



UNIVERSIDADE
DO BRASIL

UFRJ

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

MICHELE VILLARDI

ESTUDO DE DESENVOLVIMENTO DE NOVOS NANOSSISTEMAS LAMELARES E
SUA AÇÃO INIBITÓRIA SOBRE CEPAS DE *S. MUTANS* E *C. ALBICANS* VISANDO
A PREVENÇÃO DE PATOLOGIAS BUCAIS

RIO DE JANEIRO

2010

Michele Villardi

ESTUDO DE DESENVOLVIMENTO DE NOVOS NANOSSISTEMAS LAMELARES E
SUA AÇÃO INIBITÓRIA SOBRE CEPAS DE *S. MUTANS* E *C. ALBICANS*
VISANDO A PREVENÇÃO DE PATOLOGIAS BUCAIS

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia,
Universidade Federal do Rio de Janeiro, como
requisito parcial à obtenção do título de
Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador:

Prof. Dr. Lúcio Mendes Cabral

Dr. Helvécio Vinícius Antunes Rocha

Laboratório de Tecnologia Industrial Farmacêutica

RIO DE JANEIRO

2010

V719e

Villardi, Michele.

Estudo de desenvolvimento de novos nanossistemas lamelares e sua ação inibitória sobre cepas de *S.mutans* e *C.albicans* visando a prevenção de patologias bucais/ Michele Villardi; orientadores Lucio Mendes Cabral, Helvécio Vinícius Antunes Rocha. – Rio de Janeiro : UFRJ, Faculdade de Farmácia, 2010.

xvii, 81f. : il. col. ; 30cm.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – UFRJ / Faculdade de Farmácia, 2010.

Inclui bibliografia.

1. Nanotecnologia. 2. Flúor. 3. Antimicrobianos.

I. Cabral, Lucio Mendes. II. Rocha, Helvécio Vinícius Antunes.

III. Título.

CDD 615.19

Michele Villardi

ESTUDO DE DESENVOLVIMENTO DE NOVOS NANOSSISTEMAS LAMELARES E
SUA AÇÃO INIBITÓRIA SOBRE CEPAS DE *S. MUTANS* E *C. ALBICANS*
VISANDO A PREVENÇÃO DE PATOLOGIAS BUCAIS

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisitos parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em:

(Lúcio Mendes Cabral, DSc - UFRJ)

(Helvécio Vinícius Antunes Rocha, DSc – Farmanguinhos/FIOCRUZ)

(Carlos Rangel Rodrigues, DSc - UFRJ)

(Marcelo de Pádula, DSc - UFRJ)

(Lucianne Cople Maia de Faria, DSc - UFRJ)

Dedico esse trabalho a minha mãe, meu pai, meu irmão e minha madrinha que com muito carinho, compreensão e amor sempre estiveram ao meu lado, acreditando em mim.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por colocar em meu caminho pessoas tão especiais.

À minha mãe, Elizabeth, pelo amor, carinho, compreensão e pelo colo tão confortante. Muito obrigada por estar por perto em todos os momentos da minha vida e por acreditar em mim! Agradeço ao meu pai, Miguel, pelo amor e apoio que sempre me deu ao longo da minha vida. Amo vocês!

Ao meu irmão, Miguel, que é um grande amigo, companheiro e conselheiro além de ser um irmão maravilhoso.

À minha madrinha, Tereza, que além de ser tia, madrinha e mãe ainda consegue ser uma amiga leal e dedicada que me orienta nos assuntos da vida e a quem eu tenho muito a agradecer por ser maravilhosa.

Às minhas avós, Alair e Lourdes, que sempre foram excelentes!

À toda a família, entre tios e primos, por se fazerem presentes. E ao meu Padrasto, Almir, pelo apoio, carinho e paciência.

Ao meu orientador Lucio Cabral que acreditou e confiou em mim e a quem devo muitas conquistas na minha vida. Muito obrigado por tudo.

Ao meu orientador Helvécio Rocha pela paciência e orientação ao longo desse trabalho.

Aos meus amigos de laboratório: Alex Silva, Ana Paula Rodrigues, Arídio Mattos, Carolina Pupe (Carol), Cide Dantas, Daniel Savignon, Flávia Almada, Jaqueline Villaça, Karla Andrade, Lidiane Mota, Luisa Falcão (Lulu, minha estagiária 1000!!!), Luiz Cláudio Rodrigues(Lula), Maísa Teodoro, Maíra Assis, Marcela Braga, Marcos Giovane, Rachel Souza, Tarek Saad, Thiago Honório, Túlio Elisiário, que me ajudaram e me ensinaram muito sobre tecnologia farmacêutica, a amizade que tiveram por mim foi instrumento essencial para essa conquista. Aos amigos que eram do Laboratório Ilidio Afonso e Uiaran Magalhães (Uil) obrigada pelo carinho.

À todos os professores da pós Graduação em Ciências Farmacêuticas que muito me ensinaram ao longo do curso, em especial, à minha banca de acompanhamento, Patrícia Zancan e Carlos Rangel, por acompanharem esse trabalho, sempre com sugestões relevantes, que muito ajudaram no andamento do projeto.

Aos colaboradores, Professor Mauro Solla-Pena da Faculdade de Farmácia da UFRJ, Grupo do LabCQ/Faculdade de Farmácia/UFRJ , IMA/UFRJ pelo apoio ao trabalho.

Aos Colaboradores do LEES/Farmanguinhos, Altivo Pitalunga e Rafael Seiceira pelas análises.

Aos colaboradores do laboratório de Bioprodutos/ Farmanguinhos, Professora Elisabeth Sanches, Patrícia Ferreira, Kátia Novellino, Rosilene Riente, Maria

Augusta de Jesus e Ariane Ribeiro, muito obrigada pelo carinho com que me receberam.

Ao grupo da Odontopediatria da UFRJ Professora Lucianne Cople Maia, Professora Maristela Portela, Andréa Antônio e Viviane Pierro obrigada pela colaboração e apoio a esse projeto. À Viviane obrigada pelo carinho e paciência que teve para fazer a correção.

Às minhas amigas de longa data: Carla Cristina Moro, Daniela Carvalho e Flávia Ruivo que me acompanham durante a faculdade e estão “sempre a postos” para me escutar, me orientar e me apoiar. Obrigada pela amizade de vocês! Sem esquecer do meu amigo Evandro, que por conta da Dan, também acaba por me aturar... muito obrigada por ser um grande amigo!!!

À minha amiga Érika Windisch por sempre estar presente para me dar um “puxão de orelha”, me orientar, e me dar excelentes conselhos na vida. Ao longo de tantos anos de amizade passei por bons e maus momentos, e em todos eles, eu sempre pude contar com você.

À minha amiga de infância Tatiana Polito, que mesmo com minha ausência durante esse tempo sempre guardou nossa amizade, preservando com muito carinho. Muito obrigada pela paciência! E à sua família, com quem passei ótimos momentos desde as tardes em Unamar até atuais e raros encontros, obrigada por me acolher.

À amiga Carolina Garrastazu que mesmo estando na minha vida há pouquinho tempo participou da pior parte desse trabalho, o estresse da entrega...Obrigada pela paciência e carinho.

Às amigas da especialização em Odontopediatria/UFRJ, Beatriz Furtado, Karla Fanchini, Renata Puetter, pelo apoio e amizade no início deste projeto de mestrado.

À CAPES pelo apoio financeiro durante o projeto.

Obrigada a todas as pessoas que fizeram, de alguma forma, parte do meu crescimento pessoal e profissional e que por ventura não tenha citado.

“A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original”

(Albert Einstein)

RESUMO

VILLARDI, Michele. Estudo de desenvolvimento de novos nanossistemas lamelares e sua ação inibitória sobre cepas de *S. mutans* e *C. albicans* visando a prevenção de patologias bucais. Rio de Janeiro, 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

As doenças de origem microbiana que acometem a cavidade bucal são hoje uma preocupação de saúde pública, entre elas pode-se citar a cárie, a doença periodontal e a candidíase bucal em suas diferentes formas. Na busca de antimicrobianos mais eficazes, a nanotecnologia é uma grande aliada, com o qual procura-se conseguir melhores propriedades para um fármaco contornando efeitos indesejados quanto a sua utilização. A montmorilonita de sódio (MMT) é um silicato lamelar largamente utilizado no desenvolvimento de nanossistemas, sendo para isso explorada sua capacidade de troca catiônica (CTC). Entre possíveis arranjos geométricos que o silicato lamelar pode apresentar, a organização de diferentes moléculas entre suas lamelas foi a explorada nesse estudo, no qual o tetrafluoreto de titânio, o gluconato de clorexidina e a nistatina, foram intercaladas em processos individualizados. Os experimentos de intercalação foram conduzidos com 60%, 80% e 100% da substância química estudada em relação a CTC em tempos reacionais que variaram em 1, 18, 24 e 48 h, e ao final, os derivados obtidos foram caracterizados por DRX, DSC e FTIR. A atividade antimicrobiana preliminar dos nanossistemas foi avaliada em análise de halo de inibição frente as cepas de *S. mutans* e *C. albicans*. Para caracterizar os nanossistemas as análises de DRX e FTIR foram as mais adequadas para a seleção da melhor condição de intercalação de cada substância química testada, mostrando-se condizentes com o processo de intercalação. Dos derivados produzidos e testados quanto sua atividade antimicrobiana o nanossistema de gluconato de clorexidina foi o que apresentou melhor resultado frente a análise de halo de inibição. Os nanossistemas de tetrafluoreto de titânio e de nistatina também apresentaram características promissoras, embora não tenham uma atividade antimicrobiana na análise realizada, sendo necessários novos testes com esses derivados.

ABSTRACT

VILLARDI, Michele. Development of new lamellar nanosystems and their inhibitory action against *S. mutans* and *C. albicans* strains aiming buccal pathologies prevention. Rio de Janeiro, 2010. Thesis (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

Nowadays microbial diseases that affect buccal cavity are a public health concern, among them are caries, periodontal disease and buccal candidiasis in its different forms. In search for more effective antibiotics, nanotechnology is a great ally, which aims to achieve better properties for pharmaceuticals overcoming undesirable effects associated to their utilization. In this way, sodium montmorillonite is a lamellar silicate widely used in nanosystems development, exploring its cation exchange capacity (CEC). Among possible geometric arrangements that lamellar silicate can assume, different molecules organization between its lamellae was explored in this study, where titanium tetrafluoride, chlorhexidine gluconate and nystatin were intercalated under individualized processes. Intercalation experiments were conducted with 60%, 80% and 100% of studied chemical in relation to CEC in different reaction times of 1, 18, 24 and 48 h, and finally, the obtained derivatives were characterized by XRD, DSC and FTIR. Preliminary antibiotic activity were evaluated by inhibition halo analysis against *S. mutans* and *C. albicans* strains, accessing new nanosystems effectiveness. Characterization by XRD and FTIR was the more suitable analysis for nanosystems to select the best intercalation condition of each titanium tetrafluoride, chlorhexidine gluconate and nystatin. Chlorhexidine gluconate nanosystems presented the most promissory result among tested chemical. Titanium tetrafluoride and nystatin nanosystems also presented promissory characteristics, although they have not demonstrated immediate antibiotic activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura da bactéria	21
Figura 2. Biofilme dental	21
Figura 3. Aspecto esquemático do biofilme dental	22
Figura 4. Via glicolítica e ação da enolase	23
Figura 5. Doença cárie	26
Figura 6. Aspecto da mancha branca ativa	26
Figura 7. Representação esquemática da gengivite, da periodontite e da periodontite avançada	28
Figura 8. Várias formas clínicas da candidíase	29
Figura 9. Estrutura química da nistatina	32
Figura 10. Estrutura química da clorexidina	38
Figura 11. Proporções da escala nanométrica	40
Figura 12. Tipos de estruturas assumidas por nanocompósitos de argila	41
Figura 13. Estrutura básica da Montmorilonita	42
Figura 14. Estudos de modelagem molecular que simulam as substituições isomórficas da montmorilonita de sódio mostrando seu espaçamento interlamelar e seu preenchimento por sódio e água	43
Figura 15. Confeção de poços para a análise de halo de inibição	56
Figura 16. Reta de calibração obtida de solução de fluoreto de sódio em água Milli-Q	58
Figura 17. Linearidade das soluções de MFP	59
Figura 18. Linearidade das soluções de tetrafluoreto de titânio	59
Figura 19. Padrão de difração da montmorilonita de sódio e seus derivados de tetrafluoreto de titânio, 60% em relação a CTC em diferentes tempos reacionais	62
Figura 20. Padrão de difração da montmorilonita de sódio e seus derivados de tetrafluoreto de titânio, 80% em relação a CTC em diferentes tempos reacionais	62

Figura 21. Padrão de difração de montmorilonita de sódio e seus derivados de tetrafluoreto de titânio, 100% em relação a CTC em diferentes tempos reacionais	63
Figura 22. Padrão de difração da triplicata do derivado A1 referente a intercalção de montmorilonita de sódio com tetrafluoreto de titânio em tempo reacional de 1 h	65
Figura 23. Curva de DSC da montmorilonita de sódio não intercalada, tetrafluoreto de titânio isoladamente, a mistura física simulando 60% CTC e o derivado A1	66
Figura 24. Espectroscopia de infravermelho da montmorilonita de sódio não intercalada, tetrafluoreto de titânio isoladamente, mistura física simulando 60% da CTC e o derivado A1	67
Figura 25. Padrão de difração dos nanocompósitos de montmorilonita de sódio (MMT) com gluconato de clorexidina, 60% em relação a CTC nos diferentes tempos. reacionais estudados	70
Figura 26. Padrão de difração dos nanocompósitos de montmorilonita de sódio (MMT) com gluconato de clorexidina, 80% em relação a CTC nos diferentes tempos. reacionais estudados	70
Figura 27. Padrão de difração dos nanocompósitos de montmorilonita de sódio (MMT) com gluconato de clorexidina, 100% em relação a CTC nos diferentes tempos. reacionais estudados	71
Figura 28. Reta de calibração da clorexidina	72
Figura 29. Padrão de difração da triplicata do derivado C3 referente à intercalção de montmorilonita de sódio com gluconato de clorexidina em tempo reacional de 24 h	74
Figura 30. Curva de DSC da montmorilonita de sódio não intercalada, gluconato de clorexidina liofilizado, a mistura física simulando 60% CTC e o derivado C3	75
Figura 31. Espectroscopia de infravermelho da montmorilonita de sódio não intercalada, gluconato de clorexidina liofilizado, mistura física simulando 60% da CTC e o derivado C3	76
Figura 32. Padrão de difração da montmorilonita de sódio (MMT) e seus derivados de Nistatina, 60% em relação a CTC em diferentes tempos reacionais	77
Figura 33. Padrão de difração da montmorilonita de sódio (MMT) e seus derivados de Nistatina, 80% em relação a CTC em diferentes tempos reacionais.	78

Figura 34. Padrão de difração da montmorilonita de sódio (MMT) e seus derivados de Nistatina, 80% em relação a CTC em diferentes tempos reacionais.	78
Figura 35. Reta de calibração da Nistatina	80
Figura 36. Padrão de difração da triplicata N3 referente à intercalação de montmorilonita de sódio com nistatina em tempo reacional de 24 h	80
Figura 37. Curva de DSC da montmorilonita de sódio e nistatina mostrando seu comportamento isoladamente, a mistura física simulando 60% CTC e o derivado N3	81
Figura 38. Espectroscopia de infravermelho da montmorilonita de sódio não intercalada, nistatina, mistura física simulando 60% da CTC e o derivado N3	82
Figura 39. Consumo de glicose e produção de lactato da Cepa de <i>Streptococcus mutans</i> frente às soluções fluoretadas	84
Figura 40. Consumo de glicose e produção de etanol das Cepas de <i>Candida albicans</i> frente às soluções fluoretadas	85
Figura 41. Análise de halo de inibição das cepas de <i>S. mutans</i>	88
Figura 42. Análise de halo de inibição das cepas de <i>C. albicans</i>	90

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Formas clínicas das candidíases bucais	30
Quadro 2. Concentrações das soluções fluoretadas e suas formas comerciais	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Experimentos de intercalação de montmorilonita de sódio com tetrafluoreto de titânio	49
Tabela 2. Experimentos de intercalação de montmorilonita de sódio com gluconato de clorexidina	50
Tabela 3. Experimentos de intercalação de montmorilonita de sódio com nistatina	51
Tabela 4. Características das soluções fluoretadas para a análise da atividade antimicrobiana de substâncias fluoretadas	57
Tabela 5. Espaçamento interlamelar dos derivados fluoretados	64
Tabela 6. Espaçamento interlamelar dos derivados de clorexidina	72
Tabela 7. Espaçamento interlamelar dos derivados de nistatina	79
Tabela 8. Medida (em mm) do halo de inibição frente às cepas de <i>S. mutans</i> em diferentes técnicas de plaqueamento	87
Tabela 9. Medida (em mm) do halo de inibição frente às cepas de <i>C. albicans</i> em diferentes técnicas de plaqueamento	89

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP: Adenosina difosfato

ATP: Adenosina trifosfato

BHI: Brain heart infusion

C. albicans: *Candida albicans*

C. guilliermondi: *Candida guilliermondi*

C. krusei: *Candida krusei*

C. parapsilosis: *Candida parapsilosis*

CPOD: Dente cariado, perdido e obturado

CTC: Capacidade de troca catiônica

C. tropicalis: *Candida tropicalis*

DRX: Difração de raios-x

DSC: Calorimetria exploratória diferencial

DTG: Curva termogravimétrica derivada

FTIR: Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier

IMA: Instituto de Macromoléculas professora Eloisa Mano

LabECoM: Laboratório de Enzimologia e Controle de Metabolismo

MET: Microscopia eletrônica de transmissão

MF: Mistura física

MFP: Monofluorofosfato de sódio

MMT: Montimorilonita

OMS: Organização Mundial de Saúde

OPAS: Organização Pan Americana de Saúde

PEP: Fosfoenolpiruvato

pH: Potencial de Hidrogênio

S. mutans: *Streptococcus mutans*

TISAB: Tampão de ajuste total de força iônica

TG: Curva termogravimétrica

TGA: Análise termogravimétrica

UFRJ: Universidade Federal do Rio de Janeiro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 SAÚDE PÚBLICA	18
1.2 BIOFILME DENTAL	20
1.3 CÁRIE	25
1.4 DOENÇA PERIODONTAL	26
1.5 CONTROLE DO BIOFILME	28
1.6 CANDIDÍASE BUCAL	29
1.7 ALTERNATIVAS TERAPÊUTICAS PARA CONTROLE DE INFECÇÕES MICROBIANAS DA CAVIDADE BUCAL	31
1.7.1 Nistatina	31
1.7.2 Uso de substâncias fluoretadas	33
1.7.2.1 Tetrafluoreto de titânio	37
1.7.3 Clorexidina	38
1.7 NANOTECNOLOGIA	40
1.8.1 Silicatos lamelares	41
1.8.2 Novos derivados	43
2 OBJETIVO	45
3 MATERIAL E MÉTODOS	46
3.1 PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DAS SOLUÇÕES FLUORETADAS	46
3.1.1 Preparo das soluções fluoretadas	46
3.1.2 Caracterização das soluções fluoretadas	47
3.1.2.1 Doseamento de fluoreto	47
3.1.2.2 Medida de pH	48
3.2 ESTUDO DE INTERCALAÇÃO DE TETRAFLUORETO DE TITÂNIO EM MONTMORILONITA DE SÓDIO	48

3.3 ESTUDO DE INTERCALÇÃO DE GLUCONATO DE CLOREXIDINA EM MONTMORILONITA DE SÓDIO	49
3.4 ESTUDO DE INTERCALÇÃO DE NISTATINA EM MONTMORILONITA DE SÓDIO	50
3.5 CÁLCULO DE RENDIMENTO DO PROCESSO DE INTERCALAÇÃO	51
3.6 CARACTERIZAÇÃO DOS NOVOS DERIVADOS	52
3.6.1 Difração de Raios-x	52
3.6.2 Calorimetria exploratória diferencial	53
3.6.3 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier	53
3.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	54
3.7.1 Análise do consumo de glicose	54
3.7.2 Medida de Halo de inibição	55
3.8 TRATAMENTO ESTATÍSTICO	56
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
4.1 PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DAS SOLUÇÕES FLUORETADAS	57
4.2 CARACTERIZAÇÃO DOS NOVOS DERIVADOS NANOMÉTRICOS	61
4.2.1 Derivados de intercalação de tetrafluoreto de titânio em montmorilonita de sódio	61
4.2.2 Derivados da intercalação de gluconato de clorexidina em montmorilonita de sódio	69
4.2.3 Derivados de intercalação de nistatina em montmorilonita de sódio	77
4.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	82
4.3.1 Análise do consumo de glicose	82
4.3.2 Análise de halo de inibição	86

5 CONCLUSÃO	91
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93

1 INTRODUÇÃO

1.1 SAÚDE PÚBLICA

Em muitos países das Américas há alta prevalência de cárie, atingindo aproximadamente 90% das crianças em idade escolar. Isto é um reflexo da falta de estratégia de saúde bucal (OPAS, 2005).

No Brasil, o modelo assistencial odontológico público tem-se caracterizado por um atendimento cirúrgico-restaurador dos sinais das doenças bucais, sendo as mais prevalentes a cárie e a doença periodontal. Isso indica que o modelo assistencial brasileiro baseia-se em uma odontologia curativa e não preventiva (CHAVES e VIEIRA-DA-SILVA, 2002).

Estudos controlados realizados na década de 70 indicaram a pouca efetividade da atenção convencional baseada apenas no tratamento restaurador, que implica na remoção do tecido cariado e substituição da estrutura dentária perdida. Além disso, as medidas preventivas que acompanhavam essa intervenção não eram suficientes para observar uma redução de cárie (CHAVES e VIEIRA-DA-SILVA, 2002).

Frente aos relatórios apresentados pelas regionais da OPAS (Organização Pan Americana de Saúde) nos países da América, que mostraram a prevalência e gravidade da cárie e a inexistência de programas de prevenção, e à intenção de ajudar a criar novos programas preventivos e fortalecer os já existentes, a OPAS lançou uma nova estratégia para programas de prevenção de cárie baseada na fluoretação da água e do sal (OPAS, 2005).

Os resultados dos relatórios destes projetos indicam que, embora a fluoretação da água tenha sido altamente eficaz, a falta de sistemas adequados de distribuição de água nas regiões, especialmente nas zonas rurais, tornava difícil a implementação de programas nacionais de fluoretação da água (OPAS, 2005).

Em 1994, o programa de saúde bucal da OPAS começou a desenvolver uma estratégia através da avaliação de experiências de países que tinham lançado a fluoretação do sal, programas estes de meados da década de 1980. Destacou-se

um programa piloto lançado no final da década de 1980 pela Universidade do Estado do Rio de Janeiro, em cinco municípios do noroeste do estado do Rio de Janeiro (OPAS, 2005).

Essa estratégia surge como um novo programa de prevenção, e isso pode ser observado em um levantamento realizado pela OPAS no período entre 1980 à 2004, no qual avaliava-se o índice de CPOD (número de dentes Cariados, Perdidos e Obturados) em crianças de 12 anos. Nesse período já se observava indícios de uma redução no índice de CPOD, sendo que no Brasil, ao final de 1996, encontrava-se uma redução anual de aproximadamente 7,47% da prevalência de cárie (OPAS, 2005).

O índice CPOD compreende elementos dentários cariados, perdidos e obturados e é um índice proposto pela OMS (Organização Mundial de Saúde), sendo empregado mundialmente (NARVAI, 2000).

No Brasil, a mudança de paradigmas com a implementação de programas preventivos em higiene bucal e atenção efetiva do odontólogo, contribuindo inclusive para redução das perdas dentárias e adequação dos produtos de uso da cavidade bucal, converge em uma atuação profissional mais voltada para prevenção e promoção de saúde, além de melhorar os indicadores sócio-econômicos do país em geral. Ainda assim, a doença cárie continua sendo uma preocupação de saúde pública, envolvendo profissionais da área (ANDREOLI e LARA, 2004).

A postura dogmática de que as doenças bucais limitam-se à cavidade bucal obstrui a compreensão da saúde como um todo, muito discutida nas últimas décadas, essa compreensão percebe que as doenças infecciosas bucais podem levar a patologias sistêmicas (ANDREOLI e LARA, 2004).

Atualmente, existe no Brasil um programa do Ministério da Saúde focado na melhoria da saúde bucal, chamado Brasil Sorridente (<http://portal.saude.gov.br>). Isso demonstra uma conscientização, mesmo que inicial, da prevenção e promoção da saúde bucal.

1.2 BIOFILME DENTAL

A superfície dental é a única superfície corporal dura que adsorve seletivamente glicoproteínas ácidas, provenientes da saliva, as quais formam uma película na superfície do esmalte, denominada película adquirida (LOESCHE, 1986). Quando uma superfície limpa do dente está exposta à saliva, um filme de proteína, a película adquirida, é rapidamente depositado antes da formação do biofilme (SKARTVEIT e colaboradores, 1990).

Essa película é uma camada amorfa membranosa que varia de 0,1 a 3,0 μm de espessura e contém um grande número de grupos sulfato e carboxila em sua superfície, deixando a mesma carregada negativamente. Como as bactérias possuem carga líquida também negativa, existe uma repulsa inicial entre a superfície dentária e as bactérias presentes na cavidade bucal (LOESCHE, 1986).

Esse mecanismo de defesa inato decompõe-se quando ocorre a formação da placa bacteriana, também denominada biofilme dental, existindo muitas teorias para essa formação (LOESCHE, 1986). Cátions polivalentes presentes na cavidade bucal podem tornar o esmalte mais carregado positivamente e, conseqüentemente, aumentar a captura de materiais para essa película. Essa alteração na composição da película pode posteriormente influenciar a adsorção inicial de bactérias e, assim, ocorre a formação do biofilme dental (SKARTVEIT e colaboradores, 1990).

Após a primeira colonização bacteriana, o biofilme acumula novos microorganismos pela coagregação, de mesma espécie ou espécie diferente, utilizando mecanismos e estruturas como glicocálice, adesinas, pili, além da produção da matriz polissacarídea extracelular (Figura 1, página 21) (BARBIERI, 2005).

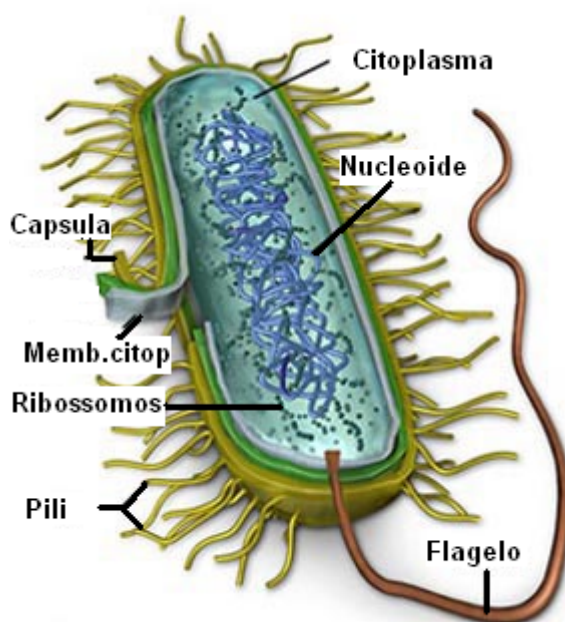


Figura 1: Estrutura da bactéria e elementos atuantes na coagregação (Adaptado de: <http://ciencia.blogas-pt.com/wp-content/uploads/2008/11/bacteria2.jpg>; acessada em 22/06/2009)

Existe um equilíbrio ecológico no biofilme dental (Figura 2, página 21 e Figura 3, página 22) que é fundamental para a manutenção de uma boca saudável. Tal equilíbrio protege o hospedeiro da invasão por bactérias potencialmente causadoras de doenças, entre elas o *Streptococcus mutans* (*S. mutans*), o qual pode estar presente no biofilme dental saudável, mas sob certas circunstâncias pode levar a doença cárie (KRETH e colaboradores, 2008).



Figura 2: Biofilme dental (Adaptada de PREVITALI e SANTOS, 2009)



Figura 3. Aspecto esquemático do biofilme
(Fonte: <http://www.dentalclinic.odo.br/tartaro.asp>; acessada em 08/12/2008)

A partir de moléculas orgânicas e inorgânicas simples do ambiente, as bactérias são capazes de sintetizar novo material celular e dividir-se, dando origem a novos microorganismos. Para estas atividades celulares, enzimas intra e extracelulares degradam açúcares presentes no meio. As bactérias utilizam carboidratos como principal fonte de energia, promovendo a doença cárie por duas maneiras: produzindo polímeros que originam estromas ligando os microorganismos entre si, formando o biofilme dental, e excretando ácidos orgânicos que levam à queda do pH na cavidade oral (NONAKA e colaboradores, 2005).

A sacarose é considerada o mais cariogênico dos carboidratos, podendo funcionar como dissacarídeo fermentável e servir como um substrato para a síntese intracelular de polissacarídeos (KRETH e colaboradores, 2008).

As enzimas necessárias para o metabolismo da sacarose são produzidas por espécies de bactérias acidúricas e acidogênicas, entre elas os *S. mutans*. Além de utilizar a sacarose como fonte energética, as bactérias utilizam-na para predominar no biofilme supra gengival (CARDOSO, REIS e SERRATINE, 2004).

A fosfotransferase é o principal sistema de transporte ativo de açúcares pela membrana citoplasmática de bactérias acidogênicas. A glicose, a frutose e a sacarose unem-se à enzima do sistema de fosfotransferase e, assim, são transportadas para o meio intracelular (CARDOSO, REIS e SERRATINE, 2004).

O transporte da glicose ocorre da seguinte forma: no meio intracelular uma enzima (EI) associa-se a uma proteína (HPr) para fosforilar a glicose que se associa a uma enzima extracelular (EII). Após a interação das duas enzimas o açúcar fosforilado é liberado no interior da bactéria. Uma vez no interior da bactéria a glicose é transformada em glicogênio ou fosfoglicerato, o quais, sob a ação da

enzima enolase, forma o fosfoenolpiruvato (PEP) que resultará em ácido piruvico e 4 ATP. Esse mecanismo é idêntico em todas as bactérias fermentadoras de açúcares (CARDOSO, REIS e SERRATINE, 2004). Esse processo é demonstrado na Figura 4, página 23.

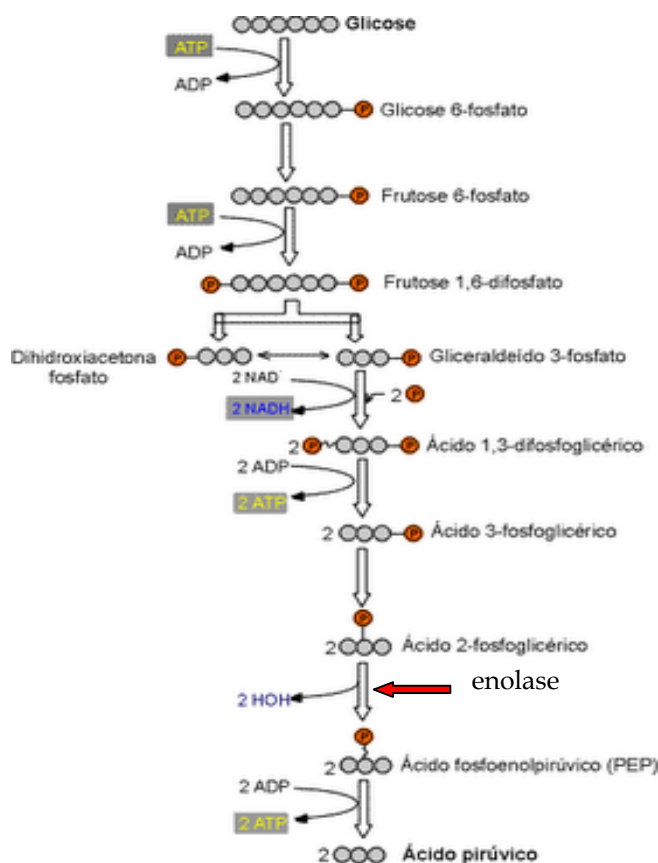


Figura 4: Via glicolítica e ação da enolase (Adaptado de http://1.bp.blogspot.com/417DCAJw-Ss/SduY2gitkl/AAAAAAAAAH-I/Ng_ssYcqreo/s400/glicolise.gif; acessada em 22/06/2008)

Dos quatro ATPs gerados, dois são usados durante a via glicolítica e os outros dois têm suas moléculas quebradas formando ADP e fósforo. O ADP tem sua energia utilizada pela fosfotransferase como também para o transporte de prótons (H^+) para o meio extracelular pela chamada força motriz de prótons. Se o produto final for o piruvato, a via glicolítica segue e este será transformado em ácido láctico que sairá da célula bacteriana juntamente com prótons em um processo denominado efluxo final (CARDOSO; REIS e SERRATINE, 2004).

Algumas bactérias, como por exemplo, o *S. mutans*, possuem duas vias de fermentação e isso dependerá da concentração de açúcar (CARDOSO, REIS e SERRATINE, 2004). Em níveis altos, o principal produto formado é o ácido láctico, através da via enzimática da lactato desidrogenase, como observado nos gêneros

Streptococcus, *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*. Em baixos níveis de açúcares, são preferidas outras vias de conversão enzimática, como a via piruvato formato-liase, resultando na produção de ácido fórmico, ácido acético e etanol como produtos finais (NONAKA e colaboradores, 2005).

O efluxo do produto final e força motriz de prótons são reações que contribuem de forma significativa para a conservação de energia metabólica nas bactérias e para manutenção da homeostase do pH citoplasmático. Quando o pH do meio externo à bactéria está reduzido, o meio intracelular mantém-se neutro através do bombardeamento de prótons para o meio extracelular, o que ocorre pelo efluxo do produto final e da força motriz de prótons. Esse processo de evasão de prótons caracteriza a propriedade acidúrica da bactéria, ou seja, sua capacidade de sobreviver e multiplicar-se em meio ácido (CARDOSO, REIS e SERRATINE, 2004).

Os microorganismos bacterianos exibem habilidades enzimáticas latentes para utilizar não somente a glicose, como também uma grande variedade de açúcares como sacarose, maltose, lactose, frutose e álcoois-açúcares como sorbitol e manitol (NONAKA e colaboradores, 2005). A flora da cavidade bucal abriga também uma grande variedade de fungos, especialmente do gênero *Candida*, além de outras bactérias comensais (ABIRAMI e VENUGOPAL, 2005).

A levedura de *Candida* possui uma morfologia extremamente versátil, pode estar presente no meio bucal sem causar danos, porém frente a fatores predisponentes, como pacientes com baixa imunidade (ABIRAMI e VENUGOPAL, 2005), é capaz de invadir tecidos causando infecções oportunistas, como a candidíase oral (BARBIERI, 2005; YIGIT; AKTAS e AYYILDIZ, 2008), ou até mesmo infecções de mucosa, como as estomatites (YIGIT; AKTAS e AYYILDIZ, 2008).

A *Candida albicans* já foi isolada em biofilme dental (ATES; AKDENIZ e SEN, 2005; YIGIT; AKTAS e AYYILDIZ, 2008), cárie e de bolsas periodontais (ATES; AKDENIZ e SEN, 2005), mas seu papel de coagregação ao *S. mutans* durante o mecanismo de aderência microbiana na superfície dentária ainda não está bem elucidado. Entretanto um estudo *in vitro* realizado por Barbieri (2005) avaliou a capacidade da aderência de cepas de *S. mutans* e *C. albicans* de forma isolada ou em associação, mostrando que esses microorganismos, quando associados,

apresentaram maior aderência à superfície dentária sugerindo que existe uma relação de aderência quando ocorre a associação entre estes microorganismos ricamente presentes na cavidade bucal, sugerindo que esse seria um fator agravante para o risco à doença cárie (BARBIERI, 2005).

1.3 CÁRIE

Os constituintes minerais do esmalte dentário são cristais de hidroxiapatita que se distribuem em forma de prismas de esmalte, que se arranjam formando lacunas, denominadas espaços interprismáticos, que possibilitam a circulação do fluido do esmalte (ASSIS e colaboradores, 1999).

Quando há produção de ácidos, principalmente ácido láctico, decorrente do metabolismo bacteriano, ocorre a saída de cálcio e fosfato dos cristais de hidroxiapatita do esmalte dentário para o fluido circulante entre os prismas, tendo-se com isso, um aumento da concentração desses íons no fluido do esmalte e, por difusão, esses sairão para o meio bucal. Esse processo de perda de cálcio e fosfato do esmalte para o meio bucal chama-se desmineralização. Ao finalizar o desafio cariogênico, no momento em que a concentração de cálcio e fosfato na saliva é maior que no fluido do esmalte, o fluxo de íons torna-se inverso, seguindo agora da saliva para o fluido do esmalte, a esse processo dá-se o nome de remineralização (ASSIS e colaboradores, 1999).

A cárie (Figura 5, página 26), uma das doenças mais prevalentes na cavidade bucal, é de caráter multifatorial sendo, por isso, passível de prevenção bem como controle da sua evolução. Basicamente, pode-se citar quatro fatores, a microbiota, a dieta, o hospedeiro e o tempo, que serão responsáveis pelo equilíbrio entre a estrutura dentária e o meio bucal. Pode-se dizer que existem fatores associados a condição sócio-econômica e cultural do paciente, como também fatores moduladores entre eles composição salivar, nível de higiene bucal, espessura do biofilme e presença ou ausência do flúor no meio bucal, que se somam à presença de microorganismos cariogênicos e dieta rica em carboidratos fermentáveis, que estão diretamente relacionados à doença cárie (SOARES e VALENÇA, 2003; ANDREOLLI e LARA, 2004).

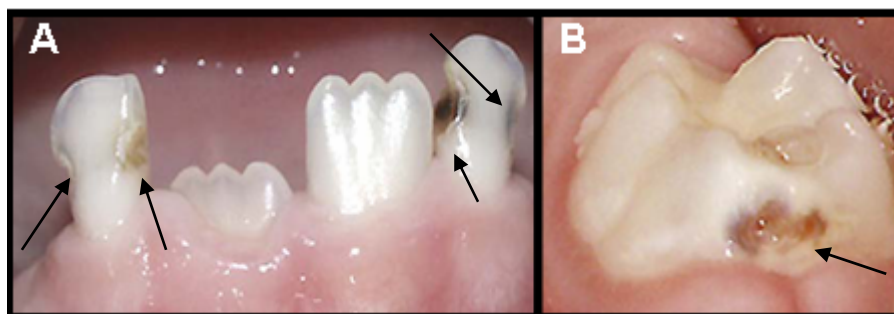


Figura 5: Doença cárie. (A) cárie interproximal nos incisivos laterais inferiores e (B) Cárie interproximal em molar. (Adaptada de BADET e RICHARD, 2004)

Após sucessivos ataques ácidos bacterianos, com reposição parcial de íons de cálcio e fosfato no esmalte, processo denominado remineralização, surge uma lesão clinicamente visível denominada como mancha branca (Figura 6, página 26), que, quando não interrompida, atinge estágios de cavitação (SOARES e VALENÇA, 2003) ou até mesmo pode levar, em casos extremos, à perda total da coroa dentária (NARVAI, 2000).

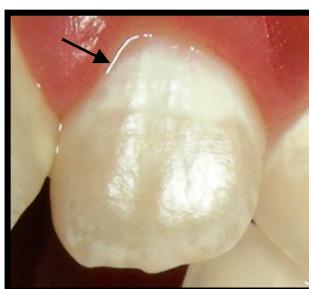


Figura 6: Aspecto da Mancha branca ativa: Rugosa e opaca (Doada pela Doutora Luciana Pomarico-Odontopediatria UFRJ).

1.4 DOENÇA PERIODONTAL

O periodonto é um conjunto de tecidos de proteção e sustentação que forma uma unidade de desenvolvimento, biológica e funcional. É composto pelos seguintes tecidos: gengiva, ligamento periodontal, cemento radicular e osso alveolar; e sua principal função é inserir o dente no tecido ósseo dos maxilares e manter íntegra a superfície da mucosa mastigatória da cavidade bucal (GUIMARÃES, 2005).

A doença periodontal resulta de um desequilíbrio da interação entre microrganismos, presentes no biofilme, e a resposta imune do organismo, pelo

aumento da patogenicidade bacteriana ou alteração da resistência do hospedeiro ao desafio microbiano (GUIMARÃES, 2005; BASCONES e MORANTE, 2006).

Inicialmente, apresenta-se como uma gengivite, que é caracterizada pela inflamação na margem da gengiva, estimulada pela placa bacteriana. Pode-se notar o caráter reversível da gengivite, pela remoção dos fatores locais e pelos sinais clínicos que apresenta, são esses: edema, eritema e sangramento. Mesmo em pequenas proporções as gengivites persistentes podem progredir para periodontites que são alterações inflamatórias destrutivas que acometem os tecidos de sustentação dos dentes, levando à perda de inserção e consequente formação de bolsa periodontal (GUIMARÃES, 2005; BASCONES e MORANTE, 2006). Porém elas são entidades distintas caracterizando-se a gengivite pelo sangramento gengival enquanto a segunda pela formação de bolsas periodontais. Não se pode afirmar, todavia, que toda gengivite levará a uma periodontite (GESSER; PERES e MARCEDES, 2001).

A classificação das doenças periodontais proposta pela Academia Americana de Periodontia em 1999, divide a doença periodontal em dois grandes grupos: gengivites e periodontites (GUIMARÃES, 2005).

As gengivites são subdivididas em associadas ao biofilme dental ou não associadas ao biofilme dental. Já as periodontites (Figura 7 página 28) dividem-se em crônicas, agressivas, como manifestação de doenças sistêmicas, doenças periodontais necrozantes, abscessos periodontais, periodontites associadas a lesões endodônticas e deformidades ou condições periodontais adquiridas ou de desenvolvimento (GUIMARÃES, 2005).

Os mecanismos fisiológicos específicos do hospedeiro e da bactéria, que levam ao aparecimento de gengivites e periodontites, não são totalmente conhecidos. Sendo assim, a prevenção da doença periodontal baseia-se na diminuição do acúmulo de placa (BASCONES e MORANTE, 2006).

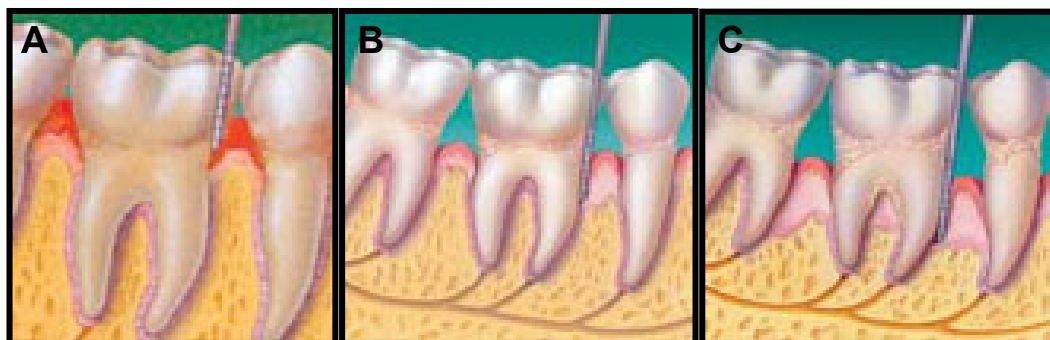


Figura 7: Representação esquemática da gengivite (A), da Periodontite (B) e da Periodontite avançada (C). A primeira caracteriza-se por uma inflamação gengival, a segunda pela presença de bolsa periodontal já indicando perda de inserção do periodonto e a terceira, grande perda de inserção com comprometimento ósseo (Adaptada de: <http://www.colgate.com.br>; acessado em 08/12/2008).

1.5 CONTROLE DO BIOFILME

O controle do biofilme pela sua remoção mecânica tem sido bem enfatizado nos países europeus, onde a cárie é vista como uma doença localizada e a placa bacteriana considerada um biofilme que deve ser desorganizado ou removido para impedir a ação bacteriana (CHAVES e VIEIRA-DA-SILVA, 2002).

Considerando-se o biofilme dental como um dos principais fatores etiológicos da cárie, diversas estratégias de prevenção buscam a remoção e o controle deste fator (CHAVES e VIEIRA-DA-SILVA, 2002). Sendo assim, a profilaxia básica para o controle da doença cárie inclui informações teóricas, instruções sobre auto-cuidado bucal, uso de agentes fluoretados, orientação dietética e controle profissional (ANDROLLI e LARA, 2004).

Uma higiene bucal correta, dieta com menor concentração de carboidratos e ingestão de alimentos menos cariogênicos, além de uma secreção salivar mantida dentro de valores fisiológicos, contribuem para uma baixa adesão do biofilme dental e, conseqüentemente, para a redução da patologia da cárie e doença periodontal (ANDROLLI e LARA, 2004).

Todavia, quando a remoção da placa é deficiente e a ingestão de sacarose é freqüente, o biofilme torna-se mais patogênico podendo causar tanto lesões em tecidos duros (cárie), quanto em tecidos moles (doença periodontal) (TORRES e colaboradores, 2000).

Para o controle efetivo do biofilme dental, é necessária a adequada escovação, bem como uso de fio/fita dental e a correta higiene, podendo ainda associar enxaguatórios bucais que teriam um efeito antibiótico como é o caso de enxaguatórios de clorexidina.

1.6 CANDIDÍASE BUCAL

É denominada candidíase ou candidose (Figura 8, página 29), a infecção bucal causada por microorganismo fúngico semelhante à levedura, como por exemplo a *C. albicans*. Outros membros do gênero *Candida* também estão presentes na cavidade bucal, porém raramente causam doença; são esses: *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. guilliermondi*. A *C. albicans* é um componente normal da microflora bucal podendo existir em harmonia sem apresentar sinais de infecção (NEVILLE e colaboradores, 2004).

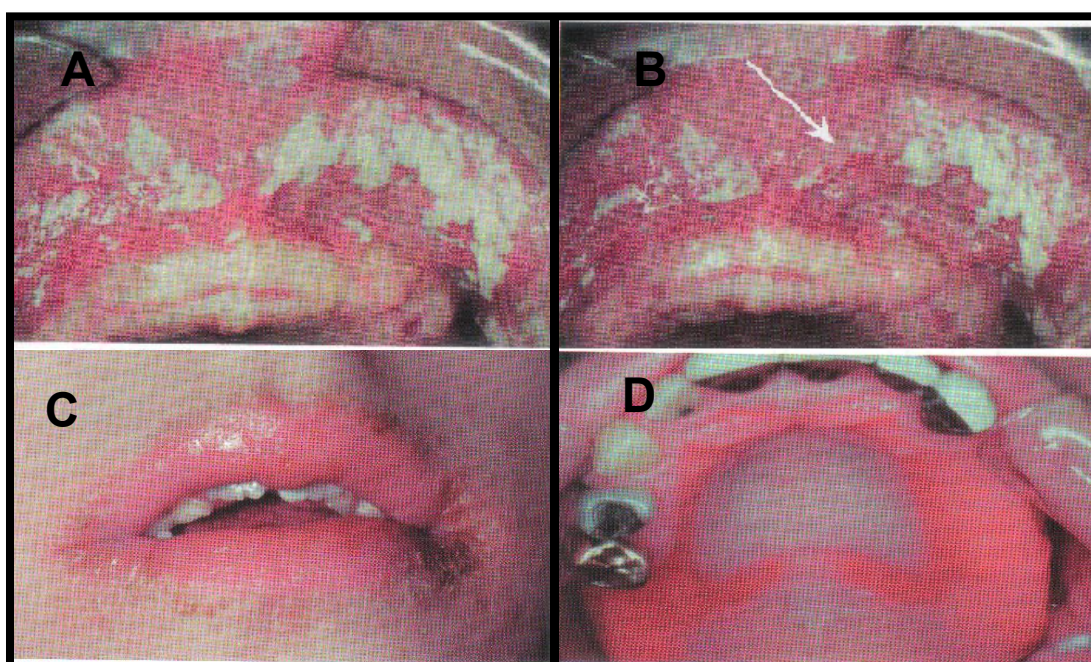


Figura 8: Várias formas clínicas de candidíase. Em A e B pode-se observar a candidíase pseudomembranosa; em C a queilite angular e em D a candidíase por dentadura (Adaptada de Neville, 2004).

Bem como outros fungos patogênicos, a *C. albicans* pode existir em duas formas: como levedura que é uma forma inócua; ou como hifas que esta associada à invasão de tecido. A essa característica de existir em duas formas dá-se o nome de dimorfismo (NEVILLE e colaboradores, 2004).

Antigamente, acreditava-se que a candidose era uma infecção oportunista que acometia pacientes debilitados por outras doenças, certamente, sabe-se que esses são os mais afetados pela doença, sendo que, atualmente, ela pode ser diagnosticada em pacientes saudáveis (NEVILLE e colaboradores, 2004; ABIRAMI e VENUGOPAL, 2005; ALVES e colaboradores, 2009; ROSATO e colaboradores, 2009). Essa infecção pode ser leve, envolvendo apenas a superfície, ou fatal, quando disseminada, sendo o caso de pacientes gravemente imunodeprimidos (NEVILLE e colaboradores, 2004; MEILLER e colaboradores, 2009). Existe em várias formas clínicas (Quadro 1, página 30 e Figura 8, página 29) podendo o indivíduo apresentar uma ou mais delas (NEVILLE e colaboradores, 2004).

Quadro 1: Formas clínicas das candidoses bucais (Adaptado de NEVILLE e colaboradores, 2004).

Tipo clínico	Aparência e sintomas	Sintomas
Pseudomembranosa (sapinho)	Placas brancas, cremosa, destacável	Sensação de queimação, hálito fétido
Eritematosa	Mácula vermelha	Sensação de queimação
Atrofia papilar central (glossite romboidal mediana)	Áreas de mucosa atrófica vermelhas	Assintomáticas
Multifocal crônica	Áreas vermelhas frequentemente com placas brancas removíveis	Sensação de queimação, assintomática
Queilite angular	Lesões vermelhas fissuradas	Irritadas, sensação de ferimento
Estomatite por dentadura	vermelhas	assintomáticas
Hiperplásica (leucoplasia por <i>candida</i>)	Placas brancas que não podem ser removidas	Assintomáticas
Mucocutânea	Placas brancas espessas que caracteristicamente não se destacam por curetagem	Odor fétido
Síndrome candidose endócrina	Placas brancas não removíveis em sua maioria	Odor fétido

Muitos antifúngicos vêm sendo desenvolvidos para tratamento de candidíase bucal, entre eles estão: Nistatina, Anfoterecina B, Clotrimazol, Cetoconazol, Fluconazol, Intraconazol, entre outros agentes que não são exatamente antifúngicos, mas cumprem a função, sendo necessário avaliar vantagens e desvantagens para sua aplicação (NEVILLE e colaboradores, 2004; ALVES e colaboradores, 2009). Ressaltando-se que a Nistatina e a Anfoterecina B vêm sendo largamente usadas, há mais de 50 anos, para tratamento local e sistêmico, respectivamente, em infecções fúngicas, sendo esses um dos mais importantes fármacos com atividade antifúngica (HAC-WYDRO e DYNAROWICZ-LATKA, 2006 a e b). Como o interesse do estudo aqui apresentado é o tratamento de candidíase bucal, e esse é realizado a partir de medicamento tópico, a nistatina foi nosso fármaco escolhido.

1.7 ALTERNATIVAS TERAPÊUTICAS PARA CONTROLE DE INFECÇÕES MICROBIANAS DA CAVIDADE BUCAL

1.7.1 Nistatina

Extraída de culturas de *Streptomyces nodous*, a nistatina foi descoberta em 1950 (HAC-WYDRO e DYNAROWICZ-LATKA, 2006b; AGUIAR, 2007), sendo considerado o primeiro tratamento eficaz de candidose bucal (NEVILLE, 2004), e tem sido empregada como antifúngico cuja indicação terapêutica atualmente está associada ao aumento no número de casos de candidíases em pacientes com câncer, AIDS e outras desordens sistêmicas (AGUIAR, 2007).

A nistatina (Figura 9, página 32) é efetiva na maioria das infecções causadas pelas espécies de *Candida* spp., mas é empregada apenas na profilaxia e tratamento de candidíases superficiais de pele e mucosas, demonstrando também atividades contra *Aspergillus*, *Cryptococcus* e outros fungos (AGUIAR, 2007). É um antifúngico largamente utilizado devido a sua atividade contra a maioria dos fungos patogênicos, da classe do polieno, que se caracteriza por moléculas de carbono ligadas por dupla ligação, sendo especificamente um tetraeno, por conter quatro duplas ligações não-

saturadas em sequência (Figura 9, página 32), ligações essas que formam a parte hidrofóbica (apolar) do fármaco que também possui em sua estrutura a parte hidrofílica (polar) que é representada pelos grupos hidroxila, carboxila e amina, sendo por isso considerada uma molécula de estrutura anfipática (HAC-WYDRO e DYNAROWICZ-LATKA, 2006 a e b; AGUIAR, 2007; ROSATO e colaboradores, 2009).

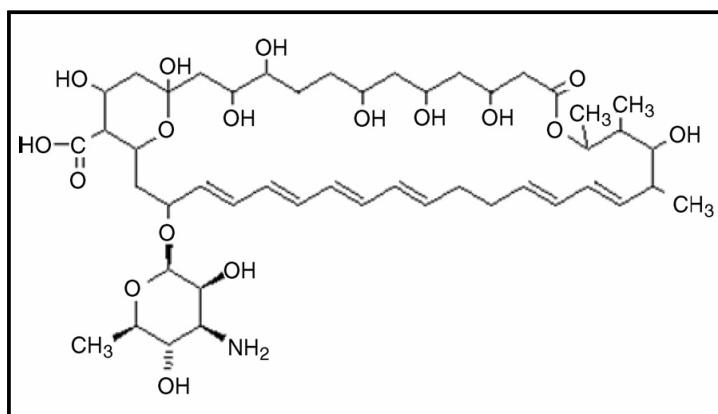


Figura 9: Estrutura química da nistatina (Adaptada de Hav-HAC-WYDRO e DYNAROWICZ-LATKA, 2006 a).

Seu mecanismo de ação mais aceito, atualmente, indica que a nistatina interage com o ergosterol, um esterol presente na membrana plasmática das células fúngicas resultando em uma desorganização funcional da mesma, devido à formação de canais transmembranares, acarretando assim, a saída de água e íons essenciais para a sobrevivência celular, como potássio, amônio, magnésio, fosfato, além da perda de açúcares, ésteres de fosfato, nucleotídeos e proteínas. Essas alterações diminuem a permeabilidade seletiva das células fúngicas, culminando em danos celulares, e, posteriormente, na morte celular (HAC-WYDRO e DYNAROWICZ-LATKA, 2006b; AGUIAR, 2007).

Deve-se destacar que um dos maiores problemas diretamente envolvidos no uso desse fármaco é sua toxicidade, que apresenta-se alta quando da administração intravenosa e intramuscular, que se justifica devido a capacidade da nistatina de se ligar, mesmo que mais fracamente, ao colesterol, outro tipo de esterol, presente na membrana plasmática das células de mamíferos. Devido a presença de esteróis em ambas as células, colesterol no mamífero e ergosterol no fungo, a administração do fármaco leva à formação de poros tanto na célula patogênica quanto na do hospedeiro.

Essa associação pode provocar efeitos adversos e tóxicos nas células, sendo ainda capaz de causar hemólise, necrose e abscessos frios nos locais quando administrado por injeção. Isso ocorre devido à sua ligação imediata com as membranas plasmáticas das hemácias, causando sua destruição. Entretanto, devido a sua baixa absorção na pele, mucosas ou trato gastrointestinal, e ao fato de que após a administração oral, grande parte é encontrada inalterada nas fezes, é indicada na terapia via oral e tópica (HAC-WYDRO e DYNAROWICZ-LATKA, 2006b; AGUIAR, 2007).

Devido às suas características farmacológicas, é empregada para uso tópico, mesmo quando concomitantemente usada por via oral, desejando-se um efeito superficial na mucosa oral e digestiva, podendo ocasionar efeitos adversos como náuseas, vômitos e diarreias, sendo as reações alérgicas raras. Muitas vezes, as náuseas são relacionadas ao sabor extremamente desagradável da nistatina, o que pode limitar o uso pelo paciente, diminuindo a adesão ao tratamento (AGUIAR, 2007).

Diversas formas de apresentações farmacêuticas de nistatina são encontradas no mercado, destinadas à administração cutânea, vaginal ou oral. Para o tratamento da candidíase oral, orofaríngea e esofagiana, a nistatina apresenta-se na forma de suspensão oral, e deve ser administrada com inicial bochecho e posterior ingestão, o que é dificultado pelo seu sabor amargo (AGUIAR, 2007).

Esse sabor amargo pode ser disfarçado pelo uso de sacarinas e sabores artificiais. Porém, se a candidose for causada por xerostomia, o uso de sacarose pode contribuir com o desenvolvimento da doença cárie (NEVILLE, 2004).

Além da suspensão oral, a nistatina ainda é apresentada nas seguintes formas farmacêuticas: pastilhas medicamentosas e comprimidos bucais, ambos dissolvidos lentamente na cavidade bucal (NEVILLE, 2004; AGUIAR, 2007).

1.7.2 Uso de substâncias fluoretadas

Há algumas décadas o flúor vem sendo utilizado para prevenção de cárie, resultando em uma melhora significativa da saúde bucal da população. A fluoretação da água de abastecimento vem se mostrando efetiva quanto à exposição ao flúor.

Outras fontes, porém, estão disponíveis, como: dentifrícios, géis, enxaguatórios, suplemento na dieta, bem como suco de frutas, bebidas carbonatadas e leite em pó formulado para amamentação (ASSIS e colaboradores, 1999).

Na tentativa de explicar a redução de cárie entre indivíduos jovens, pode-se citar o uso de flúor em larga escala, através de dentifrícios fluoretados (CHAVES e VIEIRA-DA-SILVA, 2002). Os estudos sobre a ação antibacteriana de dentifrícios verificam o seu potencial para inibir o crescimento bacteriano na boca, mas os seus potenciais antifúngicos não foram explorados (ABIRAMI e VENUGOPAL, 2005).

O flúor embora tenha seu principal efeito anticárie sobre o esmalte, pode também ter um importante, ainda que sutil, efeito antimicrobiano. Assim sendo, este pode não apresentar uma ação direta na composição da microbiota, mas pode atuar preservando a homeostase microbiana na placa, estabilizando-a durante as condições de oscilação da concentração de açúcares (GONÇALVES e colaboradores, 2001). Vem sendo empregado desde a década de 40 (BATISTA e VALENÇA, 2004; JABBARIFAR; TABIBIAN e POURSIANA, 2005) para a redução das lesões cariosas e ao longo desses anos várias teorias tentam explicar seu mecanismo de ação.

A primeira delas sugere que a oferta de flúor deve ocorrer nos primeiros anos de vida para assim ser incorporado ao dente ainda em formação (BATISTA e VALENÇA, 2004), formando a chamada fluorapatita, no lugar da hidroxiapatita presente no esmalte dental (NARVAI, 2000). Porém, não há indícios de que a assimilação do flúor pelo esmalte provoque uma diminuição na solubilidade deste, de forma a deixar esse dente menos suscetível a cárie (NARVAI, 2000; BATISTA e VALENÇA, 2004).

Uma segunda teoria afirma que o flúor deve estar permanentemente presente na cavidade oral para exercer seu efeito de maneira preventiva, atuando nos sucessivos processos de desmineralização e remineralização. Dessa forma, preconiza-se a idéia de que é mais eficaz o flúor presente nos fluidos bucais que nos tecidos duros (BATISTA e VALENÇA, 2004).

A ação do flúor no processo de remineralização ocorre devido aos níveis desse íon fluoreto na saliva e nos fluidos do biofilme permanecerem supersaturados em relação ao esmalte, mesmo com a queda do pH a níveis críticos (pH 5,5) (BATISTA e VALENÇA, 2004). Dessa forma, após a desmineralização, os íons cálcio e fosfato são reintegrados ao esmalte sob a forma de fluorhidroxiapatita ou fluorapatita (BATISTA e VALENÇA, 2004).

Ainda é importante ressaltar que a presença constante de flúor no meio bucal ocorre pela formação de fluoreto de cálcio sobre a superfície do esmalte dentário. Esse depósito atua como reservatório de fluoreto na cavidade bucal e, ao contrário do que se acreditava, esse fluoreto de cálcio tem maior impacto nos processos de desmineralização e remineralização que o fluoreto de fluorapatita (BATISTA e VALENÇA, 2004; SOARES e VALENÇA, 2003).

Uma terceira teoria é a de que o flúor também é um agente antibacteriano eficaz que atua inibindo a produção de ácido pelas bactérias (BELLI, BUCKLEY e MARQUIS, 1995). Há relatos de que o flúor inibe o transporte de glicose, o armazenamento de carboidratos, a formação de polissacarídeos extracelulares e a formação de ácidos por *Streptococcus* (JABBARIFAR; TABIBIAN e POURSIANA, 2005).

O flúor interfere no metabolismo em múltiplas áreas, sendo no meio intracelular a principal delas sobre a enzima enolase (BELLI, BUCKLEY e MARQUIS, 1995; CARDOSO; REIS e SERRATINE, 2004; NONAKA e colaboradores, 2005). Ao inibir essa ação enzimática no meio intracelular, o fosfoglicerato não passará a fosfoenolpiruvato, não havendo essa formação a via glicolítica é encerrada, e, conseqüentemente, não haverá a produção de ácido láctico e não ocorrerá o efluxo do produto final. Além de toda a ação na enolase, o flúor também interfere na fosfotransferase, porque com a ausência de fosfoenolpiruvato não há formação de ATP (ADP + fósforo) conseqüentemente ocorre a inibição da enzima EI, enzima esta responsável pela combinação de fosfato com a proteína intracelular HPr, impedindo assim o transporte de glicose para o interior da célula bem como interfere na força motriz de prótons, mecanismo responsável pelo homeostase da célula bacteriana (LOESCH, 1986; CARDOSO, REIS e SERRATINE, 2004).

Pode-se ainda ressaltar que quando funções do tipo efluxo do produto final e força motriz de prótons deixam de ser executadas, a capacidade de homeostase da bactéria é prejudicada, isso porque não será possível a expulsão de prótons para o meio extracelular para manter o pH interno da bactéria neutro. Com isso, a característica acidúrica da bactéria deixa de existir, havendo então a morte bacteriana quando o meio estiver ácido (CARDOSO, REIS e SERRATINE, 2004).

O flúor pode apresentar-se como ácido fluorídrico (HF) ou em sua forma ionizada (F^-), fluoreto livre; a primeira ocorre quando o pH do meio está ácido, sendo essa forma a mais permeável à membrana citoplasmática. O fluoreto ionizado está presente quando o pH do meio extracelular está neutro e essa forma é menos permeável à membrana (LOESCHE, 1986; CARDOSO, REIS e SERRATINE, 2004). Frente a isso, para que o flúor tenha sua atividade antimicrobiana, é necessário maior concentração da sua forma não ionizada (HF). Quando essa é permeada para o meio intracelular dissocia-se gerando sua forma ionizada, que interfere na atividade da enzima enolase e libera prótons, reduzindo o pH e deixando o meio interno mais ácido e, por fim, alterando a ação de enzimas que funcionam em pH neutro (CARDOSO, REIS e SERRATINE, 2004; JABBARIFAR, TABIBIAN e POURSIINA, 2005). Sendo assim, a aplicação tópica do flúor aumenta a resistência do dente ao ataque ácido das bactérias, já que o flúor junto ao dente é ativado em meio ácido (CARDOSO, REIS e SERRATINE, 2004).

São muitos os produtos fluoretados disponíveis para a aplicação tópica, dentre eles destacando-se: dentifrícios, enxaguatórios, géis e vernizes (BATISTA e VALENÇA, 2004). Muitas são as substâncias fluoretadas usadas em formulações comerciais, para uso profissional ou não, dentre elas: o fluoreto de sódio, o monofluorofosfato de sódio (MFP), o fluoreto estanoso, o diamino-fluoreto de prata, o tetrafluoreto de titânio e o fluorofosfato acidulado (VAN RIJKOM e colaboradores, 2003). Os mais usuais são o fluoreto de sódio e o MFP, muito presentes em dentifrícios, cada um com sua característica que os torna mais aptos ou não para o uso odontológico.

O efeito anticariogênico do flúor já está bem estabelecido, porém sua eficácia em relação a pacientes com alta atividade de cárie tem sido questionada. Assim, o interesse em desenvolver agentes anticáries mais efetivos continua sendo uma

preocupação mundial. Por essa razão o tetrafluoreto de titânio, cujos primeiros testes *in vitro* foram realizados na década de 70, vem despertando interesse científico (MORAIS, SOUZA e CHEVITARESE, 2000).

1.7.2.1 Tetrafluoreto de titânio

O tetrafluoreto de titânio (TiF_4) é conhecido como um potente agente remineralizador, porém seu mecanismo de ação ainda justifica algumas investigações (MORAIS, SOUZA e CHEVITARESE, 2000; WIEGAND e colaboradores, 2008b). Esse mecanismo de ação parece estar associado não só à presença de flúor nos processos de desmineralização e remineralização, mas também a uma película formada na superfície do esmalte, associada ao titânio, que parece ser mais resistente aos ataques ácidos (MORAIS, SOUZA e CHEVITARESE, 2000; WIEGAND e colaboradores, 2008b).

Sua ação protetora é intimamente atribuída à formação dessa película resistente a ácido, que oferece a proteção mecânica da superfície bem como o aumento da absorção de flúor, fato esse que diminuiria a desmineralização do esmalte (WIEGAND e colaboradores, 2008b).

Visto que a ação do tetrafluoreto de titânio nos processos de desmineralização e remineralização difere dos outros compostos fluoretados, cabe descrever a formação dessa película resistente. Quando aplicado no dente, o tetrafluoreto de titânio forma uma película de dióxido de titânio que fica adsorvida à superfície, sendo essa muito mais resistente ao meio ácido (SKARTVEIT e colaboradores, 1990; GU, LI e SÖREMARK, 1996; BÜYÜKYILMAZ, HAKAN e OGAARD, 1997; NÓBREGA e colaboradores, 2008). Sendo assim, seu efeito não está apenas associado ao fluoreto livre, mas também ao titânio (MAGALHÃES e colaboradores, 2008).

Um dos grandes problemas dessa substância é apresentar baixo pH, em torno de 1 – 2, em soluções de água ou etanol (NÓBREGA e colaboradores, 2008; EXTERKATE e TEN CATE, 2007), sendo um risco ao paciente durante a aplicação profissional.

Torna-se interessante o desenvolvimento de derivados fluoretados à base dessa substância (TiF_4), com a finalidade de manter seu potencial anticariogênico buscando uma maior estabilidade e maior pH das soluções. Um derivado dessa substância é algo promissor quanto à sua eficácia.

1.7.3 Clorexidina

Descoberta na década de 40, começou a ser comercializada em 1954 como antiséptico de pele. Em odontologia começou como agente de desinfecção da boca antes de procedimentos cirúrgicos e em endodontia, ganhando sua importância na periodontia na década de 70 (BASCONES e MORANTES, 2006).

É uma biguanidina catiônica (Figura 10, página 38) (TORRES e colaboradores, 2000) fortemente básica que encontra-se mais estável na forma de sal, podendo apresentar-se como acetato, cloridrato e digluconato, sendo o último o comumente usado (BASCONES e MORANTES, 2006).

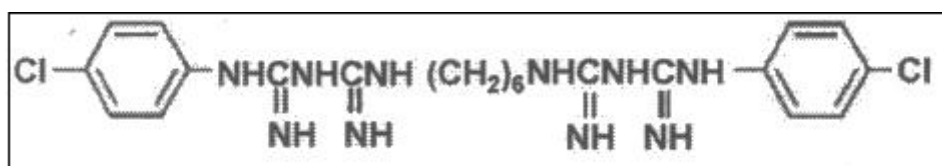


Figura 10: Estrutura química da clorexidina (Retirada de Zeng, 2009).

Por apresentar uma carga positiva, alguns fatores devem ser observados nas formulações de clorexidina, como sua interação com ânions como lauril sulfato de sódio ou até mesmo com o fluoreto de sódio que pode reduzir seu efeito antibiótico (BASCONES e MORANTES, 2006).

Liga-se fortemente à membrana celular bacteriana e, quando em baixas concentrações, exibe um efeito bacteriostático que se dá pelo aumento da permeabilidade celular com filtração dos componentes intracelulares, entre eles o potássio e o fósforo. Em altas concentrações apresenta efeito bactericida proveniente da precipitação e coagulação do citoplasma bacteriano (BASCONES e MORANTES, 2006; TORRES e colaboradores, 2000).

Seu efeito antibiótico se dá pela adsorção à superfície da célula bacteriana difundindo-se diretamente na parede celular e ligando-se à membrana plasmática,

levando ao rompimento desta, ao extravasamento dos constituintes citoplasmáticos e à consequente morte celular (MENG e colaboradores, 2008).

Na cavidade oral, adsorve-se rapidamente a superfícies como mucosa, dentes com película adquirida e hidroxiapatita, sendo liberada em 8-12 horas após o uso e no decorrer de 24 h ainda existe em baixas concentrações na cavidade bucal. Estudos farmacocinéticos indicam que apenas 30% da clorexidina fica adsorvida depois do enxágüe, sendo essa liberada gradativamente na cavidade bucal. Estudos *in vitro* indicam grande espectro de ação, sendo efetiva em bactérias Gram + e Gram – incluindo microorganismos anaeróbios e aeróbios, bem como em fungos e leveduras (BASCONES e MORANTES, 2006).

Possivelmente, a clorexidina inibe a formação do biofilme dental pela união de grupos ácidos aniônicos das glicoproteínas salivares reduzindo assim a formação da película e a consequente colonização bacteriana para a formação do biofilme, bem como a ação em bactérias presentes na cavidade bucal (BASCONES e MORANTES, 2006).

Não há descrito, em literatura, nenhuma evidência teratogênica em uso animal associada ao uso de clorexidina, porém ela apresenta efeitos adversos como pigmentação marrom aos dentes e alteração de gosto, sendo o último associado à utilização de álcool na formulação do enxaguatório. Acredita-se que a pigmentação dos dentes pode estar associada à interação da clorexidina com taninos presentes em alimentos como chá e vinho, entre outros; essa coloração pode ser removida com profilaxia profissional (BASCONES e MORANTES, 2006).

A clorexidina se apresenta comercializada em concentrações de 0,12% e 0,2% sendo o volume indicado de forma a ter aproximadamente 20mg de clorexidina por enxágüe, o que leva a resultados bem parecidos em ambas as concentrações, sendo indicado para tratamento de gengivites, periodontites, cirurgia periodontal, tratamentos de alveolites, candidíase por prótese, ulceratite aftosa, halitose, e há relatos sobre seu uso na prevenção de cárie (BASCONES e MORANTES, 2006; TORRES e colaboradores, 2000; PINEDA e colaboradores, 2000).

1.8 NANOTECNOLOGIA

Como definição, pode-se considerar a nanotecnologia como a tecnologia que se baseia na síntese, processamento, caracterização e utilização de estruturas em faixa nanométrica. O desenvolvimento desses materiais compreende partículas na escala de 1-100 nm (ROCHA, 2008; CARMO, 2009), escala essa que está associada ao tamanho de uma bactéria ou até mesmo da molécula da água (Figura 11 página 40). O interesse de desenvolver medicamentos na escala nanométrica está na possibilidade de uma farmacologia mais prática como a qual a terapia será mais específica e seletiva, agindo, por exemplo, na distribuição e liberação do medicamento (NAZAROV e colaboradores, 2009).

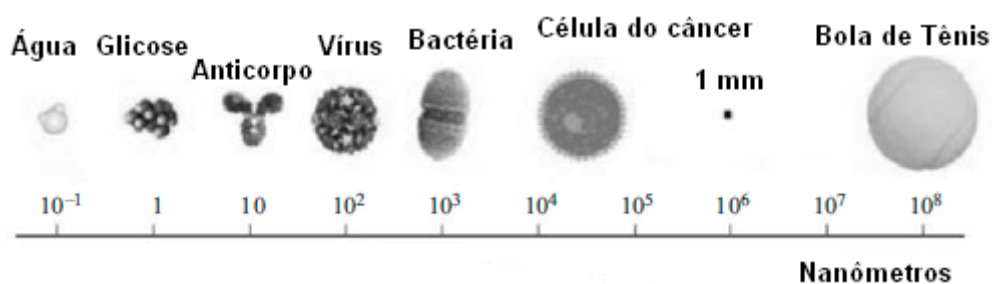


Figura 11: Proporções da escala nanométrica (Adaptado de: NAZAROV e colaboradores, 2009)

Materiais nanométricos podem exibir propriedades químicas e físicas diferentes de estruturas micrométricas, sendo a melhoria desses materiais, descritas em muitos estudos que relatam o desenvolvimento de nanocompósitos poliméricos, estabilidade térmica e mecânica, o aumento da resistência ao calor, diminuição da permeabilidade de gases e de inflamabilidade e aumento da resistência a solventes (NARYANAN e colaboradores, 2009; REYNA-VALENCIA, DEYRAIL e BOUSMINA, 2010; GONZÁLEZ-VIDAL e colaboradores, 2010). A Montmorilonita, a Hectorita e a Saponita são exemplos de materiais mais utilizadas no desenvolvimento de nanocompósitos poliméricos (BOTANA e colaboradores, 2009). Como definição de nanocompósitos pode-se dizer que é a combinação de duas ou mais substâncias cujas características se diferenciam das apresentadas pelas substâncias originais, que é a definição de compósito, porém o material é desenvolvido em escala nanométrica e apresenta propriedades melhores que os compósitos convencionais (ROCHA, 2008; CARMO, 2009).

Os nanocompósitos desenvolvidos dependem das substâncias envolvidas no processo de preparação, seja a compatibilidade ou as condições do processo. Quando uma das substâncias envolvidas é um silicato, os nanocompósitos podem existir em três tipos: Convencional, intercalada e delaminados (Figura 12, página 41) (BOTANA e colaboradores 2009; CARMO, 2009). Os convencionais são aqueles onde o silicato é apenas um preenchimento; os intercalados apresentam estruturas onde a substância se encontra entre as lamelas da argila (silicato); e os delaminados é quando as lamelas se colocam de forma dispersa na matriz (CARMO, 2009).

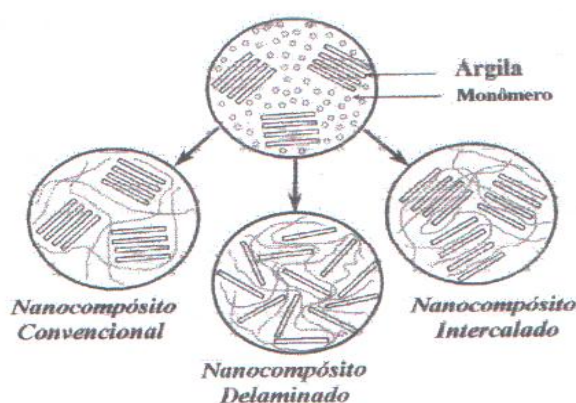


Figura 12: Tipos de estruturas assumida por nanocompósitos de argila (Retirada de Carmo, 2009)

Na intenção de obter novos agentes antimicrobianos, pode-se pensar na intercalação fármaco/silicato, ou seja, posicionar entre as lamelas da argila, no caso a montmorilonita de sódio, substâncias com características antimicrobianas a fim de desenvolver um nanocompósito de maior eficácia.

1.8.1 Silicatos lamelares

A justificativa de intercalar os ativos propostos em silicatos lamelares relaciona-se à propriedade da montmorilonita de adsorver e fixar bactérias e fungos (YANG e colaboradores, 2007; MENG e colaboradores, 2008), o que, associado à presença de um agente antimicrobiano levaria a adsorção e morte bacteriana (MENG e colaboradores, 2008).

Estudos farmacológicos mostram que a montmorilonita possui a capacidade de adsorver bactérias como *E. coli* e *S. aureus* immobilizando suas toxinas, o que não

confere a essa argila a atividade antimicrobiana conseguida então, com a associação de agentes antimicrobianos (MENG e colaboradores, 2009) funcionando assim como um carreador destes agentes (YANG e colaboradores, 2007; MENG e colaboradores, 2008; MENG e colaboradores, 2009).

A montmorilonita (Figura 13, página 42) é uma argila esmectita natural composta de duas camadas tetraédricas de sílica separadas por uma camada octaédrica de alumínio (ROCHA, 2008; MENG e colaboradores, 2009). As lamelas formam pilhas com aberturas mantidas por interações de Van der Waals entre elas, denominadas interlamela ou galeria (ROCHA, 2008).

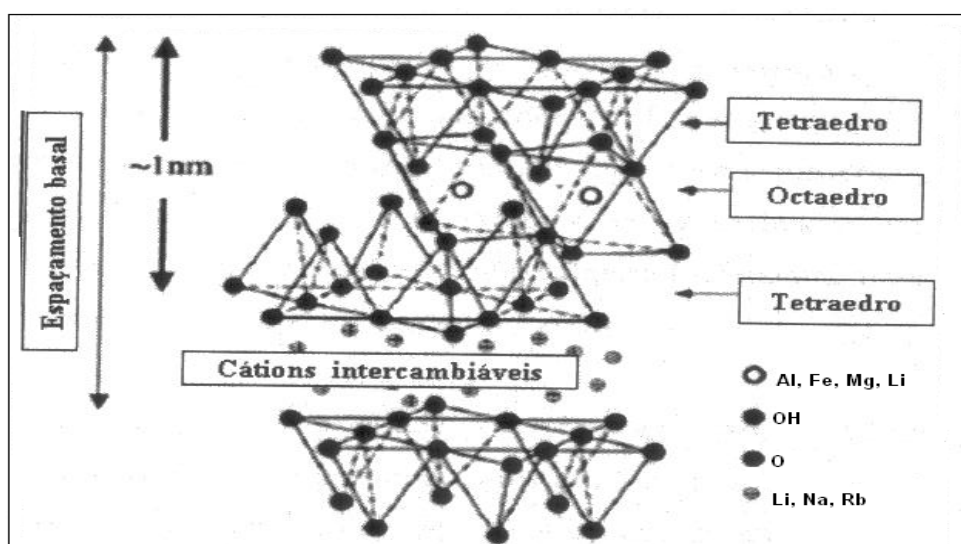


Figura 13: Estrutura básica da montmorilonita (Adaptado de Rocha, 2008)

A substituição isomórfica nas lamelas, por exemplo, Al^{+3} reposto por Mg^{+2} ou por Fe^{+2} na camada octaédrica; Si^{+4} reposto por Al^{+3} na camada tetraédrica, geram cargas negativas que são contrabalanceadas por cátions, alcalinos ou alcalino-terrosos, que se alojam no espaço interlamelar (Figura 14 página 43)(YANG e colaboradores, 2007; ROCHA, 2008).

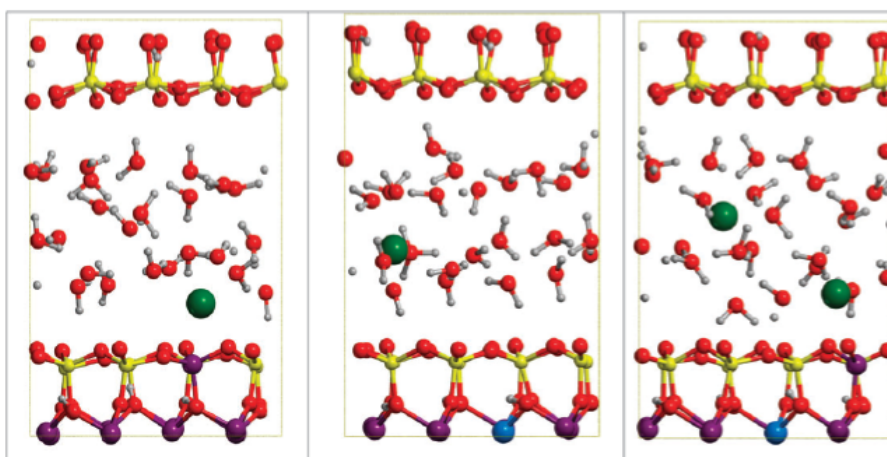


Figura 14: Estudos de modelagem molecular que simulam as substituições isomórficas da montmorilonita de sódio, mostrando seu espaçamento interlamelar e seu preenchimento por sódio e água. Em azul está representado o Mg, em amarelo o Si, em verde o Na, em vermelho o O, em cinza o H e em uva o Al. (Retirada de MIGNON e colaboradores, 2009).

Essa carga negativa não é constante, variando de lamela para lamela, considera-se então um valor médio sobre o cristal. A carga superficial moderadamente negativa é conhecida como capacidade de troca catiônica (CTC) e é expressa em meq de cátion /100g de argila (ROCHA, 2008). As forças que mantêm essas lamelas juntas são fracas sendo possível a intercalação (ROCHA, 2008).

A uso de argilas mineirais em indústrias de produtos farmacêuticos, produtos veterinários, tintas, plásticos e inseticida é favorecido pelo baixo custo (CARMO, 2009), bem como sua estabilidade térmica favorável (YANG e colaboradores, 2007).

1.8.2 Novos derivados

Existem muitos estudos relacionados ao desenvolvimento de novos nanocompósitos a partir de argilas, como a montmorilonita de sódio ou cálcio ou com argilas organofílicas que estão sempre em busca de um derivado com melhores características que a substância inicial. Entre os estudos publicados dos últimos anos, como os de Zhang e colaboradores (2009), Botana e colaboradores (2009), Macêdo-Fonsêca, Silva e Souto-Maior (2009), Narayanan e colaboradores (2009), Dal Castel e colaboradores (2010), Yarahmadi, Jakubowicz e Hjertberg (2010), González-Vidal e colaboradores (2010), Li e Wu (2010), Joshi e colaboradores (2009), pode-se destacar o de Yang e colaboradores (2007) e de Meng e colaboradores (2009) que

procuram intercalar o acetato de clorexidina em montmorilonita para desenvolver um nanocompósito, proposta essa que, também está presente em nosso trabalho de pesquisa. Apontam-se diversas diferenças entre os trabalhos já publicados e nossa proposta, sendo essas destacadas a partir da metodologia de preparo dos nanocompósitos de montmorilonita bem como nas análises realizadas e os microorganismos utilizados em cada estudo.

Ambos os estudos, Yang e colaboradores (2007) e Meng e colaboradores (2009), tiveram por objetivo desenvolver um nanocompósito com atividade antimicrobiana, bem como o proposto em nosso estudo. Para isso Yang e colaboradores (2007) utilizaram no processo de intercalação a MMT de sódio e de cálcio caracterizando o novo derivado por DRX, HRTG e FTIR e avaliando a atividade do nanocomposto frente a cepa de *E. coli*, encontrando como resultado a formação de uma nanocompósito cuja atividade antimicrobiana mostrou-se mais adequada quando a concentração de acetato de clorexidina é maior, perdurando o efeito de inibição após 1 ano de análise. Meng e colaboradores (2009) apresentaram a caracterização dos nanocompostos desenvolvidos por DRX, TGA e FTIR complementando com o estudo de liberação e a análise de inibição frente as cepas de *P. aeruginosa* e *S. aureus*, cuja conclusão indicou a formação do nanocompósito proposto sendo que o estudo de liberação mostrou uma liberação exagerada em 24 h, sendo que após 72 h ainda havia clorexidina sendo liberada. Frente a esse resultado, esse grupo conclui que a MMT pode funcionar como carreadora de fármacos quando se deseja uma liberação controlada, indica, ainda, que na análise de inibição o compósito de acetato de clorexidina com montmorilonita apresentou uma ampla atividade antimicrobiana.

Nosso estudo, além de diferenças no processo de intercalação, avaliou a atividade em microorganismos que encontram-se em abundância na cavidade bucal procurando complementar e corroborar com esses estudos já publicados. Existem ainda alguns relatos de argila fluoretadas (Kijima, Nakazawa e Takenouchi, 1991; Zhang e colaboradores, 2009; Di Gianni e colaboradores, 2009) realizadas com finalidades diferentes das propostas nesse trabalho, e não há relatos de intercalação de nistatina em montmorilonita de sódio sendo assim uma proposta inovadora.

2 OBJETIVO

Tomou-se como objetivo principal deste trabalho o desenvolvimento de novos derivados nanométricos de silicatos lamelares de forma a se otimizar a atividade antimicrobiana de fármacos de uso consagrado para a prevenção de patologias da cavidade bucal.

Como objetivos específicos, foram considerados os seguintes aspectos:

- Preparar e caracterizar novos derivados de tetrafluoreto de titânio obtidos de sua intercalação com montmorilonita sódica;
- Preparar e caracterizar novos derivados de gluconato de clorexidina obtidos de sua intercalação com montmorilonita sódica;
- Preparar e caracterizar novos derivados de nistatina obtidos de sua intercalação com montmorilonita sódica;
- Avaliar o teor de ativo, propriedades físico-químicas e estabilidade das novas preparações utilizando-se como metodologia analítica a técnica de potenciometria de íon seletivo (fluoreto), para derivados de tetrafluoreto de titânio e espectroscopia de ultravioleta para os derivados de gluconato de clorexidina e nistatina;
- Avaliar o consumo de glicose em cepas de *Streptococcus mutans* e *Candida albicans* na presença de soluções fluoretadas, utilizando-se soluções de fluoreto de sódio, monofluorofosfato de sódio e tetrafluoreto de titânio, em diferentes concentrações, com a finalidade de selecionar o composto quanto a sua atividade, bem como a concentração mais adequada;
- Realizar o teste de halo de inibição com os novos derivados desenvolvidos, utilizando-se como padrão comparativo soluções de tetrafluoreto de titânio, gluconato de clorexidina e nistatina, de forma a avaliar o comportamento, frente as cepas de *S. mutans* e *C. albicans*, dos novos nanossistemas desenvolvidos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DAS SOLUÇÕES FLUORETADAS

3.1.1 Preparo das soluções fluoretadas

Foram preparadas soluções a partir das seguintes substâncias fluoretadas: fluoreto de sódio, MFP e tetrafluoreto de titânio. O uso de fluoreto de sódio e MFP foi determinado pelo uso consagrado dessas substâncias. São comumente encontradas em diversas formulações odontológicas, apresentando ação preventiva de cárie.

As soluções foram utilizadas como padrão para avaliação da atividade antimicrobiana. As amostras foram preparadas em concentrações idênticas às formulações existentes no mercado (Quadro 2, página 46), usadas como agentes preventivos para cárie, sendo o resultado da atividade antimicrobiana dessas soluções comparadas com os novos nanossistemas propostos nesse estudo.

Quadro 2: Concentração das soluções fluoretadas e suas formas comerciais.

Solução	Concentração (ppm F)	Formulação Correspondente
NaF/ MFP/ TiF₄	500	Dentifrício Infantil
NaF/ MFP/ TiF₄	900	Enxaguatório Bucal
NaF/ MFP/ TiF₄	1500	Dentifrício Adulto
NaF/ MFP/ TiF₄	22600	Verniz Fluoretado

As soluções foram produzidas dissolvendo-se fluoreto de sódio, monofluorofosfato de sódio, tetrafluoreto de titânio nas concentrações acima descritas, após pesagem em balança analítica (BIOPRECISA modelo FA-2104N), transferindo-se para um balão volumétrico de 200 mL, com o auxílio de um funil, e avolumados com água MilliQ para atingir as diferentes concentrações desejadas.

3.1.2 Caracterização das soluções fluoretadas

3.1.2.1 Doseamento de fluoreto

Com o objetivo de se confirmar as concentrações de fluoreto das amostras padrão e dos derivados de montmorilonita de sódio com tetrafluoreto de titânio, foi utilizada a potenciometria íon seletivo. Como forma de calibração desse aparelho foi preparada uma curva de calibração, a partir de soluções de fluoreto de sódio, levando em consideração as concentrações em ppm de fluoreto. Para este fim, utilizou-se sete soluções aquosas (água purificada MilliQ) de fluoreto de sódio com concentrações que variaram de 200 a 5000 mg/L (ppm). Os valores das concentrações de flúor foram expressos, na curva de calibração, em ppm de fluoreto convertidos para a escala logarítmica.

A determinação da concentração de fluoreto nas soluções de fluoreto de sódio e de tetrafluoreto de titânio foi conduzida pela mistura de 4mL de cada solução com a mesma quantidade de um tampão para medição de fluoreto pelo eletrodo específico de flúor (TISAB). Foi utilizado o potenciômetro íon seletivo Analyser pH/íon 450M, operando em modo mV, com eletrodo íon seletivo de fluoreto ORION 9609 BNWP, para obter o potencial eletroquímico em cada uma das soluções. As leituras foram realizadas em triplicata, sob agitação (placa IKA® C-MAG HS7) .

Devido à dissociação lenta do MFP, para a leitura de fluoreto nessas soluções, faz-se necessário sua hidrólise prévia (SOUZA, SOARES e PIRES, 2005; BILLINGTON e colaboradores, 2004; TZANAVARAS e THEMELIS, 2001). A hidrólise do MFP foi realizada como descrita por Billington colaboradores em 2003, onde 4mL da amostra são hidrolizados por 1mL de HCl 4 M e mantido sob agitação por 3 horas. Após esse tempo é adicionado 1mL de NaOH 4 M com a finalidade de neutralizar o ácido. A amostra então é acrescida de 4mL de TISAB e o doseamento de íons fluoreto é realizado (BILLINGTON e colaboradores, 2003). As leituras foram realizadas em triplicata, sob agitação (placa IKA® C-MAG HS7).

A mesma metodologia de doseamento de fluoreto foi utilizada para medidas da concentração de fluoreto livre nos novos derivados de montmorilonita

com tetrafluoreto de titânio preparados, substituindo-se, todavia, os derivados fluoretados padrão pelo produto em estudo.

3.1.2.2 Medida de pH

A medida de pH das soluções fluoretadas foi realizada com 5mL de solução fluoretada analisados em potenciômetro de pH microprocessado QUIMIS modelo Q-400-T acoplado ao eletrodo de referência da QUIMIS modelo SC06, feito em triplicata.

3.2 ESTUDO DE INTERCALAÇÃO DE TETRAFLUORETO DE TITÂNIO EM MONTMORILONITA DE SÓDIO

Os nanocompósitos de montmorilonita de sódio (BENTEC) foram preparados pela técnica de solução. As reações de intercalação foram preparadas a partir de tetrafluoreto de titânio (Sigma Aldrich) e argila (montmorilonita de sódio) em proporções avaliadas: 100% em relação a capacidade de troca catiônica (CTC), 80% em relação a CTC e 60% em relação a CTC, e o solvente utilizado foi a água destilada. As proporções, nesse e em todos os processos de intercalação, foram calculadas usando como parâmetro 100% da capacidade de troca catiônica como 100meq de cátion para cada 100g de montmorilonita de sódio. As reações de intercalação, realizadas em triplicata, foram mantidas sob agitação magnética, placa IKA® C-MAG HS7, em tempos de 1, 18, 24 e 48 horas. Ao final do tempo, o produto foi centrifugado em centrífuga (SIGMA), a 4000 rpm por 40 minutos, e o precipitado foi seco em dessecador sob vácuo. As diferentes condições de intercalação estão descritas na Tabela 1, página 49.

Tabela 1: Experimentos de intercalação de montmorilonita de sódio com tetrafluoreto de titânio.

Derivado	Concentração (% em relação a CTC)	Tempo de reação
A1	60%	1 hora
A2	60%	18 horas
A3	60%	24 horas
A4	60%	48 horas
A5	80%	1 hora
A6	80%	18 horas
A7	80%	24 horas
A8	80%	48 horas
A9	100%	1 hora
A10	100%	18 horas
A11	100%	24 horas
A12	100%	48 horas

3.3 ESTUDO DE INTERCALAÇÃO DE GLUCONATO DE CLOREXIDINA EM MONTMORILONITA DE SÓDIO

Os experimentos de intercalação foram preparados conforme descrito acima para os derivados de tetrafluoreto de titânio, citados no item 3.2, sendo agora utilizado como ativo o gluconato de clorexidina (Henrifarma produtos químicos e farmacêuticos). Foram avaliadas nas seguintes proporções fármaco/silicato: 100% em relação a CTC, 80% em relação a CTC e 60% em relação à CTC, e o solvente utilizado foi a água. Os experimentos de intercalação, realizados em triplicata, foram submetidas à agitação magnética, placa IKA[®] C-MAG HS7, em tempos de 1, 18, 24 e 48 horas. Ao final do tempo, o produto foi centrifugado em centrífuga Sigma, a 4000 rpm por 40 minutos, e o precipitado foi seco em dessecador sob vácuo. Os derivados de clorexidina encontram-se descritos na Tabela 2, página 50.

Tabela 2: Experimentos de intercalação de montmorilonita de sódio com gluconato de clorexidina.

Derivado	Concentração (% em relação a CTC)	Tempo de reação
C1	60%	1 hora
C2	60%	18 horas
C3	60%	24 horas
C4	60%	48 horas
C5	80%	1 hora
C6	80%	18 horas
C7	80%	24 horas
C8	80%	48 horas
C9	100%	1 hora
C10	100%	18 horas
C11	100%	24 horas
C12	100%	48 horas

3.4 ESTUDO DE INTERCALAÇÃO DE NISTATINA EM MONTMORILONITA DE SÓDIO

Os experimentos de intercalação foram preparados conforme as reações do tetrafluoreto de titânio (item 3.2), sendo agora utilizado como ativo a nistatina. Como a nistatina apresenta baixa solubilidade em água, foi preparada uma solução de 0,9% onde são solubilizados 1 g de nistatina (Genix) em 70 mL de água destilada e 40,5 mL de ácido acético. Foram então avaliadas nas seguintes proporções: 100% em relação a CTC, 80% em relação à CTC e 60% em relação à CTC, e o solvente utilizado foi a água destilada. As reações de intercalação foram realizadas em triplicata em tempos de 1, 18, 24 e 48 horas. Ao final do tempo, o produto é centrifugado em centrífuga Sigma, a 4000 rpm por 40 minutos, e o precipitado foi seco em dessecador sob vácuo. Os derivados propostos estão descritos na Tabela 3 página 51.

Tabela 3: Experimentos de intercalação de montmorilonita de sódio com nistatina.

Derivado	Concentração (% em relação a CTC)	Tempo de reação
N1	60%	1 hora
N2	60%	18 horas
N3	60%	24 horas
N4	60%	48 horas
N5	80%	1 hora
N6	80%	18 horas
N7	80%	24 horas
N8	80%	48 horas
N9	100%	1 hora
N10	100%	18 horas
N11	100%	24 horas
N12	100%	48 horas

3.5 CÁLCULO DE RENDIMENTO DO PROCESSO DE INTERCALAÇÃO

Com a finalidade de calcular o rendimento dos derivados após a centrifugação das reações, os sobrenadantes foram filtrados, com papel de filtro analítico para derivados de tetrafluoreto de titânio e nistatina e com filtro Millipore para derivados de clorexidina, e avaliados quanto ao teor de ativo para que se possa calcular um rendimento aproximado.

O teor de fluoreto foi analisado por potenciômetro íon seletivo Analyser pH/íon modelo 450M, operando em modo mV, com eletrodo íon seletivo de fluoreto ORION 9609 BNWP comparando-se a leitura obtida com a equação da reta obtida da reta de calibração preparada a partir de soluções aquosas de fluoreto de sódio nas concentrações de 1 à 3000 ppm de fluoreto.

O teor de nistatina e de clorexidina foram analisados por espectrofotometria em espectrofotômetro SP-220 Biospectro, em comprimento de onda de 279 nm e 240 nm respectivamente sendo o teor determinado por cálculos realizados a partir da equação da reta obtida de suas respectivas retas de calibração cujas concentrações das soluções aquosas variaram de 11 à 25 µg/mL para ambos os ativos.

3.6 CARACTERIZAÇÃO DOS DERIVADOS

A caracterização dos complexos obtidos baseia-se em alterações físico-químicas da molécula incluída. As técnicas aqui utilizadas foram: Difração de Raios-X (DRX), Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) e Espectroscopia de Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).

3.6.1 Difração de Raios-X

Na análise de Difração de raios-X, a interação entre o vetor elétrico de radiação X e os elétrons da amostra a ser analisada resultam em uma dispersão. Isto ocorre, pois os raios incidem na superfície de estruturas organizadas presentes no cristal. Interferências, construtiva e destrutiva, aparecem entre os raios dispersos, uma vez que as distâncias entre os centros de dispersão são de mesma ordem de magnitude do comprimento de onda da radiação, resultando assim em difração (SKOOG e colaboradores, 1998 apud Rocha, 2008).

Quando um feixe de raios-X incide em uma superfície cristalina em mesmo ângulo θ , parte destes raios é dispersa pela camada de átomos presentes na superfície. A porção do feixe que não sofreu dispersão incide na segunda camada de átomos onde ocorre novamente a dispersão, sendo que a parte remanescente passa para uma terceira camada. Nos centros regularmente espaçados do cristal, o efeito cumulativo desse espalhamento, resulta na difração do feixe em sua grande parte, da mesma maneira que a radiação visível é difratada pela reflexão reticular. Para análise de difração de raios-X são necessários os seguintes requisitos: (1) o espaçamento entre as camadas de átomos deve ser aproximadamente o mesmo que o comprimento de onda da radiação e (2) os centros de dispersão devem ser espacialmente distribuídos numa direção altamente regular (SKOOG e colaboradores, 1998 apud Rocha, 2008).

As análises de DRX dos derivados desenvolvidos, das misturas físicas e da montmorilonita de sódio, foram realizadas em Difratorômetro de raios-X Rigaku, modelo Miniflex (IMA – UFRJ), operado a 40KV e 30mA, onde o ângulo de difração 2θ varia de 2 a 20° em temperatura ambiente e a radiação CuK_α é utilizada como fonte dos

raios- X. As misturas físicas foram realizadas para fins comparativos, sendo usadas como um controle na formação do derivado.

3.6.2 Calorimetria exploratória diferencial

A calorimetria exploratória diferencial é uma técnica na qual se mede a diferença de energia fornecida, à substância e ao material de referência, em função da temperatura, quando essas, substância e material de referência, são submetidos a uma programação controlada de temperatura (LONASHIRO, 2005 apud ROCHA, 2008).

Os derivados foram analisados, em colaboração com Laboratório de Estudo do Estado Sólido (Farmanguinhos-Fiocruz) pelos responsáveis Msc. Altivo Pitaluga Junior e Msc. Rafael Cardoso Seiceira, utilizando equipamento de DSC 822^e Mettler Toledo, sob fluxo de nitrogênio de 22,5 mL.min⁻¹, em faixa variável entre 0-340°C, com taxa de aquecimento de 20°C.min⁻¹.

3.6.3 Espectroscopia de Infravermelho com transformada de Fourier

A radiação infravermelha corresponde à parte do espectro situada entre as regiões do visível e das microondas, e a região de maior interesse na identificação de estruturas está situada entre 4000 e 400 cm⁻¹. Essa radiação, em frequência menor do que aproximadamente 100 cm⁻¹, quando absorvida por uma molécula orgânica, converte-se em energia de rotação molecular (SILVERSTEIN e colaboradores, 1994 apud ROCHA, 2008).

As posições das bandas nos espectros são apresentadas em números de ondas (ν) cuja unidade é o centímetro inverso (cm⁻¹) e as intensidades das bandas são apresentadas em transmitância (T). O processo de absorção é quantificado e, em consequência, o espectro de rotação das moléculas consiste em uma série de linhas (SILVERSTEIN e colaboradores, 1994 apud ROCHA, 2008).

Para as análises de FTIR (espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier) foram produzidas pastilhas de KBr a 2% contendo os materiais de partida, as misturas físicas e os novos derivados preparados e a leitura realizada em

espectrômetro IR Prestige-21 Shimadzu A210045 Japão (LABCQ – UFRJ) em número de onda de 4000 à 400 cm^{-1} .

3.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A atividade antimicrobiana das soluções fluoretadas, bem como dos nanocompósitos desenvolvidos foi testada frente a cepas de *S. mutans* (ATCC 25175) e *C. albicans* (ATCC 10231). Com a intenção de selecionar o melhor composto fluoretado e a concentração mais efetiva desse, foi realizada a análise de consumo de glicose. Os nanocompósitos obtidos foram testados quanto a sua atividade antimicrobiana pela análise de halo de inibição.

Previamente à realização dos testes, os microorganismos foram crescidos em meio de cultura BHI (Brain heart infusion) por 48 horas à 37°C, sendo o *S. mutans* mantido em baixa tensão de oxigênio, em jarra de anaerobiose, e a *C. albicans* sob agitação suave. Após esse tempo, o crescimento foi mensurado em câmara de Neubauer para *C. albicans* e escala de Mc Farlaned para *S. mutans*.

3.7.1 Análise do consumo de glicose

A análise foi realizada pelo Professor Doutor Mauro Sola-Penna (LabECoM – UFRJ) com a finalidade de avaliar os compostos fluoretados seguindo a metodologia descrita onde 100 μL de cada solução fluoretada foram adicionados em um eppendorf contendo 80 μL do inóculo, seguindo a adição de 20 μL de uma solução de glicose de 5 mM. Essa ordem foi mantida para que o microorganismo não consumisse glicose antes da adição da solução fluoretada. Após o preparo das amostras, essas foram submetidas a uma agitação de 10 segundos seguida da centrifugação por 20 segundos. Retirou-se em triplicata, 20 μL desta suspensão em tempo zero, 24h e 48h, sempre precedido de agitação e centrifugação. Retira-se 10 μL do eppendorf de cada alíquota (tempo zero, 24 e 48 horas) mais 90 μL de água destilada, transferindo esta mistura para uma placa TPP. Logo em seguida, 5 μL de cada poço desta primeira placa serão transferidos para uma nova placa idêntica. Adiciona-se 200 μL de um reagente de cor (Kit Glucox 500) e a leitura foi realizada por espectrofotometria, utilizando-se um leitor de microplacas ThermoPlate com uma absorbância de 492 nm e os resultados serão expressos em média de nmol de

glicose consumido nos tempos zero, 24h e 48h metodologia adaptada de Leite e colaboradores (2007).

3.7.2 Medida do halo de Inibição

Esta análise foi realizada no Laboratório de Bioprodutos de Farmanguinhos-Fiocruz pela Prof. Dr. Elisabeth Sanchez e a aluna de mestrado Patrícia Ferreira, e as Cepas de *S. mutans* foram doadas pela Prof. Dr. Ana Paula Vieira Colombo do Laboratório de Microbiologia Oral-UFRJ e as de *C. albicans* pelo laboratório de Micologia-UFRJ do Prof. Dr. Paulo Murilo Neufeld

Com a finalidade de padronizar os inóculos, aplicou-se 1 mL de solução salina contendo cepas dos microorganismos mencionados, em placa de BHI acrescido de ágar, onde as diluições seriadas variaram de 10^1 à 10^9 . A padronização do inóculo em $1,7 \times 10^7$ células por mL de *C. albicans* e $3,0 \times 10^6$ células por mL de *S. mutans* foi realizada a partir da análise de viabilidade celular.

Após a padronização, a análise de halo de inibição foi realizada em placas de Petri contendo meio de cultura sólido BHI, adicionado de ágar, onde foram semeados em toda a superfície os inóculos. Esse plaqueamento dos inóculos ocorreu de duas formas: na aplicação de 1 mL do inóculo, com auxílio da pipeta automática, essas placas foram denominadas placa 1, e com um *swab* estéril embebido nos microorganismos, denominadas *swab* 1 e *swab* 2. Após secagem da superfície, os nanocompósitos foram aplicados nas diferentes placas de duas formas, na primeira, placa *swab* 2, foram confeccionados 7 poços de aproximadamente 6 mm, onde 50 μ L de cada suspensão contendo o novo derivado bem como dos padrões foram adicionada por poço (Figura 15 página 56), metodologia foi adaptada de Soares e colaboradores (2008), na segunda, placa 1 e placa *swab* 1, os poços foram substituídos por gotas de 10 μ L. Independente do processo realizado, durante a incubação por 24 horas para *C. albicans* e 48 horas para *S. mutans* a 37°C, as soluções difundem-se para o meio de cultura podendo alterar o crescimento microbiano. As placas contendo *S. mutans* foram mantidas em anaerobiose durante todo o período de incubação. As leituras foram realizadas em tempos de 24 h para *C. albicans* e em 48 h para *S. mutans*, de acordo com o tempo de crescimento dos microorganismos estudados.

O efeito inibitório sob o crescimento microbiano foi avaliado a partir da presença de zonas de inibição (zonas claras) na área onde foram depositadas as soluções teste como indicado por Meng e colaboradores (2009) e Yang e colaboradores (2007). O tamanho da zona de inibição foi medida (mm) para posterior análise e comparação entre os padrões de tetrafluoreto de titânio, clorexidina e nistatina, a montmorilonita de sódio não intercalada e os novos derivados nanométricos preparados.

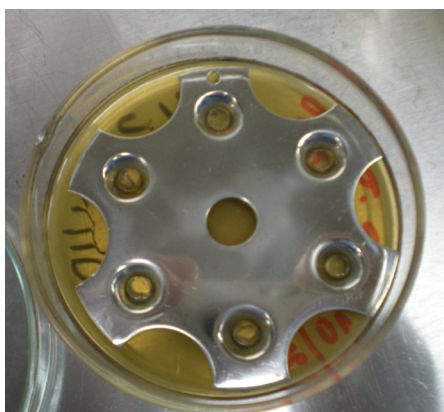


Figura 15: Confecção de poços para a análise de halo de inibição

3.8 TRATAMENTO ESTATÍSTICO

O tratamento estatístico para avaliar a significância entre as diferentes concentrações e tempos propostos para o desenvolvimento dos nanossistemas foi realizada através do cálculo de valor de p utilizando *Two Way Analysis of Variance* (ANOVA) utilizando o SigmaPlot®. Os cálculos de desvio padrão foram realizados utilizando o MS Excel®.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DAS SOLUCÕES FLUORETADAS

As soluções de substâncias fluoretadas testadas quanto à sua atividade antimicrobiana estão descritas na Tabela 4, página 57, com suas devidas concentrações requeridas indicadas em ppm de fluoreto. Essas foram caracterizadas em termos de seu pH e concentração em ppm de fluoreto livre.

Tabela 4: Características das soluções fluoretadas para a análise da atividade antimicrobiana de substâncias fluoretadas.

Substância Fluoretada	Concentração (ppm)	pH	Medida (mV)	Concentração (ppm)
NaF	500	6,743	-49	512,86
	900	7,126	-63	870,96
	1500	7,314	-77	1479,11
	22600	9,813	-144	18197,01
MFP	500	7,126	-35	302
	900	7,071	-49	512,86
	1500	7,038	-63	870,96
	22600	6,615	-46	457,09
TiF ₄	500	2,417	-28	234,42
	900	2,178	-38	338,84
	1500	1,946	-48	489,78
	22600	0,846	-32	269,15
H ₂ O MilliQ	-----	4,792	+205	0,037
PBS	-----	7,555	+103	1,70

Para o doseamento de flúor foi preparada inicialmente uma reta de calibração com potenciômetro acoplado ao eletrodo seletivo para íon fluoreto que está representada na Figura 16 página 58. Essa reta de calibração possui coeficiente de correlação $R = 0,9991$, e a equação de reta expressa por $y = - 61,48X + 113,69$, sendo a reta tida como linear e adequada para quantificação de fluoreto em solução.

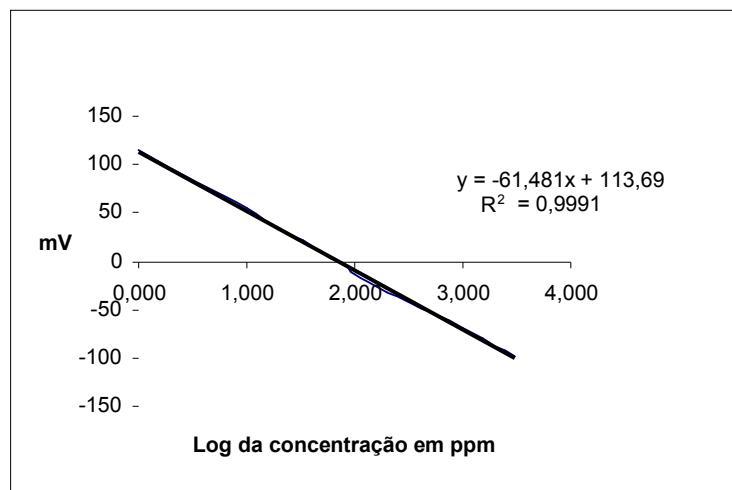


Figura 16: Reta de calibração obtida com soluções de fluoreto de sódio em água MilliQ

Para caracterização das soluções fluoretadas mostrou-se necessária a avaliação do pH das soluções, isto porque é sabido que um dos parâmetros que poderia ser apontado como limitante à aplicação profissional é o pH extremamente ácido.

Avaliando-se o pH das soluções de tetrafluoreto de titânio, pode-se justificar que estudos *in vitro* mostram uma inibição do efeito erosivo do esmalte, que possivelmente não é apenas do fluoreto e sim sua ação conjunta ao titânio. O baixo pH das soluções de tetrafluoreto de titânio tem sua vantagem pois favorece as ligações do titânio e oxigênio com o grupo fosfato, que leva à formação de uma película de dióxido de titânio na superfície do esmalte (MAGALHÃES e colaboradores, 2008), sendo esse pH baixo um parâmetro que dificulta a aplicação clínica profissional (EXTERKATE e TEN CATE, 2007) sendo um risco ao paciente. Um novo derivado de tetrafluoreto de titânio com pH mais elevado, mas ainda capaz de liberar titânio no meio, se tornaria uma alternativa promissora na prevenção da cárie. Nas demais soluções os valores de pH mostraram-se próximos a 7,0, salvo as soluções de 22600 ppm de fluoreto de sódio e de tetrafluoreto de titânio, que apresentam valores extremos de pH de 9,813 e 0,846, respectivamente, o que excluiria essas soluções para os testes de atividade antimicrobiana.

A concentração apresentada em ppm de fluoreto não possui uma relação direta entre a concentração esperada e a alcançada nas soluções de tetrafluoreto de titânio e MFP. Porém, esses resultados mostram-se lineares como observado nas Figuras 17 e 18, página 59, o que possibilita o seu uso da potenciometria iônica.

seletivo para quantificar fluoreto livre gerado. A concentração de 22600 ppm encontra-se fora da curva por ser uma suspensão, sendo a mesma excluída do estudo.

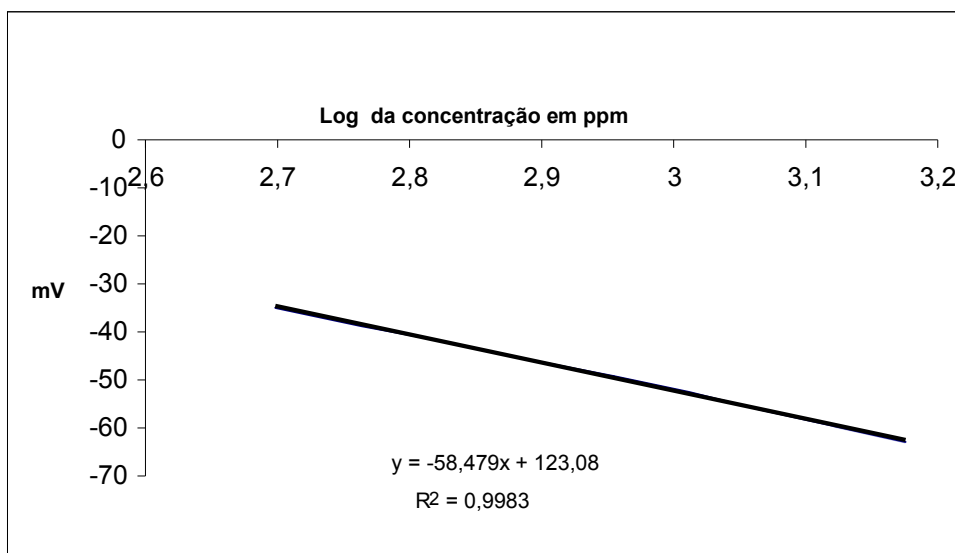


Figura 17: Medida da concentração das soluções de MFP

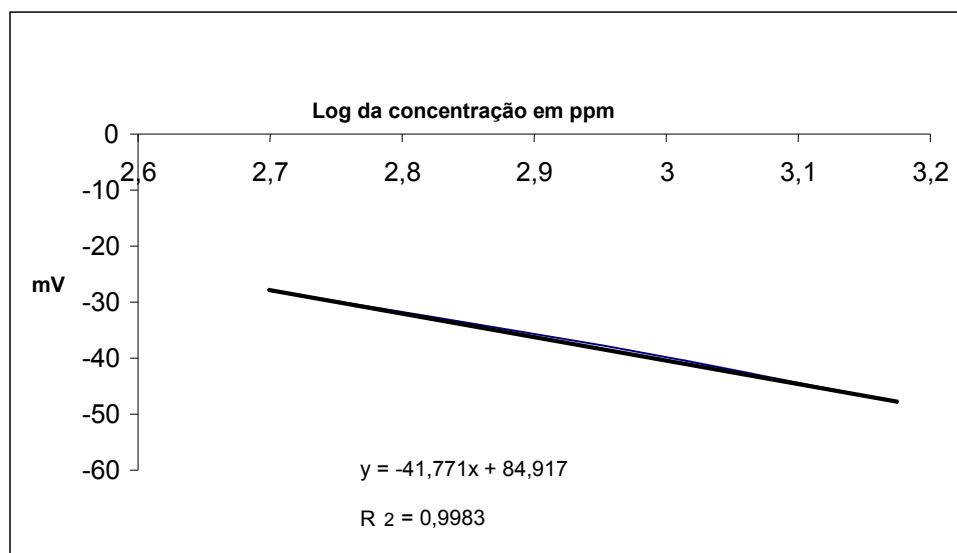


Figura 18: Medida da concentração das soluções de tetrafluoreto de titânio

Devido à necessidade de dissociação do monofluorofostato de sódio em monofluorofosfato (MFP) para a leitura de fluoreto, faz-se necessário a hidrólise prévia do composto (SOUZA, SOARES e PIRES, 2005; BILLINGTON e colaboradores, 2004; TZANAVARAS e THEMELIS, 2001). O MFP, íon resultante da hidrólise, pode auxiliar, por exemplo, na formulação de dentífricos, fazendo com que

essa substância tenha uma vantagem sobre outras substâncias fluoretadas, como fluoreto de sódio e fluoreto estanoso, por não produzir íon fluoreto que precipita em presença de substâncias abrasivas presentes nessa formulação. O Monofluorfosfato de sódio libera o íon FPO_3^{-2} (MFP) cujo sal de cálcio é solúvel, sendo então indicado o uso de carbonato de cálcio nas formulações com MFP (SOUZA, SOARES e PIRES, 2005).

Esse resultado, que poderia ser uma desvantagem do MFP, torna-se totalmente vantajoso dependendo da formulação aplicada. Sendo assim, pode-se dizer que essa dificuldade de dissociação poderia indicar uma estabilidade adicional da substância e, consequentes resultados mais eficazes, justificando a aplicação de suas soluções aquosas.

Em relação ao tetrafluoreto de titânio, pode-se justificar que sua ação protetora é atribuída à formação de uma película resistente a ácido, que oferece a proteção mecânica da superfície bem como o aumento da absorção de flúor, diminuindo a desmineralização do esmalte (WIEGAND e colaboradores, 2008 a e b).

O mecanismo de ação do tetrafluoreto de titânio ocorre não somente pela formação de fluorapatita mas também devido a película de dióxido de titânio que fica adsorvida sobre o esmalte (MORAIS, SOUZA e CHEVITARESSE, 2000). Sendo assim, o efeito não é apenas associado ao fluoreto livre, mas também ao titânio. O processo de hidrólise em soluções aquosas é descrito com a formação de muitos complexos de flúor (NÓBREGA e colaboradores, 2008). Esses complexos podem ser responsáveis pela atividade do tetrafluoreto de titânio, o que não seria mostrado apenas com o teor de fluoreto livre, doseado pelo processo de potenciometria, mas sim pela sua aplicação nas cepas. Logo, a inserção de tetrafluoreto de titânio nas lamelas de montmorilonita de sódio poderia levar a produção de diferentes complexos, tal qual se observa para o tetrafluoreto de titânio livre, que possuiriam a mesma atividade contando porém com a capacidade da argila adsorver os microorganismos auxiliando na atividade do composto (MENG e colaboradores, 2008).

Desta forma justifica-se a utilização dessas soluções, de MFP e tetrafluoreto de titânio, mesmo que, frente ao seu doseamento não se encontra a concentração

de fluoreto livre esperada, visto a simulação mais real do que se observa com novo derivado de montmorilonita sódica com tetrafluoreto de titânio, buscando-se evidenciar a atividade antimicrobiana das mesmas.

4.2 CARACTERIZAÇÃO DOS NOVOS DERIVADOS NANOMÉTRICOS

4.2.1 Derivados da intercalação de tetrafluoreto de titânio em montmorilonita de sódio

Inicialmente utilizou-se a análise de difração de raios-X somada ao cálculo de rendimento de intercalação, analisado por potenciometria íon seletivo, para se determinar as condições ideais de intercalação. Como padrão se considera o espaçamento interlamelar medido para a montmorilonita sódica isoladamente, o qual se encontra em 13,81 Å, valor que se enquadra nos citados por Mignon e colaboradores (2010) onde indica-se uma variante entre 12 à 19 Å e aproximando-se do encontrado por Macedo-Fonsêca, Silva e Souto-Maior, ou seja, 14,2 Å.

Para os resultados da intercalação de montmorilonita de sódio com tetrafluoreto de titânio, preparados como descrito no item 3.2, os padrões de difração foram divididos de acordo com a capacidade de troca catiônica testada e esses são representados nas Figuras 19 e 20, página 62 e Figura 21, página 63.

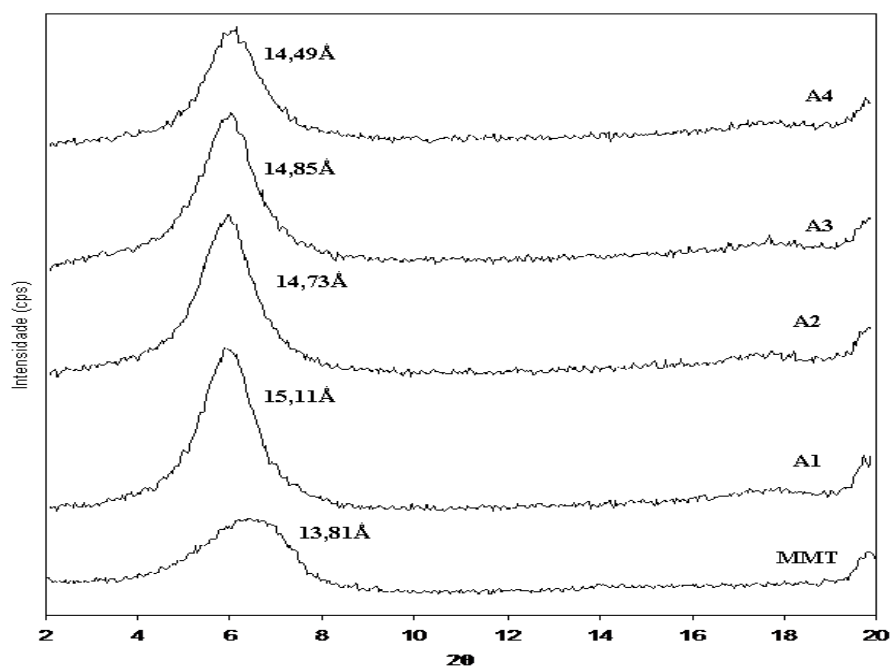


Figura 19: Padrão de difração da montmorilonita de sódio e seus derivados com tetrafluoreto de titânio, 60% em relação a CTC em diferentes tempos reacionais.

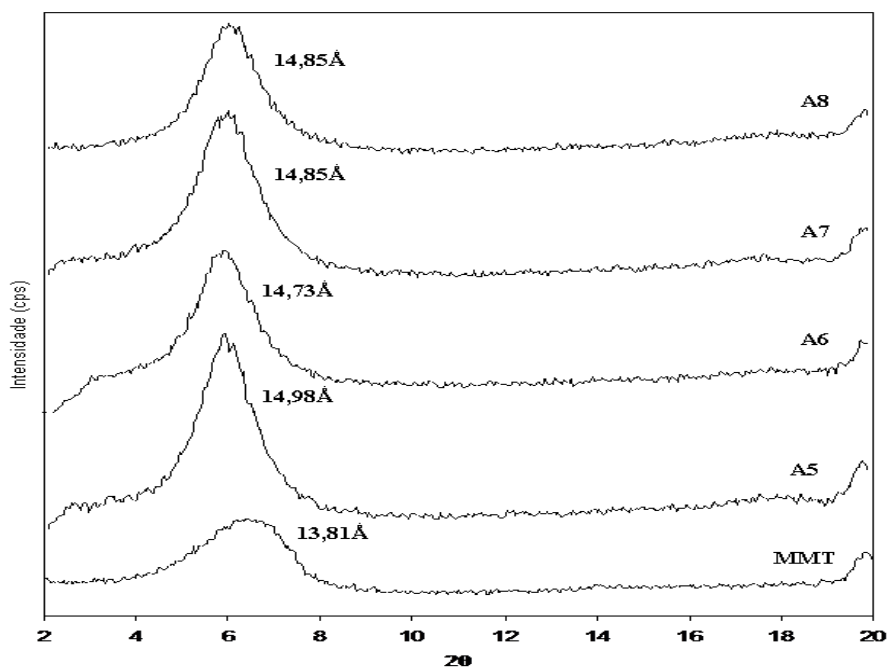


Figura 20: Padrão de difração da montmorilonita de sódio (MMT) e seus derivados com tetrafluoreto de titânio, 80% em relação a CTC em diferentes tempos reacionais.

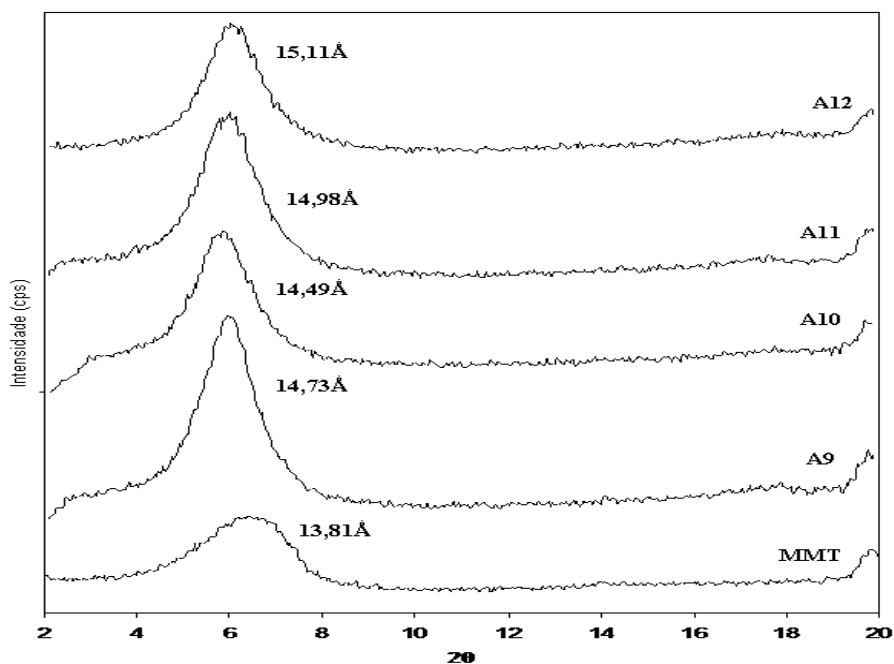


Figura 21: Padrão de difração da montmorilonita de sódio (MMT) e seus derivados com tetrafluoreto de titânio, 100% em relação a CTC em diferentes tempos reacionais.

Na análise de DRX o valor de 2θ é o fator indicativo do processo de intercalação, isso se justifica, pois a diminuição no valor do ângulo de difração associa-se ao aumento do espaçamento interlamelar, o que indica o sucesso do processo de intercalação do ativo (ZHANG e colaboradores, 2009). Observa-se, entre os padrões de difração dos derivados de tetrafluoreto de titânio, que houve a diminuição no valor de 2θ quando comparado a montmorilonita de sódio não intercalada. O cálculo de rendimento foi realizado indiretamente por potenciometria íon seletivo com o doseamento do sobrenadante após centrifugação. Esses resultados foram apresentados na Tabela 5 página 64.

Tabela 5: Espaçamento interlamelar dos derivados fluoretados

Derivado	2 θ (°)	Espaçamento Interlamelar (Å)	Rendimento (%)
Montmorilonita Sódio	6,55	13,81	----
A1	5,85	15,11	35
A2	6,00	14,73	36
A3	5,95	14,85	37
A4	6,10	14,49	36
A5	5,90	14,98	35
A6	6,00	14,73	38
A7	5,95	14,85	40
A8	5,95	14,85	41
A9	5,90	14,98	42
A10	6,10	14,49	33
A11	5,90	14,98	50
A12	5,85	15,11	48

De acordo com Meng e colaboradores (2009) e Yang e colaboradores (2007), o aumento do espaçamento interlamelar é o indicativo de um produto intercalado. Avaliando os padrões de difração e espaçamento interlamelar desses novos derivados para a seleção de um melhor ponto, nota-se que os derivados não apresentam diferença significativa entre si, por isso, o tempo reacional de uma hora mostra-se suficiente.

Confrontando os valores do espaçamento interlamelar nas diferentes capacidades de troca catiônicas propostas (Tabela 5 página 64) pode-se observar que não houve diferença significativa entre as CTC encontrando-se um valor de P de 0,799. Sendo assim, 60% em relação a CTC seria a melhor concentração de trabalho justificada pelo menor gasto de material, menor custo no processo. Entre os diferentes tempos reacionais não houve diferença significativa, valor de P = 0,239, sendo por isso o tempo de 1 h o mais adequado para ser apontado como melhor tempo reacional pelo menor tempo de preparo do nanossistema. Esses resultados apontam o derivado A1 como melhor ponto.

Porém frente aos resultados de rendimento indireto esse derivado, A1, não é o que apresenta o maior rendimento, porém se os valores estatísticos, referentes ao espaçamento interlamelar, não apontam uma diferença significativa dependente de CTC e tempo reacional, acredita-se que 35% de rendimento seja uma boa média e que valores muito superiores a esse podem estar associados a

adsorção do TiF_4 que não é o requerido na proposta de desenvolvimento dos derivados fluoretados. Sendo assim, o derivado A1 foi escolhido como melhor ponto e foi, então, preparado em triplicata (Figura 22 página 65) e caracterizado por DRX, DSC e FTIR.

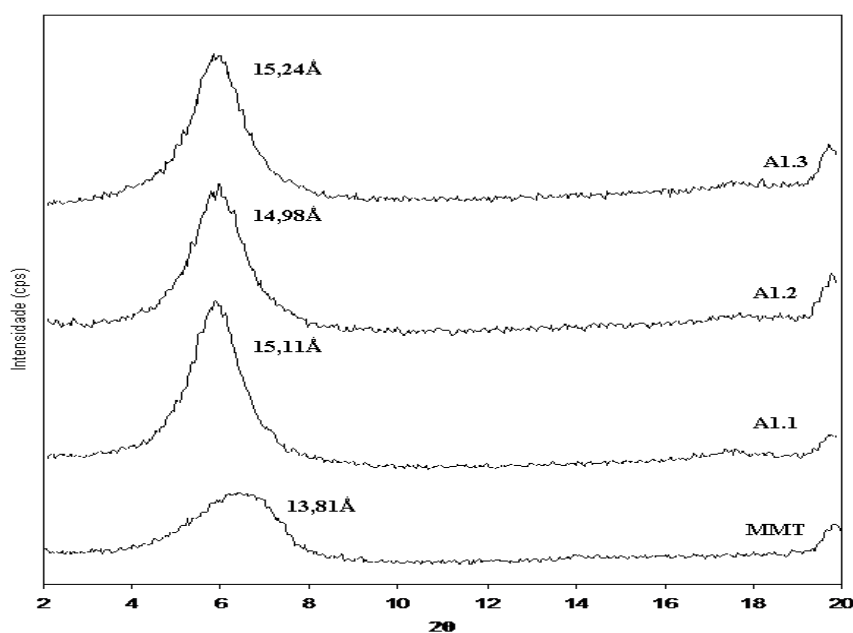


Figura 22: Padrão de difração da triplicata do derivado A1 referente a intercalação de montmorilonita de sódio com tetrafluoreto de titânio em tempo reacional de 1 h

Conforme observado na Figura 22, página 67, o valor de espaçamento interlamelar médio foi de $15,11 \text{ \AA} \pm 0,13$, similar ao inicialmente obtido para o experimento A1, assim como, o rendimento médio de intercalação observado se manteve próximo a $35\% \pm 0,03$, garantindo a reprodutibilidade do processo de preparação deste novo nanomaterial.

Segundo Yang e colaboradores (2007) e Meng e colaboradores (2009) a monocamada da argila apresenta um tamanho aproximado de $0,96 - 0,97 \text{ nm}$. Quando esse valor é subtraído do espaçamento interlamelar encontrado, tem-se, aproximadamente, o tamanho da molécula intercalada (YANG e colaboradores, 2007; MENG e colaboradores, 2009). Levando-se em conta um valor de $0,96 \text{ nm}$, ao subtrair-se do espaçamento lamelar médio de A1, que em nanômetros apresenta o valor de $1,51 \text{ nm}$, pode-se dizer que o tamanho ocupado pelo TiF_4 é de $0,55 \text{ nm}$. Essa hipótese nos levaria a um resultado indesejável uma vez que íon Ti^{+4} mede $0,69 \text{ nm}$ (JUANG e colaboradores, 2004) e o valor aqui encontrado para todo o

composto, TiF_4 , seria de 0,55 nm. Contudo, segundo Juang e colaboradores (2004), que avaliaram a troca catiônica da montmorilonita de sódio por Fe^{+2} , Cr^{+3} e Ti^{+4} , mostram que possivelmente o íon Ti^{+4} é trocado pelo dobro da CTC, ocupando o espaço do Si^{+4} na camada tetraédrica da argila. Há, ainda, a hipótese de que o TiO_2 , provavelmente formado, se alojaria na superfície bem como no espaçamento interlamelar. Porém, Juang e colaboradores (2004) apresentam resultados que levam a crer que a substituição do Si^{+4} na camada tetraédrica é mais condizente com o processo de intercalação do Titânio, resultado esse que corroboram com o encontrado em nosso estudo. Sendo assim, pode-se sugerir o processo de intercalação, uma vez que entre as lamelas encontraríamos apenas Fluoreto e esse espaçamento de 15,11 Å condiz com a argila fluoretada desenvolvida por Zhang e colaboradores (2009), os quais encontraram um espaçamento interlamelar de 15 Å. Pode-se dizer que, frente à análise de DRX, o derivado A1 é resultante de um processo de intercalação.

Verificando a reprodutibilidade do experimento de intercalação, procedeu-se a caracterização adicional do nanocompósito preparado. Na análise de DSC, pode-se observar que os derivados de tetrafluoreto de titânio apresentam padrões calorimétricos semelhantes ao da montmorilonita de sódio não intercalada, o que, a princípio, não anula uma possível intercalação (Figura 23, página 66).

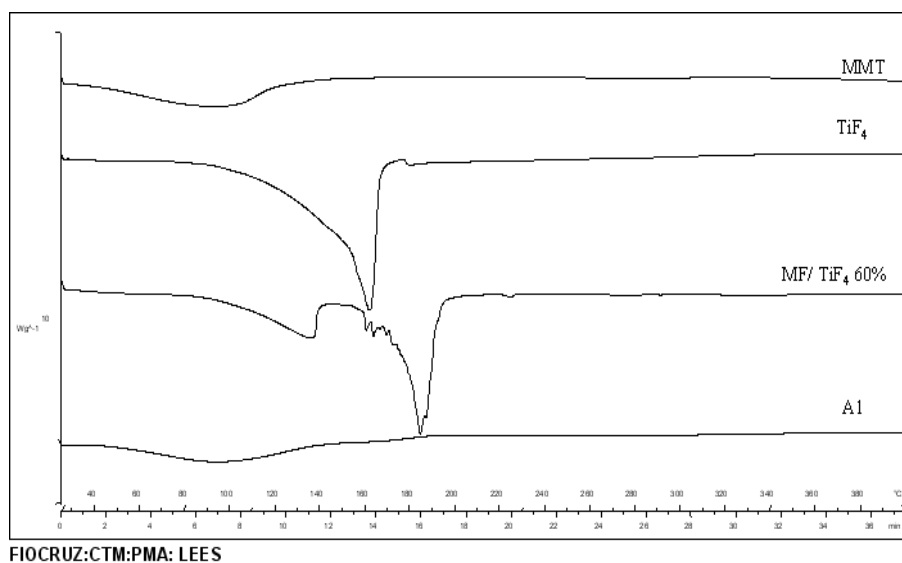


Figura 23: Curva de DSC da montmorilonita de sódio não intercalada, tetrafluoreto de titânio isoladamente, a mistura física simulando 60% CTC e o derivado A1.

O endoterma apresentado a 100°C é característico da perda de água da montmorilonita sódica. O endoterma do tetrafluoreto de titânio não é observado no padrão calorimétrico do derivado A1. Isso possivelmente acontece devido a (1) baixa concentração do ativo por grama de argila, como indicado por Rocha (2008) em seu estudo de inclusão de dapsona em bentonita sódica, ou (2) pela inserção do tetrafluoreto de titânio no interior das lamelas da montmorilonita sódica em substituição ao silício (JUANG e colaboradores, 2004) o que torna a fusão do sólido do TiF_4 um endoterma inexistente. Essa análise, embora seja importante no processo de caracterização, não foi conclusiva.

A finalidade de caracterizar os novos derivados por FTIR é avaliar se há alguma modificação na estrutura inicial da montmorilonita e moléculas hóspedes. Quando se intercala um ativo na argila sódica deseja-se apenas mantê-lo entre suas lamelas sem que sua estrutura seja modificada. Para isso, deve-se avaliar todas as bandas que são características na montmorilonita de sódio não intercalada e das moléculas hóspedes. O resultado da análise de FTIR do derivado de tetrafluoreto de titânio está representado na Figura 24 página 67.

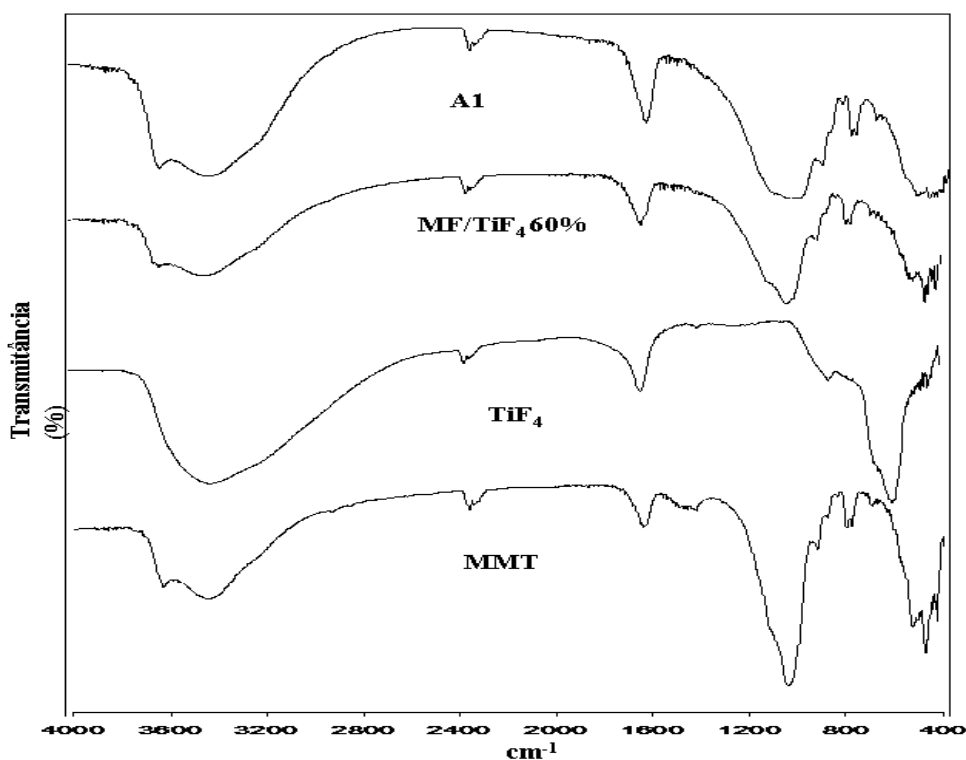


Figura 24: Espectroscopia de infravermelho da montmorilonita de sódio não intercalada, tetrafluoreto de titânio isoladamente, mistura física simulando 60% da CTC e o derivado A1.

A montmorilonita apresenta uma banda característica do estiramento de OH da água adsorvida que é observada em 3462 cm^{-1} . A mesma banda foi descrita por Meng e colaboradores (2009) e Joshi e colaboradores (2009) em 3400 cm^{-1} , e apresentada por Yang e colaboradores (2007), na faixa 3420 cm^{-1} . Em 3635 cm^{-1} tem-se a banda relacionada ao alongamento do grupo hidroxila que pode estar relacionado à ligação Al-OH que foi descrita por Meng e colaboradores (2009) e Joshi e colaboradores (2009) na faixa de 3620 cm^{-1} . Os ombros e amplitudes das bandas nessa faixa da ligação de OH, se dá pelos diversos grupos de hidroxila existentes na estrutura da montmorilonita (MENG e colaboradores, 2009).

Em 1114 cm^{-1} e 1047 cm^{-1} encontram-se as bandas da vibração do silicato nas camadas da montmorilonita, sendo Si-O fora da superfície e Si-O dentro da superfície, respectivamente, encontradas por Meng e colaboradores (2009) e por Joshi e colaboradores (2009) em 1115 cm^{-1} e 1035 cm^{-1} respectivamente. As vibrações de flexão estão em 921 cm^{-1} , 898 cm^{-1} e 854 cm^{-1} sendo essas referentes a Al-Al-OH, Al-Fe-OH e Al-Mg-OH, respectivamente, como encontradas por Meng e colaboradores (2009) e Joshi e colaboradores (2009) em 915 cm^{-1} , 875 cm^{-1} e 836 cm^{-1} respectivamente. Por outro lado, Yang e colaboradores (2007) não descrevem a deformação de Al-Fe-OH, mas apresentam em 915 cm^{-1} e 841 cm^{-1} como deformações de Al-Al-OH e Al-Mg-OH, respectivamente. Em 696 cm^{-1} e 528 cm^{-1} são encontradas bandas que caracterizam associação de Al-O e Si-O fora da superfície e Al-O-Si, respectivamente, que foram descritos por Yang e colaboradores (2007) com sinais em 624 cm^{-1} e 524 cm^{-1} . Os resultados de FTIR observados na montmorilonita de sódio corroboram com os descritos por Yang e colaboradores (2007), Meng e colaboradores (2009) e Joshi e colaboradores (2009).

Ao avaliar o resultado referente ao tetrafluoreto de titânio, pode-se dizer que a dificuldade em se avaliar a área de absorção do Ti-F se deve ao fato de que a sua absorção ocorre em uma faixa de grande absorção entre 400 cm^{-1} – 700 cm^{-1} . Acredita-se que em torno de 596 cm^{-1} é observada a ligação mais fortes referentes a Ti-F, embora é comum encontrar uma ligação mais fraca perto de 462 cm^{-1} - 504 cm^{-1} (CLARK e ERRINGTON, 1967). Pode-se ressaltar ainda, que se houver a formação de Ti-O, a faixa de absorção ocorre entre 200 cm^{-1} - 400 cm^{-1} (DICKSON, GOWLING e BENTLEY, 1967).

O derivado deveria apresentar as bandas que são encontradas na montmorilonita de sódio não intercalada e aquelas presentes no TiF_4 com pequenos deslocamentos, indicando que não houve mudança na estrutura da mesma e sim uma intercalação do tetrafluoreto de titânio entre as lamelas. Observando o resultados referentes ao derivado A1 (Figura 24 página 67), conclui-se que houve um processo de intercalação, pois são encontradas todas as bandas referentes a montmorilonita de sódio, bem como algumas referentes ao tetrafluoreto de titânio, apesar destes se apresentarem com intensidade bem menor, conforme observado na Figura 24, página 67.

4.2.2 Derivados da intercalação de gluconato de clorexidina em montmorilonita de sódio

Na busca de novas terapias para patologias da cavidade bucal, observa-se na intercalação de clorexidina com montmorilonita sódica, uma alternativa para aumentar sua estabilidade, prolongar sua liberação e aumentar sua eficácia. A proposta de inserção de clorexidina em argila sódica se justifica por estudos anteriores como o de Yang e colaboradores (2007) e Meng e colaboradores (2008 e 2009).

Para os resultados da intercalação de montmorilonita de sódio com clorexidina, como descrito no item 3.3, os padrões de difração foram divididos de acordo com a capacidade de troca catiônica testada e esses são representados nas Figuras 25 e 26, página 70 e Figura 27, página 71.

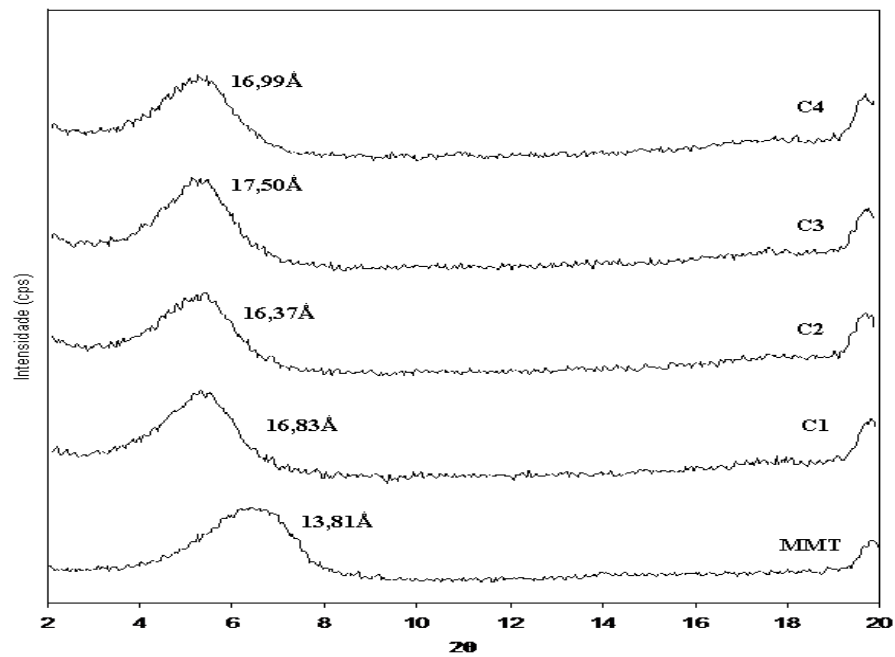


Figura 25: Padrão de difração dos nanocompósitos de montmorilonita de sódio (MMT) com gluconato de clorexidina, 60% em relação a CTC nos diferentes tempos reacionais estudados.

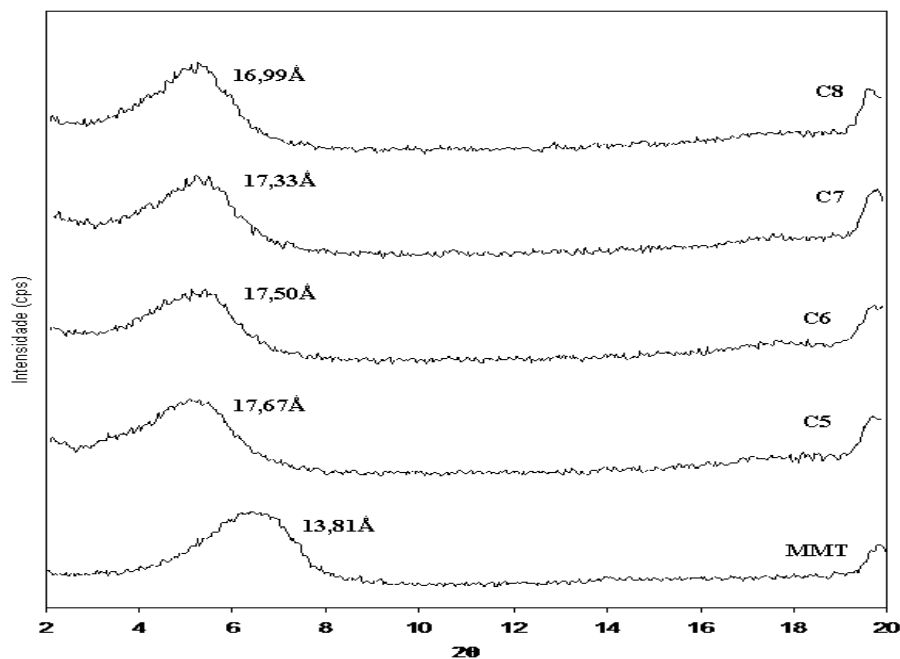


Figura 26: Padrão de difração dos nanocompósitos de montmorilonita de sódio (MMT) gluconato de clorexidina, 80% em relação a CTC nos diferentes tempos reacionais estudados.

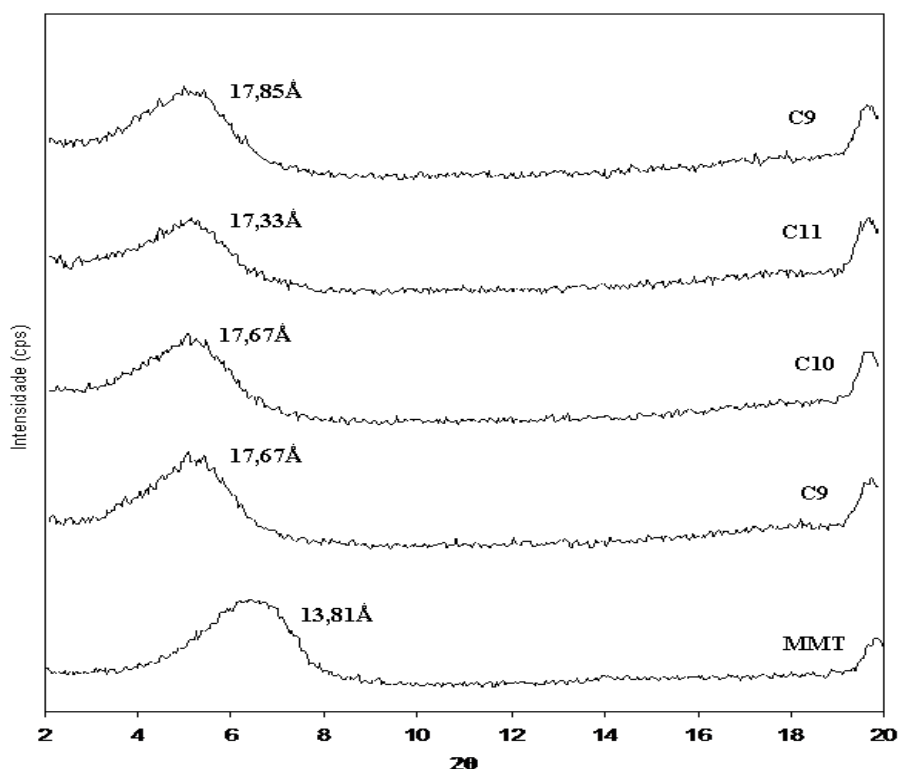


Figura 27: Padrão de difração dos nanocompósitos de montmorilonita de sódio (MMT) com gluconato de clorexidina, 100% em relação a CTC nos diferentes tempos reacionais estudados.

Observa-se um deslocamento significativo dos registros dos nanocompósitos, quando comparado ao padrão de montmorilonita de sódio nos experimentos de intercalação com clorexidina, logo, um aumento no espaçamento interlamelar característico de uma intercalação. Porém, em uma análise mais crítica, pode-se dizer que não há diferença significativa entre os nanocompósitos nas diferentes condições reacionais propostas. Assim, foi utilizado o cálculo de rendimento indireto para auxiliar na determinação de um melhor ponto de intercalação. Para tal, fez-se necessário preparar uma reta de calibração da clorexidina (Figura 28, página 72) e os resultados foram apresentados na Tabela 6, página 72.

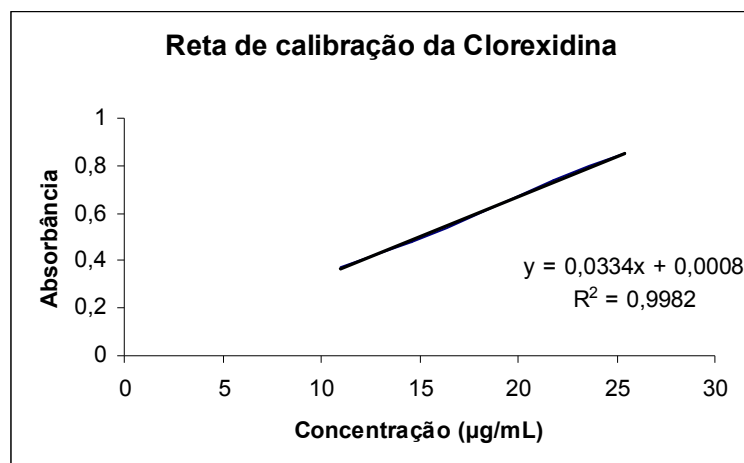


Figura 28: Reta de calibração da clorexidina

A reta de calibração mostrou-se linear, com um coeficiente de correlação R^2 de 0,9982, e adequada para quantificação de clorexidina, visto apresentar-se linear na faixa de concentração de clorexidina observada nos experimentos de intercalação.

Tabela 6: Espaçamento interlamelar dos derivados de clorexidina

Derivado	2θ (°)	Espaçamento Interlamelar (Å)	Rendimento (%)
Montmorilonita Sódio	6,55	13,81	----
C1	5,25	16,83	71
C2	5,40	16,37	71
C3	5,05	17,50	70
C4	5,20	16,99	79
C5	5,0	17,67	50
C6	5,05	17,50	58
C7	5,10	17,33	61
C8	5,2	16,99	76
C9	5,0	17,67	36
C10	5,0	17,67	45
C11	5,1	17,33	46
C12	4,95	17,85	50

É importante saber que a forma como a clorexidina se liga à lamela da montmorilonita também deve ser considerada, uma vez que, essa pode se posicionar de forma a aumentar o espaçamento interlamelar sem estar, contudo, em grande concentração entre as lamelas. Essas diferentes conformações de cadeias intercaladas são comentadas por Rocha (2008) quando cadeias de alquilaminas são intercaladas na argila, que pode usar C2 (Tabela 6 página 72) como exemplo, onde o derivado apresenta um menor espaçamento interlamelar, porém seu rendimento é

alto (71%) em relação aos outros derivados propostos, o que pode ser indicativo de adsorção da clorexidina.

Visto que estatisticamente não foi encontrada uma diferença significativa entre as diferentes capacidades de troca catiônica (Tabela 6 página 73), $P = 0,112$, aponta-se 60% em relação a CTC como a concentração mais adequada. Entre os tempos reacionais propostos também não houve uma diferença significativa ($P = 0,899$), quanto ao espaçamento interlamelar, o que apontaria C1 como melhor ponto nos derivados de clorexidina sendo a justificativa a mesma para o processo de TiF_4 . Porém, frente aos valores de rendimento nota-se que o C3 apresenta um menor rendimento, embora com valor alto de 70%, o que a acreditar que como nos espaçamentos não há diferenças significativas entre os derivados propostos, rendimentos muito altos poderiam indicar um processo de adsorção da clorexidina.

De forma a se evitar a formação de produtos adsorvidos ao invés de intercalados, elegeu-se o derivado C3, onde tem-se 60% da capacidade de troca catiônica da montmorilonita de sódio em 24 h de processo, o qual apresentou não só um bom espaçamento interlamelar como também um bom rendimento (70%), apontado-se esse como um melhor ponto entre os derivado de clorexidina.

O experimento de intercalação C3 foi repetido em triplicata apresentando um espaçamento lamelar médio de $17,05 \text{ \AA} \pm 0,42$, (Figura 29, página 74) e rendimento médio de $70\% \pm 0,02$. O espaçamento encontrado está de acordo com valores apresentado por Meng e colaboradores (2009) entre $15,1 \text{ \AA}$ a $19,4 \text{ \AA}$ e superiores aos de yang e colaboradores (2007) que encontra valores entre $14,5 \text{ \AA}$ a $16,6 \text{ \AA}$.

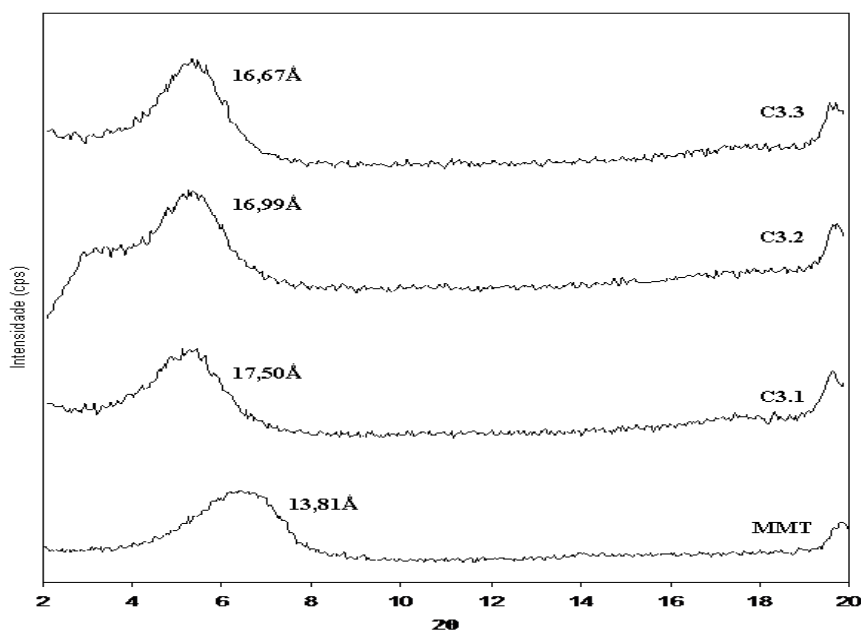


Figura 29: Padrão de difração da triplicata do derivado C3 referente à intercalação de montmorilonita de sódio com gluconato de clorexidina em tempo reacional de 24 h

Avaliando-se o tamanho da monocamada, 0,96 nm da montmorilonita subtraída do valor médio de espaçamento interlamelar do derivado C3, que refere-se a 1,70 nm, acha-se 0,74 nm sendo essa medida ligeiramente maior que a encontrada por Yang e colaboradores (2007) e Meng e colaboradores (2009) que indica um valor de 0,5 nm para a clorexidina isoladamente. O resultado encontrado esta acima do esperado, indicando que provavelmente o processo de intercalação ocorreu, porém, o arranjo da clorexidina entre as lamelas levou a um espaçamento interlamelar maior que a estrutura da clorexidina isoladamente (0,5 nm). Essa diferença na maneira com que a substância se arranja entre as lamelas foi comentada por Rocha (2008) durante a intercalação das cadeias alquilaminas.

Os resultado de DSC dos derivados de gluconato de clorexidina, bem como nos derivados de tetrafluoreto de titânio, indicam a intercalação devido ao desaparecimento dos endotermas da clorexidina em C3 (Figura 30, página 75). A clorexidina liofilizada mostra um perfil calorimétrico com endoterma entre 130°C – 140°C e outro entre 160°C-180°C. Esses endotermas não foram observados no padrão calorimétrico de C3.

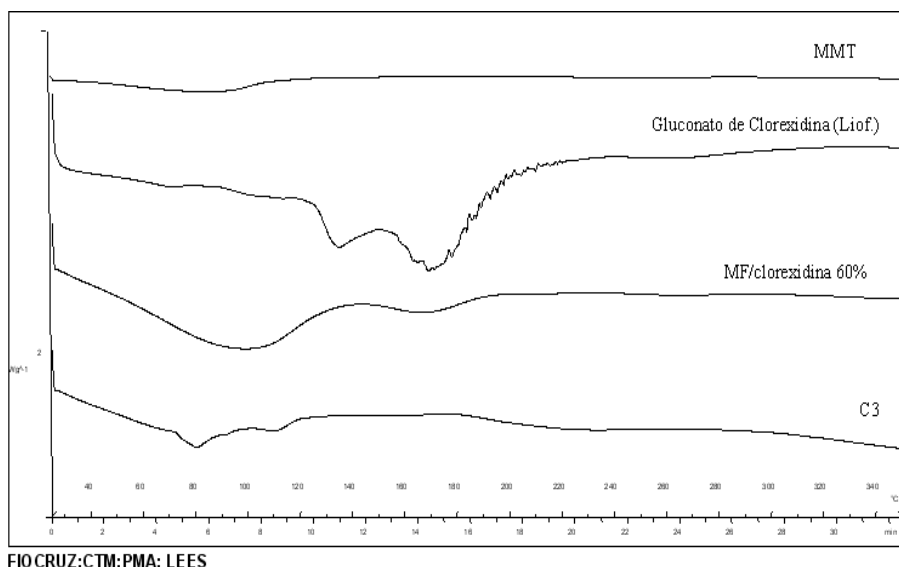


Figura 30: Curva de DSC da montmorilonita de sódio não intercalada, gluconato de clorexidina liofilizado, a mistura física simulando 60% CTC e o derivado C3.

No derivado C3 existe um endoterma suave entre 200°C-220°C que poderia indicar a saída da clorexidina intercalada, sendo essa em uma temperatura mais baixa. Esta proposta se justifica, uma vez que Carmo (2009) indicou que a saída do ativo intercalado pode ser observado nos padrões calorimétricos dos derivados em temperaturas diferentes do ativo isoladamente. O DSC não mostrou-se uma análise conclusiva para o processo de caracterização do novo derivado.

Avaliando-se o espectro de FTIR do gluconato de clorexidina (Figura 31, página 76) pode-se observar que existe uma banda em 3396 cm^{-1} e 3226 cm^{-1} correspondentes as absorções referentes a ligações alongadas do N-H e C-H do anel aromático, respectivamente. Em 2873 cm^{-1} e 2951 cm^{-1} estão as vibrações de alongamento simétricas e assimétricas do grupo metileno; e as bandas entre 1200 cm^{-1} -1600 cm^{-1} representam a absorção de ligações C-N e C-C presentes na estrutura do gluconato de clorexidina (YANG e colaboradores, 2007).

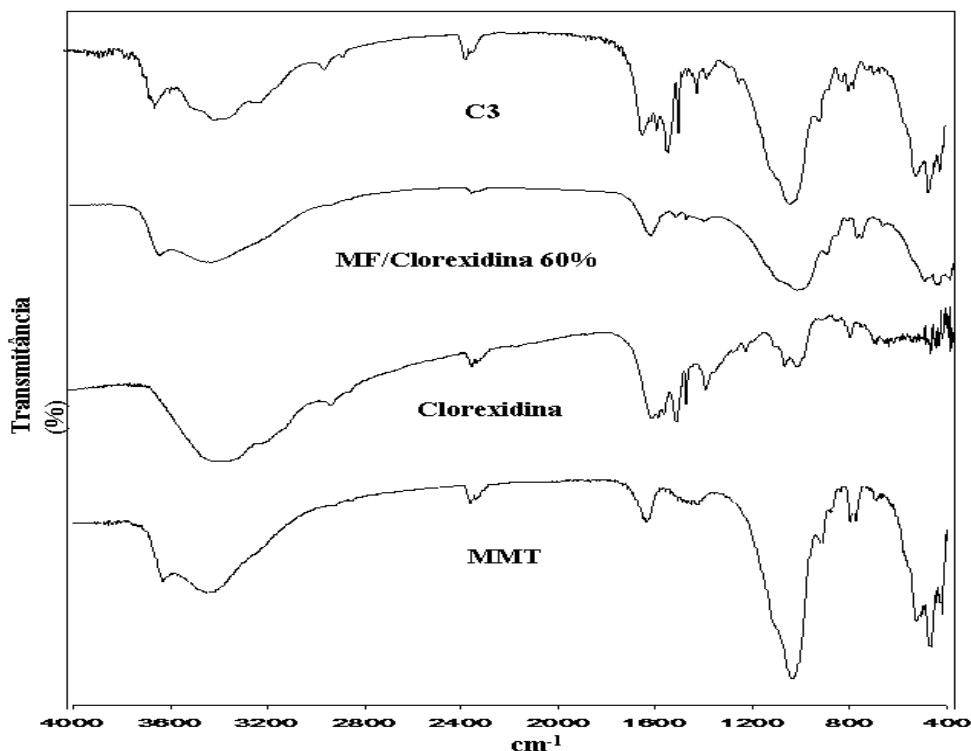


Figura 31: Espectroscopia de infravermelho da montmorilonita de sódio não intercalada, gluconato de clorexidina liofilizado, mistura física simulando 60% da CTC e o derivado C3.

O resultado de infravermelho do derivado C3 (Figura 31, página 76) sugere uma intercalação. Como já justificado nos derivados de tetrafluoreto de titânio, todas as bandas referentes à montmorilonita de sódio não intercalada estão presentes no derivado de clorexidina, em adição encontram-se bandas características da clorexidina, levemente deslocados.

Yang e colaboradores (2007) descrevem um deslocamento da banda característica do estiramento de OH da água adsorvida no derivado intercalado, em uma faixa de absorção em maior número de ondas. Segundo esse grupo de estudo, isso indica uma diminuição da hidroflicidade da superfície da montmorilonita de sódio e aumento da hidrofobicidade após a intercalação da clorexidina, esse resultado não condiz com o encontrado nesse estudo.

É importante ressaltar que o espectro referente à mistura física que simula a CTC de 60% mostra-se diferente do processo de intercalação, indicando que as reações de intercalação tem verdadeiramente um perfil diferente da simples mistura física de argila com o gluconato de clorexidina.

4.2.3 Derivados da intercalação de nistatina em montmorilonita de sódio

O experimento de intercalação de nistatina em montmorilonita sódica, busca uma terapia mais eficaz para tratamento de patologias que acometem a cavidade bucal. A proposta de um nanocompósito de nistatina visa ajustar a liberação do fármaco, que quando prolongada ajuda a mascarar o sabor desagradável da nistatina, sendo esse um obstáculo na adesão do tratamento.

Dos experimentos realizados, os padrões de difração da intercalação de nistatina com montmorilonita de sódio encontram-se representados nas Figuras 32, página 77 e Figura 33 e 34, página 78.

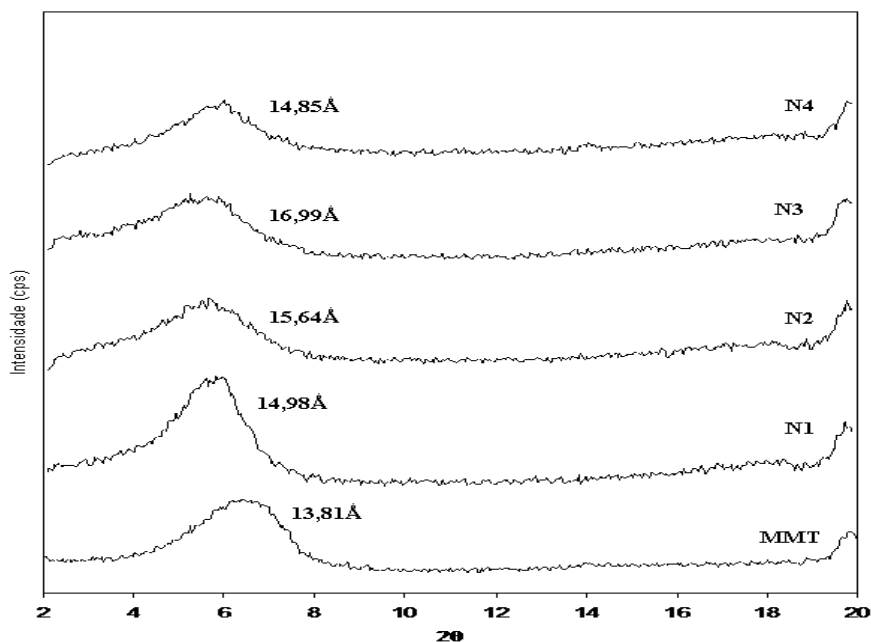


Figura 32: Padrão de difração da montmorilonita de sódio (MMT) e seus derivados de nistatina, 60% em relação a CTC em diferentes tempos reacionais.

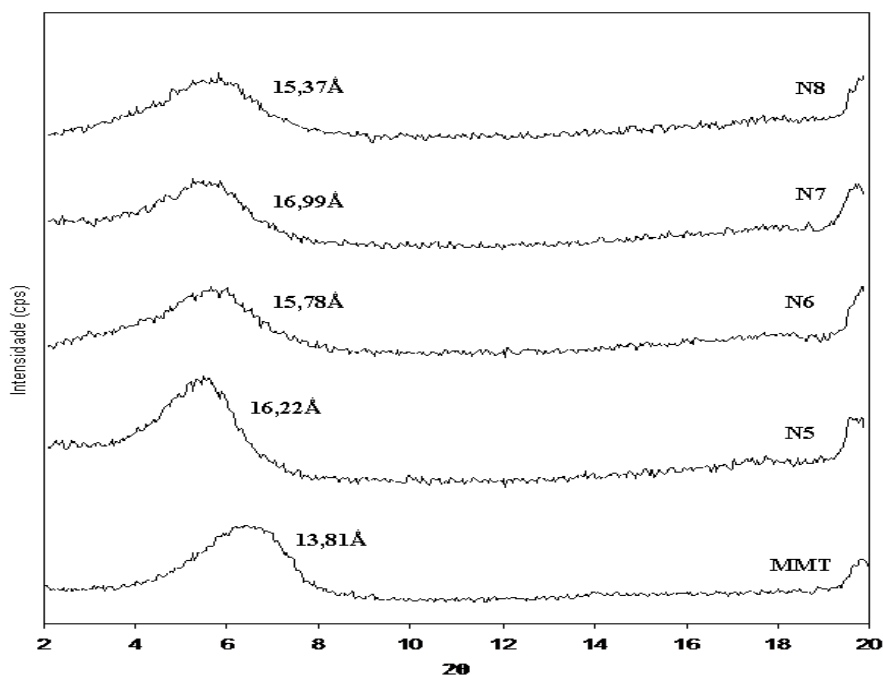


Figura 33: Padrão de difração da montmorilonita de sódio (MMT) e seus derivados de nistatina, 80% em relação a CTC em diferentes tempos reacionais.

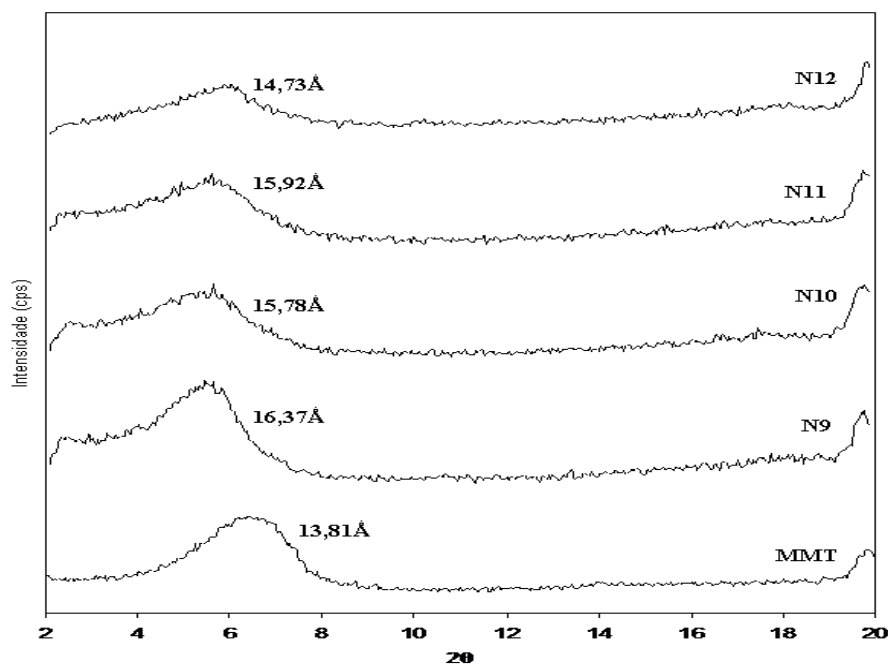


Figura 34: Padrão de difração da montmorilonita de sódio (MMT) e seus derivados de nistatina, 100% em relação a CTC em diferentes tempos reacionais.

Avaliando os padrões de difração dos derivados de nistatina, pode-se observar que em todas as condições de reação há indícios de uma intercalação devido ao deslocamento dos registros dos difratogramas em 2θ quando comparados a montmorilonita pura. Os espaçamentos interlamelares referentes a esses derivados estão descritos na Tabela 7 página 79.

Tabela 7: Espaçamento interlamelar dos derivados de nistatina

Derivado	2 θ (°)	Espaçamento Interlamelar (Å)	Rendimento (%)
Montmorilonita Sódio	6,55	13,81	----
N1	5,90	14,98	51
N2	5,65	15,64	52
N3	5,20	16,99	54
N4	5,95	14,85	46
N5	5,45	16,22	53
N6	5,60	15,78	49
N7	5,20	16,99	55
N8	5,75	15,37	43
N9	5,40	16,37	47
N10	5,60	15,78	46
N11	5,55	15,92	51
N12	6,00	14,73	44

Pelos valores encontrados nos experimentos de intercalação de nistatina em montmorilonita de sódio (Tabela 7, página 79) pode-se observar que estatisticamente não houve diferença significativa entre as CTC propostas ($P = 0,445$), indicando novamente 60% em relação a CTC como mais adequado pelo menor custo. Porém, entre os tempos reacionais o valor de P encontrado foi de 0,046 o que indica uma diferença significativa. Essa é observada entre os tempos de 24 e 48 h, sendo que, o menor tempo é o que apresenta o maior valor no espaçamento interlamelar bem maiores valores de rendimento. O derivado N3 apresentou rendimento médio de 54% destacando-se assim como o melhor ponto.

Para o cálculo de rendimento fez-se necessário a construção da reta de calibração de nistatina, apresentada na Figura 35 página 80.

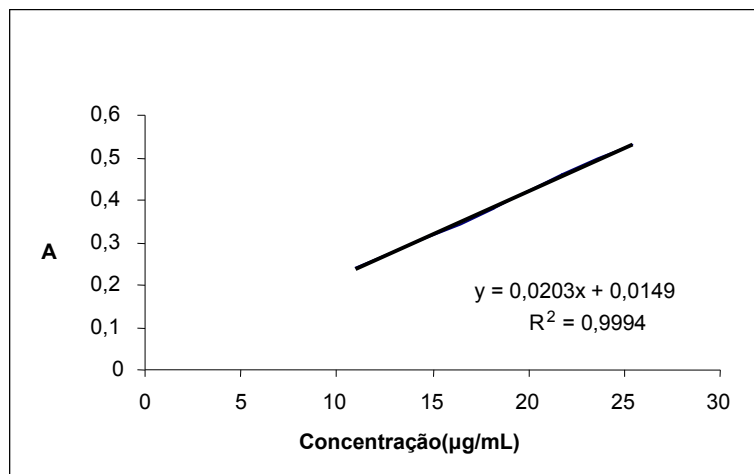


Figura 35: Reta de calibração da Nistatina

A reta de calibração obtida mostrou-se linear, apresentando um coeficiente de correlação (R^2) de 0,994, e adequada para as medidas realizadas, vistas concentrações de trabalho serem próximas as observadas nos experimentos de intercalação.

O derivado apontado como melhor ponto foi repetido em triplicata (Figura 36 página 80) e caracterizado por DRX, DSC e FTIR. O experimento N3 apresentou um espaçamento interlamelar médio de $16,63 \text{ \AA} \pm 0,38$ (Figura 36, página 80) e um rendimento médio de $54\% \pm 0,01$.

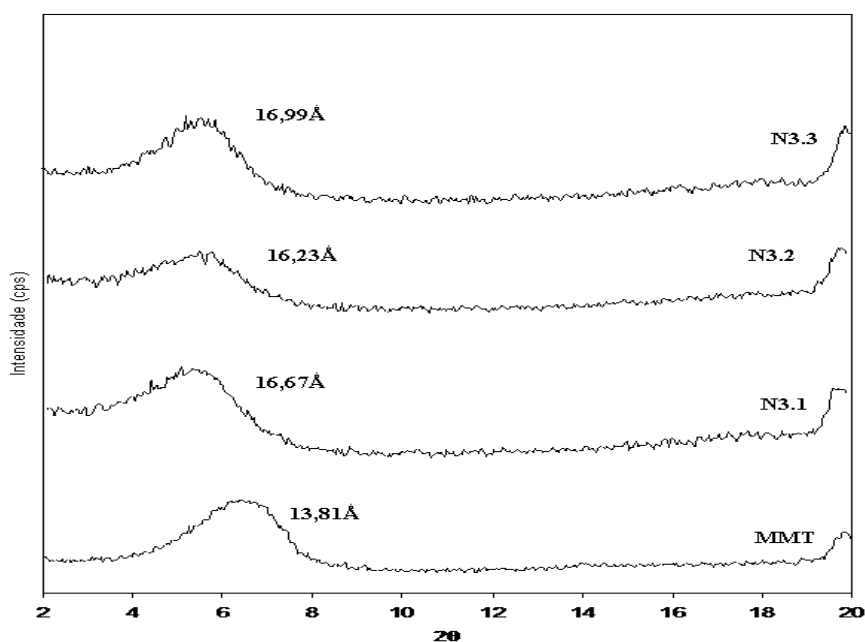


Figura 36: Padrão de difração da triplicata N3 referente à intercalação de montmorilonita de sódio com nistatina em tempo reacional de 24 h

De acordo com o padrão calorimétrico do derivado N3, pode-se sugerir intercalação. Isto é evidenciado pela ausência do endoterma característico da fusão da nistatina entre 160-180°C (Figura 37 página 81). O perfil do derivado apresenta-se bem próximo ao da montmorilonita de sódio pura com um endoterma em aproximadamente 100°C característico da água (Figura 37 página 81). A ausência do endoterma da fusão da nistatina é a evidência maior de sua intercalação, o que se confirma pela presença desta substância no nanocompósito, que pode ser observado pelo FTIR.

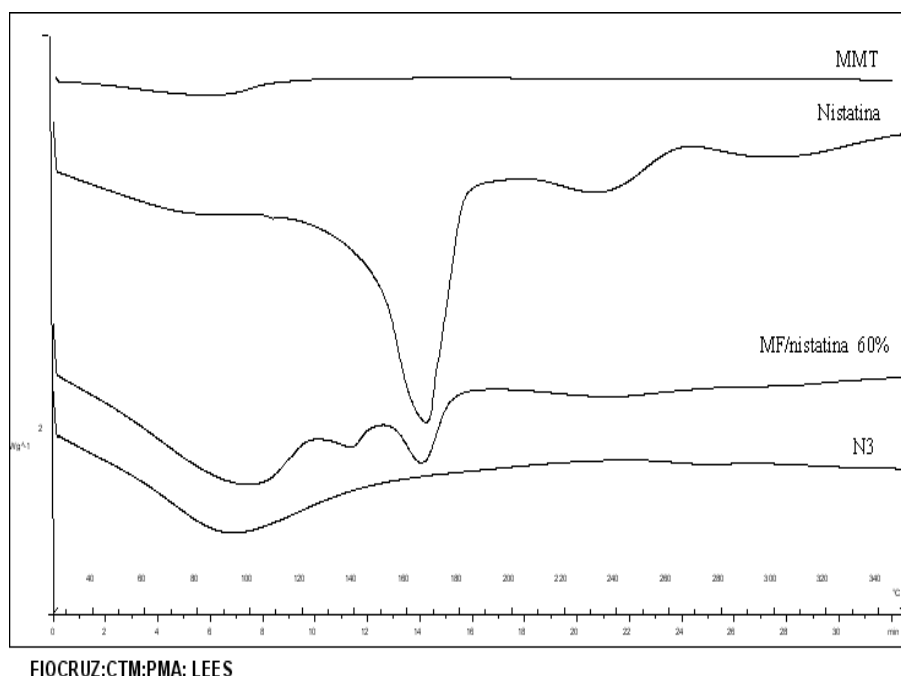


Figura 37: Curva de DSC da montmorilonita de sódio e nistatina mostrando seu comportamento isoladamente, a mistura física simulando 60%CTC e o derivado N3.

Avaliando-se o espectro de infravermelho da nistatina (Figura 38 página 82) pode-se notar que em 1008 cm^{-1} encontra-se uma banda referente ao estiramento simétrico do CH_3 ; em 1404 cm^{-1} está a banda referente a deformação simétrica de CH_3 (BRESCANSIN, 2006). As bandas referentes ao íon carboxilato encontram-se em 1575 cm^{-1} ; e em 1652 cm^{-1} apresenta-se a banda referente a lactona. O estiramento de NH e OH estão entre $3300\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$ (BRESCANSIN, 2006), apresentando-se aqui em 3437 cm^{-1} .

No espectro do derivado N3 (Figura 38 página 82) pode-se notar os sinais da montmorilonita de sódio associados aos sinais referentes a nistatina. Isso indica que ocorreu o processo de intercalação. Verifica-se, ainda, um ligeiro deslocamento das bandas características da nistatina no nanocompósito em relação à mistura física em proporção de 60% em relação a CTC sendo estes novos valores referentes à reação de intercalação.

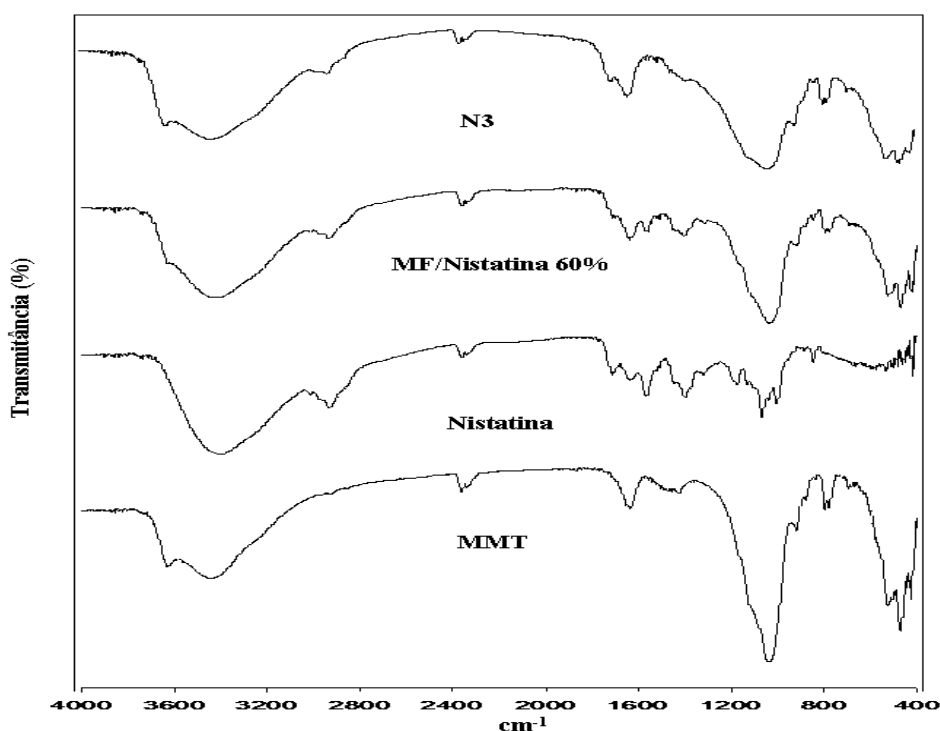


Figura 38: Espectroscopia de infravermelho da montmorilonita de sódio não intercalada, nistatina, mistura física simulando 60% da CTC e o derivado N3.

4.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

4.3.1 Análise do consumo de glicose

Os resultados relacionados ao consumo de glicose pelos microorganismos testados no presente estudo, como descrito no item 3.7.1, estão representados na Figura 39, página 84 e Figura 40, página 85. Eles já estão apresentados como consumo final de glicose incluindo assim todos os tempos medidos.

Frente às cepas de *S. mutans* (Figura 39, página 84), pode-se observar que houve um menor consumo de glicose e, conseqüente, produção de lactato, quando em presença de solução com tetrafluoreto de titânio 1500 ppm. O mesmo é

observado com cepas de *C. albicans* (Figura 40, página 85), porém, como ao final não foi encontrado lactato no meio avaliado, realizou-se a medida de etanol produzido. Segundo Nonaka e colaboradores (2005), o produto final de excreção do metabolismo bacteriano é dependente da concentração de açúcar presentes no meio, podendo seguir pela via enzimática da lactato desidrogenase, produzindo ácido láctico ou pela via enzimática da piruvato formato-liase que resultaria na excreção de ácido fórmico, ácido acético e etanol.

Estendendo-se essa capacidade de desvio da via enzimática utilizada para quebra de açúcares para os microorganismos em geral, pode-se considerar que o fungo aqui analisado possui a mesma capacidade, justificando o resultado encontrado. Isso indica que, nesse ambiente simulado em eppendorf, a *C. albicans* estaria desviando sua atividade glicolítica principal, fosfatotransferase, em função de substâncias presentes no meio, que pode ser atribuído tanto a concentração de glicose como também a presença da solução fluoretada.

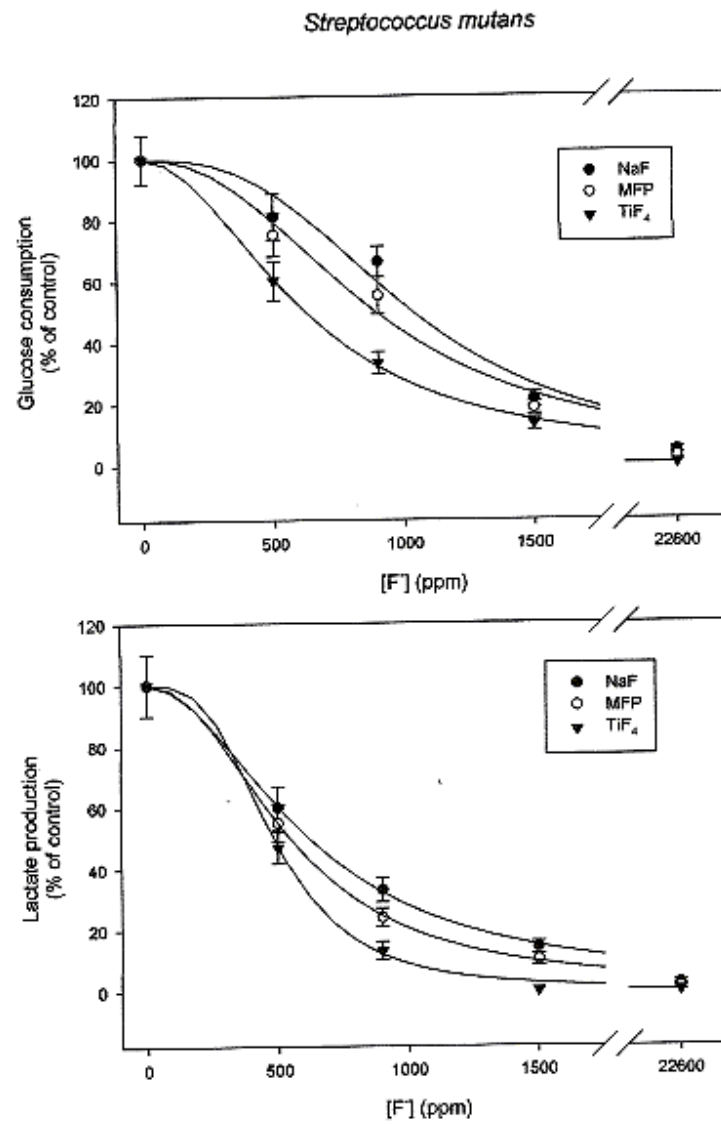


Figura 39: Consumo de glicose e produção de lactato da Cepa de *Streptococcus mutans* frente às soluções fluoretadas.

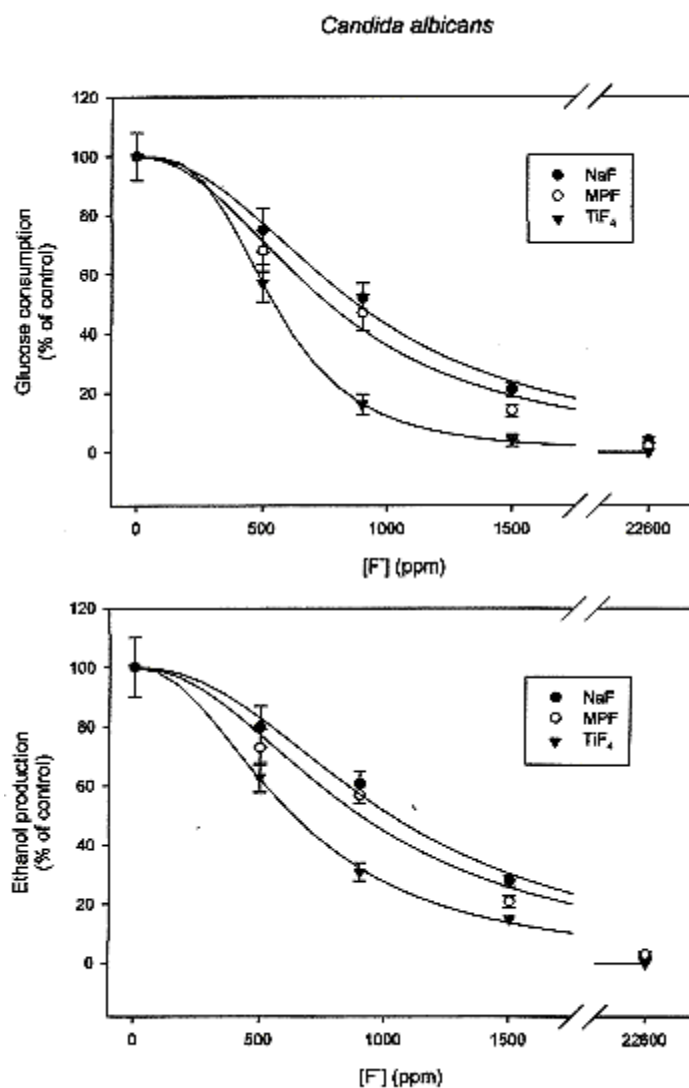


Figura 40: Consumo de glicose e produção de etanol das Cepas de *Candida albicans* frente às soluções fluoretadas

As soluções fluoretadas testadas alteraram o perfil da atividade microbiana, tanto em cepas de fungos como de bactérias. Pode-se dizer que essa modificação seria ocasionada pela ação do íon fluoreto no mecanismo do consumo de glicose, como citado Belli e colaboradores (1995), Jabbarifar, Tabibian e Poursina (2004), Cardoso, Reis e Serratine (2004) e Nonaka e colaboradores (2005).

Acredita-se que o flúor atue na via glicolítica inibindo a enolase e consequentemente, inibindo a formação de fosfoenolpiruvato a partir de fosfoglicerato no interior da bactéria. Com a ausência de fosfoenolpiruvato a via glicolítica é encerrada, sem que se observe a produção de ácido láctico. Cabe ressaltar, que quando funções do tipo efluxo do produto final e força motriz de

prótons deixam de ser executadas, a capacidade de homeostase da bactéria é prejudicada (CARDOSO; REIS e SERRATINE, 2004).

O resultado da análise nos indica uma diminuição no consumo de glicose com o aumento da concentração de todos os compostos fluoretados testados, sendo que, entre eles, o tetrafluoreto de titânio foi o que apresentou um perfil mais efetivo quando comparado aos outros dois compostos estudados. Pode-se selecionar o TiF_4 como o composto mais eficaz, o qual vem sendo descrito como um agente efetivo na prevenção de Cárie (SKARTVEIT e colaboradores, 1990; TEZEL, ERGÜCÜ e ÖNAL, 2002; RIJKOM e colaboradores, 2003; EXTERKATE e TEN CATE, 2007; WIEGAND e colaboradores, 2008b; NÓBREGA e colaboradores, 2008). A concentração mais adequada, segundo os resultados obtidos, é de 1500 ppm uma vez que em 22600 ppm não consegue-se ter uma solução. Desta forma se confirma sua escolha para o preparo dos nanocompósitos propostos.

4.3.2 Análise do Halo de inibição

Considerando-se a maior aplicabilidade desta técnica para avaliação da atividade antibacteriana de novas moléculas biologicamente ativas (MENG e colaboradores, 2008 e 2009; YANG e colaboradores, 2007; HE e colaboradores, 2006), a análise de halo de inibição foi conduzida, como descrita no item 3.7.2, de forma a comparar a atividade entre os nanocompósitos desenvolvidos e seus respectivos ativos isoladamente. Busca-se avaliar com estes resultados, não apenas potencializa a ação da associação da argila (MENG e colaboradores, 2008), mas também para escolha do derivado mais promissor.

Nas tabelas 8 página 87 e 9 página 89, pode-se observar as medidas de halo encontradas em milímetros (mm) que representam as fotos apresentadas nas Figuras 41 página 88 e 42 página 90. A suspensão de montmorilonita de sódio, simulando 60% de troca catiônica, não apresentou qualquer inibição corroborando com os resultados de Yang e colaboradores (2007) que testaram não só a montmorilonita de sódio como também a montmorilonita de cálcio, assim como, os resultados de Meng e colaboradores (2008 e 2009 e de He e colaboradores (2006) que testaram a montmorilonita de cálcio.

Tabela 8: Medida (em mm) do halo de inibição frente as cepas de *S. mutans* em diferentes técnicas de plaqueamento.

<i>S. mutans</i> – 48 horas			
	Placa 1	Swab 1*	Swab 2**
	(mm)	(mm)	(mm)
MMT	0	0	0
TiF₄	0	0	0
A1	0	0	0
Clorexidina	27	26	27
C3	22	21	21
Nistatina	0	0	0
N3	0	0	0

*Swab 1 amostras são aplicadas em gotas **Swab 2 amostras aplicadas em poços

O tetrafluoreto de titânio bem como o seu derivado A1, não apresentaram qualquer inibição independentemente dos microorganismos testados, o que indica não haver interferência do flúor no crescimento desses microorganismos. Assim, sua principal ação seria como agente remineralizador atuando nos sucessivos processos de desmineralização e remineralização (MORAIS, SOUZA e CHEVITARESSE, 2000; WIEGAND e colaboradores, 2008b). Cabe ressaltar que, mesmo sem apresentar resultados positivos como agente antimicrobiano, a intercalação já foi válida pois quando intercalado a suspensão apresenta um pH de 6,17, contrastando com o pH de 1,56 da solução de tetrafluoreto de titânio, o que já viabiliza o uso profissional.

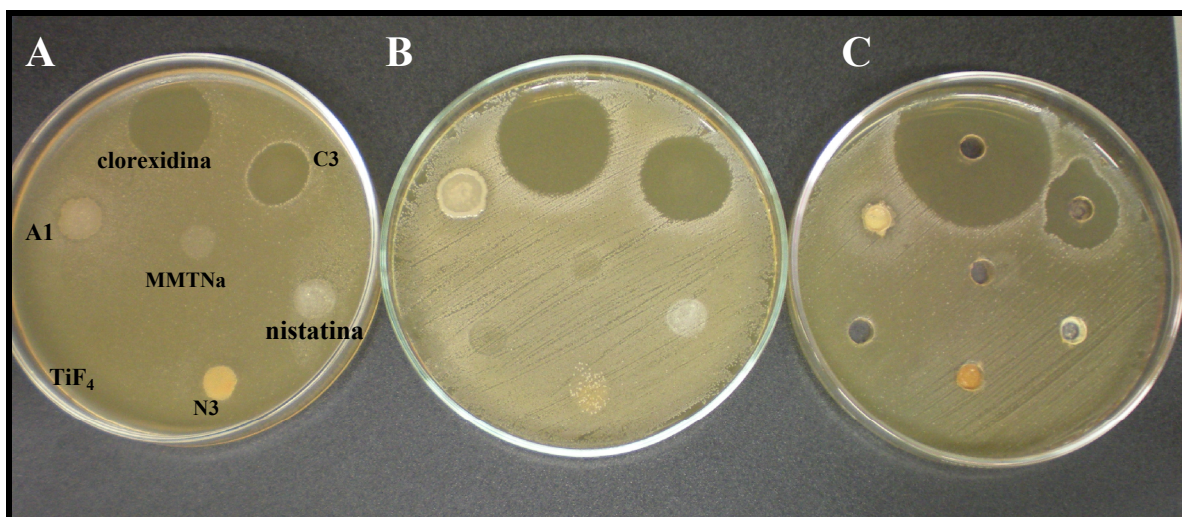


Figura 41: Análise de halo de inibição das cepas de *S. mutans*. Em A plaqueamento com auxílio da pipeta automática e amostras aplicadas em gotas; em B plaqueamento com swab e amostras aplicadas em gotas; em C plaqueamento com swab e amostras aplicadas em poços. Todas as placas demonstradas seguem a mesma ordem na aplicação das amostras.

Em ambos os microorganismos houve grande inibição quanto a aplicação da solução de clorexidina a 0,12%, bem como no nanocompósito C3. Os halos referentes a clorexidina, nas cepas de *S. mutans*, apresentaram-se com valores de 26 e 27 mm, e os halos referentes a C3 com valores de 21 e 22 mm. Nas cepas de *C. albicans* os valores referentes ao gluconato de clorexidina foram de 18, 19 e 26 mm, nas diferentes técnicas e para C3 de 11, 12 e 20 mm. Já era de se esperar que o halo referente ao derivado C3 seria menor do que o encontrado para clorexidina isoladamente, isto se dá, pelo fato de C3 ser resultante de um processo de intercalação o que indica uma liberação mais lenta da clorexidina (YANG e colaboradores, 2007; HE e colaboradores, 2006). Essa mesma análise realizada por Yang e colaboradores (2007) e de He e colaboradores (2006), com seus derivados de intercalação de acetato de clorexidina, evidenciam que a clorexidina é liberada lentamente podendo-se observar um halo associado a esse nanocompósito após um ano de análise. O interessante é que inicialmente esse nanocompósito C3 já apresenta uma grande inibição e já atuaria no meio de forma efetiva e aos poucos com a liberação lenta o efeito seria mantido sendo que o efeito por um ano não seria o desejado, havendo por isso a necessidade de ajustar essa liberação.

Tabela 9: Medida (em mm) do halo de inibição frente as cepas de *C. albicans* em diferentes técnicas de plaqueamento.

<i>C. albicans</i> – 24 horas			
	Placa 1	Swab 1*	Swab 2**
	(mm)	(mm)	(mm)
MMT	0	0	0
TiF₄	0	0	0
A1	0	0	0
Clorexidina	18	19	26
C3	11	12	20
Nistatina	16	19	27
N3	0	0	0

*Swab 1 amostras são aplicadas em gotas **Swab 2 amostras aplicadas em poços

As amostras de nistatina não mostraram qualquer inibição quando aplicadas a cepas de *S.mutans* (tabela 8 página 87), porém nas cepas de *C. albicans* (tabela 9 página 89) apresentou um halo variando de 16, 19 e 27 mm aproximando-se e dos resultados relatados por Begnami e colaboradores (2010) que encontram uma zona de 20 mm, e Radulović e colaboradores que descrevem uma zona de 19 mm. Todavia era de se esperar que o nanocompósito N3 mostrasse um padrão de liberação lento como indicado para o derivado de clorexidina. Entretanto, o nanocompósito de nistatina (N3) não mostrou qualquer inibição inicial, indicando que possivelmente essa liberação é bem mais lenta que a da clorexidina, visto a baixa solubilidade, em água e saliva, do antifúngico estudado (LI e colaboradores, 2009; RUIZ-CAMPS e CUENCA-ESTRELLA, 2009). Uma alternativa para contornar esse problema de solubilidade seria a adição de surfactantes à formulação, que formariam micelas, promovendo assim uma maior solubilidade do fármaco e, conseqüentemente, maior liberação da nistatina (LI e colaboradores, 2009). Essa liberação prolongada mostra-se apropriada para mascarar o sabor da nistatina, uma vez que a liberação progressiva do ativo minimizaria a percepção do sabor (AGUIAR, 2007).

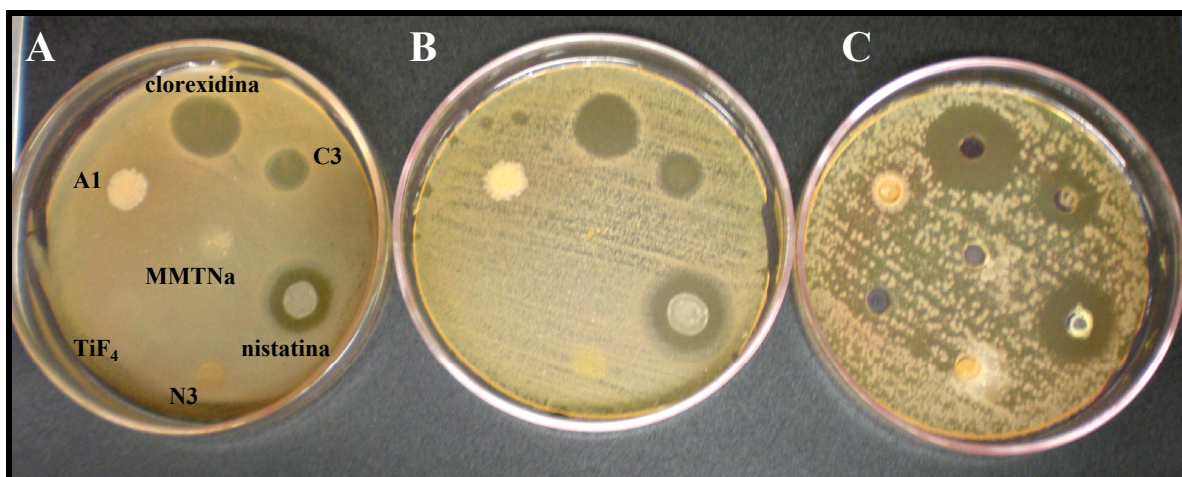


Figura 42: Análise de halo de inibição das cepas de *C. albicans*. Em A plaqueamento com auxílio da pipeta automática e amostras aplicadas em gotas; em B plaqueamento com swab e amostras aplicadas em gotas; em C plaqueamento com swab e amostras aplicadas em poços. Todas as placas seguiram a mesma sequência de aplicação das amostras.

A análise de halo de inibição mostrou-se efetiva quanto a avaliação dos novos nanocompósitos indicando que os derivados de clorexidina são bem promissores corroborando com os dados encontrados em literatura. Pode se afirmar ainda que os derivados de nistatina, se ajustados, podem levar a obtenção de sistemas de liberação prolongada deste ativo, os quais podem com um único material, substituir formulações sólidas orais mais complexas (AGUIAR, 2007). Os derivados de tetrafluoreto de titânio não apresentaram resultados que indicam que esse seria um agente antimicrobiano.

5 CONCLUSÃO

Os derivados intercalados foram caracterizados por DRX, DSC e FTIR, sendo o DRX e o FTIR os métodos que apresentaram resultados mais conclusivos no estudo de intercalação. Os derivados selecionados a partir do rendimento indireto das reações e do espaçamento interlamelar apresentado nos resultados de DRX, indicam que a metodologia utilizada para o desenvolvimento dos nanossistemas foi eficiente e reprodutível pois os novos derivados mostraram-se como nanocompósitos intercalados.

Em relação a atividade antimicrobiana avaliada, entre os nanocompósitos desenvolvidos o mais eficaz foi o C3, derivado da intercalação de clorexidina com montmorilonita de sódio, apresentando uma halo de inibição menor que o da clorexidina a 0,12% porém muito promissor pois, como indicado por Yang e colaboradores (2007) e de He e colaboradores (2006), essa liberação é prolongada e isso o diferencia da clorexidina isoladamente. Os nanossistemas A1 e N3 não apresentaram resultados imediatos, isso indica que possivelmente o A1, derivado da intercalação de tetrafluoreto de titânio com montmorilonita, possivelmente não apresenta-se como um agente antimicrobiano já que a solução de tetrafluoreto de titânio 1500 ppm também não apresentou qualquer inibição, sendo necessários novas análises que possam testar sua atividade remineralizadora. Em N3 os resultados possivelmente foram prejudicados pela baixa solubilidade da nistatina em água, não podendo assim descartar a atividade desse novo nanossistema, uma vez que se alguns parâmetros forem ajustados o resultados pode apresentar-se tão promissor quanto o de C3.

Com os resultados obtidos pode-se sugerir que foi possível realizar a intercalação de todos os compostos propostos, e avaliar superficialmente sua capacidade como agente antimicrobiano. O derivado que mostrou-se mais promissor foi resultante da intercalação de gluconato de clorexidina em montmorilonita de sódio, denominado C3.

Como perspectivas, novas análises serão necessárias para evidenciar a liberação prolongada desses nanocompósitos de nistatina, sendo importante ajustar alguns parâmetros que podem influenciar na solubilidade da nistatina e

consequentemente em sua liberação. Nos nanossistemas de tetrafluoreto de titânio novos testes serão necessários para avaliar sua capacidade antimicrobiana, bem como sua ação preventiva de Cárie.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABIRAMI, C. P.; VENUGOPAL, P. V. ***In vitro* evaluation of the antifungal activity of toothpastes.** Journal de mycology Médicate, v.15, p. 247-249, 2005
- AGUIAR, M. M. G. B. **Desenvolvimento de novos comprimidos bucais de nistatina para tratamento de candidíase oral.** Rio de Janeiro, 2007, 146f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2007
- ALVES, P. M.; QUEIROZ, I. m. g.; PEREIRA, J. V.; PEREIRA, M. S. V. **Atividade antimicrobiana, antiaderente e antifúngica *in vitro* da plantas medicinais brasileiras sobre microrganismos do biofilme dental e cepas do gênero *Cândida*.** Revista da sociedade brasileira de medicina tropical, v. 42, n.2, p. 222-224, 2009
- ANDREOLLI, R. S.; LARA, E. H. G. **Avaliação *in vitro* da eficácia de enxaguatórios bucais remineralizantes.** Informa, v.16, p. 7-8, 2004.
- ASSIS, G. F.; BUZALAF, M. A. R.; FARIA, F. A. C.; GRANJEIRO, J. M.; TORRES, S. A. **Mecanismos Biológicos e Influência de Fatores Ambientais na Fluorose Dentária e a Participação do Flúor na Prevenção da Cárie.** Revista FOB, v.7, n. 3/4, p. 63-70, 1999.
- ATES, M.; AKDENIZ, B. G.; SEN, B. H. **The effect of calcium chelating or binding agents on *Candida albicans*.** Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology and endodontology, v. 100, n.5, 2005.
- BADET, C.; RICHARD, B. **Étude clinique de la carie.** EMC- dentisterie v. 1, p. 40-48, 2004
- BARBIERI, D. S. V. **Análise da aderência *in vitro* de *Streptococcus mutans* e *Cândida albicans* na superfície dentária.** Curitiba, 74f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia) – Departamento de patologia básica, setor de ciências biológicas, Universidade Federal do Paraná, 2005.
- BASCONES, A.; MORANTES, S. **Antisépticos orales.** Revisión de la literatura y perspectiva actual. Avances em Periodoncia, v. 18, n. 1, Madrid, 2006.
- BEGNAMI, A. F.; DUARTE, M. C. T.; FURLETTI, V.; REHDER, V. L. G. **Antimicrobial potential of *coriandrum sativum* L. against different *Candida species in vitro*.** Food Chemistry, v. 118, p. 74-77, 2010
- BATISTA, M. D. E.; VALENÇA, A. M. G. **Dentifrícios Fluoretados e sua Utilização em Crianças.** Arquivos em Odontologia, v. 40, n. 2, p. 111-206, Belo Horizonte, 2004.
- BELLI, W. A.; BUCKLEY, D. H.; MARQUIS, R. E. **Weak Acid effects and Fluoride Inhibition of Glycolysis by *Streptococcus Mutans* GS-5.** Can. J. Microbiol., v. 41, p. 785-791, 1995.

BILLINGTON, R.W.; WILLIAMS, J. A.; DORBAN, A.; PEARSON, G. J. **Glass ionomer cement: evidence pointing to fluorine release in the form of monofluorophosphate in addition to fluoride ion.** *Biomaterials*, v. 25, p. 3399-3402, 2004.

BOTANA, A.; MOLLO, M.; EISENBERG, P.; SANCHEZ, R. M. T. **Effect of montmorillonite on biodegradable PHB nanocomposites.** *Applied Clay Science*, 2009, doi: 10.1016/j.clay.2009.11.001

BRESCANSIN, E. G. **Desenvolvimento e caracterização de formulações lipossomais contendo o fármaco nistatina.** São Paulo, 136 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Departamento de Físico-química, Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, 2006

BÜYÜKYILMAZ, T.; SEN, B. H.; ØGAARD, B. **Retention of titanium tetrafluoride (TiF₄), used as fissure sealant on human deciduous molars.** *Acta Odontol Scand*, v. 55, p. 73-78, Oslo, 1997.

CARDOSO, M.; REIS, C.; SERRATINE, A. C. **O poder antimicrobiano do flúor.** *Robrac*, v. 13, n. 36, p.65-68, 2004.

CARMO, F. A. **Preparo e avaliação de novas formulações farmacêuticas de liberação prolongada de nanocompósitos de aciclovir e dapsona.** Rio de Janeiro, 83f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2009.

CHAVES, S. C. L.; VIERA-DA-SILVA, L. M. **As práticas preventivas no controle da cárie dental: uma síntese de pesquisas.** *Cad. Saúde Pública*, v. 18, n.1, p. 129-139, Rio de Janeiro, Brasil, 2002.

CLARK, R. J.H.; ERRINGTON, W. **Fluoro-complexes of group IVa elements: metal-halogen vibrational frequencies.** *J. Chem. Soc. A*, 1967

EXTERKATE, R. A. M.; TEN CATE, J. M. **Effects of a new titanium fluoride derivative on enamel de- and remineralizatio.** *Eur J Oral Sci*, 115, 143-147, 2007.

GESSER, H. C.; PERES, M. A.; MARCENES, W. **Condições gengivais e periodontais associadas a fatores socioeconômicos.** *Ver. Saúde Pública*, v. 35, n. 3, São Paulo, Brasil, 2001.

DAL CASTEL, C. D.; PELEGRINI Jr., T.; BARBOSA, R. V.; LIBERMAN, S. A.; MAULER, R. S. **Properties of silane grafted polypropylene/montmorillonite nanocomposites.** *Composites: Part A*, v. 41, p. 185-191, 2010

DICKSON, F. E.; GOWLING, E. W.; BENTLEY, F. F. **Titanium complexes of para-Substituted N-Oxides. I. Effect of Substituent on the Nitrogen-Oxygen and Titanium-Oxygen Stretching Vibrations.** *Inorganic Chemistry*, v. 6, n. 6, p. 1099-1101, 1967

DI GIANNI, A.; BONGIOVANNI, R.; CONZATTI, L.; TURRI, S. **New fluorinated montmorillonites for the preparation of UV-cured coatings.** Journal of colloid and Interface Science, v. 336, p. 455-461, 2009

GONÇALVES, N. C. L. A. V.; VALSECKI JÚNIOR, A.; SALVADOR, L. S.; BERGAMO, G. C. **Efeito de solução fluoretada contendo xilitol e sorbitol no número de Estreptococos do grupo mutans na saliva de seres humanos.** Rev Panam de Salud Publica, v. 9, n. 1, Washington, 2001.

GONZÁLEZ-VIDAL, N.; MUÑOZ-GUERRA, S.; ILARDUYA, A. M.; BENALI, S.; PEETERBROECK, S.; DUBOIS, P. **Poly(hexamethylene terephthalate)-layered silicate nanocomposites.** European Polymer Journal, v. 46, p. 156-164, 2010.

GU, Z.; LI, J.; SÖREMARK, R. **Influence of tooth surface conditions on enamel fluoride uptake after topical application of TiF_4 *in vitro*.** Acta Odontol Scand, v. 54, p. 279-281, 1996.

GUIMARÃES, A. N. **Impactos da utilização de diferentes critérios clínicos diagnósticos na prevalência, associação causal e extensão da doença periodontal.** Minas Gerais, 112 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Periodontia, Universidade Federal de Minas Gerais, 2005.

HAC-WYDRO, K.; DYNAROWICZ-LATKA, P. **Nystatin in langmuir monolayers at the air/water interface.** Colloids and surfaces B: Biointerfaces, v. 53, p. 64-71, 2006 a.

HAC-WYDRO, K.; DYNAROWICZ-LATKA, P. **Interaction between nystatin and natural membrane lipids in Langmuir monolayers- The role of phospholipids in the mechanism of polyenes mode of action.** Biophysical chemistry, v.123, p. 154-161, 2006 b.

JABBARIFAR, S. E.; TABIBIAN, S. A.; POURSIINA, F. **Effect of Fluoride Mouthrinse and Toothpaste on number of *Streptococcal* colony forming units of dental plaque.** Journal of Research in Medical Science, v. 10, n. 6, p. 363-367, 2005.

JOSHI, G. V.; PATEL, H. A. ; KEVADIYA, B. D. ; BAJAJ, H. C. **Montmorillonite intercalated with vitamin B₁ as drug carrier.** Applied Clay Science, v. 45, p. 248-253, 2009

JUANG, R.; LIN, S.; HUANG, F.; CHENG, C. **Structural studies of Na-montmorillonite exchanged with Fe^{+2} , Cr^{+3} , and ti^{+4} by n_2 adsoption and EXAFS.** Journal of Colloid and Interface Science, v. 274, p. 337-340, 2004

KIJIMA, T.; NAKAZAWA, H.; TAKENOUCI, S. **Synthesis of Ti-containing pillared Montmorillonite using a trinuclear acetatochlorohydroxo titanium (III) complex.** Bull. Chem. Soc. Jpn., v. 64, p. 1395-1397, 1991

KRETH, J.; ZHU, L.; MERRITT, W.; QI, F. **Role of sucrose in the fitness of *Streptococcus mutans*.** Oral Microbiology Immunology, v. 23, p. 213-219, 2008.

LEITE, T. C.; DA SILVA, D.; COELHO, R. G.; ZANCAN, P.; SOLA-PENNA, M. **Lactate favours the dissociation of skeletal muscle 6-phosphofructo-1-kinase tetramers down-regulating the enzyme and muscle glycolysis.** Biochemical Journal, v. 408, p. 123-130, 2007.

LI, J.; BARROW, D.; HOWELL, H.; KALACHANDRA, S. **In vitro drug release study of methacrylate polymer blend system: effect of polymer blend composition, drug loading and solubilizing surfactants on drug release.** J. Mater Sci: Mater med, DOI:10.1007/s10856-009-3899-6, 2009

LI, S.; WU, P. **Characterization of sodium dodecyl sulfate modified iron pillared montmorillonite and its application for the removal of aqueous Cu (II) and Co (II).** Journal of Hazardous Materials, v. 173, p. 62-70, 2010

LOESCHE, W. J. **Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay.** Microbiological REVIEWS, v.50, n. 4, p. 353-380, dec., 1986.

MACÊDO-FONSÊNCIA, J. C.; SILVA, I. S.; SOUTO-MAIOR, R. M. **POLY(3 – HEXADECYLTHIOPHENE)/ MONTMORILLONITE CLAY NANOCOMPOSITES: Influence of preparation and type of clay on their structures.** Synthetic Metals, v. 159, p. 2215-2218, 2009

MAGALHÃES, A. C.; RIOS, D.; HONÓRIO, H. M.; JORGE JR, A. M.; DELBEM, A. C. B.; BUZALAF, M. A. R. **Effect of 4% titanium tetrafluoride solution on dental erosion by soft drink: an *in situ/ex vivo* study.** Archives of oral biology, v. 53, p. 399-404, 2008.

MEILLER, T. F.; HUBE, B.; SCHILD, L.; SHIRTLIFF, M. E.; SCHEPER, M. A.; WINKLER, R.; TON, A.; JABRA-RIZK, M. A. **A novel immune evasion strategy of *Candida albicans*: proteolytic cleavage of salivary antimicrobial peptide.** Plos one, v. 4, i.4, e5039, doi:10.1371/journal.pone.0005039, 2009.

MENG, N.; ZHOU, N.; ZHANG, S.; SHEN, J. **Synthesis and antimicrobial activities of polymer/montmorillonite-chlorhexidine acetate nanocomposite films.** Applied Clay Science, article in press, 2008.

MENG, N.; ZHOU, N.; ZHANG, S.; SHEN, J. **Controlled release and antibacterial activity chlorhexidine acetate (CA) intercalated in montmorillonite.** International Journal of Pharmaceutics, doi:10.1016/j.ijpharm.2009.08.004, 2009

MIGNOM, P.; UGLIENGO, P.; SODUPE, M.; HERNANDEZ, E. R. **Ab initio molecular dynamics study of the hydration of Li²⁺, Na⁺ and K⁺ in a montmorillonite model. Influence of isomorphic substitution.** Physical Chemistry Chemical Physics, v. 12, p. 688-697, 2010

MORAIS, A. P. ; SOUZA, I. P. R.; CHEVITARESSE, O. **Estudo *in situ* do esmalte dental humano após aplicação de tetrafluoreto de titânio.** Pesq Odont Brás, v. 14, n. 2, p. 137-143, 2000.

NARVAI, P. C. **Cárie dentária e flúor: uma relação do século XX**. Ciência & Saúde coletiva, v. 5, n. 2, 2000.

NARAYANAN, B. N.; KOODATHIL, R.; GANGADHARAN, T. ; YAAKOB, Z. ; SAIDU, F. K.; CHANDRALAYAM, S. **Preparation and characterization of exfoliated polyaniline/montmorillonite nanocomposites**. Materials Science and Engineering B, 2009, doi: 10.1016/j.mseb.2009.12.027.

NAZAROV, G. V.; GALAN, S. E.; NAZAROVA, E. V.; KARKISSHCHENKO, N. N.; MURADOV, M. M.; STEPANOV, V. A. **Drug synthesis methods and manufacturing technology**. Pharmaceutical Chemistry Journal, v. 43, p. 163-170, 2009.

NEVILLE, B. W.; DAMM, D. D. ; ALLEN, C. M. BOUQUOT, J. E. **Patologia oral & maxilofacial**, cap. 6, 2^a ed., editora Guanabara Koogan, 2004

NÓBREGA, C. B. C.; FUJIWARA, F. Y.; CURY, J. A.; ROSALEN, P. L. **TiF₄ varnish-A ¹⁹F-NMR Stability study and enamel reactivity evaluation**. Chem. Pharm. Bull., v. 56, n. 1, p. 139-141, 2008.

NONAKA, C. F. W.; FILHO, J. A. V. G.; PEREIRA, K. M. A.; QUEIROZ, L. M. G.; PINTO, L. P. **Metabolismo dos açúcares por bactérias orais envolvidas no processo de cárie – uma revisão dos aspectos atuais**. Revista Brasileira de Patologia Oral, v.4, n. 2, 2005.

OPAS **Promoting Oral Health: the use of salt fluoridation to prevent dental caries**. Scientific and Technical Publication, n. 615, 2005.

PINEDA, M. M.; SOTOMAYOR, J. C.; MENDOZA, A. R.; CHEIN, S. V.; VENTOCILLA, M. H.; BENAVENTE, L. L. **Aplicación de métodos antisépticos previos al tratamiento odontológico para la reducción de la carga microbiana salival**. Odontologia Sanmarquina, v. 1, n. 5, 2000

PREVITALI, E. F.; SANTOS, M. T. B. R. **Cárie Dentária e Higiene Bucal em Crianças com Paralisia Cerebral**. Pesq Bras Odontoped Clin Integr, v. 9 n. 1 p. 43-47, 2009.

RADULOVIĆ, N.; STOJANOVIĆ, G.; VUKIĆEVIĆ, R.; DEKIĆ, V.; DEKIĆ, B.; PALIĆ, R. **New 3,4-Annulated Coumarin Derivatives: Synthesis, Antimicrobial Activity, Antioxidant Capacity, and Molecular Modeling**. Monatshefte für Chemie, v. 137, p. 1477-1486, 2006

REYNA-VALECIA, A.; DEYRAIL, Y.; BOUSMINA, M. **In situ follow-up of intercalation process in a clay/polymer nanocomposite model system by Rheo-FXDR analyses**. Macromolecules, v. 43, p. 354-361, 2010

ROCHA, H. A. **Preparação e caracterização de nanocompósitos de uso em sistemas de liberação controlada de fármacos**. Rio de Janeiro, 130f. Tese (Doutorado em Ciências e Tecnologia de Polímeros)- Instituto de Macromoléculas Professora Eloísa Mano, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2008

ROSATO, A.; VITALI, C.; PIARULLI, M.; MOZZOTTA, M.; ARGENTIERI, M. P.; MALLAMACI, R. ***In vitro* synergic efficacy of the combination of nystatin with the essential oils of *Origanum vulgare* and *Pelargonium graveolens* against some *Candida* species.** Phytomedicine, v. 16, p. 972-975, 2009

RUIZ-CAMPS, I.; CUENCA-ESTRELLA, M. **Antifúngicos para uso sistémico.** Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica, v. 27, n. 6, p. 353-362, 2009

SOARES, D. G. S.; OLIVEIRA, C. B.; DRUMOND, M. R. S.; TRAVASSOS, D. B.; SILVA, C. A.; PADILHA, W. W. N. **Atividade antibacteriana de tinturas de plantas tropicais sobre microorganismos da cavidade bucal.** Revista Odontológica de Araçatuba, v. 29, n. 1, p. 20-24, 2008

SOARES, J. M. P.; VALENÇA, A. M. G. **Avaliação clínica do potencial terapêutico do gel e verniz fluoretados na remineralização de lesões cariosas incipientes.** Pesq. Bras. Odontoped Clin Integr, v. 3, n. 2, p. 35-41, 2003.

SOUZA, I. A.; SOARES, M. F.; PIRES, M. **Determinação simultânea de fluoreto e monofluorofosfato em dentifrícios por cromatografia iônica.** Revista Analytica, n. 17, p. 56-60, 2005.

SKARTVEIT, L.; SELVIG, A. K.; MYKLEBUST, S.; TVEIT, A. B. **Effect of TiF_4 solution on bacterial growth *in vitro* and on tooth surfaces.** Acta Odontol. Scand., v. 48, p. 169-174, 1990.

TEZEL, H.; ERGÜCÜ, Z.; ÖNAL, B. **Effects of topical fluoride agents on artificial enamel lesion formation *in vitro*.** Quintessence International, v. 33, n. 5, p. 347-352, 2002.

TORRES, C. R. G.; KUBO, C. H.; ANIDO, A. A.; RODRIGUES, J. R. **Agentes antimicrobianos e seu potencial uso na odontologia.** Pós-Grad. Ver. Fac. Odontol. São José dos Campos, v. 3, n. 2, p. 43-52, 2000.

TZANAVARAS, P.; THEMELIS, D. G. **Rapid flow injection spectrophotometric determination of monofluorophosphates in toothpastes after on-line hydrolysis by alkaline phosphatase immobilized on a cellulose nitrate membrane.** Analytica Chimica Acta, v. 467, p. 83-89, 2002.

VAN RIJKOM, H.; RUBEN, J.; VIEIRA, A.; HUYSMANS, M. C.; TRUIN, G.-J.; MULDER, J. **Erosion-inhibiting effect sodium fluoride and titanium tetrafluoride treatment *in vitro*.** Eur. J. Oral Sci. v. 111, p. 253-257, 2003.

ZENG, P.; ZHANG, G.; RAO, A.; BOWLES, W.; WIEDMANN, T. S. **Concentration dependent aggregation properties of chlorhexidine salts.** International Journal of Pharmaceutics, 367, p. 73-18, 2009

ZHANG, J.; CHENG, X.; LIU, H.; WEILIANG, L. **Synthesis and properties of Poly(vinyl alcohol)/synthetic F-montmorillonite nanocomposites.** Chinese Journal of Chemistry, v. 27, p. 1611-1616, 2009.

WIEGAND, A., LAABS, K. A.; GREßMANN, G.; ROOS, M.; MAGALHÃES, A. C., ATTIN, T. **Protection of short-time enamel erosion by different tetrafluoride compounds.** Archives of Oral Biology, v. 53, p. 497-502, 2008 a.

WIEGAND, A.; MEIER, W.; SUTTER, E.; MAGALHÃES, A. C.; BECKER, K.; ROOS, M.; ATTIN, T. **Protective effect of different tetrafluorides on erosion pellicle-free and pellicle-covered enamel and dentine.** Carie Research, v. 42, p. 247-254, 2008 b.

YANG, D.; YUAN, P.; ZHU, J. X. ; HE, H.- P. **Synthesis and characterization of antibacterial compounds using montmorillonite and chlorhexidine acetate.** Journal of thermal analysis and calorimetry, v. 89, n. 3, p. 847-852, 2007.

YARAHMADI, N.; JAKUBOWICZ, I.; HJERTBERG, T. **Development of poly(vinyl chloride)/montmorillonite nanocomposites using chelating agents.** Polymer Degradation and Stability, v. 95, p. 132-137, 2010.

YIGIT, N.; AKTAS, E.; AYYILDIZ, A. **Antifungal activity of toothpastes against oral *Candida* isolates.** Journal de Mycologie médicale, v. 18, p. 141-146, 2008

[<http://ciencia.blogas-pt.com/wp-content/uploads/2008/11/bacteria2.jpg>] acessada em 22de junho de 2009

[<http://www.dentalclinic.odo.br/tartaro.asp>] acessada em 08 de dezembro de 2008

[<http://1.bp.blogspot.com/417DCAJw-Ss/SduY2gitkl/AAAAAAAAAH->

[I/Ng_ssYcqreo/s400/glicolise.gif](http://1.bp.blogspot.com/417DCAJw-Ss/SduY2gitkl/AAAAAAAAAH-I/Ng_ssYcqreo/s400/glicolise.gif)] acessada em 22de junho de 2008

[<http://www.colgate.com.br>] acessada em 08 de dezembro de 2008