

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CURSO DE GRADUAÇÃO DE ODONTOLOGIA  
NATÁLIA ADELINO XAVIER PONTES DE FREITAS

**Estudo *in vitro* da eficácia de nanopartículas de quitosana encapsulando óleo de pequi (*Caryocar coriaceum*) frente a *Enterococcus faecalis***

Monografia apresentada ao curso de graduação de Odontologia da Universidade Federal da Paraíba para obtenção de título de bacharel.

**JOÃO PESSOA – PB**

**2018**

**NATÁLIA ADELINO XAVIER PONTES DE FREITAS**

**Estudo *in vitro* da eficácia de nanopartículas de quitosana encapsulando óleo de pequi (*Caryocar coriaceum*) frente a *Enterococcus faecalis***

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de graduação de Odontologia, da Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento para às exigências para a obtenção do título de bacharel no curso de nível superior de Odontologia.

Orientador: Paulo Rogério Ferreti Bonan

Co-orientadoras: Isabella Lima Arrais Ribeiro

Daniela Bomfim de Barros

**JOÃO PESSOA - PB**

**2018**

**A banca de examinadores Trabalhos de Conclusão de Curso, em sessão pública realizada em \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_\_, considerou o trabalho de conclusão " Estudo *in vitro* da eficácia de nanopartículas de quitosana encapsulando óleo de pequi (*Caryocar coriaceum*) contra *Enterococcus faecalis*" da candidata Natália Adelino Xavier Pontes de Freitas**

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>o</sup>. Orientador – Paulo Rogério Ferreti Bonan

---

Prof<sup>o</sup>. Thiago Farias Rocha Lima

---

Prof<sup>o</sup>. André Ulisses Dantas Batista

---

Prof<sup>o</sup>. Ângelo Brito Pereira Melo

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos os pacientes que tive a oportunidade de tratar, pessoas maravilhosas, confiaram no meu trabalho. Agradeço primeiramente a Deus que mesmo diante das dificuldades foi a minha Rocha.

Aos meus pais , pois se galguei até aqui foi porque eles me motivaram a alcançar as estrelas.

Aos grandes pesquisadores e orientadores Paulo Bonan, Isabella Arrais e Daniela Bomfim, sou grata pela dedicação e incentivo a entrar na área pesquisadora. Às mestrandas Panmela e Joyce pela paciência e socorro em momentos de desespero. À técnica de laboratório Rebbeca que usando sua gentileza e genialidade tornou meu caminho na pesquisa menos penoso.

Agradeço pela colaboração com o Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Pernambuco. E aos colegas do LAMAB, da Universidade Federal da Paraíba campus I.

## SUMÁRIO

1. RESUMO	06
2. ABSTRACT	06
3. INTRODUÇÃO	07
3.1. <i>Enterococcus faecalis</i> e o insucesso do tratamento endodôntico	07
3.2. Modificações em medicações intracanal e eficácia sobre <i>E. Faecalis</i>	07
3.3. O óleo do pequi, quitosana e atividade antimicrobiana	07
4. METODOLOGIA	08
4.1. Coleta, identificação do material vegetal e obtenção do óleo	08
4.2. Obtenção da Quitosana	09
4.3. Obtenção das Nanopartículas (NPs) de quitosana	09
4.4. Amostras	09
4.5. Potencial Zeta	10
4.6. Grupos de teste e controle (teste antimicrobiano)	10
4.6.1. Preparo do inóculo	11
4.6.2. Padronização	11
4.6.3. Microdiluição em caldo e replaqueamento dos subcultivos	11
4.6.4. Método de disco difusão em meio sólido	12
5. RESULTADOS	12
5.1. Potencial Zeta	12
5.2. CIM (Concentração Inibitória Mínima)	13
5.3. Difusão em ágar (CBM- Concentração Bactericida Mínima)	14
5.4. Difusão em disco no ágar	14
6. DISCUSSÃO	15
7. CONCLUSÕES	16
8. REFERÊNCIAS	16

## RESUMO

*Enterococcus faecalis* é uma espécie microbiana comumente isolada em infecções periapicais persistentes. A medicação intracanal tem por objetivo reduzir a microbiota residual, e, dessa forma, se faz importante a pesquisa de novos materiais para a sua incorporação. Objetivo: estudar *in vitro* a eficácia de nanopartículas de quitosana com óleo de Pequi (*Caryocar coriaceum*) encapsulado contra *Enterococcus faecalis*. Metodologia: o óleo do *C. coriaceum* foi extraído do mesocarpo do fruto usando a técnica com rotaevaporação. A quitosana foi obtida por meio de etapas sequenciais de pré-tratamento, desmineralização, desproteinização, desodorização e secagem. As nanopartículas de quitosana foram obtidas através da desacetilação, seguida da neutralização e gotejamento de Tripolifosfato de Sódio (TPP). Os testes antimicrobianos foram feitos através da CIM (Concentração Inibitória Mínima) e CBM (Concentração Bactericida Mínima). Resultados: Não se observou atividade antimicrobiana do óleo do *C. coriaceum* em nenhuma das concentrações testadas: 3,88 mg/mL de quitosana; 2,34 mg/mL de óleo; 3,834 mg/mL de quitosana; 3,82 mg/mL de quitosana e 0,017 mg/mL de óleo. Sendo assim um novo teste de Difusão em Disco foi executado com uma amostra pura e concentração maior do óleo (10 µl), que confirmou a inatividade antimicrobiana. Conclusão: Conclui-se que o óleo do *C. coriaceum* encapsulado em nanopartículas de quitosana não exerceram atividade antimicrobiana sobre *E. faecalis*.

DESCRITORES: nanocápsula, quitosana, endodontia, enterococcus faecalis, óleo.

## 2. ABSTRACT

*Enterococcus faecalis* is a microbial species commonly isolated in persistent periapical infections. The intracanal medication aims to reduce the residual microbiota, and, in this way, it becomes important to research new materials for its incorporation. Aim: to study *in vitro* the efficacy of chitosan nanoparticles with Pequi (*Caryocar coriaceum*) oil encapsulated against *E. faecalis*. Methodology: *C. coriaceum* oil was extracted from the fruit mesocarp using the rotavaporation technique. Chitosan was obtained by means of sequential stages of pre-treatment, demineralization, deproteinization, deodorization and drying. Chitosan nanoparticles were obtained through deacetylation followed by neutralization and dripping of sodium tripolyphosphate (TPP). Results: No antimicrobial activity of *C. coriaceum* oil was observed in any of the tested concentrations: 3.88 mg / mL chitosan, 2, 34 mg / mL oil, 3.834 mg / mL chitosan, 3.82

mg / mL chitosan, and 0.017 mg / mL oil. Thus a new Disk Diffusion test was performed with a pure sample and a higher oil concentration (10 µl), which confirmed the antimicrobial inactivity. Conclusion: It was concluded that the oil of *C. coriaceum* encapsulated in chitosan nanoparticles did not exert antimicrobial activity on *E. faecalis*.

DESCRIPTORS: nanocapsule, chitosan, endodontia, enterococcus faecalis, oil.

### 3. INTRODUÇÃO

O insucesso endodôntico é, na maioria das vezes, resultante de falhas técnicas, as quais impossibilitam a conclusão adequada dos procedimentos intracanaís voltados para o controle e a prevenção da infecção endodôntica<sup>1</sup>. Associado com a incapacidade de alcançar completa desinfecção do canal radicular, visando o controle infeccioso, a medicação intracanal antimicrobiana vem para auxiliar nesses casos e tentar alcançar a microbiota residual, sendo utilizada entre as sessões terapêuticas<sup>2</sup>. O Hidróxido de Cálcio é o material mais comumente utilizado com medicamento intracanal<sup>3</sup> mesmo assim, novos fármacos vem sido testados.

O *Enterococcus faecalis* é uma espécie comumente isolada que pode desempenhar um papel em infecções endodônticas persistentes<sup>4,5,6</sup>. O desenvolvimento destas infecções pode ser causado pela sua resistência antimicrobiana inerente, capacidade de adaptação a mudanças ambientais severas ea capacidade de invadir os túbulos dentinários onde eles estão protegidos dos medicamentos endodônticos e são, portanto, difíceis de eliminar<sup>6</sup>.

O efeito antibacteriano do *Caryocar brasiliense* Cambess (Pequi) foi testado contra *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, concluindo que substâncias antioxidantes presentes no extrato hidroetanólico das folhas do pequi são responsáveis pela atividade antimicrobiana desse fitoterápico<sup>7</sup>. Também foi comprovada ação anti-inflamatória e cicatricial do óleo de Pequi (*Caryocar coriaceum*), e foi aventada a ação antimicrobiana do mesmo<sup>8</sup>.

A quitosana é um polissacarídeo catiônico produzido através da desacetilação da quitina, que é adquirido através do exoesqueleto de crustáceos<sup>9</sup>. Para potencializar o uso dessas substâncias, o uso de nanopartículas é uma opção. As nanopartículas (NPs) de quitosana na interface dentinária, podem induzir biomineralização das matrizes de colágeno formando uma barreira contra recolonização bacteriana, tem

ação quelante, interfere na formação inicial de biofilme sobre a dentina, ação esta semelhante ao do EDTA, e também tem potencial de induzir a remineralização da dentina <sup>3</sup>.

Segundo Yadav<sup>10</sup>, Clorexidina, NaOCl e quitosana nas concentrações testadas reduziram o biofilme com *E. faecalis* significativamente, mas a baixa toxicidade da quitosana nas duas concentrações testadas (0,5% e 0,25%) favoreceu seu uso como irrigante do canal radicular como uma alternativa, considerando as propriedades indesejáveis de NaOCl, como alto efeito desmineralizante, e clorexidina com ausência de atividade e não tem ação clareadora <sup>11</sup>.

O uso de *E. faecalis* neste estudo justifica-se por sua resistência relatada a procedimentos químico e mecânicos do tratamento intracanal, por seu comprovado envolvimento no insucesso dos tratamentos endodônticos e por ser relativamente fácil de cultivar e manipular. Dessa forma, esse estudo tem como objetivo analisar a atividade antimicrobiana contra a *E. faecalis* e viabilidade de novos materiais como a quitosana e óleo de pequi, ambos com características indicadoras de serem favoráveis para controle da infecção microbiana do canal radicular e biocompatibilidade.

#### **4. METODOLOGIA**

##### **4.1. Coleta, identificação do material vegetal e obtenção do óleo**

As amostras de *Caryocar coriaceum Wittm* foram coletadas na Floresta Nacional do Araripe-Apodi (Ceará, Brasil), identificado e processado no laboratório de Produtos Naturais, do Departamento de Bioquímica, do Centro de Biociências, da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). O óleo da espécie *Caryocar coriaceum* foi obtido sua densidade pela média de três pesagens diferentes em uma balança analítica e então dividida pelo volume (0,8 g/mL). O mesocarpo de *C. coriaceum* foi aquecido na estufa a 50°C por 48 horas, logo após colocado para resfriar e deixadas no dessecador até o preparo para extração do óleo. Foi triturado 5mg de mesocarpo e adicionado 6,5 gramas de sulfato de sódio anidro (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Em seguida foi então retornada para papel de filtro e reservada, em seguida adicionou-se pérolas de Boraxe 240 ml de n-hexano. A amostra foi colocada em condensadores Soxhlet na Bateria Sebelin, e foi aguardado de 6 a 8 horas de extração. Logo mais, as chapas aquecedoras foram desligadas, o resfriamento dos balões foi aguardado e o sistema Soxhlet/ balão foi retirado.

Por fim, foi colocada água destilada no banho-maria do rotaevaporador e aquecida a 50°C, e associado a um condensador mantido sempre com água gelada. O

balão de fundo chato foi retirado e levado para o fluxo de gás nitrogênio industrial para retirar o resíduo do solvente até o peso do balão estabilizar. O balão com o óleo foi pesado e seu peso anotado. O óleo obtido foi transferido para frascos âmbar e armazenado em freezer (-20°C).

#### **4.2 Obtenção da Quitosana**

A obtenção da quitosana deu-se mediante os seguintes processos: pré-tratamento, desmineralização, desproteíntização, desodorização e secagem. Foi utilizada para os ensaios realizados em escala piloto uma capacidade de 7kg de matéria-prima. O processo de produção de quitosana foi realizado a partir da desacetilação da quitina, em que a quitina reage com solução de NaOH 45°Bé (42,3%), em um reator com agitação e aquecimento (130° C constante), por 2 horas, logo após é removido o excesso do reagente com água aquecida. Da quitina desacetilada obtém-se a quitosana e esta passou por um processo de purificação, que consiste em dissolver quitosana a 1%, em solução de 1% ácido acético. Essa solução é centrifugada, e o material não dissolvido foi separado. Após, foi feita a neutralização com ácido até pH 7,0<sup>9</sup>.

#### **4.3 Obtenção das Nanopartículas (NPs) de quitosana**

A quitosana foi purificada a 0,5% (p/v) em solução de ácido acético 1% (v/v). Após 24h sob agitação e temperatura ambiente, o pH original da solução de 4,0 foi ajustado para  $4,7 \pm 0,1$  com solução de NaOH 10 N. As NPs foram formadas após o gotejamento de solução aquosa de tripolifosfato de sódio (TPP) 0,25% (p/v) à solução de CS na razão 1:3 (v/v). O gotejamento foi feito por intermédio de uma bomba dosadora peristáltica Havard com agulha descartável (0,70 mm de diâmetro, a 500,0µL /min, sob magnética de 30 minutos (300rpm)).

#### **4.4 Amostras**

Foi estabelecida uma proporção óleo:quitosana de 1:2, óleo:span80 de 1:1, óleo:etanol de 3:1 TPP (Tripolifosfato) foi usado na proporção de 3mL para 10mL de quitosana. A densidade do óleo de pequi foi de 0,8 g/mL. Foi usado nas amostras de quitosana 126mg (1,4mL) de quitosana, e 23,6mL de água destilada.

Foi necessário fazer modificações de proporção e adição de diluentes, para melhorar a solubilidade do sistema. Dessa forma, o óleo foi diluído com span 80 e etanol devido a polaridade hidrofóbica do óleo em relação a quitosana. Devido a essa

modificação, pode-se levar em consideração a possibilidade de influência na estabilidade fisicoquímica da amostra.

**Amostra I e I1:** quitosana(1,4mL=126mg)+ H<sub>2</sub>O(23,6mL)+ácido acético(0,25mL), sob agitação magnética por 24h. Adicionou-se 7,5mL de TPP com uma bomba injetora (500,0μL /min), agitou-se por 30min (3,88 mg/mL de quitosana).

**Amostra L e L1:** óleo de pequi(70 μL)+ span (70μL)+ etanol(210μL)+ H<sub>2</sub>O(23,6mL), sob agitação magnética por 30min (2,34 mg/mL de óleo)

**Amostra K e K1:** quitosana (1,4mL)+span (70μL)+ etanol(210μL)+ H<sub>2</sub>O(23,6mL)+ Ác. Acético(0,25mL, o qual evapora), sob agitação magnética por 24h. Adicionou-se 7,58 mL de TPP com uma bomba injetora (500,0μL /min), agitou-se por 30min (3,834 mg/mL de quitosana).

**Amostra J e J1:** quitosana (1,4mL)+óleo de pequi(70 μL)+ span (70μL)+ etanol(210μL)+ H<sub>2</sub>O(23,6mL)+ Ác. Acético (0,25mL, o qual evapora), sob agitação magnética por 24h. Adicionou-se 7,6mL de TPP com uma bomba injetora (500,0μL /min), agitou-se por 30min (3,82 mg/mL de quitosana, 0,017mg/mL de óleo).

#### 4.5 Potencial Zeta

As análises foram realizadas no equipamento Malvern Zetasizer Nano S, da Malvern Instruments Ltd, o qual utiliza o princípio da difração do raio laser. As medidas foram realizadas em triplicata a 25 °C.

#### 4.6 Grupos de teste e controle (teste antimicrobiano)

Amostras do	}	1.TPP	2.O1(Óleo de Pequi + Etanol)
Grupo		3. O2 (Óleo de Pequi + Span 80)	4. Etanol
Controle		5. Span 80	6. Ác. Acético

Amostras	}	1. K1
do		2. I1
Grupo		3. L1
Teste		4. J1

Cultivo: *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212)

##### 4.6.1 Preparo do inóculo

Para o cultivo de *E. faecalis*, foi realizado o descongelamento das cepas de referência em temperatura ambiente. Em seguida, 50 µL do inoculo e 5mL (5000 µL) do meio BHI-Caldo foram colocados em tubos Falcon com tampa previamente esterilizados. Após homogeneização no Agitador e tubos (Vórtex, da FANEM®, modlo 251), os tubos semi-abertos foram colocados em jarra de anaerobiose e levado para a Estufa Cultura Bacteriológica (Sterilifer, SX1.0DTMC), durante 48 horas a 37°C. Após 48h do cultivo, o tubo foi colocado em aparelho centrifugador (Centrífuga 80-2B, CENTRIBIO ) e centrifugado por 15 minutos na velocidade 2.500 rpm (rotações por minuto). Em seguida, o sobrenadante foi descartado e ao tubo foi acrescentado 5 mL de solução salina (NaCl 0,9%). Após, a mistura foi homogeneizada no Vórtex e realizada a leitura da densidade bacteriana <sup>12</sup>.

#### **4.6.2 Padronização**

As suspensões bacterianas preparadas em solução salina (NaCl 0,9%) foram padronizadas através de espectrofotômetro (GLOMAX MULTI, Promega) emitindo comprimento de onda de 625 nm e valor de absorbância variando entre 0,080 a 0,100 correspondente a concentração de 1 a 2 × 10<sup>8</sup> UFC (unidades formadoras de colônias)/mL, equivalente a 0,5 da Escala de MacFarland. Para a leitura, uma placa de 96 poços de fundo chato (COSTAR®) foi utilizada, onde no primeiro poço foram colocados 100 µL de salina e no segundo poço, 100 µL do inóculo previamente preparado <sup>12</sup>.

#### **4.6.3 Microdiluição em caldo e replaqueamento dos subcultivos**

A determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) para os grupos avaliados foi realizada através da técnica da microdiluição em caldo (NCCLS, 2003). Realizou-se paralelamente a microdiluição dos controles de viabilidade das cepas controle de crescimento (CC - 100 µL do meio-caldo e 100 µL do inóculo), controle de esterilidade do meio (CE - 100µL do meio-caldo), e controle positivo não foi feito, pois a literatura defende que a amostra "I" tem efeito antibacteriano contra *E. faecalis*<sup>13</sup>.

Inicialmente, foram distribuídos 100 µL de BHI-caldo nos orifícios da placa de microdiluição de fundo em U. Posteriormente, 100 µL do aduto avaliado foram transferidos para o primeiro poço e diluídos seriadamente a partir da retirada de uma alíquota de 100 µL da cavidade mais concentrada para a cavidade sucessora, seguindo até o ultimo poço. Em seguida, foram adicionados a cada poço 100 µL do

inóculo na concentração  $5 \times 10^5$  UFC/mL. O ensaio foi realizado em triplicata, e as placas de microdiluição foram incubadas em estufa a 37°C durante 24 horas.

A leitura para determinação da CIM dos grupos sobre as cepas de *E. faecalis* foi feita a partir do método visual, levando em consideração a formação ou não de aglomerados de células no fundo da cavidade da placa de microdiluição<sup>9</sup>. Dessa forma, a CIM foi considerada a menor concentração do produto em teste capaz de inibir o crescimento das cepas utilizadas nos ensaios microbiológicos<sup>14</sup>.

Para a confirmação do resultado visual, ou seja, para confirmar a presença de microrganismos viáveis nas concentrações inibitórias, 30 µL do corante Resazurina Sódica (Sigma®) foram adicionados como indicador de óxido-redução, o qual indica alteração de pH (potencial de hidrogênio) devido à presença de microrganismos<sup>15</sup>.

Após 1 hora da aplicação do corante a placa foi avaliada e tabulado os resultados. As Concentrações Bactericidas Mínimas (CBMs) dos adutos foram determinadas a partir do resultado da CIM, no qual será realizado o subcultivo de 10 µL da concentração correspondente à inibitória e as duas concentrações imediatamente mais concentradas (CIM x 2 e CIM x 4)<sup>16</sup>, em placas de petri contendo meio sólido (BHI-ágar). Após 48 horas de incubação à 37°C, foram realizado a leitura das CBMs, considerada a menor concentração que impediu o crescimento visível do subcultivo<sup>14</sup>.

#### **4.6.4 Método de disco difusão em meio sólido**

O ensaio para determinação do efeito antibacteriano das substâncias foi realizado pelo método de disco difusão em meio sólido. Em placas de Petri estéreis serão adicionados 20 mL de BHI-ágar e resfriado a 45-50°C. Após solidificação do ágar, foi inoculado 500 µL da suspensão bacteriana de *E. faecalis* na concentração de  $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>. Em seguida, discos de papel de filtro estéreis serão embebidos em 10 µL do óleo de pequi e colocados sobre o meio de cultura. O ensaio foi realizado em triplicata, e os resultados serão avaliados a partir da mensuração dos diâmetros dos halos de inibição de crescimento bacteriano em milímetros (mm).

## **5. RESULTADOS**

### **5.1 Potencial Zeta**

A descrição das amostras de óleo de pequi utilizadas sob temperatura de 25°C foi:

Amostras	Média do Potencial Zeta	Mobilidade	Condutibilidade Elétrica
I	42,5667 mV	3,336 $\mu\text{mcm/Vs}$	0,562mS/cm
K	43,5 mV	3,41 $\mu\text{mcm/Vs}$	0,5867 mS/cm
L	-41,4 mV	-3,24467 $\mu\text{mcm/Vs}$	0,143mS/cm
J	24,7333 mV	1,939 $\mu\text{mcm/Vs}$	0,9283 mS/cm

Como esperado, o potencial zeta muda de negativo (amostra L) para positivo quando recoberto com quitosana (amostra J) <sup>17</sup>, o que comprova o encapsulamento do óleo de pequi pelas nanopartículas de quitosana.

## 5.2 CIM (Concentração Inibitória Mínima)

Para os grupos experimentais de controle, as atividades antimicrobianas do controle negativo contra o *E. faecalis*, e não tiveram efeito sobre o crescimento, respectivamente, para nenhum dos poços de semeadura.

Em todos os grupos experimentais não se observou efeito de inibição do crescimento do *E. faecalis*, indicando não haver atividade antimicrobiana dos compostos com o óleo do pequi, do óleo do pequi puro e das nanopartículas de quitosana sobre o microrganismo. A resazurina permaneceu na coloração azul, indicando que não houve crescimento bacteriano, e em todas as amostras e alguns controles foi-se observado alteração de cor (roxa, rosa, laranja), conforme observado nas figuras A e B indicando a viabilidade microbiana.

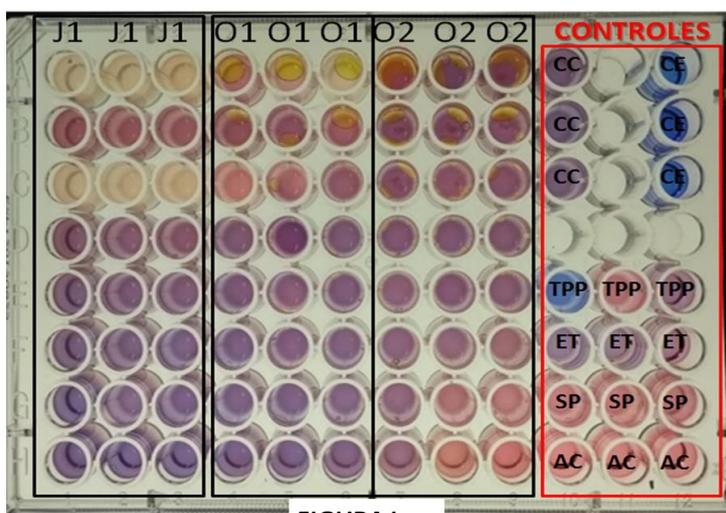


FIGURA I

Figura I : Placa de 96 poços contendo os grupos amostrais: (J), (O1) e (O2) em triplicata. Controle de crescimento (CC). Controles de esterilidade: (CE), (TPP), Etanol (ET), Span(SP), Ácido Acético (AC)

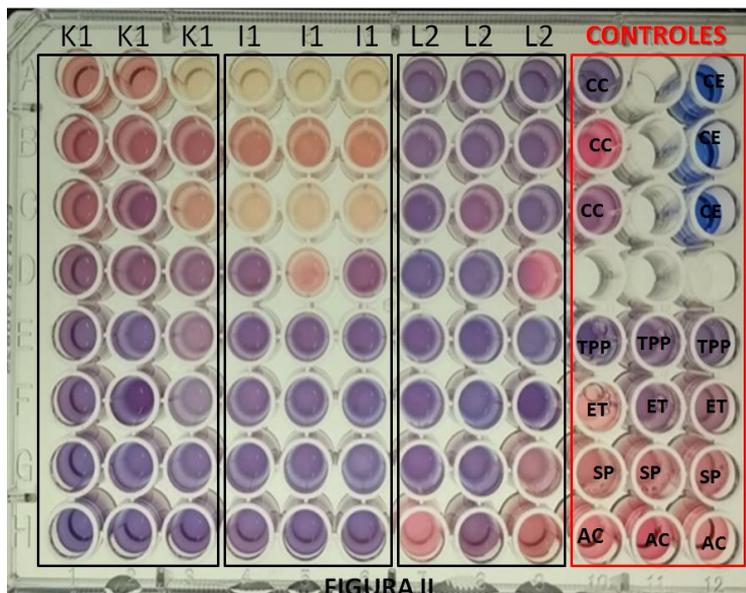


Figura II : Placa de 96 poços contendo os grupos amostrais: (K), (I) e (L) em triplicata. Controle de crescimento (CC). Controles de esterilidade: (CE), (TPP), Etanol (ET), Span(SP), Ácido Acético (AC)

### 5.3 Difusão em ágar (CBM-Concentração Bactericida Mínima)

Nenhuma das concentrações utilizadas se mostraram suficiente para inibir a proliferação da *E. faecalis*.

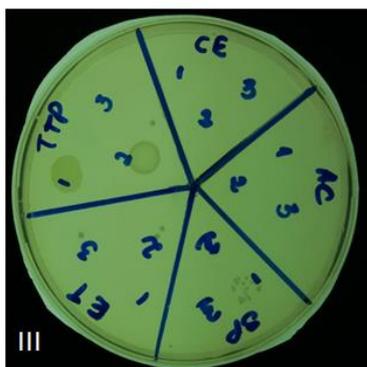


Figura III: Placa de ágar com 5 controles : TPP, ETANOL(ET), ÁCIDO ACÉTICO (AC), SPAN(SP) e puro ágar (CE- controle de esterilidade)

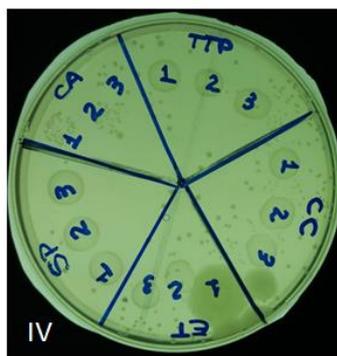


Figura IV: Placa de ágar com 5 controles : TPP, CA (controle de atividade), CC (controle de crescimento), SPAN (SP), ETANOL(ET)

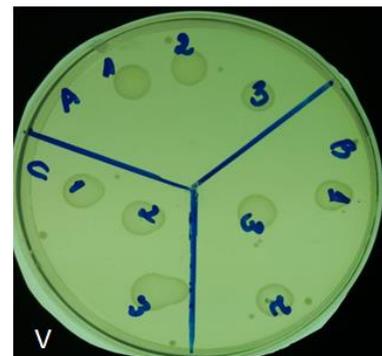


Figura V: Placa de ágar com triplicata de O2(óleo de pequi+span)

### 5.4 Difusão em disco no ágar

Visto que as amostras testadas não tiveram atividade antimicrobiana, feito um novo teste de

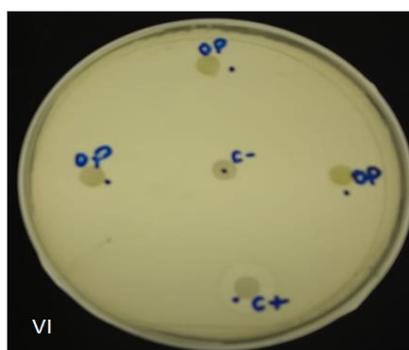


Figura VI. Placa de ágar com 5 discos: C±(controle de atividade) com clorexidina 0,2%, C-(controle negativo), OP(óleo de pequi)

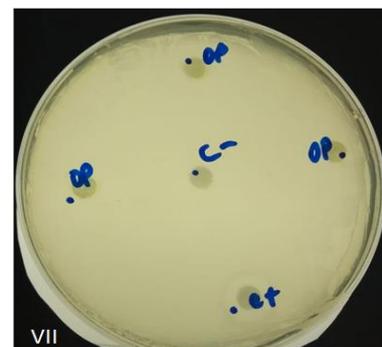


Figura VII. Replicata da figura VI.

difusão em disco com 10µL de óleo de pequi puro reproduzindo a mesma ineficácia dos testes anteriores.

## 6. DISCUSSÃO

O estudo mostrou que o óleo do mesocarpo do pequi não teve ação contra *E. faecalis*. Curiosamente a literatura mostra que a extração proveniente de outras partes da planta pode ter ação antimicrobiana. Por exemplo, a atividade antibacteriana do extrato hidroetanólico de *Caryocar brasiliense* Cambess, foi positiva para *E. faecalis*, concluindo que substâncias antioxidantes (no extrato mostrou a presença de flavonoides, taninos, saponinas e terpenóides) presentes no extrato hidroetanólico das folhas do pequizeiro são responsáveis pela atividade antimicrobiana desse fitoterápico<sup>7</sup>. O extrato aquoso da folha do *C. brasiliense* apresentou bioatividade inibitória intermediária somente sobre a bactéria *S. aureus* em concentração de 50g/mL, não demonstrando atividade sobre *E. coli*, *E. faecalis* e *P. aeruginosa*<sup>18</sup>. Podemos então inferir que a forma de extração na forma de extrato tem resultados podem ter efeitos biológicos distintos. Também sabe-se que as características hidrofóbicas do óleo, por não possibilitarem mistura homogênea com o meio de cultura, tem uma exposição diferencial entre a bactéria e o agente inibidor podendo trazer prejuízos ao efeito antimicrobiano<sup>19</sup>.

Muitos fatores podem influenciar sobre os dados obtidos da CIM, como por exemplo métodos de difusão e diluição, condições de cultivo (tempo de incubação, temperatura, taxa de oxigênio), meio de cultura, concentração das substâncias testadas, dispersão e emulsificação dos agentes utilizados na emulsão óleo-água<sup>20</sup>. A concentração do extrato, a qualidade do material coletado, época de coleta, teor do princípio ativo ou baixa sensibilidade dos microrganismos estudados aos óleos e extratos podem ter gerado essa ausência na atividade antimicrobiana dos mesmos<sup>21</sup>.

Tem-se feito tentativas de atividade antimicrobiana contra *E. faecalis* com nanoencapsulamento. Por exemplo, o gel de Nanopartículas de Prata (NPs de Ag) nas concentrações 0,05%, 0,1% e 0,2% foi testado em comparação a clorexidina (CHX) 2% e ao fenol canforado. Não foram encontradas diferenças significativas entre NPs de Ag 0,05% e as outras substâncias, porém o gel de NPs de Ag 0,1% e 0,2% foi mais eficaz que a CHX e fenol canforado<sup>22</sup>. As nanopartículas de quitosana liofilizadas da pesquisa de Blanco<sup>4</sup>, indicaram atividade antimicrobiana sobre o *E. faecalis* e apresentaram tamanho compatível com o diâmetro dos túbulos dentinários, indicando uma amostra que possui potencial antimicrobiano, biocompatibilidade e poder de penetração dentinário. No nosso estudo, porém a quitosana foi inerte. Isso corrobora

com outro estudo que utilizou NPs de quitosana a 0,2% como substância irrigadora e quenão debelou a contaminação dentinária da *E. faecalis*<sup>23</sup>.

O potencial zeta é a magnitude de atração ou repulsa entre as partículas e fornece informações sobre a interação eletrostática entre as superfícies. No caso das nanopartículas, uma característica importante é a carga superficial positiva. O potencial zeta está diretamente relacionado ao seu potencial antimicrobiano, tais como a média dos valores do potencial zeta de cada grupo de amostra, o desvio padrão e o pH<sup>24</sup>. Estudos demonstraram que partículas com um potencial abaixo de -30 mV e acima de +30 mV são mais estáveis em suspensão e apresentam menor agregação. As partículas neutras apresentam menores taxas de opsonização quando comparadas a partículas altamente carregadas <sup>25</sup>.

Embora o óleo da espécie *C. coriaceum*, as nanopartículas de quitosana e as nanocápsulas de quitosana com o óleo não tenham demonstrado atividade bacteriana contra *E. Faecalis* devem ser realizados mais testes com essas substâncias. Estes testes devem ser feitos sob novas condições de extração, proporção, preparo das amostras e levar em consideração as influências agrícolas sobre fruto.

## 7. CONCLUSÃO

Conclui-se que o óleo do *C. coriaceum* encapsulado em nanopartículas de quitosana não exerceram atividade antimicrobiana sobre *E. faecalis*.

## 8. REFERÊNCIAS

1. Lopes, HP, Siqueira Júnior, JF. Endodontia: Biologia e técnica. 3. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015.
2. Stojanović N, Krunić J, Popović B, Stojičić S, Živković S. Prevalence of *Enterococcus faecalis* and *Porphyromonas gingivalis* in Infected Root Canals and Their Susceptibility to Endodontic Treatment Procedures: A Molecular Study. *SrpArhCelokLek*. 2014 Sep-Oct;142(9-10):535-541.
3. Perochena, AEDC. Efeito das nanopartículas de quitosana e da variação da concentração temperatura e pH do hipoclorito de sódio sobre biofilmes orais formados "in situ"[dissertação de doutorado] Bauru (SP): Universidade de São Paulo; 2015. 131p.
4. Delboni MG, Gomes BPFA, Francisco PA, Teixeira FB, Drake D. Diversity of *Enterococcus faecalis* genotypes from multiple oral sites associated with endodontic

failure using repetitive sequence-based polymerase chain reaction and arbitrarily primed polymerase chain reaction. *Journal of Endodontics* 2017, 43(3): 377–382.

5. Vidana R, Rashid MU, Özenci V, Weintraub A, Lund B. The origin of endodontic *Enterococcus faecalis* explored by comparison of virulence factor patterns and antibiotic resistance to that of isolates from stool samples, blood cultures and food. *International Endodontic Journal* 2015, 49(4): 343–351.

6. Wang Z, Shen Y, Haapsalo M. Effectiveness of Endodontic Disinfecting Solutions against Young and Old *Enterococcus faecalis* Biofilms in Dentin Canals. *Journal of Endodontic* 2012, Oct; 38(10):1376-9.

7. De Paula-Junior W, Rocha FH, Donatti L, Fadel-Picheth CMT, Weffort-Santos AM. Leishmanicidal, antibacterial, and antioxidant activities of *Caryocar brasiliense* Cambess leaves hydroethanolic extract, *Rev. Bras. Farmacogn* 2006 Dez; 16 Suppl: 625–630.

8. Batista JS, Silva AE, Rodrigues CMF, Costa KMFM, Oliveira AF, Paiva ES, Nunes FVA, Olinda RG. Avaliação da atividade cicatrizante do óleo de pequi (*Caryocar coriaceum Wittm*) em feridas cutâneas produzidas experimentalmente em ratos. *Arq. Inst. Biol.* 2010 jul/set; 77(3): 441-447.

9. Moura C, Muszinsk P, Schmidt C, Almeida J, Pinto L. Quitina e Quitosana Produzidas a partir de resíduos de Camarão e Siri: Avaliação do Processo em Escala Piloto. *Vetor* 2006; 16(1/2): 37-45.

10. Yadav P, Chaudhary S, Saxena RK, Talwar S, Yadav S. Evaluation of Antimicrobial and Antifungal efficacy of Chitosan as endodontic irrigant against *Enterococcus Faecalis* and *Candida Albicans* Biofilm for endodontic substrate. *J ClinExpDent.* 2017 Mar 1;9(3):361-367.

11. Meneses, ACSMMAKL. Soluções irrigantes em endodontia: revisão de literatura [monografia]. Recife: Faculdade Integrada de Pernambuco. 2017..

12. NCCLS. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacterial that grow aerobically, Approved Standard. 6ed. NCCLS document M07-A6. National Committee for Clinical Laboratory Standards Wayne 2003,23(2).

13. Blanco MA. Avaliação da incorporação de nanopartículas de quitosana ao cimento endodôntico AH PLUS [Dissertação de Mestrado] Rio de Janeiro (RJ): Universidade Federal do Rio de Janeiro; 2011. 66p.

14. Andrews JM. Determination of minimum inhibitory concentrations. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 2001; 48(1): 5–16.

15. Montejano HA, Gervaldo M, Bertolotti SG. The excited-states quenching of resazurin and resorufin and resofurin and by p- benzoquinones in polar solvents. *Dyes and Pigments* 2005; 64: 117-124.
16. De Castro RD, Lima EO. Anti-candida activity and chemical composition of *cinnamomum zeylanicum* blume essential oil. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 2013; 56(5) : 749–755.
17. Guterres SS, Pohlmann AR, Frank LA, Michalowski CB. Desenvolvimento e caracterização de nanocápsulas multiparede contendo captopril e furosemida para administração oral. *Clinical and biomedical research* 2014; 34: 86.
18. Machado DS, Abreu SGF, Lamounier LO, Negreiros D. Avaliação antibacteriana do extrato aquoso da folha de *caryocar brasiliense cambess.* (caryocaraceae). *Visão Acadêmica* 2018 Jan-Mar; 19(1): 5-19.
19. Cansian RL, Mossi AJ, Oliveira D, Toniazzo G, Treichel H, Paroul N, Astolfi V, Serafini LA, *et al.* Atividade antimicrobiana e antioxidante do óleo essencial de ho-sho (*Cinnamomum camphora* Ness e Eberm Var. Linalooliferafujita). *Food Science and Technology* 2010; 30(2), 378-384.
20. Nascimento PFC , Nascimento AC , Rodrigues CS, Antonioli AR , Santos PO, Júnior AMB, Trindade RC, *et al.* Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. *Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy* 2007 Jan./Mar; 17(1): 108-113.
21. Souza CN, Almeida AC, Xavier MTR, Costa JPR, Silva LMV, Martins ER, *et al.* Atividade antimicrobiana de plantas medicinais do cerrado mineiro frente a bactérias isoladas de ovinos com mastite. *Montes Claros* 2017 jul./dez; 19(2):51-61.
22. Bo D, Kayombo CM. Effect of nanosilver gel, chlorhexidinegluconate, and camphorated phenolon *Enterococcus faecalis* biofilm. *IntSch Res Notices.* 2014; 1-5.
23. Nunes LF. Avaliação da efetividade de diferentes substâncias químicas irrigantes contra o *Enterococcus faecalis*. Estudo ex vivo [Dissertação de Mestrado]. Cuiabá (MT): Universidade de Cuiabá – UNIC; 2017.65p.
24. Skoog DA, Holler FJ, Nieman TA. *Princípios de Análise Instrumental.* 5ª ed. Porto Alegre (RS) : Bookman; 2002.
25. Xiao K, Li Y, Luo J, Lee JS, Xiao W, Gonikb AM, Agarwal R, Lama KS. The effect of surface charge on in vivo biodistribution of PEG- oligocholic acid based micellar nanoparticles. *Biomaterials* 2011 May ; 32(13): 3435–3446.