

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DOS MATERIAIS

Dissertação de Mestrado

**CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DA QUITOSANA  
NOS PROCESSOS DE DES-REMINERALIZAÇÃO DO  
ESMALTE DENTÁRIO.**

Thatiana Montenegro Stamford Arnaud

Recife – PE, Brasil.

Março, 2008

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DOS MATERIAIS

Dissertação de Mestrado

**CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DA QUITOSANA  
NOS PROCESSOS DE DES-REMINERALIZAÇÃO DO  
ESMALTE DENTÁRIO.**

Thatiana Montenegro Stamford Arnaud

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências de Materiais da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Título de Mestre.

Orientador: Flamarion Borges Diniz

Co-orientações:

Prof. Dr. Anderson S. L. Gomes

Profª. Dra. Rosa Maria Souto Maior

Profª. Dra. Cinthia Tabchoury

\* Bolsista CAPES

Recife – PE, Brasil.

Março, 2008

**Arnaud, Thatiana Montenegro Stamford**  
**Caracterização e aplicação da quitosana nos processos de des-remineralização do esmalte dentário / Thatiana Montenegro Stamford Arnaud. - Recife : O Autor, 2008.**

**xii, 109 folhas : il., fig., tab., quadro.**

**Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco. CCEN. Programa de Pós-graduação em Ciência de Materiais, 2008.**

**Inclui bibliografia.**

**1. Ciência de materiais. 2. Polímeros. 3. Cariologia. 4. Tomografia de coerência óptica. I. Título.**

**541.2254 CDD (22.ed.) PCM2008-10**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS  
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DE MATERIAIS

**PARECER DA BANCA EXAMINADORA DE DEFESA DE MESTRADO**

***THATIANA MONTENEGRO STAMFORD ARNAUD***

*“CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DA QUITOSANA NO PROCESSO DE DES-  
REMINERALIZAÇÃO DO ESMALTE DENTÁRIO”*

A Banca Examinadora composta pelos Professores Flamarion Borges Diniz (*Presidente*), Anderson Stevens Leônidas Gomes, Rosa Maria Souto Maior, todos da Universidade Federal de Pernambuco; Professora Cinthia Pereira Machado Tabchoury, da Universidade de Campinas, considera a candidata:

( ) APROVADA COM DISTINÇÃO    (X) APROVADA    ( ) REPROVADA

Secretaria do Programa de Pós Graduação em Ciência de Materiais do Centro de Ciências Exatas e da Natureza da Universidade Federal de Pernambuco, aos 03 dias do mês de março de 2008.

*Flamarion B. Diniz*

PROF. FLAMARION BORGES DINIZ  
PRESIDENTE

*Anderson Stevens Leonidas Gomes*

PROF. ANDERSON STEVENS LEONIDAS GOMES  
1º EXAMINADOR

*Rosa Maria Souto Maior*

PROFª ROSA MARIA SOUTO MAIOR  
2º EXAMINADOR

*Cinthia Pereira Machado Tabchoury*

PROFª CINTHIA PEREIRA MACHADO TABCHOURY  
3º EXAMINADOR

Ao meu amado marido, Adrian, e a  
meu presente divino, Gabriel.

**AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. Flamarion Borges Diniz, pela orientação, amizade e pelos ensinamentos recebidos.

Ao Prof. Dr. Anderson S. L. Gomes, pela co-orientação e por disponibilizar o Laboratório de Optoeletrônica e Fotônica para a realização das análises de Tomografia por Coerência Óptica (OCT).

Ao cirurgião dentista, Sergio Grinfeld, pela obtenção dos dentes utilizados nesta pesquisa.

A Profa. Dra. Galba Takaki por fornecer a quitosana Sigma® usada na parte experimental deste trabalho.

Ao Professor Armando Shinohara, por ensinar a manusear o microdurômetro e por disponibilizá-lo durante toda a parte experimental.

Ao Professor Rômulo Menezes, por permitir a realização das análises de fósforo e cálcio no Departamento de Energia Nuclear. Esta ajuda foi imprescindível para o desenvolvimento desta pesquisa.

Ao Magnífico Reitor da Universidade Federal de Pernambuco, Prof. Dr. Amaro Lins.

Ao Prof. Dr. Cid Araújo, Coordenador Geral da Pós-Graduação de Ciências dos Materiais, pela competente administração.

Aos Professores Marcelo Navarro, Petrus Cruz e André Galembeck por disponibilizarem equipamentos necessários para a caracterização da quitosana.

A Central Analítica do departamento de química, especialmente aos funcionários Ricardo e Eliete pela disponibilidade e vontade de ajudar.

Ao técnico Francisco pela ajuda na difração de raio-X da quitosana realizada no Departamento de física.

Ao MSc. Bernardo, por transmitir parte de seu conhecimento sobre a técnica de Tomografia por Coerência Óptica (OCT).

A Rebeca por auxiliar nas análises de Tomografia por Coerência Óptica (OCT).

A Profa. Madalena pelo apoio na realização da titulação condutimétrica.

A Sandra que prestou imenso auxílio durante as análises de cálcio.

Aos colegas do Laboratório de Eletroquímica Edson Mororó Moura (LEEMM), Alyson, Gilson, Gilvaldo, Kleber, Maria Danielly, Rogério, Rômulo e Tiago pela agradável convivência.

Aos funcionários do DQF, especialmente Ângela, Marta e Wellington.

A CAPES, pela bolsa concedida.

Ao meu marido, Adrian, por sempre me ajudar nas realizações dos meus sonhos.

Ao meu filho, Gabriel, por ensinar-me a valorizar todos os momentos vividos.

Aos meus pais, Newton e Tânia, pelo apoio incondicional em todas as etapas da minha vida. A vocês, que me ensinaram princípios como honestidade, responsabilidade e sempre acreditarem em mim, o meu amor e a minha eterna gratidão.

À minha irmã, Thayza, pela inspiração, ajuda e incentivo nesta jornada.

Aos meus irmãos de coração, Marcelo, Lisângela, Débora e Laura, pelo carinho, amizade e incentivo em todos os momentos de nossas vidas.

A todas as pessoas que, com a mais simples palavra, atitude ou auxílio, contribuíram direta ou indiretamente na elaboração deste trabalho.

“A maior recompensa para o trabalho do homem não é o que ele ganha com isso, mas o que ele se torna com isso”.

Jhon Ruskin

## SUMÁRIO

	Páginas
LISTA DE ABREVIATURAS .....	01
LISTA DE FIGURAS .....	04
LISTA DE TABELAS .....	07
<b>RESUMO</b> .....	<b>09</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>11</b>
<b>1. CONSIDERAÇÕES PRELIMINARES</b> .....	<b>13</b>
<b>2. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>17</b>
2.1. QUITINA E QUITOSANA .....	17
2.1.1. <b>Histórico</b> .....	17
2.1.2. <b>Considerações</b> .....	18
2.1.3. <b>Propriedades</b> .....	22
2.2. ESMALTE DENTÁRIO .....	24
2.3. SALIVA .....	28
2.4. MÉTODOS EMPREGADOS .....	31
2.4.1. <b>Ciclagem de pH</b> .....	31
2.4.2. <b>Tomografia por Coerência Óptica</b> .....	33
2.4.3. <b>Análise de Microdureza</b> .....	35
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>37</b>
3.1. OBJETIVO GERAL .....	37
3.2. OBJETIVO ESPECÍFICO .....	37
<b>4. JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>38</b>
<b>5. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL</b> .....	<b>40</b>
5.1. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS .....	40
5.2. OBTENÇÃO DOS DENTES .....	40
5.3. PREPARO DOS ESPÉCIMES .....	40
5.3.1. <b>Corte do dente</b> .....	40
5.3.2. <b>Fixação da amostra e delimitação da área exposta</b> .....	42
5.3.3. <b>Limpeza e polimento dos espécimes</b> .....	42
5.4. CARACTERIZAÇÃO DOS ESPÉCIMES POR MICROINDENTAÇÃO..	44
5.4.1. <b>Obtenção do corpo de prova</b> .....	44

5.4.2. <b>Microdureza do esmalte</b> .....	44
5.5. ORIGEM DA QUITOSANA .....	45
5.6. CARACTERIZAÇÃO DA QUITOSANA .....	45
5.6.1. <b>Características estruturais</b> .....	46
5.6.1.1. Espectroscopia vibracional na região do infravermelho .....	46
5.6.2. <b>Grau de desacetilação</b> .....	46
5.6.2.1. Espectroscopia vibracional na região do infravermelho .....	46
5.6.2.2. Ressonância Magnética Nuclear .....	46
5.6.2.3. Titulação Condutimétrica .....	47
5.6.2.4. Análise Elementar .....	47
5.6.3. <b>Grau de umidade e análise térmica</b> .....	47
5.6.3.1. Análise termogravimétrica – TGA .....	47
5.6.3.2. Calorimetria Exploratória Diferencial – DSC .....	48
5.6.4. <b>Cristalinidade</b> .....	48
5.6.4.1. Difração de raio-X .....	48
5.7. TRATAMENTO DO ESMALTE COM QUITOSANA .....	48
5.7.1. <b>Preparo das soluções de quitosana</b> .....	48
5.7.2. <b>Aplicação da quitosana ao esmalte dentário</b> .....	49
5.7.3. <b>Estudo preliminar da capacidade de infiltração da quitosana no esmalte dentário através da técnica de Tomografia por Coerência Óptica (OCT)</b> .....	49
5.8. CICLAGEM DE pH .....	51
5.9. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL .....	52
5.10. MÉTODOS PARA AVALIAR O EFEITO DA CICLAGEM DE pH NA AUSÊNCIA E PRESENÇA DE QUITOSANA .....	53
5.10.1. <b>Análise de Microdureza</b> .....	54
5.10.2. <b>Análise química das soluções empregadas</b> .....	55
5.10.2.1. Determinação de fósforo .....	55
5.10.2.2. Determinação de cálcio .....	56
6. <b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	58
6.1. CARACTERIZAÇÃO DOS ESPÉCIMES POR MICRODUREZA .....	58
6.2. CARACTERIZAÇÃO DA QUITOSANA .....	60
6.2.1. <b>Características estruturais</b> .....	60

6.2.1.1. Espectroscopia vibracional na região do infravermelho .....	60
6.2.2. <b>Grau de Desacetilação</b> .....	61
6.2.2.1. Ressonância Magnética Nuclear .....	62
6.2.2.2. Titulação Condutimétrica .....	63
6.2.2.3. Espectroscopia vibracional na região do infravermelho .....	68
6.2.2.4. Análise Elementar .....	71
6.2.2.5. Comparação dos valores dos graus de desacetilação .....	72
6.2.3. <b>Grau de umidade e análise térmica</b> .....	74
6.2.3.1. Análise termogravimétrica – TGA .....	74
6.2.3.2. Calorimetria Exploratória Diferencial – DSC .....	75
6.2.4. <b>Cristalinidade</b> .....	75
6.2.4.1. Difração de raio-X .....	75
6.3. VERIFICAÇÃO DA PERMEABILIDADE DO ESMALTE A QUITOSANA .....	78
6.4. AVALIAÇÃO DO EFEITO DA QUITOSANA NO PROCESSO DE DES-REMINERALIZAÇÃO DO ESMALTE DENTÁRIO .....	82
6.4.1. <b>Análise de Microdureza</b> .....	82
6.4.1.1. Cálculo da perda do volume mineral do esmalte dentário .....	82
6.4.2. <b>Análise química das soluções empregadas</b> .....	85
6.4.2.1. Análise de fósforo .....	85
6.4.2.1.1. Avaliação do processo de desmineralização e remineralização na ausência e presença de quitosana .....	85
6.4.2.1.2. Comparação dos valores de microdureza e fósforo .....	88
6.4.2.2. Análise de cálcio .....	90
6.4.2.2.1. Avaliação do processo de desmineralização e remineralização na ausência e presença de quitosana .....	90
6.4.2.2.2. Comparação dos valores de microdureza e cálcio .....	91
7. <b>CONCLUSÕES</b> .....	93
PERSPECTIVAS .....	94
REFERÊNCIAS .....	95

**LISTA DE ABREVIATURAS**

% vol.	Porcentagem de volume mineral
%Inibição	Porcentagem de inibição da perda mineral
$\Delta\text{Ca}$	Perda líquida de cálcio
$\Delta\text{P}$	Perda líquida de fósforo
$\Delta x$	Varredura axial
$\Delta z$	Deslocamento lateral
$\Delta\lambda$	Largura de banda
$\mu\text{m}$	Micrômetro(s)
$\mu\text{S/cm}$	Microsiemens por centímetro
A	Absorbância
Å	Angstrom
$A_{1655}$	Absorbância no comprimento de onda 1655 $\text{cm}^{-1}$
$A_{3450}$	Absorbância no comprimento de onda 3450 $\text{cm}^{-1}$
AA	Absorção Atômica
$\text{Ca}_{\text{DES}}$	Quantidade de cálcio liberada pelo esmalte na desmineralização
$\text{Ca}_{\text{RE}}$	Quantidade de cálcio absorvida pelo esmalte na remineralização
C %	Percentual de carbono
C/N	Relação entre carbono e nitrogênio
CCS	Centro de Ciências da Saúde
cm	Centímetro
d	Espaçamento das camadas de átomos
DEN	Departamento de Energia Nuclear da UFPE
DES	Desmineralizadora
$\text{D}_2\text{O}$	Óxido de deutério
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
EA	Análise Elementar
GD%	Percentual do Grau de Desacetilação
H	Hidrogênio
H%	Percentual de hidrogênio
$\text{H}^2$	Núcleo de hidrogênio na posição 2 do anel glicopiranosídico
$\text{H}^{2-6}$	Núcleo de hidrogênio nas posição 2-6 do anel glicopiranosídico
$\text{H}_2\text{SO}_4$	Ácido sulfúrico

HA	Hidroxiapatita
HCl	Ácido clorídrico
HV	Hardness Vickers
I <sub>A</sub>	Intensidade de difração relativa à região amorfa da quitosana
I <sub>C</sub>	Intensidade de difração relativa à região cristalina da quitosana
I <sub>CR</sub>	Índice de cristalinidade
IV	Infravermelho
KBr	Brometo de potássio
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Dihidrogenofosfato de potássio
KHN	Knoop Hardness Number
Log	Logarítimo
mA	Miliamper
mg	Miligrama
MHz	Megahertz
mm	Milímetro
N%	Percentual de nitrogênio
N <sub>2</sub>	Gás nitrogênio
NaOH	Hidróxido de sódio
nm	Nanômetro
°C	Grau(s) celsius
OCT	Tomografia por Coerência Óptica
PBS	Phosphate-Buffered-Saline
P <sub>DES</sub>	Quantidade de fósforo liberada pelo esmalte na desmineralização
pH	Logaritmo negativo da concentração hidrogeniônica (-log [H <sup>+</sup> ])
ppm	Parte(s) por milhão
P <sub>RE</sub>	Quantidade de fósforo absorvida pelo esmalte na remineralização
PS-OCT	Tomografia por Coerência Óptica Sensível a Polarização
PVC	Policloreto de vinila
Q[1,25]	Quitosana na concentração de 1,25 mg/mL
Q[2,50]	Quitosana na concentração de 2,5 mg/mL
Q[5,0]	Quitosana na concentração de 5,0 mg/mL
R <sup>2</sup>	Relação linear
RE	Remineralização

RMN <sup>13</sup> C	Ressonância Magnética Nuclear de carbono 13
RMN <sup>1</sup> H	Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio
S	Segundo(s)
T	Transmitância
TGA	Análise Termogravimétrica
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
V/V	Percentual em volume
VM <sub>ED</sub>	Volume mineral do esmalte desmineralizado
VM <sub>EH</sub>	Volume mineral do esmalte hígido
δ	Deslocamento químico
ΔVM	Perda do volume mineral do esmalte
ΔVM <sub>C</sub>	Perda do volume mineral do esmalte para o grupo controle
ΔVM <sub>T</sub>	Perda do volume mineral do esmalte para o grupo tratado com quitosana
Θ	Ângulo teta
λ	Comprimento de onda
δ <sub>NH</sub>	Modo vibracional da deformação angular da ligação N-H (amida II)
v <sub>C=O</sub>	Deformação axial C=O (amida I)
v <sub>C-N</sub>	Deformação axial de C-N da amida
v <sub>C-O</sub>	Estiramento C-O do grupo alcoólico primário (-CH <sub>2</sub> – OH)
v <sub>O-H</sub>	Estiramento OH

## LISTA DE FIGURAS

	Páginas
Figura 01: Dente hígido e suas estruturas: esmalte, dentina, polpa e cimento. ....	13
Figura 02: Estrutura química da quitina e da celulose. ....	20
Figura 03: Esquema da reação de N-desacetilação da quitina para obtenção de quitosana através de hidrólise por hidróxido de sódio. ....	21
Figura 04: Estrutura química da quitosana. ....	22
Figura 05: Corte de esmalte dentário de mamífero primitivo. (e= esmalte, j=junção amelodental d=dentina). ....	26
Figura 06: Orientação dos cristais de hidroxiapatita nas camadas aprismática (A) e prismática (P) do esmalte dentário. No esmalte aprismático, os cristais são paralelos entre si e perpendiculares à superfície do esmalte dentário. A orientação dos cristais varia em um mesmo prisma e na região que delimita dois prismas (↑) a diferença de orientação dos cristais é máxima. ....	26
Figura 07: Corte do esmalte dentário humano. Observe que várias estrias de Retzius podem ser observadas (R). Os canalículos dentinários aparecem como linhas escuras. D=Dentina. E=Esmalte. ....	27
Figura 08: A) Porção coronária revestida por parafilme e realização dos traçados com caneta (pilot) para auxiliar no corte do elemento dentário. B) Molde de PVC com resina EPOXY sustentando o dente pela raiz e deixando a porção coronária preparada para os cortes mesio-distal e vestibulo-lingual. C) Aparelho de corte Labcut modelo 1010 da EXTEC <sup>®</sup> . D) Posicionamento do dente no aparelho para a realização do primeiro corte vestibulo-lingual. ....	41
Figura 09: A) Esmalte de unha, isento de cálcio e fósforo na sua composição, sendo utilizado como verniz ácido resistente. B) Cera utilidade e haste de plástico.....	42
Figura 10: A) Polimento da amostra na Politriz modelo PLF da marca FORTEL B) Amostra submersa em 20 mL de solução PBS - Banho de ultra-som (Ultra-som Thornton).....	43
Figura 11: A) Espécime fixado com cera pegajosa em lâmina de vidro. B) Compressor utilizado para nivelar o esmalte exposto com a cera pegajosa. ....	44
Figura 12: A) Corpo de prova após a retirada da lâmina de vidro superior. B) Microdurômetro HMV-2 (Shimadzu).....	45

Figura 13: A) Pincel nº 2, recipiente com quitona de 2,5 mg/mL e amostra. B) Aplicação da quitosana na área exposta de esmalte dentário (5mm <sup>2</sup> ). .....	49
Figura 14: Interferômetro de Michelson montado em fibra óptica – Sistema de Tomografia por Coerência Óptica (OCT). .....	50
Figura 15: Fluxograma representando os procedimentos experimentais adotados nos estudos. ....	53
Figura 16: Espécimes mantidos sob refrigeração em ambiente fechado e úmido até a leitura de microdureza. ....	54
Figura 17: Espectro no infravermelho da quitosana Sigma®. ....	60
Figura 18: Esquema da quitina/quitosana com a numeração dos prótons que aparecem no RMN <sup>1</sup> H. ....	62
Figura 19: Interações intramoleculares e intermoleculares em/entre as cadeias de quitosana. ....	63
Figura 20: Espectro de RMN <sup>1</sup> H da quitosana Sigma®. ....	64
Figura 21: Curva de titulação condutimétrica da amostra de quitosana. ....	67
Figura 22: Espectro no infravermelho da quitosana Sigma® para determinar o grau de desacetilação através da equação 4 que utiliza a linha de base (a). ....	69
Figura 23: Espectro no infravermelho da quitosana Sigma® para determinar o grau de desacetilação através da equação 5 que utiliza a linha de base (b). ....	70
Figura 24: Curva da perda de massa e o DSC da quitosana. ....	74
Figura 25: Difratoograma de raio-X da quitosana Sigma®. ....	76
Figura 26: Imagem de OCT de espécime contendo quitosana (1,25 mg/mL) no terço médio. ....	79
Figura 27: Imagem de OCT de espécime sem quitosana (direita) e com quitosana na concentração de 2,5 mg/mL (esquerda). ....	79
Figura 28: Imagem de OCT de espécime contendo quitosana (5,0 mg/mL). ....	80
Figura 29: Representação gráfica da perda do volume mineral média de acordo com os grupos. As barras de erro representam o desvio-padrão. ....	84
Figura 30: Representação gráfica da quantidade de fósforo liberada (DES) pelo esmalte dentário na ciclagem. As barras de erro representam o desvio-padrão. ....	85
Figura 31: Representação gráfica da quantidade de fósforo absorvida (RE) pelo esmalte dentário na ciclagem. As barras de erro representam o desvio-padrão. ....	86

Figura 32: Representação gráfica do percentual de ganho mineral durante o processo de des-remineralização do esmalte dentário através da análise de fósforo. As barras de erro representam o desvio-padrão. ....	87
Figura 33: Comparação dos valores obtidos da inibição da perda mineral (%) através da microdureza do esmalte dentário e pela análise química de fósforo das soluções empregadas. ....	89
Figura 34: Comparação dos valores obtidos da inibição da perda mineral (%) através da microdureza do esmalte dentário e pela análise química de cálcio das soluções empregadas. ....	92

## LISTA DE TABELAS

	Páginas
Tabela 01: Conteúdo de quitina aproximado (percentual de massa seca), em diferentes fontes. ....	19
Tabela 02: Condições de desacetilação da quitina para produção de quitosana. ....	21
Tabela 03: Concentrações de íons relevantes na saliva. ....	30
Tabela 04: Composição química da solução PBS (Phosphate-Buffered-Saline). ....	43
Tabela 05: Composição química da solução desmineralizadora (DES). ....	51
Tabela 06: Composição química da solução remineralizadora (RE). ....	52
Tabela 07: Correlação do volume pipetado da solução II e a obtenção das soluções padrão de fósforo com concentrações variando de 0,1014 a 1,5216 µg/mL. ....	56
Tabela 08: Valores de dureza Vickers encontrado em cada espécime e a média da microdureza para cada grupo. ....	58
Tabela 09: Atribuição das bandas do infravermelho da quitosana Sigma®. ....	60
Tabela 10: Integração dos picos do espectro de RMN <sup>1</sup> H da quitosana Sigma® para o cálculo do grau de desacetilação. ....	64
Tabela 11: Valores dos graus de desacetilação em porcentagem da quitosana determinados por RMN <sup>1</sup> H, a partir de duas equações distintas. ....	65
Tabela 12: Condutância medida (µS/cm) a cada volume de base acrescentada durante a titulação condutimétrica. ....	66
Tabela 13: Valores da massa de quitosana, concentração da base, volume de base usado para a neutralização dos grupos ácidos da amostra e o grau de desacetilação da quitosana. ....	68
Tabela 14: Valores dos graus de desacetilação em porcentagem da quitosana determinados por espectroscopia vibracional na região do infravermelho, a partir de duas equações distintas. ....	71
Tabela 15: Percentuais de carbono, nitrogênio, hidrogênio, a relação carbono / nitrogênio e o grau de desacetilação da amostra de quitosana. ....	72
Tabela 16: Valores dos graus de desacetilação (%) em porcentagem da quitosana Sigma® determinados por RMN <sup>1</sup> H, titulação condutimétrica, espectroscopia vibracional na região do infravermelho (IV) e análise elementar. ....	72
Tabela 17: Índice de cristalinidade e as intensidades de difrações nas regiões cristalinas e amorfas da quitosana. ....	77

Tabela 18: Média e desvio padrão (n=3) da perda do volume mineral (%) e do percentual de inibição do esmalte dentário após a ciclagem. ....	83
Tabela 19: Média e desvio padrão (n=3) da quantidade de fósforo ( $\mu\text{g}$ ) liberada (DES) ou absorvida (RE) pelo esmalte dentário na ciclagem de pH. ....	86
Tabela 20: Média e desvio padrão (n=3) da perda líquida de fósforo ( $\mu\text{g}$ ) e do percentual de inibição do esmalte dentário após a ciclagem. ....	88
Tabela 21: Média e desvio padrão (n=3) da quantidade de cálcio ( $\mu\text{g}$ ) liberada (DES) ou absorvida (RE) pelo esmalte dentário na ciclagem de pH. ....	90
Tabela 22: Média e desvio padrão (n=3) da perda líquida de cálcio ( $\mu\text{g}$ ) e do percentual de inibição do esmalte dentário após a ciclagem. ....	91

## RESUMO

A doença cárie, embora já controlada pelo uso do flúor, ainda acomete uma parcela significativa da população mundial, em especial nos países menos desenvolvidos, o que têm impulsionado pesquisas sobre novos métodos preventivos. Vários estudos têm demonstrado que a quitosana, por ser um polímero biocompatível, biodegradável e por apresentar ação antibacteriana, pode ser usada como substância anticariogênica. Contudo, a efetividade da quitosana na inibição da perda mineral ainda não foi determinada. Assim, o objetivo desta pesquisa *in vitro* foi caracterizar e avaliar o efeito da quitosana nos processos de remineralização do esmalte dentário. A quitosana foi caracterizada físico-quimicamente e a sua capacidade de infiltração ao esmalte dentário foi observada através de Tomografia por Coerência Óptica (OCT). De acordo com os resultados, a quitosana utilizada apresentou grau de desacetilação em torno de 65% e índice de cristalinidade próximo a 32%. A OCT mostrou que a quitosana aderiu à superfície do esmalte e penetrou parcialmente ao redor dos prismas. 36 espécimes foram submetidos à ciclagem de pH durante 5 dias para investigar o efeito da concentração de quitosana (1,25; 2,5 e 5,0 mg/mL) e do tempo de exposição da mesma ao esmalte dentário (30, 60 e 90 s). Para verificar o efeito da ciclagem de pH na ausência e presença da quitosana foram analisadas as alterações ocorridas no dente e nas soluções empregadas através do método de microdureza e determinação de fósforo, respectivamente. Os dados obtidos pela microdureza concordaram com os encontrados nas análises de fósforo verificando que a quitosana inibiu a perda mineral em 56% a 82% dependendo da concentração e do tempo de exposição sendo o melhor resultado o da quitosana de 2,5 mg/mL no tempo de 60s. No entanto, não houve diferença estatística entre as concentrações de 2,5 e 5,0 mg/mL e entre os tempos de 60 e 90s. Os

resultados deste estudo indicam que a quitosana influenciou o processo de des-mineralização do esmalte dentário inibindo a perda.

**Palavras chaves:** quitosana, cárie, esmalte dentário, desmineralização, remineralização.

**ABSTRACT**

The disease caries, but now controlled by the use of fluoride, still affects the majority of the world's population have incremented the development of new prevented methods. Despite to this fact many studies have been showed that chitosan is a biocompatible and biodegradable polymer which present antibacterial action and may be used as anticariogenic product. However, the effectiveness of chitosan on inhibition of mineral decay was not still unclear. Thus, the main objective of this *in vitro* study was to characterize and evaluate the chitosan applied to act in the demineralization processes of the dental enamel. The chitosan was physical-chemically characterized and its infiltration capacity in the dental enamel was observed Tomography by Optical Coherence (OCT). By the obtained results the type of chitosan used showed: deacetylation rate beyond 65 % and crystalline index near 32 %. The Tomography by Optical Coherence (OCT) parameter showed that chitosan adhered to dental enamel surface and partially jumped inside the prismatic surface. 36 specimes were submitted to pH cycling for 5 days with the objective to investigate the effect of chitosan rates (1.25; 2,5 and 5.0 mg/mL) and the specimes exposition time to the dental enamel (30; 60 and 90 s). To verify the effect of different pH values in presence and absence of chitosan were analyzed the alterations occurred on tooth and solutions used by the microindentation method and phosphorus analyses, respectively. The microhardness data are in agreement with phosphorus analyses and allowed that chitosan inhibited the mineral decay in 56 % and 82 % depending of rates and time of exposition and best were observed when applied chitosan in rate 2.5 mg/mL and exposed time of 60 s. Although, wasn't observed significant difference between 2.5 and 5.0 rates

and exposition time of 60 and 90 s. The results suggest the chitosan effect on the process of des-remineralization of the dental enamel, inhibiting the mineral decay.

**Key Words:** chitosan, caries, dental enamel, desmineralization, remineralization.

## 1. CONSIDERAÇÕES PRELIMINARES

O dente é uma estrutura dura, saliente e esbranquiçada, anatomicamente dividida em raiz e coroa. A raiz é a porção que está inserida no osso e a coroa é a parte visível na cavidade oral. A coroa é formada por três tecidos diferentes. Mais internamente encontra-se uma câmara preenchida por tecido conjuntivo, vasos sanguíneos e nervo (a polpa) que é responsável pela nutrição do dente. Revestindo a cavidade pulpar está a dentina a qual é extremamente sensível devido às terminações dos filetes nervosos que penetram no seu interior. Em contato com a dentina e recobrendo toda a coroa há o esmalte dentário que é o tecido mais duro do corpo humano (Figura 01).

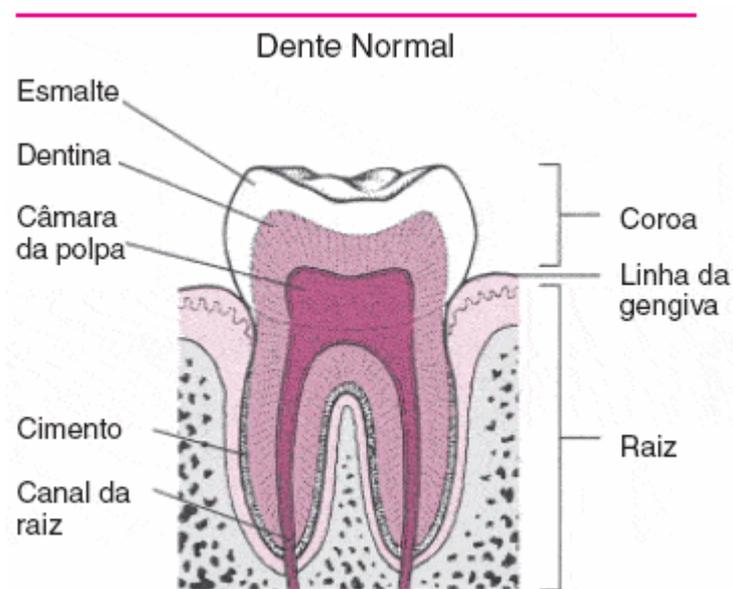


Figura 01: Dente hígido e suas estruturas: esmalte, dentina, polpa e cimento.

Fonte: [http://www.msd-brazil.com/msd43/m\\_manual/mm\\_sec8\\_94.htm](http://www.msd-brazil.com/msd43/m_manual/mm_sec8_94.htm)

O esmalte dentário se apresenta como uma estrutura extremamente organizada constituída por cristais de hidroxiapatita,  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , intercalados por água e material orgânico como as proteínas enamelinas as quais são responsáveis pela

orientação e sustentação destes cristais. Embora a hidroxiapatita seja o constituinte principal do esmalte, este também apresenta outros elementos como flúor, zinco, chumbo na sua camada superficial e sódio, carbono, magnésio nas suas camadas mais profundas, enquanto outros íons ficam inalterados pela profundidade como o estrôncio e o cobre.

O esmalte dentário está em contato com a saliva que é um fluido orgânico com pH variando entre 5,2 e 7,8. A saliva tem como principais componentes químicos: água (99,5%), sódio, potássio, cloro, magnésio, cálcio, fosfato, carbonato, ácido úrico, ácido cítrico e proteínas. Esta composição permite que a saliva atue quimicamente neutralizando os ácidos bucais, exercendo, portanto, a função de proteger os dentes contra a dissolução do esmalte. A integridade físico-química do esmalte dentário dentro do ambiente oral depende totalmente da composição e do comportamento químico dos fluidos orais. Os principais fatores que controlam a estabilidade da apatita do esmalte são: o pH e as concentrações ativas livres de cálcio e fósforo em solução. O equilíbrio químico entre o esmalte em termos de hidroxiapatita e a fase aquosa pode ser representado da seguinte maneira:  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2 \rightleftharpoons 10 \text{Ca}^{2+} + 6 \text{PO}_4^{3-} + 2 \text{OH}^-$ . Se as apatitas se dissolverão ou permanecerão intactas sob qualquer circunstância, dependerá do produto das concentrações ativas livres dos íons na fase líquida. Em equilíbrio, a solução é saturada e o produto da atividade dos íons é denominado produto da solubilidade.

As concentrações de cálcio e fosfato presentes na saliva influenciam o pH dos fluidos orais. O pH no qual a saliva é exatamente saturada no que se refere à apatita do esmalte, é definido como “pH crítico”: abaixo do pH crítico, o esmalte pode se dissolver (processo de desmineralização) enquanto que acima do valor crítico o esmalte tende-se a “remineralizar”. Bactérias cariogênicas presentes na cavidade bucal metabolizam

açúcares em ácidos fazendo com que o pH do meio resulte inferior ao “pH crítico”, acarretando na subsaturação de cálcio e fósforo da saliva e conseqüentemente na saída desses íons do esmalte (processo de desmineralização). A neutralização do pH da saliva resulta novamente na saturação do cálcio e do fósforo e na restituição desses íons para o esmalte (processo de remineralização). Esta neutralização da saliva pode se dar por vários fatores como, por exemplo: o uso diário de dentifrícios e bochechos com flúor ou outras substâncias que inibam a desmineralização ou favoreçam a remineralização do esmalte dentário.

O Flúor, advindo da fluoretação artificial, é absorvido quase completamente pelo organismo humano, enquanto que a sua absorção através de alimentos tais como, chás, peixes e determinados vegetais, é de apenas 25%. A maior parte deste elemento químico se deposita no tecido ósseo, enquanto uma pequena porção migra para os dentes. O flúor para prevenir a cárie precisa ser usado na dosagem certa, caso contrário será considerado um produto tóxico. A toxicidade crônica do flúor apresenta como principal efeito colateral: a fluorose, que consiste inicialmente no aparecimento de leves manchas esbranquiçadas no esmalte dentário até manchas avançadas acastanhadas acarretando na fratura da estrutura dental. A toxicidade aguda pode provocar desde um leve mal estar até a morte dependendo da dose. A dose fatal para adultos é de 2,5 a 5,0 gramas e para uma criança com peso de 10 Kg a dose é de 535mg.

Uma substância que tem sido empregada em estudos odontológicos sobre prevenção de cárie é a quitosana. A quitosana é um biopolímero obtido da desacetilação da quitina - o maior constituinte de exoesqueletos de crustáceos. A quitina e quitosana são polímeros atóxicos, biodegradáveis e biocompatíveis, cujas propriedades vêm sendo exploradas e aplicadas também no ramo da medicina, biotecnologia, alimentos entre outras.

Para caracterizar a quitosana é importante realizar análises de morfologia, cristalinidade, grau de umidade e grau médio de acetilação. Esta última característica pode influenciar o desempenho da quitosana em muitas de suas propriedades.

O objetivo deste trabalho é caracterizar a quitosana e verificar a influência desta nos processos de des-remineralização do esmalte dentário.

## 2. INTRODUÇÃO

### 2.1. QUITINA E QUITOSANA

#### 2.1.1. Histórico

A quitina foi descrita pela primeira vez em 1811 na França por Braconnot, professor de Historia Natural, que durante suas pesquisas ao tratar *Agaricus volvaccus* e outros fungos, com solução alcalina, encontrou uma substância com conteúdo maior de nitrogênio do que a madeira, concluindo que se tratava de uma nova substância identificada em plantas, a qual denominou de “fungine” (Anjos, 2005). Em 1823, Odier isolou uma substância contida nas carapaças de insetos semelhante à encontrada em plantas, a qual chamou de quitina que em grego “khitón” significa túnica, envelope ou cobertura, contudo não conseguiu detectar nitrogênio. Odier estabeleceu pela primeira vez uma relação entre as substâncias de suporte encontradas na carapaça de insetos e nos tecidos vegetais (Muzzarelli, 1977). Payen em 1843 detectou a presença de nitrogênio da quitina e iniciou a discussão entre a diferença de celulose e quitina. Ledderhose (1878) identificou a quitina como um composto de glucosamina e ácido acético e escreveu a equação de hidrólise. Gilson (1894) confirmou a presença de glucosamina na quitina (Stamford, 2007).

Odier e Childre relataram o isolamento da quitina usando vários tratamentos com soluções de hidróxido de potássio concentrado o que os levou a um equívoco, pois na realidade os citados pesquisadores haviam isolado a quitosana. Esta foi descrita pela primeira vez em 1859 por Rouget, como sendo uma quitina modificada, pois em seus estudos relata que ao ferver a quitina em hidróxido de potássio concentrado, a mesma fica solúvel em ácidos orgânicos (Muzzarelli, 1977). Em 1894 Hoppe-Seyler ao estudar

a quitina modificada, propôs o nome quitosana, pelo fato de que a quitosana possui a mesma quantidade de nitrogênio da quitina (Hong, 1996).

A quitosana foi produzida industrialmente pela primeira vez em 1971, no Japão. As pesquisas sobre quitina e quitosana e suas aplicações só começaram a receber investimentos científicos e tecnológicos em torno de 1979, quando se começou a perceber o grande potencial de suas aplicações (Monteiro Júnior, 1999). Em 1986, o Japão já possuía quinze industriais produzindo quitina e quitosana em escala comercial. Atualmente a quitosana vem recebendo destaque nas pesquisas com suas aplicações, sendo considerada um dos materiais de maior potencial do século, devido a sua grande versatilidade de uso (Roberts, 1992; Monteiro Júnior, 1999).

### 2.1.2. Considerações

Quitina é um polímero natural, insolúvel, linear que apresenta o mesmo tipo de unidade monomérica  $\beta$ -1,4 *N*-acetilglucosamina e com exceção da celulose é o polissacarídeo mais abundante e largamente distribuído na natureza, (Canela & Garcia, 2001). Sua estrutura é similar à da celulose, exceto pelo fato de que o grupo hidroxila do carbono na posição 2 do anel glicopiranosídico é substituído pelo grupo acetamida (Figura 02). Esta semelhança estrutural é refletida nas funções similares exercidas por estes dois polímeros na natureza, pois ambos atuam como material estrutural e protetor (Signini, 2002; Campos-Takaki, 2005). A quitina é encontrada no exoesqueleto dos crustáceos, insetos, artrópodes e na parede celular de fungos. O rendimento de quitina (percentual) extraída de diferentes fontes encontra-se descrito na Tabela 1.

Tabela 01: Conteúdo de quitina aproximado (percentual de massa seca), em diferentes fontes.

<i>Fonte de Quitina</i>		<i>Conteúdo de quitina (%)</i>
<b><i>Crustáceos</i></b>		
Caranguejo	Câncer	72,1 <sup>c</sup>
	Carcinus	64,2 <sup>b</sup>
	Paralithodes	35,0 <sup>b</sup>
	Callinectes	14,0 <sup>a</sup>
Camarão	Crangon	69,1 <sup>c</sup>
	Alasakan	28,0 <sup>d</sup>
Lagosta	Nephrops	69,8 <sup>c</sup>
	Homarus	60-75,0 <sup>c</sup>
<b><i>Insetos</i></b>		
Coleoptera		27-35,0 <sup>c</sup>
Diptera		54,8 <sup>c</sup>
Periplaneta		2,0 <sup>d</sup>
Blatella		18,4 <sup>c</sup>
Pieris		64,0 <sup>c</sup>
Bombyx		44,2 <sup>c</sup>
Calleria		33,7 <sup>c</sup>
<b><i>Moluscos</i></b>		
Clamshell		6,1
Oyster shell		3,6
Squid, Skeletal pen		41,0
Krill, deproteinized shell		40,2
<b><i>Fungos</i></b>		
<i>Aspergillus nigersogenum</i>		42,0 <sup>e</sup>
<i>Penicillium notatum</i>		18,5 <sup>e</sup>
<i>Penicilium chrysogenum</i>		20,1 <sup>e</sup>
<i>Saccharomyces cereviseae</i>		2,9 <sup>e</sup>
<i>Mucor rouxii</i>		44,5
<i>Lactarius Vellereus</i> (cogumelo)		19,0

<sup>a</sup> Peso corpóreo úmido; <sup>b</sup> Peso corpóreo seco; <sup>c</sup> Peso orgânico de cutícula; <sup>d</sup> Peso total de cutícula seca; <sup>e</sup> Massa micelial seca.

Fonte: Tharanathan & Kittur, 2003.

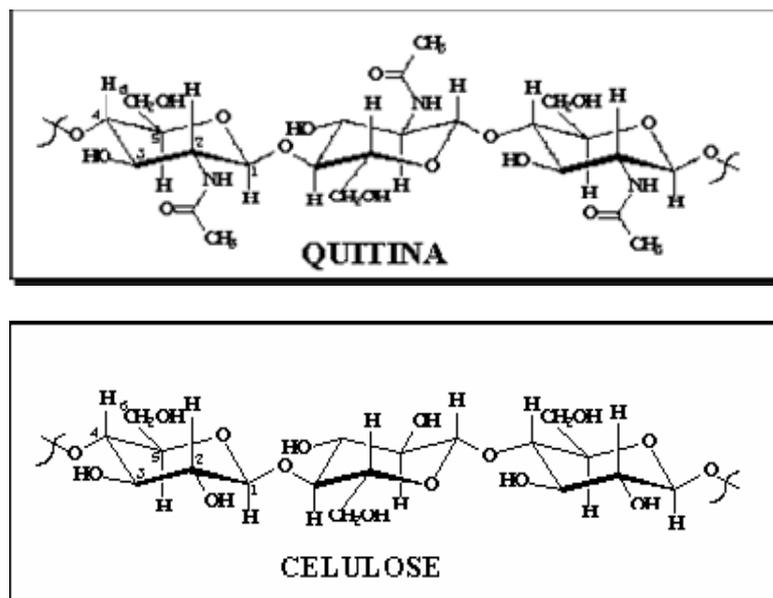


Figura 02: Estrutura química da quitina e da celulose.

*Fonte: Signini, 2002..*

A desacetilação da quitina conduz a um novo polímero denominado quitosana (Amorim et al, 2000; Andrade et al., 2003). Geralmente o processo de desacetilação ocorre a partir da hidrólise da quitina, em meio alcalino, em temperaturas elevadas sob condições heterogêneas (Klug et al., 1998); (Tonhi et al., 2002). No entanto, este processo também pode ocorrer utilizando enzimas específicas, como a quitinase ou pela ação de microrganismos (Monteiro Júnior, 1999; Kim & Rajapakse, 2005). A condição de desacetilação e a reação química da quitina podem ser visualizadas na tabela 02 e na figura 03 respectivamente. A quitina pode sofrer vários graus de desacetilação, resultando em diversos derivados da quitosana (Canela & Garcia, 2001; Khan et al., 2002). O produto totalmente desacetilado é raramente obtido, visto que o tempo necessário para completar a reação de desacetilação é longo e acaba acarretando na despolimerização da cadeia. (Klug et al, 1998).

Tabela 02: Condições de desacetilação da quitina para produção de quitosana.

FONTE	DESACETILAÇÃO				
	Atmosfera	Conc. Álcali	Temp. (°C)	Tempo (horas)	Razão quitina / álcali
Lagosta	Ar/N2	55% KOH	100-140	0,50-15	1:100
Caranguejo	N2	47% NaOH	60- 110	1,2 x 1-4 <sup>b</sup>	-----
	N2	40% NaOH	Refluxo	10	-----
Camarão	N2	50% NaOH	100	0,5-5	-----
	ar/ N2	50% NaOH	145-150	0,30, 0,25	1:10
	ar	50% NaOH	60	2 <sup>c</sup>	1:4
	vácuo	50% NaOH	100	0,5 x 2 <sup>b</sup>	1:15
	ar	50% NaOH	95	0,75 x 2 <sup>b</sup>	-----
Camarão de água doce	ar	50% NaOH	30	24-144	1:14-56
	ar	60% KOH	100	1	1:65
	ar	50% NaOH	100	2	-----
Krill	ar	50%NaOH	80-96	0,30	-----
	ar	39% KOH <sup>a</sup>	refluxo	20	1:17

a dissolvido em 95% de etanol + etileno glicol; b tempos de tratamento do álcali separado; c secagem por aquecimento.

Fonte: Signini, 2002.

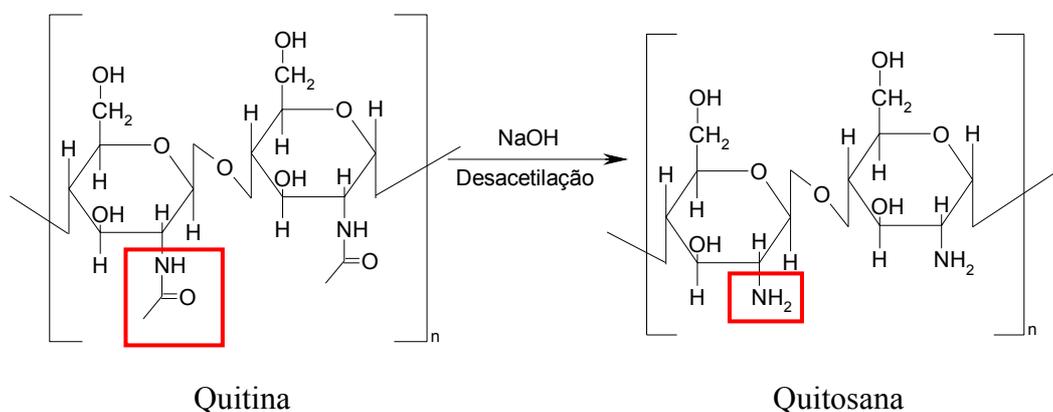


Figura 03: Esquema da reação de N-desacetilação da quitina para obtenção de quitosana através de hidrólise por hidróxido de sódio.

Fonte: Anjos (2005).

Quitosana é um heteropolímero natural, composto por unidades  $\beta$ -1,4 D-glucosamina ligadas a resíduos de N-acetilglucosamina (Figura 04) (Chatterjee et al,

2005). A quitosana não é muito encontrada na natureza, quando comparada à quitina e a celulose, podendo ser encontrada na parede celular de alguns fungos, principalmente da Classe Zygomycetes e em alguns moluscos; (Silva et al, 2006). Desta forma a melhor maneira de obter quitosana é na indústria através da hidrólise química da quitina (Pochanavanich & Suntornsuk, 2002; Okawa et al., 2003; Franco et al., 2005; Amorim et al., 2006). Existem vários derivados da quitosana, os quais podem se diferenciar pelo grau de desacetilação, assim como pela disposição dos grupos N-acetil residuais, na cadeia do polímero (Rinaudo, 2006; Stamford et al., 2007).

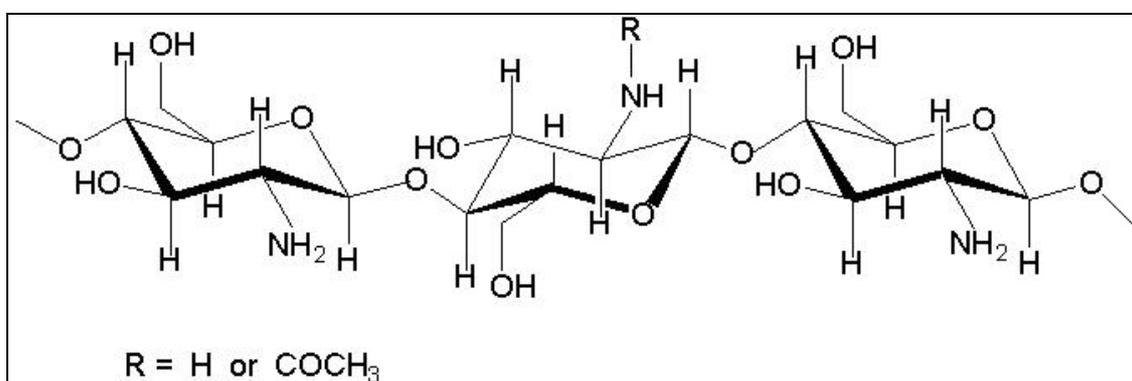


Figura 04: Estrutura química da quitosana

Fonte: Hiorth et al., 2006

### 2.1.2. Propriedades

A quitosana é um polímero caracterizado por propriedades específicas que revelam seu potencial para inúmeras aplicações em vários produtos comerciais. As principais propriedades deste polissacarídeo são: bioatividade, biodegradabilidade, biocompatibilidade, reatividade do grupo amino desacetilado, permeabilidade seletiva, ação polieletrólítica, habilidade em formar gel e filme, habilidade de quelação e capacidade adsortiva (Synowieck & Al-Khateeb, 2003; Tharanathan & Kittur, 2003).

No pH biológico a quitosana apresenta-se como um policação. Em meio ácido os grupos amino da quitosana captam íons hidrogênio do meio, resultando em uma

carga global positiva no polímero. Esta característica permite a sua interação com moléculas carregadas negativamente tais como: gorduras, tecido animais ou vegetais, membrana celular, entre outras formas (Horner et al., 1997; Pautlowska, 1997). As possibilidades de aplicações são ainda enriquecidas pelo fato que a quitosana pode ser preparada em diferentes formas, tais como soluções de viscosidade controlada, géis, filmes e membranas, microesferas e nanopartículas (Campana Filho et al., 2007, Javakuma & Mano, 2007; Sezer et al., 2007; Wongpanit et al., 2007).

A quitosana vem sendo extensivamente estudada devido às suas propriedades peculiares que lhe conferem um aproveitamento bastante versátil, tais como:

- carreador de fármacos de liberação controlada e DNA (Kim et al., 2004; Park et al., 2004);
- regeneração de tecidos epiteliais (Maia et al., 2006; Cho et al., 2007; Olmez et al., 2007);
- confecção de membranas artificiais (Costa et al., 2006);
- promotor de osteogênese (Murugan & Ramakrishna, 2004);
- antibacteriano (Ikinci et al., 2002; Chung et al., 2004; Yadav & Bhise, 2004, Cao & Sun, 2007);
- coadjuvante da higiene oral (Sano et al., 2002; Sano et al., 2003);
- absorção de gordura e redução do colesterol sérico (Gades & Stern, 2005);
- componente de cosméticos (Kohei & Maki, 2006);
- remoção e recuperação de diferentes resíduos (Vivek & Torres, 2000);
- biotransformação e detecção de pesticidas (Du et al, 2007)
- recobrimento de sementes na agricultura (Velásquez, 2003);
- degradação de corantes, aminoácidos e proteínas (Borderías, et al., 2005);
- agente de floculação no tratamento de efluentes aquosos (Díaz et al., 2007).

Embora nos últimos anos a aplicação da quitosana, já esteja bem estabelecida, as pesquisas em novas aplicações têm aumentado exponencialmente em diversas áreas, como na agricultura, indústria de alimentos, meio ambiente e biotecnologia.

## 2.2. ESMALTE DENTÁRIO

O esmalte dentário é uma estrutura rígida que consiste de cristais de hidroxiapatita firmemente unidos, conferindo uma aparência semelhante ao vidro. É um material translúcido, sendo a cor branco-amarelada dos dentes resultante da dentina (Ramires-Ramiro et al., 2000). O esmalte dentário apresenta 95 % de minerais, 4 % de água e 1% de matriz orgânica (Lippert et al., 2004).

O mineral do esmalte é a apatita com unidade molecular  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , cuja fórmula química pode ser diminuída para  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ , que apresenta 40 % de cálcio, 57 % de fosfato (18% fósforo) e 3% de hidroxila (Romano e Torriani, 1996). Estes elementos são chamados de componentes principais, visto que são constituintes da própria apatita, e as quantidades relativas variam apenas marginalmente dependendo da origem do esmalte. Os chamados elementos menores em geral não são igualmente distribuídos pelo esmalte. A concentração de alguns elementos como o flúor, zinco e chumbo é alta nas camadas superficiais do esmalte, e próximo à dentina a concentração cai consideravelmente. A tendência oposta, baixa concentração nas camadas externas e alta concentração nas camadas internas aplicam-se a outros elementos (sódio, carbonato, magnésio), enquanto outros ficam inalterados pela profundidade, como estrôncio, cobre (Mavropoulos, 1999). No total os componentes menores somam cerca de 3%, dos quais o carbonato e o sódio compreendem 9/10 da concentração. A maioria desses íons é estranha ao entrelaçado de hidroxiapatita e pode ser considerada como impurezas

incluídas no mineral durante sua formação. Esses componentes menores comportam-se como parte dos cristais (Carvalho et al., 2002).

A unidade molecular é repetida em todas as direções para formar um único cristal de esmalte, aproximadamente  $0,03 \times 0,04 \times 2 \mu\text{m}$ , e cada cristal é circundado por uma camada de água firmemente ligada. A presença dessa película de hidratação indica que o cristal do esmalte está eletricamente carregado. Os cristais são densamente reunidos e organizados em bastonetes que se estendem desde a dentina até a superfície do esmalte. Estes prismas de esmalte apresentam dimensões em torno de: 68,3 nm de comprimento, 26,3 nm de espessura e 3-6  $\mu\text{m}$  de diâmetro (Lippert et al., 2004). Os bastonetes são firmemente unidos e sustentados uns aos outros através do formato irregular da sua superfície. A sustentação destes bastonetes se deve às proteínas denominadas enamelinas que se localizam nas irregularidades entre os prismas e nas estruturas delicadas que se estendem para dentro dos mesmos. Durante o processo de maturação do esmalte dentário ocorre deposição de minerais ao redor e dentro dos prismas o que caracteriza a outra função das enamelinas: orientação na formação dos prismas de esmalte (Thylstrup e Fejerskov, 1995).

A superfície externa do esmalte é formada por uma camada fina e homogênea onde os cristais de hidroxiapatita são paralelos entre si. Esta camada é dita aprismática (sem prismas) e apresenta uma dimensão em torno de 100  $\mu\text{m}$ . A maior parte do esmalte é formada por prismas ou bastões (Figura 05). Cada prisma se origina na junção entre a dentina e o esmalte (limite amelo-dentinário) e segue até a região próxima a superfície do esmalte (Dominguez-Medina et al., 2002).

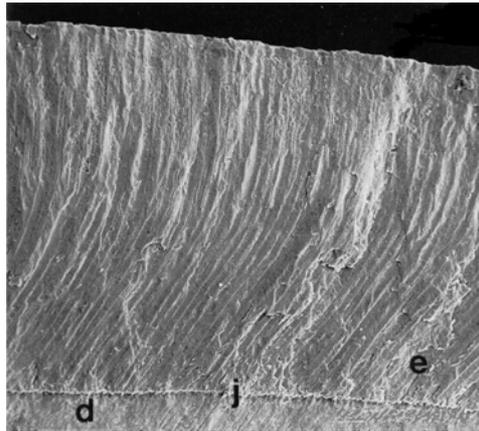


Figura 05: Corte de esmalte dentário de mamífero primitivo. (e= esmalte, j=junção amelodental d=dentina).

Fonte: [http://www.fop.unicamp.br/dm/ap\\_esmalte.doc](http://www.fop.unicamp.br/dm/ap_esmalte.doc).

Os prismas são formados devido à variação na orientação dos cristais de hidroxiapatita. A diferença de orientação dos cristais entre dois prismas vizinhos faz com que o limite entre estes seja visível (Figura 06). (Claudino et al., 2006)

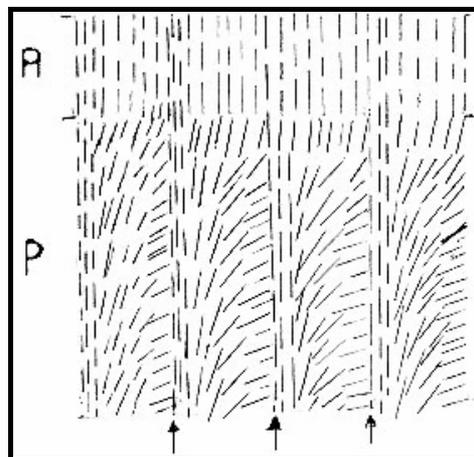


Figura 06: Orientação dos cristais de hidroxiapatita nas camadas aprismática (A) e prismática (P) do esmalte dentário. No esmalte aprismático, os cristais são paralelos entre si e perpendiculares à superfície do esmalte dentário. A orientação dos cristais varia em um mesmo prisma e na região que delimita dois prismas (↑) a diferença de orientação dos cristais é máxima.

Fonte: [http://www.fop.unicamp.br/dm/ap\\_esmalte.doc](http://www.fop.unicamp.br/dm/ap_esmalte.doc)

A primeira camada de esmalte dentário é sintetizada sobre a dentina e prossegue até que seja completada toda a espessura do esmalte. O esmalte é sintetizado por células denominadas de ameloblastos, sendo que são sensíveis às variações metabólicas que ocorrem no organismo. O organismo humano possui um ciclo chamado de cercceptano que ocorre aproximadamente a cada 9 dias. No final de cada ciclo aparece uma linha chamada de estria de Retzius (Figura 07). Estas linhas quando chegam à superfície do esmalte formam ondulações chamadas de periquimáceas (Domínguez-Medina et al., 2002). A contagem das estrias de Retzius ou das periquimáceas tem sido usada em estudos antropológicos para se comparar o tempo de formação do esmalte dentário de humanos e espécies de homínídeos que viveram há milhões de anos. Estrias mais evidentes podem ser formadas por alterações metabólicas oriundas de processos patológicos como desnutrição, febre, intoxicação por flúor ou metais pesados durante a formação do esmalte dentário. Estrias também podem ser formadas por ingestão de medicamentos que se incorporam ao esmalte dentário, sendo a tetraciclina o melhor exemplo (Figura 07) (Duarte et al., 2003; Otobe et al., 2006).

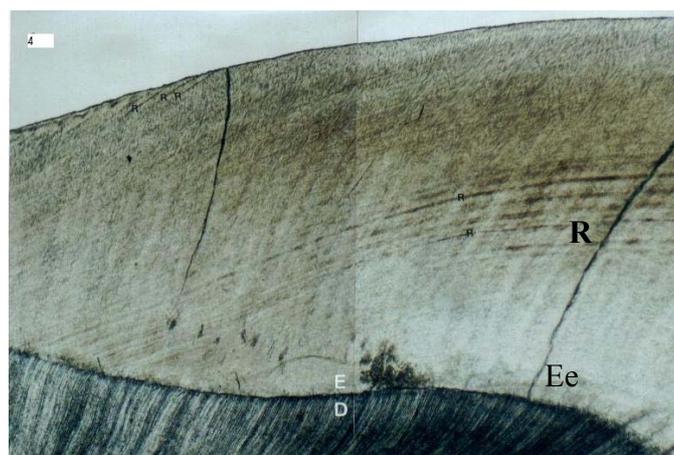


Figura 07: Corte do esmalte dentário humano. Observe que várias estrias de Retzius podem ser observadas (R). Os canalículos dentinários aparecem como linhas escuras. D=Dentina. E=Esmalte.

Fonte: [http://www.fop.unicamp.br/dm/ap\\_esmalte.doc](http://www.fop.unicamp.br/dm/ap_esmalte.doc)

Durante os primeiros anos, após a erupção do dente, o esmalte passa por um processo de maturação secundária que pode deixá-lo mais resistente a desmineralização e a lesão de cárie (Pereira & Sousa, 2002; Furlan et al., 2005; Castellan et al., 2007). Provavelmente esta maturação consiste de depósitos de mineral dos fluidos orais no esmalte superficial. Entretanto, o depósito mineral é muito pequeno para ser monitorado pelo raio-X ou por alterações de densidade. Esse estágio pós-eruptivo reflete os processos de desmineralização e redeposição constantes que ocorrem durante a erupção do dente. Durante esses processos, os elementos dissolvidos instantaneamente como o carbonato e o sódio são liberados ao passo que os elementos com grande afinidade à apatita são retidos como, por exemplo, o flúor (Weyne e Hareri, 2001; Riordan, 2002).

### 2.3. SALIVA

O esmalte dentário é revestido por uma película protéica denominada saliva. Na boca de um indivíduo saudável, cerca de 1ml de saliva é espalhado em uma superfície total de 200 cm<sup>2</sup>, resultando em uma película fina de 10-100 µm de espessura. Um adulto produz cerca de 1-1,5 litros de saliva por dia. Durante o sono uma pessoa pode produzir aproximadamente 0,25 ml de saliva por minuto enquanto que durante uma mastigação vigorosa, a quantidade produzida por minuto pode chegar a 10ml (Migliari et al., 2002; Tedesco et al., 2004; Braga et al., 2005).

A composição do fluido oral é muito complexa. Apresenta componentes orgânicos, inorgânicos e inúmeros elementos celulares como células epiteliais da mucosa, leucócitos provenientes dos sulcos gengivais, bem como milhões de microrganismos (Albuquerque & Camargo, 2007). Os componentes orgânicos consistem de uma variedade de proteínas, carboidratos e enzimas (Migliari et al., 2001). Os componentes inorgânicos mais importantes, diferentes da água, são: cálcio, fosfato,

flúor e hidrogênio (pH). Os principais componentes inorgânicos da saliva são: sódio, potássio, cloro, cálcio e fosfato, sendo os três primeiros fundamentais para a manutenção do poder iônico da saliva, e os dois últimos determinam a saturação relativa do fluido em relação ao esmalte dentário (Fukushima et al., 2000; Leal et al., 2003; Fukushima et al., 2005). A concentração de íon hidrogênio (pH) nos fluidos orais pode ser considerada a “variável principal”, já que ela influencia a maioria das reações químicas que ocorrem na boca, mais notadamente o equilíbrio entre os fosfatos de cálcio do tecido duro e sua fase líquida adjacente. Os íons de hidrogênio nos fluidos orais têm diversas origens: a) secretados através das glândulas na forma de ácidos inorgânicos e orgânicos, produzidos pela microbiota bucal; b) adquiridos pela cavidade oral por meio de bebidas ou alimentos ácidos (Mauricio et al., 2003; Migliari et al., 2004; Domaneschi et al., 2007).

As concentrações totais de íons inorgânicos são mostradas na Tabela 03. Em geral, tanto o pH quanto a concentração de cálcio são maiores na saliva submandibular que na saliva da parótida. Além disso, através de estímulo, a concentração de carbonato e o pH aumentam ao passo que a concentração de fosfato diminui. Em soluções orgânicas complexas como a saliva, grande parte do cálcio e fosfato ocorre em combinação inorgânica ( $\text{CaHPO}_4^0$ ,  $\text{CaH}_2\text{PO}_4^+$  e  $\text{CaHCO}_3^+$ ) ou organicamente em complexos de cálcio e fosfato de composições variadas. Geralmente os complexos são dissociados à medida que o pH cai, o que provoca aumento da concentração ativa livre dos íons. (Thylstrup & Fejrskov, 1995; Fukushima et al., 2006; Mickenautsh et al., 2006).

Tabela 03: Concentrações de íons relevantes na saliva.

pH	5,2-7,8
Cálcio	1-3 mmol/L
Fosfato	3-8 mmol/L
Flúor	0,01-0,1 mg/L
Carbonato	5-30 mmol/L
Outros íons (sódio, potássio e cloreto)	20-40 mmol/L

*Fonte: Thylstrup & Fejrskov, 1995.*

A função digestiva da saliva humana é mínima, sendo a amilase a única enzima digestiva importante na saliva. Entretanto, a função da saliva como lubrificante (mucina) que facilita a formação do bolo alimentar, auxilia na deglutição e também na fala (Melo & Jorge, 1999). A saliva protege a cavidade oral contra alterações de pH devido à sua capacidade tampão (uréia, sialina) e é importante na defesa contra microrganismos orais já que aglutina bactérias, previne a adesão de microrganismos ao dente além de ter atuação bactericida e bacteriostática (Alves et al., 2004). Desta forma a saliva é essencial para a saúde dentária. O índice de fluxo salivar reduzido aumenta a suscetibilidade às lesões de cárie e às erosões dentárias (Uceda et al., 2000). A cárie é definida como resultado da dissolução química dos tecidos duros do dente provocada por produtos da degradação bacteriana enquanto que a erosão é a dissolução química da substância do dente causada por qualquer outro agente. (Claudino et al., 2006; Mickenautsh et al., 2006)

## 2.4. MÉTODOS EMPREGADOS

Este tópico tem por objetivo abordar algumas considerações relativas à ciclagem de pH, Tomografia por Coerência Óptica e à análise de microdureza, métodos empregados no presente estudo.

### 2.4.1. Ciclagem de pH

A ciclagem de pH se refere a um modelo *in vitro* de desenvolvimento de cárie em que o substrato (esmalte/dentina) é exposto a combinações de desmineralização e remineralização, designadas para simular as variações dinâmicas na saturação do mineral e no pH associadas com o processo natural de cárie (White, 1995). É esta dinâmica do método que o diferencia de outros modelos de indução de lesão de cárie artificial como a imersão em solução tampão de acetato ou lactato; imersão em meio de cultura de bactérias acidogênicas e contato com gel acidificado cujo comportamento estático simula uma condição de ataque ácido bastante diferente do que ocorre no ambiente bucal. Dessa forma, quando o substrato dental é mantido na solução desmineralizadora, composta de tampões ácidos com cálcio e fosfato em pH baixo, mimetizam-se os vários momentos de decréscimo de pH que ocorrem no biofilme dental e na superfície do esmalte diariamente. O estágio de remineralização, por sua vez, é simulado com o emprego de soluções contendo cálcio e fosfato em um grau de saturação semelhante àquele da saliva.

De acordo com Tagliaferro. (2004), lesões de 100-250  $\mu\text{m}$  de profundidade, formadas em períodos tão curtos quanto dias ou semanas nos modelos *in vitro*, representam uma progressão clínica da lesão de 6 a 12 meses. Portanto, os sistemas *in vitro* aceleram a dinâmica mineral associada ao processo de desenvolvimento da lesão cariiosa dentro de períodos muito menores dos que ocorrem *in vivo*. Segundo Queiroz

(2004), os modelos *in vitro* permitem avaliar os mecanismos envolvidos nos processos de desmineralização e remineralização com habilidade de quantificar efeitos sobre uma simples variável, mantidas as outras constantes. Por outro lado, apresentam algumas limitações como:

- à inadequada simulação das condições intra-bucais complexas;
- a dificuldade de simular o volume e a composição salivar em relação à área do dente;
- os artefatos associados com a escolha do substrato;
- e as condições do teste, em especial os períodos de imersão na solução desmineralizadora ou remineralizadora.

O modelo pioneiro de ciclagem de pH foi proposto por Ten Cate & Duijsters, em 1982. Os pesquisadores imergiram dentes bovinos com lesão de cárie subsuperficial em soluções desmineralizadora (DES) e remineralizadora (RE), alternadamente. A solução DES era constituída por 2,2 mmol/L de cálcio, 2,2 mmol/L de fósforo e 50 mmol/L de ácido acético em pH 4,7 e a solução RE continha 1,5 mmol/L de cálcio, 0,9 mmol/L de fósforo, 130 mmol/L de cloreto de potássio e 20 mmol/L de tampão cacodilato em pH 7,0. Adicionalmente, foram acrescentados 2 ppm de flúor nas soluções usadas para alguns grupos. A ciclagem foi realizada durante 10 dias e os espécimes foram mantidos na solução DES por 3 ou 8 h diárias. Determinações de cálcio, fósforo e flúor foram realizadas nas soluções e as lesões foram avaliadas com auxílio da análise de microdureza e da microrradiografia. De acordo com os autores, as condições experimentais do estudo foram semelhantes às do ambiente oral, comparadas com estudos de des- e remineralização conduzidos em separado.

Vários pesquisadores propuseram alterações nesse modelo, seja na composição ou no pH das soluções, no tempo de imersão dos espécimes, no volume de solução por

área dental exposta ou na duração da ciclagem, de acordo com o delineamento experimental.

Argenta *et al.* (2003) modificaram o modelo de ciclagem de pH proposto por Featherstone *et al.* (1986) com o objetivo de preservar a superfície do esmalte e de produzir lesões iniciais que pudessem ser avaliadas pela análise de microdureza. Para isso, realizaram algumas alterações como: a adição de flúor nas soluções; a elevação do pH da solução RE para 7,4; a diminuição do período de permanência dos espécimes na solução DES para 3 h diárias; a redução do número de ciclos que passou a ser 5 e a permanência dos espécimes na solução RE por 2 dias, depois de finalizados os ciclos. Os autores observaram que a profundidade da lesão formada no esmalte foi similar àquela encontrada por Featherstone *et al.* (1986) e concluíram que o modelo possibilita avaliar as variações de mineral ocorridas nas camadas mais externas do esmalte durante o desenvolvimento de cárie.

#### 2.4.2. Tomografia por Coerência Óptica

Em 1991, Huang *et al.* trouxeram uma importante contribuição para a Biomedicina quando propuseram um novo método de diagnóstico: OCT, sigla em inglês para Tomografia por Coerência Óptica. A técnica já era conhecida, porém até então só era empregada na indústria de telecomunicações para identificar e caracterizar reflexões em componentes ópticos. O sistema, desenvolvido por Huang e seus colaboradores, se baseava num interferômetro proposto por Michelson no ano de 1881 e utilizava como fonte de luz um diodo superluminescente de baixa coerência emitindo um comprimento de onda médio de 830 nm, ou seja, próximo do infravermelho, que se propagava através de uma fibra óptica. O feixe de luz, ao deixar a fonte, passava pelo divisor de feixe e seguia para os dois braços do interferômetro: o de referência e o da amostra. Em

seguida, as reflexões do espelho de referência e do tecido avaliado eram re combinadas e, através da variação da posição do espelho de referência, a amplitude e o atraso da reflexão da amostra eram detectados. Porém, só quando o percurso óptico dos dois braços do interferômetro coincidia, é que se observava o sinal interferométrico. O deslocamento do feixe nas duas direções perpendicularmente à face da amostra, tornou possível a construção de imagens em duas dimensões dos tecidos biológicos, sem que houvesse qualquer prejuízo aos mesmos e com uma resolução axial de 17  $\mu\text{m}$ . No entanto, observou-se que para o deslocamento obtido permanecesse na escala correta, o deslocamento óptico obtido deveria ser dividido pelo índice de refração do tecido biológico examinado, pois a luz se deslocava no tecido com uma velocidade inferior à do ar. No caso dos tecidos da cavidade oral, Colston Jr. et al. (1998a) relataram que o índice de refração da mucosa oral era aproximadamente 1,3, do esmalte 1,6 e da dentina 1,5.

Colston Jr. et al. (1998b) empregaram um sistema de OCT para estudar *in vitro* o tecido gengival de porcos. Al final do experimento, eles relataram que a quantidade de luz retroespalhada coerentemente que vinha do tecido avaliado decaía exponencialmente com a profundidade. Este decaimento era maior na dentina do que no esmalte, fato que foi atribuído à diferença entre o coeficiente de espalhamento dos dois tecidos (maior na dentina do que no esmalte). Os autores obtiveram dados bastante interessantes, como por exemplo, distinção da junção esmalte /cimento e a interface dente/gengiva, permitindo a avaliação da bolsa periodontal ou sulco gengival.

Wang et al. (1999) utilizaram a PS-OCT: Tomografia por Coerência Óptica Sensível a Polarização que levava em consideração os efeitos de polimerização da amostra permitindo a revelação de aspectos importantes da estrutura dos tecidos dentários. Essa nova técnica se propunha a medir a intensidade das franjas de

interferência da luz retroespalhada em duas componentes ortogonais de polarização em cada posição da amostra. Desta forma, pode ser usada para determinar a magnitude da birrefringência da amostra, em função da profundidade. A luz era dividida em um feixe polarizado vertical e outro horizontal, seguindo separadamente para os fotorreceptores específicos. Deste modo, Wang e sua equipe mediram a birrefringência do esmalte e dentina, além de sugerir que os prismas de esmalte agiam como guias de onda.

Boppart et al. (2002) utilizaram a técnica de OCT para investigar tanto *in situ* quanto *in vivo* a leucoplasia oral, condição considerada pré-maligna. Os autores apontaram vantagens das imagens obtidas através da Tomografia por Coerência Óptica sobre a biópsia excisional, técnica usualmente empregada no diagnóstico das condições malignas da cavidade oral. Ao contrário da biópsia, a OCT permitiu uma avaliação quantitativa do espessamento epitelial e da morfologia subepitelial, sem que fosse necessária a excisão do tecido a ser avaliado, além de permitir também a realização de vários exames na mesma área, sem causar qualquer dano ao tecido.

Melo (2005) verificou que através da técnica de OCT é possível se diferenciar os tecidos duros que compõem o dente, permitindo o diagnóstico e também o tratamento precoce de lesões de cárie. No final do experimento, observou-se que as imagens obtidas através do método de OCT, ao contrário das radiografias periapicais, permitem a avaliação micrométrica da interface dente/restauração, detectando e medindo fendas com uma espessura que variou de 51  $\mu\text{m}$  a 146  $\mu\text{m}$ , em restaurações de amálgama e resina composta restritas ao esmalte.

#### 2.4.3. Análise de Microdureza

A determinação das alterações do conteúdo mineral, resultantes da desmineralização e remineralização nos tecidos dentais duros, é importante em vários

estudos na odontologia, especialmente na área de cariologia. Dentre os diversos métodos de quantificação mineral no esmalte destaca-se a microdureza do esmalte que indiretamente evidencia a perda e/ou ganho mineral. No teste de microdureza, um penetrador é levemente pressionado contra a superfície a ser testada usando carga e tempo pré-definidos. Há dois tipos de penetradores utilizados em pesquisas na área de cariologia: o diamante Vickers e o diamante Knoop, que produzem impressões em forma de quadrado e losango, respectivamente (ten Bosch & Angmar-Mansson, 1991).

O comprimento das impressões na amostra é determinado microscopicamente em micrômetros e se o valor aumenta, o tecido perdeu mineral. Contrariamente, se diminui em magnitude, muito provavelmente o tecido ganhou mineral (Arends & ten Bosch, 1992).

Featherstone *et al.* (1983) verificaram, em estudo comparativo, que a porcentagem de volume mineral (%vol) determinada pela microrradiografia, uma técnica quantitativa, também pode ser calculada por meio da microdureza aplicando-se a seguinte fórmula:  $\%vol = 4,3 \times (KHN)^{1/2} + 11,3$  onde KHN (*Knoop hardness number*) é o número de dureza Knoop. O coeficiente de correlação encontrado foi de 0,919 e os pesquisadores concluíram que a técnica de microdureza pode ser utilizada não somente na comparação de alterações de dureza, bem como uma medida de perda/ganho mineral resultante de processos de desmineralização e remineralização.

Kielbassa *et al.* (1999) também observaram relação linear ( $R^2 = 0,915$ ) entre a raiz quadrada do KHN e a %vol e, segundo eles, os valores de microdureza podem ser convertidos em %vol usando a seguinte equação:  $[21,19 + 3,66 \times (KHN)^{1/2}]$ .

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar *in vitro* o efeito da quitosana nos processos de des-remineralização do esmalte dentário.

#### 3.2. OBJETIVO ESPECÍFICO

- I. Caracterizar físico-quimicamente a quitosana de crustáceo (Sigma®);
- II. Verificar a desmineralização e remineralização do esmalte dentário na presença e ausência de quitosana;
- III. Avaliar a capacidade de infiltração da quitosana no esmalte dentário através da técnica de Tomografia por Coerência Óptica.
- IV. Calcular a perda/ganho de mineral através da técnica de microdureza;
- V. Estabelecer uma relação entre os dados de microdureza e as análises de fósforo e cálcio.

#### **4. JUSTIFICATIVA**

A cárie é uma doença infecto-contagiosa que acomete a maioria da população mundial, de forma diferente para cada indivíduo e caracteriza-se pela perda progressiva de tecido mineralizado do dente. Com o advento da ciência e tecnologia, nas últimas décadas, a pesquisa de produtos que visam à prevenção da perda de minerais do dente passou a ser de primordial importância para a indústria farmacêutica odontológica. Na era da odontologia preventiva, o flúor passou a ter um papel de destaque, com relação à cárie, devido às suas propriedades preventivas e terapêuticas. O uso indiscriminado do flúor culminou com o aparecimento de pessoas acometidas pelos seus efeitos colaterais, sendo o mais comum a fluorose dentária, sobretudo em crianças. Assim, vários estudos vêm sendo realizados, com a finalidade de verificar a eficácia de novos produtos que interfiram nos processos de des-remineralização do esmalte dentário e conseqüentemente, na instalação da doença cárie (Lippert et al., 2004; Queiroz, 2004; Tagliaferro, 2004; Ganss, 2005). Uma substância que tem sido empregada em estudos odontológicos sobre prevenção de cárie é a quitosana, já que esta apresenta propriedades bactericidas e/ ou bacteriostáticas. A quitosana também é um material biocompatível, biodegradável e é considerada atóxica visto que a sua toxicidade oral em seres humanos é em torno de 16g/Kg de peso corpóreo. Em pH ácido apresenta-se como um polícatión. Os grupos amino da quitosana captam íons hidrogênio do meio, resultando em uma carga global positiva no polímero, o que lhe confere sua capacidade bioadesiva a moléculas carregadas negativamente tais como: esmalte dentário, tecidos moles, membrana celular, entre outras. Devido a sua natureza biocompatível e propriedades funcionais, a quitosana apresenta amplo potencial para aplicação como biomaterial na área odontológica. O presente trabalho de pesquisa propõe a realização

de ensaios “in vitro”, para verificar a influência da quitosana no processo de remineralização do esmalte dentário, visando sua aplicação como biomaterial odontológico anticariogênico.

## **5. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL**

Este estudo procurou verificar o efeito da quitosana no processo de des-mineralização do esmalte dentário. Primeiramente foram obtidos os dentes e a preparação dos espécimes foi realizada da forma a ser descrita posteriormente. Paralelamente foi feita a caracterização da quitosana utilizada nesta pesquisa. Em seguida simulamos o processo de des-mineralização do esmalte dentário através do método modificado da ciclagem de pH descrito por Argenta *et al.* (2003).

### **5.1. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS**

A pesquisa foi realizada tendo autorização do Comitê de Ética Ofício nº: 162/2007-CEP/CCS, protocolo nº288/07-CEP/CCS (Comitê de Ética em Pesquisa/Centro de Ciências da Saúde).

### **5.2. OBTENÇÃO DOS DENTES**

Foram coletados 27 dentes humanos permanentes, recém extraídos por motivos de inclusão ou por indicação ortodôntica. Os dentes, após serem retirados dos alvéolos, foram limpos em água corrente e os restos orgânicos removidos com auxílio de cureta (nº 11), explorador (nº 5) e holeback (nº3). Os elementos dentários foram lavados com água destilada, detergente e esponja, mantendo-se em soro fisiológico a temperatura de 4°C. Os dentes ao serem recolhidos dos consultórios odontológicos foram esterilizados em auto-clave, na temperatura de 105 °C, por 1 hora. Em seguida os dentes foram separados e identificados para o armazenamento a seco até a utilização experimental.

### **5.3. PREPARO DOS ESPÉCIMES**

#### **5.3.1. Corte do dente**

Cada dente foi totalmente recoberto com parafilme. A parte da raiz foi embutida em resina EPOXY auto polimerizante, em molde de PVC, com as medidas apropriadas para adaptação no aparelho de corte Labcut modelo 1010 da EXTEC<sup>®</sup>. A porção coronária ficou revestida apenas pelo parafilme e sobre este foram realizados traçados com caneta (pilot), com a finalidade de auxiliar o corte no sentido vestibulo-lingual e/ou mesio-distal obtendo-se, desta forma, 2 e/ou 6 fragmentos de cada dente. Neste procedimento o dente foi posicionado no aparelho de formas diferentes (Figura 08).

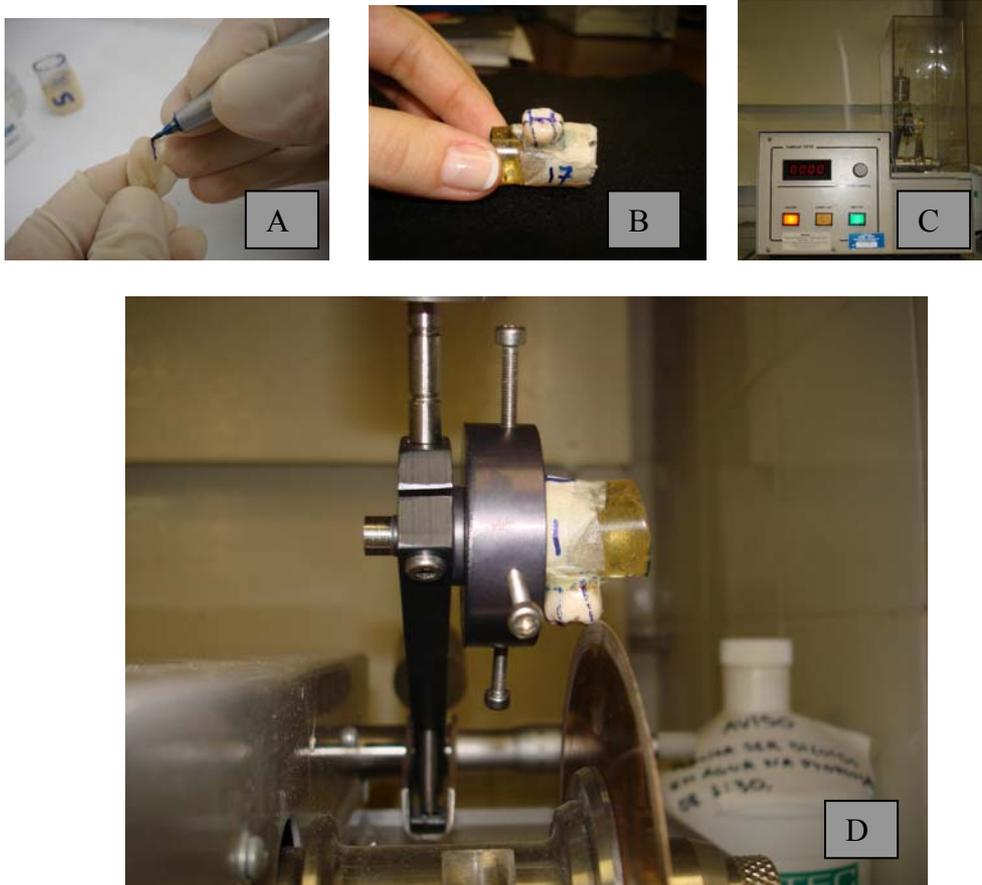


Figura 08: A) Porção coronária revestida por parafilme e realização dos traçados com caneta (pilot) para auxiliar no corte do elemento dentário. B) Molde de PVC com resina EPOXY sustentando o dente pela raiz e deixando a porção coronária preparada para os cortes mesio-distal e vestibulo-lingual. C) Aparelho de corte Labcut modelo 1010 da EXTEC<sup>®</sup>. D) Posicionamento do dente no aparelho para a realização do primeiro corte vestibulo-lingual.

### 5.3.2. Fixação da amostra e delimitação da área exposta

Os fragmentos dentários foram fixados com cera odontológica nº 7 fundida e, para evitar o contato com as mãos e facilitar o manuseio das amostras o material foi colocado em haste de plástico (Figura 09).

Visando obter uma área de 5 mm<sup>2</sup>, foi fixado papel adesivo (5 mm<sup>2</sup>) nos fragmentos dentários e nas demais regiões do dente foram aplicadas duas camadas de verniz ácido resistente (isento de cálcio e fósforo na sua composição). Posteriormente as amostras foram cobertas com cera utilidade odontológica a fim de reforçar o isolamento entre o dente e as soluções empregadas. Em seguida, a tira de papel adesivo foi removida permitindo, desta forma, a exposição do esmalte dentário unicamente na área desejada (5mm<sup>2</sup>).

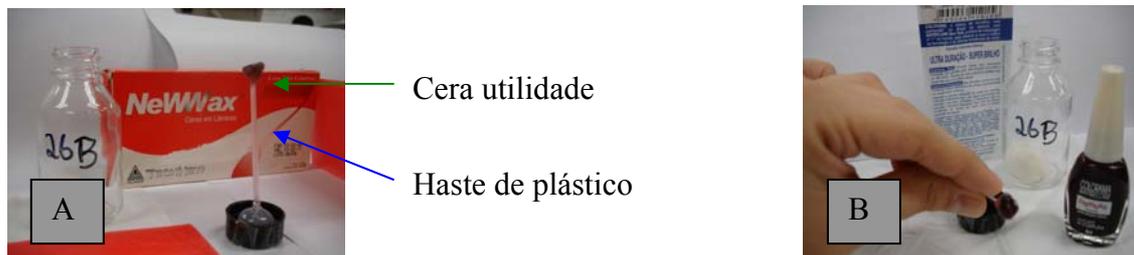


Figura 09: A) Cera utilidade e haste de plástico. B) Esmalte de unha, isento de cálcio e fósforo na sua composição, sendo utilizado como verniz ácido resistente.

### 5.3.3. Limpeza e polimento dos espécimes

Para retirar o material deixado pela tira adesiva foi necessário submeter os espécimes à profilaxia com escova de Robinson em baixa rotação e pasta Herjos-F durante 1 minuto e a dois banhos de ultra-som de 30 s, cada (Figura 10).

O polimento das amostras foi realizado com alumina 0,3 µm usando uma Politriz modelo PLF da marca FORTEL na velocidade de 300 rpm, durante 1 minuto, lavando-se constantemente com solução PBS (Phosphate-Buffered-Saline) - (Tabela 4). Em

seguida, os espécimes foram submersos em 20 mL de solução de PBS e levados ao Ultra-som Thornton por 2 min, com a finalidade de remover os resíduos aderidos na superfície do esmalte e o excesso de alumina (Figura 10).



Figura 10: A) Polimento da amostra na Politriz modelo PLF da marca FORTEL. B) Amostra submersa em 20 mL de solução PBS - Banho de ultra-som (Ultra-som Thornton).

Para hidratação, os espécimes foram submersos em solução tampão de PBS, durante 24 horas na temperatura ambiente (Tabela 04). Para evitar proliferação de bactérias, após o manuseio, as amostras foram deixadas por mais 24 horas em 4 °C. Após o re-equilíbrio iônico, os espécimes foram cuidadosamente examinados, selecionando-se aqueles cujos esmaltes estavam íntegro e livre de manchas brancas, trincas e outras imperfeições. No experimento foram utilizados trinta e seis espécimes selecionados, sendo os demais usados em estudos pilotos.

Tabela 04: Composição química da solução PBS (Phosphate-Buffered-Saline).

pH	6,8-7,2
NaCl	8 g/L
KCl	2 g/L
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2 g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2 g/L

## 5.4. CARACTERIZAÇÃO DOS ESPÉCIMES POR MICROINDENTAÇÃO

### 5.4.1. Obtenção do corpo de prova

Removeu-se a haste plástica das amostras e cada espécime foi fixado em uma lâmina de vidro com cera pegajosa da TechNew (Figura 11A). Para nivelar o esmalte exposto com a cera, a amostra foi pressionada contra duas lâminas de vidro com o auxílio de um compressor (Figura 11B). Em seguida, a lâmina superior foi removida e o corpo de prova foi levado ao suporte do microdurômetro para prosseguir com a análise de microdureza (Figura 12A).

### 5.4.2. Microdureza do esmalte

O aparelho utilizado foi o microdurômetro HMV-2 (Shimadzu, Figura 12B) com penetrador do tipo Vickers. As impressões foram realizadas mantendo o longo eixo do diamante do penetrador paralelo à superfície externa do esmalte e utilizando carga de 25 g durante 10 s. Foram feitas três medidas para cada amostra e calculada a média.

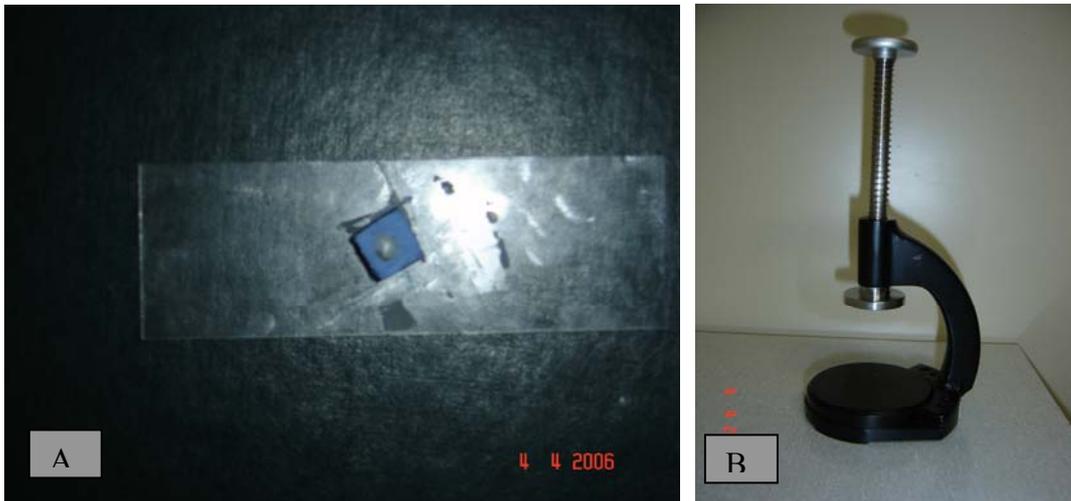


Figura 11: A) Espécime fixado com em lâmina de vidro com cera pegajosa da TechNew. B) Compressor utilizado para nivelar o esmalte exposto com a cera pegajosa.

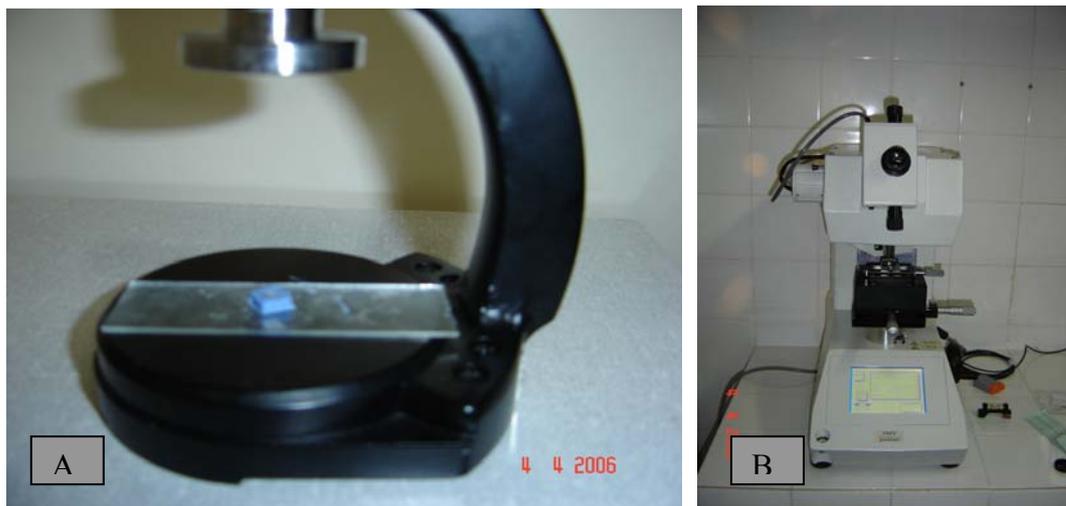


Figura 12: A) Corpo de prova após a retirada da lâmina de vidro superior. B) Microdurômetro HMV-2 (Shimadzu).

#### 5.5. ORIGEM DA QUITOSANA

A quitosana utilizada neste trabalho foi extraída de exoesqueletos de caranguejo e é comercializada pela empresa Aldrich como sendo quitosana de crustáceo Sigma®. O fabricante forneceu o grau de desacetilação como sendo maior ou igual a 85%. Contudo, a massa molar média, bem como qualquer outra informação, não foi mencionada. A quitosana usada nos experimentos foi gentilmente cedida pela Universidade Católica de Pernambuco.

#### 5.6. CARACTERIZAÇÃO DA QUITOSANA

Diversas técnicas foram realizadas para a caracterização da quitosana. A *caracterização estrutural* da quitosana Sigma® foi realizada por espectroscopia vibracional na região do infravermelho. O *grau de desacetilação* foi determinado utilizando quatro técnicas: RMN  $^1\text{H}$ , titulação condutimétrica, espectroscopia vibracional na região do infravermelho e análise elementar. O *grau de umidade e a análise térmica* foram determinados por termogravimetria e calorimetria diferencial

exploratória (DSC), respectivamente. Também foi observada a *crystalinidade* da amostra através da difração de raio-X.

### 5.6.1. Características estruturais

#### 5.6.1.1. Espectroscopia vibracional na região do infravermelho

O espectro no infravermelho foi obtido em um espectrofotômetro com transformada de Fourier da Bruker modelo IF66, na região entre  $4000\text{cm}^{-1}$  e  $400\text{cm}^{-1}$ . Aproximadamente 1,5 mg de quitosana foi seca em estufa a vácuo durante 15 horas a  $60^\circ\text{C}$ . Em seguida, foi adicionado 100mg de KBr e a mistura homogeneizada em almofariz de ágata. A pastilha foi preparada e deixada na estufa a vácuo a  $110^\circ\text{C}$  durante 20 horas. Por tanto, o espectro do pó da quitosana foi obtido utilizando pastilha de KBr como suporte. A medida foi realizada na Central Analítica do Departamento de Química Fundamental da UFPE.

### 5.6.2. Grau de desacetilação

#### 5.6.2.1. Espectroscopia vibracional na região do infravermelho

O espectro no infravermelho foi obtido conforme descrito anteriormente no tópico 5.6.1.1.

#### 5.6.2.2. Ressonância Magnética Nuclear

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  foi obtido a partir de um procedimento descrito por Signini et al. (2000). O equipamento utilizado foi o da Varian Unity Plus em 300MHz. A solução de quitosana foi preparada pela dissolução de 10mg de quitosana em 1ml de solução de HCl/D<sub>2</sub>O 1% (v/v), durante 24 horas formando uma solução viscosa. Uma alíquota dessa solução foi colocada em tubo de 5 mm de diâmetro para a análise a  $50^\circ\text{C}$ , com tempo de relaxação de 6 segundos e pulso de  $90^\circ$ .

### 5.6.2.3. Titulação Condutimétrica

Neste procedimento, 200mg de quitosana foi solubilizada em 40mL de solução de ácido clorídrico 0,05 M por 18 horas. A amostra foi titulada com solução de NaOH padronizado à 0,17 M submetido a temperatura de  $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ . As variações de condutância durante a titulação foram medidas por um condutivímetro Metrohm 712, equipado com célula condutimétrica, sendo expresso em  $\mu\text{S}/\text{cm}$ .

### 5.6.2.4. Análise Elementar

A análise elementar da quitosana sigma® foi obtida no equipamento Analisador elementar modelo EA 1110 da Carlo Erba Instruments, na Central Analítica do Departamento de Química Fundamental da UFPE.

## 5.6.3. Grau de umidade e análise térmica

### 5.6.3.1. Análise termogravimétrica – TGA

A análise térmica foi realizada para verificar as perdas de massa com o aumento da temperatura. Esta técnica é utilizada para caracterizar a estabilidade térmica do material. A medida foi realizada no laboratório de materiais vítreos e nanodispositivos fotônicos do Departamento de Química Fundamental da UFPE, em um termoanalisador da Shimadzu, modelo 50WS. A medida termogravimétrica foi efetuada usando suporte de platina e uma massa de aproximadamente 9mg de quitosana. A taxa de aquecimento foi de  $10^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ , dentro da faixa de 30 a  $400^{\circ}\text{C}$ , sob fluxo de nitrogênio de  $50 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ .

### 5.6.3.2. Calorimetria Exploratória Diferencial – DSC

O experimento de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) foi realizado para identificar os eventos endotérmicos e exotérmicos que ocorrem durante o aquecimento da amostra, ocorrendo ou não perda de massa. A medida foi realizada no laboratório de materiais vítreos e nanodispositivos fotônicos do Departamento de Química Fundamental da UFPE, em um DSC da Shimadzu, modelo DSC-60WS. A curva foi obtida dentro da faixa de 30 a 400° C para a quitosana com massa de aproximadamente 9mg e uma taxa de aquecimento de 10° C.min<sup>-1</sup>, sob fluxo de nitrogênio de 50mL.min<sup>-1</sup>.

### 5.6.4. Cristalinidade

#### 5.6.4.1. Difração de raio-X

O difratograma de raios-X da quitosana foi obtido no Laboratório de Raios-X do Departamento de Física da UFPE. A medida foi realizada usando um aparelho de difração de raios-X modelo SIEMENS D5000, radiação de Cu-K $\alpha$  sendo  $\lambda = 1,5406\text{\AA}$ , em uma faixa de varredura entre 3° e 80° com taxa de 0,02° .min<sup>-1</sup>.

## 5.7. TRATAMENTO DO ESMALTE COM QUITOSANA

### 5.7.1. Preparo das soluções de quitosana

Nos experimentos a quitosana foi dissolvida em ácido acético a 1%, sob agitação constante por 24 horas, obtendo-se por diluições seriadas as seguintes concentrações (mg/mL): 1,25; 2,5 e 5,0.

### 5.7.2. Aplicação da quitosana ao esmalte dentário

A quitosana, nas concentrações de 1,25; 2,5 e 5 mg/mL, foi pincelada sob a área exposta de esmalte dentário de aproximadamente 5mm<sup>2</sup> (Figura 13). Após o tempo estabelecido para cada grupo (30, 60 e 90s) os espécimes foram submetidos à ciclagem de pH.

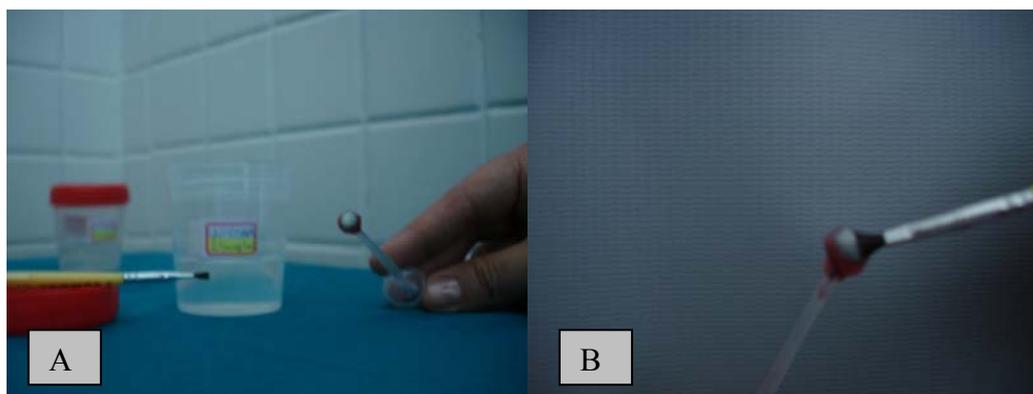


Figura 13: A) Pincel n° 2, recipiente com quitona de 2,5 mg/mL e amostra. B) Aplicação da quitosana na área exposta de esmalte dentário (5mm<sup>2</sup>).

### 5.7.3. Estudo preliminar da capacidade de infiltração da quitosana no esmalte dentário através da técnica de Tomografia por Coerência Óptica (OCT)

Segundo Mjör & Fejerskov (1990) e Ten Cate (1998) o esmalte dentário apresenta certo grau de permeabilidade embora seja o tecido mais duro do corpo humano. Portanto, foi realizado um estudo preliminar para verificar a permeabilidade do esmalte dentário a quitosana de diferentes concentrações através do método de Tomografia por Coerência Óptica (OCT). As análises de OCT foram realizadas no laboratório de Optoeletrônica e Fotônica do Departamento de Física da Universidade Federal de Pernambuco.

Para se obter as imagens, através da técnica de OCT, foi utilizado um interferômetro de Michelson, à base de fibra óptica, acoplado a uma fonte de luz de baixa coerência (Figura 14). A fonte de luz usada no experimento foi um laser de

Ti:safira com comprimento de onda ( $\lambda$ ) de 800 nm e largura de banda ( $\Delta\lambda$ ) de 63 nm obtendo-se uma resolução axial de aproximadamente 10  $\mu\text{m}$  e uma resolução lateral de aproximadamente 35  $\mu\text{m}$ .

A varredura axial ( $\Delta x$ ) das amostras foi obtida movendo-se o espelho localizado no braço de referência do interferômetro. Assim, o feixe do laser penetrava na amostra, e a luz retroespalhada fornecia informações sobre a estrutura da amostra. Porém, para se formar uma imagem bi-dimensional, as amostras foram deslocadas em seu longo eixo (deslocamento lateral ou  $\Delta z$ ) e, em cada ponto foi feita uma varredura axial. O sinal gerado foi captado através de um fotodetector de alta eficiência (RS do Brasil, 194-290) e o sinal gerado pelo sistema de detecção foi eletronicamente filtrado e enviado a um osciloscópio digital de 300 MHz (TDS3032B da Tektronix) conectado a um computador obtendo-se desta forma as imagens das amostras.

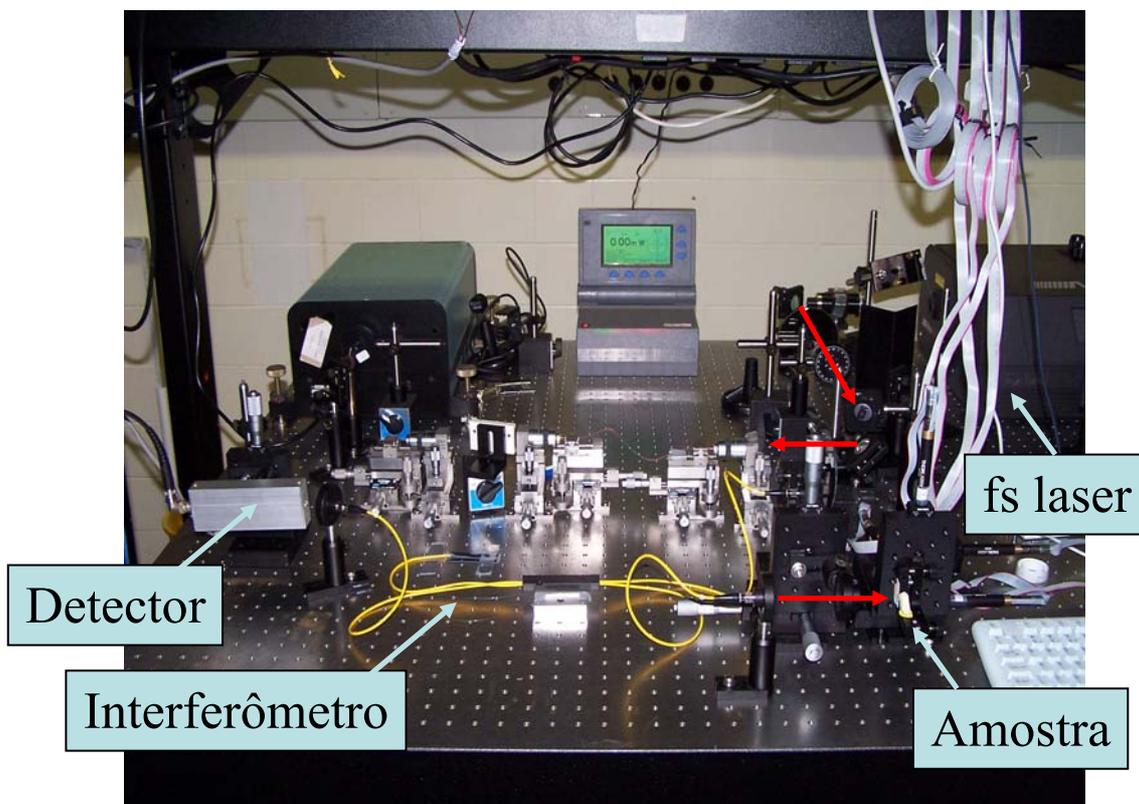


Figura 14: Interferômetro de Michelson montado em fibra óptica – Sistema de Tomografia por Coerência Óptica (OCT).

## 5.8. CICLAGEM DE pH

O procedimento iniciou-se com a imersão do espécime em solução tampão de PBS (Tabela 04) durante 48 horas a fim de re-equilibrar ionicamente o dente antes do início da ciclagem de pH (Tarsi et al., 1998).

Para a realização da ciclagem de pH cada espécime permaneceu imerso individualmente, durante 3 h, em 20 mL (4 mL/mm<sup>2</sup> de esmalte exposto) de solução desmineralizadora (DES), com pH ajustado com ácido clorídrico para 4,0 (Tabela 05). Em seguida, as amostras foram removidas desta solução, lavadas com água destilada e deionizada por 10s e secas com papel absorvente. Depois os espécimes foram imersos individualmente, durante 21 h, em 10 mL (2 mL/ mm<sup>2</sup> de esmalte exposto) de solução remineralizadora (RE) com pH 7,4 (Tabela 06). A ciclagem de pH foi repetida durante cinco dias consecutivos o que equivale a aproximadamente seis meses do processo de des-remineralização do esmalte dentário na cavidade oral (Tagliaferro, 2004). Durante os cinco dias do ciclo, utilizou-se para cada amostra cinco recipientes com a solução DES e outros cinco com a solução RE. Ou seja, todo dia o espécime era submerso em uma solução com concentrações conhecidas de cálcio e fósforo e desta forma foi possível determinar a quantidade de íons liberada ou absorvida pelo esmalte dentário.

Tabela 05: Composição química da solução desmineralizadora (DES).

pH	4,0
Nitrato de cálcio	2 mmol/L
Fosfato de sódio bibásico	2 mmol/L
Tampão de acetato (acetato de sódio e ácido acético glacial)	75 mmol/L

Tabela 06: Composição química da solução remineralizadora (RE).

pH	7,4
Nitrato de cálcio	1,5 mmol/L
Fosfato de sódio bibásico	0,9 mmol/L
Cloreto de potássio	150 mmol/L
Tampão cacodilato	20 mmol/L

### 5.9. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Foi empregado um delineamento experimental aleatório com 12 grupos e três repetições de tal forma que todos os grupos foram submetidos à ciclagem de pH. O primeiro grupo, denominado BRANCO, caracterizou-se por não apresentar esmalte dentário exposto. Para isolar o dente da solução, as amostras foram totalmente revestidas com verniz ácido resistente e posteriormente foram cobertas com cera utilidade (cera odontológica). O grupo BRANCO foi adicionado no experimento com a principal finalidade de verificar que os materiais utilizados não liberavam nem absorviam cálcio e fósforo, portanto, não iriam interferir nas análises quantitativas desses íons. Os demais grupos apresentaram uma área exposta de esmalte dentário com aproximadamente 5mm<sup>2</sup>. O segundo e terceiro grupo foram denominados de CONTROLES por não conterem quitosana nas amostras, e foram avaliados em pH 4,0 e 4,8. No experimento foram usados nove tratamentos para verificar o efeito da quitosana, considerando variações de concentração (1,25; 2,50 e 5 mg/mL) e de tempo de atuação da quitosana ao esmalte dentário (30; 60 e 90 s). Estes nove grupos foram avaliados em pH 4,0.

Os procedimentos experimentais utilizados encontram-se esquematicamente representados na Figura 15.

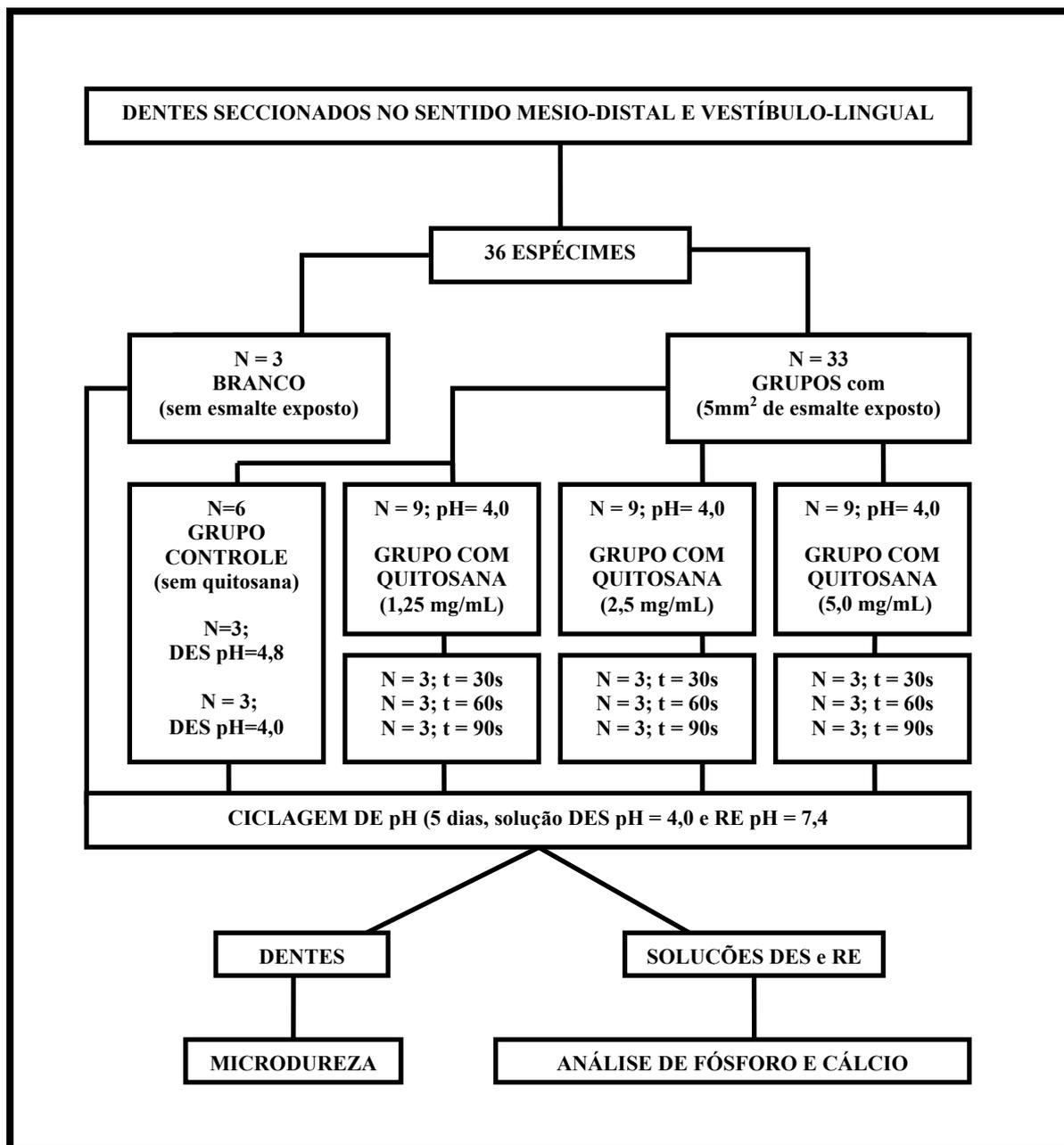


Figura 15: Fluxograma representando os procedimentos experimentais adotados nos estudos.

#### 5.10. MÉTODOS PARA AVALIAR O EFEITO DA CICLAGEM DE pH NA AUSÊNCIA E PRESENÇA DE QUITOSANA

Para observar o efeito da ciclagem de pH, foram utilizados métodos para avaliar as alterações ocorridas no dente e nas soluções empregadas, sendo para o esmalte dentário usada a técnica de microdureza, e nas soluções desmineralizadoras e

remineralizadoras foram determinadas as concentrações de cálcio e fósforo por espectroscopia de absorção atômica e pelo método do molibdato de amônio, respectivamente.

Após os cinco dias de ciclagem, os espécimes foram imersos na solução RE por 48 horas. Em seguida, as amostras foram lavadas com jatos de água destilada e deionizada durante 10 s, secas com papel absorvente e mantidas em ambiente fechado, úmido e sob refrigeração até a segunda leitura de microdureza (Figura 16). Enquanto isto as soluções desmineralizadoras e remineralizadoras foram submetidas às análises químicas de fósforo e cálcio.



Figura 16: Espécimes mantidos sob refrigeração em ambiente fechado e úmido até a leitura de microdureza.

#### 5.10.1. Análise de Microdureza

Para verificar os efeitos dos diversos tratamentos no processo de desremineralização do esmalte dentário, todos os espécimes foram submetidos à análise de microdureza, no Departamento de Engenharia Mecânica da UFPE, antes e depois da ciclagem de pH como foi descrito anteriormente no tópico 4.4.

### 5.10.2. Análise química das soluções empregadas

#### 5.10.2.1. Determinação de fósforo

A quantidade de fósforo foi determinada no DEN- Departamento de Energia Nuclear da UFPE . As medidas foram realizadas por um espectrofotômetro FEMTO – 600 S, através da reação com molibdato de amônio, conforme procedimento descrito a seguir (Murphy e Riley, 1962).

#### Solução I

Dissolveu-se 0,1787 Bi (NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> .5H<sub>2</sub>O em 25 mL de água destilada, adicionou-se 15 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado, colocando-se sob agitação até completa dissolução. Adicionou-se 2,0g de (NH<sub>4</sub>)Mo<sub>7</sub>.O<sub>24</sub>.4H<sub>2</sub>O dissolvidos em 20mL de água, completando-se o volume para 100mL. Desta solução 60mL foram diluídos para 200mL.

#### Solução II

Dissolveu-se 27,9 mg de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> em 100 mL de água contendo 0,3 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado, completando-se o volume para 250mL, obtendo-se desta forma uma solução de 25,36 µg de fósforo por mL.

Para a preparação das soluções padrão para fósforo pipetou-se 0,1; 0,3; 0,5; 0,7; 0,9; 1,1; 1,3 e 1,5 mL da solução II e diluiu-se para 25 mL com água destilada. Obtendo-se soluções padrão com concentrações variando de 0,10 µg/mL a 1,52 µg/mL de fósforo como segue na tabela 07:

Tabela 07: Correlação do volume pipetado da solução II e a obtenção das soluções padrão de fósforo com concentrações variando de 0,10 a 1,52  $\mu\text{g/mL}$ .

Solução II	Concentração de fósforo ( $\mu\text{g/mL}$ )
0,1 mL	0,10
0,3 mL	0,30
0,5 mL	0,51
0,7 mL	0,71
0,9 mL	0,91
1,1 mL	1,12
1,3 mL	1,32
1,5 mL	1,52

As soluções para obtenção da curva analítica foram obtidas por mistura de 10mL da solução I e 5mL das soluções padrão para fósforo, adicionando-se uma ponta de espátula de ácido ascórbico, que confere cor azul as soluções, proporcionalmente à quantidade inicial de fosfato presente nas soluções. Após 10 minutos, efetuou-se a leitura de absorbância em espectrofotômetro FEMTO- 600 S, em 718 nm.

As amostras desmineralizadoras e remineralizadoras foram diluídas 1:100 a fim de se obter uma solução cuja concentração estivesse dentro da curva de calibração.

#### 5.10.2.2. Determinação de cálcio

As medidas de absorção atômica foram realizadas no DEN- Departamento de Energia Nuclear da UFPE, com equipamento espectrofotômetro AA-250 Plus da Varian, conforme procedimento descrito a seguir (Embrapa, 1997).

### Solução I

Diluiu-se 10 mL do Titrisol Calcium- Standard 1000mg de cálcio da Merk para 100mL, obtendo-se assim uma solução de 100mg de cálcio. Desta solução diluíram-se alíquotas de 0; 1; 2; 4; 6 e 8 mL para 100 mL com água destilada e deionizada., obtendo-se então as soluções padrão de cálcio.

As amostras desmineralizadoras e remineralizadoras foram diluídas 1:25 a fim de se obter uma solução cuja concentração estivesse dentro da curva de calibração.

As medidas de absorção atômica foram realizadas sob as condições analíticas descritas por Ogawa, (2002).

### 5.11. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram analisados usando o programa *Statística*, e a comparação das médias realizada pelo teste t-Student ao nível de 95% de confiança (Neto et al., 2007).

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A apresentação dos resultados foi dividida em quatro tópicos que serão discutidos na seguinte ordem: (6.1) caracterização dos espécimes por microdureza; (6.2) caracterização da quitosana; (6.3) verificação da permeabilidade do esmalte dentário a quitosana; (6.4) avaliação do efeito da quitosana no processo de des-remineralização do esmalte dentário.

### 6.1. CARACTERIZAÇÃO DOS ESPÉCIMES POR MICRODUREZA

Foi usada a técnica de microdureza no esmalte exposto para caracterizar os espécimes tendo em vista que a dureza Vickers de um dente totalmente hígido é em torno de 450. O valor médio de dureza Vickers encontrado para os espécimes utilizados foi 418,5 HV (*Vickers hardness*) sendo superior aos valores obtidos por Ribeiro & Langer Filho (2003) que avaliaram a microdureza do esmalte dentário submetido ao peróxido de carbamida a 16% com e sem aplicação de fluoreto de sódio a 0,05% (grupo A – 319,75 HV e grupo B – 311,77 HV).

Embora a média de microdureza tenha sido 418,5 HV, os valores variaram de 364 HV a 442 HV (Tabela 08). Esta variação ocorre em função do estágio de desenvolvimento do dente, da idade ou mesmo em diferentes regiões num mesmo dente. (Thylstrup e Fejrskov, 1995; Spalding, 2000). Essa diferença na microdureza também se deve a diversidade dos grupos dentários (molares, pré-molares) e a exposição do esmalte com o meio bucal (Dominguez-Medina et al., 2002; Otobe et al, 2006).

Tabela 08: Valores de dureza Vickers encontrado em cada espécime e a média da microdureza para cada grupo.

Espécimes	Microindentação Dureza Vickers (HV)	GRUPOS (triplicata)	Média da Microindentação
1	424,0 ± 0,9	Controle pH=4,8	412

2	439,0 ± 2,0	}	Controle pH=4,8	412
3	373,0 ± 2,0			
4	427,0 ± 1,0	}	Controle pH=4,0	415
5	438,0 ± 3,5			
6	380,0 ± 3,6	}	Q [1,25] t=30s	419,2
7	432,7 ± 0,6			
8	435,0 ± 3,0	}	Q [1,25] t=60s	424,1
9	390,0 ± 2,6			
10	421,3 ± 2,1	}	Q [1,25] t=90s	430,5
11	424,0 ± 3,6			
12	427,0 ± 2,6	}	Q [2,5] t=30s	433,4
13	434,5 ± 1,3			
14	437,0 ± 4,4	}	Q [2,5] t=60s	428,4
15	420,0 ± 3,6			
16	431,2 ± 0,6	}	Q [2,5] t=90s	415
17	434,0 ± 1,7			
18	435,0 ± 2,6	}	Q [5,0] t=30s	416,2
19	429,3 ± 1,1			
20	423,0 ± 1,7	}	Q [5,0] t=60	408,8
21	433,0 ± 2,6			
22	419,0 ± 1,9	}	Q [5,0] t=90s	401,8
23	425,0 ± 3,6			
24	401,0 ± 2,6	}		
25	436,6 ± 0,9			
26	442,0 ± 2,0	}		
27	370,0 ± 1,7			
28	424,5 ± 0,9	}		
29	412,0 ± 6,2			
30	390,0 ± 2,6	}		
31	417,4 ± 1,6			
32	424,0 ± 4,6	}		
33	364,0 ± 2,6			

## 6.2. CARACTERIZAÇÃO DA QUITOSANA

### 6.2.1. Características estruturais

#### 6.2.1.1. Espectroscopia vibracional na região do infravermelho

A espectroscopia na região do infravermelho permite observar e classificar algumas bandas relativas a vibrações características dos grupos funcionais presentes na estrutura da quitosana. A Figura 17 mostra o espectro de infravermelho da quitosana Sigma® e a Tabela 09 mostra as bandas observadas no espectro e suas tentativas de atribuições.

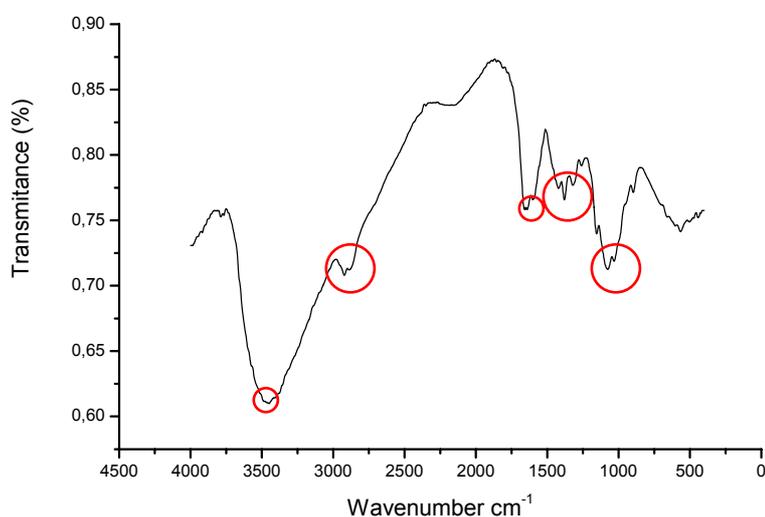


Figura 17: Espectro no infravermelho da quitosana Sigma®.

Tabela 09: Atribuição das bandas do infravermelho da quitosana Sigma®.

Comprimento de onda (cm <sup>-1</sup> )	Tentativas de atribuições
800 a 1200	Anéis piranosídicos
1374	(-CH <sub>2</sub> - OH) ν <sub>C-O</sub>
1428	(amida) ν <sub>C-N</sub>
1607	(amida II) δ <sub>NH</sub>
1647	(amida I) ν <sub>C=O</sub>
2888	ν <sub>C-H</sub>
3459	ν <sub>O-H</sub>
	(amina) δ <sub>NH</sub>

O espectro obtido para a quitosana Sigma® mostra um pico largo em  $3459\text{ cm}^{-1}$ , na região correspondente ao estiramento OH, a qual aparece sobreposta à banda de deformação axial NH do grupo amina concordando com os resultados encontrados por Nunthanid et al. (2001). Além disto, Figueiredo (2002) relata que o grupo amina primário livre ( $-\text{NH}_2$ ) na posição  $\text{C}_2$  da glucosamina também apresenta outro pico na região entre  $1220$  e  $1020\text{ cm}^{-1}$  o qual foi observado no espectro da figura 17 em  $1143\text{ cm}^{-1}$ .

O pico em  $2888\text{ cm}^{-1}$  representa o estiramento C-H alifático e o pico em  $1647\text{ cm}^{-1}$  corresponde à banda de deformação axial C=O do grupo amida I da quitina, indicando que a amostra não está totalmente desacetilada concordando, por tanto, com Figueiredo (2002). Enquanto que, o modo vibracional da deformação angular da ligação N-H (amida II) aparece como um ombro em  $1607\text{ cm}^{-1}$  semelhante ao observado por Anjos (2005).

O pico em  $1374\text{ cm}^{-1}$  representa o estiramento C-O do grupo alcoólico primário ( $-\text{CH}_2 - \text{OH}$ ). A deformação axial de C-N da amida aparece em  $1428\text{ cm}^{-1}$ . E, a banda intensa entre  $800$  e  $1200\text{ cm}^{-1}$  está relacionada aos anéis piranosídicos, assim como foi relatado por Shigemasa et al., em 1996.

### 6.2.2. Grau de Desacetilação

O grau de desacetilação é considerado um dos principais parâmetros na caracterização da quitina e da quitosana. Ele é definido como sendo o número de grupos amina em relação ao número de grupos amida da cadeia polimérica.

Vários métodos já foram propostos para a sua determinação tais como: espectroscopia no infravermelho, no ultravioleta, RMN  $^1\text{H}$ , RMN  $^{13}\text{C}$ , análise elementar e titulações potenciométrica e condutimétrica. Entretanto, existe certa discrepância entre

os valores encontrados pelas diferentes técnicas, por isso até hoje ainda busca-se método mais adequado para sua determinação.

No presente trabalho, quatro destes sete métodos foram realizados para determinar o grau de desacetilação da quitosana: 1) ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN  $^1\text{H}$ ); 2) titulação condutimétrica; 3) espectroscopia vibracional na região do infravermelho; 4) Análise elementar.

#### 6.2.2.1. Ressonância Magnética Nuclear

A ressonância magnética nuclear de  $^1\text{H}$  é uma técnica que permite a quantificação de alto grau de desacetilação. A preparação da amostra é simples por diversos motivos tais como: não há necessidade de preparar curva analítica; utiliza uma pequena quantidade de substância (miligramas) e não precisa purificá-la (caso os picos de impurezas não tenham o mesmo deslocamento químico dos picos relevantes da quitosana).

Segundo Lavertu, et al. (2003) a determinação do grau de desacetilação por RMN  $^1\text{H}$  é feita utilizando uma relação entre os picos referentes aos prótons do grupo acetoamido da quitina e os outros prótons, exceto o próton do carbono anomérico ( $\text{C}_1$ ) da quitosana/quitina (Figura 18).

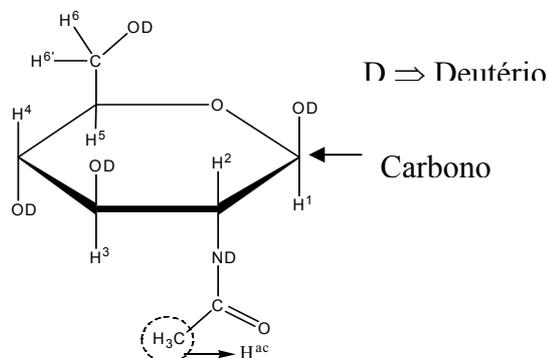


Figura 18: Esquema da quitina/quitosana com a numeração dos prótons que aparecem no RMN  $^1\text{H}$ . Fonte: Anjos (2005).

Nesta técnica a amostra de quitosana é dissolvida em solução de ácido clorídrico deuterado resultando em uma solução viscosa, fazendo-se necessário que a medida seja realizada a 50°C para impedir interações intermoleculares e intramoleculares (Figura 19). Visto que, estas interações modificam o tempo de relaxação responsável pela integração dos picos influenciando, desta forma, o valor do grau de desacetilação. Assim também, é necessário que as medidas sejam realizadas rapidamente, de modo a minimizar problemas causados pela hidrólise da quitosana, ou seja, a quebra das ligações glicosídicas que formam o biopolímero. A Figura 20 mostra o espectro de RMN  $^1\text{H}$  para a quitosana Sigma®.

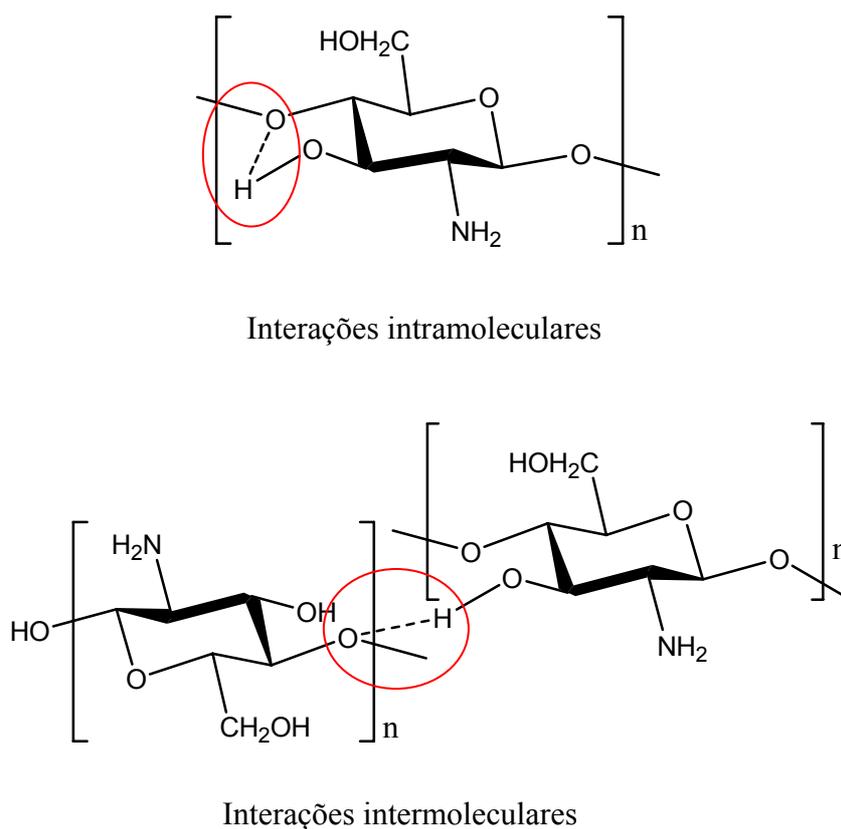


Figura 19: Interações intramoleculares e intermoleculares em/entre as cadeias de quitosana.

Fonte: Anjos (2005).

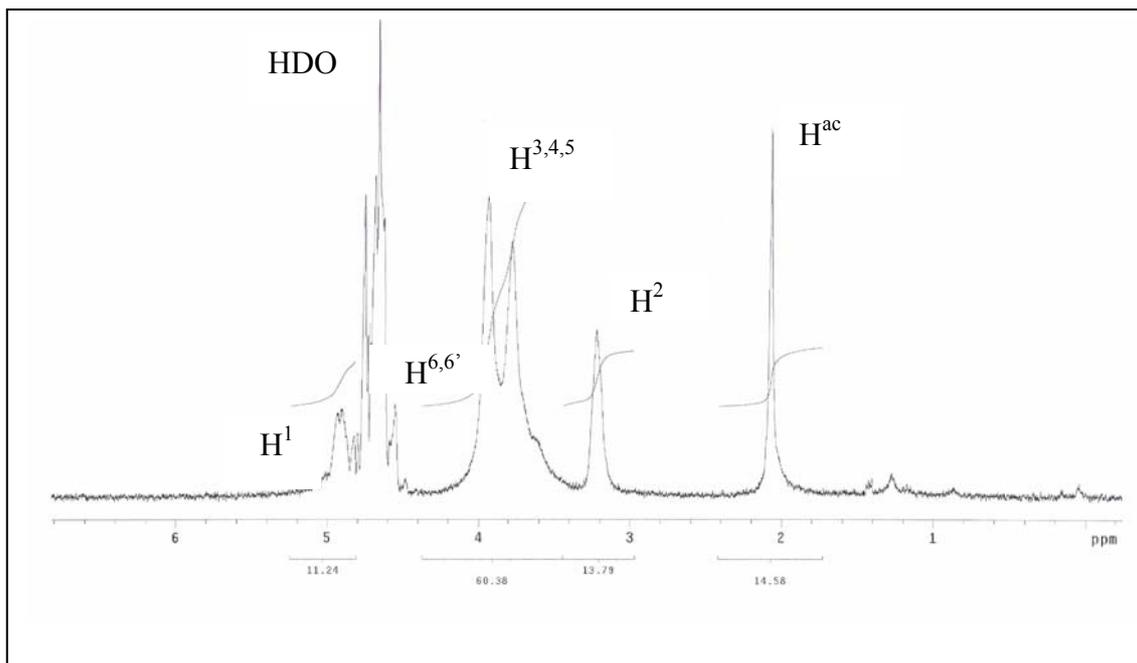


Figura 20: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da quitosana Sigma®.

Tabela 10: Integração dos picos do espectro de RMN  $^1\text{H}$  da quitosana Sigma® para o cálculo do grau de desacetilação.

Hidrogênios	Integração dos picos
	Quitosana Sigma®
$\text{H}^{\text{ac}}$	14,58
$\text{H}^2$	13,79
$\Sigma \text{H}^{2,3,4,5,6,6'}$	74,17

O grau de desacetilação foi calculado pela equação 1 proposta por Hirai et al. (1991), que utiliza os sinais dos prótons  $\text{H}^2$ ,  $\text{H}^3$ ,  $\text{H}^4$ ,  $\text{H}^5$ ,  $\text{H}^6$ ,  $\text{H}^{6'}$  ( $\text{H}^{2-6}$ ) de ambos os monômeros e o pico referente aos núcleos do hidrogênio do grupo acetoamido ( $\text{H}^{\text{ac}}$ ).

$$GD(\%) = \left( 1 - \left( \frac{1}{3} H^{\text{ac}} / \frac{1}{6} H^{2-6} \right) \right) \times 100 \quad (\text{Eq. 1})$$

E pela equação 2 proposta por Signini et al. (2000), que utiliza a área do pico na região de 2ppm atribuído aos núcleos de hidrogênio do grupo acetoamido ( $\text{H}^{\text{ac}}$ ) e a área

do pico em 3,4ppm referente ao núcleo de hidrogênio na posição 2 do anel glicopiranosídico ( $H^2$ ).

$$GD\% = \left( 1 - \left( \frac{H^{ac}}{3H^2} \right) \right) \times 100 \quad (\text{Eq.2})$$

A equação 2 só leva em conta os picos do grupo acetamido ( $H^{ac}$ ) e dos hidrogênios do carbono na posição 2 do anel glicopiranosídico ( $H^2$ ). A escolha desses dois picos se deve ao fato de que as áreas relativas a núcleos dos grupos metila presentes no grupo acetamido e ao núcleo na posição 2 do anel glicopiranosídico, estão relativamente livres das influências do pico de HOD. O deslocamento químico ( $\delta$ ) de HOD obtido no espectro da quitosana Sigma foi aproximadamente 4,8 ppm concordando com Anjos (2005) e Lavertu et al. (2003) e discordando de Santos et al. (2003) que encontraram um valor próximo a 3,8 ppm.

Os valores dos graus de desacetilação variaram utilizando as equações 1 e 2, como mostrado na Tabela 11.

Tabela 11: Valores dos graus de desacetilação em porcentagem da quitosana determinados por RMN  $^1H$ , a partir de duas equações distintas.

Quitosana	Eq.(1)	Eq. (2)
Sigma®	61%	65%

#### 6.2.2.2. Titulação Condutimétrica

A determinação do grau de desacetilação da quitosana por titulação condutimétrica é um método indireto bastante utilizado nas industriais por ser uma técnica simples e de baixo custo.

Para preparar a solução de quitosana foi preciso dissolver 102 mg de quitosana em 20 mL de ácido clorídrico 0,05 M sob agitação constante por 24 horas.

Paralelamente foi feita a padronização da solução de hidróxido de sódio visto que esta base tanto no estado sólido como em solução absorve rapidamente CO<sub>2</sub> da atmosfera produzindo carbonato de sódio. A solução padrão de NaOH 0,17 M foi preparada a partir do ácido biftalato de potássio por ser a substância primária frequentemente utilizada na aferição de soluções básicas.

A solução de quitosana foi titulada com NaOH segundo a tabela 12 e em seguida foi traçada a curva de titulação condutimétrica (Figura 32).

Tabela 12: Condutância medida ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ ) a cada volume de base acrescentada durante a titulação condutimétrica.

Volume de NaOH (mL)	Condutância ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )
0	11,50
0,5	11,63
1,0	10,68
1,5	9,217
2,0	8,498
2,5	8,212
3,0	7,476
3,5	7,229
4,0	7,094
4,5	6,995
5,0	6,617
5,5	6,199
6,0	5,860
6,5	5,460
7,0	5,273
7,5	5,190
8,0	5,293
8,5	5,252
9,0	5,290

---

9,5	5,535
10,0	5,607
10,5	5,669
11,0	5,779
11,5	5,935

---

A **curva condutimétrica** da amostra de quitosana obtida neste trabalho com solução de NaOH e excesso de ácido clorídrico está mostrada na figura 21. O primeiro ramo representa a neutralização do ácido presente, o segundo corresponde à neutralização de prótons dos grupos amino da quitosana e o terceiro conjunto de pontos refere-se ao excesso de base, após o ponto de equivalência.

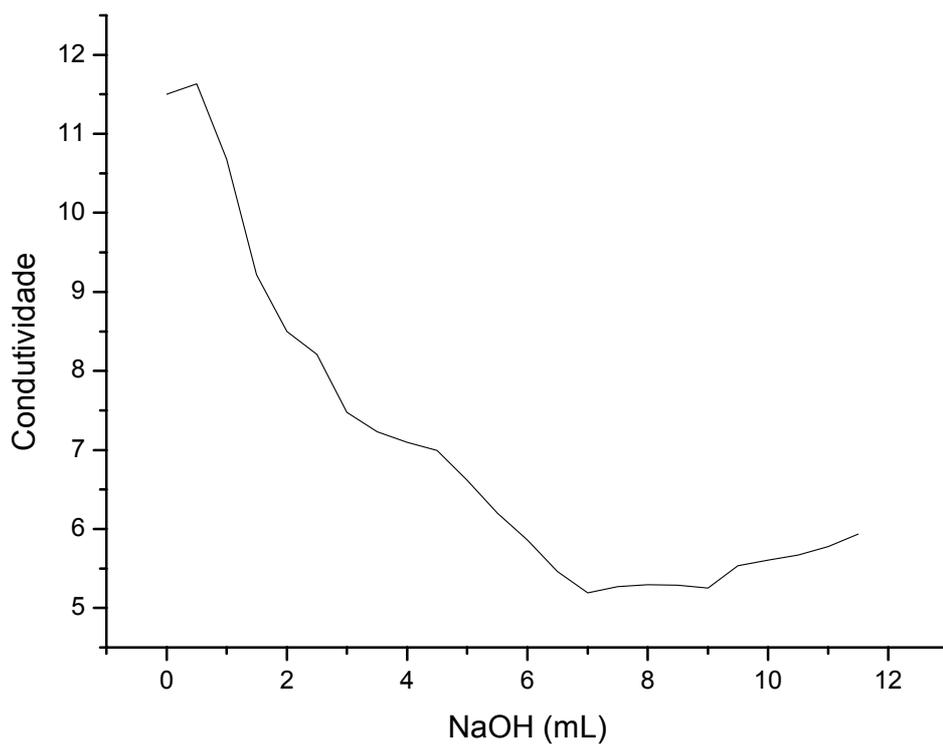


Figura 21: Curva de titulação condutimétrica da amostra de quitosana.

O grau de desacetilação da quitosana foi calculado usando a equação 3 proposta por Raymond et al. (1993):

$$\% GD = 16,1 \times [base] \times (V_2 - V_1) / m \text{ (Eq. 3)}$$

Nestas equações, *GD* é o grau médio de desacetilação, *V1* é o volume de base usado para a neutralização de HCl em excesso (mL); *V2 - V1* é o volume de base usado para a neutralização dos grupos ácidos de quitosana (mL); [*base*] é a concentração da base usada e *m* é a massa da amostra de quitosana (Tabela 13).

Tabela 13: Valores da massa de quitosana, concentração da base, volume de base usado para a neutralização dos grupos ácidos da amostra e o grau de desacetilação da quitosana.

Quitosana Sigma ®	m	[base]	(V <sub>2</sub> - V <sub>1</sub> )	GD%
	102 mg	0,17 M	2mL	54%

### 6.2.2.3. Espectroscopia vibracional na região do infravermelho

A espectroscopia no infravermelho é uma técnica que além de caracterizar a estrutura do polímero, vide item 6.2.1.1, também é utilizada para determinar o grau de desacetilação da quitosana através da relação entre as absorvâncias nos comprimento de ondas de 1655 e 3450 cm. Para medir a absorvância em um espectro de transmitância versus comprimento de onda é preciso: 1) traçar as linhas de base; 2) calcular a diferença de transmitância; 3) converter os valores de transmitância para absorvância ( $A = \log T_1/T_2$ ) e 4) aplicar os valores na equações propostas por Domszy & Roberts (1985) (Eq.4) e por Baxter et al. (1992) (Eq.5) que utilizam linhas de base diferentes para calcular a absorvância no comprimento de onda 1655. No entanto, as duas equações apresentam um mesmo objetivo: calcular o grau de desacetilação da quitosana

relacionando os picos característicos do grupo amina e acetamida do heteropolímero (Tabela 14).

$$\text{(Eq.4) } GD = 100 - [(A_{1655} / A_{3450}) \times 100 / 1,33] \text{ ----- Linha de base (a)}$$

Onde:

$A_{1655}$  é a absorbância no comprimento de onda  $1655 \text{ cm}^{-1}$  obtido utilizando a linha de base (a) proposta por Domszy & Roberts (1985). Esta banda de absorção é característica da vibração entre os átomos de carbono e oxigênio ( $\nu_{\text{C=O}}$ ) do grupo amida I da quitina residual presente na quitosana.  $A_{3450}$  é a banda de absorção no comprimento de onda  $3450 \text{ cm}^{-1}$  correspondente ao estiramento OH e a deformação axial NH do grupo amina presente na quitosana. O número 1,33 equivale ao valor de  $(A_{1655} / A_{3450})$  encontrado na quitina pura (Figura 22).

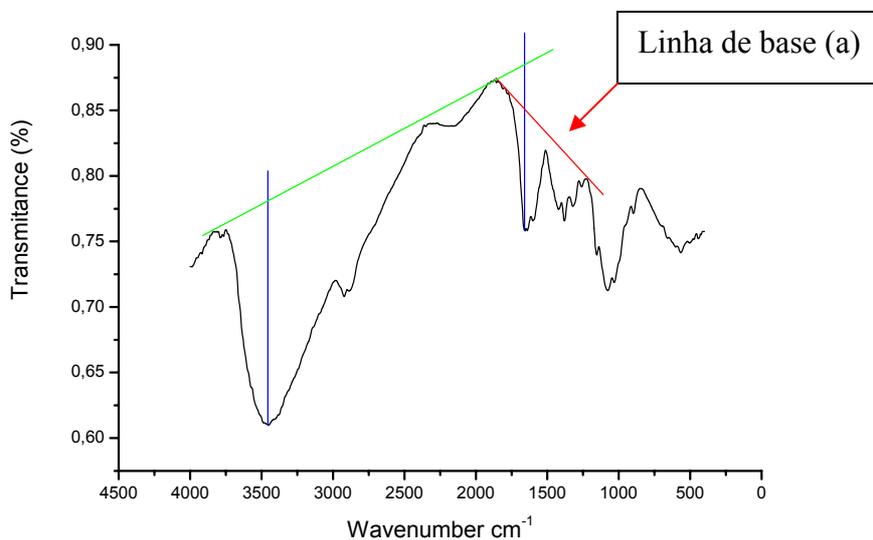


Figura 22: Espectro no infravermelho da quitosana Sigma® para determinar o grau de desacetilação através da equação 4 que utiliza a linha de base (a).

$$GD = 100 - [(A_{1655} / A_{3450}) \times 115] \text{ ----- Linha de base (b) (Eq. 5)}$$

Onde:

$A_{1655}$  é a absorbância no comprimento de onda  $1655 \text{ cm}^{-1}$  obtido utilizando a linha de base (b) proposta por Baxter et al. (1992) e  $A_{3450}$  é a absorbância medida no comprimento de onda  $3450 \text{ cm}^{-1}$  empregando a mesma linha de base usada por Domszy & Roberts (1985). O valor de  $(A_{1655} / A_{3450})$  para a quitina pura encontrado por Baxter et al. (1992) quando traçada a linha de base (b) foi aproximadamente 0,87. Para introduzir este número na sua equação em vez de multiplicar  $(A_{1655} / A_{3450})$  por 100 e dividir por 0,87, os autores decidiram simplificar a fórmula multiplicando  $(A_{1655} / A_{3450})$  por 115 (Figura 23).

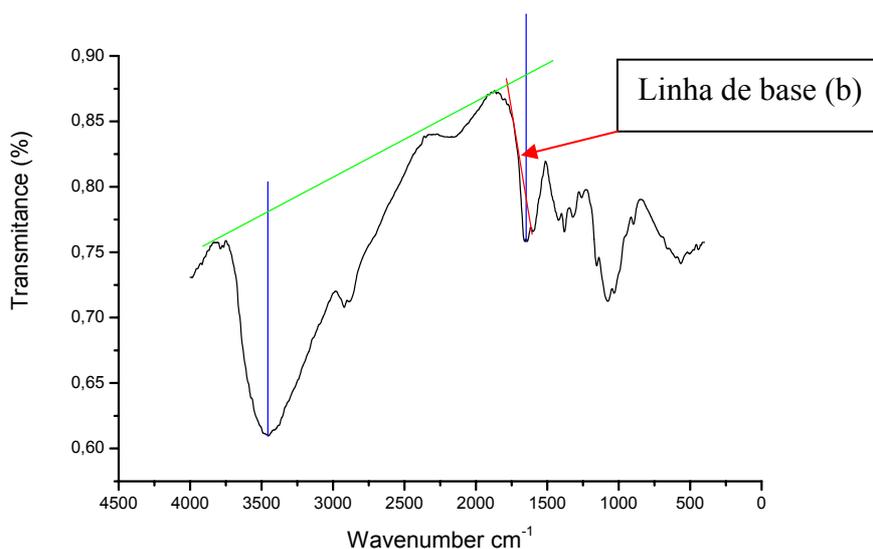


Figura 23: Espectro no infravermelho da quitosana Sigma® para determinar o grau de desacetilação através da equação 5 que utiliza a linha de base (b).

Tabela 14: Valores dos graus de desacetilação em porcentagem da quitosana determinados por espectroscopia vibracional na região do infravermelho, a partir de duas equações distintas.

Comprimento de onda (cm <sup>-1</sup> )	Absorbância (logT <sub>1</sub> /T <sub>2</sub> )	Grau de desacetilação da quitosana (%)	
		Eq. (4)	Eq. (5)
3459	0,1080		
1647 - linha de base (a)	0,0510	65 %	83 %
1647 - linha de base (b)	0,0161		

#### 6.2.2.4. Análise Elementar

A análise elementar é outra ferramenta que pode ser utilizada para a determinação do grau de desacetilação da quitosana. Apesar de ser um método preciso, deve ser usado com muita cautela em virtude dos diferentes teores de hidratação, que variam de acordo com as condições de armazenamento e tratamento prévio da amostra. A equação 6 foi proposta por Kassai et al., 2000 para determinar o grau de desacetilação da quitosana tendo em vista a relação entre carbono e nitrogênio a qual pode ser obtida pela análise elementar.

$$GD\% = \left( 1 - \frac{(C/N) - 5,145}{6,816 - 5,145} \right) \times 100 \quad (\text{Eq.6})$$

Onde C/N é a razão de carbono/nitrogênio. Esta razão de acordo com Kassai et al. (2000) varia de 5,145 em quitosana completamente desacetilada (monômero da quitosana) a 6,816 em quitina inteiramente acetilada (monômero da quitina).

A Tabela 15 mostra os percentuais de carbono, nitrogênio, hidrogênio, a relação carbono/nitrogênio e o grau de desacetilação encontrado na amostra de quitosana analisada.

Tabela 15: Percentuais de carbono, nitrogênio, hidrogênio, a relação carbono / nitrogênio e o grau de desacetilação da amostra de quitosana.

Quitosana	C %	N %	H %	C/N	GD%
Sigma®	37.88	7.03	6.59	5.39	<b>85.34%</b>

Este método só apresenta resultados precisos para a quitosana que não tem resíduos de proteínas, caso contrário, é necessário a purificar a quitosana.

#### 6.2.2.5. Comparação dos valores dos graus de desacetilação

Na Tabela 16 são apresentados todos os valores obtidos para o grau de desacetilação da quitosana Sigma® por RMN <sup>1</sup>H, titulação condutimétrica, espectroscopia vibracional na região do infravermelho e análise elementar.

Tabela 16: Valores dos graus de desacetilação (%) em porcentagem da quitosana Sigma® determinados por RMN <sup>1</sup>H, titulação condutimétrica, espectroscopia vibracional na região do infravermelho (IV) e análise elementar.

RMN <sup>1</sup> H		Titulação	Espectroscopia no IV		Análise	Valor do
Eq.1	Eq.2	Condutimétrica	Eq.4	Eq.5	elementar	fabricante
61	65	54	65	83	85,34	>85

Os resultados do grau de desacetilação da quitosana mais próximos ao fornecido pelo fabricante (>85%) foram os obtidos pela análise elementar (85,34%) e pela espectroscopia no infravermelho ao utilizar a linha de base (b) através da Eq.5 (83%). No entanto, isto não significa que estes sejam os resultados mais confiáveis visto que todos os outros resultados foram inferiores ao GD especificado pelo fabricante. Além disso, a quitosana Sigma® não foi purificada o que poderia justificar o resultado do grau de desacetilação ter dado superior para a análise elementar, ou seja, o biopolímero

deve apresentar proteínas residuais. E, em relação ao maior valor encontrado pela Eq5, se dá ao fato de que esta equação foi elaborada, segundo Baxter et al., 1992, para determinar o grau de desacetilação de quitosanas com  $GD > 90\%$  enquanto que a Eq 4 é usada para quitosana com baixo grau de desacetilação ( $GD < 75\%$ ).

Valores idênticos foram observados entre as determinações do grau de desacetilação por RMN  $^1H$  (Eq.2) e por Espectroscopia no infravermelho (Eq.4). A espectroscopia de RMN e a vibracional no IV estão relacionadas respectivamente com o envolvimento de núcleos e elétrons no processo de absorção de energia o que torna estas técnicas capazes de fornecer informações precisas. Contudo, é preciso saber usá-las corretamente a fim de se obter os dados desejados. Por isto foram usadas duas equações de cada técnica para determinar o GD da quitosana e, posteriormente poder verificar a mais adequada para a amostra estudada. Como a substância analisada é um polímero, vale salientar que a RMN é uma técnica bastante utilizada para analisar polímeros e determinar a pureza de amostras o que a torna um método confiável para este experimento.

Santos et al (2003) determinaram o grau de desacetilação de quitosanas comerciais de diferentes origens tanto por RMN  $^1H$  quanto por titulação condutimétrica e observaram resultados semelhantes entre as duas técnicas, embora os valores obtidos pela ressonância tenham sido um pouco maiores do que a titulação.

No presente trabalho, o grau de desacetilação encontrado pela titulação condutimétrica (54%) foi relativamente inferior aos resultados obtidos por RMN  $^1H$  (61% e 65%). No entanto, ao observar a tabela 12 pode-se verificar que não foi medida a condutividade da solução nos volumes entre 6,5 a 7,0 e 9,0 a 9,5 o que poderia aumentar o valor de  $(V_2 - V_1)$  da equação 3 até 0,8 mL acarretando no aumento do grau de desacetilação até 75% .

Desta forma, embora tenham sido obtidos valores do grau de desacetilação variando de 54% a 85% dependendo da técnica empregada, o presente estudo considera o GD da quitosana Sigma® igual a 65%.

Segundo Peter (Peter, 1995), a quitina e quitosana podem ser diferenciadas pelo grau de desacetilação (GD) de tal forma que quando o polímero possui o  $GD \leq 60\%$  é considerada quitina. E quando o grau de desacetilação for superior a 60%, o polissacarídeo é denominado de quitosana.

### 6.2.3. Grau de umidade e análise térmica

#### 6.2.3.1. Análise termogravimétrica – TGA

Os polissacarídeos geralmente têm forte afinidade por água e no estado sólido essas macromoléculas têm uma estrutura desordenada que é facilmente hidratada. A figura 24 mostra as curvas de TGA e DSC da quitosana Sigma® sob atmosfera de N<sub>2</sub> na faixa de temperatura de 25 a 400° C.

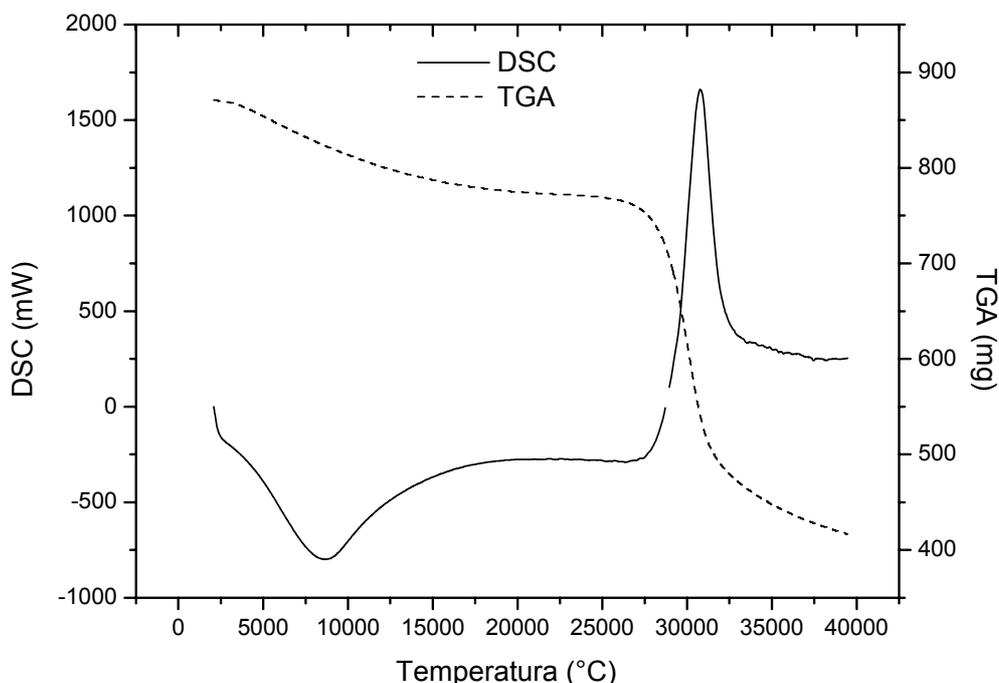


Figura 24: Curva da perda de massa e o DSC da quitosana.

Assim, a análise termogravimétrica (TGA) da quitosana apresenta uma primeira perda de massa em torno de 90 °C referente desidratação da quitosana e uma segunda perda de massa que começa em aproximadamente 260°C, que é referente ao início da termodecomposição da quitosana, com a geração de um resíduo carbonizado.

#### 6.2.3.2. Calorimetria Exploratória Diferencial – DSC

Na curva do DSC (Figura 24) observa-se dois picos, o primeiro evento térmico registrado para a quitosana foi um pico largo endotérmico entre 25 °C a 175 ° C, correspondente à perda de água de hidratação, e o segundo evento térmico registrado foi um pico exotérmico entre 260°C e 325°C, que é relacionado à decomposição da quitosana que continua além do limite de temperatura do experimento. Os dois processos estão coerentes com os eventos observados nas curvas TGA e concordam com o que foi observado por Kittur et al. (2002), Anjos (2005) e Stamford et al. (2007) que descreveram dois eventos térmicos para amostras de quitosana, sob N<sub>2</sub> em curva de DSC.

#### 6.2.4. **Cristalinidade**

##### 6.2.4.1. Difração de raio-X

A difração de raio-X é uma técnica usada para conhecer o interior dos sólidos no que diz respeito ao arranjo dos átomos, ao comprimento e ângulo de ligações. Na técnica de difração de pó, um feixe de raio-X monocromático é direcionado para a amostra, espalhada em um suporte, e a intensidade de difração é medida quando o detector é movido em diferentes ângulos. A figura 25 mostra o difratograma de raio-X obtido para a quitosana Sigma®.

A equação central para analisar os resultados de um experimento de difração de raio-X é a equação (7) de Bragg ( $2d \sin\Theta = \lambda$ ) que relaciona o ângulo ( $\Theta$ ) no qual a interferência construtiva ocorre com o espaçamento ( $d$ ) das camadas de átomos na amostra para o raio-X de determinado comprimento de onda ( $\lambda$ ). A radiação usada no experimento foi uma fonte de cobre com  $\lambda = 154,06$  pm. Observou-se interferência construtiva principalmente em  $2\Theta = 9^\circ$  e  $20^\circ$  que correspondem a dois picos característicos da quitosana. O espaçamento das camadas de átomos foi calculado automaticamente pela equação de Bragg e indicados acima de cada pico do difratograma de raio-X obtido para a quitosana Sigma® mostrado na figura 25.

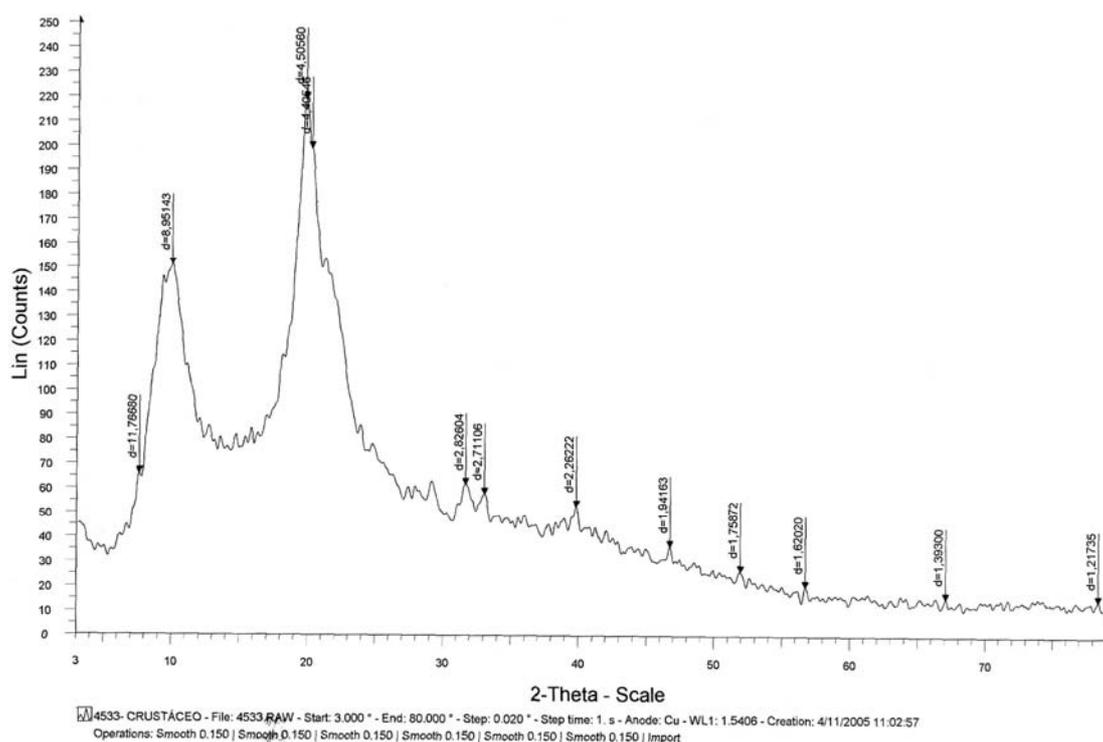


Figura 25: Difratoograma de raio-X da quitosana Sigma®.

O índice de cristalinidade, ou grau de ordenamento, da quitosana foi calculado através da equação proposta por Focher et al., (1990) descrita a seguir:

$$I_{CR} = \left( \frac{I_C - I_A}{I_C} \right) \times 100 \quad (\text{Eq.8})$$

Onde:  $I_{CR}$  é o índice de cristalinidade e  $I_C$  e  $I_A$  são as intensidades de difrações relativas às regiões cristalinas ( $2\theta \approx 20^\circ$ ) e amorfas ( $2\theta \approx 9^\circ$ ), respectivamente. A Tabela 17 mostra o índice de cristalinidade encontrado para a quitosana Sigma®.

Tabela 17: Índice de cristalinidade e as intensidades de difrações nas regiões cristalinas e amorfas da quitosana.

Quitosana	$I_C (2\theta \approx 20^\circ)$	$I_A (2\theta \approx 9^\circ)$	$I_{CR} (\%)$
Sigma®	220	150	31,82 %

Jaworska et al. (2003) verificaram por difração de raio-X a cristalinidade de diversas quitosana e observaram que o índice de cristalinidade sofre alteração dependendo do tipo de quitosana e do método empregado para a sua obtenção. Estes pesquisadores encontraram para alguns desses métodos a seguinte ordem crescente do índice de cristalinidade: fungo < molusco < crustáceo e para outros métodos de obtenção da quitosana a ordem foi: fungo < crustáceo < molusco. Estes resultados também demonstram que a cristalinidade apresenta uma relação com o grau de desacetilação da quitosana.

A difratometria de raio-X é a técnica menos apropriada para determinar o grau de desacetilação da quitosana. No entanto, tem-se observado correlação entre elas (Li et al., 1997). De modo geral, verificou-se que a quitosana possui menor grau de cristalinidade do que a quitina e conforme aumenta o grau de desacetilação diminui o grau de cristalinidade. A diminuição do grau de cristalinidade durante a desacetilação da quitina não está associada apenas à remoção dos grupos acetil na quitosana, mas

também, às drásticas condições de processamento da quitina e da quitosana (Ornum, 1992; Monteiro Júnior, 1999). Portanto, o resultado encontrado para a cristalinidade do biopolímero estudado ( $I_{CR} = 31,82\%$ ) foi coerente com os demais resultados obtidos do seu grau de desacetilação visto que apresentou baixo grau de ordenamento característico de um material amorfo como é o caso da quitosana.

### 6.3. VERIFICAÇÃO DA PERMEABILIDADE DO ESMALTE A QUITOSANA

Fish (1927) determinou a capacidade do esmalte dentário de se comportar como membrana permeável ou semipermeável dependendo do tamanho do íon. Esta propriedade, segundo o autor, existe em função da presença da matéria orgânica (proteínas solúveis, insolúveis e peptídeos) no esmalte.

Segundo Borderías, et al. (2005), uma das propriedades da quitosana está relacionada à degradação de proteínas. Além disso, sabe-se que a quitosana é um polieletrólito catiônico em meio ácido o que permite a sua interação com moléculas carregadas negativamente como: o tecido dentário e membrana celular (Horner et al., 1997; Pautlowska, 1997).

Foi empregada à técnica de Tomografia por Coerência Óptica (OCT) para verificar se o biopolímero fica aderido à superfície do esmalte ou penetra em direção a dentina e se esta capacidade se altera com o aumento da concentração de quitosana. As figuras 26, 27 e 28 mostram as imagens obtidas pela Tomografia por Coerência Óptica para as diferentes concentrações de quitosana (1,25; 2,5 e 5,0 mg/mL).

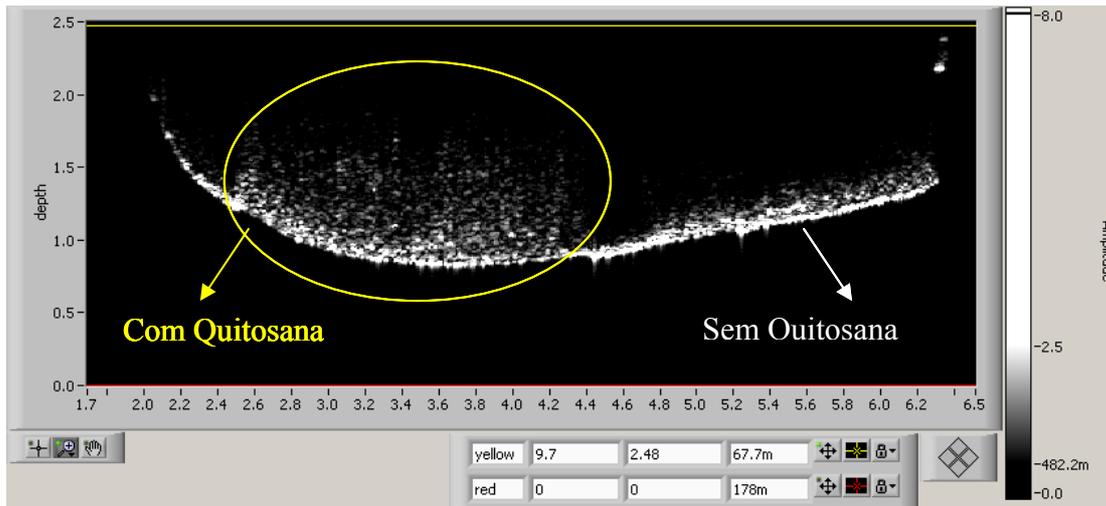


Figura 26: Imagem de OCT de espécime contendo quitosana (1,25 mg/mL) no terço médio.

A figura 26 mostra a imagem obtida pela OCT de um espécime no qual a quitosana foi aplicada no terço médio da amostra. Observa-se um maior espalhamento de luz na região que contém quitosana. No entanto, não foi visualizado o limite amelo – dentinário nesta imagem.

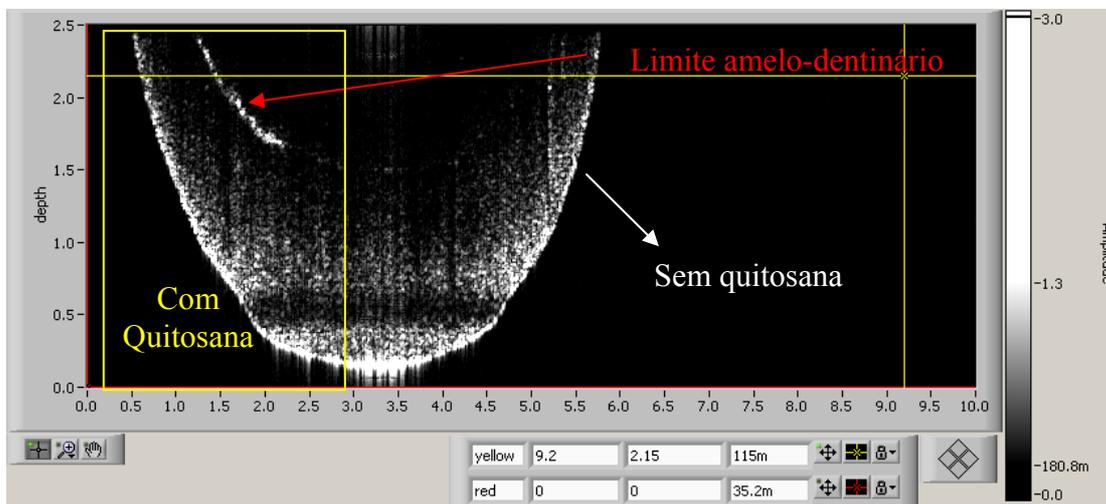


Figura 27: Imagem de OCT de espécime sem quitosana (direita) e com quitosana na concentração de 2,5 mg/mL (esquerda).

A figura 27 é uma imagem de OCT de um dente que não contém quitosana na porção mesio-vestibular e na porção disto-vestibular apresenta quitosana na

concentração de 2,5 mg/mL. Observa-se um maior espalhamento de luz na região que contém quitosana e o limite amelo-dentinário foi bem visualizado no lado do dente que apresentava o biopolímero.

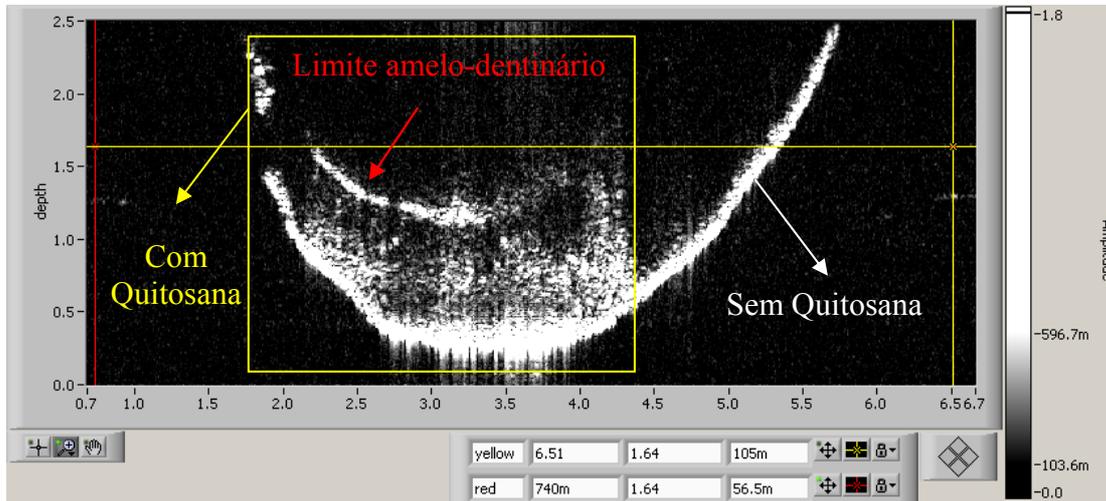


Figura 28: Imagem de OCT de espécime contendo quitosana (5,0 mg/mL).

A figura 28 mostra a imagem de OCT de um dente que apresenta quitosana na concentração de 5,0 mg/mL em 2/3 do espécime. Visualiza-se o limite amelo-dentinário na parte do dente que contém a substância estudada.

Os resultados obtidos foram qualitativos podendo observar nas figuras 27 e 28 que parte da quitosana ficou na superfície do esmalte e outra parte penetrou até o limite amelo-dentinário para as concentrações de 2,5 e 5,0 mg/mL. Provavelmente a quitosana deve ter se aderido à delicada malha de material orgânico localizado ao redor dos prismas de esmalte semelhante ao observado por Fish (1927) quando demonstrou a infiltração centrífuga de um corante através da câmara pulpar, estendendo-se além do limite amelo-dentinário até quase a superfície do esmalte. O autor verificou que os prismas e a substância interprismática mostraram-se praticamente impermeáveis ao corante, no entanto ao redor de cada prisma observou uma camada orgânica que permite a microcirculação de um fluido.

A infiltração de substâncias da superfície externa em direção à polpa (infiltração centrípeta) foi descrita por Bartelstone (1951). Por meio da aplicação de  $I^{131}$  na superfície do esmalte intacto de caninos de oito cobaias, os autores observaram a penetração desta substância através do esmalte em direção à dentina e à polpa. Contudo, Wainwrigth (1951) verificou que o esmalte intacto mostrou-se impermeável à penetração de vários radioisótopos.

Para estudar a permeabilidade do esmalte, Hoppenbrouwers et al (1986) avaliaram dentes irrompidos e não irrompidos por meio da resistência elétrica e observaram que nos dentes irrompidos, as camadas mais externas apresentaram maior resistência e, desta forma, menor permeabilidade. Nos dentes não irrompidos, a resistência foi semelhante para todas as camadas analisadas. Portanto, a permeabilidade das camadas superficiais do esmalte altera-se após a irrupção.

O esmalte jovem comporta-se como uma membrana semipermeável, permitindo a passagem de água e outra substância de pequeno tamanho molecular pelos poros, entre os cristais. Com a idade, esses poros diminuem à medida que os cristais adquirem mais íons e aumentam de tamanho (Ten Cate, 1998).

Kuhar et al (1997) avaliaram a permeabilidade do esmalte após aplicação de ácido fosfórico a 37% e observaram dano na camada superficial aprismática provocando um aumento significativo na permeabilidade do esmalte. Os autores concluíram que os procedimentos que causam alteração na superfície do esmalte aumentam a susceptibilidade a desmineralização e ao processo de cárie.

As imagens observadas pela OCT discordam de Kuhar et al. (1997), já que a quitosana mesmo tendo causado alteração na superfície do esmalte conseguiu inibir o processo de desmineralização. Por outro lado, as figuras obtidas pela OCT concordam

com Bartelstone (1951) e Ten Cate (1998) ao mostrarem que o esmalte permite a infiltração de substância em direção à polpa.

#### 6.4. AVALIAÇÃO DO EFEITO DA QUITOSANA NO PROCESSO DE DES-REMINERALIZAÇÃO DO ESMALTE DENTÁRIO

##### 6.4.1. Análise de Microdureza

##### 6.4.1.1. Cálculo da perda do volume mineral do esmalte dentário

Para o cálculo da perda do volume mineral foi preciso transformar as médias dos valores de dureza Vickers (HV) em dureza Knoop (HK) através da equação (9):

$$HK = HV \times 1,451 / 0,1891 \text{ (Eq. 9)}$$

Em seguida os valores de Knoop encontrados foram transformados em porcentagem de volume mineral (%vol) pela equação proposta por Featherstone *et al.* (1983): %vol = 4,3 x (KHN)<sup>1/2</sup> + 11,3 (Eq. 10) onde KHN (*Knoop hardness number*) é o número de dureza Knoop médio encontrado após a transformação dos valores de dureza Vickers medidos em cada uma das amostras.

O valor obtido da primeira leitura de microdureza (antes da ciclagem) encontrou-se o volume mineral do esmalte hígido (VM<sub>EH</sub>) e a segunda análise (depois da ciclagem) obteve-se o volume mineral do esmalte desmineralizado (VM<sub>ED</sub>). A diferença entre o VM<sub>EH</sub> e VM<sub>ED</sub> resultou no parâmetro ΔVM que corresponde, em última análise, à perda do volume mineral do esmalte.

Adicionalmente, a porcentagem de inibição da perda mineral foi calculada para os grupos tratados com quitosana, utilizando-se a média ΔVM, por meio da equação (11):

$$\% \text{ de Inibição} = (\Delta\text{VM}_{\text{CONTROLE}} - \Delta\text{VM}_{\text{TRATADOS}}) \times 100 / \Delta\text{VM}_{\text{CONTROLE}} \text{ (Eq.11)}$$

O valor percentual da perda do volume mineral ( $\Delta\text{VM}$ ), bem como o percentual de inibição para cada grupo estão descritos na tabela 18.

Tabela 18: Média e desvio padrão (n=3) da perda do volume mineral (%) e do percentual de inibição do esmalte dentário após a ciclagem.

<b>GRUPO</b>	<b><math>\Delta\text{VM}</math> (%)</b>	<b>Inibição da Perda Mineral (%)</b>
Controle pH= 4,8	4,64 $\pm$ 0,43 b	–
Controle pH= 4,0	11,62 $\pm$ 0,82 a	–
Quitosana [1,25] em 30s	5,11 $\pm$ 0,54 b	56%
Quitosana [1,25] em 60s	3,64 $\pm$ 0,28 c	69%
Quitosana [1,25] em 90s	3,69 $\pm$ 0,37 c	68%
Quitosana [2,50] em 30s	3,08 $\pm$ 0,19 d	73%
Quitosana [2,50] em 60s	2,12 $\pm$ 0,46 e	82%
Quitosana [2,50] em 90s	2,21 $\pm$ 0,39 e	81%
Quitosana [5,00] em 30s	2,89 $\pm$ 0,36 d	75%
Quitosana [5,00] em 60s	2,21 $\pm$ 0,26 e	81%
Quitosana [5,00] em 90s	2,22 $\pm$ 0,37 e	81%

*Médias seguidas por letras distintas diferem estatisticamente entre si pelo teste T-Student no nível de 95% de confiança (p<0,05).*

A análise da tabela 18 evidencia que a perda do volume mineral ( $\Delta\text{VM}$ ) dos espécimes submetidos à aplicação de quitosana foi estatisticamente menor (p<0,05) que aquela do grupo controle com pH= 4,0. Portanto, a quitosana influenciou o processo de des-remineralização do esmalte dentário inibindo a perda mineral de 56% a 82% dependendo da concentração (1,25; 2,5; 5,0 mg/mL) e do tempo de exposição do biopolímero (30; 60; 90 s) ao esmalte.

O menor valor encontrado para a inibição da perda mineral (56%) foi para o grupo (Q[1,25] em 30s) o qual teve a perda do volume mineral ( $\Delta VM = 5,11$ ) semelhante ao grupo controle com pH= 4,8 ( $\Delta VM = 4,64$ ) significando que a quitosana na concentração de 1,25 mg/mL e aplicada por 30 s já foi suficiente para compensar a variação de 0,8 no pH da solução desmineralizadora.

O melhor resultado obtido para a inibição da perda mineral (82%) foi para o grupo (Q[2,5] em 60s) o qual não diferiu significativamente ( $p > 0,05$ ) dos grupos (Q[2,5] em 90s); (Q[5,0] em 60s) e (Q[5,0] em 90s) revelando que não houve significância estatística entre as concentrações de 2,5 e 5,0 mg/mL e entre os tempos de exposição de 60 e 90s. Por outro lado, foram observadas diferenças significativas nos valores de  $\Delta VM$  ( $p < 0,05$ ) entre os grupos (Q[1,25]) e (Q[2,5]) assim como para os tempos de 30 e 60s independentemente da concentração de quitosana.

A figura 29 ilustra a perda do volume mineral média ( $\Delta VM$ ) para cada grupo do experimento.

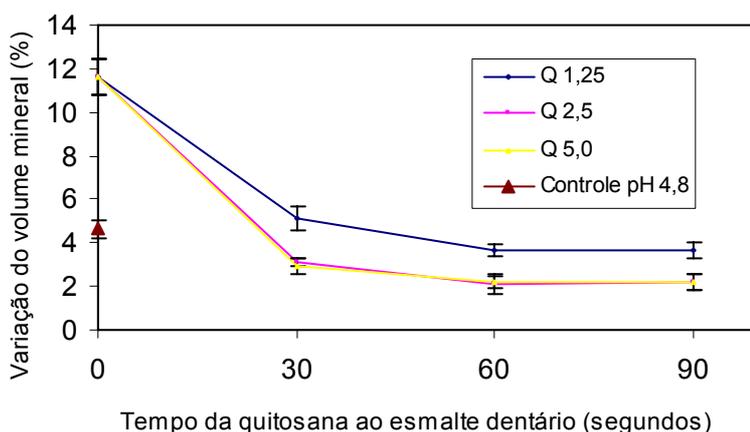


Figura 29: Representação gráfica da perda do volume mineral média de acordo com os grupos. As barras de erro representam o desvio-padrão.

#### 6.4.2. Análise química das soluções empregadas

A análise química, ao contrário da microdureza, consegue avaliar separadamente o processo de desmineralização e o de remineralização. Contudo, no final da ciclagem os valores da perda mineral devem coincidir com a análise de microdureza.

##### 6.4.2.1. Análise de fósforo

6.4.2.1.1. Avaliação do processo de desmineralização e remineralização na ausência e presença de quitosana

A quantidade de fósforo ( $\mu\text{g}$ ) liberada e absorvida pelo esmalte dentário nas soluções desmineralizadoras (DES) e remineralizadoras (RE) respectivamente estão ilustradas nas figuras 30 e 31 e descritas na Tabela 19.

Para encontrar a quantidade de fósforo, expressa em  $\mu\text{g}$ , liberada (DES) ou absorvida (RE) pelo esmalte dentário foi preciso levar em consideração o volume de cada solução – DES (20 mL) e RE (10 mL) – assim como somar o valor obtido com o do ciclo anterior até totalizar os cinco dias de ciclagem. E, por fim subtrair este resultado da massa de fósforo encontrada inicialmente nas soluções empregadas que foram 1245,2  $\mu\text{g}$  para a solução DES e 287,1  $\mu\text{g}$  para a solução RE.

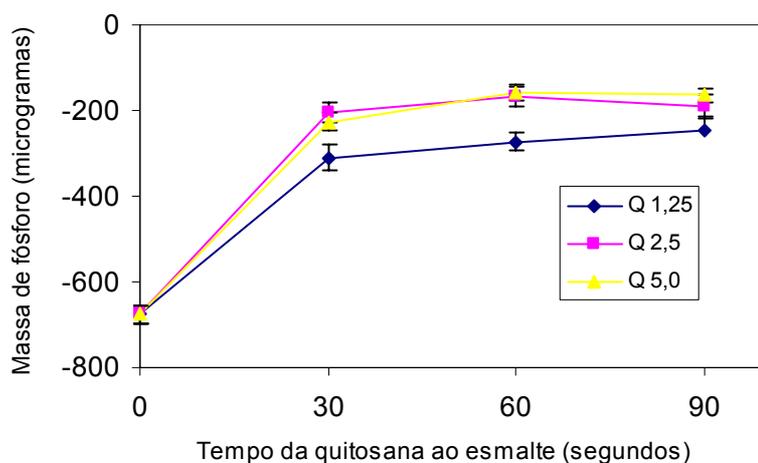


Figura 30: Representação gráfica da quantidade de fósforo liberada (DES) pelo esmalte dentário na ciclagem. As barras de erro representam o desvio-padrão.

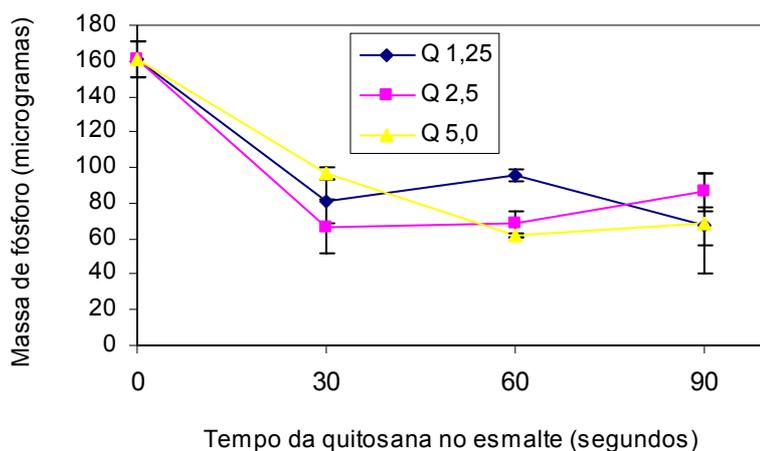


Figura 31: Representação gráfica da quantidade de fósforo absorvida (RE) pelo esmalte dentário na ciclagem. As barras de erro representam o desvio-padrão.

Tabela 19: Média e desvio padrão (n=3) da quantidade de fósforo ( $\mu\text{g}$ ) liberada (DES) ou absorvida (RE) pelo esmalte dentário na ciclagem de pH.

GRUPO	Fósforo liberado ( $\mu\text{g}$ )	Fósforo absorvido ( $\mu\text{g}$ )
	no processo DES	no processo RE
Controle	675,8 $\pm$ 21,8 a	160,7 $\pm$ 10,1 a
Q[1,25] em 30s	309,4 $\pm$ 30,8 b	81,3 $\pm$ 12,5 c
Q[1,25] em 60s	272,2 $\pm$ 22,1 c	95,3 $\pm$ 3,4 b
Q[1,25] em 90s	247,0 $\pm$ 30,1 c	67,2 $\pm$ 10,5 c
Q[2,50] em 30s	205,6 $\pm$ 23,2 d	66,7 $\pm$ 14,9 c
Q[2,50] em 60s	165,8 $\pm$ 26,2 e	68,6 $\pm$ 7,3 c
Q[2,50] em 90s	188,4 $\pm$ 25,5 e	86,2 $\pm$ 10,5 b
Q[5,00] em 30s	227,0 $\pm$ 21,0 d	96,5 $\pm$ 3,2 b
Q[5,00] em 60s	159,6 $\pm$ 15,4 e	61,9 $\pm$ 0,7 c
Q[5,00] em 90s	163,0 $\pm$ 16,3 e	68,4 $\pm$ 7,3 c

Médias seguidas por letras distintas diferem estatisticamente entre si pelo Teste T-Student no nível de 95% de confiança ( $p < 0,05$ ).

Os resultados da Tabela 19 mostram que a quantidade de fósforo liberado pelo esmalte na solução DES do grupo Controle foi significativamente maior ( $p < 0,05$ ) que as

dos grupos contendo quitosana. O melhor valor obtido foi para o grupo Q[5,0] em 60s embora tenha verificado a ausência de diferença estatística entre este grupo e os grupos Q[2,5] em 60s; Q[2,5] em 90s; e Q[5,0] em 90s confirmando os resultados encontrados pela perda de volume mineral ( $\Delta VM$ ). A análise das soluções remineralizadoras demonstrou que os grupos contendo quitosana absorveram significativamente menos fósforo do que o grupo controle. Este fato provavelmente deve ter se dado pela menor perda de fósforo nos grupos contendo quitosana, durante o processo de desmineralização, requerendo assim menor reposição do mineral.

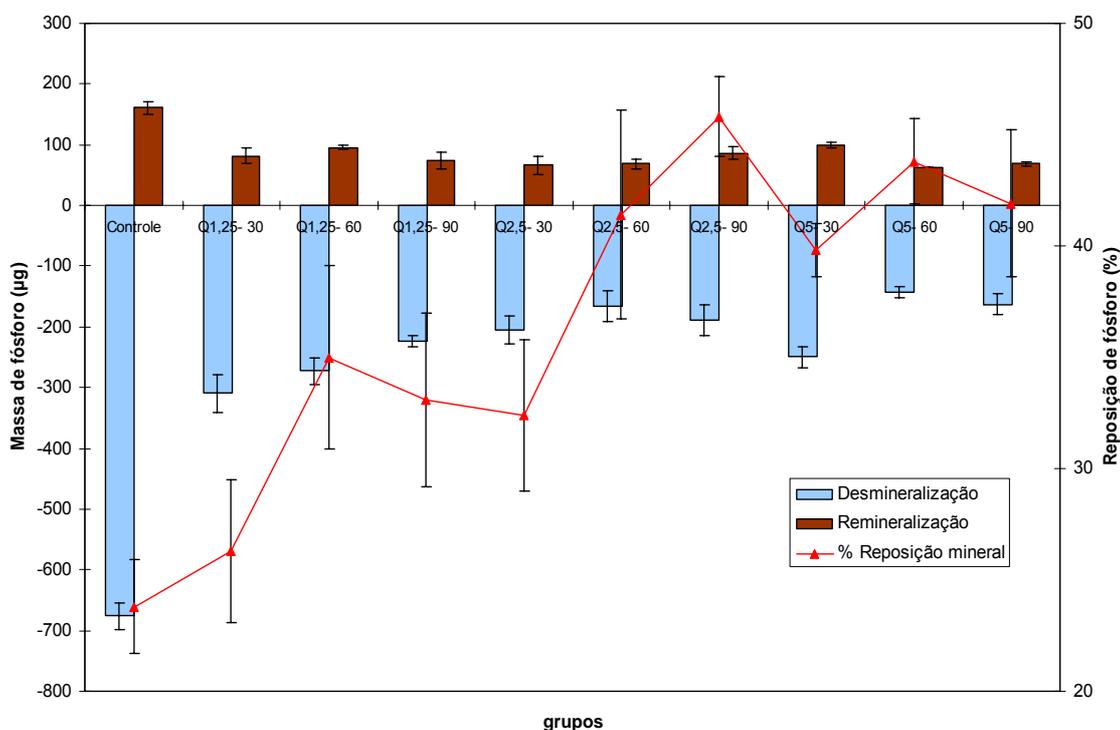


Figura 32: Representação gráfica do percentual da reposição mineral de fósforo durante o processo de des-remineralização do esmalte dentário. As barras de erro representam o desvio-padrão.

A figura 32 mostra que o grupo controle conseguiu repor 23,8 % do fósforo perdido enquanto que os grupos contendo quitosana tiveram uma reposição de 26,3% a

45,8% comprovando que a quitosana influenciou no processo de remineralização do esmalte dentário promovendo uma maior reposição de fósforo em torno de 2,5% a 22%. O menor valor encontrado para a reposição de fósforo (26,3%) foi para o grupo (Q[1,25] em 30s) o qual não apresentou diferença estatística ( $p > 0,05$ ) em relação ao grupo controle. No entanto, foram observadas diferenças estatísticas nos valores da reposição mineral entre o grupo controle e os demais grupos contendo quitosana sendo o melhor resultado (45,8%) obtido para o grupo (Q[2,5] em 90s).

#### 6.4.2.1.2. Comparação dos valores de microdureza e fósforo

Os valores da microdureza e das análises de fósforo foram comparados com base nos resultados encontrados para a inibição da perda mineral (%) e estão descritos na tabela 18 e 20 respectivamente.

A inibição da perda mineral da tabela 20 foi obtida através da perda líquida de fósforo ( $\Delta P$ ) que corresponde à diferença entre  $P_{DES}$  (quantidade de fósforo liberada pelo esmalte na desmineralização) e  $P_{RE}$  (quantidade de fósforo absorvida pelo esmalte na remineralização).

Tabela 20: Média e desvio padrão (n=3) da perda líquida de fósforo ( $\mu\text{g}$ ) e do percentual de inibição do esmalte dentário após a ciclagem.

GRUPO	$\Delta P (P_{DES} - P_{RE})$ ( $\mu\text{g}$ )	Inibição da Perda Mineral (%)
Controle	515,1 $\pm$ 29,28	—
Q[1,25] em 30s	228,1 $\pm$ 25,74	56%
Q[1,25] em 60s	176,9 $\pm$ 24,94	66%
Q[1,25] em 90s	179,8 $\pm$ 29,33	65%
Q[2,50] em 30s	138,9 $\pm$ 8,40	73%

Q[2,50] em 60s	97,2 ± 21,98	81%
Q[2,50] em 90s	102,2 ± 15,83	80%
Q[5,00] em 30s	130,5 ± 19,81	75%
Q[5,00] em 60s	97,7 ± 16,01	81%
Q[5,00] em 90s	94,6 ± 23,72	82%

Foi construído um gráfico dos resultados obtidos da análise de microdureza versus a análise de fósforo a fim de verificar correlação entre as técnicas empregadas (Figura 33).

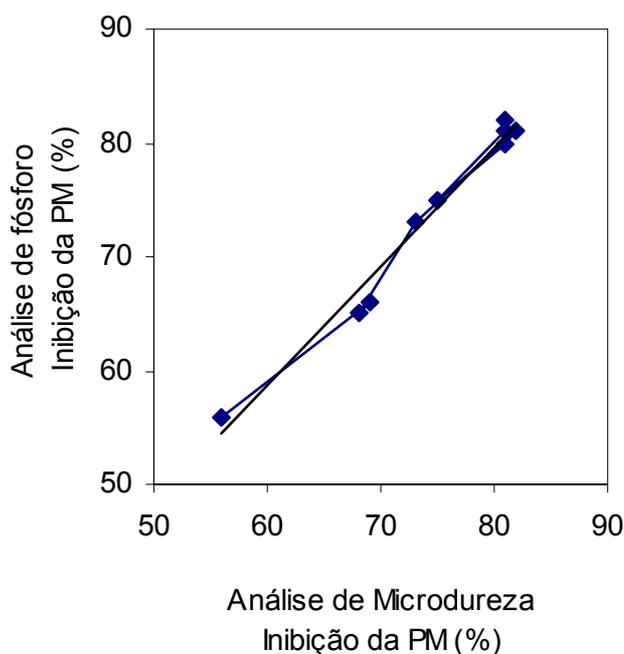


Figura 33: Comparação dos valores obtidos da inibição da perda mineral (%) através da microdureza do esmalte dentário e pela análise química de fósforo das soluções empregadas.

A reta obtida apresenta um bom coeficiente de correlação ( $r = 0,978$ ); sendo possível comprovar a eficácia das duas análises.

## 6.4.2.2. Análises de cálcio

6.4.2.2.1. Avaliação do processo de desmineralização e remineralização na ausência e presença de quitosana

O procedimento para encontrar a quantidade de cálcio, expressa em  $\mu\text{g}$ , liberada ou absorvida pelo esmalte dentário foi o mesmo descrito anteriormente pelo fósforo.

A quantidade de cálcio ( $\mu\text{g}$ ) liberada ou absorvida pelo esmalte dentário nas soluções desmineralizadora (DES) e remineralizadoras (RE) respectivamente estão descritas na Tabela 21.

Tabela 21: Média e desvio padrão ( $n=3$ ) da quantidade de cálcio ( $\mu\text{g}$ ) liberada (DES) ou absorvida (RE) pelo esmalte dentário na ciclagem de pH.

GRUPO	Solução Desmineralizadora (pH= 4,0)	Solução Remineralizadora (pH= 7,4)
Controle	469,0 $\pm$ 36,15 a	106,1 $\pm$ 4,75 a
Q[1,25] em 30s	332,0 $\pm$ 33,01 b	101,2 $\pm$ 11,80 a
Q[1,25] em 60s	303,2 $\pm$ 22,38 c	93,4 $\pm$ 12,67 b
Q[1,25] em 90s	310,4 $\pm$ 10,93 c	93,4 $\pm$ 6,21 b
Q[2,50] em 30s	252,2 $\pm$ 16,46 d	82,4 $\pm$ 6,64 c
Q[2,50] em 60s	172,8 $\pm$ 22,05 e	82,5 $\pm$ 12,73 c
Q[2,50] em 90s	172,8 $\pm$ 26,82 e	82,5 $\pm$ 16,86 c
Q[5,00] em 30s	245,0 $\pm$ 32,50 d	89,7 $\pm$ 18,91 b
Q[5,00] em 60s	208,8 $\pm$ 22,49 e	108,1 $\pm$ 12,56 a
Q[5,00] em 90s	194,6 $\pm$ 22,19 e	89,8 $\pm$ 11,00 b

*Médias seguidas por letras distintas diferem estatisticamente entre si pelo Teste T-Student ao nível de 95% de confiança ( $p<0,05$ ).*

A tabela 21 mostrou que a quantidade de cálcio liberada e absorvida pelo esmalte foi inferior ou semelhante às encontradas pelo fósforo o que não está de acordo com a estequiometria da hidroxiapatita  $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$  a qual apresenta na sua composição 40% de cálcio e 18% de fósforo. Portanto, a quantidade de cálcio

encontrada deveria seguir esta proporção visto que a hidroxiapatita representa a porção mineral do esmalte dentário.

#### 6.4.2.2.2. Comparação dos valores de microdureza e cálcio

Os valores da microdureza e das análises de cálcio foram comparados com base nos resultados encontrados para a inibição da perda mineral (%) e estão descritos na tabela 18 e 22 respectivamente.

A inibição da perda mineral da tabela 22 foi obtida através da perda líquida de cálcio ( $\Delta\text{Ca}$ ) que corresponde à diferença entre  $\text{Ca}_{\text{DES}}$  (quantidade de cálcio liberada pelo esmalte na desmineralização) e  $\text{Ca}_{\text{RE}}$  (quantidade de cálcio absorvida pelo esmalte na remineralização).

Tabela 22: Média e desvio padrão (n=3) da perda líquida de cálcio ( $\mu\text{g}$ ) e do percentual de inibição do esmalte dentário após a ciclagem.

GRUPO	$\Delta\text{Ca}$ ( $\text{Ca}_{\text{DES}} - \text{Ca}_{\text{RE}}$ ) ( $\mu\text{g}$ )	Inibição da Perda Mineral (%)
Controle	469,0 $\pm$ 36,15	-
Q[1,25] em 30s	332,0 $\pm$ 33,01	29,2 %
Q[1,25] em 60s	303,2 $\pm$ 22,38	35,4 %
Q[1,25] em 90s	310,4 $\pm$ 10,93	33,8 %
Q[2,50] em 30s	252,2 $\pm$ 16,46	46,2 %
Q[2,50] em 60s	172,8 $\pm$ 22,05	63,2 %
Q[2,50] em 90s	172,8 $\pm$ 26,82	63,2 %
Q[5,00] em 30s	245,0 $\pm$ 32,50	47,8 %
Q[5,00] em 60s	208,8 $\pm$ 22,49	55,5 %
Q[5,00] em 90s	194,6 $\pm$ 22,19	58,5 %

Foi construído um gráfico dos resultados obtidos da análise de microdureza versus a análise de cálcio a fim de verificar correlação entre as técnicas empregadas (Figura 34).

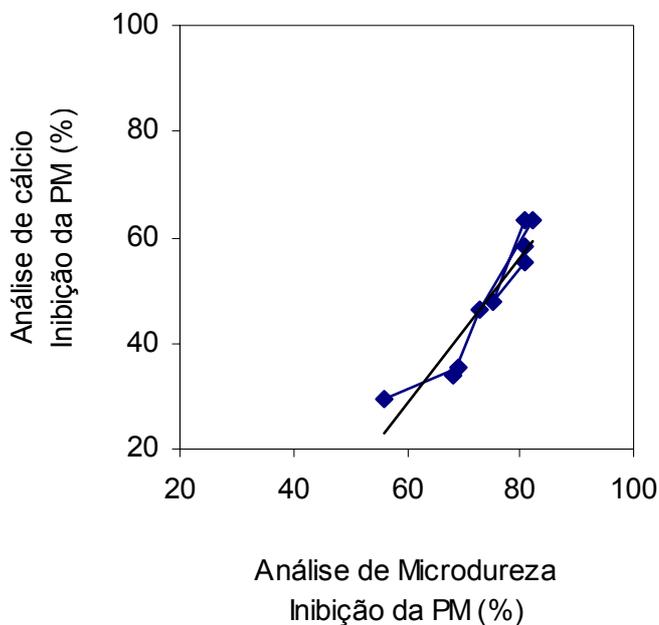


Figura 34: Comparação dos valores obtidos da inibição da perda mineral (%) através da microdureza do esmalte dentário e pela análise química de cálcio das soluções empregadas.

A figura 34 mostra que embora exista correlação ( $r = 0,882$ ) entre as duas análises, os valores da inibição da perda mineral obtidos pela microdureza foram significativamente maiores que os encontrados pela análise de cálcio. Este resultado provavelmente deve ter ocorrido devido à falha na análise de cálcio ou pelo fato da quitosana ter agido de forma diferente para cada íon.

## 7. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos e considerando as condições empregadas no presente estudo, pode-se concluir que:

- A amostra de quitosana apresenta baixo grau de desacetilação (65%) e baixo grau de ordenamento (32%);
- A Tomografia por Coerência Óptica sugere que parte da quitosana se adere à superfície do esmalte dentário e parte penetra no mesmo através da matéria orgânica localizada ao redor dos prismas;
- A quitosana nas concentrações de 2,5 e 5,0 mg/mL penetra o esmalte dentário até atingir o limite amelo-dentinário;
- A quitosana interfere no processo de desmineralização do esmalte dentário inibindo a perda mineral, a qual é influenciada pela concentração e tempo de exposição do polímero ao esmalte;
- A quitosana apresenta melhor atuação nas concentrações de 2,5 e 5,0mg/mL e nos tempos de 60 e 90 segundos de exposição, não havendo diferença estatística entre os mesmos.
- Os dados de microdureza e as análises de fósforo ou cálcio podem ser relacionados através do percentual de inibição da perda mineral.

**PERSPECTIVAS**

Considerando os resultados da presente pesquisa, sugere-se que estudos futuros sejam conduzidos com o objetivo de:

- Comparar o efeito da quitosana de diferentes origens (caranguejo, crustáceo e fungo) nos processos de des-remineralização do esmalte dentário;
- Avaliar a capacidade de infiltração da quitosana no esmalte através da microscopia eletrônica de varredura;
- Investigar o mecanismo de ação da quitosana no esmalte dentário;

Além disso, a realização de pesquisas *in vivo*, que forneçam dados complementares para uma avaliação mais ampla do comportamento da quitosana aplicada ao esmalte dentário frente a desafios cariogênicos, torna-se necessária.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Albuquerque ILS, Camargo T.C. Prevenção e tratamento da mucosite oral induzida por radioterapia: revisão de literatura. *Revista Brasileira de Cancerologia*. 2007; 53(2): 195-209.

Alves MBR, Motta ACF, et al. Saliva Substitute in Xerostomic Patients with Primary Sjögren's Syndrome. A Single-Blind Trial. Quintessence, Chicago, Estados Unidos. 2004; 35: 392-396.

Amorim RVS, Souza W, Fukushima K, Campos-Takaki GM. Faster chitosan production by mucoralean strains in submerged culture. *Braz. J. Microb.* 2000; 32: 20-23.

Amorim RVS, Pedrosa RP, Fukushima K, Martínez CR, Ledingham WM, Campos-Takaki GM. Alternative Carbon Sources from Sugar Cane Process for Submerged Cultivation of *Cunninghamella bertholletiae* to Produce Chitosan. *Food Technol. Biotechnol.* 2006; 44: 519–523.

Andrade VS, Neto BB, Fukushima K, Campos-Takaki GM. Effect of medium components and time of cultivation on chitin production by *Mucor circinelloides* (*Mucor javanicus* IFO 4570) - A factorial study. *Rev. Iberoam. Micol.* 2003; 20: 149-153.

Anjos FSC. Filmes e beads à base de quitosana: incorporação de compostos luminescentes e estudos de interações hospedeiro-hóspede. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de Pernambuco- Departamento de química fundamental. 2005, 93p.

Arends J, ten Bosch JJ. Demineralization and remineralization evaluation techniques. *J Dent Res.* 1992; 71 (Spec No): 924-8.

Argenta RMO, Tabchoury CPM, Cury JA. A modified pH-cycling model to evaluate fluoride effect on enamel demineralization. *Pesqui Odontol Bras.* 2003; 17(3): 241-6.

Bartelstone HJ. Radioiodine penetration through intact enamel with uptake by bloodstream and thyroid gland. *J. Dent. Res.* 1951; 30: 728-733.

Baxter A, Dillon M, Taylor KDA, Roberts GAF. Improved method for i.r. determination of the degree of N-acetylation of chitosan. *Int. J. Biol. Macromol.* 1992; 14: 166-169.

Boppart SA, Ghanta RK, Hsiung PL et al. RLE. Progress Report, MIT. 2002.

Borderías AJ, Sánchez-Alonzo I, Pérez-Mateos M. New applications of fibers in foods: Addition to fishery products. *Trends in Food Science e Technology.* 2005; 16: 458-465.

Braga F, Terci A, Pacifico A et al. Estudo da Prevalência de Xerostomia e Candidose Bucal em Pacientes Portadores de Ardência Bucal. *Águas de Lindóia-SP. Brazilian Oral Research.* São Paulo-SP. 2005; 19: 193p.

Campana Filho SP, Britto D, Curti E, Abreu FR, Cardoso MB, Battisti MV, Sim PC, Goy RC, Signini R & Lavall RL. Extração, estrutura e propriedades de alfa- e beta-quitina. *Química Nova.* 2007; 30: 644-650.

Campos-Takaki GM. The fungal versatility on the copolymers chitin and chitosan production. In: Dutta, PK. (ed) *Chitin and chitosan opportunities and challenges India*, SSM: International Publication. 2005.

Canella KMNC, Garcia RB. Caracterização de quitosana por cromatografia de permeação em gel – influência do método de preparação e do solvente. *Quim. Nova.* 2001; 24: 13-17.

Cao Z & Sun YN. Halamine-based chitosan: Preparation, characterization, and antimicrobial function. *J Biomed Mater Res.* 2007; 1.

Carvalho JG de, Godoy LF de, Bastos MTA. Comparação de duas técnicas para remineralização do esmalte. *Pesqui. Odontol. Bras.* 2002; 16(1): 89-92.

Castellan CS, Luiz AC, Bezinelli LM. In vitro Evaluation of Enamel Demineralization after Er:YAG and Nd:YAG Laser Irradiation on Primary Teeth. *Photomedicine & Laser Surgery*. 2007; 25: 85-90.

Chatterjee S, Adhya M, Guha AK & Chatterjee BP. Chitosan from *Mucor rouxii*: production and physico-chemical characterization. *Process Biochem*. 2005; 40: 395-400.

Cho YW, Cho YN, Chung S H, Yoo G & Ko SW. Water-soluble chitin as a wound healing accelerator. *Biomaterials*. 2007; 20 (22): 2139-2145.

Chung YC, Su YP, Chen CC, Jia G, Wang HL, Wu JCG, Lin JG. Relationship between antibacterial activity of chitosan and surface characteristics of cell wall. *Acta Pharmacol Sin*. 2004; 25(7): 932-936.

Claudino LV, Valença AMG, Medeiros MID et al. Análise em microscopia eletrônica de varredura da superfície do esmalte dentário submetido à ação de sucos de frutas cítricas. *Revista Odonto Ciência – Fac. Odonto/PUCRS*. 2006; 21 (52): 139-145.

Colston BW, Everett MJ, Da Silva LB, Otis LL, Stroeve P & Nathel H. Imaging of hard-and soft-tissue structure in the oral cavity by optical coherence tomography. *Applied Optics*. 1998; 37(16): 3582–3585.

Colston B, Sathyam U, Da Silva L, Everett M, Stroeve P. Otis. *Dental opt. Optics Express*. 1998; 3(6): 230–238.

Costa Silva HSR, Santos KSCR, Ferreira EI. Quitosana: Derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. *Química Nova*. 2006; 29: 776-785.

Díaz EDA, Velasco MCV, Pérez FR, López CAR, Ibarreta LL. *Revista Iberoamericana de Polímeros*. 2007; 8(1): 20.

Domaneschi C, Mauricio AR, Modolo F et al. Idiopathic hyperplasia of the sublingual glands in totally or partially edentulous individuals. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics*. 2007; 103: 374-377.

Domínguez-Medina N, González-López S, Menéndez-Núñez M. Estudio de las vías de difusión de la lesión de mancha blanca del esmalte. *RCOE*. 2002; 7(5): 469-476.

Domszy JG; Roberts AF. *Makromol. Chem*. 1985; 186: 1671-1677.

Du D, Ding J, Cai J, Zhang A. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2007; 58: 145.

Duarte VA, Duarte VA, Elias R, Fadel F et al. *Farmacologia Aplicada na Odontologia – Antibiótico*. Revista Brasileira de Odontologia, Rio de Janeiro. 2003.

Embrapa - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. *Manual de Métodos de Análise de solo*. Rio de Janeiro. 1997; 212p.

Featherstone JD, Ten Cate JM, Shariati M, Arends J. Comparison of artificial caries-like lesions by quantitative microradiography and microhardness profiles. *Caries Res*. 1983; 17(5):385-91.

Featherstone, J.D., O'Reilly, M.M., Shariati, M., Brugler, S. Enhancement of remineralisation in vitro and in vivo. In: Leach SA(ed); *Factors affecting De- and Remineralization of the Teeth*. Oxford: IRL Press. 1986; 23-34.

Figueiredo JFD. *Compósitos hidroxiapatita: Quitosana. Preparação, caracterização e aspectos físico-químicos*. Dissertação de Mestrado. Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo. 2002. 69p.

Fish EW. The circulation of lymph in dentin and enamel. *J. Amer. Dent. Ass.* 1927; 14: 804-817.

Focher B, Beltrame PL, Naggi A., et al. *Carbohydrate Polymers*, 1990 ; 12 : 405-418.

Franco LO, Stamford TCM., Stamford NP, Campos-Takaki GM. *Cunninghamella elegans* (IFM 46109) como fonte de quitina e quitosana. *Analyt.* 2005; 3:40-44.

Fukushima R, Granjeiro JM, Taga EM, Buzalaf MAR. Cinética do flúor na saliva de adultos e crianças após o uso de dentifrícios fluoretados. *Revista da Faculdade de Odontologia de Bauru, Bauru, SP*, 2000; 8 : 45-50.

Fukushima R, Sampaio FC, Buzalaf MAR. Determinação de flúor em saliva através de diferentes técnicas de análise com eletrodo. *Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica. Águas de Lindóia, SP*: 2005; p125.

Fukushima R, Forte FDS, Sampaio FC, Buzalaf MAR. Parotid ductal saliva as a biomarker of exposure to fluoride. In: 84th General Session & Exhibition of the IADR, Brisbane. *Journal of Dental Research*. 2006; 85.

Furlan GHV, Braga S, Steagall-Jr W. Estudo comparativo do desgaste dental causado por diferentes cerdas de escovas dentais. *Revista do Instituto de Ciências da Saúde: Odontologia, Farmácia, Bioquímica e Veterinária, São Paulo*. 2005; 23(4): 305-308.

Gades MD, Stern JS. Chitosan supplementation and fat absorption in men and women. *J Am Diet Assoc*. 2005; 105:72-77.

Ganss C, Lussi A, Klimek. Comparison of Calcium/Phosphorus Analysis, Longitudinal Microradiography and Profilometry for the Quantitative Assessment of Erosive Demineralisation. *Caries Research*. 2005; 39: 178-184.

Hiorth M, Versland T, Heikkilä J, Tho I, and Sande SA. Immersion Coating of Pellets with Calcium Pectinate and Chitosan. *International Journal of Pharmaceutics*. 2006; 308(1-2): 25-32.

Hirai A, Odani H, Nakajima A. *Polymer Bulletin*. 1991; 26: 87-94.

Hong XY, Jim MS. *Pure Appl. Chem*. 1996; 10:1459-1477.

Hoppenbrouwers PMM, Scholber HPF, Borggreven MPM. Measurement of the permeability of dental enamel and its variation with depth using electrochemical method J. Dent. Res. 1986; 65:154-157.

Horner V, Pittermann W, Wachter, R Efficiency of high molecular weight chitosan in skin care applications. In: Domard A, Roberts GAF & Varum KM. Advances in chitin science. Lyon, Jacques Andre Publishers. 1997; 671-677.

Huang D, Swanson EA, Lin CP, Schuman JS, Stinson WG, Chang W, Hee MR, Flotte T, Gregory K, Puliafito CA, fujimoto JG. Optical coherence tomography. Science. 1991; 254(5035):1178–1181.

Ikinci G, Senel S, Akincibay H, Kas S, Ercis S, Wilson CG, Hincal AA. Effect of chitosan on a periodontal pathogen Porphyromonas gingivalis. Int. J. Pharm. 2002; 235:121-127.

Jayakumar R, Reis RL, Mano JF. Synthesis and characterization of pH-sensitive thiol-containing chitosan beads for controlled drug delivery applications. Drug Deliv. 2007; 14:9-17.

Jaworska M, Sakurai K, Gaudon P, Guibal E. Influence of chitosan characteristics on polymer properties. I: Crystallographic properties. Polym. Int. 2003; 52:198–205.

Kassai MR, Arul J, Charlet C. Journal of Polymer Science Part-B-Polymer Physics. 2000; 38:2591-2598.

Khan TA, Peh KK, Ch'ng HS. Reporting degree of deacetylation values of chitosan: the influence of analytical methods. J. Pharm. Pharmaceut. Sci. 2002; 5: 205-212.

Kielbassa AM, Wrbas KT, Schulte-Mönting J, Hellwig E. Correlation of transversal microradiography and microhardness on in situ-induced demineralization in irradiated and nonirradiated human dental enamel. Arch. Oral Biol. 1999; 44(3): 243-51.

Kim SK, Rajapakse N. Enzymatic production and biological activities of chitosan oligosaccharides (COS): A review. 2005; 62: 357-368.

Kim TH, Park IK, Nah JW, Choi YJ, Cho CS. Biomaterials. 2004; 25: 3783.

Kittur FS, Harish PKV, Udaya SK, Tharanathan RN Characterization of chitin, chitosan and their carboxymethyl derivatives by differential scanning calorimetry. Carbohydrate Polymers 2002; 49:185-193.

Klug M, Sanches MNM, Laranjeira MCM, Fávere VT. Quím. Nova. 1998; 21: 410-413.

Kohei H, Maki O. Chitin and Chitosan Research. 2006; 12(2): 86.

Kuhar M. Enhance permeability of acid-etched or ground dental enamel. J. Prosth. Dent. 1997; 77: 578-582.

Lavertu M, Xia Z, et al. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2003; 32:1149-1158.

Leal SC, Toledo O, Bezerra ACB. Morphological Alterations of the Parotid Gland of Rats Maintained on a Liquid Diet. Brazilian Dental Journal, Ribeirão Preto. 2003; 14 (3): 172-176.

Li J, Revol JF, Marchessault RH. Journal of Applied Polymer Science. 1997; 65: 373-380.

Lippert F, Parker DM, Jandt KD. In Vitro demineralization/remineralization cycles at human tooth enamel surfaces investigated by AFM and nanoindentation. Journal of Colloid and Interface Science. 2004; 280: 442-448.

Maia RCC, Franco LO, Stamford TCM, Fukushima K, Porto ALF, Campos-Takaki GM. Chitin produced by *Cunninghamella elegans* (IFM 46109) and applied to wound

healing. *J. Asian Chitin*. 2006; 2: 11-20.

Mauricio A, Domaneschi C, Migliari DA, Ou Migliari D. Hipertrofia da glândula salivar sublingual em indivíduos desdentados total ou parcial: um estudo pareado. *Revista da Pós-Graduação, FOU SP, São Paulo, SP*. 2003; 10: 277.

Mavropoulos E. A hidroxiapatita como absorvedor de metais. Dissertação de Mestrado. Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública. 1999;105.

Melo N, Jorge JJ. Quantificação e Identificação de *Candida spp.* em saliva total de pacientes HIV positivos- estudo longitudinal. In: Tese de Mestrado apresentada ao curso de Biologia e Patologia Buço-Dental, Faculdade de Odontologia de Piracicaba UNICAMP. 1999; 72p.

Melo LSA, Araújo RE, Freitas AZ, Zezell D, Vieira ND, Girkin J, Hall A, Carvalho AS, Gomes L. Evaluation of enamel dental restoration interface by optical coherence tomography. *J. Biomedical Optics*. 2005; 10(6):064027–5.

Mickenausch S, Yengopal V, Bonecker M, Leal SC, Bezerra ACB, Oliveira LB. Minimum Intervention (MI) - A New Approach in Dentistry. 1st. ed. Jonnesburg: Midentistry corp. 2006; 135 p.

Migliari DA, O. Migliari DYY. et al. New in vitro model for the acquired enamel pellicle: pellicles formed from whole saliva show inter-subject consistency in protein composition and proteolytic fragmentation patterns. *Journal of Dental Research*. 2001; 80(1): 385-388.

Migliari DA. Ou Migliari D, Birman EG, Tedesco D. Análise do fluxo salivar não-estimulado em portadores da síndrome da ardência bucal. In: XXVIII Jornada Brasileira de Estomatologia. 2002; Curitiba, 94p.

Migliari DA Ou Migliari D, Sugaya NN, Hirota SK. et al. Patient's life after treatment of minor salivary gland neoplasms. In: 7th Biennial Congress of the European

Association of Oral Medicine, 2004, Berlin, Alemanha. Annals of the 7th Biennial Congress of the European Association of Oral Medicine. 2004; p. 86-86.

Mjör IA, Fejerskov O. Embriologia e Histologia oral humana. São Paulo, Panamericana. 1990.

Monteiro Júnior AO. Preparação, modificação química e calorimetria do biopolímero quitosana. Tese (doutorado). Universidade Estadual de Campinas- Instituto de Química, Campinas. 1999; 101p.

Murphy J, Riley JP. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analytica Chimica Acta*. 1962; 27:31-36.

Murugan R, Ramakrishna S. Bioresorbable composite bone paste using polysaccharide based nano hydroxyapatite. *Biomater*. 2004; 25:3829 –3835.

Muzzarelli RAA. Chitin, ed. Pergamon Press. Ancona, Italy. 1977; p.305.

Neto BB, Scarminio IS, Bruns RE. Como fazer experimentos. Cap. 2 – Como comparar duas médias. Editora: Unicamp, 2007; 91p.

Nunthanid J, et al. Drug development and Industrial Pharmacy, 2001; 27:143-157.

Ogawa CA. Compósitos hidroxiapatita: colágeno. Preparação, caracterização e estudos em liberação controlada de ciprofloxacina. Dissertação de Mestrado Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo. 2002; 106p.

Okawa Y, Kobayashi M, Suzuki AB, Suzuki S, Suzuki M. Comparative Study of protective effects of chitin, chitosan, and N-acetyl chitohexaose against *Pseudomonas aeruginosa* and *Listeria monocytogenes* infections in mice. *Biol. Pharm. Bull.* 2003; 26:902-904.

Olmez SS, Korkusuz P, Bilgili H, Senel S. Chitosan and alginate scaffolds for bone

tissue regeneration. *Pharmazie*. 2007; 62: 423-31.

Ornum JV. *Infofish Int*. 1992; 6: 48-52.

Otobe IF, Sousa SOM, Matthews RW et al. Successful treatment with topical tetracycline of oral white sponge nevus occurring in a patient with systemic lupus erythematosus. *International Journal of dermatology*, Reino Unido. 2006; 45: 1130-1131.

Park JH, Kwon S, Nam, J-O, Park R-W, Chung H, Seo SB, Kim I.-S, Kwon I.C, Jeong SY. *Journal of Controlled Release*. 2004; 95:579.

Pawtłowska E. The assessment of influence of chitosan on the dental pulp in rats. In: Domard A, Roberts GAF, Varum KM. *Advances in chitin science*. Lyon: Jacques Andre Publishers. 1997; 705-710.

Peter MG, *JMS- Pure Appl. Chem*. 1995; 4: 629-640.

Pereira TB, Sousa FB. Dissecção de lesões cáries: nova técnica de estudo histopatológico tridimensional. *Pesquisa Odontológica Brasileira*, São Paulo. 2002; 16 (2): 151-156.

Pochanavanich P, Suntornsuk W. Fungal chitosan production and its characterization. *Let. Appl. Microbiol*. 2002; 35:17-21.

Queiroz CS. Modelos de estudos in vitro para avaliar o efeito do fluoreto na desmineralização e remineralização do esmalte e dentina. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.- Piracicaba, SP. 2004; 68p.

Ramires-Romero ACD et al. Microabrasão do esmalte dental (ameloplastia) em fluorose severa. In: *Odontopediatria: resoluções clínicas*. Curitiba. 2000; Cap. 3: 109-114.

Raymond L, Morinet FG, Marchessault RH. Degree of deacetylation of chitosan using conductometric titration and solid-state NMR. *Carbohydrate Research*. 1993; 246: 331-336.

Ribeiro MA, Langer Filho ST. Avaliação da microdureza do esmalte dental, submetido ao peróxido de carbamida a 16%, com e sem aplicação de fluoreto de sódio a 0,05%. UNIVALI – Universidade do Vale do Itajaí – Santa Catarina. 2003.

Rinaudo M. Chitin and chitosan: properties and applications *Prog Polym*. 2006; 31: 603-632.

Riordan PJ. Dental fluorosis decline after changes to supplement and toothpaste regimens. *Comm. Dent Oral Epidemiol*. 2002; 30 (3): 233-240.

Roberts GAF. *Chitin Chemistry*. The Macmillan Press, London. 1992; 368p.

Romano AR, Torriani DD. Diagnóstico de Cárie nos Dentes Anteriores e o Tratamento da Lesão Inicial em Esmalte. In: Busato et al. *Dentística restaurações em dentes posteriores*. São Paulo: Artes Médicas. 1996; 35-52.

Sano H, Shibasaki K, Matsukubo T. Effect of molecular mass and degree of deacetylation of chitosan on adsorption of streptococcus sobrinus 6715 to saliva treated hydroxyapatite. *Bull. Tokyo dent. Coll*. 2002; 43 (2):75-82.

Sano H, Shibasaki R, Matsukubo T, Takaesu Y. Effect of chitosan rinsing on reduction of dental plaque formation. *Bull. Tokyo Dent. Coll*. 2003; 44:9-16.

Santos JE, Soares JP, et al, *Polímeros: Ciência e tecnologia*. 2003; 13 (4): 242-249.

Sezer AD, Hatipoglu F, Cevher E, Ogurtan Z, Bas AL, Akbuga J. Chitosan film containing fucoïdan as a wound dressing for dermal burn healing: preparation and in vitro/in vivo evaluation. *Pharm Sci Tech*. 2007; 24:39.

Shigemaza Y, Matura H, Sashiva H, Saimoto H. An improved IR spectroscopic determination of degree of deacetylation of hitin, in *Advances in Chitin Science*, Vol I, ed by Domard A, Jeuniau C, Muzzarelli RAA and Roberts G, Jacques André' Publishers, Lyon, France. 1996; pp 204–209.

Signini R, Desbrièresb J, Campana-Filho SP. *Carbohydrate Polymers*. 2000; 43: 351-357.

Signini R. Estudo das relações estruturas/propriedades de quitina e quitosana Tese (Doutorado em Físico-Química) – Instituto de Química de São Carlos- USP- São Paulo. 2002.

Silva MCF, Stamford TCM, Franco LO, Campos-Takaki GM. *Asian Chitin J*. 2006; 2: 29.

Spalding M. Estudo “in vitro” do aspecto morfológico da superfície do esmalte e alteração na permeabilidade dentária após clareamento. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Bauru. USP – Bauru. 2000; 140p.

Stamford TCM, Stamford TLM, Stamford NP, NETO BB, Campos-Takaki GM. Growth of *Cunninghamella elegans* UCP 542 and production of chitin and chitosan using yam bean medium *Elect. J. Biotech*. 2007; 10:15.

Synowiecki J, Al-Khatteb NAA. Production, properties, and some new applications of chitin and its derivatives. *Crit. Rev. Food Sci. Nut*. 2003; 43:144-171.

Tachibana TV, Braga S, Sobral MAP. Ação dos dentifrícios sobre a estrutura dental após imersão em bebida ácida - estudo in vitro. *Ciência Odontológica Brasileira Brazilian Dental Sceince*, São José dos Campos. 2006; 9 (2): 48-55.

Tagliaferro EPS. Avaliação in vitro da associação de laser de CO2 e flúor fosfato acidulado na inibição da progressão de cárie em esmalte de dentes decíduos. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de

Odontologia de Piracicaba. Piracicaba, SP. 2004. 73p.

Tarsi R, Corbin B, Pruzzo C, Muzzarelli RAA. Effect of low-molecular-weight chitosans on the adhesive properties of oral streptococci. *Oral Microbiol Immunol.* 1998; 13: 217-224.

Tedesco D, Migliari DA Ou Migliari D, Birman EG. Fluxo salivar não-estimulado, proteínas salivares em portadores da síndrome de ardência bucal. *Águas de Lindóia-SP. Brazilian Oral Research.* 2004; 18:240-240.

Ten Bosch JJ, Angmar-Månsson B. A review of quantitative methods for studies of mineral content of intra-oral incipient caries lesions. *J Dent Res.* 1991; 70(1): 2-14.

Ten Cate JM, Duijsters PPE. Alternating demineralization and remineralization of artificial enamel lesions. *Caries Res.* 1982; 16(3): 201-10.

Ten Cate JM. *Oral histology: development structure and function.* 5 ed. St. Louis, Mosby. 1998.

Tharanathan RN, Kittur FS. Chitin-The Undisputed Biomolecule of Great Potential. *Critical Rev. Food Sci. Nutrit.* 2003; 43:61 –87.

Thylstrup A, Fejrskov O. *Cariologia Clínica.* 2ed. São Paulo: Santos. 1995; 111-157.

Tonhi E, Plepis AMG. Obtenção e Caracterização de Blendas Colágeno-quitosana. 2002; 25: 943-948.

Uceda N, Müller AP et al. Tratamento para pacientes xerostômicos: Revisão da literatura. São Paulo. *Revista de Pós-Graduação.* 2000; 7: 40.

Velásquez CL. *Revista Iberoamericana de Polímeros.* 2003; 4(2), 91.

Vivek DS, Torres JA. *Biotechnol. Prog.* 2000; 16:1091.

Wainwright WW. The permeability of human dental root structures to radioactive iodine. *J. Perodontol.* 1951; 23: 95-102.

Wang XJ, Milner TE, Boer JF, et al. Characterization of dentin and enamel by use of optical coherence tomography. *Applied Optics.* 1999; 38(10): 2092-2096.

Weyne SC, Harari SG. Cariologia: Implicações e aplicações clínicas. In: Baratieri L.N. et al. *Odontologia Restauradora: fundamentos e possibilidades.* São Paulo: Santos. 2001; Cap1, p.1-30.

White DJ. The application of in vitro models to research on demineralization and remineralization of the teeth. *Adv Dent Res.* 1995; 9(3): 175-93.

Wongpanit P, Tabata Y, Rujiravanit R. Miscibility and Biodegradability of Silk Fibroin/Carboxymethyl Chitin Blend Films. *Macromol Biosci.* 2007;1.

Yadav AV, Bhise SB. Chitosan: a potencial biomaterial effective against typhoid. *Cur. Sci.* 2004; 87:1176-1178.