida+glicerol
6	Híbrida
7	Quitosana+glicerol
8	Quitosana
Controle Positivo	Meio DMEM com 10% SFB
Controle Negativo	Meio DMEM com 1% SFB

- Soluções utilizadas

- Meio de cultura – DMEM (Gibco Co.)

Foi utilizado o meio Dulbecco que é basicamente uma modificação do meio de Eagle incluindo concentrações de aminoácidos maiores, assemelhando-se às concentrações protéicas das células de mamíferos. Este meio tem sido utilizado na cultura de grande variedade de células de crescimento em monocamada e seus componentes estão listados na Tabela 4.

Tabela 4 – Componentes do meio Dulbecco's MEM.

SAIS INORGÂNICOS	(mg/L)
Cloreto de cálcio (CaCl ₂) (anidro)	200,00
Nitrato ferroso (Fe(NO ₃) ₃ ·9H ₂ O)	0,10
Cloreto de potássio (KCl)	400,00
Sulfato de magnésio (MgSO ₄)	97,67
Cloreto de sódio (NaCl)	6400,00
Fosfato de sódio (NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O)	125,00
AMINOÁCIDOS	
L-Arginina-HCl	84,00
L-Cistina 2HCl	62,57
L-Glutamina	584,00
Glicina	30,00
L-Histidina HCl·H ₂ O	42,00
L-Isoleucina	104,80
L-Leucina	104,80
L-Lisina-HCl	146,20
L-Metionina	30,00
L-Fenilalanina	66,00
L-Serina	42,00
L-Treonina	95,20
L-Triptofano	16,00
L-Tirosina 2Na 2H ₂ O	103,79
L-Valina	93,60
VITAMINAS	
D-ca Pantotenato	4,00
Cloreto de Colina	4,00
Acido Fólico	4,00
i-Inositol	7,00
Niacinamida	4,00

Piridoxal HCl	4,00
Riboflavina	0,40
Tiamina – HCl	4,00
OUTROS	
D-Glucose	1.000,00
Vermelho de Fenol	15,90
Piruvato de Sódio	110,00
Bicarbonato de Sódio (NaHCO ₃)	3.700,00

Fonte: DMEM

- Soro Fetal Bovino (SFB)

No grupo controle positivo foi utilizado no meio de cultura 10% de soro fetal bovino, proporcionando condições ideais para a proliferação de fibroblastos. Já o grupo de controle negativo foi tratado com 1% de soro fetal bovino, promovendo pouco crescimento celular obtido nas condições ideais (DAMANTE, 2007, EDUARDO et al., 2007).

• Tampão Salino Fosfato – PBS-A

O tampão salino fosfato (pH 7,4) foi constituído por:

- 137 mM de cloreto de sódio;
- 2,68 mM de cloreto de potássio;
- 1,47 mM de fosfato diácido de potássio;
- 8,1 mM de fosfato monoácido de sódio;

• Tripsina:

Solução de tripsina 0,25% (m/v) preparada em PBS-A contendo 1 mM de EDTA.

A partir dos extratos puros foram realizadas diluições na proporção de 1:1 em meio de cultura DMEM + 10% SFB, para todas as bandagens.

4.10.3 Ensaio de viabilidade celular

Um dos métodos de análise de viabilidade celular mais usado e bem aceito é o teste de redução do MTT (FRESHNEY, 2000). O ensaio da redução do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5- difeniltetrazólio) analisa a atividade mitocondrial das células (MOSMANN, 1983). Este ensaio, definido na literatura como apropriado para estimativa de viabilidade celular (HANSEN et al., 1989; SCHWEIKL; SCHMALZ, 1996), baseia-se na capacidade que a enzima succinato desidrogenase (presente nas mitocôndrias de células viáveis) têm de converter o sal de tetrazolium (dimetiltiazol difenil tetrazolium, ou MTT), que é hidrossolúvel e de cor amarelada,

em cristais de formazana, que são de cor azul escura. Esta capacidade que somente células vivas possuem, indica atividade mitocondrial e conseqüente viabilidade celular (COSTA et al., 2003; SLETTEN; DAHL, 2003). O formazana, de cor azul purpúrea, é solubilizado e, então, sua concentração é determinada pela densidade óptica no leitor de ELISA (FLUOstar OPTIMA, BMG Labtech, Offenburg, Alemanha) (Figura 3).

4.10.4 Redução do MTT

Para o teste de viabilidade celular (MTT) foi feito o plaqueamento celular (Figura 2) em placas de 96 poços (1×10^3 células/poço). Após 6 horas de adesão celular houve a troca do meio de cultura com SFB a 5%, fazendo com que as células entrassem em sub-estímulo para proliferação. As placas foram incubadas em estufas úmidas a 37°C com 5% CO₂ por 24 h. Posteriormente o meio foi trocado pelos diferentes extratos obtidos de cada uma das bandagens. Os grupos controles positivo e negativo foram cultivados em meio DMEM com 10% e 1% de SFB, respectivamente. Após os períodos de 24, 48 e 72 horas, permanecendo as células incubadas a 37°C com atmosfera contendo 5% CO₂ e 95% ar, foi feita a análise.



Figura 2 - Manipulação das culturas celulares em capela de fluxo laminar e disposição das placas de 96 poços e garrafas na estufa de CO₂.

Decorrido os períodos de incubação (24, 48 e 72 horas), o sobrenadante das células foi removido e então foi adicionado 160 µL de meio sem vermelho de fenol por poço e 10 µL da solução de MTT (0,5mg de MTT/mL de PBS). As células foram incubadas a 37° C por 4 horas protegidas da luz. Após esse tempo, as placas (Figura 4) foram retiradas da estufa e adicionada a solução solubilizadora dos grânulos de formazan (20% SDS; HCl 0,01M) a 50 µL e deixadas “overnight” à

temperatura ambiente. Em seguida, a absorbância de cada poço foi mensurado a 570 nm no leitor de fluorescência (Fluostar Ótima – BMG LABTECH – Offenburg, Alemanha) utilizando o programa MARS Data Analysis Software. A função mitocondrial das células viáveis correspondentes a cada tratamento foi obtida e expressa em densidade óptica (Figura 3).

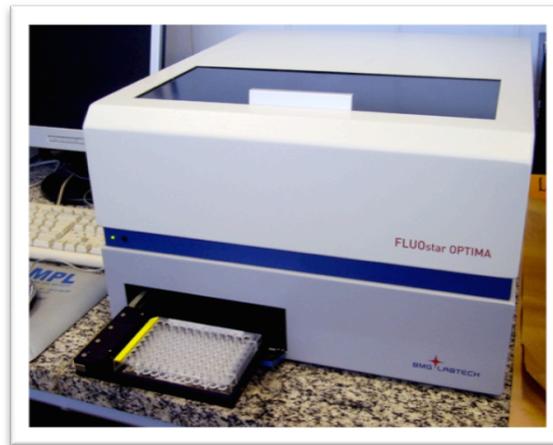


Figura 3 - Leitor de fluorescência (Fluostar Ótima – BMG LABTECH)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	1	2	3	4	5	6	7	8	C+	C-		B	A
B	1	2	3	4	5	6	7	8	C+	C-		B	B
C	1	2	3	4	5	6	7	8	C+	C-		B	C
D	1	2	3	4	5	6	7	8	C+	C-			D
E	1	2	3	4	5	6	7	8	C+	C-			E
F	1	2	3	4	5	6	7	8	C+	C-			F
G	1	2	3	4	5	6	7	8	C+	C-			G
H	1	2	3	4	5	6	7	8	C+	C-			H
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	

Figura 4 - Microplaca com as bandagens (1 a 8 tipos de membranas, C+ (controle positivo), C- (controle negativo), B (blank) em octoplicatas.

5 Resultados

5 RESULTADOS

O planejamento deste estudo consistiu de duas etapas. A primeira etapa foi dedicada à elaboração e produção dos géis e membranas. A segunda etapa foi realizada à caracterização química e biológica das membranas. Foram então selecionadas oito composições para o preparo das membranas.

5.1 Ensaio de absorção de água e de perda de massa em tampão PBS

A Figura 5 mostra o perfil de absorção de água e a Figura 6 o perfil de perda de massa em porcentagem das bandagens de quitosana e quitosana_GL, e híbridas (quitosana/alginato/quitosana) e híbridas_GL com glicerol realizado em solução salina de tampão fosfato (PBS – Fosfato buffer solution) durante um período de 5 dias a 37°C.

As bandagens de quitosana sem e com glicerol apresentaram uma capacidade de absorção de água de 187% a 127% enquanto, as híbridas 203% e 143% com glicerol respectivamente. Portanto é possível observar que as membranas de quitosana ou híbridas absorvem mais água do que as membranas que possuem glicerol em sua composição. O alginato não interfere na absorção de água. Outra característica que pode ser observada é que a variável tempo altera a absorção, ela possui o pico de absorção nas primeiras 24h e após esse período sua absorção é variável, porém a membrana híbrida com glicerol tem seu pico de absorção após 72h.

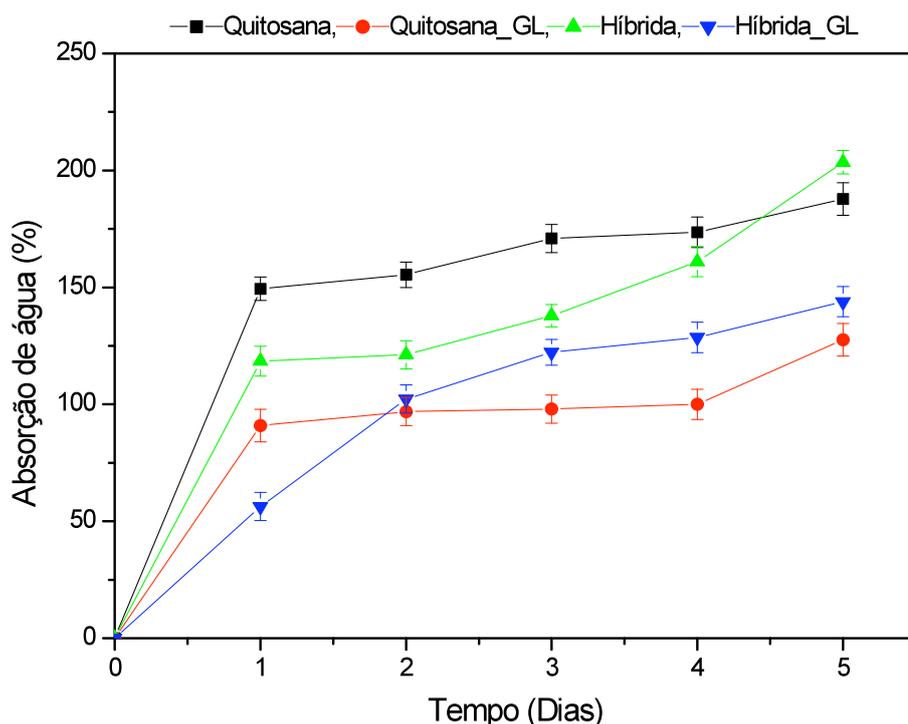


Figura 5. Absorção de água (%) das membranas de quitosana (■), quitosana com glicerol (●), híbrida (▲) e híbrida com glicerol (▼) em solução tampão PBS, pH 7,4±0,2 após o período de incubação de 5 dias a 37°C.

Tratando-se da perda de massa das bandagens de quitosana sem e com glicerol, os índices ficaram em torno de 8% a 18%, enquanto, as bandagens híbridas ficaram variaram de 30% e 40%. Os resultados demonstram claramente a natureza dos polímeros empregados, uma vez que a quitosana não é solúvel em água. Portanto ela em sua forma sem glicerol tem uma menor perda de massa quando comparada com a sua forma híbrida, pois o alginato é solúvel em água, nesse caso a massa que não foi solubilizada durante o período do experimento possivelmente é a porção de quitosana. Com relação a perda de massa o alginato facilitou a liberação do polímero, pois tanto as membranas de quitosana perderam menos massa quando comparadas com as híbridas que perderam mais massa.

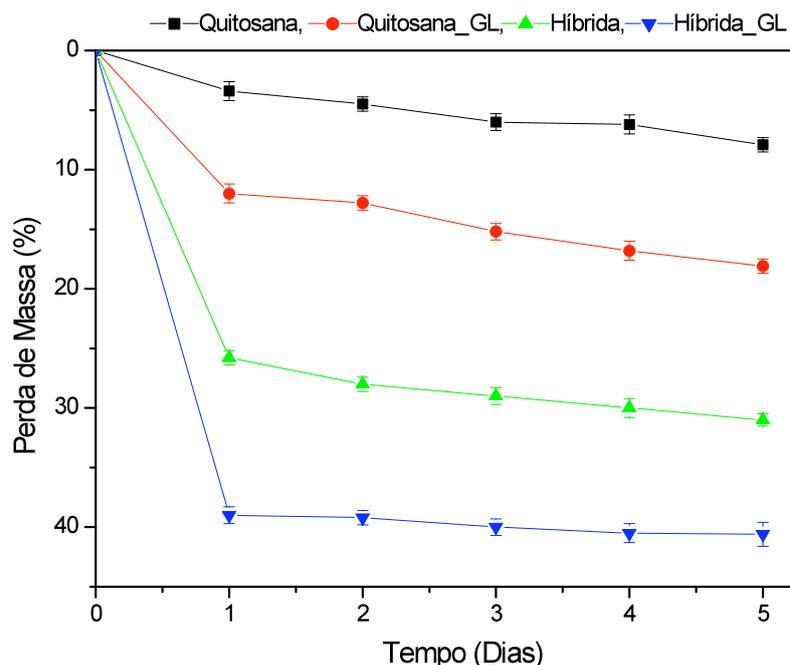


Figura 6. Perda de massa (%) das membranas de quitosana (-■-), quitosana com glicerol (-●-), híbrida (-▲-) e híbrida com glicerol (-▼-) em solução tampão PBS, pH 7,4±0,2 após o período de incubação de 5 dias a 37°C.

5.1.2 Teste de absorção de água e perda de massa em saliva artificial

A Figura 7 mostra o perfil de absorção de água e a Figura 8 o perfil de perda de massa em porcentagem das bandagens de quitosana e quitosana_GL, e híbridas (quitosana/alginato/quitosana) e híbridas_GL com glicerol realizado em solução de saliva artificial durante um período de 3 dias a 37°C. Este experimento não teve a mesma duração que em PBS pois a saliva artificial não dura um período maior que 3 dias.

As bandagens de quitosana sem e com glicerol apresentaram uma capacidade de absorção de água de 287,3% a 152,5% enquanto, as híbridas 425% e 570% com glicerol respectivamente. Os polímeros em meio salivar possuem comportamento muito diferente do observado em PBS, pois a saliva possui componentes bem diferentes do PBS. Como pode ser observado no gráfico o comportamento não possui um padrão linear, sendo sua comparação mais difícil pois as membranas puras possuem o mesmo padrão de absorção do teste realizado com PBS, onde o glicerol dificulta a absorção de água. Já nas membranas híbridas a absorção é bem diferente pois a membrana com glicerol absorveu muito mais água do que a híbrida sem glicerol.

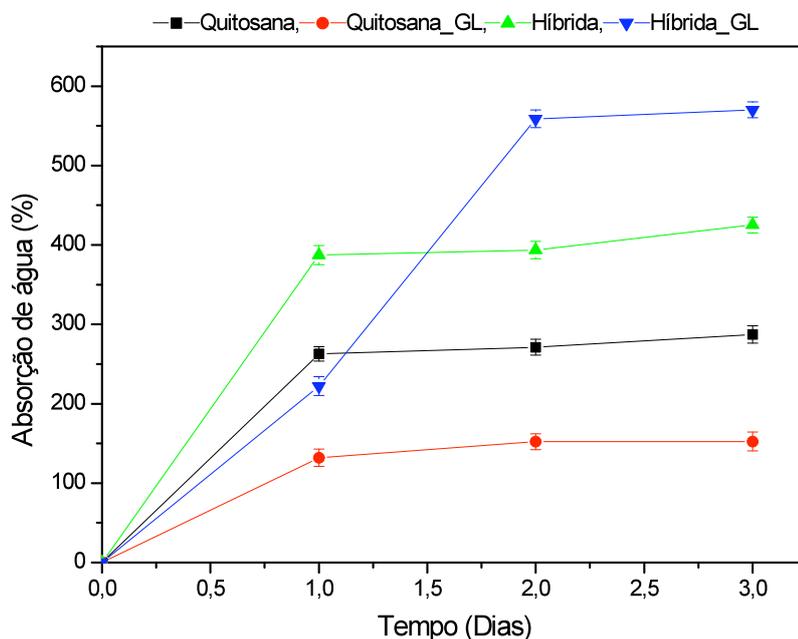


Figura 7. Absorção de água (%) das membranas de quitosana (■), quitosana com glicerol (●), híbrida (▲) e híbrida com glicerol (▼) em solução de saliva artificial após o período de incubação de 3 dias a 37°C.

Tratando-se da perda de massa das bandagens de quitosana com e sem glicerol, os índices ficaram em torno de 8% a 10%, enquanto, as bandagens híbridas ficaram variaram de 25% e 30%. Como podemos observar nos valores obtidos de absorção de água foram maiores para as membranas híbridas (quitosana/alginato/quitosana) assim como as respectivas perdas de massa. Os resultados demonstram novamente a natureza dos polímeros empregados, uma vez que a quitosana não é solúvel em água.

Foi possível verificar que a quitosana apresentou uma menor perda de massa quando comparada com a sua forma híbrida, pois o alginato é solúvel em água, nesse caso a massa que não foi solubilizada durante o período do experimento possivelmente é a porção de quitosana. Com relação a perda de massa o glicerol também facilitou a liberação do polímero, pois tanto a quitosana pura quanto a híbrida perderam menos massa do que as membranas com glicerol.

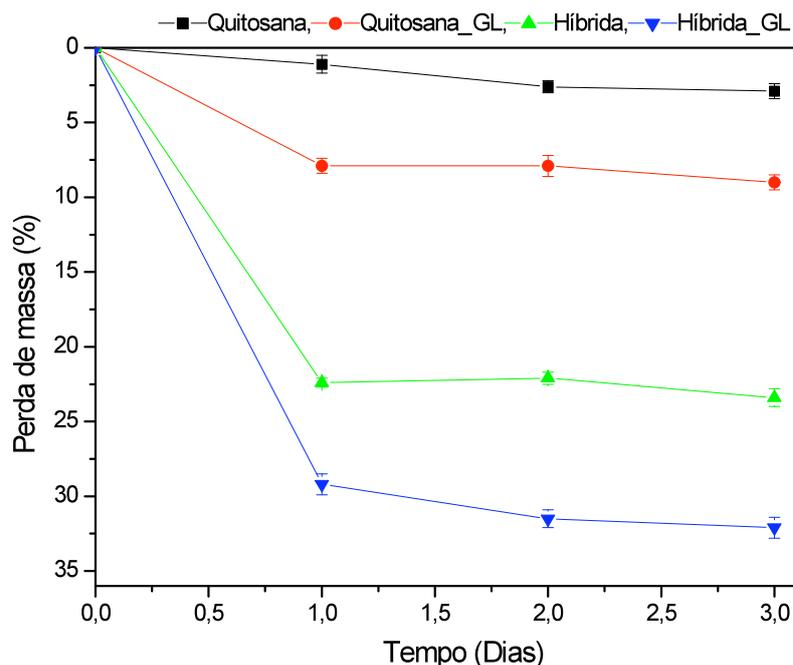


Figura 8. Perda de massa (%) das membranas de quitosana (-■-), quitosana com glicerol (-●-), híbrida (-▲-) e híbrida com glicerol (-▼-) em solução de saliva artificial após o período de incubação de 3 dias a 37°C.

5.2 Medida de pH

5.2.1 pH em tampão PBS

O pH das amostras imersas em solução de PBS foram medidas ao longo de 5 dias e os valores obtidos podem ser observados na Figura 9. Pode-se observar uma redução em torno de 10% para as membranas de quitosana e híbridas sem glicerol e de 5% para as membranas com glicerol. Essa redução pode estar diretamente relacionada com a solubilização da membrana com o PBS, a quitosana é solubilizada em ácido acético e não foi neutralizada após sua produção. Por isso ocorreu essa pequena variação de pH. Essa diferença de variação entre as membranas ocorre pela solubilização em PBS. As membranas que mais se solubilizam tem uma redução maior de pH, quando comparadas as que menos se solubilizam.

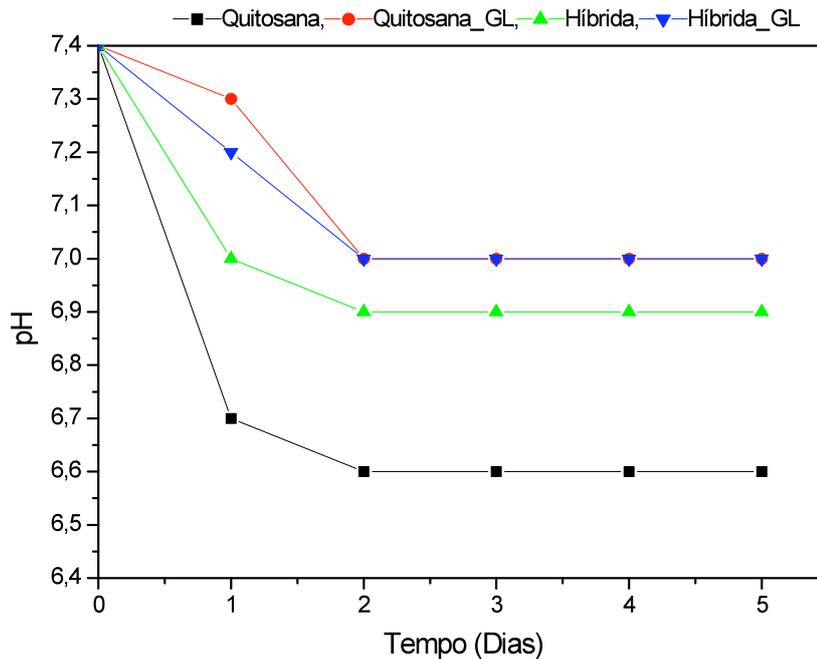


Figura 9. Medida de pH das amostras em solução de PBS

5.2.2 pH em solução de saliva artificial

O pH das amostras imersas em solução de saliva foram medidas ao longo de 3 dias e os valores obtidos podem ser observados na Figura 10. Pode-se observar uma redução em torno de 13% para as membranas híbridas com glicerol e de 8% para as membranas de quitosana com glicerol. As membranas sem glicerol tiveram uma redução de pH menor do que as com glicerol. Essa relação está diretamente ligada a absorção de água das membranas, a mesma redução de pH pode ser observada na solução de PBS, porém a solubilização é diferente portanto a redução em saliva artificial é maior do que em PBS.

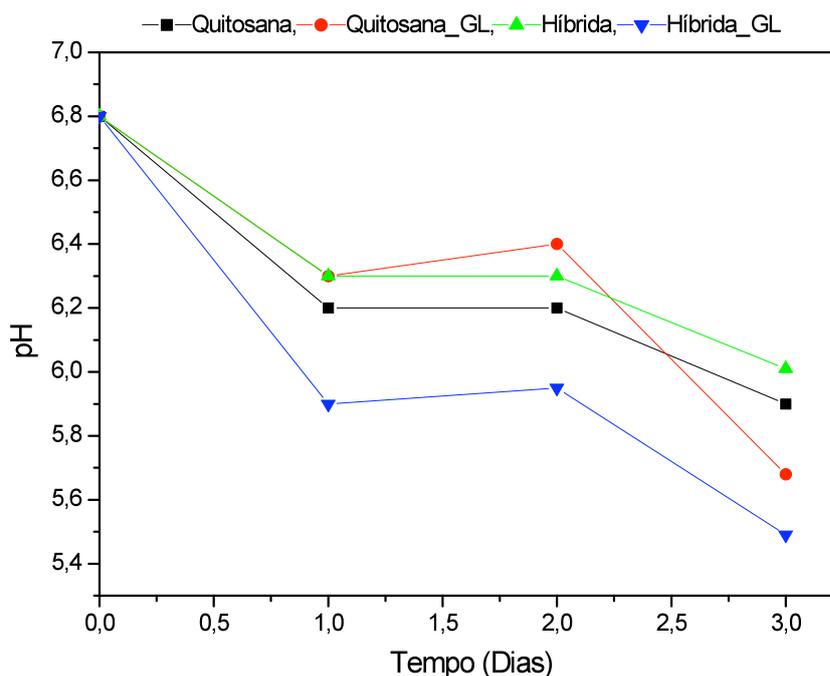


Figura 10. Medida de pH das amostras em solução de saliva artificial

5.3 Liberação do fármaco

A liberação controlada do fármaco foi avaliada apenas em solução com PBS pois tornou-se inviável fazer o experimento com a saliva artificial, uma vez que as membranas se degradaram rapidamente não sendo possível a leitura da absorbância no espectrofotômetro.

Com relação aos dados obtidos no experimento foi possível observar na Figura 11 que a membrana híbrida foi a que mais liberou o fármaco, tendo uma liberação gradativa e crescente ao longo dos 5 dias. A quitosana sem glicerol teve uma liberação positiva até o segundo dia, tendo uma queda no terceiro dia mantendo sua liberação. A membrana híbrida com glicerol teve boa liberação também, mas talvez não foi tão positiva quanto a híbrida pura por conta da presença do glicerol, fato encontrado também na absorção de água e perda de massa. A membrana que manteve seu comportamento em todos os experimentos realizados nesse trabalho foi a quitosana com glicerol pois absorveu pouca água (127%), perdeu pouca massa (18%) e também não teve boa capacidade na liberação do fármaco (0,02%), evidencia que apesar do glicerol dar uma plasticidade maior ao polímero dificulta algumas características importantes que são esperadas do mesmo.

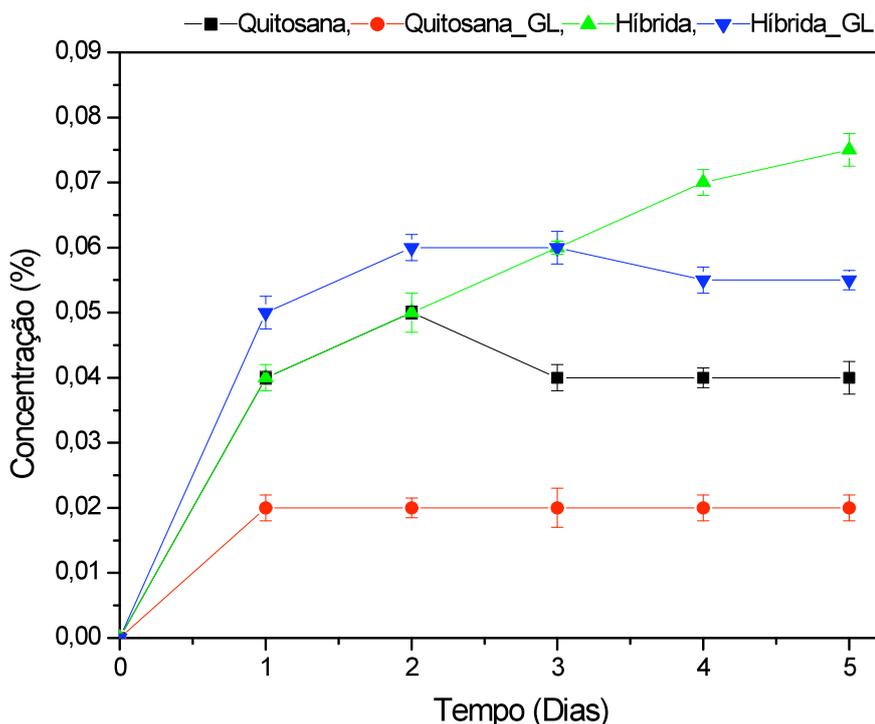


Figura 11. Ensaio de liberação controlada da clorexidina analisada no período de 5 dias

5.4 Citotoxicidade da Bandagem em Cultura de Fibroblastos

Como pode ser observado Figura 12 as bandagens que contem clorexidina em sua composição (1-4) obtiveram resultados de viabilidade (densidade óptica) inferiores ao controle negativo em todos os períodos experimentais (24, 48 e 72 horas), podendo sugerir uma diminuição drástica na proliferação e morte celular. Já as bandagens que não possuem clorexidina em sua composição (5-8) foram viáveis em todos os períodos estudados, sendo que os grupos 7 e 8 apresentaram diferença significativa com relação ao controle positivo. As membranas híbridas (5 e 6) interferiram parcialmente o crescimento celular. Pode-se observar que a bandagem composta de quitosana pura com e sem glicerol não foi citotóxica, o alginato pode causar leve citotoxicidade, já a clorexidina foi citotóxica nas condições realizadas nesse experimento.

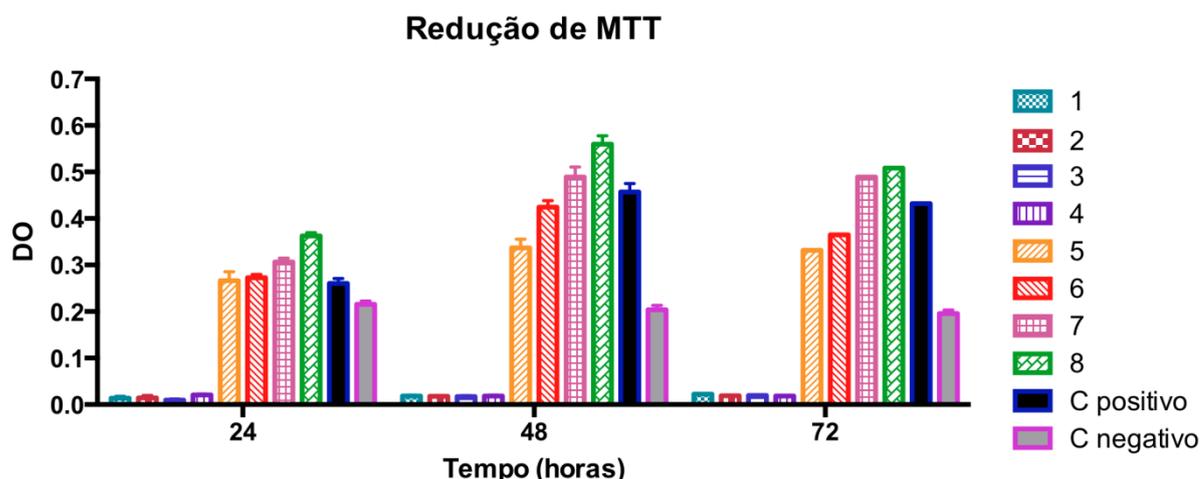


Figura 12. Média e desvio-padrão da densidade óptica (DO) do extrato puro das bandagens (grupos 1 a 8) e os controles positivo e negativo, nos diferentes períodos experimentais (24, 48, 72 horas)

No tratamento realizado da mesma forma porém com diluição do extrato puro em meio (1:1) os mesmos padrões foram encontrados, conforme Figura 13. Porém, com a diluição dos extratos a citotoxicidade do fármaco continuou evidente, pois no primeiro período experimental (24 horas) quase todas as células morreram. Após as 24 horas houve um leve aumento nos dados de densidade óptica, mas quando comparados ao controle negativo é possível observar que não houve crescimento significativo (Figura 13). Na Figura 13 as bandagens que contem clorexidina em sua composição (1-4) obtiveram resultados de viabilidade (densidade óptica) muito inferiores ao controle negativo em todos os períodos experimentais (24, 48 e 72 horas), confirmando uma grande diminuição na proliferação e morte celular, já que este tratamento possui diluição do meio. As bandagens que não possuem clorexidina em sua composição (5-8) foram todas viáveis em todos os períodos estudados, sendo que os grupos 7 e 8 apresentaram diferença significativa com relação ao controle positivo, principalmente após 72h de tratamento. As membranas híbridas (5 e 6) interferiram parcialmente no crescimento celular. Porém com 24 horas as membranas 6 e 8 apresentaram diferença significativa em relação ao controle positivo. Pode-se observar que a bandagem composta de quitosana pura com e sem glicerol não foi citotóxica.

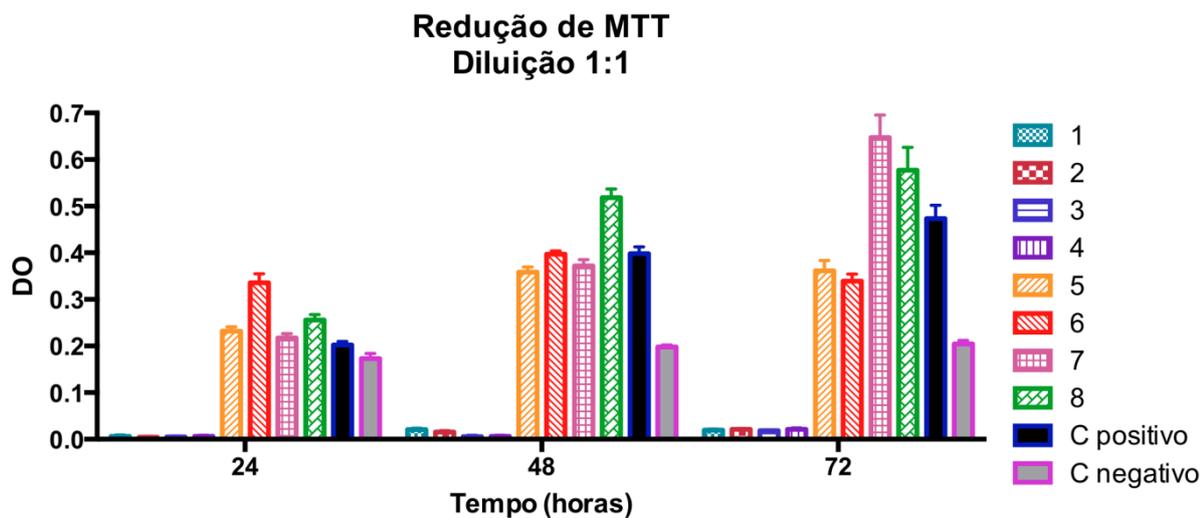


Figura 13. Média e desvio-padrão da densidade óptica (DO) do extrato puro das bandagens (grupos 1 a 8) e os controles positivo e negativo, nos diferentes períodos experimentais (24, 48, 72 horas) com diluição do meio 1:1.

6 Discussão

6 DISCUSSÃO

A escolha dos polímeros e fármacos utilizados no presente trabalho foi realizada por suas propriedades físico-químicas tanto quanto sua elasticidade e maleabilidade, quanto por sua biocompatibilidade, atoxicidade, bioadesão, entre outros fatores já citados.

6.1 Absorção de água e perda de massa

Com relação a absorção de água Costa e colaboradores (2012) dizem que suas amostras absorveram em media 40% de água, porém em diferentes composições essa absorção pode chegar a 70%. Se a proporção dos polímeros são iguais a absorção é reduzida, quando as concentrações são diferentes a absorção é maior. Este fato pode estar relacionado com um maior numero de ligações cruzadas entre o colágeno e a quitosana, as cadeias tornam-se mais próximas dificultando a penetração de solvente (COSTA et al., 2012).

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

Ao avaliar a absorção de diferentes fluídos como solução salina (SS), fluido corpóreo simulado (FCS) e soro fetal bovino (SFB) GIRATA (2011) obteve valores para as amostras ausentes de agentes antimicrobianos e com 1,1% de prata. As amostras puras absorveram 13,0%, 9,2% e 8,4% respectivamente, as amostras com prata absorveram 23%, 15% e 14% respectivamente. As amostras que estavam em saliva artificial absorveram em média 237,5% as bandagens que estavam em PBS absorveram 102,5% em media. Os dados obtidos são diferentes dos encontrados por GIRATA (2011) pois a autora utilizou acetona para solubilizar a quitosana.

A absorção de água é exponencial e a absorção de tampão fosfato é linear, as razões para essa diferença está relacionada as diferentes interações iônicas que ocorrem entre elas. A água destilada tem pH 5,6 enquanto o tampão fosfato tem pH 7,2 diferindo nas condições de equilíbrio iônico (ASSIS & SILVA, 2003).

A hidrofiliidade da quitosana se dá em função dos grupos desacetilados que se associam aos grupos hidroxila e amino naturalmente, caracterizando sua forte afinidade por moléculas polares. Esses grupamentos têm grande influência sobre a

quantidade de água retida, considerando que o aumento da concentração de quitosana no filme interfere significativamente na quantidade de água absorvida.

A membrana de quitosana com glicerol absorveu menos água quando comparada com outras que foram testadas em solução de PBS. A absorção média de água da membrana de quitosana com glicerol em solução PBS foi de aproximadamente duas vezes sua massa inicial (213%), o presente trabalho teve uma absorção de água da mesma bandagem de 80% nas primeiras 24h. Com relação a absorção de água em saliva artificial os dados obtidos corroboram com os dados das membranas de quitosana e CMC, apesar de possuírem composições diferentes o comportamento de absorção em saliva artificial foi o mesmo, a membrana de quitosana com CMC e glicerol foi a que mais absorveu água (MELIN, 2012), o mesmo ocorreu com a membrana de quitosana e alginato com glicerol.

Para a avaliação da perda de massa é necessário saber sobre sua estabilidade e cinética de degradação. A degradação de polímeros de quitosana e alginato é dependente da extensão de interação, ou seja, a estabilidade está relacionada com o número de pontos de ligação entre as moléculas de quitosana e alginato (YAN et al., 2000; LI et al., 2009).

As análises de perda de massa em esferas para liberação de fármacos com diferentes concentrações de quitosana e alginato na composição obtidos por Tahtat et al. (2013) foram que a perda de massa de alginato é maior quando há diminuição da razão de quitosana/alginato, sugerindo que a quitosana interfere na solubilização. Com relação aos dados obtidos no presente trabalho pode se concluir que perda de massa ocorreu nas primeiras 24h, sendo que as bandagens de quitosana/alginato perderam mais massa (25 a 40%) do que as bandagens de quitosana (5 a 13%). A perda de massa é parcialmente independente da natureza dos meios aquosos, podendo ser atribuída pela remoção de moléculas que não reagiram durante o processamento (YAN et al., 2000).

6.2 Citotoxicidade e Liberação de fármaco

Existem vários estudos que comprovam a eficácia da quitosana *in vitro* assim como suas aplicações. Azcurra et al. mostraram que a quitosana de alto peso era eficaz na redução da hidrofobicidade e adesão de *Candida albicans* a células dos tecidos moles da cavidade oral. Os géis de quitosana são menos ativos contra a *Candida albicans* do que a clorexidina.

A escolha do fármaco corrobora com outros autores que relatam que a clorexidina incorporada no gel de quitosana aumenta a atividade antifúngica. A concentração de clorexidina ideal encontrada por Kloster et al. (2011) foi de 1%, a mesma concentração utilizada no presente trabalho, porém segundo Senel et al. (2000) a concentração pode variar de 0,1% a 2,0% no tratamento de candidíase na cavidade oral.

A elaboração e o uso de filmes ou membranas de quitosana tem liberação prolongada, fato que pode ser percebido nos resultados, pois durante os 5 dias de experimento foi possível avaliar que o fármaco estava sendo liberado. Ikinci et al. (2002) dizem que a liberação é prolongada estando o filme intacto até 4 horas após a aplicação, sugerindo vantagem para o tratamento de periodontite, comprovando também sua eficácia em patógenos periodontais *Porphyromonas gingivalis*.

O uso de revestimentos de quitosana para a veiculação local de antimicrobianos como a tetraciclina e a clorexidina na mucosa oral, canais radiculares ou bolsas periodontais são importantes pois não causam toxicidade ao hospedeiro. Porém mais teses precisam ser realizados para que isso possa ser afirmado, pois segundo os dados obtidos no teste de viabilidade celular com fibroblastos foi possível avaliar que a quitosana e o alginato são polímeros atóxicos, porém as membranas que possuíam o fármaco incorporados em sua composição causaram morte celular, sendo tóxicos para este tipo de célula (DECKER et al., 2005).

Ao avaliar a citocompatibilidade da quitosana e um derivado quaternário usando o teste MTT, o mesmo utilizado no presente trabalho, Ji et al (2009) concluíram que os grupos quaternários em alta concentração tornam o ambiente altamente catiônico, produzindo forte atração eletrostática com grupos carregados negativamente na superfície da célula do ligamento periodontal gerando morte celular, com efeito citotóxico acentuado.

A viabilidade das células nos tratamentos das membranas de quitosana/CMC/glicerol em todas as suas variações de composição não apresentaram toxicidade celular, o mesmo foi encontrado nos grupos de 5 a 8 que são as bandagens sem fármaco, em que duas delas tiveram diferença significativa em relação ao controle positivo (MELIN, 2012).

6.3 Avaliação do pH

A liberação do fármaco está associada com a temperatura e com o pH (SUN et al., 2013). Ele fez teste de liberação de fármacos em dois diferentes pH 2,1 e 7,4 e observou que liberação de fármaco com pH 7,4 era muito maior do que o pH 2,1. A quantidade de fármaco liberado foi de cerca de 81,5% após 10 horas em pH 7,4, enquanto que em pH 2,1 foi de 12,1% a liberação. Ele justifica ainda que a liberação está relacionada com a capacidade do polímero absorver água, facilitando a liberação do fármaco por pressão osmótica. Nos dados obtidos no presente trabalho foi possível observar que em solução de PBS a variação de pH ocorreu nas primeiras 48h com um patamar estável depois. O pH inicial foi de 7,4 em temperatura a 37°C com redução máxima para pH 6,6, resultando em grande absorção de água e liberação de fármaco controlada. Já os resultados do pH em saliva artificial a 37°C foi diferente pois houve oscilação de pH não manteve um patamar o que facilitou a decomposição da bandagem e não a liberação do fármaco (SUN et al., 2013).

7 Conclusões

7 CONCLUSÕES

As características bioquímicas e biofísicas dos polímeros e das bandagens desenvolvidas no presente trabalho indicaram que o biomaterial desenvolvido pode ter potencial para aplicação na Odontologia. Ao buscar novas ferramentas e tecnologia na literatura científica, foi possível observar a necessidade de novos materiais com diversas aplicações na área médica, odontológica, biomédica e farmacêutica. A atuação de membrana com efeito antimicrobiano ainda é muito recente, necessitando de mais testes para sua aplicação *in vivo*.

Os ensaios de absorção de água e perda de massa puderam elucidar o tempo de degradação da membrana e seu comportamento bioquímico em diferentes solventes, mostrando ser aplicável na cavidade oral.

A avaliação da oscilação de pH em PBS foi diferente da encontrada em saliva artificial, a redução do pH em PBS foi menor do que em saliva, talvez por equilíbrio osmótico essa variação ocorreu de forma diferente.

O teste de viabilidade celular mostrou que as membranas analisadas que não possuem o fármaco são atóxicas, já as membranas que possuem o fármaco causaram morte celular, necessitando que novos testes sejam realizados com diferentes concentrações de clorexidina associada a sua ação antimicrobiana.

Referências

REFERÊNCIAS

- ABDOU ES, NAGY KSA, ELSABEE MZ. Extraction and characterization of chitin and chitosan from local sources. *Biores Technol.* 2008;99:1359-67.
- ALONSO D, GIMENO M, SÁNCHEZ SJD, SHIRAI K. Chitosan-based microcapsules containing grapefruit seed extract grafted onto cellulose fibers by a non-toxic procedure. *Carbohyd Res.* 2010;345:854-59.
- ARAÚJO MTB., ARAÚJO RPC., CAMPOS EJ. Estudo in vitro e in vivo da atividade bactericida da clorexidina 0,12 por cento e a 0,2 por cento e dos produtos farmacológicos Listerine e Duplax. *Rev Odonto Ciênc.* 2001; 16(33):187-200.
- AKAKI E. Avaliação da incorporação de agentes antibacterianos a cimentos resinosos. Belo Horizonte: Escola de Engenharia da UFMG, 2005.166p. (Tese, Doutorado em Engenharia Metalúrgica).
- AVE´ROUS L.,BOQUILLON N. Biocomposites based on plasticized starch: thermal and mechanical behaviours. *Carbohydr Polym.* 2004; 56:111-122.
- ASSIS OBG, SILVA VL. Caracterização estrutural e da capacidade de absorção de água em filmes finos de quitosana processados em diversas concentrações. *Polímeros.* 2003;13(4):223-28.
- BARBANTI SH, ZAVAGLIA CAC, DUEK EAR. Polímeros biorreabsorvíveis na engenharia de tecidos. *Polímeros.* 2005;15(1):13-21.
- BAE K., JUN EJ., LEE SM., PAIK DI., KIM JB., Effect of water-soluble reduced chitosan on *Streptococcus mutans*, plaque regrowth and biofilm vitality. *Clinical oral Investigations.* 2006; 10:102-7.
- BANKER GS. Film coating theory and practice. *Journal of Pharmaceutical Sciences.* 1966; 55(1):81-89.
- BLODGETT KJ. *Am. Chem. Soc.* 1935; 57, 1007.
- BOATENG JS, MATTHEWS KH, STEVENS HNE, ECCLESTON GM. Wound healing dressings and drug delivery systems: a review. *J Pharm Sci.* 2008;97(8):2892-923.
- BORSCHIVER S, ALMEIDA LFM, ROITMAN T. Monitoramento tecnológico e mercadológico de biopolímeros. *Polímeros.* 2008;18(3):256-61.
- BORER KT. Increased serum growth hormone and somatic growth in exercising adult hamsters. *The American journal of physiology.* 1978; 234(6): E611-6.
- BUDTZ E., KNUDSEN AM. Chlorexidine gel and Steradent employed in cleaning

- dentures. *Acta Odontol Scand.* 1978; 36: 83-7.
- BURKATOVSKAYA M, TEGOS GP, SWIETLIK E, DEMIDOVA TN, CASTANO AP, HAMBLIN MR. Use of chitosan bandage to prevent fatal infections developing from highly contaminated wounds in mice. *Biomaterials.* 2006;27:4157-64.
- BYRNE C. Technical textiles market – an overview. In: HORROCKS AR, ANAND SC. *Handbook of technical textiles.* Cambridge: Woodhead Publishing. 2000, P.1-23.
- CARVALHO FC, BRUSCHI ML, EVANGELISTA RC, GREMIÃO MPD. Mucoadhesive drug delivery systems. *Braz. J. Phar. Sci.,* 2010: 46, n.1.
- CARRANZA JR., NEWMAN MG. *Periodontia clínica.* 8 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1997.
- CANELLA KMC, GARCIA RB. Caracterização de quitosana por cromatografia de permeação em gel – influência do método de preparação e do solvente. *Quim Nova.* 2001;24:13-7.
- CAUDURO NETO R. Estudo comparativo entre agentes químicos antiplaca:avaliaçãodas pesquisas. *RGO.* 1978;26(1):55-63.
- COOKE FW, LEMONS JE, RATNER BD. Properties of materials. In: RATNER BD, HOFFMAN AS, SCHOEN FJ, LEMONS JE. *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine.* San Diego: Academic Press; 1996, P.11-35.
- COSTA CA, HEBLING J, GARCIA-GODOY F, HANKS CT. In vitro cytotoxicity of five glass-ionomer cements. *Biomaterials,* Sep 2003; 24(21):3853-8
- COSTA MO, SADER MS, SOARES GA. Produção e caracterização de membranas de colágeno-quitosana para aplicações biomédicas. Trabalho apresentado Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais. 2012.
- CURY JA., ROCHA EP., KOO H. Effect of saccharin on antibacterial activity of chlorhexidine gel. *Braz Dent J.* 2000;11(1):29-34.
- DAMANTE CA. Efeito da terapia com laser em baixa intensidade (LILT) na expressão de fatores de crescimento da família FGF por fibroblastos gengivais humanos [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2007.
- DASH M, CHIELLINI F, OTTENBRITE RM, CHIELLINI E. Chitosan – a versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. *Prog Polym Sci.* 2011;36:981-1014.
- DENARDI BB. O uso da clorexidina na prática odontológica. *Revista da APCD.* 1994; 48(2):1279-85.
- DMEM - Low Glucose. Cotia: LGC Biotecnologia Ltda

-
- DODANE V., VILIVALAM VD. Pharmaceutical applications of chitosan. *Pharm Sci Technol Today*. 1998; 1:246–253.
- DUCEPPE N, TABRIZIAN M. Advances in using chitosan-based nanoparticles for in vitro and in vivo drug and gene delivery. *Expert Opin Drug Deliv*. 2010;7(10):1191-207.
- DUTTA P K, DUTTA J, TRIPATHI VS. Chitin and chitosan: chemistry, properties and applications. *J Sci Ind Res*. 2004;63:20-31.
- DUEK E A R., ZAVAGLIA C A C., BELANGERO W D. *Polymer*. 1999; 40:6465.
- EDUARDO FP, MEHNERT DU, MONEZI TA, ZECELL DM, SCHUBERT MM, EDUARDO CP. Cultured Epithelial Cells Response to Phototherapy With Low Intensity Laser. *Lasers in Surgery and Medicine* 2007; 39: 365-372.
- ELKE M., ROLF-JOACHIM M., WOLF-DIETER D. *Polym. Degrad. Stabil*. 2003, 80, 489.
- FAN L., DU Y., ZHANG B., YANG J., ZHOU J., KENNEDY JF. Preparation and properties of alginate/carboxymethyl chitosan blend fibers. *Carbohydrate Polymers* 2006; 65:447-452.
- FERREIRA, MC, PAGGIARO AO, ISAAC C, TEIXEIRA NETO N, SANTOS GB. Substitutos cutâneos: conceitos atuais e proposta de classificação. *Rev Bras Cir Plast*. 2011;26(4):696-702.
- FRESHNEY RI. *Culture of animal cells. A manual of basic technique*. 4.ed. New York: Wiley-Liss; 2000
- FURTH ME, ATALA A, VAN DYKE ME. Smart biomaterials design for tissue engineering and regenerative medicine. *Biomaterials*. 2007;28:5068-73.
- GERENTES P., VACHOUD L., DOURY J., DOMARD A. Study of a chitin-based gel as injectable material in periodontal surgery. *Biomaterials*. 2002; 23:1295-302.
- GIRATA AK. Dissertação de mestrado, Faculdade de Engenharia Química, Unicamp. 2011.
- HANSEN MB, NIELSEN SE, BERG K. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J. Immunol. Methods* 1989; 119:203-210.
- HIRANO S., OHE Y.,ONO H. Selective N-acylation of chitosan. *Carbohydr Res*. 1976; 70:526-35.
- HIRANO S. Chitin and chitosan as novel biotechnological materials. *Polym Int*. 1999;48:732-4.

-
- HÖFER D, SWEREV M. Medical textile and skin equivalents. *J Textile Apparel Tech Manag.* 2003;3(2):1-4.
- HOVEN VP, TANGPASUTHADOL V, ANGKITPAIBOON Y, VALLAPA N, KIATKAMJORNWONG S. Surface-charged chitosan: preparation and protein adsorption. *Carbohydr Polym.* 2007;68(1):44-53.
- HUGO WB., LONGWORTH AR. Some aspects of the mode of action of chlorhexidine action. *Pharm Pharmacol.* 1964;16:655-62.
- IKINCI G., SENEL S., AKINCIBAY H., KAS S., ERCIS S., WILSON CG., HINCAL AA. Effect of chitosan on a periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis*. *International Journal of Pharmaceutics.* 2002; 235:121-7.
- ILLUM L. 2003. Nasal drug delivery-possibilities, problems and solutions. *J Control Release* 87:187–198.
- ISO 10993-12. Biological evaluation of medical devices. Part 12: Sample preparation and referente materials. 2012.
- JAYAKUMAR R, NWE N, TOKURA S, TAMURA H. Sulfated chitin and chitosan as novel biomaterials. *Int J Biol Macromol.* 2007;40(3):175-81.
- JAYAKUMAR R, PRABAHARAN M, SUDHEESH KUMAR PT, NAIR SV, TAMURA H. Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications. *Biotechnol Adv.* 2011;29(3):322-37.
- JOHNSON F A., CRAIG D Q M., MERCER A D. *J. Pharm. Pharmacol.* 1997; 49, 639.
- KLIMEK J, HELLWIG E, AHRENS G. Fluoride taken up by plaque, by the underlying enamel and by clean enamel from three fluoride compounds in vitro. *Caries Res.* 1982;16:156-61.
- KHOR E., LIM LY. Implantable Applications of chitin and chitosan. *Biomaterials,* 2003; 24: 2339-49.
- KLOSTER AP. Desenvolvimento e análise “in vitro” do efeito antimicrobiano de bandagem bucal. 2011, 101f. Dissertação (Mestrado em Odontopediatria), Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, 2011.
- KONG M, CHEN XG, XING K, PARK HJ. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. *Int J Food Microbiol.* 2010;144:51-63.
- KUMAR MNV. A review of chitin and chitosan applications. *React Funct Polym.* 2000;46(1):1-27.
- KWOR K K., GROVES M J., BURGESS D J. *Pharm. Res.* 1991; 8, 341.

-
- KURITA K, KAJI Y, MORI T, NISHIYAMA Y. Enzymatic degradation of b chitin: susceptibility and the influence of deacetylation. *Carbohydr Polym.* 2000;(42):19-21.
- KLIMEK J, HELLWIG E, AHRENS G. Fluoride taken up by plaque, by the underlying enamel and by clean enamel from three fluoride compounds in vitro. *Caries Res.* 1982;16:156-61.
- KOIDE SS. *Nutr.Res.* 1998, 18,1091.
- LARANJEIRA MCM, FÁVERE VT. Quitosana: biopolímero funcional com potencial industrial biomédico. *Quim Nova.* 2009;32(3):672-8.
- LANGMUIR I J. *Am. Chem. Soc.* 1917; 39, 1848.
- LENDHE J. *Tratado de Periodontologia Clínica.* 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara; 1992.
- LI Z, RAMAY HR, HAUCH KD, XIAO D, ZHANG M. Chitosan - alginate hybrid scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials.* 2005;26(18):3919-28.
- LIM F., SUN A M. *Science.* 1980; 210: 908.
- LOE H. Does Chlorhexidine have a place in the prophylaxis of dental diseases? *J. Periodont Res.* 1973; 12: 93-9.
- MAJETI NV, KUMAR R. A review of chitin and chitosan applications. *React Funct Polym.* 2000;46:1-27.
- MELIN GR, Desenvolvimento de bandagem a partir de polímeros naturais para aplicações médicas. Trabalho de qualificação de mestrado. USP-EACH. 2012.
- MI FL., WU YB., SHYU SS., CHAO AC., LAI JY., SU CC. Asymmetric chitosan membranes prepared by dry/wet phase separation: a new type of wound dressing for controlled antibacterial release. *Journal of Membrane Science.* 2003; 212: 237-54.
- MUZZARELLI RA, ROCCHETTI R. The determination of molybdenum in sea water by hot graphite atomic absorption spectrometry after concentration on p-aminobenzylcellulose or chitosan. *Anal Chim Acta.* 1973; 64:371-9.
- MATTOSO LHC., FERREIRA M., OLIVEIRA Jr ON. Conjugated polymers for Langmuir-Blodgett films fabrication, In: J.C. Salamone, *The Polymeric Materials Encyclopedia*, Boca Raton, CRC Press Inc. 1996; 2:1432-1439.
- MOSMANN T. *Methods, J. Immunol.* 1983; 65:55-63.
- NAIR LS, LAURENCIN CT. Biodegradable polymers as biomaterials. *Prog Polym Sci.* 2007;32:762-98.
- NAJAFPOUR G., YOUNESI H., ISMAIL K S K. *Bioresour. Technol.* 2004, 92, 251.

-
- NAVARRO M, MICHIARDI A, CASTAÑO O, PLANELL JA. Biomaterials in orthopaedics. *J Roy Soc Interface*. 2008;5(27):1137-58.
- PARK BQ, KIM MM. Applications of chitin and its derivatives in biological medicine. *Int J Mol Sci*. 2010;11:5152-64.
- PILLAI CKS, PAUL W, SHARMA CP. Chitin and chitosan polymers: chemistry, solubility and fiber formation. *Prog Polym Sci*. 2009;34:641-78.
- PINHEIRO CE., VONO AZ., PAVARINI AB., Goma de mascar contendo Clorexidina: avaliação de sua capacidade antiplaca e anticárie. *RGO*. 1985; 33(1): 67-70.
- PRADELLA JGC. Biopolímeros e intermediários químicos. Relatório técnico nº 84396-205, Centro de Tecnologia de Processos e Produtos, Laboratório de Biotecnologia Industrial – LBI/CTPP (2006).
- PAUL W., SHARMA CP. Chitosan and alginate wound dressing: a short review. *Trends in biomaterials & artificial organs*. 2004; 18:18-23.
- QIN C, LI H, XIAO Q, LIU Y, ZHU J, DU Y. 2006. Water-solubility of chitosan and its antimicrobial activity. *Carbohydr Polym* 63:367–374.
- RATNER BD. Biomaterials science: an interdisciplinary endeavor. In: RATNER BD, HOFFMAN AS, SCHOEN FJ, LEMONS JE. *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine*, San Diego: Academic Press; 1996, P.1-8.
- REMUÑÁN-LÓPEZ, C.; BODMEIER, R.; *J. Controlled Release* 1997, 44, 215.
- RIKIMARU S., WAKABAYASHI Y., NOMIZU M., NISHI N., *Polym. J.* 2003, 35, 255.
- RIVALDI, JD, SARROUH, BF, FIORILO, R, SILVA, SS Glicerol de Biodiesel Estratégias biotecnológicas para o aproveitamento do glicerol gerado da produção de biodiesel, *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento* - nº 37, 2007.
- REGE PR, BLOCK LH. Chitosan processing sequence on the resultant chitosans properties. *Carbohydr Res*. 1999;321:235-45.
- SANTOS JE, SOARES JP, DOCKAL ER, CAMPANA FILHO SP, CAVALHEIRO ETG. Caracterização de quitosanas comerciais de diferentes origens. *Polímeros*. 2003;13:242-49.
- SANTOS JUNIOR AR, WADA MLF. Polímeros biorreabsorvíveis como substrato para cultura de células e engenharia tecidual. *Polímeros*. 2007;17(4);308-17.
- SCHWEIKL H, SCHMALZ G. Toxicity parameters for cytotoxicity testing of dental materials in two different mammalian cell lines. *Eur. J. Oral Sci.* Jun 1996; 104(3):292-9
- SCHIOTT CR., LOE H. The sensitivity of oral streptococci to chlorhexidine. *J*

Periodont Res. 1972; 7(2): 192–4.

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

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

SHIN H., JO S., MIKOS AG., *Biomaterials.* 2003, 24, 4353.

SINNES EP. Controle químico da placa bacteriana. In: Lascaia NT. *Prevenção na Clínica Odontológica: promoção da saúde bucal.* São Paulo: Artes Médicas: 1997. p .174-185.

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

SLETTEN GBG, DAHL JE. Cytotoxicity effects of extract of compomers. *Acta Odontol. Scand.* 2003; 57:316-22.

SMIDSRÖD, O.; SKJAK-BRAEK, G.; *Trends Biotechnol.* 1990, 8, 71.

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

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

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

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

TABARY N. Functionalization of PVDF membranes with carbohydrate derivatives for the controlled delivery of chlorhexidine. *Biomolecular Engineering.* 24: 472–476, 2007

TZE, W. J.; CHENG, S. C.; TAI, J.; YE, H.; *Transplant P.* 1998, 30, 477.

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

UENO H., NAKAMURA F., MURAKAMI M., OKUMURA M., KADOSAWA T., FIJINAGA T. Evaluation effects of chitosan for the extra-cellular matrix production by fibroblasts and the growth factors production by macrophages. *Biomaterials.* 2001; 22:2125-30.

- VAHDATY A., PITT FORD TR., WILSON RF. Efficacy of chlorhexidine in disinfecting dentinal tubules in vitro. *Endod Dent Traumatol.* 1993 Dec; 9(6): 243-8.
- VERT M., LI MS., SPENLEHAUER G., GUERIN P. *J.Mater. Sci.* 1992, 3, 432.
- WANG L., KHOR E., LIM LY. Chitosan-alginate –CaCl₂ system for membrane coat application. *Journal of Pharmaceutical Sciences.* 2001; 90:1134-42.
- YAMAMOTO H, KUNO Y, SUGIMOTO S, TAKEUCHI H, KAWASHIMA Y. Surface-modified PLGA nanosphere with chitosan improved pulmonary delivery of calcitonin by mucoadhesion and opening of the intercellular tight junctions. *J Control Release.* 2005;102(2):373-8
- YAN X., KHOR E., LIM LY. PEC Films prepared from chitosan-alginate coacervates. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin.* 2000; 48:941-46.
- YANG, X.J.; KOW, L.M.; FUNABASHI, T.; MOBBS, C.V.; *Diabetes* 1999, 48, 1763.
- YU L. *Biodegradable polymer blends and composites from renewable resources* 2008.
- YU L., CHEN L. *Biodegradable polymer blends and composites from renewable resources* 2008. Chapter 1, 1-14.
- YU L., PETINAKIS S., DEAN K., BILY KA., WU D. *Green polymeric blends and composites from renewable resources. Macromol Symp.* 2007; 249-250: 535-539.