

## POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE MEMBRANAS DE NANOCELULOSE BACTERIANA COM LIBERAÇÃO CONTROLADA DE OTOSPORIN PARA CAPEAMENTO PULPAR

PEDRO HENRIQUE SANTALIESTRA E SILVA<sup>1</sup>; JULIANA SILVA RIBEIRO DE  
ANDRADE<sup>2</sup>; ANDRESSA DA SILVA BARBOZA<sup>3</sup>; RAFAEL GUERRA LUND<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Pelotas – [pedrohss.ufpel@gmail.com](mailto:pedrohss.ufpel@gmail.com)

<sup>2</sup> Universidade Federal de Santa Catarina - [sribeirooj@gmail.com](mailto:sribeirooj@gmail.com)

<sup>3</sup> Universidade Federal de Santa Catarina - [d.andressabarboza@gmail.com](mailto:d.andressabarboza@gmail.com)

<sup>4</sup> Universidade Federal de Pelotas – [rafael.lund@gmail.com](mailto:rafael.lund@gmail.com)

### 1. INTRODUÇÃO

A cárie dentária é a doença infecciosa odontológica mais comum no mundo. A remoção excessiva do tecido cariado ou em casos severos de cárie, expondo a polpa dentária, é indicativo de capeamento pulpar, procedimento com o objetivo de proteger a polpa dentária e permitir sua recuperação (GARG; GARG, 2010). O surgimento de infecções decorrentes ao procedimento de reparo ou por conta da natureza complexa da microbiota oral combinada com as inúmeras mudanças de concentrações das várias substâncias presentes na saliva e em alimentos podem dificultar a regeneração tecidual, principalmente dos odontoblastos e recuperação do paciente (HIRAYMA et al., 2013).

Os materiais mais utilizados para o capeamento pulpar são o Hidróxido de Cálcio (Ca(OH)<sub>2</sub>) e o Agregado Trióxido Mineral (MTA), sendo que ambos são aplicados sobre a superfície da polpa dentária visando a formação de uma ponte de dentina, porém apresentam algumas limitações, como alto custo, difícil aplicação e grande solubilidade em água (HIRAYMA et al., 2013). Nesse cenário, surge a necessidade de desenvolver novos materiais com características bioativas que favoreçam a regeneração e manutenção da vitalidade pulpar, o controle de infecções e de inflamações (FUKS, 2008). Neste estudo, é avaliado apenas o potencial antimicrobiano de um novo biomaterial para capeamento pulpar.

A Celulose Bacteriana (BC) é um biopolímero produzido por bactérias e apresenta alto grau de pureza e de cristalinidade, boas propriedades químicas, físicas e biocompatibilidade (BLANCO PARTE et al., 2020). A BC têm sido alvo de pesquisas devido ao seu potencial para aplicações biomédicas, podendo ser funcionalizada com medicamentos e outras partículas (LIU et al., 2022). O CaCO<sub>3</sub> é um dos biominerais mais abundantes na natureza, é insolúvel em água, biocompatível e pode ser usado como material ósseo, promover a biomineralização, e ser utilizado como sistema de liberação de fármacos possibilitando seu uso na restauração e regeneração do complexo dentino-pulpar (SARASWATI et al., 2023). O Otosporin®, apresenta em sua composição dois antibacterianos – neomicina e polimixina B, ambos eficazes contra bactérias do tipo Gram-negativo – e um anti-inflamatório – hidrocortisona – é indicada para inflamações e infecções no ouvido (FARMOQUÍMICA S.A., 2004) comumente utilizado em endodontias em pulpectomias de polpa inflamada.

Logo, este trabalho busca desenvolver uma membrana de celulose bacteriana (MBC) funcionalizada com Carbonato de Cálcio (CaCO<sub>3</sub>) e o medicamento Otosporin®, que tenha propriedades de regeneração tecidual e ação antibacteriana.

## 2. METODOLOGIA

O inóculo de *Gluconacetobacter hansenii* (ATCC 23769) foi reativado a partir de uma alíquota armazenada a  $-80^{\circ}\text{C}$  em glicerol (20%) em 4mL de manitol, depois 100mL da solução foram plaqueados em meio manitol e incubado por 7 dias a  $26^{\circ}\text{C}$  (CESCA, 2016). Após este período, o inóculo foi suspenso em meio manitol utilizando uma mistura de 90% em volume do meio Manitol e 10% do novo inóculo (em volume) e essa mistura foi levada às placas de 96 poços.

Após o preenchimento de todos os poços (200 $\mu\text{l}$ /poço), as placas foram incubadas por 7 dias a  $26^{\circ}\text{C}$ . Após esse período, as MBC produzidas foram retiradas dos poços, e tratadas em uma solução de 0,1M de NaOH por 24h a  $50^{\circ}\text{C}$ , posteriormente, lavadas com água deionizada para a remoção de NaOH até se obter pH=7 e, por último, as membranas foram autoclavadas para a máxima limpeza e esterilização (ANTONIO et al., 2012).

Para a funcionalização das MBC com  $\text{CaCO}_3$ , elas foram imersas em um frasco contendo 3,2% (m/v) de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  a  $25^{\circ}\text{C}$  durante 20min e, posteriormente, uma solução contendo 3,2% (m/v) de  $\text{CaCl}_2$  1,25M em tampão de Gly-NaCl (pH = 10) foi vertida no frasco e agitada a 300rpm durante outros 20min, cada membrana foi lavada duas vezes com 2mL de água deionizada após o processo (BOSIO et al., 2014). Após a liofilização as membranas foram divididas em grupos experimentais e submersas em diferentes concentrações de Otosporin® gerando os grupos experimentais do estudo. Sete grupos de membranas foram utilizadas: um grupo controle; um apenas com  $\text{CaCO}_3$ ; e cinco com concentrações diferentes de Otosporin®, todas as MBC possuem a mesma concentração de  $\text{CaCO}_3$ . Os grupos estão detalhados na Tabela 1.

Tabela 1. Grupos experimentais

Grupos	Espécimes
G1	$\text{CaCO}_3$
G2	$\text{CaCO}_3$ + Otosporin® 10mg
G3	$\text{CaCO}_3$ + Otosporin® 5mg
G4	$\text{CaCO}_3$ + Otosporin® 2,5mg
G5	$\text{CaCO}_3$ + Otosporin® 1,25mg
G6	$\text{CaCO}_3$ + Otosporin® 0,625mg
G7	Controle positivo

Foram realizados dois ensaios para avaliar a atividade antimicrobiana: o teste de contato direto modificado (TCDm), realizado em triplicata, com 6 diluições e nos períodos de 1 e 24h a  $37^{\circ}\text{C}$ ; e o de difusão em ágar (DA) realizado em triplicata (n=3). No TCDm, foi utilizada a bactéria *S. mutans* e no DA, duas bactérias: *S. mutans*, *E. faecalis*; e um fungo *C. albicans*. Cada microrganismo foi cultivado de acordo com seu tempo de incubação e em meio de cultura específico. As amostras de MBC funcionalizadas possuem 6mm de diâmetro e 2mm de espessura e todas foram desinfetadas por irradiação UV antes da realização dos ensaios.

No ensaio TCDm, as amostras foram colocadas em poços de duas placas de 96 poços (n=6/grupo) e adicionados 20 $\mu\text{L}$  da suspensão de *S. mutans*. O controle bacteriano positivo foi plaqueado, poços sem MBC receberam também 20 $\mu\text{L}$  desta suspensão. As placas foram incubadas por 1 e 24 h a  $37^{\circ}\text{C}$ . Após a incubação, foram adicionados 180 $\mu\text{L}$  de meio de cultura em todos os poços e levada ao *Shaker* para homogeneização por 10min. Em seguida, foi retirado uma alíquota de 100 $\mu\text{L}$  de cada poço e colocados em eppendorfs contendo 900 $\mu\text{L}$  de solução salina. A

partir desta solução concentrada foi feita uma diluição seriada. Destas diluições, foram plaqueadas 20µL em meio de cultura ágar e, após 24h de incubação a 37°C, as contagens de colônias foram realizadas (CORREA et al., 2016).

Para o ensaio de DA, foram preparadas quatro placas de ágar com o meio adequado para cada microrganismo (total de 12 placas). As amostras correspondentes a cada grupo, foram colocadas nas placas e incubadas por 24h a 37°C. Após esse período, os halos de inibição foram mensurados utilizando um paquímetro (MARTINS et al., 2022).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No teste de contato direto modificado (Figura 1), a partir da contagem das UFC, observa-se que os grupos G1, G2, G3, G4, G5 e G6 não apresentaram nenhuma UFC após 24h de incubação, apenas o grupo G6 apresentou UFC após 1h de incubação, indicando que em menores concentrações, uma ação antibacteriana eficaz leva mais tempo para ocorrer. Deste modo, a ação antimicrobiana foi verificada em todos os grupos, inclusive no grupo G1, que havia apenas CaCO<sub>3</sub>, mostrando que, em associação aos bactericidas em baixas concentrações, pode apresentar resultados piores.

Figura 1. Gráfico dos resultados do teste de contato direto modificado para a bactéria *S. mutans*

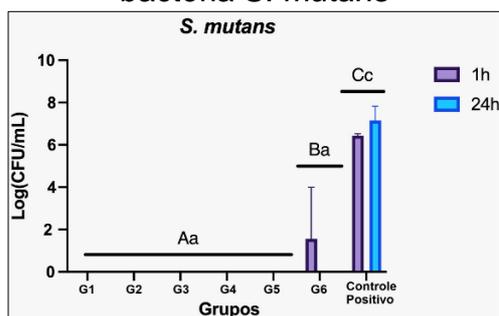


Figura 1. Teste de contato direto modificado (UFC/mL). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas (p=0,05) – maiúsculas: grupos; minúsculas: tempo.

O ensaio de DA (Tabela 2) apresentou halos de inibição para as duas bactérias, porém ao ser testado com o fungo *C. albicans*, não apresentou inibição, ou seja, o CaCO<sub>3</sub> e o Otosporin não possuem potencial fungicida, uma vez que o medicamento contém apenas antibacterianos. Segundo os diâmetros do halo obtidos, observa-se que quanto maior a concentração de Otosporin® maior é halo, sendo que o grupo G1 apresentou o melhor resultado, apesar de não conter o medicamento. É possível também observar que a ação antibacteriana é maior quando testado com *S. mutans* em relação ao *E. faecalis*.

Tabela 2. Média dos diâmetros de halos de inibição (mm) dos materiais testados pelo teste de difusão em ágar contra os microrganismos *S. mutans*, *E. faecalis* e *C. albicans* (n=3).

Grupos experimentais	Microorganismos testados		
	<i>S. mutans</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>C. albicans</i>
CaCO <sub>3</sub>	31,5±0,5 <sup>a</sup>	21,33±0,29 <sup>ab</sup>	-

<b>CaCO<sub>3</sub>+Otosporin 10mg</b>	28,67±0,58 <sup>a</sup>	17,83±0,29 <sup>b</sup>	-
<b>CaCO<sub>3</sub>+Otosporin 5mg</b>	26,17±0,76 <sup>a</sup>	15,0±1,0 <sup>b</sup>	-
<b>CaCO<sub>3</sub>+Otosporin 2,5mg</b>	24,67±0,58 <sup>a</sup>	12,5±0,5 <sup>b</sup>	-
<b>CaCO<sub>3</sub>+Otosporin 1,25mg</b>	23,33±0,58 <sup>a</sup>	9,83±0,29 <sup>b</sup>	-
<b>CaCO<sub>3</sub>+Otosporin 0,625mg</b>	10,5±0,5 <sup>b</sup>	-	-
<b>Controle positivo</b>	-	-	-

#### 4. CONCLUSÕES

A partir dos ensaios realizados podemos concluir que as membranas experimentais foram funcionalizadas com sucesso e que as mesmas apresentaram um potencial antimicrobiano satisfatório.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANTONIO, R. V et al. Produção de celulose bacteriana a partir de diferentes substratos. **Revista Técnico-Científica do IFSC**, p. 176-176, 2012.
- BLANCO-PARTE, F. et al. Current progress on the production, modification, and applications of bacterial cellulose. **Critical reviews in biotechnology**, v. 40, n. 3, p. 397-414, 2020.
- BOSIO, V. E. et al. Synthesis and characterization of CaCO<sub>3</sub>-biopolymers hybrid nanoporous microparticles for cancer damaged bone therapy. **Journal of Nanoparticles Research**, v. 132, p. 4833794, 2014.
- CESCA, K. **Sistema de liberação de fármaco desenvolvido em matriz de nanocelulose bacteriana para o tratamento da recidiva de câncer de mama**. Nov. 2016. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina.
- CORREA, C. F. et al. Antimicrobial activity from polymeric composites-based polydimethylsiloxane/TiO<sub>2</sub>/GO: evaluation of filler synthesis and surface morphology. **Polymer Bulletin**, v. 74, p. 2379-2390, 2017.
- DAS, M. et al. Composite scaffolds based on bacterial cellulose for wound dressing application. **ACS Applied Bio Materials**, v. 5, n. 8, p. 3722-3733, 2022.
- FUKS, Anna B. Vital pulp therapy with new materials for primary teeth: new directions and treatment perspectives. **Journal of endodontics**, v. 34, n. 7, p. S18-S24, 2008.
- GARG, N.; GARG, A. **Textbook of operative dentistry**. Nova Deli: Jaypee Brothers Medical Publishers, 2010.
- HIRAYAMA, S. et al. Effects of calcium carbonate on odontoblast differentiation and calcification ability of human dental pulp cells. **Journal of Oral Tissue Engineering**, v. 11, n. 2, p. 123-134, 2013.
- LIU, X. et al. Promoting osseointegration by in situ biosynthesis of metal ion-loaded bacterial cellulose coating on titanium surface. **Carbohydrate Polymers**, v. 297, p. 120022, 2022.
- OTOSPORIN®: Suspensão otológica. Responsável técnico: Dra. Márcia Weiss I. Campos. Rio de Janeiro: FARMOQUÍMICA S.A, 2024. 1 bula de remédio. 9p. Disponível em: <https://consultas.anvisa.gov.br/#/bulario/q/?nomeProduto=OTOSPORIN>. Acesso em: 10 set. 2023.
- SARASWATI, W. et al. CaCO<sub>3</sub> from Anadara granosa shell as reparative dentin inducer in odontoblast pulp cells: In-vivo study. **Journal of Oral Biology and Craniofacial Research**, v. 13, n. 2, p. 164-168, 2023.