



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

LUTE RAFAEL DE SOUZA

ESTUDO DA DEGRADAÇÃO MICROBIANA *IN VITRO* DO POLI (1,4-*TRANS*-ISOPRENO) (*IN NATURA*) E EM CONES DENTÁRIOS

FORTALEZA

2012

LUTE RAFAEL DE SOUZA

ESTUDO DA DEGRADAÇÃO MICROBIANA *IN VITRO* DO POLI (1,4-*TRANS*-ISOPRENO) (*IN NATURA*) E EM CONES DENTÁRIOS

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Química, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Química.

Área de concentração: Química

Orientadora: Profa. Dra. Judith Pessoa de Andrade Feitosa

FORTALEZA

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Universidade Federal do Ceará

Biblioteca de Ciências e Tecnologia

S713e Souza, Lute Rafael de.

Estudo da degradação microbiana in vitro do poli (1,4-trans-isopreno) (in natura) e em cones dentários / Lute Rafael de Souza – 2012.

80 f. : il. color., enc. ; 30 cm.

Mestrado (Dissertação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciência, Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Mestrado em Química, Fortaleza, 2012.

Área de Concentração: Química.

Orientação: Profª. Dra. Judith Pessoa de Andrade Feitosa.

1. Enterococcus faecalis.
2. Cones de Guta-Percha.
3. Biodegradação.
- I. Título.

CDD 547

Esta Dissertação foi aprovada como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Química, área de concentração Química , outorgada pela Universidade Federal do Ceará, em cuja Biblioteca de Ciências e Tecnologia/UFC encontra-se à disposição dos interessados.

Lute Rafael de Souza
Lute Rafael de Souza

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: 21/09/2012

EXAMINADORES:

Judith P. de A. Feitosa
Profa. Dra. Judith Pessoa de Andrade Feitosa
Universidade Federal do Ceará – UFC

Regina Célia M. Paula
Profa. Dra. Regina Célia Monteiro de Paula
Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof. Dr. Isaac Neto Goes da Silva
Universidade Estadual do Ceará- UECE

O presente trabalho se desenvolveu sob orientação da professora Dra. **Judith Pessoa de Andrade Feitosa**, no Laboratório de Polímeros, no Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará, com colaboração de pesquisadores do Laboratório de Bioprospecção e Produtos Naturais, na Universidade Estadual do Ceará, no Centro de Ciências e Tecnologia da Região dos Inhamuns, no Município de Tauá, Ceará.

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

(Albert Einstein)

Aos meus pais José Antonio e Maria do Espírito Santo, que sempre acreditaram em mim e nunca deixaram com que eu deixasse de acreditar nos meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus que sempre olha pra mim, nunca me esquece e sempre me guia e me ouve quando eu preciso.

Aos meus pais, José Antonio e Maria do Espírito Santo, que sempre se dedicaram para que eu pudesse ter uma educação de qualidade, sempre acreditaram no meu potencial e sempre contribuíram para o aumento da minha auto estima, fazendo com que eu sempre acreditassem nos meus sonhos.

À minha namorada Ítala que sempre me apoiou emocionalmente durante toda a jornada para a realização dessa dissertação.

Aos meus irmãos Ronaldo, Jacqueline e Janaina que sempre me apoiaram e torceram por mim.

À todos os parentes que sempre me deram todo o incentivo necessário para que eu pudesse superar mais essa etapa na minha vida.

Aos meus amigos e ex-colegas de graduação Samuel, Erivalda e Rilakson que torceram muito para que eu alcançasse o grau de mestre.

Aos colegas do Laboratório de Polímeros, pela amizade, pela confiança, pelos auxílios e pela contribuição intelectual, pois me espelhei em vários deles para arranjar forças para superar os desafios impostos pelo curso de Mestrado em Química.

Aos meus amigos Igor, Gilliard e Batista que são amigos com os quais eu sempre poderei contar com a amizade e o bom humor deles.

Aos alunos de iniciação científica Josué e Cristiane que foram muito importantes para a realização dos ensaios microbiológicos e também pela amizade que com certeza se estenderá além das paredes da universidade.

Aos colegas do Laboratório de Biotecnologia e Recursos Naturais (BIOREN) do CECITEC, Tauá, pela amizade, pela confiança, pelos auxílios e pelos incentivos.

Ao professor Júnior que sempre me apoiou e sempre acreditou no meu potencial, como também de todos aqueles que já estudaram ou estudam no CECITEC.

Aos professores Lúcio e Vitor que sempre acreditaram na minha capacidade e me incentivaram bastante durante toda a minha jornada acadêmica.

À professora Loba que sempre me incentivou e sempre acreditou na minha capacidade, mas me mostrou que “a sorte é uma mistura de oportunidade e competência”.

Ao professor Vicente que me ensinou que “a vida é feita de desafios e que devemos estar aptos para superá-los, caso contrário, seremos superados pelos obstáculos impostos pela sociedade”.

Aos professores Ernani e Vania Melo que colaboraram para a realização dos experimentos microbiológicos com suporte teórico, como também tiveram muita paciência comigo e se mostraram grandes incentivadores.

Ao professor Cláudio Maniglia que colaborou com o trabalho através do fornecimento dos materiais odontológicos e com suporte teórico, como também teve bastante paciência comigo e sempre esteve disponível quando precisei.

Às professoras Regina, Jeanny e Pablyana que sempre tiveram disponibilidade para as minhas indagações, como também se mostraram grandes incentivadoras.

À profa. Judith, que é muito mais do que uma excelente orientadora, pela confiança, incentivo e paciência.

Ao orgão de fomento CAPES, pelo apoio financeiro concedido.

À todos, que de alguma maneira contribuíram para a realização desse trabalho.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|-----|---|
| BHI | Brain Heart Infusion (Infusão de Coração e Cérebro) |
| MSM | Meio de Sais Minerais |
| UFC | Unidades Formadoras de Colônias |

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|-------------|---|----|
| Figura 1 - | Representação esquemática do poli (1,4- <i>trans</i> -isopreno) | 17 |
| Figura 2 - | Estrutura morfológica de um dente..... | 20 |
| Figura 3 - | Etapas de formação de biofilme bacteriano..... | 22 |
| Figura 4 - | Produtos de baixa massa molecular obtidos da degradação do poli (1,4- <i>cis</i> -isopreno)..... | 23 |
| Figura 5 - | Metodologia da separação dos constituintes dos cones de guta-percha..... | 28 |
| Figura 6 - | Metodologia empregada na etapa de diluição do inóculo para a contagem de células e medidas de densidade óptica..... | 29 |
| Figura 7 - | Metodologia empregada na etapa de construção da curva de calibração para contagem do inóculo por densidade óptica..... | 30 |
| Figura 8 - | Variação de massa dos cones de guta-percha postos em contato com <i>E. faecalis</i> (●) Odous® (○) Tanari®..... | 38 |
| Figura 9 - | Porcentagem de aumento de resíduo a 800 °c dos cones de guta-percha imersos em meio com <i>Enterococcus faecalis</i> (●) Odous® (○) Tanari®..... | 39 |
| Figura 10 - | Porcentagem de aumento de resíduo a 800 °c dos cones de guta-percha imersos em meio com <i>Enterococcus faecalis</i> (●) Odous® (○) Tanari®..... | 40 |
| Figura 11 - | Variação de M_{pk} do poli (1,4- <i>trans</i> -isopreno) proveniente dos cones das marcas (●) Odous® e (○) Tanari® em <i>E. faecalis</i> | 41 |
| Figura 12 - | Cromatogramas do poli (1,4- <i>trans</i> -isopreno) proveniente dos cones da marca Odous®..... | 42 |
| Figura 13 - | Cromatogramas do poli (1,4- <i>trans</i> -isopreno) proveniente dos cones da marca Tanari®..... | 43 |
| Figura 14 - | Espectros de infravermelho para os cones da marca Odous® imersos em meio líquido contendo a bactéria <i>E. faecalis</i> | 46 |
| Figura 15 - | Espectros de infravermelho para os cones da marca Tanari® imersos em meio líquido contendo a bactéria <i>E. faecalis</i> | 47 |
| Figura 16 - | Cinética de absorbância relativa das bandas de deformação de OH/OOH, C=O e C=C-H para o poli (1,4- <i>trans</i> -isopreno) isolado dos cones da marca Odous® em contato com <i>E. faecalis</i> | 49 |
| Figura 17 - | Cinética de absorbância relativa das bandas de deformação de OH/OOH, C=O e C=C-H para o poli (1,4- <i>trans</i> -isopreno) isolado dos cones da marca Tanari® em contato com <i>E. faecalis</i> | 50 |
| Figura 18 - | Imagen da superfície dos cones da marca Odous®. à esquerda: cone submetido ao contato com meio de sais minerais (MSM) sem o inóculo (CN). à direita: cone submetido ao contato com o inóculo por 80 dias. Aumento de 2000x..... | 51 |
| Figura 19 - | Variação de massa do poliisopreno <i>in natura</i> imerso em meio com <i>Enterococcus faecalis</i> | 52 |
| Figura 20 - | Variação de M_{pk} do poliisopreno <i>in natura</i> submetido ao contato com <i>E. faecalis</i> | 54 |
| Figura 21 - | Cromatogramas do poli (1,4- <i>trans</i> -isopreno) <i>in natura</i> | 55 |
| Figura 22 - | Espectros de infravermelho para o poliisopreno <i>in natura</i> em meio líquido contendo a bactéria <i>Enterococcus faecalis</i> | 57 |
| Figura 23 - | Cinética de absorbância relativa das bandas de OH/OOH, C=O e C=C-H para o poli (1,4- <i>trans</i> -isopreno) <i>in natura</i> em contato com <i>E.</i> | |

| | | |
|-------------|--|----|
| | <i>faecalis</i> | 58 |
| Figura 24 - | RMN H ¹ para o poliisopreno <i>in natura</i> submetido ao contato com o controle negativo por 100 dias..... | 59 |
| Figura 25 - | RMN H ¹ para o poliisopreno <i>in natura</i> não submetido ao bioensaio | 60 |
| Figura 26 - | RMN H ¹ para o poliisopreno <i>in natura</i> submetido ao contato com o inóculo por 100 dias..... | 60 |
| Figura 27 - | Estruturas provenientes da oxidação do poli (1,4- <i>trans</i> -isopreno) | 61 |
| Figura 28 - | Ensaios de atividade antimicrobiana mediante <i>E. faecalis</i> . da esquerda para a direita: óxido de zinco, sulfato de bário, material inorgânico isolado dos cones da marca Odous®..... | 63 |
| Figura 29 - | Medidas periódicas de pH dos MSM's inoculados contendo (●) cones da marca Odous® (○) cones da marca Tanari® (Δ) poliisopreno <i>in natura</i> | 64 |
| Figura 30 - | Concentração de <i>E. faecalis</i> obtida através de medidas de densidade óptica dos meios contendo (●) cones da marca Odous® (○) cones da marca Tanari® (Δ) poliisopreno <i>in natura</i> | 65 |
| Figura 31 - | Número de células de <i>E. faecalis</i> obtido por contagem de células dos meios contendo (●) cones da marca Odous® (○) cones da marca Tanari® (Δ) poliisopreno <i>in natura</i> | 67 |
| Figura 32 - | Biomassa seca de células de <i>E. faecalis</i> proveniente dos meios inoculados contendo (●) cones da marca Odous® (○) cones da marca Tanari® (Δ) poliisopreno <i>in natura</i> | 69 |
| Figura 33 - | Medidas de porcentagem de mineralização de CO ₂ dos cones da marca Odous® (●) Tanari (○) e do poliisopreno <i>in natura</i> (Δ) imersos em <i>E. faecalis</i> | 70 |
| Figura 34 - | Medidas de pH dos controles negativos com 30 mg de Ba(OH) ₂ .8H ₂ O dos meios com (●) cones da marca Odous® (○) cones da marca Tanari® (Δ) poliisopreno <i>in natura</i> | 72 |
| Figura 35 - | Ensaio de liberação de Zn ²⁺ a temperatura de 37 °C (●) cones da marca Odous® (○) cones da marca Tanari®..... | 73 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|-------------|--|----|
| Tabela 1 - | Componentes dos cones de guta-percha..... | 18 |
| Tabela 2 - | Tratamento matemático usado nos dados experimentais para experimentos feitos em triplicata e sem replicata..... | 35 |
| Tabela 3 - | Porcentagem em massa dos constituintes dos cones de guta-percha das marcas Odous® e Tanari®..... | 37 |
| Tabela 4 - | Massa molar de pico (M_{pk}) do poli (1,4- <i>trans</i> -isopreno) dos cones de guta-percha das marcas Odous® e Tanari®..... | 43 |
| Tabela 5 - | Atribuições das bandas de infravermelho do poli (1,4- <i>trans</i> -isopreno) isolado dos cones das marcas Odous® e Tanari® e do poli (1,4- <i>trans</i> -isopreno) <i>in natura</i> (guta) submetidos ao contato submetidos ao contato com <i>E. faecalis</i> por 100 dias..... | 45 |
| Tabela 6 - | Perda de massa dos materiais após 100 dias de contato com o inóculo..... | 52 |
| Tabela 7 - | Massa molar de pico dos cones das marcas Odous®, Tanari® e do poliisopreno <i>in natura</i> após 100 dias de contato com <i>E. faecalis</i> | 53 |
| Tabela 8 - | Principais atribuições das bandas no infravermelho para o poli (1,4- <i>trans</i> -isopreno) isolado dos cones das marcas Odous® e Tanari® e do poli (1,4- <i>trans</i> -isopreno) <i>in natura</i> (guta) submetidos ao contato com <i>E. faecalis</i> por 100 dias..... | 56 |
| Tabela 9 - | Absorbância relativa das bandas de OH/OOH, C=O e C=C-H do poliisopreno em contato com os microorganismos pelo período de 100 dias..... | 59 |
| Tabela 10 - | Diâmetro médio dos halos de inibição para o teste de difusão em poço para <i>Enterococcus faecalis</i> | 62 |
| Tabela 11 - | Medidas de pH após 100 dias de contato dos meios com os materiais | 64 |
| Tabela 12 - | Número de células de <i>E. faecalis</i> obtido por medidas de densidade óptica dos meios em contato com o inóculo por 100 dias..... | 66 |
| Tabela 13 - | Níveis de confiança calculados através de Teste T de Student para a contagem de células por densidade óptica e por contagem de células. | 67 |
| Tabela 14 - | Número de células de <i>E. faecalis</i> obtido por contagem de células dos meios em contato com o inóculo por 100 dias..... | 68 |
| Tabela 15 - | Biomassa de células de <i>E. faecalis</i> dos meios em contato com o inóculo por 100 dias..... | 70 |
| Tabela 16 - | Medidas de porcentagem de mineralização de CO ₂ após 100 dias de contato..... | 71 |

RESUMO

Os cones de guta-percha usados em endodontia, compostos de poli (1,4-*trans*-isopreno), ZnO e/ou BaSO₄ e ceras/resinas, foram feitos para durar a vida inteira nos canais radiculares por eles preenchidos. Entretanto, existem evidências de que esses materiais sofrem degradação com o decorrer do tempo de obturação intensificada quando existem infecções por microrganismos. A bactéria *Enterococcus faecalis* é um desses microrganismos, normalmente associada com infecções periapicais persistentes. A prevalência dessa bactéria em casos de re-tratamento ocorre entre 29 e 79% dos casos. O objetivo do trabalho é estudar a degradação bacteriana de cones de guta-percha em meio contendo *E. faecalis*, com o foco na matéria orgânica, o poliisopreno. Cada amostra de cone foi imersa em meio de sais minerais com inóculo de concentração de $5,4 \times 10^5$ UFC/mL por períodos de 10 a 100 dias. Os cones foram removidos do contato com o inóculo em tempos variados e analisados. Foram pesados e caracterizados por TGA, GPC, FTIR, MEV e RMN H¹. O crescimento do inóculo foi monitorado através de medidas de densidade óptica, determinação da porcentagem de mineralização de CO₂, medidas da biomassa seca de células, medidas de pH e contagem de células. A atividade antimicrobiana dos constituintes inorgânicos dos cones foi verificada mediante o teste de difusão em poço. Foi observada perda gradual de massa dos cones com o tempo de degradação. O aumento no teor de resíduos em 800°C, mostra que houve uma perda progressiva de matéria orgânica e um aumento na proporção de constituintes inorgânicos. Após o contato com *E. faecalis*, o poliisopreno isolado dos cones das marcas Odous® e Tanari® foi analisado e comparado com o poliisopreno *in natura* por GPC e FTIR. Os resultados mostram que nos três casos ocorre uma pequena e gradual perda de massa molar do poliisopreno constituintes do material, mais evidenciada no poliisopreno *in natura*. Os espectros de infravermelho mostraram que a degradação também ocorre com modificações estruturais do polímero, especialmente no surgimento de bandas de deformação de C=O e OH/OOH; e variações no padrão de cristalinidade das bandas de C=C-H. As imagens de MEV mostram que podem ocorrer mudanças na morfologia da superfície dos cones biodegradados, resultado do ataque seletivo ao componente orgânico. Os espectros de RMN de H¹ do poliisopreno *in natura* mostram que o material sofreu pequenas mudanças estruturais nas moléculas de poliisopreno durante o bioensaio. Todos os bioensaios de monitoramento indicaram que o inóculo cresce continuamente durante o período de contato com os cones ou com o poliisopreno *in natura*. A bactéria degrada a matéria orgânica dos cones usando-os como fonte de substrato e, consequentemente, causando vazios nos cones que podem ocasionar falhas no tratamento endodôntico.

Palavras-Chave: Cones de Guta-Percha, *Enterococcus faecalis*, poli (1,4-*trans*-isopreno)

ABSTRACT

The gutta-percha cones used in endodontic therapy, consisting of poly (1,4-*trans*-isoprene), ZnO and/or BaSO₄ and wax/resin, were meant to last a lifetime in root canals filled by them. However, there is evidence that these materials suffer degradation with the passage of time when there shutter intensified infections by microorganisms. The bacterium *Enterococcus faecalis* is one of those microorganisms commonly associated with persistent periapical infections. The prevalence of this bacterium in cases of re-treatment is between 29% and 79% of cases. The objective is to study the bacterial degradation of gutta-percha in medium containing *E. faecalis*, with the focus on organic matter, polyisoprene. Each sample cone was immersed in mineral salts medium with inoculum concentration of 5.4×10^5 CFU/mL for periods of 10 to 100 days. The cones were removed from contact with the inoculum at various times and analized. Were weighed and characterized by TGA, GPC, FTIR, NMR H¹ and SEM. The growth of the inoculum was monitored by optical density measurements, determining of percentage of mineralization of CO₂, measured dry biomass cells, measurements of pH and cell count. The antimicrobial activity of inorganic constituents of cones was verified by diffusion test pit. Was observed gradual loss of mass of the cones with the degradation time. The increase in the ash content at 800 °C, shows that there was a progressive loss of organic matter and an increased proportion of inorganic constituents. After contact with *E. faecalis*, polyisoprene isolated cones marks Odous® and Tanari® was analized and compared and the fresh polyisoprene by GPC and FTIR. The results show that in all three cases there is small and gradual loss of the molar mass of the polyisoprene constituents of material, the more evidente in polyisoprene *in nature*. Infrared spectra show that degradation also occurs with strutural modifications of the polymer, especially in the occurrence of deformation bands of C=O and OH/OOH, and variations in the pattern of cristalinity of the bands of C=C-H. The SEM images show that changes may occur in the surface morphology of the cones biodegraded, resulting the from selective attack to the organic component. The NMR H¹ spectra of polyisoprene fresh show that the material has undergone minor structural changes in the molecules of polyisoprene during bioassay. All bioassays monitoring indicated that the inoculum grows continuously during the period of contact with the cones or polyisoprene *in nature*. The bacteria degrades the organic matter of the cones using them as a source of substrate and thereby causing voids cones that can cause failure in endodontic treatment.

Keywords: Gutta-Percha Cones, *Enterococcus faecalis*, Poly (1,4-*trans*-isoprene)

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| LISTA DE NOMENCLATURAS E SIGLAS..... | I |
| LISTA DE FIGURAS..... | II |
| LISTA DE TABELAS..... | IV |
| RESUMO..... | V |
| ABSTRACT..... | VI |

| | |
|---|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO..... | 17 |
| 1.1 O poli (1,4- <i>trans</i> -isopreno)..... | 17 |
| 1.2 Cones de guta-percha..... | 18 |
| 1.3 O tratamento do canal dentário..... | 19 |
| 1.3.1 Microbiota dos canais radiculares..... | 20 |
| 1.3.1.1 <i>Enterococcus faecalis</i> | 21 |
| 1.3.2 A formação de biofilmes..... | 21 |
| 1.4 A degradação microbiana dos cones de guta-percha..... | 23 |
| 2 OBJETIVOS..... | 25 |
| 2.1 Objetivo geral..... | 25 |
| 2.2 Objetivos específicos..... | 25 |
| 3 MATERIAIS E MÉTODOS..... | 26 |
| 3.1 Materiais utilizados..... | 26 |
| 3.1.1 Solventes e reagentes..... | 26 |
| 3.1.2 Meios de cultura..... | 26 |
| 3.2 Metodologia..... | 26 |
| 3.2.1 Ensaio de biodegradação..... | 26 |
| 3.2.2 Processo de separação dos componentes dos cones de guta-percha..... | 27 |
| 3.2.3 Pesagem dos cones e do polímero <i>in natura</i> | 28 |
| 3.2.4 Monitoramento do crescimento celular por medidas de densidade óptica..... | 28 |
| 3.2.5 Determinação da porcentagem de mineralização..... | 30 |
| 3.2.6 Medida de biomassa seca de células..... | 31 |
| 3.2.7 Medidas de pH..... | 32 |
| 3.2.8 Contagem de células viáveis..... | 32 |
| 3.2.9 Teste de difusão em poço..... | 32 |
| 3.2.10 Cromatografia de permeação em gel (GPC)..... | 32 |
| 3.2.11 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)..... | 33 |
| 3.2.12 Análise termogravimétrica (TGA)..... | 33 |
| 3.2.13 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)..... | 33 |
| 3.2.14 Ressonância magnética nuclear de H ¹ (RMN de H ¹)..... | 34 |
| 3.2.15 Espectrofotometria de absorção atômica..... | 34 |
| 4 ESTATÍSTICA..... | 35 |
| 4.1 Tratamento dos dados individuais..... | 35 |
| 4.2 Tratamento dos conjuntos de dados quantitativos..... | 35 |
| 4.3 Informações qualitativas..... | 36 |
| 5 RESULTADOS..... | 37 |
| 5.1 Degradação do poliisopreno dos cones de guta-percha..... | 37 |
| 5.1.1 Caracterização dos cones | 37 |

| | | |
|---------|---|----|
| 5.1.2 | Variação de massa dos cones das marcas Odous® e Tanari®..... | 38 |
| 5.1.3 | Análise do teor residual..... | 39 |
| 5.1.4 | Variação de massa molar do poliisopreno dos cones..... | 41 |
| 5.1.5 | Caracterização química do poliisopreno isolado dos cones..... | 44 |
| 5.1.6 | Cinética da degradação do poliisopreno isolado dos cones..... | 49 |
| 5.1.7 | Análise de imagens da superfície dos cones..... | 51 |
| 5.2 | Degradação do poliisopreno <i>in natura</i> | 52 |
| 5.2.1 | Variação de massa do poliisopreno..... | 52 |
| 5.2.2 | Variação de massa molar do poliisopreno <i>in natura</i> | 53 |
| 5.2.3 | Caracterização química da degradação do poliisopreno <i>in natura</i> | 55 |
| 5.2.4 | Cinética da degradação do poliisopreno <i>in natura</i> | 58 |
| 5.2.5 | Estudo da degradação do poliisopreno <i>in natura</i> através de RMN de H ¹ | 59 |
| 5.3 | Bioensaios | 62 |
| 5.3.1 | Avaliação da atividade antimicrobiana dos constituintes inorgânicos dos cones de guta-percha..... | 62 |
| 5.3.2 | Monitoramento do crescimento de células..... | 63 |
| 5.3.2.1 | Avaliação da acidez..... | 63 |
| 5.3.2.2 | Medidas de densidade óptica..... | 65 |
| 5.3.2.3 | Monitoramento por contagem de células..... | 66 |
| 5.3.2.4 | Monitoramento por obtenção de biomassa seca..... | 68 |
| 5.3.2.5 | Medidas de CO ₂ mineralizado..... | 70 |
| 5.4 | Ensaio de liberação de Zn²⁺ | 73 |
| 6 | CONCLUSÃO | 74 |
| 7 | PERSPECTIVAS FUTURAS | 75 |
| 8 | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 76 |

1 - INTRODUÇÃO

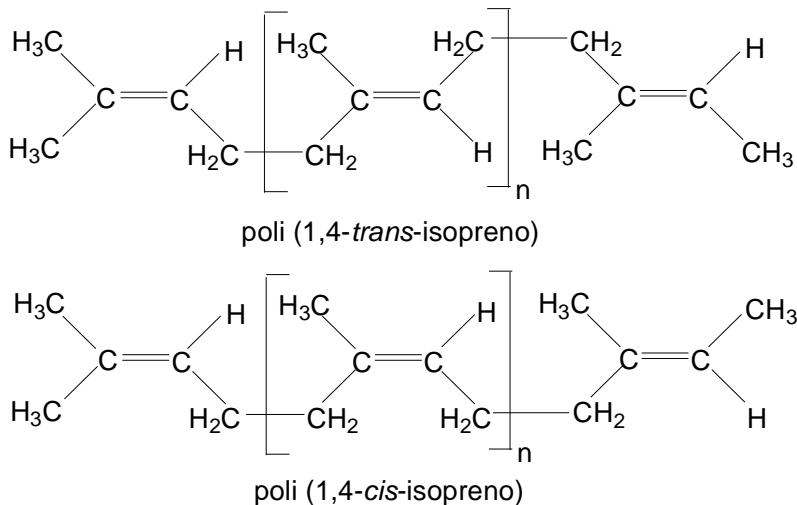
1.1- O poli (1,4-*trans*-isopreno)

Guta-Percha é um polímero orgânico natural, que pode ser obtido pela coagulação do látex de árvores da família das Sapotáceas do gênero *Palaquim*, das espécies *Mimusops balata* e *Mimusops huberi*, existentes principalmente na Sumatra, nas Filipinas e no arquipélago Malaio, e encontradas também na floresta amazônica (RIBEIRO e LIMA, 1998).

Alguns fabricantes admitem utilizar a *balata*, extraída da árvore *Manikara bidentata*, da família das sapotáceas, a qual é abundante no Brasil, particularmente na Amazônia (LOPES e SIQUEIRA JR, 1999). Tem sido relatado que, química e fisicamente, balata e guta-percha são essencialmente idênticas (INGLE e BAKLAND, 1994).

Guta-Percha é um polímero que consiste de unidades C_5H_8 (isopreno), onde cada uma delas contém uma ligação dupla na configuração *trans*, enquanto que a borracha natural, seu isômero, tem suas unidades com uma ligação dupla na conformação *cis*. Guta-Percha produz *trans*-poliisoprenos com massas molares entre $1,4 \times 10^5$ e $1,7 \times 10^5$ g/mol (JENDROSSEK, TOMASI e KOPPENSTEDT, 1997). O principal componente presente no látex é o polímero poli (1,4-*trans*-isopreno) (Figura 1), entretanto o isômero *cis* pode estar presente em menor proporção (GOLUB, ROSENBERG e GEMMER, 1978).

Figura 1 - Representação esquemática do poli (1,4-*trans*-isopreno)



O poli (1,4-*trans*-isopreno) é um termoplástico cristalino que resiste à abrasão, ao corte e à deformação (BUCKLER, 1984). O polímero oferece uma combinação incomum de

propriedades para usos médicos: próteses, talas, aparelhos ortopédicos e anexos para membros artificiais (BUCKLER, 1984). À temperatura ambiente, a guta-percha é um material duro, leve e transparente aos raios-X. Quando colocada em água quente, a guta-percha amacia e cristaliza lentamente à temperatura do corpo, permitindo, desse modo, a moldagem direta no corpo do paciente (SENYEK, 1994). Esse conjunto de propriedades faz com que ela seja um material largamente utilizado na odontologia como material obturador (GOODMAN, SCHILDER e ALDRICH, 1974).

1.2 - Cones de guta-percha

Os cones de guta-percha são materiais usados para o preenchimento de canais radiculares há mais de 100 anos (VALOIS, SILVA e AZEVEDO, 2005). A utilização desses componentes tem como objetivo melhorar as propriedades físico-químicas, principalmente dureza, radiopacidade (BAUMGARTNER, ZEHNDER e PAQUÉ, 2007), flexibilidade e estabilidade dimensional, facilitando seu emprego na obturação de canais (LEONARDO e LEAL, 1991). A faixa de composição dos componentes da guta-percha de várias marcas analisadas foi obtida por Gurgel-Filho e col. (2003) e estão representadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Componentes dos cones de guta-percha

| Componente | Porcentagem de massa |
|--|-----------------------------|
| Óxido de zinco | 36,4 – 84,3 |
| Poli (1,4- <i>trans</i> -isopreno) (guta-percha) | 14,5 – 21,8 |
| Sulfato de bário | 0 – 31,2 |
| Ceras/resinas | 1 – 4,1 |
| Corantes e antioxidantes | Traços |

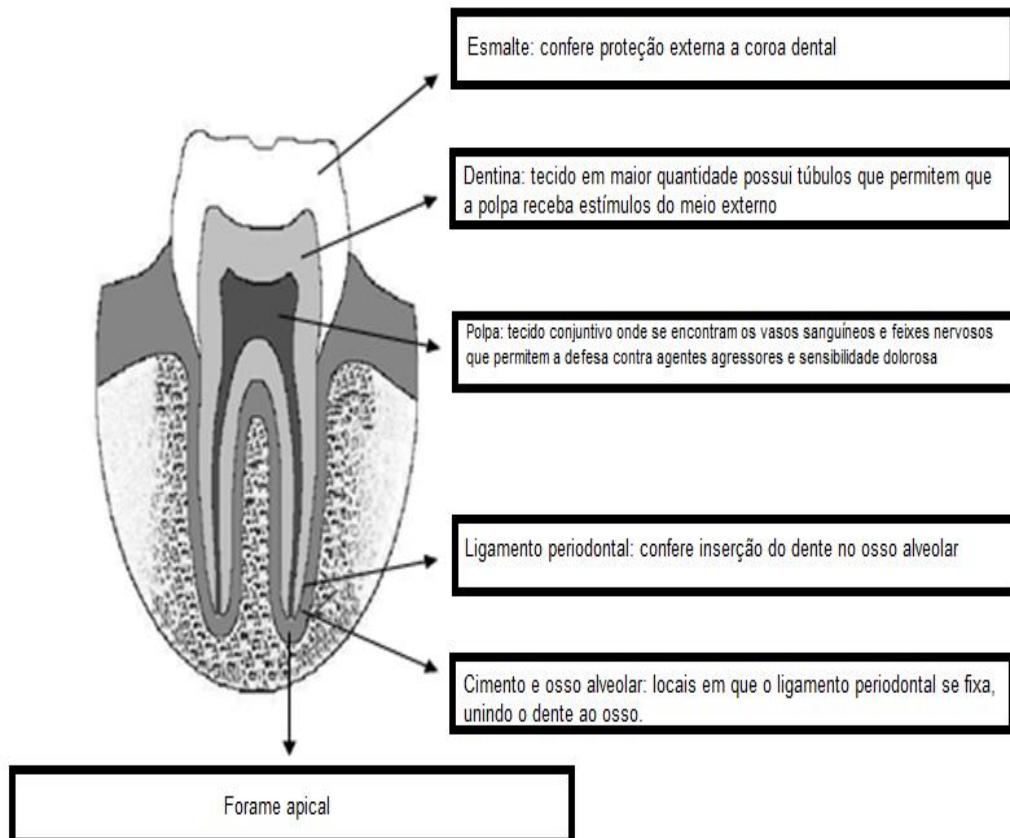
A radiopacidade presente nos cones é devido à presença dos constituintes inorgânicos, em especial ao BaSO₄ que está presente em algumas composições unicamente com a finalidade de conferir essa característica ao material (SILVA e COSTA, 2004). já o ZnO, além de conferir radiopacidade, tem atividade bactericida comprovada e é largamente utilizado em diversos materiais de uso médico e industrial com essa finalidade (KRISHNA, KOODALI e MANNA, 2011; TAYEL e col., 2011; LIPOVSKY e col., 2011). As ceras/resinas têm a função de dar agregação da parte inorgânica com a parte orgânica dos cones, poli (1,4-*trans*-isopreno).

Sob as condições biológicas, sem dúvida, a ampla utilização da guta-percha como material de obturação deve-se a sua qualidade como material inerte (FRANKLIN e col., 2005; HAUMAN e LOVE, 2003), pouco tóxico e não alergênico (ZUOLO, 1998). Outras vantagens citadas são: passível de desinfecção, impermeável à umidade, torna-se plástica pelo calor ou através de solventes comuns, deixa-se condensar adaptando-se razoavelmente às irregularidades do sistema de canais. Após seu endurecimento, não sofre alterações dimensionais, não provoca alteração de coloração do dente, é radiopaca e de fácil remoção do interior do canal, quando necessário (ZUOLO, 1998).

1.3- O tratamento do canal dentário

A endodontia é o ramo da odontologia que estuda a morfologia, fisiologia e patologia da polpa dental e dos tecidos perirradiculares. Resumidamente, essa especialidade cuida da prevenção e tratamento das alterações patológicas da polpa dentária e de suas repercussões na região apical e periapical (LEONARDO, 2005; DE DEUS, 1992). A dentina, polpa e cavidade pulpar representam o endodonto, enquanto que a região apical e periapical estão representadas pelo ápice e tecidos de sustentação do dente que contornam o ápice radicular (cimento, ligamento periodontal e osso alveolar) (LEONARDO, 2005) (Figura 2).

Figura 2 - Estrutura morfológica de um dente. Fonte: LEONARDO, 2005



O objetivo do tratamento dos canais radiculares é prevenir ou curar periodontites apicais por limpeza, lavagem e preenchimento desses canais, de modo a eliminar a inflamação ou infecção da polpa e dos tecidos perirradiculares (MANIGLIA-FERREIRA e col., 2007; MUÑOZ e col., 2007). Alguns microorganismos sobrevivem ao procedimento químico e ao mecânico de limpeza e preenchimento dos canais radiculares ou persistem dentro do material de preenchimento. Eles são capazes de induzir falhas no tratamento endodôntico por aderência à superfície do material levando a infecções, daí a importância de um estudo sobre a influência desses microorganismos na degradação dos cones de guta-percha (SENGES e col., 2011).

1.3.1 - Microbiota dos canais radiculares

Está bem estabelecido que microorganismos e seus produtos metabólicos desempenhem um papel importante na etiologia da manutenção das infecções endodônticas, de modo que um dos principais objetivos do tratamento endodôntico é a maior redução

possível do número de microorganismos no sistema de canais radiculares (FAGUNDES e col., 2005).

Mais de 300 espécies microbianas são encontradas no interior do canal radicular infectado (TURK e col., 2008). Os túbulos dentinários possuem um microambiente que favorece o desenvolvimento de microorganismos anaeróbios (OGUNTEBI, 1994). As espécies mais frequentemente identificadas no canal dentário são: *Enterococcus faecalis* e espécies de *Propionibacterium*, *Streptococcus* e *Lactobacillus* (ADIB, SPRATT e GULABIVALA, 2004). Os microorganismos que sobrevivem à limpeza durante o preenchimento radicular, inclusive *E. faecalis*, podem crescer lentamente sob a forma de filme e ter alta resistência (GEORGE, BASRANI e KISHEN, 2010). *E. faecalis* é a espécie mais frequentemente detectada nos casos de falha na terapia endodôntica, com uma prevalência que varia de 29 a 77% (WANG e col., 2011).

1.3.1.1- *Enterococcus faecalis*

Enterococcus faecalis é uma bactéria fermentativa, anaeróbia facultativamente em formato de cocos de 0,5 - 1 µm de diâmetro. Elas ocorrem isoladas em pares ou em cadeias curtas. A maioria das cepas não é hemolítica e não tem motilidade (RÔÇAS, SIQUEIRA JR. e SANTOS, 2004).

Estudos *in vitro* demonstraram a capacidade da *E. faecalis* de penetrar nos túbulos dentinários, habilidade não demonstrada por todas as espécies bacterianas (PARADELLA, KOGA-ITO e JORGE, 2007). Do ponto de vista microbiológico, os *Enterococcus* apresentam poucas exigências para o seu crescimento, sendo capazes de crescer em temperaturas de 10 a 45°C, pH 9,6 em 6,5% de solução salina, e de sobreviver a 60°C por 30 minutos (PARADELLA, KOGA e JORGE, 2007). *E. faecalis* ocorre em aproximadamente 80% das infecções enterocócicas e o tratamento desse tipo de infecção é bastante difícil, devido sua alta resistência a antibióticos (GEORGE, BASRANI e KISHEN. 2010).

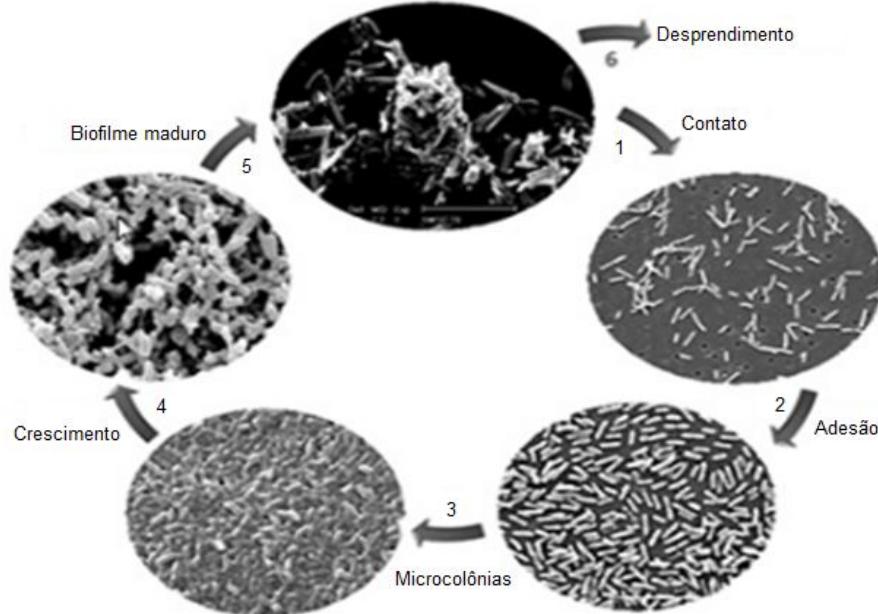
1.3.2- A formação de biofilmes

A alta taxa de detecção de *E. faecalis* nos casos de re-tratamento ocorre porque os microorganismos são levados para dentro do canal radicular durante o procedimento de tratamento. O isolamento incompleto da área de operação, a micro-quebra do cimento e a drenagem podem causar uma infecção inicial por *E. faecalis* (WANG e col., 2011). Alguns

estudos apresentaram evidências da colonização e formação de biofilme de *E. faecalis* em canais dentários de dentes humanos (GEORGE, KISHEN e SONG, 2005; LIU e col., 2010). *E. faecalis* pode aderir às paredes dos canais dentários, acumular, e formar comunidades organizadas em um biofilme (WANG e col., 2011). Isso é importante porque, com um biofilme, o microorganismo pode se proteger de agentes microbianos pela camada matriz do biofilme e por uma reduzida taxa de crescimento, uma vez que o biofilme é uma película de bactérias (EBERT e col., 2007). Essa bactéria pode sobreviver em meio com água e limitação de nutrientes por vários meses (WILLIANS e col., 2006).

O biofilme é formado a partir do condicionamento de uma determinada superfície pela adsorção de material orgânico (UCHA, KAIWAR e MEHTA, 2010). Posteriormente, as bactérias em fenótipo planctônico são transportadas para o sítio de aderência na superfície, juntamente com os nutrientes dando início ao processo de adesão bacteriana, ainda reversível, por atração eletrostática (USHA, KAIWAR e MEHTA, 2010). As bactérias aderidas na superfície formam micro-colônias onde ocorre o crescimento celular, colonização e adesão irreversível até que ocorra maturação do biofilme (FIGDOR e GULABIVALA, 2011). Após a maturação, ocorre o desprendimento de bactérias em fenótipo planctônico que podem, por sua vez, aderir em outra superfície e formar um novo biofilme (FIGDOR e GULABIVALA, 2011). O ciclo de formação de biofilme bacteriano é mostrado na Figura 3.

Figura 3- Etapas de formação de biofilme bacteriano (FIGDOR e GULABIVALA, 2011)

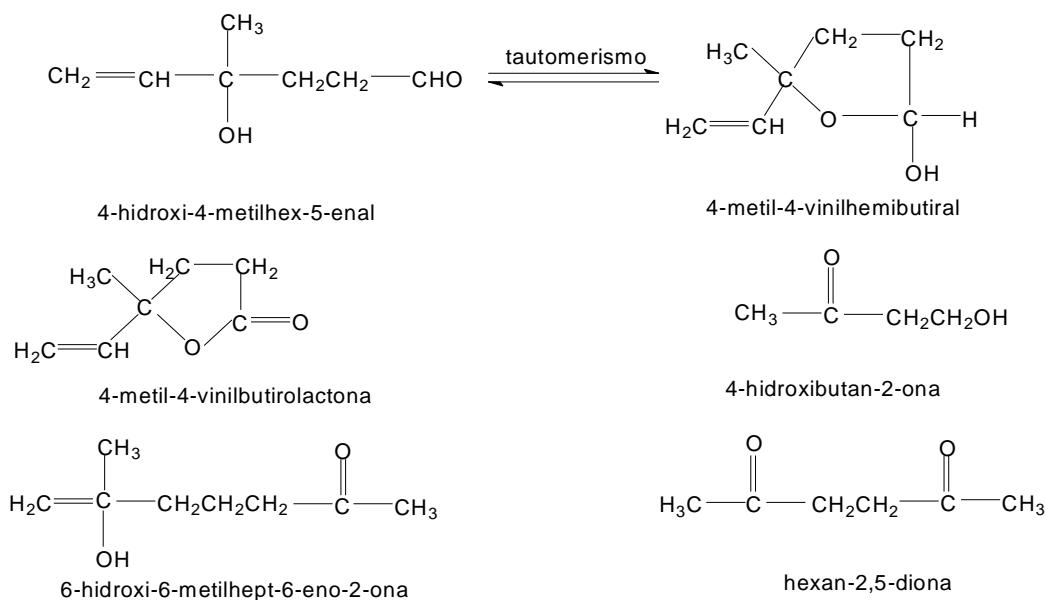


1.4- A degradação microbiana dos cones de guta-percha

A análise dos produtos de degradação do poli (1,4-*cis*-isopreno) natural e sintético isolados de várias culturas de bactérias, sem exceção, indicou que há clivagem oxidativa da dupla ligação (ROSE e STEINBÜCHEL, 2005). A degradação do polímero de guta-percha proveniente dos cones pode ocasionar basicamente três tipos de problemas: citotoxicidade, perda da massa do polímero e infecção dos canais radiculares.

O primeiro problema é a liberação, através do forame apical ao ligamento periodontal, de substâncias de baixo peso molecular que podem causar citotoxicidade. É conhecido que 4-hidroxibutan-2-ona, 4-hidroxi-4-metilhex-5-enal, 4-metil-4-vinilbutirolactona, 4-vinil-4-metilhemibutiral, hexan-2,5-diona e 6-hidroxi-6-metilhept-6-eno-2-ona são produzidos durante a degradação do poli (1,4-*cis*-isopreno) (Figura 4) (JENDROSSEK, TOMASI e KOPPENSTEDT, 1997). Não se tem relatos na literatura de produtos de baixo peso molecular obtidos durante processo de biodegradação do poli (1,4-*trans*-isopreno).

Figura 4- Produtos de baixa massa molecular obtidos da degradação do poli (1,4-*cis*-isopreno) (JENDROSSEK, TOMASI e KOPPENSTEDT, 1997)



O segundo problema possível é a perda de massa do polímero. O poli (*cis*-1,4-isopreno), degradado por bactérias dos gêneros *Actinomyces*, *Streptomyces* ou *Nocardia* perde cerca de 18% em massa em 70 dias de incubação a 30°C (JENDROSSEK, TOMASI e

KROPPIENSTEDT 1997). A perda de massa no polímero guta-percha poderia tornar o cone menos denso e reduzir as propriedades selantes no canal, o que ocasionaria o insucesso no tratamento endodôntico (SATO e col., 2003).

Outro problema para o insucesso do tratamento de canais é a degradação bacteriana da guta-percha ocasionada dentro do canal dentário devido a algum tipo de infecção bacteriana por falhas no tratamento (BODE, KERKHOFF e JENDROSSEK, 2001).

Até hoje, não se tem conhecimento de bactérias bucais que possam expressar enzimas capazes de degradar o poli (1,4-*trans*-isopreno) (guta-percha) (WARNEKE e col., 2007). Entretanto, Silva-Júnior e col. (2006) estudaram o envelhecimento *in vivo* de cones de guta-percha de 0 a 30 anos de obturação e perceberam que o poli (1,4-*trans*-isopreno) proveniente desses cones sofre perda contínua de massa molar em um processo cinético de pseudo primeira ordem. A degradação contínua de polisoprenos pode ocorrer por diversos fatores: qualidade do cones, tipo da fonte de aquecimento, temperatura, luz, anatomia do dente (SILVA e COSTA, 2004). Entretanto, os autores perceberam que alguns pontos estavam fora da curva cinética, pois tratava-se de cones que tinham sido removidos de canais com infecção. A perda de massa molar no poli (1,4-*trans*-isopreno) desses cones é de ordem de grandeza maior que nos cones retirados de canais onde não foi observado processo de infecção. Desde então surgiu a curiosidade de observar quais são as variações no polímero mediante sistemas *in vitro* contendo apenas os cones como fonte de substrato para o *Enterococcus faecalis*, bactéria mais comumente encontrada na região dos canais radiculares (BOTELHO, 2006).

2 – OBJETIVOS

2.1 – Objetivo geral

O objetivo deste trabalho é verificar a estabilidade, *in vitro*, do polímero poli (1,4-*trans*-isopreno) *in natura* e em cones (marcas Odous® e Tanari®) na presença de *Enterococcus faecalis*.

2.2 - Objetivos específicos

- Avaliar a possibilidade de biodegradação *in vitro* do poliisopreno *in natura* e isolado dos cones das marcas Odous® e Tanari® através de imagens de MEV, espectros de FTIR e GPC.
- Correlacionar as variações de massa dos cones e do poliisopreno *in natura* com a possibilidade de biodegradação *in vitro* desses materiais através de procedimento de pesagem e caracterização por TGA.
- Avaliar a possibilidade de biodegradação *in vitro* do poliisopreno *in natura* e do poliisopreno nos cones das marcas Odous® e Tanari® mediante monitoramento do crescimento de células através de medidas periódicas de pH, de densidade óptica, contagem de células, medidas de respiração celular e biomassa seca de células.
- Avaliar a atividade antimicrobiana do ZnO, do BaSO₄ e dos constituintes inorgânicos dos cones das marcas Odous® e Tanari® e a influência dos mesmos no processo de biodegradação do poliisopreno.
- Confrontar os resultados dos bioensaios com as análises físico-químicas na busca de possíveis evidências de degradação dos materiais.

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1- Materiais utilizados

Foram utilizadas amostras de cones de guta-percha das marcas comerciais Odous® e Tanari®, ambos de tamanho médio, fabricados em 2010, com validade de 4 anos; e amostras de guta-percha *in natura* importadas da Malásia e cedidas pela empresa Tanariman Industrial LTDA.

3.1.1- Solventes e reagentes

Os solventes empregados foram: acetona, da Synth; clorofórmio e tolueno, da Merck. Os reagentes utilizados foram: cloreto de bário ($BaCl_2$), hidrogeno fosfato de sódio dodeca hidratado ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$), di hidrogeno fosfato de potássio (KH_2PO_4), cloreto de amônio (NH_4Cl), cloreto de cálcio di hidratado ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$), sulfato de magnésio hepta hidratado ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$), hidróxido de bário octa hidratado [$Ba(OH)_2 \cdot 8H_2O$], óxido de zinco (ZnO) e sulfato de bário ($BaSO_4$) (todos da Reagen); ácido sulfúrico (H_2SO_4) e ácido clorídrico (HCl), da Dinâmica.

3.1.2- Meios de cultura

Os meios empregados foram os seguintes: caldo BHI (Infusão de Coração e Cérebro) e o Ágar Muller-Hinton, ambos da Difco.

3.2- Metodologia

3.2.1- Ensaio de biodegradação

Um inóculo de *E. faecalis*, proveniente de uma cepa padrão (ATCC 29212) (cepa adquirida na bacterioteca do Laboratório de Bioprospecção e Produtos Naturais do CECITEC-UECE) foi cultivado em caldo BHI durante 24 horas a 37°C para a ativação. Alíquotas de 0,1 mL foram semeadas em placas de ágar Mueller Hinton para isolamento de colônias. A pureza da cultura foi confirmada pelo método da coloração de Gram. O ágar foi preparado de acordo com as instruções do fabricante e vertido uniformemente em placas de Petri previamente

esterilizadas em autoclave a 121 °C por 15 minutos. Após os devidos cuidados, a bactéria foi semeada no ágar.

O ensaio de biodegradação foi realizado *in vitro*, expondo o poli (1,4-*trans*-isopreno) *in natura* e os cones de guta-percha em meio específico contendo a bactéria *E. faecalis*. O ensaio foi realizado em meio de cultura líquido de sais minerais (MSM) com a seguinte composição: 5g/L de Na₂HPO₄.12H₂O, 5g/L de KH₂PO₄, 10g/L de NH₄Cl, 1g/L de CaCl₂.2H₂O e 5g/L de MgSO₄.7H₂O. O pH foi ajustado para 7,0 com solução de NaOH 0,1 mol/L afim de simular a condição de pH no interior de canais radiculares com a presença da bactéria (LOPES e SIQUEIRA-JR., 1999). O meio foi esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos.

Uma alíquota do caldo BHI com o inóculo de concentração $4,9 \times 10^6$ unidades formadoras de colônia/mL (UFC/mL) foi diluída até a concentração de $5,4 \times 10^5$ UFC/mL em MSM. Posteriormente, cada amostra (0,6 g) do material a ser submetido aos testes de biodegradação foi esterilizada com álcool 70% por 5 minutos. Cada amostra de cone ou do poliisopreno *in natura* ficou imersa em 1,5 mL de MSM com o inoculo ou 1,5 mL de MSM sem o inoculo (controle negativo) pelos períodos de 10 a 100 dias; à temperatura de 37°C. Após o período de incubação, os meios foram separados por filtração simples sob condições assépticas, utilizando gases estéreis, esterilizadas com solução de hipoclorito de sódio 5% por 10 minutos.

Em cada tubo de plástico foi colocado um cone. Para cada período de tempo os experimentos foram feitos em triplicata para as amostras e os controles negativos.

3.2.2- Processo de separação dos componentes dos cones de guta-percha

O isolamento e quantificação dos constituintes dos cones de guta-percha foram feitos em triplicata utilizando a metodologia de Friedman com modificações (FRIEDMAN e col., 1975; GURGEL-FILHO e col., 2003). Cada cone de guta-percha foi dissolvido em 10 mL de clorofórmio na ausência de luz por 24 horas. Em seguida, a solução foi centrifugada e o sobrenadante (material orgânico) foi separado do precipitado (material inorgânico). Posteriormente, 10 mL de acetona foram adicionados ao sobrenadante para a precipitação do polímero. As ceras e resinas foram obtidas por evaporação da mistura. O precipitado inorgânico foi lavado 5 vezes com HCl 2,4 mol/L até que restasse apenas sulfatos metálicos insolúveis. Os constituintes dos cones de guta-percha foram quantificados por esse método,

assim como o poliisopreno foi isolado dos cones submetidos aos ensaios de biodegradação. A Figura 5 apresenta um fluxograma do método de separação aplicado.

Figura 5- Metodologia da separação dos constituintes dos cones de guta-percha



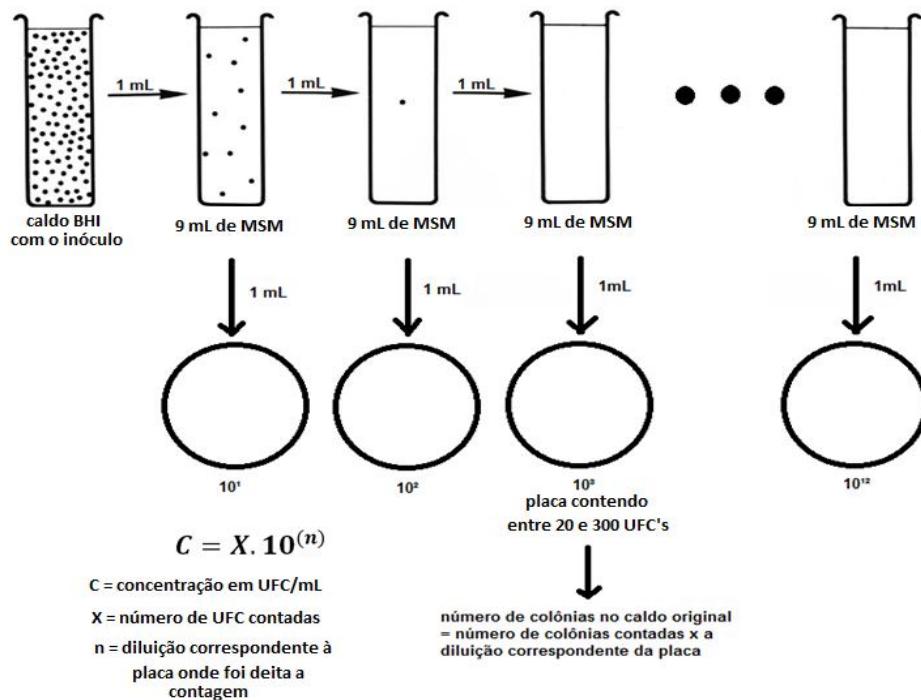
3.2.3- Pesagem dos cones e do polímero *in natura*

As amostras de cone e de polímero *in natura* foram pesadas antes e após o contato com o inóculo ou com o controle negativo em meio líquido de sais minerais (MSM). Após os respectivos períodos de contato com os meios, as amostras foram lavadas com água destilada e postas para secar sob vácuo até a obtenção de peso constante. Após a pesagem, as amostras foram lavadas com álcool 70% e separadas para as demais análises físico-químicas.

3.2.4- Monitoramento do crescimento celular por medidas de densidade óptica

Uma alíquota de 1 mL de caldo BHI com o inóculo foi diluída até 10 mL em MSM. O procedimento de diluição foi realizado de forma seriada até a obtenção de 10 padrões de diluição do inóculo. Uma alíquota de 1 mL de cada inóculo proveniente das diluições foi semeada em placa de Petri contendo ágar Muller-Hinton e incubada por 24 horas a 37°C. Após incubação foi escolhida uma placa de Petri com um número entre 20 e 300 UFC. Após a escolha da placa, as colônias foram contadas em um contador de colônias CP-608 da Phoenix (HOLDEMAN,CATO e MOORE, 1977) (Figura 6).

Figura 6- Metodologia empregada na etapa de diluição do inóculo para contagem de células e medidas de densidade óptica



Após a contagem das colônias, a concentração de microorganismos no caldo original foi determinada através da Equação 1:

$$C = W \times 10^{(n)} \quad (1)$$

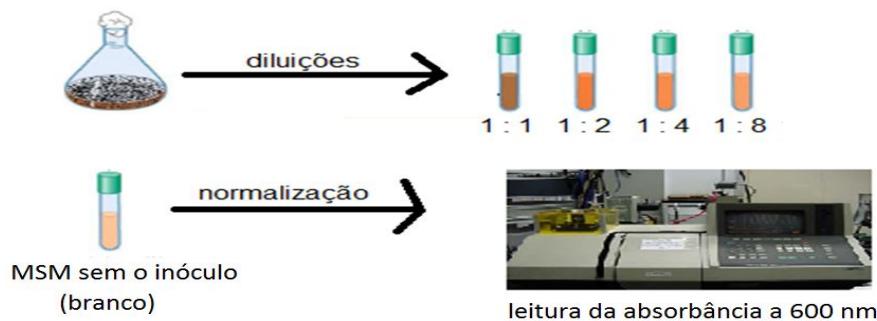
onde C é a concentração em UFC/mL do inóculo no caldo original; W é o número de colônias contadas em uma placa de Petri contendo entre 20 e 300 UFC e n é a diluição correspondente à placa onde foi feita a contagem das colônias.

O caldo original de concentração conhecida foi diluído em MSM nas proporções de 1:1, 1:2, 1:4 e 1:8 (Figura 7). Posteriormente, as soluções tiveram suas absorbâncias medidas em um espectrofotômetro (Femto 432) a um comprimento de onda de 600 nm. Após as medidas espectrofotométricas foi construída uma curva de calibração de concentração (UFC/mL) versus absorbância (densidade óptica), com $R^2=0,998$, representada pela Equação 2.

$$C = 2,78 \times 10^3 + 5,98 \times 10^6 A \quad (2)$$

onde A é a absorbância e C é a concentração de bactérias em UFC/mL.

Figura 7- Metodologia empregada na etapa de construção da curva de calibração para contagem do inóculo por densidade óptica



3.2.5- Determinação da porcentagem de mineralização

Evidências para a biodegradação das cadeias de hidrocarboneto da guta-percha foi obtida pela determinação da liberação respiratória de CO₂ durante o cultivo da bactéria na presença do poliisopreno *in natura* ou dos cones de guta-percha como única fonte de carbono.

Os ensaios foram feitos seguindo a metodologia descrita por Linos e Steinbuchel com modificações (LINOS e STEINBUCHEL, 1998). Os cones de guta-percha (0,6 g) foram adicionados em tubos plásticos contendo 1,5 mL de MSM com o inóculo de concentração 5,4x10⁵ UFC/mL ou tubos plásticos com o controle negativo. O poliisopreno *in natura* foi cortado em pequenos cubos com a mesma quantidade de massa e submetido ao ensaio em condições similares aos cones.

Após os respectivos períodos de incubação, foram adicionados 30 mg de Ba(OH)₂.8H₂O em cada meio submetido ao bioensaio. Em seguida, o meio com o inóculo foi diluído em 9 mL de água destilada em um erlenmeyer com tampa de rosca com contêiner de vidro interno. Posteriormente, foram adicionadas 2 gotas de fenolftaleína. O excesso de hidróxido foi quantificado através da titulação com uma solução 0,01 mol/L de ácido clorídrico (HCl). A quantidade mássica de CO₂ em solução foi quantificada através da equivalência entre o número de mols de íons Ba²⁺ provenientes do Ba(OH)₂.H₂O e o número de mols de íons CO₃²⁻ provenientes do processo de solubilização do CO₂ em solução. A porcentagem de mineralização foi determinada com o uso da Equação 3.

$$\text{Mineralização } (\% \text{CO}_2) = (\text{massa de CO}_2 / \text{massa de poliisopreno}) \times 100 \quad (3)$$

Para as amostras de cones de guta-percha foi necessário um ajuste matemático para que a massa dos materiais fosse expressa como massa de poliisopreno, pois apenas parte da composição desses materiais é composta do polímero. Como os constituintes dos cones submetidos aos bioensaios foram previamente quantificados pela metodologia de Friedman, o ajuste pôde ser feito com o uso da Equação 4.

$$\text{Massa de poliisopreno} = 0,6 \times (\% \text{ de poliisopreno quantificada}/100) \quad (4)$$

Para que a massa de CO₂ pudesse ser expressa como tal, foi necessário subtrair a massa de CO₂ quantificada para cada período do meio com o controle negativo da massa de CO₂ com os meios contendo o inóculo. O artifício matemático descrito é representado pela Equação 5.

$$m.CO_2\text{exp.} = m.CO_2i. - m.CO_2c.n. \quad (5)$$

onde, $m.CO_2\text{exp.}$ corresponde à massa de CO₂ expressa na Equação 3, $m.CO_2i.$ corresponde à massa de CO₂ quantificada do meio contendo o inoculo e $m.CO_2c.n.$ corresponde ao CO₂ contido nos controles negativos. Esse procedimento foi necessário, pois esse cálculo elimina a possibilidade da influência de CO₂ atmosférico nas medidas.

3.2.6- Medida da biomassa seca de células

Após cada intervalo de 10 dias de contato com os cones, 300 µL do caldo com o inóculo ou com o controle negativo foram transferidos para um tubo de ensaio com 5 mL de caldo BHI e incubados a 37 °C por 24 horas. Após a inoculação, o conteúdo do tubo de ensaio foi transferido para um erlenmeyer com 50 mL de caldo BHI e, então, incubado a 180 rpm de agitação por 72 horas à 37 °C. Em seguida 10 mL de caldo com o inóculo foram centrifugados a 12500 rpm por 40 minutos à 2 °C. O inóculo (sólido) foi separado do meio (sobrenadante) e centrifugado 2 vezes com água destilada nas mesmas condições de temperatura e velocidade de agitação com a finalidade de garantir a lavagem do inóculo. As amostras foram secas em tubos previamente pesados a 80 °C até a obtenção de peso constante da biomassa seca de células (MORTERA e col., 2012).

3.2.7- Medidas de pH

Após as separações dos materiais do meio com o inóculo ou controle negativo, 1 mL de cada meio foi diluído até 10 mL com água destilada e o pH foi medido em um pHmetro Quimis.

3.2.8 – Contagem de células viáveis

Após os respectivos períodos de inoculação, os materiais foram separados dos caldos contendo o inóculo ou o controle negativo. Posteriormente, os meios foram diluídos em MSM em uma série de 8 diluições. 1 mL de cada diluição foi semeado em placas de Agar Muller-Hinton e incubadas em estufa bacteriológica por 24 horas. Após o crescimento das colônias, foi escolhida uma placa contendo entre 20 e 300 unidades formadoras de colônia (HOLDEMAN,CATO e MOORE, 1977). As colônias foram contadas em um contador de colônias CP-608 da Phoenix e a concentração em UFC/mL foi determinada pelo uso da Equação 1.

3.2.9- Teste de difusão em poço

O teste de atividade antimicrobiana foi feito utilizando o método de Kirby-Bauer com modificações (BAUER e COL., 1966). O meio ágar Muller-Hinton foi preparado de acordo com as instruções do fabricante e em seguida foi adicionado em placas de Petri previamente esterilizadas, de modo que a espessura de cada meio vertido na placa ficou em torno de 5 mm. Após a preparação dos meios de cultura foi feita uma perfuração de 4 mm de diâmetro no centro de cada placa. Cada perfuração foi preenchida com óxido de zinco, sulfato de bário ou material inorgânico isolado dos cones. Os microorganismos foram espalhados nas placas com o uso de “swab” e após 24 horas de incubação a 37°C as placas foram retiradas e o diâmetro dos halos de inibição medidos.

3.2.10- Cromatografia de permeação em gel (GPC)

A massa molar média do poliisopreno foi estimada através de Cromatografia de Permeação em Gel (GPC) utilizando um cromatógrafo da Shimadzu modelo LC10-AD acoplado a um detector de índice de refração modelo RID-6A. Foi empregada uma pré-coluna

e duas colunas em série da Phenomenex, do tipo Phenogel LINEAR/MIXED 5 e 5U com 7,80 x 50 mm e 7,8 x 300 mm, respectivamente. O volume de cada amostra injetada foi de 50 µL, com concentração de 0,1%, à temperatura ambiente. A fase móvel empregada foi o tolueno com o fluxo de 1 mL/min. Uma curva de calibração foi construída utilizando padrões de poliestireno (Shodex-Showa Denko), com concentração de 0,1% contendo as seguintes massas molares de pico: $2,96 \times 10^3$; $1,13 \times 10^4$; $2,85 \times 10^4$; $1,72 \times 10^5$; $2,19 \times 10^5$; $1,01 \times 10^6$; $3,15 \times 10^6$ g/mol.

3.2.11- Espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A guta-percha isolada dos cones foi analisada na forma de filmes obtidos através da evaporação de solução em clorofórmio depositada sobre janelas de KBr. Os espectros de absorção na região do infravermelho foram obtidos em equipamento Shimadzu FTIR-8300 na região de 4000-400 cm⁻¹.

3.2.12- Análise termogravimétrica (TGA)

As análises foram realizadas em equipamento TGA-50 da Shimadzu Corporation em atmosfera de N₂. Aproximadamente 10 mg das amostras foram aquecidos em uma faixa de temperatura de 25 a 800°C em uma razão de aquecimento de 10 °C/min, fluxo de 50 mL/min de N₂, utilizando cadinho de platina.

3.2.13- Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Os cones submetidos à análise de MEV foram cortados em formato cilíndrico e posteriormente cortados de forma transversal, em forma de meio cilindro, conforme descrito na literatura (LOPES, SIQUEIRA-JR e ELIAS, 2000). As imagens da superfície dos cones foram obtidas em um microscópio eletrônico de varredura do tipo XL30-Phillips. Antes do recobrimento as amostras foram lavadas com água destilada em abundância e depois foram submetidas ao contato com uma solução de álcool 70% (v/v) por 5 minutos e então foram secas e pesadas novamente até a obtenção de peso constante. O recobrimento das amostras foi feito com platina e as imagens foram obtidas com um aumento de 2000 vezes quando as amostras foram submetidas à tensão de 10 KV.

3.2.14- Ressonância magnética nuclear de H¹ (RMN de H¹)

A degradação do poliisopreno *in natura* foi estudada por RMN de H¹. As amostras utilizadas para as análises foram o poliisopreno não submetido ao ensaio de biodegradação *in vitro*, o poliisopreno submetido ao contato com o controle negativo por 100 dias e o poliisopreno submetido ao contato com o inóculo pelo mesmo período. Os espectros foram obtidos em equipamento Brucker Avance 500 MHz, com transformada de Fourier. As amostras foram solubilizadas em clorofórmio deuterado (CDCl₃). O padrão utilizado foi o TMS.

3.2.15 –Espectroscopia de absorção atômica

Em cada tubo de plástico foram adicionados 60 mg de cones de guta-percha e 1,5 mL de água destilada. Os tubos de plástico foram hermeticamente fechados e submetidos ao banho termostatizado a 37°C por períodos de 10 a 100 dias. Uma solução estoque de Zn²⁺ (Merck) 1000 ppm foi preparada em água purificada pelo sistema Milli-Q. Em seguida soluções padrão de concentrações variando de 0,5 a 2 ppm (pH = 7,0) foram preparadas por diluição da solução estoque. A curva padrão, com R²=0,9999, foi obtida pelo método do padrão externo. A solução proveniente dos tubos de plástico foi diluída na proporção 1 : 10 e a concentração de zinco em solução (Zn²⁺) foi medida nas mesmas condições dos padrões com o uso de um espectrofotômetro de absorção atômica com chama modelo GBC 933 Plus, equipado com uma lâmpada de cátodo oco.

4 – ESTATÍSTICA

4.1 – Tratamento dos dados individuais

A variação da dispersão total dos dados foi calculada através do Teste de Conchran, nos casos em que foi cogitada a possibilidade de remoção de um dado de um determinado conjunto. Após o tratamento dos dados com ou sem a necessidade de Teste de Conchran, os dados foram organizados e tiveram suas médias aritméticas calculadas, acompanhada de seus respectivos desvios padrão. Os intervalos de confiança individuais foram calculados a partir dos desvios padrão dos dados com um nível de significância de 0,05. Os valores teóricos individuais foram calculados para servirem de parâmetro de comparação para os dados obtidos experimentalmente. A comparação foi feita entre as médias aritméticas dos dados obtidos experimentalmente e as médias teóricas para cada dado individual.

Os resultados experimentais expostos nas tabelas das seções de resultados foram expressos através do cálculo da média dos resultados com seus respectivos intervalos de confiança.

4.2 – Tratamento dos conjuntos de dados quantitativos

Os dados teóricos foram comparados com os dados experimentais através da correlação direta entre eles, do Teste T e do Teste F. O tratamento matemático feito para os dados experimentais quantitativos está resumido na Tabela 2.

Tabela 2 – Tratamento matemático usado nos dados experimentais para experimentos feitos em triplicata e sem replicata

| Tratamento matemático | Em triplicata | Sem replicata |
|------------------------|---------------|---------------|
| Média aritmética | X | - |
| Desvio padrão | X | - |
| Intervalo de confiança | X | - |
| Correlação* | X | X** |
| Teste T* | X | X** |
| Teste F* | X | X** |

*Esse tratamento não foi aplicado nos dados referentes à quantificação dos constituintes dos cones das marcas Odous® e Tanari®, nem aos dados referentes ao experimento do teste de difusão em poço

** (X) submetidos ao tratamento matemático (-) não submetidos ao tratamento matemático.

O teste T foi feito considerando que as variâncias dos valores teóricos são diferentes das dos valores obtidos experimentalmente em uma distribuição bicaudal e foi empregado para calcular a significância da diferença entre os dados teóricos e os obtidos experimentalmente. O Teste F foi empregado para verificar a precisão dos dados, inclusive a acurácia dos métodos empregados.

Alguns valores experimentais foram comparados entre si com o uso do Teste T de Student para avaliar se a diferença entre eles é significativa. A diferença foi considerada significativa quando os valores de T foram menores que 0,95, representando uma significância maior que 5%.

Os símbolos a e b foram colocados nas tabelas de resultados para indicar se ocorre (a) ou não (b) diferença estatística entre os dados analisados.

4.3 – Informações qualitativas

As informações qualitativas não foram submetidas ao tratamento matemático descrito nos tópicos 4.1 e 4.2 e nenhum outro tratamento matemático. Essas informações apenas foram agrupadas de modo a exibir informações visuais. Os dados experimentais organizados dessa forma foram os seguintes: os espectros de infravermelho do poliisopreno *in natura* e do poliisopreno isolados dos cones das marcas Odous® e Tanari®; as imagens de MEV dos cones das marcas Odous®; os espectros de RMN de H¹ do poliisopreno *in natura*.

5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1- Degradação do poliisopreno nos cones de guta-percha

5.1.1- Caracterização dos cones

Os cones tiveram os seus constituintes separados e quantificados através do método proposto por Friedman com modificações (FRIEDMAN e col., 1975; GURGEL-FILHO e col., 2003). Os resultados obtidos foram comparados com os resultados obtidos por Gurgel-Filho (2003) e encontram-se listados na Tabela 3.

Tabela 3 - Porcentagem em massa dos constituintes dos cones de guta-percha das marcas Odous® e Tanari®

| Componente | Porcentagem de massa (Odous®) | | Porcentagem de massa (Tanari®) | |
|------------------------------------|-------------------------------|---|--------------------------------|---|
| | Atual | Obtida por Silva-Júnior e col. (2003) | Atual | Obtida por Silva-Júnior e col. (2003) |
| Óxido de zinco | 75,7 ± 2,9 | 79,7 ± 0,26 ^b | 70,7 ± 4,1 ^a | 55,2 ± 4,28 |
| Poli (1,4- <i>trans</i> -isopreno) | 20,1 ± 2,1 | 18,8 ± 0,20 ^b | 13,2 ± 1,6 ^b | 15,6 ± 0,64 |
| Sulfato de bário | - | - | 11,2 ± 1,1 ^a | 34,9 ± 2,12 |
| Ceras/resinas | 4,2 ± 0,7 | 1,5 ± 0,13 ^a | 4,90 ± 0,5 ^a | 2,40 ± 0,20 |

Os resultados da Tabela 3 mostram que para os cones da marca Odous® as quantidades de óxido de zinco e poli (1,4-*trans*-isopreno) permaneceram aproximadamente as mesmas, como também o fato de que os cones dessa marca continuam isentos de sulfato de bário. A única mudança significativa na composição dos cones da marca Odous® se dá no aumento do teor de ceras/resinas, de 1,5 ± 0,13 para 4,2 ± 0,7. Como as ceras/resinas têm a função de conferir maior agregação da parte orgânica com a inorgânica dos cones, talvez essa tenha sido a única preocupação dos fabricantes dos cones dessa marca.

Os resultados da Tabela 3 mostram que, embora a quantidade de poli (1,4-*trans*-isopreno) tenha permanecido aproximadamente a mesma, houve três mudanças na formulação dos cones da marca Tanari®: a quantidade de óxido de zinco aumentou; a quantidade de sulfato de bário diminuiu; a quantidade de ceras e resinas aumentou duas vezes (aumentou de 2,4 para 4,9 %). Esses resultados mostram que os fabricantes dessa marca de cones se preocuparam em diminuir o teor de agente radiopacificador (remoção de sulfato de bário dos

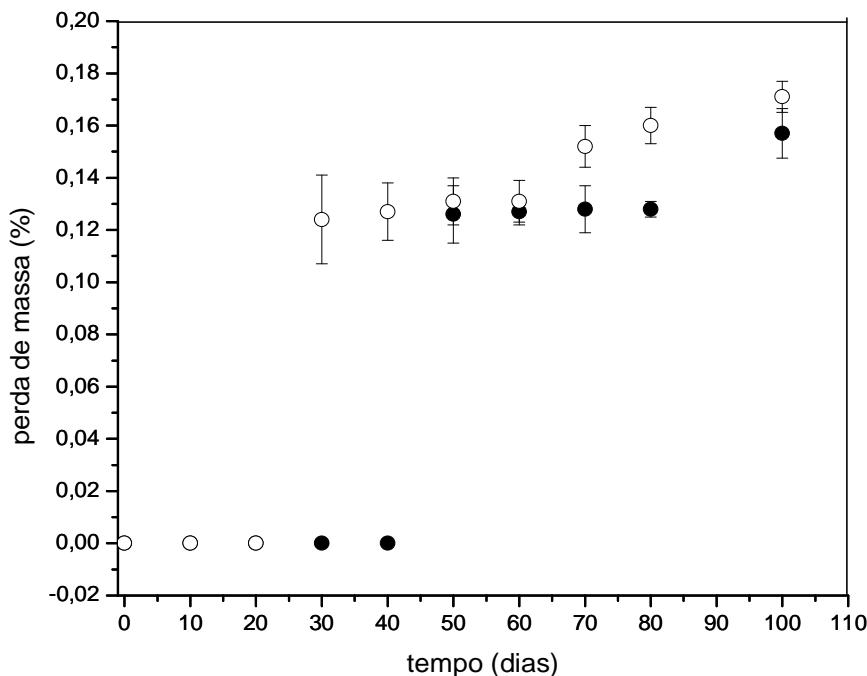
cones); aumentar a capacidade bactericida (acrúscimo de óxido de zinco na composição original); como também se preocuparam com a união das partes orgânica e inorgânica dos cones (aumento do teor de ceras/resinas na composição).

5.1.2- Variação de massa dos cones das marcas Odous® e Tanari®

Os cones de guta-percha foram pesados antes e após o contato com o inóculo conforme descrito no tópico 3.2.3. Os dados da Figura 8 mostram que a degradação dos cones ocorre com perda de massa. A perda de massa dos cones em contato com o inóculo é perceptível após 40 dias para a marca Odous® e 20 dias para a Tanari®. O material tem seu máximo de perda de massa entre 40 e 50 dias de contato com o inóculo para a marca Odous® e entre 20 e 30 dias para a Tanari®. Após o máximo de perda de massa ocorre uma perda pequena, porém, gradual, após 80 dias de contato com o inóculo para a marca Odous® e 60 dias para a Tanari®. A perda máxima de massa, 0,18% (m/m), do material mediante o contato com *E. faecalis* ocorre aos 100 dias de contato para os cones de ambas as marcas. Esses resultados de perda de massa são bem inferiores aos 18% citados anteriormente na literatura para o poli (1,4-cis-isopreno) posto em contato com *Nocardia* e *Actinomyces* por 70 dias (JENDROSSEK, TOMASI e KROPPIENSTEDT, 1997).

Figura 8- Variação de massa dos cones de guta-percha postos em contato com *E. faecalis* (●) Odous®

(○) Tanari®

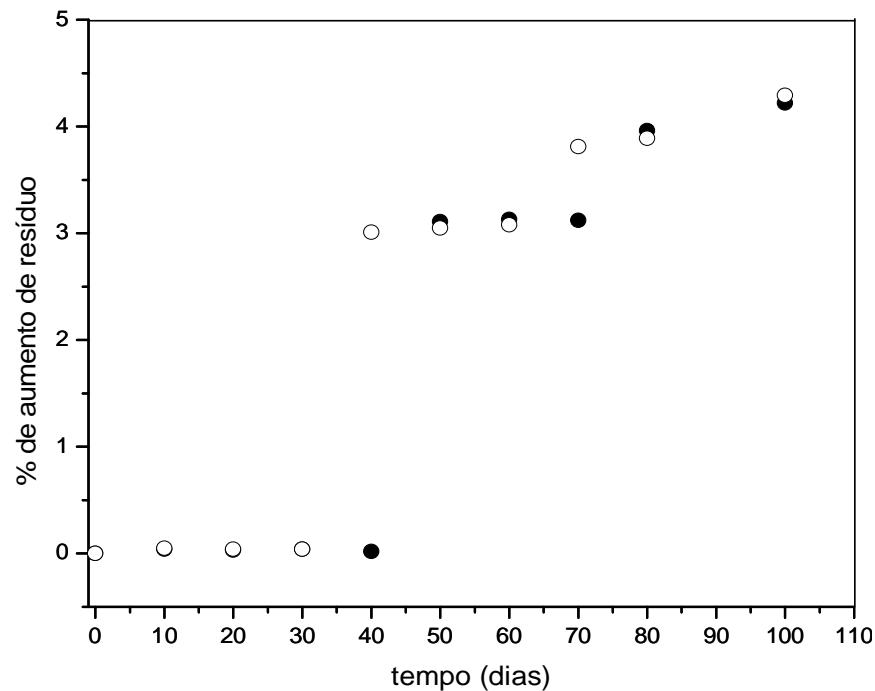


A perda máxima de massa foi de 0,9% para os cones de ambas as marcas. A massa perdida é a matéria orgânica, o polímero, e Zn^{2+} proveniente do óxido de zinco (vide resultados no tópico 5.4). Como a quantidade de Zn^{2+} liberada é muito pequena, se comparada com a perda de matéria orgânica, é possível inferir que a bactéria usa o poli (1,4-*trans*-isopreno) como fonte de carbono, já que a porcentagem de seu isômero, na guta-percha natural, varia de 0,3 à 0,5 % (ZANG e XUE, 2011).

5.1.3- Análise do teor residual

A porcentagem de resíduo medida ao final de cada aquecimento na análise termogravimétrica é referente à massa dos constituintes inorgânicos presentes na composição dos cones. A Figura 9 mostra que o aumento da porcentagem de constituintes inorgânicos cresce com o tempo de contato entre o material e o meio microbiano. Isso ocorre porque os microorganismos consomem parte da matéria orgânica desses materiais com o decorrer do tempo.

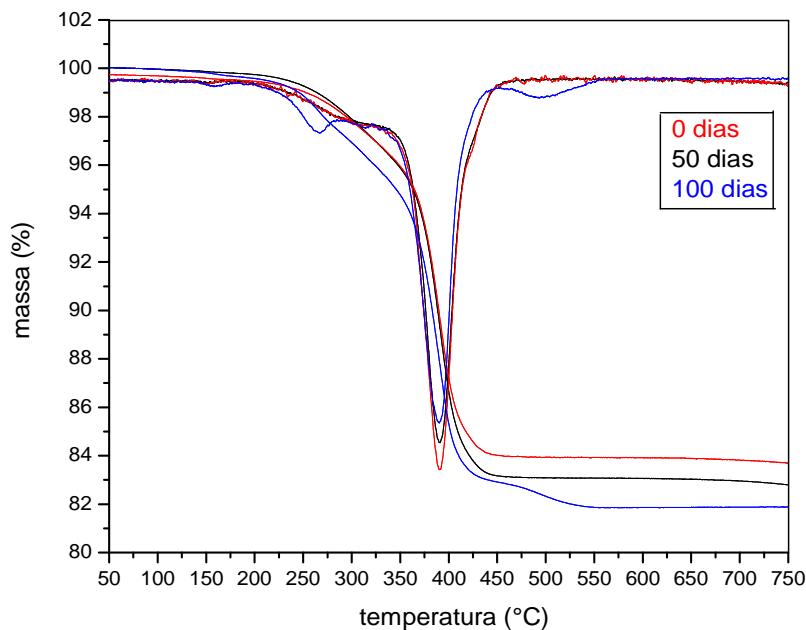
Figura 9- Porcentagem de aumento de resíduo a 800 °C dos cones de guta-percha imersos em meio com
Enterococcus faecalis (●) Odous® (○) Tanari®



O resultado exposto na Figura 9 mostra uma curva de consumo da matéria orgânica similar à de perda de massa do material na Figura 6. Entretanto, é notável que as diferenças de porcentagem de massa são muito grandes. Na Figura 6 a porcentagem máxima de perda de massa foi de 0,18% após 100 dias de contato, enquanto que o valor registrado através de TGA para o mesmo período foi de aproximadamente 4,5%. É possível atribuir essa diferença à sensibilidade da técnica de TGA (CHALMERS e MEIER, 2008).

Como a porcentagem de isômero *cis* na guta-percha natural é bem pequena (SILVA-JR, 2007; ZANG e XUE, 2011) é possível que a bactéria esteja usando a parte da guta-percha correspondente ao poli (1,4-*trans*-isopreno) como substrato, mesmo que a literatura não relate a existência de microorganismos que expressam enzimas capazes de degradar esse polímero (WARNEKE e col., 2007). Além do uso dos isômeros *cis* e *trans* do poliisopreno, ainda é possível que a bactéria esteja usando as ceras e resinas constituintes dos cones, pois as porcentagens de degradação dos cones são próximas às desses constituintes nos cones (Tabela 3).

Figura 10- Curvas de TGA e DTG para os cones da marca Odous® submetidos ao processo de aquecimento



Através da Figura 10 é possível perceber que ao final do processo de aquecimento dos cones as quantidades de resíduo restante são diferentes para as amostras submetidas por 0, 50 e 100 dias. Ainda é possível perceber que a temperatura em que a degradação térmica dos cones é máxima gira em torno de 400 °C.

5.1.4- Variação de massa molar do poliisopreno dos cones

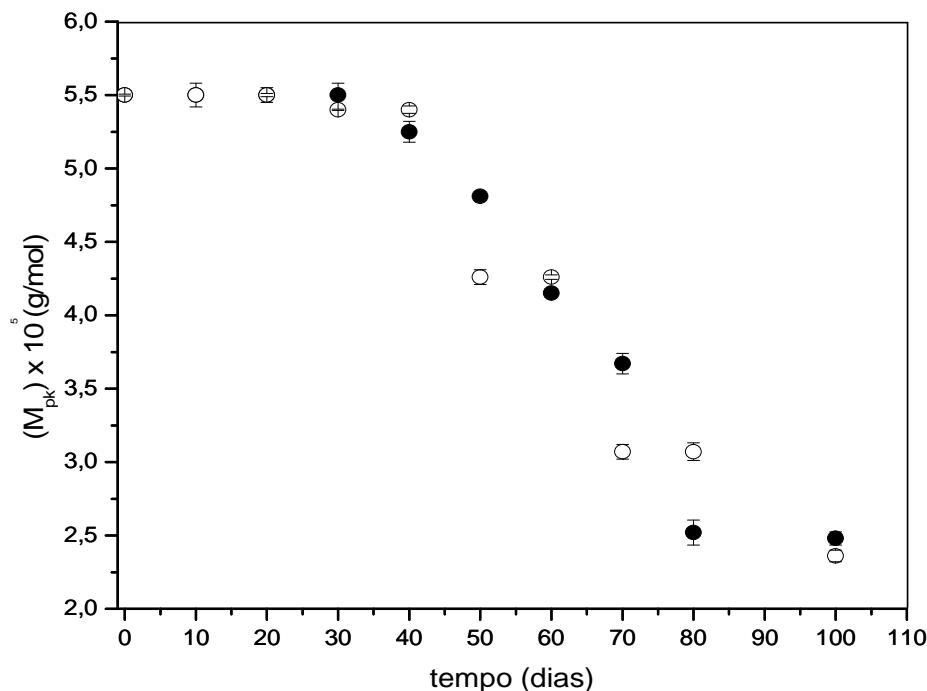
A massa molar de pico (M_{pk}) foi estimada através de uma curva construída a partir dos padrões de poliestireno. A curva de calibração, com $R^2=0,996$, é representada pela Equação 6.

$$\text{Log } M_{pk} = 8,6085 - 0,5350xV \quad (6)$$

onde, V significa volume de eluição.

A Figura 11 mostra que o polímero proveniente dos cones de guta-percha em contato com cultura de *E. faecalis* sofre perda de massa molar a partir de 30 dias de contato para os cones da marca Odous® e 20 dias para os cones da marca Tanari®. A variação máxima de massa molar de pico após 100 dias de contato é de aproximadamente 2×10^5 g/mol para os cones de ambas as marcas.

Figura 11- Variação de M_{pk} do poli (1,4-*trans*-isopreno) proveniente dos cones das marcas (●) Odous e (○) Tanari em *E. faecalis*



No processo de degradação biológica de polímeros, ocorre a utilização do mesmo e/ou de seus aditivos como fonte de carbono e energia para os microorganismos (GRISA e

COL., 2011). Esses resultados mostram que o microorganismo estudado pode se utilizar de parte do polímero como fonte de carbono.

A maioria dos microorganismos procariotos requer um composto orgânico como fonte de carbono (MADIGAN, MARTINKO e PARKER, 2004). Como o *E. faecalis* é um micro-organismo heterotrófico, a diminuição de massa molar do polímero é compatível com as características nutricionais desse micro-organismo, pois o mesmo secreta enzimas que quebram moléculas orgânicas grandes em moléculas menores. Entretanto, é importante salientar que a massa molar medida na análise de GPC é uma massa molar estatística (CHALMERS e MEIER, 2008) e as perdas de massa molar são grandes, o que sugere que durante o processo de biodegradação as moléculas de poliisopreno são quebradas em moléculas menores.

Figura 12- Cromatogramas do poli (1,4-*trans*-isopreno) proveniente dos cones da marca Odous®

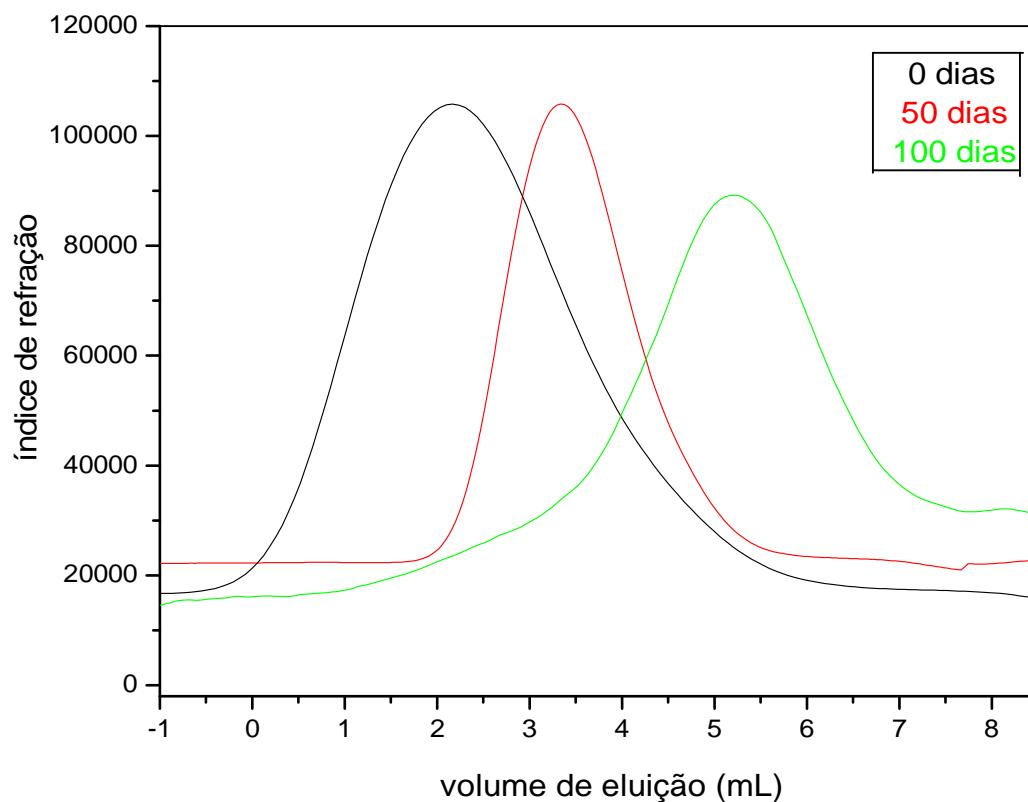
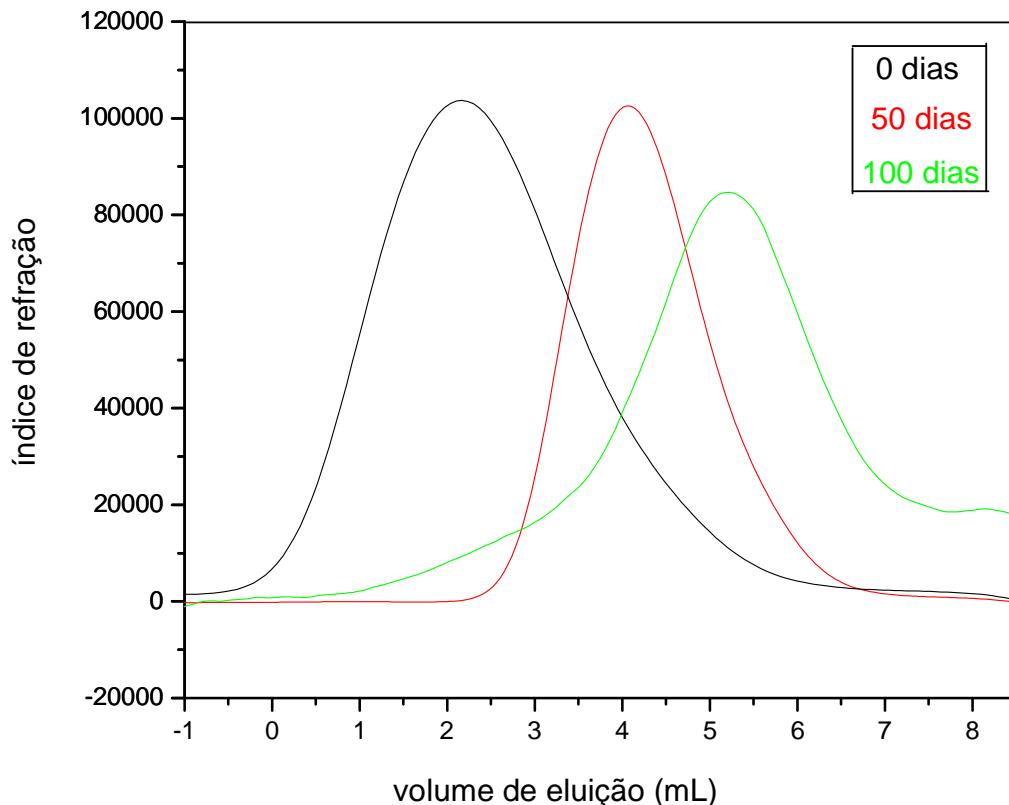


Figura 13- Cromatogramas do poli (1,4-*trans*-isopreno) proveniente dos cones da marca Tanari®



Os perfis unimodais dos cromatogramas das Figuras 10 e 11 sugerem que durante a biodegradação do polímero nos cones haja a formação de um produto majoritário de massa molar muito menor que a do polímero antes do contato com a bactéria e que a formação de produtos secundários é de porcentagem não significativa. Esses cromatogramas sugerem que a degradação está ocorrendo através de quebra na parte central da cadeia polimérica. A Tabela 4 mostra os valores de massa molar para os cones submetidos ao contato com *E. faecalis* pelos períodos 0, 50 e 100 dias.

Tabela 4 – Massa molar de pico (M_{pk}) do poli (1,4-*trans*-isopreno) dos cones de guta-percha das marcas Odous® e Tanari®

| | $M_{pk} \times 10^5$ (g/mol) (0 dias)* | $M_{pk} \times 10^5$ (g/mol) (50 dias)* | $M_{pk} \times 10^5$ (g/mol) (100 dias)* |
|---------------|--|---|--|
| Marca Odous® | $5,50 \pm 0,021$ | $4,81 \pm 0,070$ | $2,48 \pm 0,040$ |
| Marca Tanari® | $5,50 \pm 0,006$ | $4,26 \pm 0,051$ | $2,36 \pm 0,036$ |

* M_{pk} é a massa molar de pico

Os resultados da Tabela 4 mostram que os perfis de degradação do poli (1,4-*trans*-isopreno) dos cones são semelhantes, pois os valores de massa molar para os períodos 0, 50 e 100 dias são muito próximos, embora diferentes, considerando os desvios padrões.

5.1.5- Caracterização química do poliisopreno isolado dos cones

As bandas que foram levadas em consideração na interpretação dos espectros de infravermelho foram: 3400-3420 cm^{-1} , atribuída ao estiramento OH/OOH; 1715-1737 cm^{-1} , devido ao estiramento C=O; e 797-881 cm^{-1} , atribuída ao estiramento C=C–H do isômero *trans* (BARBOSA, 2007). A Tabela 5 mostra todas as bandas detectadas nos espectros de infravermelho para os cones das marcas Odous® e Tanari® e para o poliisopreno *in natura*, após 100 dias de contato dos materiais com *E. faecalis*.

Tabela 5 – Atribuições das bandas no infravermelho para o poli (1,4-*trans*-isopreno) isolado dos cones das marcas Odous® e Tanari® e do poli (1,4-*trans*-isopreno) *in natura* (guta) submetidos ao contato com *E. faecalis* por 100 dias

| Número de onda (cm ⁻¹) | | | | | | |
|------------------------------------|-----------|-----------|------------|------------------------------------|---|------|
| Odous® | Tanari® | Guta | Literatura | Atribuição | Origem | Ref. |
| 3136-3693 | 3096-3714 | 3030-3703 | 3300-3400 | v de O-H | Hidroperóxidos, alcool, ácido carboxílico | 1 |
| 2960 | 2961 | 2952 | 2961 | v _{as} de CH ₃ | <i>trans</i> -isopreno | 2 |
| 2940-2913 | 2937-2916 | 2930-2912 | 2930-2910 | v _{as} de CH ₂ | <i>trans</i> -isopreno | 2 |
| 2858 | 2855 | 2852 | 2850 | v _s de CH ₂ | <i>trans</i> -isopreno | 2 |
| 1707-1740 | 1710-1735 | 1705-1724 | 1710-1737 | v de C=O | Aldeído, cetona, ácido carboxílico, éster | 1 |
| 1668-1680 | 1665-1679 | 1665-1684 | 1675-1681 | v de C=C | C=C em um anel ou cetona | 1 |
| 1662 | 1663 | 1660 | 1667 | v de C=C | <i>trans</i> -isopreno | 2 |
| 1448 | 1444 | - | 1445 | δ de CH ₂ | <i>trans</i> -isopreno | 2 |
| 1373 | 1377 | - | 1384 | δ _{as} de CH ₃ | <i>trans</i> -isopreno | 2 |
| 1227 | 1219 | - | 1210 | β de =C-H | <i>trans</i> -isopreno | 2 |
| 1161 | 1156 | - | 1154 | ω de CH ₃ | <i>trans</i> -isopreno | 2 |
| 1095 | 1099 | - | 1101 | v de C-C | <i>trans</i> -isopreno | 2 |
| - | - | 1110 | 1101 | v de C-O | Éster | 1 |
| 1030 | 1032 | - | 1035 | ρ de CH ₃ | <i>trans</i> -isopreno | 2 |
| 974 | 981 | - | 990 | v de C-C | <i>trans</i> -isopreno | 2 |
| 872 | 880 | - | 884 | γ de =C-H | <i>trans</i> -isopreno | 2 |
| 836 | 840 | - | 858 | γ de =C-H | <i>trans</i> -isopreno | 3 |

1: PAVIA, CHAPMAN e KRIZ, 1996; 2: ARJUNAN, SUBRAMANIAN e MOHAN, 2001; 3: RICHARDSON e SACHER, 1953; v, estiramento; δ, deformação; β, tensão no plano; γ, tensão fora do plano; ω, vibração; ρ, balanço; s, simétrica; as, assimétrica.

Os espectros de infravermelho das Figuras 14 e 15 mostram que durante o processo de degradação houve variação na intensidade das bandas que caracterizam a degradação do polímero dos cones ou do poliisopreno *in natura* em meio com *E. faecalis*.

Figura 14- Espectros de infravermelho para os cones da marca Odous® imersos em meio líquido contendo a bactéria *Enterococcus faecalis*

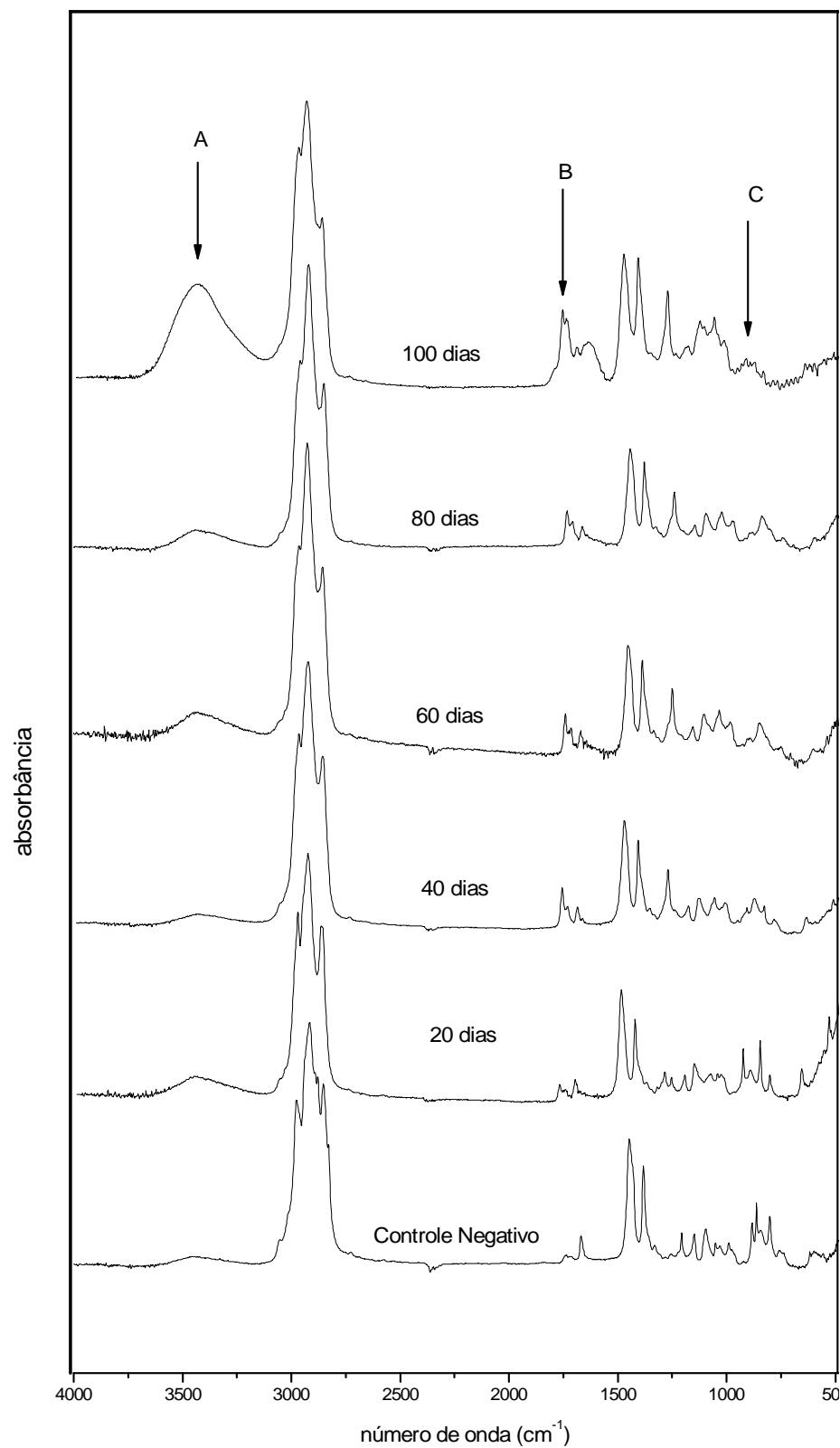
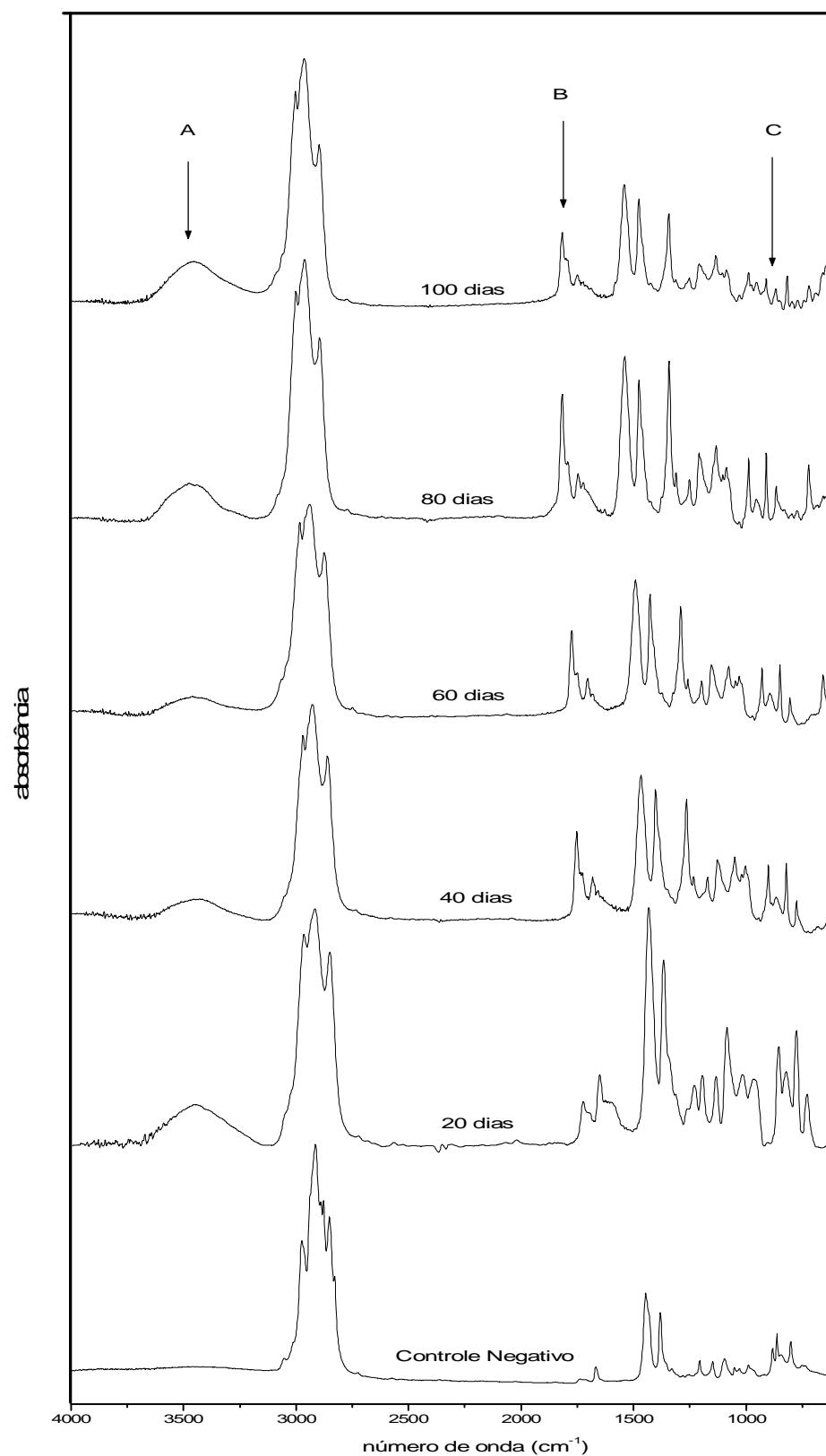


Figura 15- Espectros de infravermelho para os cones da marca Tanari® imersos em meio líquido contendo a bactéria *Enterococcus faecalis*



O desaparecimento das bandas entre 797 cm⁻¹ e 881 cm⁻¹, especificamente as bandas em 880, 860 e 800 cm⁻¹, características da forma cristalina (RICHARDSON e SACHER, 1953), e a permanência da banda a 835-840 cm⁻¹ indica que durante a degradação microbiana o polisopreno se torna amorfo. A formação de produtos oxigenados e a quebra de ligações podem conferir ao material o caráter amorfo (SILVA-JR. e col., 2006).

O aumento de intensidade de bandas entre 1715 cm⁻¹ e 1737 cm⁻¹ e entre 3400 cm⁻¹ e 3420 cm⁻¹ demonstra que no decorrer do processo de degradação microbiana há oxidação das cadeias carbônicas do polímero, o que leva à formação de alguns grupamentos funcionais tais como: alcoóis, ácidos carboxílicos, aldeídos, cetonas e ésteres (SILVERSTEIN, WEBSTER e KIEMLE, 2007).

Os cones em contato com o inóculo sofreram uma degradação muito sutil durante um período que variou de 10 a 100 dias de contato. As bandas entre 797 cm⁻¹ e 881 cm⁻¹ desapareceram gradualmente, restando apenas bandas entre 835-840 cm⁻¹, indicando que durante o processo o material se tornou amorfo. A banda em 835-840 cm⁻¹ diminuiu de intensidade indicando clivagem da ligação C=C (ALAM e col., 2000). As bandas de estiramento de C=O e OH/OOH tiveram incrementos muito pequenos. Entretanto, para o período de 100 dias de degradação houve um aumento considerável de intensidade se comparada com os controles negativos ou com a amostra que não foi submetida ao contato com MSM. Isso indica que durante a degradação microbiana o material foi relativamente oxidado.

Estudos nutricionais demonstram que algumas bactérias podem assimilar vários compostos orgânicos utilizando-os na síntese de novos materiais celulares, tais como: aminoácidos, ácidos graxos, ácidos orgânicos, açúcares, bases nitrogenadas, compostos aromáticos e outras moléculas complexas (MADIGAN, MARTINKO e PARKER, 2004). Desse modo parte do polímero degradado *in vitro* pode estar sendo convertida em moléculas menores com grupamentos funcionais variados.

Os espectros dos controles negativos foram omitidos devido ao fato de não terem sido observadas mudanças em qualquer região dos espectros durante os 100 dias de contato dos materiais com os meios sem o inóculo. Entretanto, os controles negativos de 100 dias de contato são expostos nas Figuras 14 e 15.

5.1.6- Cinética da degradação do poliisopreno isolado dos cones

Os estudos de cinética de degradação foram feitos através da visualização e utilização da banda de deformação simétrica de CH₂ do *trans*-isopreno que ocorre entre 1445 cm⁻¹ e 1452 cm⁻¹ (RODRIGUES e col., 2006) como padrão. Dessa forma foi possível a obtenção das absorbâncias relativas das bandas de OH/OOH, C=O e H-C=C.

Os dados das Figuras 16 e 17 mostram que ocorre uma degradação progressiva do poliisopreno proveniente dos cones que entraram em contato com *E. faecalis*. Isso é um problema já que na maioria dos casos de re-tratamento, essa bactéria foi isolada de canais dentários (WANG e col., 2011; WILLIANS e col., 2006; RÔÇAS e SIQUEIRA-JR., 2004; LINS, LIMA e TRAVASSOS, 2010; SENGES e col., 2011). Desse modo esse microorganismo pode estar dentre os fatores responsáveis por falhas na terapia endodôntica.

Figura 16- Cinética de absorbância relativa das bandas de deformação de (●) OH/OOH (○) C=O e (Δ) C=C-H para o poli (1,4-*trans*-isopreno) isolado dos cones da marca Odous® em contato com *E. faecalis*

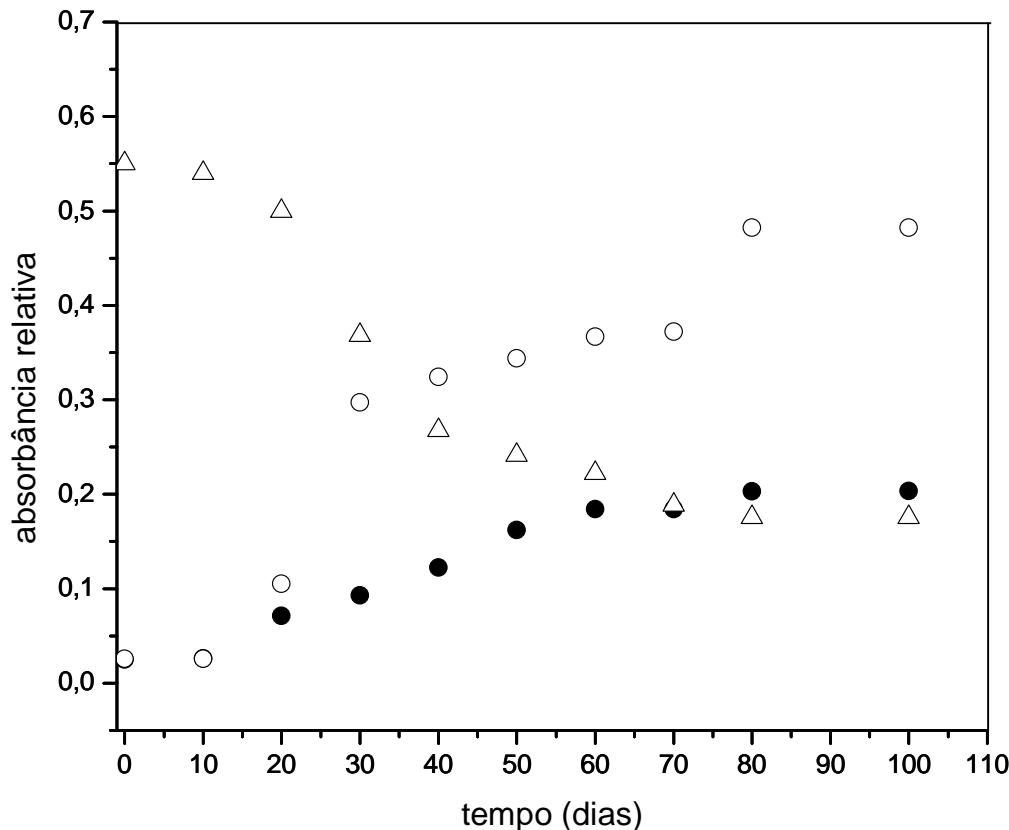
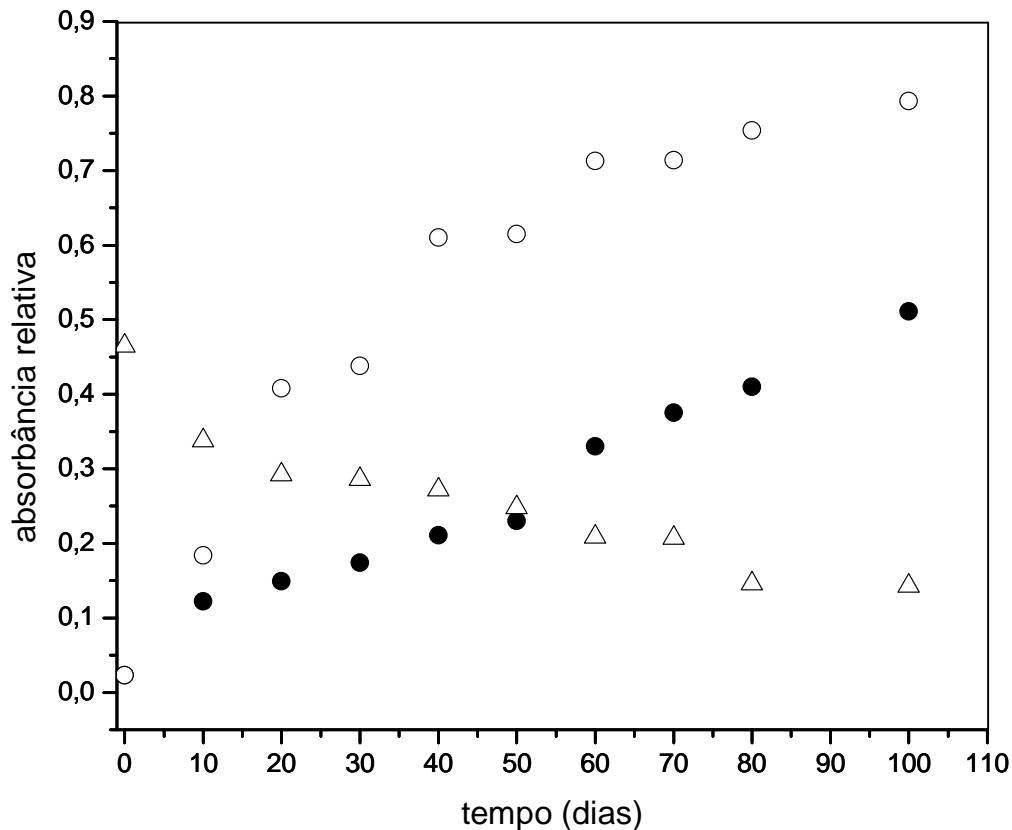


Figura 17- Cinética de absorbância relativa das bandas de deformação de OH/OOH (●) C=O (○) e (Δ) C=C-H para o poli (1,4-*trans*-isopreno) isolado dos cones da marca Tanari® em contato com *E. faecalis*



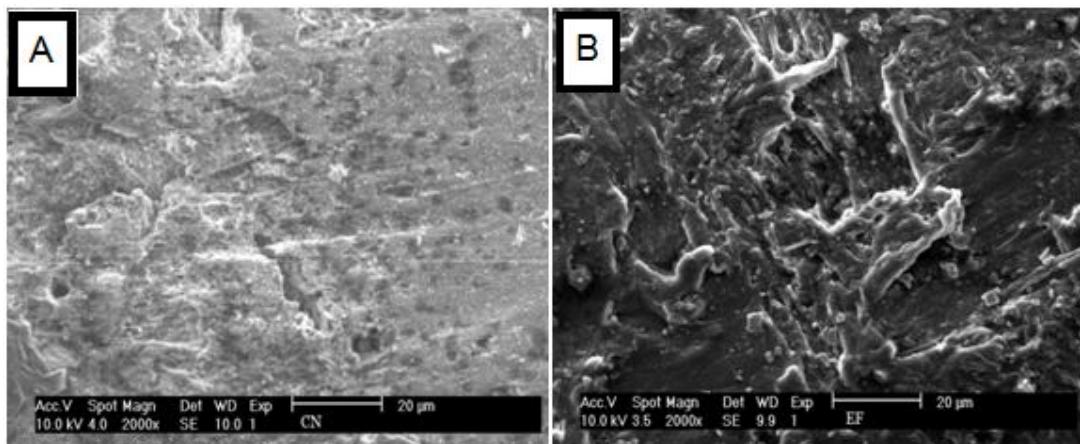
A clivagem da ligação C=C das moléculas do polímero, representada pela diminuição da intensidade da banda C=C-H nas Figuras 16 e 17, ocorre simultaneamente ao aumento de intensidade das bandas de C=O e OH/OOH. Através da visualização dessas figuras observa-se que *E. faecalis* degrada o poliisopreno proveniente dos cones das marcas Odous® e Tanari® de maneira diferente.

Os dados das Figuras 16 e 17 mostram que as modificações nos grupamentos funcionais das moléculas do poliisopreno isolado dos cones da marca Tanari® são mais intensas que no polímero isolado dos cones da marca Odous®. Isso ocorre, possivelmente, devido ao fato do óxido de zinco ser o constituinte inorgânico responsável por conferir atividade antimicrobiana ao material, pois os cones da marca Odous® possuem óxido de zinco como único constituinte inorgânico em sua composição.

5.1.7- Análise de imagens da superfície dos cones

Através de imagens de MEV é possível visualizar a diferença entre a superfície de um cone submetido por 80 dias ao contato com o controle negativo com a de um cone com o inóculo pelo mesmo período. As imagens de MEV são exibidas na Figura 18.

Figura 18- Imagens da superfície dos cones da marca Odous®. (A) cone submetido ao contato com meio de sais minerais (MSM) sem o inóculo (CN). (B) cone submetido ao contato com o inóculo por 80 dias. Aumento de 2000x.



As imagens de MEV mostram que os cones de guta-percha por si só (imagem A) têm irregularidades em sua superfície. O que está de pleno acordo com a explanação feita por Ebert e col. (2007). Isso é um problema, pois alguns microorganismos podem usar as irregularidades na superfície dos cones como sítios de adesão e crescer nesses espaços sob a forma de biofilme (UCHA, KAIWAR e MEHTA, 2010).

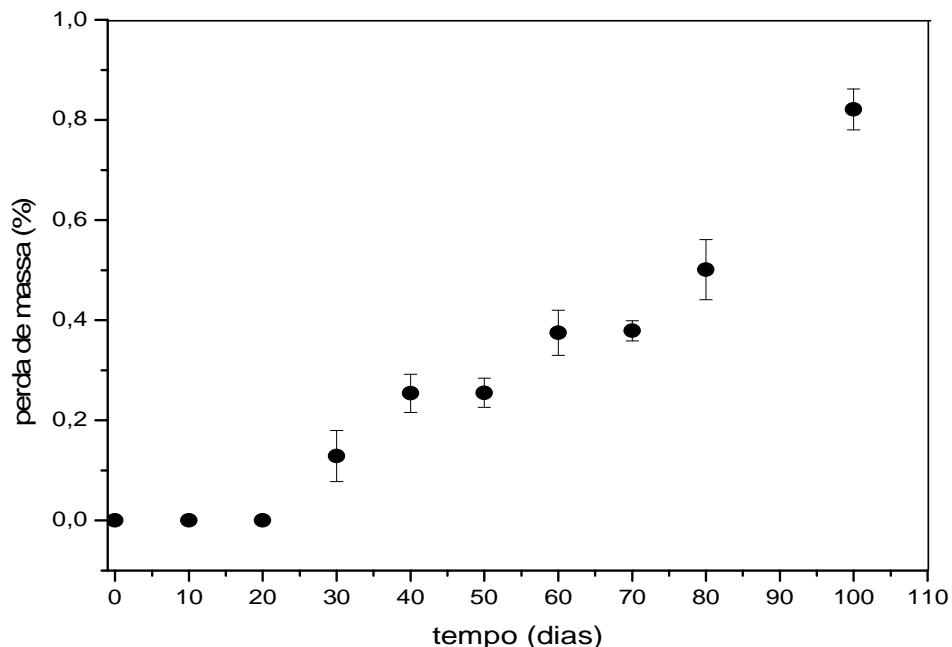
As imagens mostram que após 80 dias de contato com *E. faecalis* há um aumento na irregularidade da superfície dos cones. Isso sugere que a bactéria degradou parte dos cones, o poli (1,4-*trans*-isopreno), por uma via bioquímica desconhecida. De acordo com Warneke e col. (2007), até hoje não foram isoladas enzimas capazes de degradar o poli (1,4-*trans*-isopreno). Entretanto já foram isoladas duas enzimas capazes de degradar o seu isômero, o poli (1,4-*cis*-isopreno): a dioxigenase e a aldeído desidrogenase.

5.2- Degradação do poliisopreno *in natura*

5.2.1- Variação de massa do poliisopreno

Os resultados da Figura 19 confirmam o fato de que *E. faecalis* degrada parte da matéria orgânica proveniente do polímero. A perda de massa do poliisopreno *in natura* é mais de duas vezes maior que a perda de massa dos cones. Isso ocorre por 2 motivos: esse material tem mais fonte de carbono disponível e a atividade antimicrobiana dos constituintes inorgânicos dos cones impede que a degradação do poliisopreno desses materiais ocorra na mesma intensidade do poliisopreno *in natura*.

Figura 19- Variação de massa do poliisopreno *in natura* imerso em meio com *Enterococcus faecalis*



A Tabela 6 mostra os resultados para o percentual de perda de massa dos materiais quando os mesmos são postos em contato com o inóculo por 100 dias.

Tabela 6 – Perda de massa dos materiais após 100 dias de contato com o inóculo

| Materiais | Perda de massa em porcentagem |
|-------------------------------|-------------------------------|
| Poliisopreno <i>in natura</i> | $0,82 \pm 0,01^a*$ |
| Cones da marca Odous® | $0,155 \pm 0,009^{a*}$ |
| Cones da marca Tanari® | $0,162 \pm 0,007$ |

*Comparação estatística com os cones da marca Tanari®

Os resultados da Figura 9 para a análise do teor residual por TGA podem sugerir que a bactéria usa somente as ceras/resinas como substrato, deixando o poliisopreno isento de biodegradação, pois as porcentagens máximas de aumento de teor residual são muito próximas das porcentagens desses componentes no procedimento de quantificação de seus constituintes (Tabela 3). Entretanto, os resultados expostos na Tabela 3, mostram que a bactéria também usa parte do poliisopreno dos cones como substrato, já que a porcentagem de perda de massa do poliisopreno *in natura* é superior à dos cones. Esse fato também é evidenciado pela cinética das bandas de OH/OOH, C=O e H-C=C, nas Figuras 16 e 17, pois observa-se que há uma progressão na intensidade relativa dessas bandas. É importante salientar que para a realização das análises de FTIR o poliisopreno foi, primeiramente, isolado dos cones e está isento de cera/resina. Desse modo, não é possível atribuir qualquer variação nos espectros das Figuras 14 e 15 com a presença ou a degradação de ceras/resinas.

5.2.2- Variação de massa molar do poliisopreno *in natura*

A variação de massa molar do poliisopreno *in natura* foi maior do que a observada para os cones das marcas Odous® e Tanari®. Esse resultado é coerente já que a guta-percha natural é isenta de quaisquer constituintes que poderiam vir a lhe conferir proteção contra ataque microbiano, como também a matéria orgânica disponível para a bactéria é maior. Os resultados para a massa molar do polímero após 100 dias de contato com o inóculo estão expostos na Tabela 7.

Tabela 7 – Massa molar de pico dos cones das marcas Odous®, Tanari® e do poliisopreno *in natura* submetidos ao contato com *E. faecalis*

| Materiais | M_{pk} (g/mol) em t = 0 | M_{pk} (g/mol) em t = 100 dias |
|-------------------------------|---|--|
| Poliisopreno <i>in natura</i> | $(5,50 \pm 0,095) \times 10^5$ | $(1,70 \pm 0,010) \times 10^5$ a* |
| Cones da marca Odous® | $(5,50 \pm 0,021) \times 10^5$ | $(2,48 \pm 0,040) \times 10^5$ a* |
| Cones da marca Tanari® | $(5,50 \pm 0,006) \times 10^5$ | $(2,36 \pm 0,036) \times 10^5$ |

*Comparação estatística com os cones da marca Tanari®

A Figura 20 mostra que o perfil de perda de massa molar do polímero segue um modelo de decaimento exponencial. Isso significa que existe um limite de degradação do material. Isso pode ocorrer por 2 motivos: deve existir algum nutriente em quantidade

limitada para a bactéria, já que a bactéria consegue sobreviver às condições do meio de cultura pobre em minerais e usa a guta-percha como única fonte de carbono; ou a bactéria está próxima de sua fase estacionária de crescimento, nesse caso isso pode ocorrer devido a quantidade de metabólitos acumulados no meio; nessa fase a bactéria tenta se adaptar ao meio e pode utilizar alguns metabólitos secundários como fonte de carbono, como também pode reduzir sua taxa metabólica e crescer sob forma lenta ou até mesmo alcançar a sua forma latente (TORTORA, FUNKE e CASE, 2003). Esses fatores fazem com que a bactéria de uma forma ou outra reduza o consumo da matéria orgânica proveniente dos cones de guta-percha com o passar do tempo de contato com os materiais.

Figura 20 - Variação de M_{pk} do poliisopreno *in natura* submetido ao contato com *E. faecalis*

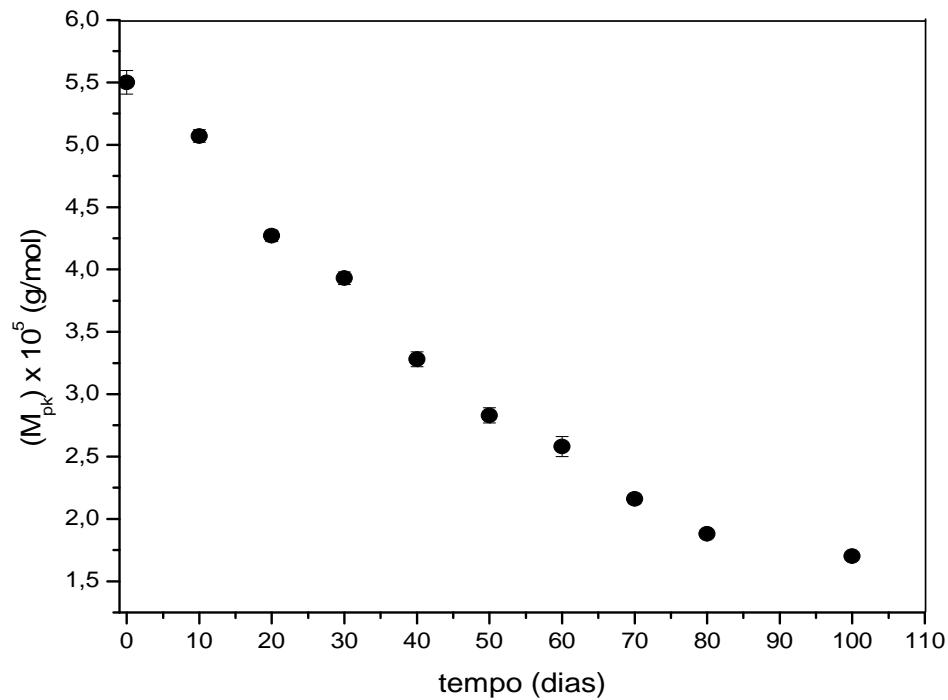
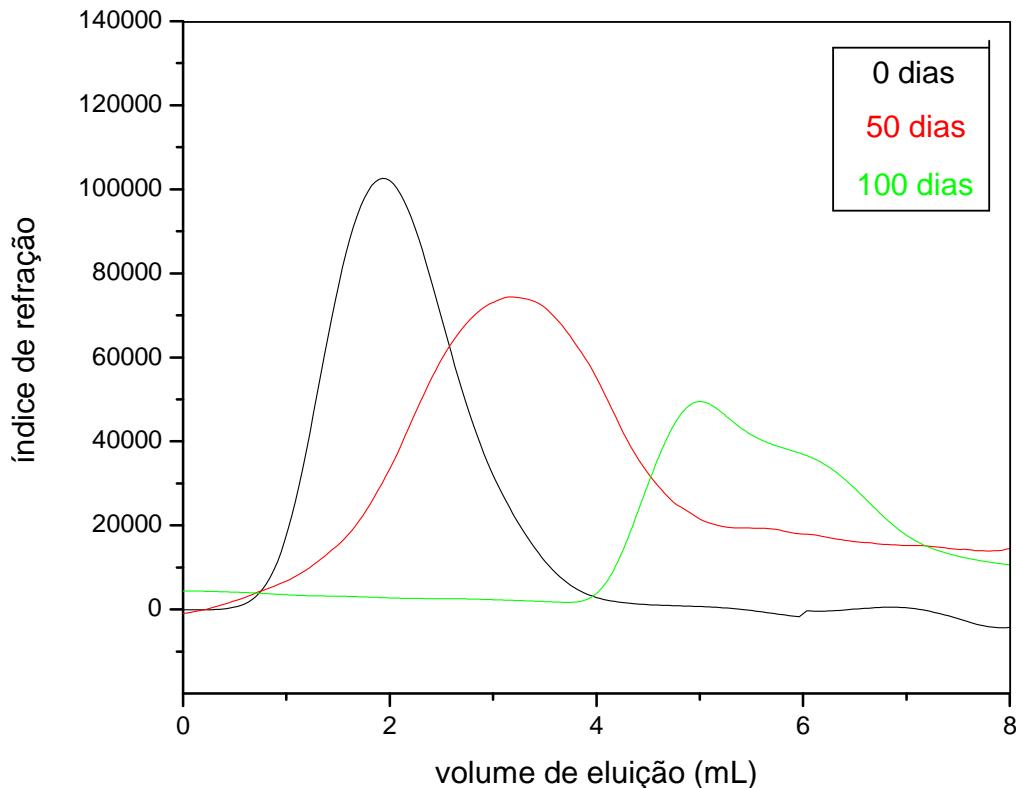


Figura 21- Cromatogramas do poli (1,4-*trans*-isopreno) *in natura*



A curva bimodal da Figura 19 para o tempo de 100 dias de contato reforça os argumentos propostos para a perda de massa molar observada na Figura 20 e na Tabela 7, pois esse perfil é característico de formação predominante de dois produtos com massas molares médias. Isso mostra que a degradação do poli (1,4-*trans*-isopreno) *in natura* é mais severa que à do polímero isolado dos cones, comprovando o fato de que esse polímero pode ser usado como única fonte de carbono por *E. faecalis*.

5.2.3- Caracterização química da degradação do poliisopreno *in natura*

A guta-percha *in natura* sofreu degradação de forma mais acentuada do que os cones das marcas Odous® e Tanari® (Figura 22). A diferença na degradação do poliisopreno *in natura* com relação à degradação do poliisopreno nos cones de guta-percha é considerável e fica evidente quando é feita uma comparação entre a intensidade das bandas de OH/OOH entre os espectros das Figuras 14 e 15 com os da Figura 22 para o período de 80 dias de contato.

Outra maneira de constatar o fato de que a degradação do poliisopreno *in natura* ocorreu de forma mais acentuada que no poliisopreno proveniente dos cones é comparar o

conjunto de todas as bandas que foram detectadas nos espectros das Figuras 14, 15 e 22. As bandas detectadas estão descritas suscintamente na Tabela 5, entretanto, as bandas que representam maior relevância para essa discussão estão organizadas na Tabela 8.

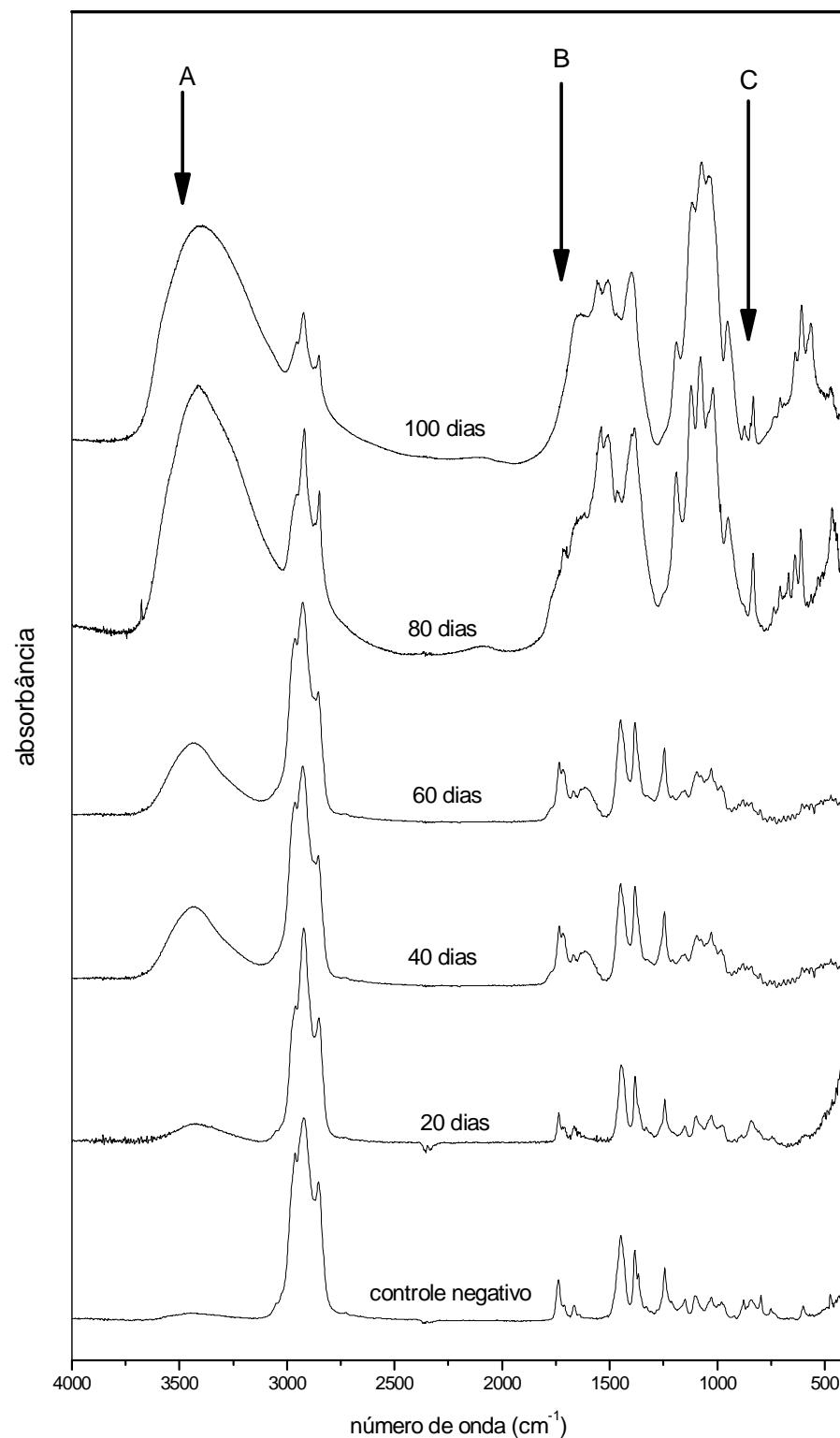
Tabela 8 – Principais atribuições das bandas no infravermelho para o poli (1,4-*trans*-isopreno) isolado dos cones das marcas Odous® e Tanari® e do poli (1,4-*trans*-isopreno) *in natura* (guta) submetidos ao contato com *E. faecalis* por 100 dias

| Número de onda (cm ⁻¹) | | | | | | |
|------------------------------------|---------|------|------------|----------------------------------|------------------------|------|
| Odous® | Tanari® | Guta | Literatura | Atribuição | Origem | Ref. |
| 1448 | 1444 | - | 1445 | δ de CH ₂ | <i>trans</i> -isopreno | 2 |
| 1373 | 1377 | - | 1384 | δ_{as} de CH ₃ | <i>trans</i> -isopreno | 2 |
| 1227 | 1219 | - | 1210 | β de =C-H | <i>trans</i> -isopreno | 2 |
| 1161 | 1156 | - | 1154 | ω de CH ₃ | <i>trans</i> -isopreno | 2 |
| 1095 | 1099 | - | 1101 | v de C-C | <i>trans</i> -isopreno | 2 |
| - | - | 1110 | 1101 | v de C-O | Éster | 1 |
| 1030 | 1032 | - | 1035 | ρ de CH ₃ | <i>trans</i> -isopreno | 2 |
| 974 | 981 | - | 990 | v de C-C | <i>trans</i> -isopreno | 2 |
| 872 | 880 | - | 884 | γ de =C-H | <i>trans</i> -isopreno | 2 |
| 836 | 840 | - | 858 | γ de =C-H | <i>trans</i> -isopreno | 3 |

1: PAVIA, CHAPMAN e KRIZ, 1996; 2: ARJUNAN, SUBRAMANIAN e MOHAN, 2001; 3: RICHARDSON e SACHER, 1953; v, estiramento; δ , deformação; β , tensão no plano; γ , tensão fora do plano; ω , vibração; ρ , balanço; s, simétrica; as, assimétrica.

A Tabela 8 mostra que, para um período de 100 dias de contato dos materiais com *E. faecalis*, todas as bandas referentes à algum tipo de vibração molecular envolvendo grupamentos químicos típicos do *trans*-isopreno foram detectadas em intensidade apreciável para o poli (1,4-*trans*-isopreno) proveniente dos cones de ambas as marcas analisadas, enquanto que para o polímero *in natura* não houve a detecção de nenhuma dessas bandas. Por outro lado, a banda v de C-O de éster foi detectada exclusivamente nos espectros de infravermelho do poli (1,4-*trans*-isopreno) *in natura*, indicando que a oxidação do polímero *in natura* ocorreu de forma mais evidenciada do que no polímero proveniente dos cones.

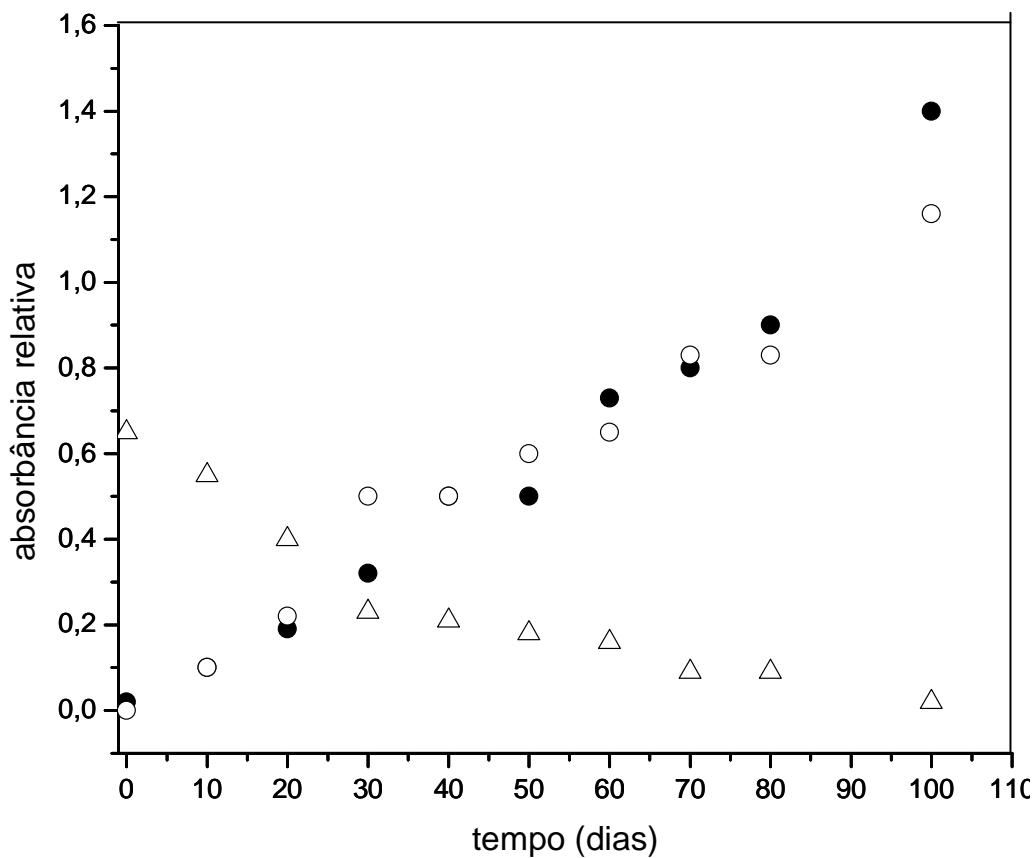
Figura 22- Espectros de infravermelho para o poliisopreno *in natura* em meio líquido contendo a bactéria *Enterococcus faecalis*



5.2.4- Cinética da degradação do poliisopreno *in natura*

A cristalinidade do polímero *in natura* é maior do que a do polímero proveniente dos cones, pois a absorbância relativa a uma das bandas de estiramento de H-C=C em 860 cm⁻¹ do polímero *in natura* que não foi submetido ao processo de degradação (tempo zero), é de 0,64. O polímero proveniente dos cones esse valor é de 0,55 para os cones da marca Odous® e 0,47 para a Tanari® (Figuras 16, 17 e 23). Isso ocorre devido ao fato do material *in natura* ser isento de outros materiais.

Figura 23- Cinética de absorbância relativa das bandas de deformação de (●) OH/OOH (○) C=O e (Δ) C=C-H para o poli (1,4-*trans*-isopreno) *in natura* em contato com *E. faecalis*



No processo de degradação do poliisopreno *in natura* a intensidade relativa das bandas de OH/OOH e de C=O aumentou de forma mais intensa à ocorrente no poliisopreno isolado dos cones (Figuras 16, 17 e 23).

Tabela 9- Absorbância relativa das bandas de OH/OOH, C=O e C=C-H do poliisopreno em contato com os microorganismos pelo período de 100 dias

| | Guta in natura | Odous® | Tanari® |
|----------|-----------------------|-------------------|-------------------|
| A OH/OOH | 1,39 ^{a*} | 0,47 ^b | 0,51 ^b |
| A C=O | 1,12 ^a | 0,48 ^a | 0,79 ^a |
| A C=C-H | 0,02 ^a | 0,14 ^a | 0,10 ^a |

*Comparação estatística com os cones das marcas Odous® e Tanari®

Os resultados da Tabela 9 mostram que o polímero *in natura* é degradado mais intensamente que o polímero proveniente dos cones. A principal modificação funcional ocorreu na banda de OH/OOH em que a absorbância relativa teve maior variação entre o polímero isolado dos cones e o polímero *in natura*. O poliisopreno dos cones da marca Tanari® sofre modificações mais profundas nos grupamentos funcionais de suas moléculas, pois isso fica óbvio na observação dos valores de absorbância relativa das bandas de OH/OOH e C=O.

5.2.5- Estudo da biodegradação do poliisopreno *in natura* através de RMN de H¹

Os espectros de RMN H¹ do poliisopreno *in natura* submetido ao controle negativo e não submetido ao bioensaio são exibidos nas Figuras 24 e 25, respectivamente.

Figura 24- RMN H¹ para o poliisopreno *in natura* submetido ao contato com o controle negativo por 100 dias

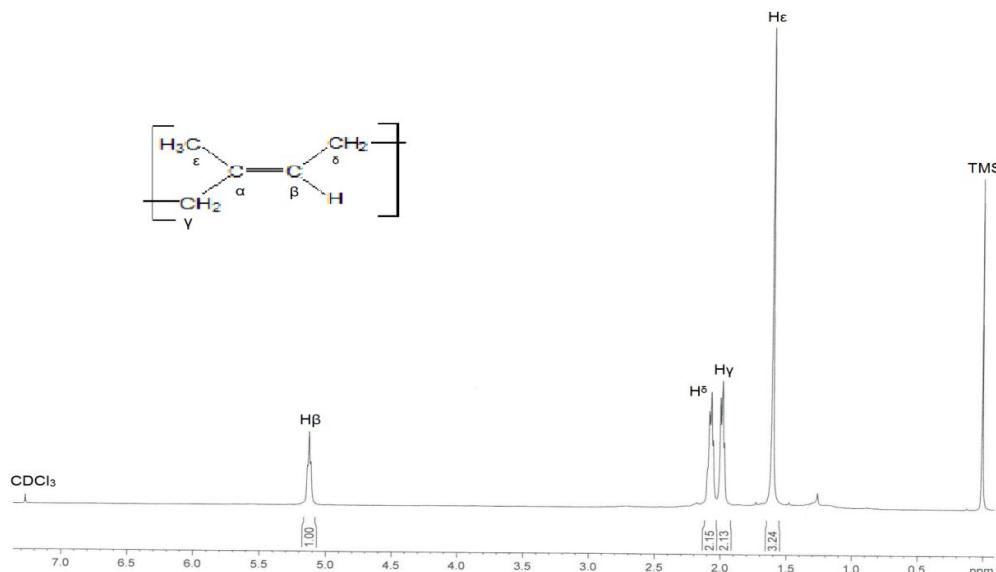
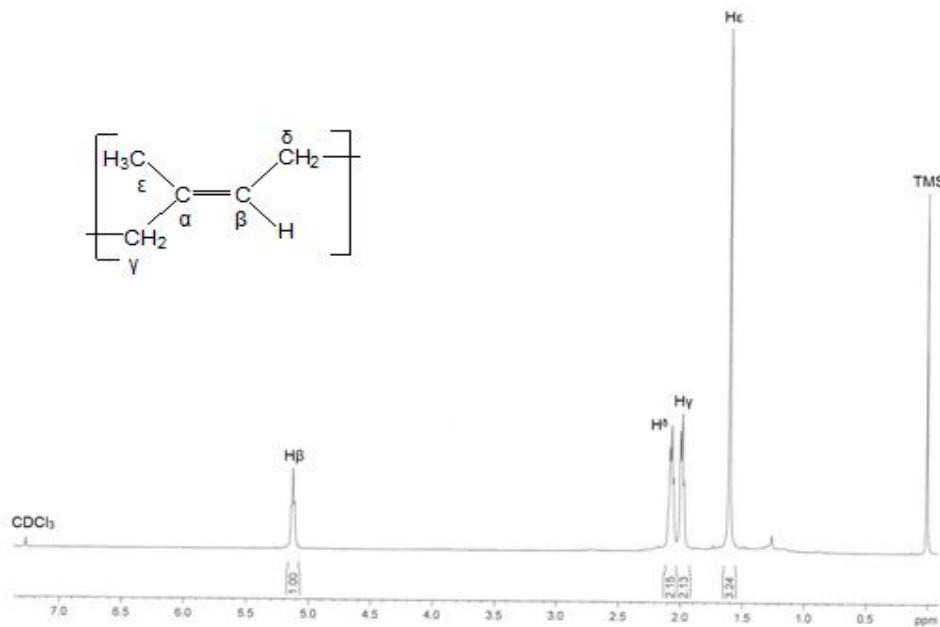


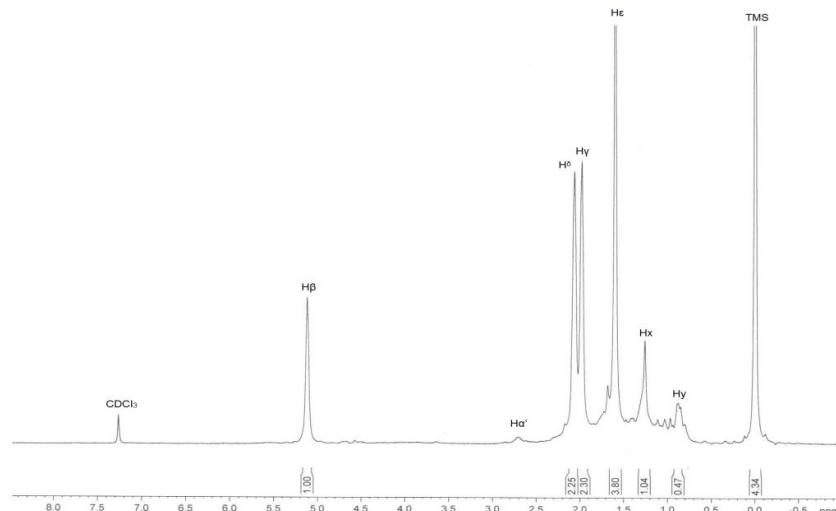
Figura 25- RMN H¹ para o poliisopreno *in natura* não submetido ao bioensaio



Levando em consideração as atribuições reportadas na literatura (GOLUB, 1978), os sinais de absorção nos espectros de próton mostrados em 5,17; 2,12; 2,04 e 1,65 ppm foram atribuídos aos hidrogênios H_β, H_δ, H_γ e H_α, respectivamente.

A Figura 26 apresenta o espectro do poliisopreno *in natura* submetido ao contato por 100 dias com o inoculo. H_{α'}

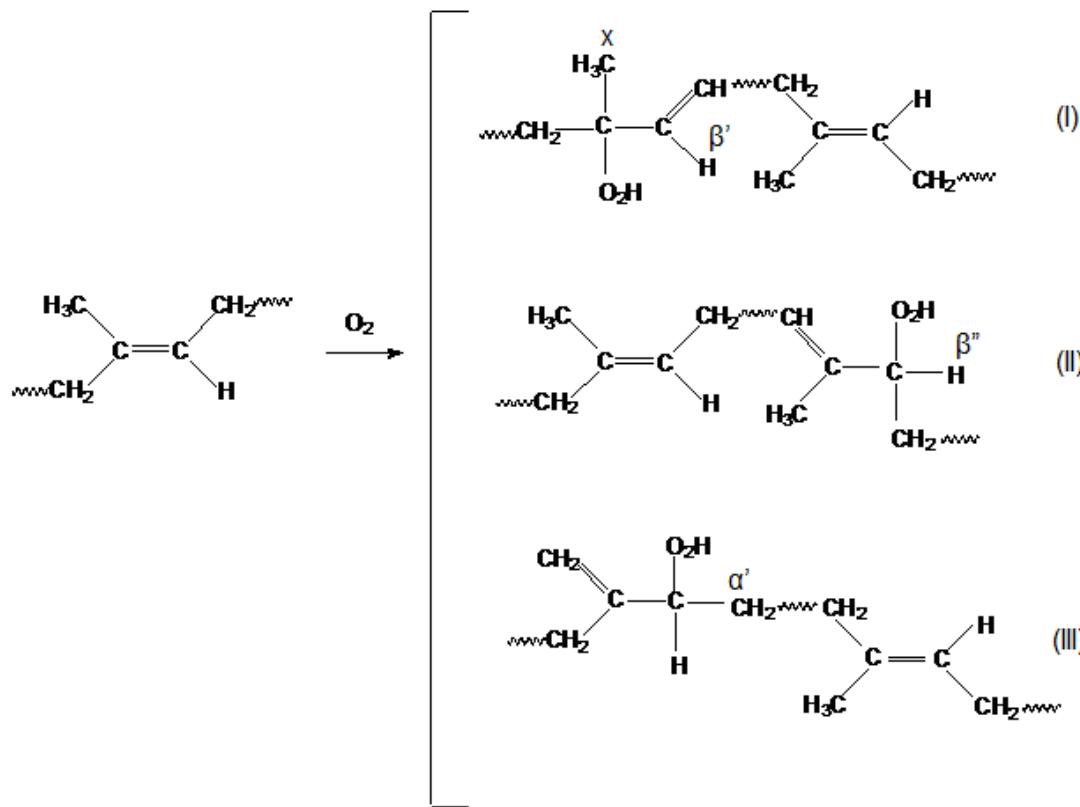
Figura 26- RMN H¹ para o poliisopreno *in natura* submetido ao contato com o inóculo por 100 dias



Os sinais devido a $\text{H}\beta$, H^δ' , H^γ e H^ϵ são observados no espectro da Figura 23. Três novos sinais em 2,65, 1,31 e 0,93 ppm também foram detectados. O sinal em 2,65 ppm é atribuído aos hidrogênios provenientes do grupamento CH_2 formado pela quebra da ligação dupla no carbono α . O sinal em 1,31 ppm é atribuído ao próton do grupo CH_3 devido a formação de hidroperóxidos no carbono α , confirmando a degradação observada no estudo de infravermelho.

Golub e col. (1978) mostraram que a oxidação do poli (1,4-*trans*-isopreno) pode ocasionar mudanças no espectro de RMN dos poliisoprenos devido às estruturas mostradas na Figura 27.

Figura 27- Estruturas provenientes da oxidação do poli (1,4-*trans*-isopreno)



O sinal em 1,30 ppm é atribuído a H^ϵ (estrutura I), 5,54 ppm atribuído a $\text{H}\beta'$ (estrutura I), 4,2 ppm atribuído a $\text{H}\beta''$ (estrutura II) e o de 2,8 ppm ao $\text{H}\alpha'$ (estrutura III).

No espectro de H^1 do poliisopreno *in natura* submetido ao contato com o inóculo por 100 dias (Figura 26) apenas o sinal em 1,30 ppm foi detectado. Um dos possíveis motivos para essa observação pode ser o tempo de contato com o inóculo, pois resultados

reportados por Silva-Jr. (2007) mostram que os demais sinais citados foram detectados em uma amostra de poli (1,4-*trans*-isopreno) isolado de cones com 15 anos de obturação provenientes de contaminação dos canais radiculares.

5.3- Bioensaios

5.3.1- Avaliação da atividade antimicrobiana dos constituintes inorgânicos dos cones de guta-percha

O teste de atividade antimicrobiana para o óxido de zinco, o sulfato de bário e o material inorgânico isolado dos cones de guta-percha foi feito em triplicata. Os diâmetros dos halos de inibição foram medidos e daí foi obtida uma média das zonas de inibição. Os dados são apresentados na Tabela 10.

Tabela 10- Diâmetro médio dos halos de inibição para o teste de difusão em poço para *Enterococcus faecalis*

| Material | Média do diâmetro dos halos de inibição |
|---|---|
| ZnO | 16,0 ± 0,35 |
| Constituintes inorgânicos * dos cones Odous® | 15,9 ± 0,42 |
| BaSO ₄ | - |
| Constituintes inorgânicos** dos cones Tanari® | 13,6 ± 0,45 |

*Extraído dos cones da marca Odous® pelo método de Friedman com modificações (Friedman e col., 1975; Gurgel-Filho e col., 2003).

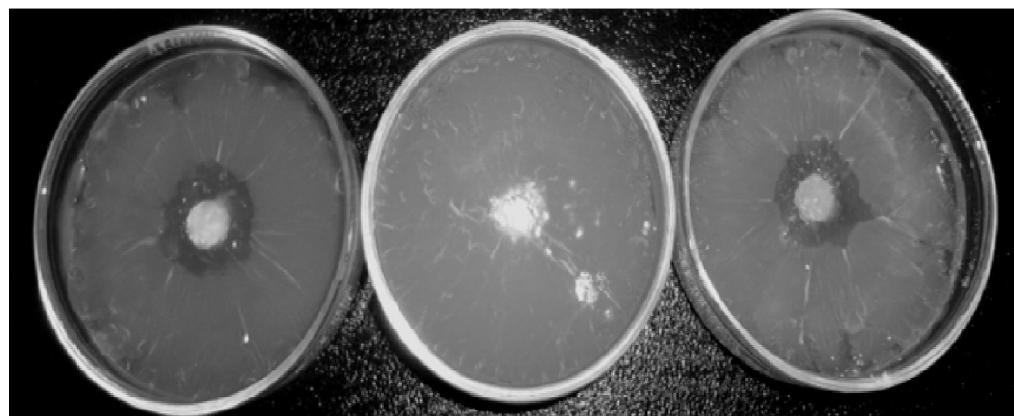
**Extraído dos cones da marca Tanari® pelo método de Friedman com modificações (Friedman e col., 1975; Gurgel-Filho e col., 2003)

Os resultados mostram que o ZnO puro e o material inorgânico proveniente dos cones da marca Odous® têm atividade antimicrobiana similar frente ao inóculo. O material inorgânico desses cones é unicamente ZnO; e o óxido de zinco é o constituinte que tem a função de conferir atividade antimicrobiana aos cones. Esse óxido é usado, inclusive, para essa finalidade em diversos materiais para usos médicos e industriais (KRISHNA, KOODALI e MANNA, 2011; TAYEL e col., 2011; LIPOVSKY e col., 2011).

A atividade antimicrobiana dos constituintes inorgânicos dos cones da marca Tanari® é menor do que à do óxido de zinco. Isso é coerente se for considerado o fato de que a parte inorgânica desses cones é composta de óxido de zinco e sulfato de bário que não apresentou atividade antimicrobiana, como também, se for considerado o fato do óxido de zinco conferir, embora com menos intensidade, radiopacidade aos cones (SILVA e COSTA, 2004).

O sulfato de bário tem como principal função conferir radiopacidade aos cones (SILVA e COSTA, 2004). Os resultados expostos mostram que esse constituinte não apresenta atividade antimicrobiana (Figura 28). Desse modo é possível afirmar que a degradação do poliisopreno dos cones das marcas Odous® e Tanari® é menor do que no polímero *in natura* devido óxido de zinco conferir atividade antimicrobiana ao material. Os resultados exibidos no procedimento de pesagem dos cones e nas caracterizações de GPC e FTIR reforçam essa afirmação.

Figura 28- Ensaios de atividade antimicrobiana mediante *E. faecalis*. da esquerda para a direita: óxido de zinco, sulfato de bário, material inorgânico isolado dos cones da marca Odous®

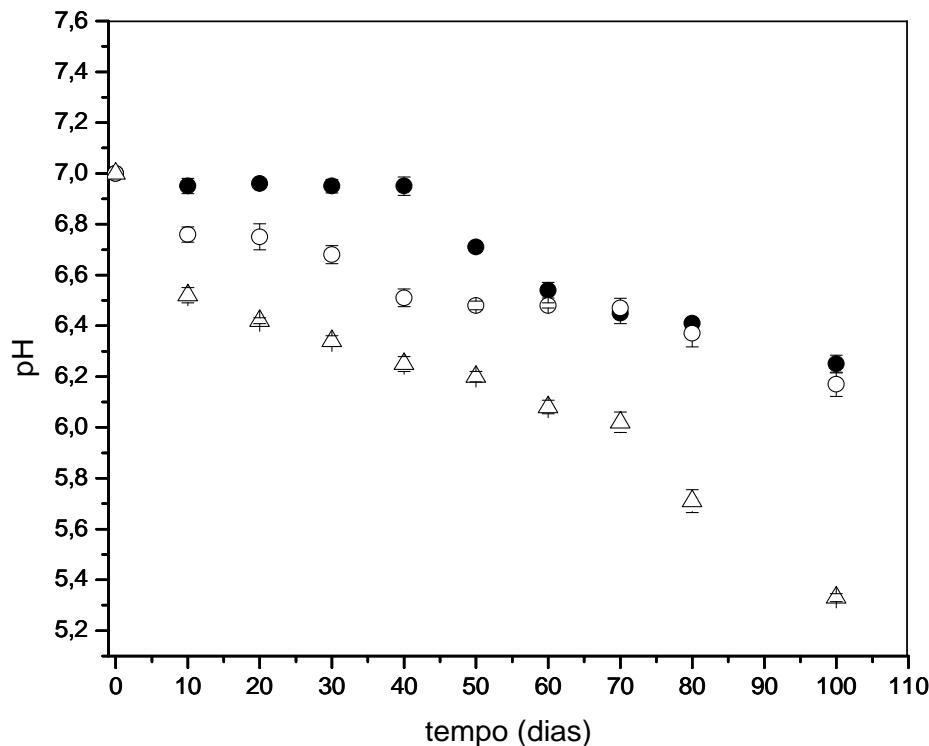


5.3.2- Monitoramento do crescimento de células

5.3.2.1- Avaliação da acidez

A Figura 29 mostra os resultados das medidas de pH feitas periodicamente nos meios contendo o inóculo submetido ao contato com os materiais. A Tabela 11 exibe os resultados dessas medidas após 100 dias de contato dos meios com os materiais. Os resultados das medidas dos controles negativos foram omitidos do gráfico porque o pH se manteve constante em $7,00 \pm 0,04$ durante os 100 dias de experimento.

Figura 29- Medidas periódicas de pH dos MSM's inoculados contendo (●) cones da marca Odous® (○) cones da marca Tanari® (Δ) poliisopreno *in natura*



Os resultados expostos mostram que durante o processo de degradação de parte da matéria orgânica proveniente do polímero, o pH é alterado possivelmente devido à liberação metabólica de CO₂ que reage com a água para formar ácido carbônico (H₂CO₃), que acidifica levemente o meio. Entretanto, o principal fator pela queda de pH do meio ocorre, possivelmente, devido à liberação de ácido lático, já que *E. faecalis* tem a capacidade de liberar esse metabólito durante o processo de fermentação (XIONG e col., 2012; MUYANJA e col., 2003). A contribuição do ácido lático para a acidez do meio é maior do que à do ácido carbônico, pois esse ácido é mais forte (pKa 3,86 e 6,36, respectivamente) (BRADY e HUMISTON, 1987).

Tabela 11 – Medidas de pH após 100 dias de contato dos meios com os materiais

| Meios inoculados contendo: | pH |
|-------------------------------|-------------------|
| Poliisopreno <i>in natura</i> | $5,33 \pm 0,02^a$ |
| Cones da marca Odous® | $6,25 \pm 0,04^a$ |
| Cones da marca Tanari® | $6,17 \pm 0,05^a$ |

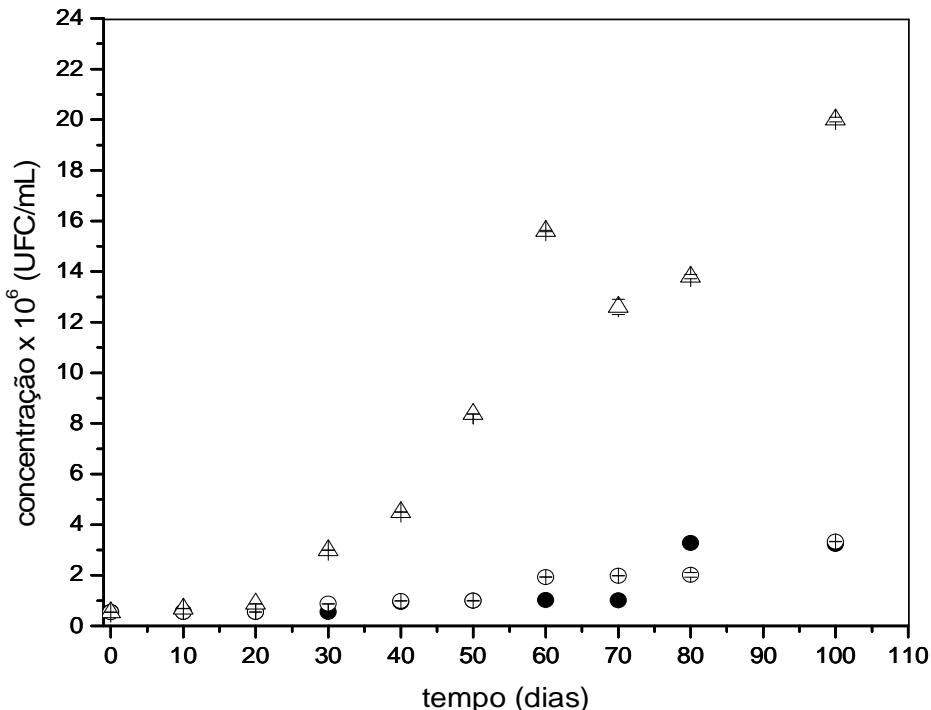
Os resultados da Tabela 11 e da Figura 29 mostram que a variação do pH é um parâmetro que reforça o fato de que a bactéria usou parte da matéria orgânica dos materiais como única fonte de nutriente.

O fato do poliisopreno *in natura* ter uma maior quantidade de substrato disponível do que os cones, juntamente com o fato de não possuir componentes que possam causar inibição do processo indica que após 100 dias de contato com o inóculo esse material sofreu degradação de forma mais acentuada que os demais materiais submetidos às mesmas condições experimentais. A redução do pH foi a maior observada, subtende-se que a liberação de metabólitos (enzimas, coenzimas, co-fatores e outros metabólitos de caráter ácido) resultantes do processo de degradação da matéria orgânica ocorreu de forma mais pronunciada devido ao provável aumento do número de células bacterianas no meio (PELCZAR-JR, CHAN e KRIEG, 1997).

5.3.2.2- Medidas de densidade ótica

A Figura 30 mostra o resultado do monitoramento do crescimento celular por medidas periódicas de densidade óptica.

Figura 30 – Concentração de *E. faecalis* obtida através medidas de densidade óptica dos meios contendo (●) cones da marca Odous® (○) cones da marca Tanari® (Δ) poliisopreno *in natura*



A Figura 30 mostra que os valores referentes ao número de bactérias são crescentes em todos os meios inoculados contendo os materiais. Entretanto, a intensidade de crescimento das bactérias no meio contendo o polisopreno *in natura* é muito superior à dos meios com os cones das marcas Odous® e Tanari®. Os resultados mostram que o fato de o polímero *in natura* ser isento de agentes com atividade antimicrobiana faz com que a bactéria consuma esse polímero de forma mais intensa. Nos cones, a presença dos componentes inorgânicos, em especial o óxido de zinco, confere proteção contra a biodegradação (KRISHNA, KOODALI e MANNA, 2011; LIPOVSKY e col., 2011; TAYEL e col., 2011). Os dados referentes ao número de células após 100 dias de contato dos materiais com o meio são exibidos na Tabela 12.

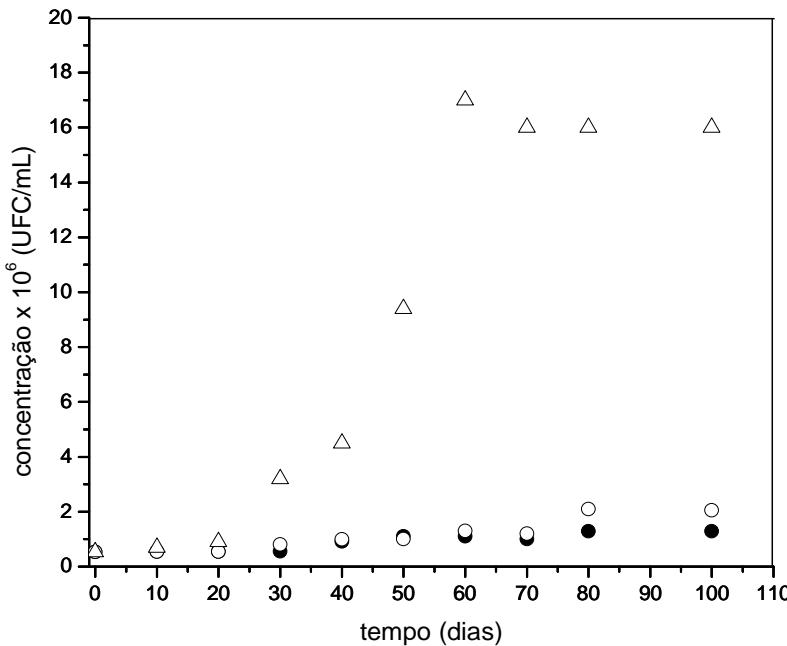
Tabela 12 – Número de células de *E. faecalis* obtido por medidas de densidade óptica dos meios em contato com o inóculo por 100 dias

| Meios inoculados contendo: | Número de células |
|-----------------------------------|---|
| Poliisopreno <i>in natura</i> | (2000 ± 2,10) x10 ⁴ ^a |
| Cones da marca Odous® | (324 ± 2,51) x10 ⁴ ^a |
| Cones da marca Tanari® | (333 ± 2,56) x10 ⁴ ^a |

5.3.2.3- Monitoramento por contagem de células

O monitoramento do crescimento microbiano por contagem de células foi feito a fim de confirmar a tendência observada no monitoramento por densidade óptica. Os resultados para a contagem de células são mostrados na Figura 31.

Figura 31 – Número de células de *E. faecalis* obtido por contagem dos meios contendo (●) cones da marca Odous® (○) cones da marca Tanari® (Δ) poliisopreno *in natura*



Embora a tendência no crescimento das colônias seja semelhante, os resultados expostos na Figura 31 são significativamente diferentes daqueles expostos na Figura 30. Os níveis de confiança entre os resultados usando o Teste T de Student comparativo são exibidos na Tabela 13 com níveis de significância de 5%.

Tabela 13 – Níveis de confiança calculados através de Teste T de Student para a contagem de células por densidade óptica e por contagem de células

| Meios inoculados contendo: | Probabilidade T |
|-------------------------------|-----------------|
| Poliisopreno <i>in natura</i> | 0,90 |
| Cones da marca Odous® | 0,31 |
| Cones da marca Tanari® | 0,45 |

Um dos possíveis motivos para a diferença entre os métodos consiste no fato de que algumas medidas de densidade óptica tiveram que ser extrapoladas da curva de calibração. Desse modo, os resultados para o monitoramento do crescimento de células são mais confiáveis que os das contagens (TRIOLA, 2008). Entretanto os argumentos usados para a exposição dos dados na Figura 30 são válidos, pois a diferença entre o número de células do meio contendo poliisopreno *in natura* com o número de células dos meios contendo os cones das marcas Odous® e Tanari® é bastante significativa ($T = 0,010$ e $T = 0,012$,

respectivamente). Os dados referentes ao número de células após 100 dias de contato do meio com os materiais são expostos na Tabela 14.

Tabela 14 - Número de células de *E. faecalis* obtido por contagem de células dos meios em contato com o inóculo por 100 dias

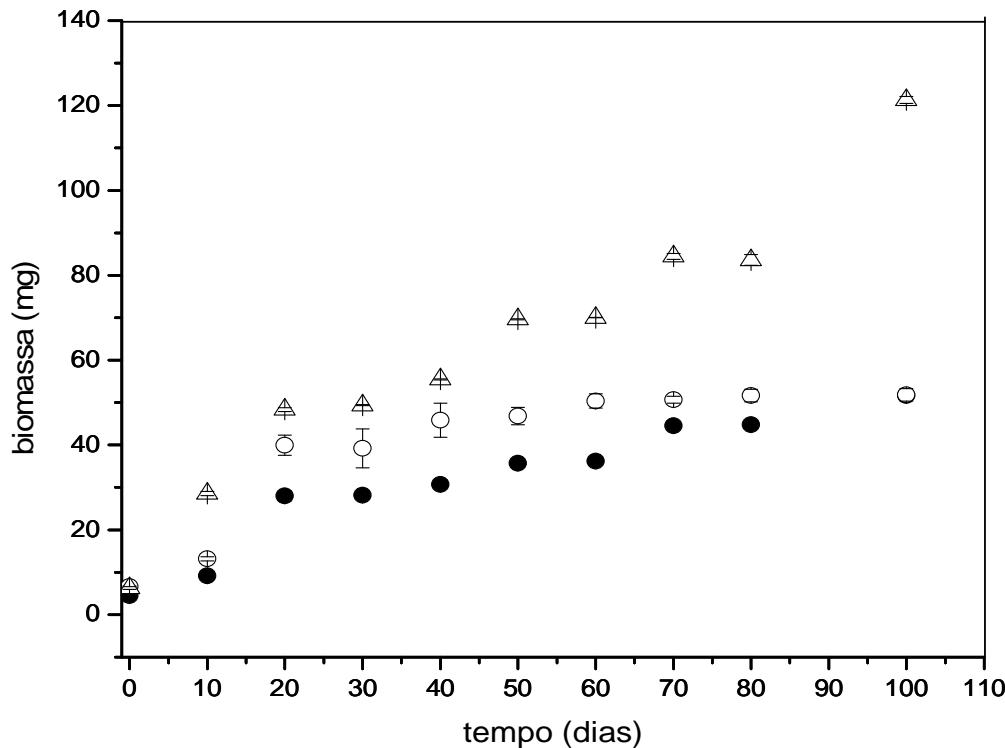
| Meios inoculados contendo: | Número de células |
|-----------------------------------|---------------------------------|
| Poliisopreno <i>in natura</i> | $1,60 \times 10^7$ ^a |
| Cones da marca Odous® | $1,29 \times 10^6$ ^a |
| Cones da marca Tanari® | $2,05 \times 10^6$ ^a |

Embora haja significância na diferença entre os resultados das medidas de concentração celular por contagem de células e densidade óptica, a tendência experimental observada é a mesma. Desse modo, ambos os resultados devem ser levados em consideração e reforçam o argumento exposto para os resultados para as medidas de pH no que diz respeito à crescente liberação de metabólitos ácidos devido ao aumento gradual do número de células no meio (MADIGAN, MARTINKO e PARKER, 2004) (Figura 29).

5.3.2.4- Monitoramento por obtenção de biomassa seca

Através das pesagens da biomassa seca proveniente da amplificação do inóculo foi possível monitorar o crescimento das células em complemento às medidas de densidade óptica e contagem de células. Esse monitoramento tem a desvantagem de não fornecer um número de células no meio. Entretanto, através desse método é possível verificar uma fase de morte celular das bactérias de um meio, caso haja (TORTORA, FUNKE e CASE, 2003). Os resultados para o monitoramento são expostos na Figura 32.

Figura 32 – Biomassa seca de células de *E. faecalis* proveniente dos meios inoculados contendo (●) cones da marca Odous® (○) cones da marca Tanari® (Δ) poliisopreno *in natura*



Os resultados expostos nas Figuras 30 e 31 mostraram que a bactéria cresce nos meios contendo qualquer um dos 3 materiais como única fonte de carbono, como também mostram que a bactéria cresceu com maior intensidade no meio contendo o poliisopreno *in natura*. As quantidades de biomassa de bactéria produzida dos meios contendo os cones das marcas Odous® e Tanari® são tecnicamente semelhantes (Tabela 15 e Figura 32). Os resultados expostos na Figura 30 reforçam os resultados para as medidas de concentração de células em 2 aspectos: a quantidade de biomassa formada é proporcional ao número de células viáveis do inoculo no meio; tanto o número de células quanto a biomassa de *E. faecalis* formada a partir da alíquota de inoculo que foi posta em contato com poliisopreno *in natura* é muito superior do que nos casos em que o contato ocorreu entre o inóculo e os cones.

Tabela 15 – Biomassa de células de *E. faecalis* dos meios em contato com o inóculo por 100 dias

| Meios inoculados contendo: | Biomassa (mg) |
|-------------------------------|-----------------------------|
| Poliisopreno <i>in natura</i> | 121,34 ± 3,68 ^{a*} |
| Cones da marca Odous® | 51,67 ± 0,97 ^{b**} |
| Cones da marca Tanari® | 51,83 ± 1,45 |

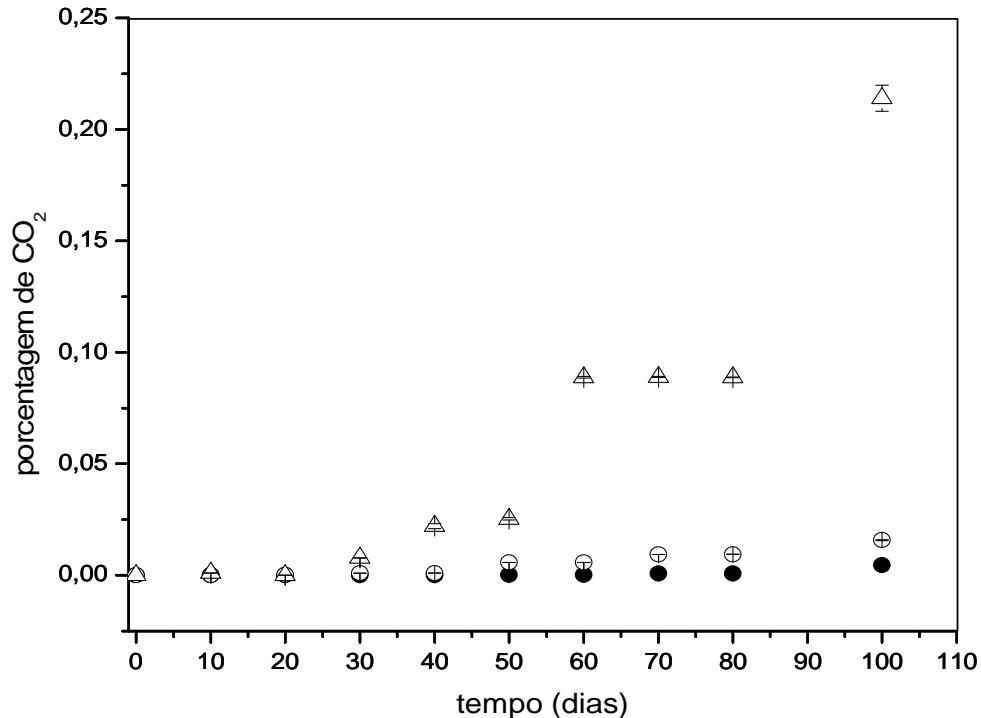
* Comparação estatística entre o poliisopreno *in natura* e os cones de ambas as marcas

** Comparação estatística entre os Cones das marcas Odous® e Tanari®

5.3.2.5- Medidas de CO₂ mineralizado

Através das medidas de CO₂ por titulação foi possível quantificar macroscopicamente a capacidade da bactéria em degradar o poliisopreno. Para essa medida foi necessário determinar a evolução respiratória de CO₂ da bactéria no meio com o polímero submerso. Os resultados das medidas de mineralização de CO₂ são expostos na Figura 33.

Figura 33 – Medidas de porcentagem de mineralização de CO₂ dos cones da marca Odous® (●) Tanari (○) e do poliisopreno *in natura* (Δ) imersos em *E. faecalis*



Houve um aumento progressivo na quantidade de CO₂ liberada pela bactéria durante o processo de degradação nos meios contendo os três materiais. Entretanto, as

quantidades de CO₂ quantificadas dos meios contendo o poliisopreno *in natura* são muito superiores às das cones de ambas as marcas analisadas. Isso ocorreu devido ao fato de os cones possuírem constituintes com atividade antimicrobiana, como também a menor quantidade de substrato disponível para a bactéria. A diferença nas quantidades de CO₂ liberadas durante a degradação do poliisopreno é mais evidenciada quando os dados após 100 dias de bioensaio são colocados em uma tabela (Tabela 16).

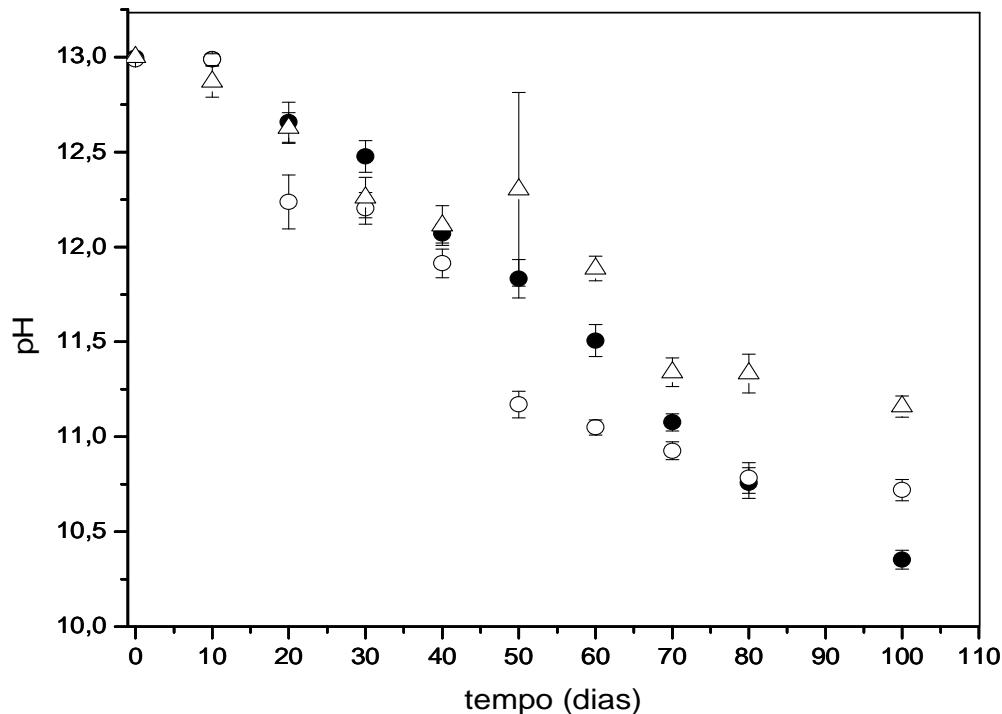
Tabela 16 – Medidas de porcentagem de mineralização de CO₂ após 100 dias de contato

| Meios inoculados contendo: | Porcentagem de CO₂ mineralizado |
|-----------------------------------|---|
| Poliisopreno <i>in natura</i> | (214 ± 0,03) x 10 ⁻³ |
| Cones da marca Odous® | (4,42 ± 0,01) x 10 ⁻³ |
| Cones da marca Tanari® | (15,8 ± 0,01) x 10 ⁻³ |

Os resultados das medidas de CO₂ são diferentes dos reportados por Linos e Steinbuchel (1998) e Warneke e col. (2007), pois em ambos os casos, o poli (1,4-*trans*-isopreno) foi posto em contato com uma variedade de microorganismos, dentre eles o *E. faecalis*, e não foi observado em nenhum caso a formação desse metabólito. Os autores também não conseguiram obter nenhum indício de degradação do polímero por nenhum outro bioensaio realizado por eles.

Após a adição do Ba(OH)₂.8H₂O nos controles negativos, o pH dos meios foi medido. Os resultados são expostos na Figura 34.

Figura 34 – Medidas de pH dos controles negativos com 30 mg de Ba(OH)₂.8H₂O dos meios com (●) cones da marca Odous® (○) cones da marca Tanari (Δ) poliisopreno *in natura*



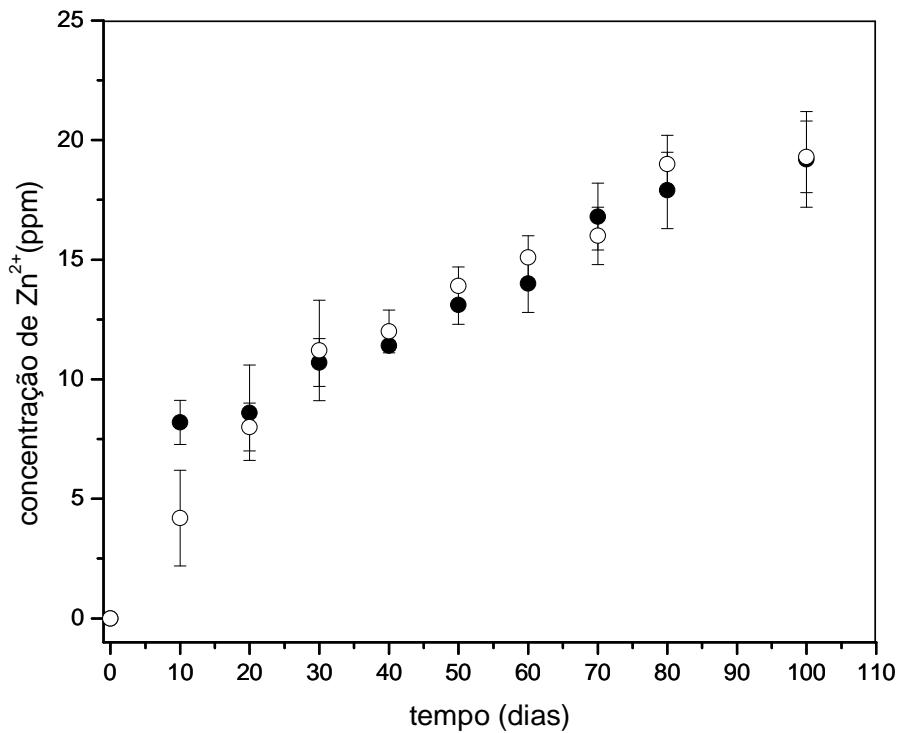
Os resultados expostos na Figura 34 mostram que houve variação de pH nos 3 meios. Entretanto, essa variação foi maior nos meios contendo os cones das marcas Odous® e Tanari®. Isso ocorreu devido à ocorrência de uma possível liberação de Zn²⁺ proveniente do ZnO dos cones, pois quando esse íon reage com os íons HO⁻ provenientes do Ba(OH)₂.8H₂O ele forma Zn(OH)₂ (hidróxido de zinco) que é um composto muito insolúvel (KOTZ e TREICHEL-JR, 2005). Desse modo, os íons HO⁻ são removidos e o pH do meio diminui com a liberação de Zn²⁺ (BACCAN e col., 2001). Desse modo, a liberação contínua de Zn²⁺ pode conferir neutralidade a um meio básico contendo os cones. Isso é um problema, já que alguns agentes bactericidas introduzidos no canal dentário, tais como o Ca(OH)₂ (hidróxido de cálcio) agem aumentando o pH do meio por liberação de íons HO⁻ (WECKWERTH e col., 2011).

A variação de pH dos meios contendo o poliisopreno *in natura* é justificada se for considerado o fato de que nesse meio houve um consumo mais intenso de matéria orgânica e que tal consumo ocorreu acompanhado da liberação de metabólitos ácidos para o meio. Esses metabólitos liberam íons H⁺ que neutralizam parte dos íons HO⁻ provenientes do Ba(OH)₂.8H₂O adicionado ao meio.

5.4 – Ensaio de liberação de Zn²⁺

Os resultados de absorção atômica da Figura 35 mostram que ocorre liberação contínua de Zn²⁺ dos cones das marcas Odous® e Tanari®. O perfil de liberação de Zn²⁺ é semelhante. Isso mostra que a liberação desse constituinte é independente da quantidade de ZnO presente nos cones.

Figura 35 – Ensaio de liberação de Zn²⁺ a temperatura de 37 °C (●) cones da marca Odous® (○) cones da marca Tanari®



Os resultados da Figura 35 reforçam a tese de que a liberação de Zn²⁺ altera o pH do meio, pois eles confirmam que realmente ocorre a liberação desse íon. Uma vez em solução, esse íon pode reduzir o pH do meio através da captura de HO⁻ na formação de Zn(OH)₂, um composto extremamente insolúvel (KPS = 4,5x10⁻¹⁷) (BACCAN e col., 2001).

6 – CONCLUSÃO

Ocorre degradação bacteriana da guta-percha (poli-1,4-*trans*-isopreno), fato que nunca foi reportado na literatura tornando, desse modo, esse trabalho inédito, o que abre novas possibilidades para a pesquisa nos ramos da odontologia, da biologia e da química. Esse resultado dá a oportunidade para o surgimento de pesquisas aplicadas ao aperfeiçoamento dos cones de guta-percha e até mesmo mecanismos de combate ou prevenção dos microorganismos que podem causar a deterioração dos materiais de preenchimento dentário. Os resultados mostram que a degradação do poliisopreno *in natura* é maior do que a do poliisopreno nos cones das marcas Odous® e Tanari®, comprovando, desse modo, que o *E. faecalis* pode usar o poli (1,4-*trans*-isopreno) como única fonte de carbono. Os cones têm apenas 13,2 – 20,1% de poliisopreno, dificultando o acesso inicial da bactéria ao polímero. Ocorrem modificações estruturais no polímero com produção de grupamentos OH/OOH, C=O e clivagem da C=C durante o contato dos materiais com a bactéria, mostrando que a bactéria age de forma efetiva na degradação do polímero. Ocorre aumento do teor de resíduo a 800 °C nos cones Odous® e Tanari®, refletindo diminuição de massa de material orgânico durante a degradação microbiana. Os ensaios de monitoramento de crescimento apontam o aumento periódico do número de células que ocorre devido ao consumo de matéria orgânica nos cones ou no poliisopreno *in natura*. A degradação do poliisopreno nos cones da marca Tanari® é ligeiramente superior à dos cones da marca Odous®, mostrando, dessa forma, a importância do ZnO na composição desses materiais, já que trata-se do único constituinte com atividade bactericida nos cones, como também os cones da marca Odous® têm maior quantidade desse constituinte em sua composição do que os cones da marca Tanari®.

7 – PERSPECTIVAS FUTURAS

Pretende-se avaliar a possibilidade de degradação dos cones por sistemas contendo outros microorganismos assim como pretende-se avaliar a influência do aquecimento desses materiais no processo de biodegradação, já que os mesmos são submetidos à diferentes técnicas de obturação durante o preenchimento dos canais radiculares. Pretende-se analisar a degradação dos cones mediante outros ensaios de biodegradação, como também através de outras técnicas de caracterização de materiais. Pretende-se testar novas formulações de cones de guta-percha na busca de uma composição em que o poli (1,4-*trans*-isopreno) sofra a menor degradação possível, tanto microbiológica quanto por fatores como aquecimento e técnica de obturação empregada.

8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADIB, V., SPRATT, D., GULABIVALA, K. *International Endodontic Journal*, 37 (2004) 542-551.
- ALAM, T. M., CELINA, M., ASSINK, R. A., CLOUGH, R. L., GILLEN, K. T., WHEELER, D. R. *Macromolecules*, 33 (2000) 1173-1181.
- ARJUNAN, V., SUBRAMANIAN, S., MOHAN, S. *Acta Spectrochim Part A*, (2001).
- BACCAN, N.; ANDRADE, J. C.; GODINHO, O. E. S.; BARONE, J. S., Química analítica quantitativa elementar; Editora Edgard Blücher, 3^a edição, Campinas (2001).
- BARBOSA, L. C. A., Espectroscopia no infravermelho na caracterização de compostos orgânicos; Editora UFV, Viçosa (2007).
- BAUER, A. W.; KIRBY, W. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M., *American Journal Clinical Pathology*, 45 (1966) 493-496.
- BAUMGARTNER, G.; ZEHNDER, M.; PAQUÉ, F., *Journal of Endodontics*, 33 (2007) 45-47.
- BODE, H.; KERKHOFF, D.; JENDROSSEK, D., *Biomacromolecules*, 2 (2001) 295-306.
- BOTELHO, T. B., Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, (2006). Dissertação de Mestrado.
- BRADY, J. E.; HUMISTON, G. E., Química Geral; Editora LTC, 2^a edição, Rio de Janeiro (1987).
- BUCKLER, E. J., *Canadian Journal of Chemical Engineering*, 62 (1984) 11-13.
- CHALMERS, J. M.; MEIER, R. J., Comprehensive analytical chemistry: molecular characterization and analysis of polymers; Editora Elsevier, Amsterdam (2008).
- DE DEUS, Q.D., Endodontia; Editora Medsi, 5^a edição, Rio de Janeiro (1992).
- EBERT, J.; ROGGENDORF, M. J.; FRANK, K.; PETSCHELT, A., *International Endodontic Journal*, 41 (2007) 249-257.
- FAGUNDES, F. S.; LEONARDI, D. P.; HARAGUSHIKU, G. A.; BARATTO-FILHO, F.; TOMAZINHO, L. F.; TOMAZINHO, P. H., *Revista Sul-Brasileira de Odontologia*, 2 (2005) 7-11.
- FIGDOR, D. GULABIVALA, K., *Endodontic Topics*, 18 (2011) 62-77.
- FRANKLIN, R. T.; ROBERT, J. L.; NORMAN, W.; FRANK, K.; DAVID, H. P.; YIU-FAI, M.; CHING-NGOR, S. L.; RAKESH, R.; CHAD, W., *Journal of Endodontics*, 31 (2005) 514-519.

- FRIEDMAN, C. M.; SANDRIK, J. L.; HEUER, M. A.; RAPP, G. W., *Journal Dentistry Resource*, 54 (1975) 921-925.
- GEORGE, S.; BASRANI, B.; KISHEN, A., *Journal of Endodontics*, 36 (2010) 1241-1244.
- GOLUB, M. A.; ROSENBERG, M. L.; GEMMER, R. V., Applications of Polymer Spectroscopy; Editora Elsevier, Nova Iorque (1978).
- GEORGE, S.; KISHEN, A.; SONG, P., *Journal of Endodontics*, 31 (2005) 867-872.
- GOODMAN, A.; SCHILDER, H.; ALDRICH, W., *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*, 37 (1974) 954-961.
- GRISA, A. M.; SIMIONI, T.; CARDOSO, V.; ZENI, M.; BRANDALISE, R. N., *Polímeros*, 21 (2011) 210-216.
- GURGEL-FILHO E. D.; FEITOSA J. P. A.; TEIXEIRA F. B.; DE PAULA R. C. M.; SILVA-JR. J. B. A.; SOUZA-FILHO F. J., *International Endodontic Journal*, 36 (2003) 302-307.
- HAUMAN, C. H. J.; LOVE, R. M., *International Endodontic Journal*, 36 (2003) 75-85.
- HOLDEMAN, L. V.; CATO, E. P.; MOORE, W. E. C., Anaerobe laboratory manual; Editora Blaksburg, 4^a edição, Virginia (1977).
- INGLE, J. I.; BAKLAND, L. K., Endodontics; Editora Willians e Wilkins, 4^a edição, Baltimore (1994).
- JENDROSSEK, D.; TOMASI, G.; KROPPENSTTEDT, R. M., *Microbiology Letters*, 150 (1997) 179-188.
- KOTZ, J. C.; TREICHEL-JR, P. M., Química geral e reações químicas; Editora Pioneira Thonsom Learning, 5^a edição, São Paulo (2005).
- KRISHNA, R. R.; KOODALI, R. T.; MANNA A. C., *Langmuir*, 27 (2011) 4020-4028.
- LEONARDO, M. R., Endodontia. Tratamento de canais radiculares: princípios técnicos e biológicos; Editora Artes Médicas (2005).
- LEONARDO, M. R.; LEAL, J. M., Endodontia: Tratamento de canais radiculares; Editora Pan-americana, 2^a edição, São Paulo (1991).
- LINOS, A., STEINBUCHEL, A., *Kautschuk und Gummi, Kunststoffe*, 51 (1998) 496-499.
- LINS, C. C. S. A.; LIMA, G. A.; TRAVASSOS, R. M. C., *International Journal Dentistry*, 9 (2010) 215-219.
- LIPOVSKY, A.; NITZAN, Y.; GENDANKEN, A.; LUBART, R., *Nanotechnology*, 22 (2011) 101-105.

LIU, H.; WEI, X.; LING, J.; WANG, W.; HUANG, X., *Journal of Endodontics*, 36 (2010) 630-635.

LOPES, H. P.; SIQUEIRA-JR, J. F., Endodontia: Biologia e Técnica; Editora Medsi, Rio de Janeiro (1999).

LOPES, H. P.; SIQUEIRA-JR, J. F.; ELIAS, C. N., *Journal of Endodontics*, 26 (2000) 418-420.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J., Microbiologia; Editora Pearson Education do Brasil, 10^a edição, São Paulo (2004).

MANIGLIA-FERREIRA, C.; SILVA-JR, J. B. A.; DE PAULA, R. C. M.; FEITOSA, J. P. A.; ZAIA, A. A.; FERRAZ, C. C. R.; SOUZA-FILHO, F. J., *International Endodontic Journal*, 40 (2007) 25-30.

MORTERA, P.; ESPARIZ, M.; SUÁREZ, C.; REPIZO, G.; DEUTSCHER, J.; ALARCÓN, S.; BLANCATO, V.; MAGNI, C., *Applied and Environmental Microbiology*, 78 (2012) 1936-1945.

MUÑOZ, H. R.; SARAIVA-LEMUS, G. A.; FLORIÁN, W. E.; LAINFIESTA, J. F., *Journal of Endodontics*, 33 (2007) 673-675.

MUYANJA, C. M. B. K.; NARVHUS, J. A.; TREIMO, J.; LANGSRUD, T., *International Journal of Food Microbiology*, 80 (2003) 201-210.

OGUNTEBI, B.R., *International Endodontic Journal*, 27, (1994) 218-222.

PARADELLA, T. C.; KOGA-ITO, C. Y.; JORGE, A. O. C., *Revista de Odontologia da UNESP*, 36 (2007) 163-168.

PAVIA, D. L., LAMPMAN, G. M., KRIZ, G. S. Introduction to Spectroscopy: A Guide for Students of Organic Chemistry; Editora Saunders College, Flórida (1996).

PELCZAR-JR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R., Microbiologia: Conceitos e Aplicações; Pearson Education do Brasil, São Paulo, 2^a Edição (1997).

RIBEIRO, I. L. S.; LIMA, G. A., *Revista do Conselho Regional de Odontologia de Pernambuco*, 1 (1998) 1-7.

RICHARDSON, W. S.; SACHER, A., *Journal of Polymer Science*, 10 (1953) 353-370.

RÔÇAS, I. N.; SIQUEIRA-JR, J. F.; SANTOS, K. R. N., *Journal of Endodontics*, 30 (2004) 315-320.

RODRIGUES, F. H. A.; FEITOSA, J. P. A.; RICARDO, N. M. P. S.; FRANÇA, F. C. F.; CARIOCA, J. O. B., *Journal Brazilian Chemistry Society*, 17 (2006) 265-271.

ROSE, K.; STEINBÜCHEL, A., *Applied and Environmental Microbiology*, 71 (2005) 2803-2812.

SATO, S.; HONDA, Y.; KUWAHARA, M.; WATANABE, T., *Biomacromolecules*, 4 (2003) 321-329.

SILVA, J. C. A.; COSTA, R. F., *Pesquisa Brasileira de Odontopediatria Clínica Integrada*, 4 (2004) 171-177.

BOTELHO T. B., Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, (2006). Dissertação de Mestrado.

SILVA-Jr, J. B. A., Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, (2007). Tese de Doutorado.

SILVA-JR., J. B. A.; DE PAULA, R. C. M.; FEITOSA, J. P. A.; GURGEL-FILHO, E. D.; FERREIRA, C. M.; SOUZA-FILHO, F. J., *Journal Applied Polymer Science*, 100 (2006) 4082-4088.

SENGES, C.; WRBAS, K. T.; ALTENBERGER, M.; FOLLO, M.; SPITZMÜLLER, B.; WITTMER, A.; AL-AHMAD, A., *Journal of Endodontics*, 37 (2011) 1247-1252.

SENYEK, M. L., Isoprene polymers, Encyclopedia of Polymer Science and Engineering; Editora Mosby, St. Louis (1994).

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J., Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos; Editora LTC, 7^a edição, Rio de Janeiro (2007).

TAYEL, A. A.; EL-TRAS, W. F.; MOUSSA, S.; EL-BAZ, A. F.; MAHROUS, H.; SALEM, M. F.; BRIMER, L., *Journal of Food Safety*, 31 (2011) 211-218.

TORTORA, G.; FUNKE, B.; CASE, C., Microbiologia; Editora Artmed, 6^a edição, São Paulo (2003).

TRIOLA, M. F., Introdução à Estatística; Editora LTC, 10^a edição, Rio de Janeiro (2008).

TURK, B.T.; ATES, M.; SEN, B. H.; TURKEY, I., *Oral Medical Oral Pathology and Oral Radiology Endodontic*, 106 (2008) 457-462.

UCHA, H. L.; KAIWAR, A.; MEHTA, D., *International Journal of Contemporary Dentistry*, 1 (2010) 44-51.

VALOIS, C. R. A.; SILVA, L. P.; AZEVEDO, R.B., *Journal of Endodontics*, 31 (2005) 749-751.

WANG, L.; DONG, M.; ZHENG, J.; SONG, Q.; LI, J.; NIU, W., *Journal of Endodontics*, 37 (2011) 631-636.

WARNEKE, S.; ARENSKÖTTER, M.; TENBERGE, K. B.; STEINBÜCHEL, A., *Microbiology*, 153 (2007) 347-356.

WECKWERTH, P. H.; SIQUINELLI, N. B.; WECKWERTH, A. C.; VIVIAN, R. R.; DUARTE, M. A. H., *Dental Press Endodontics*, 1 (2011) 46-51.

WILLIANS, J. M.; TROPE, M.; CAPLAN, D. J.; SHUGARS, D. C., *Journal of Endodontics*, 32 (2006) 715-721.

XIONG, T.; GUAN, Q.; SONG, S.; HAO, M.; XIE, M., *Food Control*, 26 (2012) 178-181.

ZANG, J.; XUE, Z., *Polymer Testing*, 30 (2011) 753-759.

ZUOLO, M. L., Endodontia Para o Clínico Geral; Editora Artes Médicas, 10^a edição, São Paulo (1998).