

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ANA PAULA VILELA

DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO CLÍNICA DE GEL
CONTENDO NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS DE EUGENOL NA SENSIBILIDADE
DECORRENTE DO CLAREAMENTO DENTAL

PONTA GROSSA

2021

ANA PAULA VILELA

DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO CLÍNICA DE GEL
CONTENDO NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS DE EUGENOL NA SENSIBILIDADE
DECORRENTE DO CLAREAMENTO DENTAL

Tese apresentada para a obtenção do título de doutora
em Ciências Farmacêuticas na Universidade Estadual
de Ponta Grossa, área de Fármacos, Medicamentos e
Biociências aplicadas a Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Alessandro Dourado Loguercio
Coorientador: Prof. Dr. Paulo Vitor Farago

PONTA GROSSA
2021

V699 Vilela, Ana Paula
Desenvolvimento, caracterização e avaliação clínica de gel contendo nanocápsulas poliméricas de Eugenol na sensibilidade decorrente do clareamento dental / Ana Paula Vilela. Ponta Grossa, 2021.
105 f.

Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas - Área de Concentração: Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Alessandro Dourado Loguércio.
Coorientador: Prof. Dr. Paulo Vitor Farago.

1. Clareamento dental. 2. Dentinários. 3. Eudragit rs100. 4. Eugenol. 5. Nanotecnologia. I. Loguércio, Alessandro Dourado. II. Farago, Paulo Vitor. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia. IV.T.

CDD: 615.321

Ponta Grossa, 04 de agosto de 2021.

ATA DE EXAME DE DEFESA DE TESE DE DOUTORADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS -
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: FÁRMACOS, MEDICAMENTOS E BIOCÊNCIAS APLICADAS À
FARMÁCIA NÚMERO 10/2021 DA DOUTORANDA ANA PAULA VILELA REALIZADA NO DIA 04
DE AGOSTO DE 2021, NA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA.

Ao quarto dia de agosto de dois mil e vinte e um, às 13:15 horas, via videoconferência, na Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) em sessão pública sob a presidência do Professor Doutor Alessandro Dourado Loguercio reuniu-se a Banca Examinadora de exame de defesa de tese de Doutorado em Ciências Farmacêuticas da doutoranda Ana Paula Vilela, na linha de pesquisa: Desenvolvimento e Controle de Fármacos, Medicamentos e Correlatos, constituída pelo Professor Doutor Alessandro Dourado Loguercio (UEPG/PR) e demais Doutores (membros titulares): Márcia F. de Rezende Siqueira (FACPP/CE), Yasmine Mendes Pupo (UFPR/PR), Jessica Mendes Nadal (UEPG/PR) e Jane Manfron (UEPG/PR). Iniciados os trabalhos, a presidência deu conhecimento aos membros da banca e ao candidato das normas que regem o exame de defesa de tese de Doutorado e definiu-se a ordem a ser seguida pelos examinadores para arguição. O título do trabalho foi: "Desenvolvimento tecnológico, caracterização e avaliação clínica de nanocápsulas poliméricas contendo eugenol na sensibilidade decorrente do clareamento dental". Encerrada a defesa, a banca considerou APROVADA a tese, considerado como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas. A aluna deverá entregar, no prazo de até 30 dias, a versão definitiva da tese de Doutorado, com as modificações sugeridas pelos membros da banca examinadora. Nada mais havendo a ser tratado, lavrou-se a presente ata que vai assinada pelos membros da Banca Examinadora.

Observações (se necessário): _____

Alteração de título: sim não

Novo título: Desenvolvimento, caracterização e avaliação
clínica de gel contendo nanocápsulas poliméricas

de eugenol na sensibilidade
decorrente do clareamento dental.

Alessandro Dourado Loguercio I - (UEPG - PR) - Presidente

Márcia F. de Rezende Siqueira (FACPP/CE) -
Titular

Yasmine Mendes Pupo (UFPR/PR) - Titular

Jessica Mendes Nadal (UEPG/PR) - Titular

Jane Manfron (UEPG/PR) - Titular

Ponta Grossa, 30 de julho de 2021

AGRADECIMENTOS

A Deus por nunca me desamparar quando inúmeras vezes orei e pedi soluções em meio tantos problemas e Ele sempre me mostrou saídas.

Aos meus pais por confiarem em mim, desde os meus 14 anos quando fui morar sozinha em outra cidade para estudar, por resistirem a tantas dificuldades e sempre me encorajando que eu seria capaz de conseguir. Amo vocês incondicionalmente.

Ao meu cunhado Abraham e minha irmã Cristiana, por serem meus maiores incentivadores de iniciar mestrado e doutorado, por me apoiarem sempre, por exercer os papéis de pais em vida em todo o momento.

A minha irmã Valéria e todos os meus sobrinhos por me apoiarem e se orgulharem de mim a todo momento.

Ao meu esposo por compreender minha ausência em muitas situações e sempre acreditar que eu venceria.

Ao meu orientador Dr. Alessandro Dourado Loguércio quando no começo do doutorado expliquei minha situação dizendo que não poderia deixar de trabalhar e mesmo assim me aceitou e me fez acreditar que eu conseguiria.

Ao meu coorientador Dr. Paulo Vitor Farago, por ser minha base científica, por me socorrer em todas as vezes que precisei e por ser tão positivo e me encorajar dizendo sempre que iria dar certo.

Ao meu ex-orientador do mestrado Dr. Gilson Cesar Franco que não mediu esforço para me ajudar quando minha vontade foi de ingressar no doutorado, mesmo não fazendo parte do grupo de docentes deu sua avaliação positiva a meu respeito me endossando aos professores.

A todos os meus colegas do laboratório de pesquisa, mas principalmente ao Guilherme que me ajudou, me apoiou, me incentivou e que tenho certeza que se não fosse por ele não teria tido condições de realizar boa parte do experimento.

Aos demais colegas da Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Às minhas amigas Brunna e Rhayza pela amizade, disponibilidade e pelas oportunas manifestações de companheirismo, encorajamento e apoio.

Aos meus colegas de trabalho por me compreenderem minha ausência e me incentivarem sempre.

Aos funcionários e técnicos de laboratório que sempre me atenderam com muito respeito, pela ajuda no decorrer deste trabalho.

Ao CLABMU e CLABMU-SEBISA, e seus técnicos, pelo auxílio na realização das análises.

À coordenação do curso de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas.

E a todos aqueles que, de alguma maneira, direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, muito obrigada!

RESUMO

O clareamento dental é um dos procedimentos estéticos mais procurados na Odontologia. Apesar de ser uma técnica de fácil manuseio muitos pacientes não se adaptam com o uso de moldeira para realização de clareamento caseiro e optam pelo clareamento de consultório. Em contrapartida, este pode apresentar alto índice de sensibilidade dental (SD) devido a maior concentração do gel clareador e por esse motivo, alguns fármacos, de uso sistêmico e/ou tópico, foram testados, mas nenhum deles conseguiu eliminar a SD por completo. Neste sentido, o eugenol, fármaco que possui propriedades anti-inflamatórias e anestésicas nos fez acreditar que pode ser uma alternativa eficaz no tratamento da SD. Em contrapartida, o eugenol apresenta características de ser um fármaco volátil e de ação imediata, sendo necessário utilizar-se de uma tecnologia apropriada para a sua formulação. Diante do exposto, o trabalho objetivou desenvolver e avaliar nanocápsulas poliméricas contendo eugenol (NC-E) na SD a partir do polímero EUD RS100 e avaliar clinicamente a eficácia de um gel contendo as NC-E frente a sensibilidade dental. As nanocápsulas poliméricas foram desenvolvidas pelo método da deposição interfacial do polímero pré-formado. Os sistemas poliméricos foram caracterizados por meio de estudos morfológicos, espectroscópicos e térmicos. A estabilidade físico-química das formulações foi avaliada num período de 120 dias. O método analítico para a determinação do eugenol nas formulações foi validado conforme o preconizado na Agência Nacional de Vigilância Sanitária e *The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*. O gel de nanocápsulas foi desenvolvido e realizado a caracterização organoléptica, físico-química e análise reológica. As nanocápsulas poliméricas contendo eugenol (NC-E) e nanocápsulas controle sem eugenol (NC-C) foram preparadas com êxito pela técnica escolhida. As NC-E e NC-C apresentaram formato predominantemente esférico com uma superfície lisa e regular e tamanho médio de partícula de aproximadamente 125 nm, índice de polidispersão abaixo de 0,3 e potencial zeta inferior a +30 mV. Os espectros de Infravermelho com Transformada de Fourier asseguraram que o processo de nanoencapsulação não resultou em ligações químicas significativas entre o eugenol e o polímero. As NC-E e NC-C mantiveram-se estáveis até um período de 60 dias, onde alterações no potencial zeta começaram a modificar significativamente. As formulações apresentaram eficiência de encapsulação superior a 90%, sendo que o método analítico empregado se mostrou comprovadamente, linear para a faixa de aplicação proposta, preciso, exato e robusto, mostrando-se capaz de quantificar o eugenol nanoencapsulado nos sistemas poliméricos, fornecendo resultados confiáveis. O controle de qualidade do gel dessensibilizante contendo NC-E (gel de NC-E) manipulado para ser utilizado na clínica não apresentou diferenças significativas durante 90 dias de armazenamento. As análises de reologia demonstraram que o gel contendo NC-E possui uma menor viscosidade que o gel controle quando submetido a altas frequências de rotação. A administração do gel NC-E a 1% nos pacientes não apresentou resultados na redução do risco absoluto e na intensidade da SD e também não demonstrou alteração da cor.

Palavras-chaves: Clareamento dental. Dentinários. Eudragit RS100. Eugenol. Nanotecnologia. Sensibilidade da dentina.

ABSTRACT

Tooth whitening is one of the most sought-after cosmetic procedures in Dentistry. Despite being an easy-to-handle technique, many patients do not adapt to the use of a tray for at-home bleaching and opt for in-office bleaching. On the other hand, this may present a high index of sensitivity tooth (ST) due to the higher concentration of the whitening gel and for this reason, some drugs, for systemic and/or topical use, were tested, but none of them managed to eliminate ST completely. Given the above, the study aimed to develop and evaluate polymeric nanocapsules containing eugenol (NC-E) in DS from polymer EUD RS100 and clinically evaluate the effectiveness of a gel containing NC-E against tooth sensitivity. Polymeric nanocapsules were developed using the preformed polymer interfacial deposition method. Polymeric systems were characterized through morphological, spectroscopic and thermal studies. The physicochemical stability of the formulations was evaluated over a period of 120 days. The analytical method for the determination of eugenol in formulations was validated as recommended by the National Health Surveillance Agency and The International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. The nanocapsule gel was developed and organoleptic characterization performed, physicochemical and rheological analysis. Polymeric nanocapsules containing eugenol (NC-E) and control nanocapsules without eugenol (NC-C) were successfully prepared by the chosen technique. NC-E and NC-C were predominantly spherical in shape with a smooth and regular surface and mean particle size of approximately 125 nm, polydispersion index below 0.3 and zeta potential below +30 mV. Fourier Transform Infrared spectra ensured that the nanoencapsulation process did not result in significant chemical bonds between eugenol and the polymer. NC-E and NC-C remained stable up to a period of 60 days, when changes in zeta potential began to change significantly. The formulations presented encapsulation efficiency above 90%, and the analytical method used proved to be linear for the proposed application range, precise, accurate and robust, being able to quantify the nanoencapsulated eugenol in polymeric systems, providing results reliable. The quality control of the desensitizing gel containing NC-E (NC-E gel) manipulated for use in the clinic did not show significant differences during 90 days of storage. Rheology analyzes demonstrated that the gel containing NC-E has a lower viscosity than the control gel when subjected to high rotation frequencies. The administration of 1% NC-E gel in patients did not show results in reducing the absolute risk and intensity of DS and also did not show color change.

Keywords: Dentin sensitivity. Dentins. Eudragit RS100. Eugenol. Nanotechnology. Tooth whitening.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Estrutura dentária	18
FIGURA 2 – Estrutura química do eugenol	20
FIGURA 3 – Imagem ilustrativa do <i>Syzygium aromaticum</i> (cravo da Índia). (a) Ramo florido; (b) botão floral dessecado	21
FIGURA 4 – Comparação das variações de concentração de fármacos administrados por diferentes métodos: liberação controlada (linha verde) e terapia convencional (linha vermelha).....	25
FIGURA 5 – Diferentes tipos de nanopartículas.....	26
FIGURA 6 – Tipos biodegradáveis de nanopartículas de acordo com sua estrutura organizacional, classificadas em nanocápsula e nanoesfera	28
FIGURA 7 – Estrutura molecular do Eudragit® RS100	31
FIGURA 8 – Desenho experimental	37
FIGURA 9 – Ilustração esquemática do método de deposição interfacial do polímero pré-formado.....	38
FIGURA 10 – Gel clareador <i>Whiteness HP AutoMixx</i> (FGM).....	50
FIGURA 11 – Diário de Sensibilidade (NRS)	51
FIGURA 12 – Escala visual analógica (VAS)	52
FIGURA 13 – Tabela para avaliação de cor de acordo com a escala Vita e da escala Easyshade	53
FIGURA 14 – Escala de cor, Vita Classical (Vita Zahnfabrik, Bad Säckingen, Alemanha) (a), escala de cor Vita Bleachedguide 3D-MASTER (Vita Zahnfabrik, Bad Säckingen, Alemanha) (b) avaliação objetiva da cor foi realizada com o espectrofotômetro Vita Easyshade (Vita Zahnfabrik, Bad Säckingen, Alemanha) (c)	54
FIGURA 15 – Nanossuspensão obtida pelo método de deposição interfacial do polímero pré-formado	56
FIGURA 16 – Fotomicrografias das nanocápsulas poliméricas liofilizadas NC-C (a) e NC-E (b) por FEG-SEM, aumento de 5.000 a 32.800 Kx	59
FIGURA 17 – Espectros de FTIR do eugenol puro, do polímero Eudragit RS100, da lactose e das NC-C e NC-E. (2 cm^{-1} , 64 scans, pastilha com KBr)	61
FIGURA 18 – Curva de TG para a lactose	62

FIGURA 19 – Curva de TG para Eudragit RS 100	63
FIGURA 20 – Curvas de TG para NC-C e NC-E	64
FIGURA 21 – Cromatograma do eugenol	65
FIGURA 22 – Fragmentos do eugenol	66
FIGURA 23 – Representação gráfica da curva analítica padrão para a determinação do eugenol obtida por UHPLC na faixa de concentração de 2,4 a 240 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (n = 3).....	67
FIGURA 24 – Valores de pH nos tempos 0, 30, 60 e 90 dias	71
FIGURA 25 – Valores de tamanho nos tempos 0, 30, 60 e 90 dias	72
FIGURA 26 – Valores de IPD nos tempos 0, 30, 60 e 90 dias	73
FIGURA 27 – Valores de potencial zeta nos tempos 0, 30, 60 e 90 dias	74
FIGURA 28 – Análise reológica do gel contendo as nanocápsulas sem fármaco (NC-C) após o preparo (a), após 30 dias (b), após 60 dias (c) e após 90 dias de armazenamento (d).....	78
FIGURA 29 – Análise reológica do gel contendo as nanocápsulas contendo Eugenol (NC-E) após o preparo (a), após 30 dias (b), após 60 dias (c) e após 90 dias de armazenamento (d).	79
FIGURA 30 – Análise reológica do gel comercial utilizado na clínica.....	80
FIGURA 31 – Análise reológica do gel comercial e gel contendo as nanocápsulas sem fármaco (NC-C)	81
FIGURA 32 – Análise reológica do gel comercial e gel contendo as nanocápsulas contendo Eugenol (NC-E).	82
FIGURA 33 – Diagrama do fluxo do ensaio clínico, incluindo informações detalhadas sobre os pacientes.....	83

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Composição da formulação de nanocápsulas poliméricas contendo eugenol	38
TABELA 2 – Formulação do gel base (150 g)	44
TABELA 3 – Formulação para os géis testados na clínica.....	44
TABELA 4 – Valores de pH obtidos logo após o preparo das nanossuspensões	57
TABELA 5 – Valores obtidos de diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta para as NC-C e NC-E.....	57
TABELA 6 – Parâmetros utilizados para os cromatogramas.....	65
TABELA 7 – Dados obtidos através da regressão linear	67
TABELA 8 – Valores experimentais obtidos dos ensaios de repetibilidade e precisão intermediária	68
TABELA 9 – Valores experimentais obtidos no ensaio de exatidão	69
TABELA 10 – Parâmetros analisados	70
TABELA 11 – Resultados obtidos das características organolépticas do gel base e do gel de NC-E acondicionados em diferentes temperaturas.....	75
TABELA 12 – Valores de perda de peso do gel base e NC-E em diferentes lugares de armazenamento.....	76
TABELA 13 – Valores de pH do gel base e do gel de NC-E em diferentes lugares de armazenamento.....	77
TABELA 14 – Comparação do número de pacientes que apresentaram ou não sensibilidade entre os grupos.....	84
TABELA 15 – Médias dos valores de sensibilidade dental em diferentes tempos usando a escala NRS.....	84
TABELA 16 – Médias e desvio padrão da intensidade de DS em diferentes pontos de avaliação usando a escala VAS.....	84
TABELA 17 – Médias e desvio padrão de Δ SGU obtidos com VitaPan Classical, Vita Bleachedguide, Δ E, Δ E00 e Wld entre a linha de base e 2 semanas após o clareamento junto com o valor p e a diferença média (IC 95%).....	85

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	15
2.1	Objetivo Geral	15
2.2	Objetivos Específicos	15
3	REVISÃO DA LITERATURA	16
3.1	CLAREAMENTO DENTAL	16
3.2	EUGENOL	19
3.3	NANOTECNOLOGIA	23
3.4	NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS	26
3.5	EUDRAGIT RS100	30
3.6	SISTEMAS DE LIBERAÇÃO MODIFICADA CONTENDO EUGENOL NA ODONTOLOGIA	32
4	MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1	EQUIPAMENTOS	34
4.2	REAGENTES E SOLVENTES	34
4.2.1	Fármaco	34
4.2.2	Polímero	35
4.2.3	Água Purificada	35
4.2.4	Solventes e Demais Reagentes	35
4.2.5	Material	35
4.3	DESENHO EXPERIMENTAL	37
4.4	PREPARO DAS NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS CONTENDO EUGENOL	38
4.5	CARACTERIZAÇÃO DAS SUSPENSÕES DE NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS	39
4.5.1	Determinação do pH	39
4.5.2	Liofilização	39
4.5.3	Análise Morfológica e de Superfície	39

4.5.3.1	Determinação do diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta	39
4.5.3.2	Microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo	39
4.5.4	Análise Estrutural	40
4.5.4.1	Avaliação por espectroscopia na região do infravermelho	40
4.5.4.2	Análise térmica	40
4.6	AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO	40
4.6.1	Preparo das Soluções Padrão	41
4.6.2	Desenvolvimento e Validação do Método	41
4.6.3	Quantificação do Eugenol Encapsulado	43
4.7	ANÁLISE DE ESTABILIDADE	43
4.7.1	Determinação do Diâmetro Médio, Índice de Polidispersão e Potencial Zeta	43
4.8	PREPARO DO GEL CONTENDO NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS DE EUGENOL	44
4.9	CARACTERIZAÇÃO DO GEL CONTENDO NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS DE EUGENOL	44
4.9.1	Características Organolépticas	45
4.9.2	Aspectos Físico-Químicos	46
4.9.2.1	Determinação dos valores de pH	46
4.9.2.2	Determinação de perda de massa	47
4.9.2.3	Análise reológica	47
4.10	AVALIAÇÃO CLÍNICA DO GEL	47
4.10.1	CrITÉRIOS de Exclusão e Inclusão	48
4.10.2	Cálculo Amostral	49
4.10.3	Randomização e Cegamento	49
4.10.4	Técnica de Clareamento	49
4.10.5	Sensibilidade Dental	50
4.10.6	Avaliação da Cor	52
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	56

5.1	OBTENÇÃO DAS NANOCÁPSULAS CONTENDO EUGENOL.....	56
5.2	DETERMINAÇÃO DO pH.....	56
5.3	ANÁLISE MORFOLÓGICA E DE SUPERFÍCIE.....	57
5.3.1	Determinação do Diâmetro Médio, Índice de Polidispersão e Potencial Zeta Logo Após a Formulação	57
5.3.2	Microscopia Eletrônica de Varredura por Emissão de Campo	58
5.4	ANÁLISE ESTRUTURAL	60
5.4.1	Avaliação por Espectroscopia na Região do Infravermelho	60
5.4.3	Avaliação da Eficiência de Encapsulação	64
5.4.3.1	Desenvolvimento e validação do método analítico para quantificação do eugenol.....	64
5.4.3.2	Eficiência de encapsulação	70
5.5	ANÁLISE DE ESTABILIDADE.....	70
5.5.1	Determinação do pH, Diâmetro Médio, Índice de Polidispersão e Potencial Zeta nos Tempos: 0, 30, 60 e 90 Dias	70
5.6	CARACTERIZAÇÃO DO GEL CONTENDO NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS DE EUGENOL	74
5.6.1	Aspectos Físico-Químicos.....	75
5.6.1.1	Determinação da perda de peso	75
5.6.1.2	Determinação dos valores de pH	76
6	CONCLUSÕES	87
	REFERÊNCIAS.....	88
	ANEXO A - PARECER CONSUBSTANCIADO DE APROVAÇÃO DA PESQUISA	96
	ANEXO B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	100
	ANEXO C – FICHA CLÍNICA.....	103
	ANEXO D – ARTIGO 1 PUBLICADO NO JOURNAL OF ESTHETIC AND RESTORATIVE DENTISTRY	104
	ANEXO E – ARTIGO 2 ACEITO NO THE JOURNAL OF THE AMERICAN DENTAL ASSOCIATION	105

1 INTRODUÇÃO

O desejo por dentes mais brancos tornou o clareamento um dos procedimentos estéticos mais procurados na Odontologia. O tratamento é bastante satisfatório, conservador e seguro. Dentre as opções de técnicas existentes para a realização, a técnica de clareamento em consultório utilizando o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) numa concentração de 35% tem sido bastante solicitada pelos pacientes, já que a maioria não se adapta ao uso da moldeira utilizada no clareamento caseiro e desejam resultados mais rápidos (PAULA *et al.*, 2015).

Mesmo o clareamento de consultório sendo um procedimento seguro, ele apresenta alto índice de sensibilidade dental (SD) e por esse motivo, alguns fármacos, de uso sistêmico e/ou tópico, como anti-inflamatórios, corticóides e analgésicos são frequentemente testados no intuito de reduzir ou até eliminar esse efeito adverso. Apesar da facilidade de administração e a boa aceitação por parte dos pacientes os produtos para a redução da SD não têm apresentado resultados satisfatórios (PAULA *et al.*, 2014).

Tendo em vista a necessidade de encontrar um fármaco que auxilie durante o clareamento dental, minimizando o desconforto do paciente em relação à SD, o eugenol, fármaco já utilizado na prática clínica odontológica, parece ser uma alternativa ao tratamento da SD relacionada ao procedimento do clareamento em consultório. O eugenol possui propriedades anti-inflamatórias e anestésicas por mecanismos de bloqueio da liberação de mediadores e citocinas inflamatórias (MOURA; RABELLO; PEREIRA, 2013). Tal mecanismo nos faz acreditar que o eugenol possa ser um fármaco eficaz no tratamento da SD por reduzir citocinas envolvidas no processo da dor. Porém, o eugenol apresenta características como volatilidade e de ação imediata, sendo necessário utilizar-se de uma tecnologia apropriada para a sua formulação que garanta a eficácia terapêutica, liberação prolongada do fármaco, diminua a toxicidade e aumente o tempo de ação (NECKEL; LEMOS-SENNA, 2005).

Além disso, uma das tecnologias mais promissoras, a nanotecnologia farmacêutica, acaba sendo uma área interessante para melhorar a ação terapêutica de inúmeros ativos. Essa tecnologia refere-se à produção controlada de estruturas e

sistemas na escala nanométrica, ou seja, em um bilionésimo do metro (10^{-9} m), a partir da utilização de moléculas e materiais das mais diversas origens. Dentre os sistemas nanométricos que existem, as nanopartículas poliméricas são um dos mais estudados e esse sistema é aplicado à liberação controlada de fármacos e pode ser definido como estruturas sólidas, que apresentam tamanho entre 100 e 300 nm, e são compostas, principalmente, por polímeros biodegradáveis. As nanopartículas poliméricas podem ser divididas em nanocápsulas ou nanoesferas, que diferem entre si pela sua composição e organização estrutural (LAL *et al.*, 2010). O processo de nanoencapsulação fornece vantagens como: eficácia terapêutica, liberação prolongada do fármaco, diminuição da toxicidade e maior tempo de ação (NECKEL; LEMOS-SENN, 2005).

Nesse sentido, e após verificar na literatura a falta de dispositivos nanotecnológicos para encapsular o eugenol, o objetivo deste trabalho foi desenvolver uma estratégia baseada em nanocápsulas poliméricas contendo o eugenol para aplicação tópica, caracterizá-la por meio de métodos morfológicos, espectroscópicos e térmicos e testá-lo na prática clínica do clareamento dental, avaliando sua eficácia na sensibilidade gerada pelo clareamento realizado em consultório com H_2O_2 a 35% em diferentes períodos de avaliação.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Desenvolver e caracterizar uma forma farmacêutica para incorporação de nanocápsulas poliméricas contendo eugenol a 1%, e avaliar clinicamente a sua eficácia na sensibilidade decorrente do clareamento dental em consultório com H₂O₂ a 35%.

2.2 Objetivos Específicos

- Obter as nanocápsulas poliméricas contendo eugenol 1%, pelo método da deposição interfacial do polímero pré-formado;
- Promover a caracterização morfológica, espectroscópica e térmica das nanocápsulas;
- Quantificar a eficiência de encapsulação e estabelecer o perfil de liberação do eugenol nas nanocápsulas;
- Elaborar um gel contendo nanocápsulas poliméricas de eugenol 1% para ser aplicado imediatamente após o clareamento dental;
- Caracterizar o gel formulado por meio de análises organolépticas, físico-químicas e reológicas;
- Avaliar o efeito do eugenol nanoencapsulado na redução da intensidade da sensibilidade dental no clareamento em consultório com H₂O₂ a 35% por meio da escala Vita Classical e Vita Bleachedguide e do espectrofotômetro Vita Easyshade®;
- Avaliar o efeito do eugenol na eficácia do clareamento dental em consultório com H₂O₂ a 35% por meio das escalas Vita Classical e Vita Bleachedguide e do espectrofotômetro Vita Easyshade®.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 CLAREAMENTO DENTAL

O aumento da conscientização do paciente sobre a capacidade de melhorar o sorriso tem sido responsável pelo “boom” da Odontologia estética nos últimos anos (REZENDE *et al.*, 2016a). Apesar da técnica de clareamento ter sido descrita pela primeira vez em 1989 por Hoywood e Heymann (DARRIBA *et al.*, 2018) ela só ganhou espaço dentre os tratamentos estéticos mais procurados nos dias de hoje, já que atualmente as pessoas vêm vivenciando uma intensa pressão social em torno do “sorriso perfeito e branco” como padrão de beleza e também por melhorar a auto-estima das pessoas.

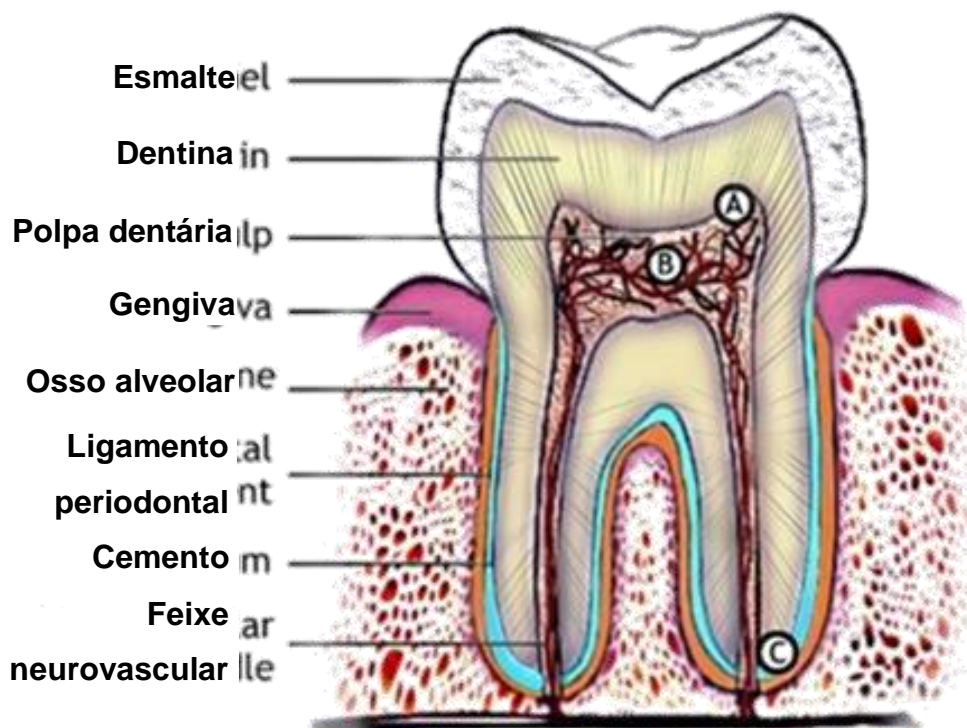
O clareamento dental é o procedimento estético responsável pela remoção de manchas extrínsecas e intrínsecas e o resultado é usualmente obtido pela ação de um forte agente de degradação (OLDOINI *et al.*, 2018). O procedimento pode ser realizado utilizando duas técnicas, o caseiro supervisionado pelo cirurgião dentista e o clareamento de consultório (REZENDE *et al.*, 2016b). Apesar do clareamento caseiro ser mais frequentemente recomendado, alguns pacientes não se adaptam ao uso das moldeiras ou não querem esperar por duas a três semanas para ver o resultado do tratamento, tornando o clareamento de consultório bastante solicitado, o qual em apenas duas ou três sessões pode atingir uma variação de até 8 unidades na escala de cor (REIS *et al.*, 2011).

O clareamento em consultório é usualmente realizado com o H_2O_2 , um radical livre derivado do oxigênio, termicamente instável que em concentrações altas tem o poder de oxidação dos cromógenos dentinários, reagindo com as moléculas pigmentadas dos tecidos duros do dente, quebrando-as em moléculas mais curtas e portanto, menos coloridas proporcionando o clareamento dental (OLDOINI *et al.*, 2018; BORTOLATTO *et al.*, 2014; REIS *et al.*, 2013). Embora o H_2O_2 seja conhecido como os radicais livres capazes de degradar moléculas orgânicas complexas responsáveis pela coloração do dente, tem sido relatado que seu baixo peso molecular os torna capazes de se difundir através do esmalte e da dentina atingindo o espaço pulpar podendo causar danos às células pulpares, especialmente aos odontoblastos subjacentes à dentina (COSTA *et al.*, 2014), por esse motivo tem sido

relatado que 67 a 100% dos pacientes submetidos ao clareamento de consultório se queixaram de SD (REZENDE *et al.*, 2019). Apesar de ser um procedimento seguro, o alto índice de SD leva alguns pacientes a abandonar o tratamento, acarretando em resultados menos satisfatórios (REZENDE *et al.*, 2016b).

Essa sensibilidade tem sua etiologia provavelmente relacionada à agressão do tecido pulpar devido a passagem do H₂O₂ através do esmalte, da dentina e da polpa, causando inflamação (COSTA *et al.*, 2014). A dor pulpar é uma consequência da resposta inflamatória, principalmente quando ocorre um dano tecidual, originando uma vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular que resulta na formação de edema, aumento da pressão interna, e conseqüentemente, a estimulação dos receptores da dor e redução do limiar dos nociceptores, tal mecanismo é descrito na literatura como a teoria hidrodinâmica (TEIXEIRA, 2004). Essa teoria afirma que as alterações ambientais, mecânicas, térmicas e químicas causam o movimento do fluido dentro dos túbulos dentinários, que estimulam os terminais das fibras nervosas pulpares localizadas dentro das paredes de entrada dos túbulos, induzindo assim dor aguda transitória. A teoria hidrodinâmica destaca o conceito de que vários estímulos diferentes podem evocar respostas semelhantes (LIU *et al.*, 2020). A Figura 1 representa o esquema da estrutura dentária humana.

FIGURA 1 – Estrutura dentária



Fonte: Adaptado de Baranova *et al.* (2020)

A SD varia muito de pessoa para pessoa e o profissional apenas consegue avaliá-la, após o relato e descrição realizado pelo paciente. A SD gerada pelo clareamento pode ser uma experiência desagradável que pode durar até 48 h (REIS *et al.*, 2011).

Em relação ao tratamento, existem duas vias comuns para tratar o dente com sensibilidade; passivo e ativo. O primeiro é pela abordagem não medicamentosa de infusão, em que os indivíduos com SD leve durante a realização do clareamento dental pode seguir esse protocolo, reduzindo o tempo de tratamento, alternando dias ou mesmo mantendo o tratamento até que a sensibilidade acabe. O tratamento ativo de sensibilidade envolve o uso de um agente dessensibilizante, e está mais preocupado com o gerenciamento da SD moderada a severa. Esses agentes agem através do túbulo dentinário de forma oclusiva e/ou neural (SHAH, 2017).

Em razão disto algumas estratégias têm sido utilizadas na intenção de minimizar a SD, dentre elas, a redução da concentração do H_2O_2 (CERQUEIRA *et al.*, 2013), redução da frequência e do tempo do uso do gel clareador (CARDOSO *et al.*,

2010), utilização de medicamentos de uso tópico como nitrato de potássio para diminuir a transmissão do impulso nervoso da dor (REIS *et al.*, 2011), o uso de glutaraldeído, nitrato de prata e cloreto de zinco para agregação proteica causada pela reação com as fibras de colágeno da dentina, levando a esclerose de túbulos dentinários (ALKAHTANI, 2016), a utilização de fluoretos com finalidade de diminuir a permeabilidade dentinária pela obstrução dos túbulos abertos (ARMÊNIO *et al.*, 2010), além de alguns medicamentos de uso sistêmico como Ibuprofeno – 400 mg (PAULA *et al.*, 2013a), e 600 mg (CHARAKORN *et al.*, 2009), etorocoxibe – 60 mg (PAULA *et al.*, 2013a), ácido ascórbico – 500 mg (PAULA *et al.*, 2014) e dexametasona (REZENDE *et al.*, 2016b). Porém, nenhuma dessas estratégias foram capazes de eliminar a intensidade da SD.

Devido ao fato de nenhuma das estratégias encontradas na literatura apresentarem resultados satisfatórios para a SD, a pesquisa na área continua na intenção de encontrar uma terapia ou tecnologia que alcance bons resultados tanto na intensidade como na duração da redução da SD.

3.2 EUGENOL

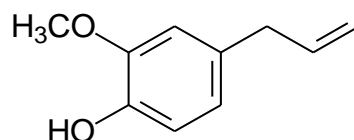
Os óleos essenciais têm sido usados há milhares de anos em várias culturas para fins medicinais. Eles são líquidos hidrofóbicos concentrados contendo compostos químicos voláteis (facilmente evaporados em temperatura ambiente) de plantas. Por causa de suas propriedades antidepressivas, estimulantes, desintoxicantes, antibacterianas, antivirais e calmantes, eles vêm ganhando popularidade como uma terapia natural, segura e econômica para uma série de problemas de saúde (HERMAN *et al.*, 2019; PERRICONE *et al.*, 2017).

Os óleos essenciais são líquidos oleosos aromáticos extraídos de diferentes partes das plantas, como por exemplo, folhas, cascas, sementes, flores e frutos. Eles podem ser obtidos por expressão, fermentação, enfloração, extração por vapor de água ou por CO₂ supercrítico, mas entre todos os métodos, a destilação a vapor de água e a hidrodestilação são amplamente utilizadas para a sua produção comercial. As plantas revelam-se um bom tipo de conjunto de substâncias produzidos pelas mesmas, empregados como proteção contra predadores e para atrair polinizadores.

Óleos e extratos vegetais têm sido usados para uma ampla variedade de propósitos por muitos milhares de anos (HERMAN *et al.*, 2019; PERRICONE *et al.*, 2017).

Dentre os inúmeros óleos essenciais, temos o eugenol (4-alil-2-metoxifenol) (Figura 2) que pode ser encontrado no tomilho (*Thymus vulgaris*, Lamiaceae), noz-moscada (*Myristica fragrans*, Myristicaceae), canela (*Cinnamomum verum*, Lauraceae) e manjeriço (*Ocimum basilicum*, Lamiaceae) porém sua principal fonte de extração é o cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*, Myrtaceae) (TSUCHIYA, 2017; GHOSH; MUKHERJEE; CHANDRASEKARAN, 2014; AHMAD *et al.*, 2018). O cravo da índia possui mais de 80% de eugenol na composição química do seu óleo essencial (HU *et al.*, 2016).

FIGURA 2 - Estrutura química do eugenol



Fonte: A autora

A espécie *Syzygium aromaticum* (Myrtaceae), popularmente conhecida como craveiro-da-índia, é uma árvore de grande porte, podendo atingir de 12 a 15 m de altura e o seu ciclo vegetativo pode alcançar mais de cem anos. No Brasil, praticamente apenas a Bahia, na região do Baixo Sul, produz esta especiaria na forma comercial. Essa região destaca-se como produtora de uma das especiarias mais comercializadas no mundo, o botão floral do craveiro-da-índia na forma desidratada, conhecido como cravo-da-índia (Figura 3) (OLIVEIRA *et al.*, 2009). Tanto o óleo essencial, como o composto isolado são usados como fragrância em indústrias de aromatizantes e na produção de cosméticos. Nas últimas décadas, houve muitos estudos farmacológicos sobre seus efeitos no sistema reprodutivo, imune, cardiovascular, gástrico, sistema nervoso central e urinário (PRAMOD; ANSARI; ALI, 2010).

FIGURA 3 - Imagem ilustrativa do *Syzygium aromaticum* (cravo da Índia). (a) Ramo florido; (b) botão floral dessecado



Fonte: (Cravo..., 2020)

O principal componente do óleo essencial de cravo é o eugenol, um composto fenólico líquido, incolor ou amarelo-claro (ESMAEILI *et al.*, 2016; PRAMOD; ANSARI; ALI, 2010). Diversas atividades farmacológicas foram relatadas para este composto, a exemplo de antimicrobiano, antifúngico, antiviral, antioxidante e antitumoral. Além disso, seus efeitos analgésico, anestésico e anti-inflamatório têm sido bem documentados na literatura (ESMAEILI *et al.*, 2016; DANIEL *et al.*, 2009; TSUCHIYA, 2017).

Estudos têm mostrado que o eugenol tem sido utilizado em diferentes áreas de forma segura, pois não apresenta efeitos cancerígenos ou mutagênicos, de acordo com o FDA (Food and Drug Administration) que aceita a ingestão diária de 2,5 mg/kg de eugenol por peso corpóreo em humanos (FDA, 2014).

A ação anti-inflamatória do eugenol, ocorre por ser capaz de bloquear através da inibição da biossíntese de lipoxigenase e acúmulo precoce de leucócitos, é capaz

também de bloquear a liberação de mediadores de inflamação dos quais incluem a interleucina-1 beta (IL-1 beta), fator de necrose tumoral-alfa (TNF-alfa) e prostaglandina E2 (MOURA; RABELLO; PEREIRA, 2013; PRAMOD; ANSARI; ALI, 2010). Estudos anteriores demonstraram que o eugenol tem propriedades anti-inflamatórias comparáveis com alguns AINEs, como o etodolaco e a indometacina (ESMAEILI et al., 2016). Dessa forma, sugere um potencial efeito anti-inflamatório em pulpites agudas e periodontites apicais por alterarem a capacidade de adesão dos macrófagos e modularem reações imunes e inflamatórias nas polpas dentárias e tecidos periapicais. Além disso, o eugenol inibe a atividade de P2X, um receptor de dor expresso no gânglio trigeminal, explicando sua ação analgésica (MOURA; RABELLO; PEREIRA, 2013; PRAMOD; ANSARI; ALI, 2010). Clinicamente esses efeitos são observados pela diminuição do quadro álgico em pacientes com dor de origem pulpar em casos considerados reversíveis (TRAVASSOS et al., 2011). O eugenol também possui atividade antibacteriana contra microrganismos Gram positivos e Gram negativos, inibindo as funções macrofágicas, modulando as reações inflamatórias imunes (PRAMOD et al., 2016).

O eugenol exibe uma excelente atividade antibacteriana contra uma ampla gama de microrganismos como *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* entre outros e também contra o patógeno gástrico humano *Helicobacter pylori* e o patógeno humano restrito *Salmonella typhi*. Devido à natureza hidrofóbica ele penetra através da bicamada fosfolipídica da membrana celular bacteriana e altera a estrutura da membrana (GHOSH; MUKHERJEE; CHANDRASEKARAN, 2014). O eugenol perturba a membrana bacteriana, alterando a permeabilidade da mesma seguida pelo vazamento de constituintes intracelulares e morte celular (GHOSH; MUKHERJEE; CHANDRASEKARAN, 2014).

A ação antinociceptiva do eugenol tem sido atribuído à sua capacidade de reduzir a ativação neuronal, inibindo os canais de sódio e cálcio voltagem-dependentes. A literatura relata que o eugenol reduziu a alodinia mecânica da lesão do nervo periférico pela inibição dos canais de nucleotídeos cíclicos (HCN) ativados pela hiperpolarização. Além disso, a modulação dos sistemas opióide, glutamatérgico

e purinérgico foi proposta como o mecanismo molecular subjacente ao analgésico (TRPV1) (CHUNG *et al.*, 2014).

O eugenol foi utilizado pela primeira vez na prática clínica odontológica na década de 1950, como anestésico geral (TSUCHIYA, 2017). Também foi utilizado como anestésico tópico para aliviar a dor decorrente de uma variedade de fontes, incluindo pulpites e hipersensibilidade dentinária (DANIEL *et al.*, 2009). E talvez a forma mais utilizada e conhecida seja o cimento de óxido de zinco e eugenol (OZE) que é amplamente utilizado na Odontologia pela fácil preparação na prática clínica, por exibir aceitáveis propriedades físicas e produzir respostas biológicas satisfatórias (TRAVASSOS *et al.*, 2011).

A toxicidade do eugenol já foi questionada em estudos anteriores, porém Esmaeili e colaboradores (2016), em um estudo avaliando formulações tópicas contendo diferentes concentrações de eugenol concluíram que em baixas concentrações possui efeitos analgésicos e anti-inflamatórios e em altas concentrações ocorre a produção de radicais livres que causam danos teciduais, acrescenta também que o eugenol foi aplicado com segurança topicamente até 5%, enquanto uma concentração de 8% pode causar irritação.

O eugenol é um fármaco versátil com inúmeras ações farmacológicas aplicáveis na clínica odontológica, porém por ser um fármaco volátil, oxidável e de ação imediata, o desenvolvimento de nanocápsulas para este fármaco seriam ideais para explorar os benefícios deste fitoquímico e assim melhorar a adesão do paciente e a eficácia terapêutica. A nanotecnologia fornece as vantagens de fácil manuseio, retenção de ingredientes voláteis, aumento da biodisponibilidade, estabilidade, proteção contra a oxidação e melhor solubilidade em água (PRAMOD *et al.*, 2016; AHMAD *et al.*, 2018; HU *et al.*, 2016).

3.3 NANOTECNOLOGIA

A nanotecnologia (NT) foi reconhecida como uma tecnologia essencial do século XXI. Devido às suas implicações e rápido desenvolvimento, a NT causou um grande impacto científico e econômico nas políticas de ciência e tecnologia (DIMER *et al.*, 2013; QI *et al.*, 2018). Vários governos priorizaram a NT em sua agenda nacional

para o desenvolvimento de ciência e tecnologia. Hoje, mais de 50.000 artigos de NT são publicados anualmente em todo o mundo. Nos últimos anos mais de 2.500 patentes foram registradas em grandes escritórios de patentes, como o European Patent Office (QI *et al.*, 2018).

O conceito de NT vem sendo aprimorado de acordo com os avanços da ciência, por isso ainda não há um conceito internacional consensual para o termo. Na área da saúde, a *European Medicines Agency* define a NT como o uso de pequenas estruturas menores de 1.000 nanômetros de diâmetro que são projetadas para apresentar propriedades específicas (DIMER *et al.*, 2013; KUMARI; YADAV; YADAV, 2010; HEERA; SHANMUGAM, 2015). A multidisciplinaridade é uma característica marcante da NT, pois ela abrange diversas áreas de atuação, como química, farmácia, biologia, física, medicina, engenharias, informática, fotografia, monitoramento ambiental, agricultura, ciência dos materiais, ciências forenses, indústrias automobilística, eletrônica e têxtil. (KUMARI; YADAV; YADAV, 2010).

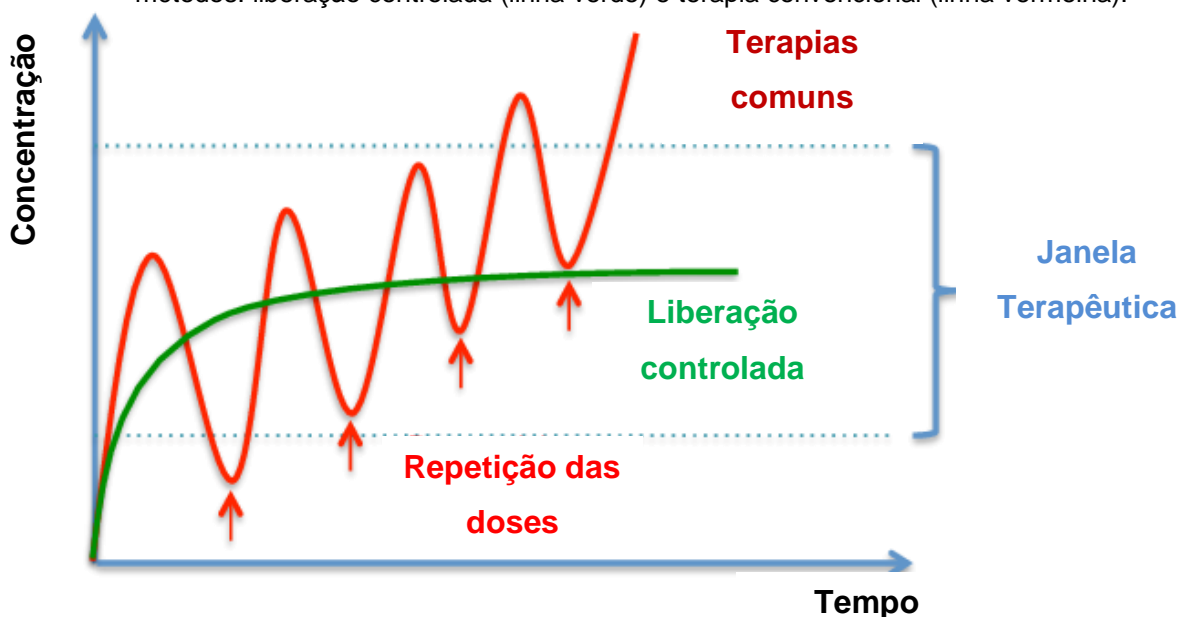
Particularmente nas áreas de NT farmacêutica e de nanomedicina, os esforços em pesquisa e desenvolvimento visam principalmente projetar os fármacos para oferecerem vantagens em relação aos seus homólogos, como: diminuição dos efeitos colaterais dos fármacos; o prolongamento do tempo de liberação do fármaco no organismo; direcionamento do princípio ativo ao sítio específico; aumento da eficácia terapêutica por meio da diminuição da dose necessária para que seja atingido o efeito esperado; melhora da biodisponibilidade e da solubilidade de fármacos insolúveis ou pouco solúveis em água; aumento da concentração do fármaco no tecido-alvo, entre outros benefícios (FARAJI; WIPF, 2009; DIMER *et al.*, 2013; CARTAXO, 2018).

Idealmente, os sistemas manométricos de liberação controlada têm por objetivo modular a liberação do fármaco na faixa terapêutica por tempo prolongado utilizando-se de dosagem única. Em terapias convencionais de administração, a concentração da droga na corrente sanguínea aumenta até atingir o nível máximo de dissolução (pico) e então declina, sendo requerida a administração de nova dose para manter os níveis de concentração, contudo elevadas concentrações acima da faixa terapêutica podem conduzir a toxicidade, enquanto concentrações subterapêuticas são

ineficazes e podem em alguns casos causar resistência ao fármaco (Figura 4) (CARTAXO, 2018; BIZERRA; SILVA, 2016).

A NT têm sido amplamente explorada como transportadores biodegradáveis devido às suas grandes vantagens sobre os sistemas convencionais, como: melhorar a solubilidade do fármaco aumentando a área de superfície, aumentar a estabilidade de agentes farmacêuticos, o uso de quantidades menores de medicamentos caros, aumento da biodisponibilidade do fármaco protegendo os contra degradações físico-químicas e / ou biológica se tratamento mais eficaz com efeitos colaterais mínimos (CARTAXO, 2018; SIQUEIRA *et al.*, 2019; HU *et al.*, 2016).

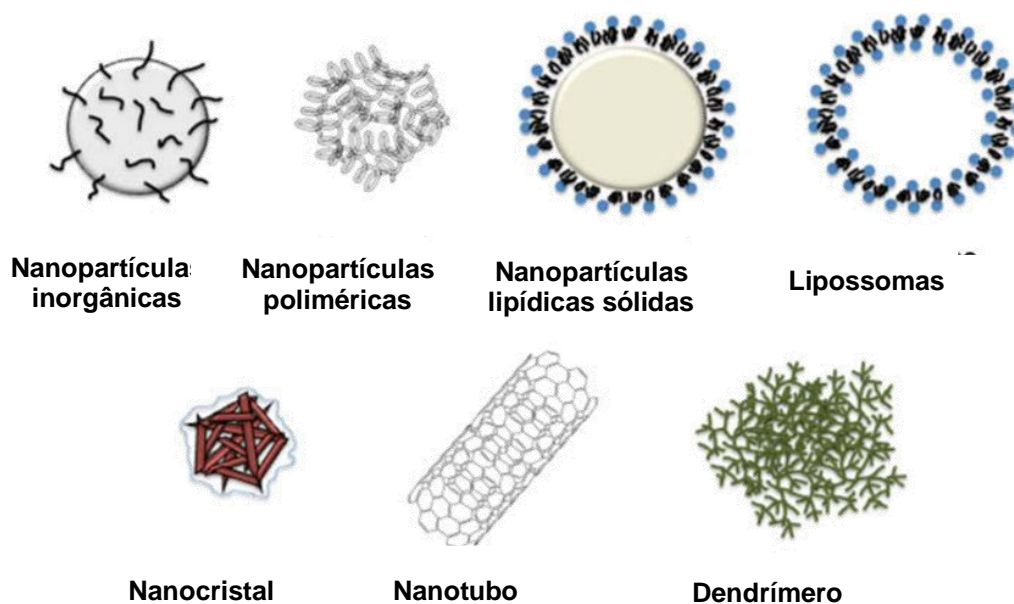
FIGURA 4 - Comparação das variações de concentração de fármacos administrados por diferentes métodos: liberação controlada (linha verde) e terapia convencional (linha vermelha).



Fonte: Adaptado de Cartaxo (2018)

Existem vários tipos de sistemas manométricos já descritos na literatura, os quais são divididos em dois principais grupos: nanopartículas orgânicas e inorgânicas. O primeiro grupo inclui micelas, dendrímeros, lipossomas, híbridos e NPPs poliméricas, o segundo grupo inclui fulerenos, pontos quânticos, NPPs de sílica e ouro (Figura 5) (CARTAXO, 2018; SIQUEIRA *et al.*, 2019; HU *et al.*, 2016; PRAMOD *et al.*, 2016; CHEN *et al.*, 2011).

FIGURA 5 - Diferentes tipos de nanopartículas



Fonte: Adaptado de Faraji e Wipf (2009)

3.4 NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS

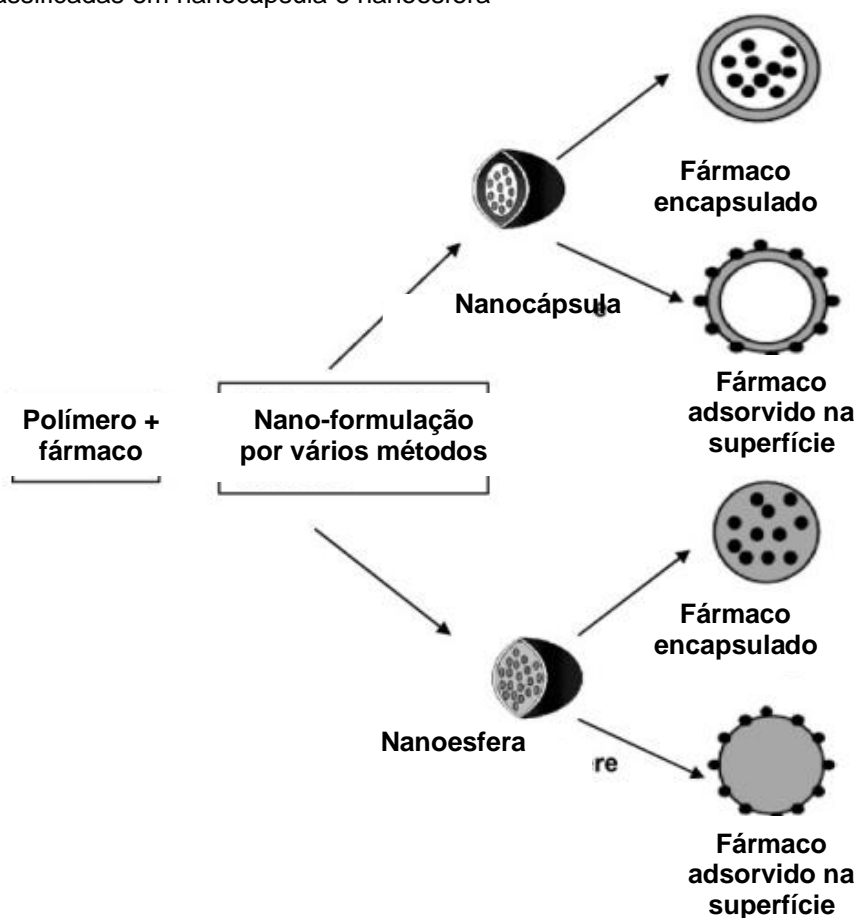
O campo de nanopartículas poliméricas (NPPs) está se expandindo rapidamente e desempenhando um papel importante em um amplo espectro de áreas que vão desde eletrônica, fotônica, materiais condutores, sensores, medicina, biotecnologia, controle de poluição a tecnologia ambiental (NAGAVARMA *et al.*, 2012). A literatura enfatiza as vantagens das nanopartículas sobre micropartículas e lipossomas, o tamanho de 10 a 1000nm das nanopartículas oferece uma série de vantagens distintas sobre as micropartículas (REIS *et al.*, 2006). Como por exemplo:

- Proteção do fármaco no sistema contra possíveis instabilidades no organismo, promovendo a manutenção de níveis plasmáticos numa concentração constante;
- Aumento da eficácia terapêutica;
- Liberação progressiva e controlada do fármaco mediante a resposta a estímulos do meio exterior (sensíveis a variação de pH ou de temperatura);
- Diminuição da toxicidade pela redução de picos plasmáticos de concentração máxima;

- Direcionamento de fármacos a alvos específicos (local, especificidade);
- Possibilidade de incorporar tanto substâncias hidrófilas como lipófilas;
- Diminuição da dose terapêutica e do número de administrações com consequente aumento da adesão do doente à terapêutica;
- Melhoria significativa em relação aos métodos tradicionais de administração oral e intravenosa em termos de eficiência e eficácia; proporciona uma concentração mais alta de agente farmacêutico no local desejado. (NAGAVARMA *et al.*, 2012; MARQUES; LOPES; SOUTO, 2009).

As NPPs são definidas como portadores sólidos de medicamentos que podem ou não ser biodegradáveis. O termo nanopartícula é um nome coletivo para nanocápsulas e nanoesferas. As nanocápsulas são constituídas por um invólucro polimérico e um núcleo oleoso, podendo o fármaco estar dissolvido neste núcleo e/ou adsorvido à parede polimérica. Já as nanoesferas são formadas por uma matriz polimérica e não apresentam óleo em sua composição. Neste sistema, o fármaco pode ficar retido ou absorvido (Figura 6). (REIS *et al.*, 2006; KUMARI; YADAV; YADAV, 2010; SCHAFFAZICK; POHLMANN, 2002; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; MARQUES; LOPES; SOUTO, 2009; SOUTO; DEVERINO; SANTANA, 2011; RAO; GECKELER, 2011).

FIGURA 6 - Tipos biodegradáveis de nanopartículas de acordo com sua estrutura organizacional, classificadas em nanocápsula e nanoesfera



Fonte: Adaptado de Kumari, Yadav e Yadav (2010)

As NPPs são altamente preferidas por serem veículos promissores no sistema de administração de medicamentos, elas transportam efetivamente drogas, proteínas e DNA para atingir células e órgãos, seu tamanho nanométrico promove permeação eficaz através das membranas celulares e estabilidade na corrente sanguínea. Além disso, as NPPs são não-tóxicas, não-trombogênicas, não-imunogênicas, não-inflamatórias, não ativam neutrófilos, são biodegradáveis e são aplicáveis a várias moléculas, como drogas, proteínas, peptídeos ou ácidos nucleicos (NAGAVARMA *et al.*, 2012; KUMARI; YADAV; YADAV, 2010).

Para o direcionamento do fármaco a um alvo específico, características como tamanho de partícula, carga de superfície, composição e presença de ligantes na superfície e hidrofobicidade, devem ser analisadas e determinadas para que se alcance a finalidade desejada. O tamanho da partícula é crucial para a interação com membranas celulares e para a penetração do fármaco através das barreiras

biológicas. Outra característica importante que se deve avaliar é a carga de superfície, para que se possa determinar se ocorre a agregação das NPPs quando na corrente circulatória, ou se acontece adesão ou interação com as membranas de células carregadas com cargas opostas (PASZKO *et al.*, 2011; KUMARI; YADAV; YADAV, 2010; FARAJI; WIPF, 2009).

Para a preparação dos sistemas poliméricos de transporte, pode recorrer-se ao uso de polímeros naturais ou sintéticos (biodegradáveis e não-biodegradáveis) (Quadro 1) (SEVERINO *et al.*, 2011b). A seleção do polímero a ser empregado está condicionada, a natureza do fármaco que se pretende incorporar no sistema (SEVERINO *et al.*, 2011a). Ao eleger o material a ser utilizado deve-se observar as características físico-químicas, como a viscosidade e a higroscopicidade. Outro fator é a natureza do fármaco, quando hidrofílica recorre-se, em geral, a polímeros de natureza apolar e a preparação do sistema deve proceder em meio não aquoso e quando se trata de fármacos hidrofóbicos deve selecionar um método de preparação em meio aquoso e, para isso, recorre-se, em geral, a polímeros de natureza hidrofílica (SEVERINO *et al.*, 2011a). Além disso, o polímero sintético deve ser biocompatível e ter capacidade de liberar completamente o solvente ou outros materiais utilizados durante o processo de encapsulação, além de não apresentar sabor desagradável no caso de consumo oral.

QUADRO 1 - Polímeros utilizados no sistema de liberação de fármacos

Classificação	Polímeros
Polímeros Naturais	
Polímeros a base de proteínas	Colágeno, albumina, gelatina
Polissacarídeos	Agarose, alginato, carragenina, ácido hialurônico, dextran, quitosana, ciclodextrina
Polímeros Sintéticos Biodegradáveis	
Poliésteres	Poli(ácido láctico), Poli(ácido glicólico), poli(hidroxibutirato), poli(ϵ -caprolactona), poli(ácido- β -málico), poli(dioxanonas)
Polianidridos	Poli(ácido sebácico), poli(ácido adípico), poli(ácido terftálico)
Poliâmidas	Poli(imino carbonatos), poliaminoácidos
Outros	Poli(ciano acrilatos), poliuretanos, éster poliorto, polidihidropirans, poliacetais
Polímeros sintéticos não degradáveis	
Derivados de celulose	Carboximetil celulose, etilcelulose, celulose acetato, celulose acetato propionato, hidroxipropil metilcelulose
Silicones	Polidimetilsiloxano, sílica coloidal
Polímeros acrílicos	Polimetacrilatos, poli(metilmetacrilato), poli hidro(etilmetacrilato)

Fonte: Adaptado de Bizerra e Silva (2016)

Os polímeros biodegradáveis apresentam numerosas vantagens sobre os não biodegradáveis, uma vez que não necessitam de remoção cirúrgica após o esgotamento do princípio ativo, podem fornecer um meio de liberação direta da substância à circulação sistêmica e o polímero e o princípio ativo podem ser combinados em várias formas (SEVERINO *et al.*, 2011a).

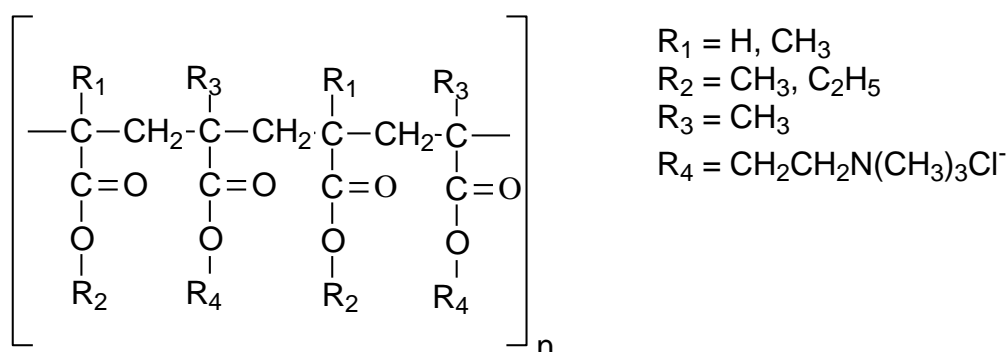
3.5 EUDRAGIT RS100

A linha de polímeros Eudragit surgiu do conhecimento do Dr. Rohm em 1933, posteriormente em 1954 foram lançados os Eudragit L e Eudragit S, em 1972 o Eudragit foi um marco importante, tornando o processo de revestimento mais fácil, seguro, versátil e econômico. Com o desenvolvimento de vários graus de Eudragit,

tornou-se possível lidar com muitos aspectos do desenvolvimento de formulações como revestimento de filme, granulação, compressão direta, extrusão por fusão e domínio de tecnologias para projetar liberação imediata ou sustentada, revestimento entérico, liberação controlada e formulações transdérmicas (PATRA *et al.*, 2017).

O Eudragit® RS100 (Figura 7) é um copolímero de poli (acrilato de etila, metilmetacrilato e metacrilato de clorotrimetil-amonioetil), contém 4,5 a 6,8% dos grupos de amônio quaternário. Estes grupos químicos fornecem carga superficial positiva ao polímero, o que o faz interagir com fármacos carregados negativamente ou a superfície celular dos tecidos alvos. Essa característica pode subsequentemente maximizar a captação celular do complexo fármaco-polímero e também ressaltam sua característica mucoadesiva (DALCIN; OURIQUE; GOMES, 2017; ADIBKIA *et al.*, 2011; PIGNATELLO *et al.*, 2001).

FIGURA 7 - Estrutura molecular do Eudragit® RS100



Fonte: A autora

Polímeros bioadesivos são materiais capazes de se ligarem a substratos biológicos de duas maneiras: aderindo à camada mucosa (mucoadesivos) ou à membrana celular (citoadesivos). A bioadesão é uma propriedade explorada como estratégia para aumentar o tempo de permanência de um medicamento no organismo. Em consequência, a biodisponibilidade dos fármacos pode ser melhorada e o número de doses tomadas, diariamente, pode ser reduzido. Outra vantagem é que a bioadesão pode ser modulada para ocorrer em sítios específicos, diminuindo a toxicidade e aumentando a efetividade terapêutica dos fármacos (VILLANOVA; ORÉFICE; CUNHA, 2010).

A adesão de nanocápsulas preparadas com Eudragit RS100® à mucosa é bem conhecida e descrita, melhorando o desempenho dos nanossistemas. A mucosa apresenta uma superfície negativa devido à presença de mucina, portanto o uso de nanocápsulas com carga positiva melhoram sua permeação (DALCIN; OURIQUE; GOMES, 2017). Nanocápsulas catiônicas produzidas com o Eudragit RS100® apresentam inúmeras vantagens como, mucoadesão e liberação sustentada do fármaco, bem como a melhoria das diferentes atividades biológicas que incluem analgésicos, antifúngicos, anti-inflamatórios, fotoproteção e outros efeitos (DALCIN; OURIQUE; GOMES, 2017).

O Eudragit RS100® é insolúvel em água e tem baixa permeabilidade, mas é permeável em fluidos digestivos, que foram desenvolvidos para controlar a liberação de medicamentos encapsulados. Seu uso está amplamente associado à produção de formulações orais e tópicas, e estudos anteriores relatam sua boa biocompatibilidade em diferentes aplicações, também é insolúvel em pH fisiológico, mas incha na água (ADIBKIA *et al.*, 2011; PIGNATELLO *et al.*, 2001).

3.6 SISTEMAS DE LIBERAÇÃO MODIFICADA CONTENDO EUGENOL NA ODONTOLOGIA

Atualmente, a nanotecnologia é usada para produzir muitos materiais odontológicos, incluindo resinas compostas restauradoras fotopolimerizáveis e seus sistemas de colagem, materiais de moldagem, cerâmicas, camadas de cobertura de implantes dentários e enxaguatórios bucais com flúor. Outras vantagens das nanopartículas, que têm chamado a atenção na Odontologia, são sua melhor penetração nos túbulos dentinários, propriedades antibacterianas profundas e diminuição da microinfiltração. Devido a estas propriedades favoráveis, a utilização de nanopartículas na produção de selantes endodônticos tornou-se o centro de interesse, recentemente (JAVIDI *et al.*, 2015). Segundo Javidi *et al.* (2015) estudos incorporaram nanopartículas de polietilenoimina quaternizada ou nanopartículas de quitosana em diferentes selantes e avaliaram sua biocompatibilidade, propriedades antibacterianas e físicoquímicas.

Pramod *et al.* (2016) em um estudo avaliando a perda óssea em ratos com periodontite induzida e tratados com eugenol nanoencapsulado, eugenol puro e placebo observou uma diferença significativa no grupo tratado com eugenol nanoencapsulado para os outros grupos, o grupo tratado com eugenol nanoencapsulado apresentou menor reabsorção óssea, concluída pelo autor que a nanoencapsulação do eugenol forneceu características como liberação lenta que favoreceram o tratamento da periodontite.

Hu *et al.* (2016), avaliando a eficácia antimicrobiana de nanoemulsão contendo eugenol colocada sobre diferentes cepas de bactérias pode concluir que o grupo tratado com nanoemulsão de eugenol obteve uma diferença significativa quando comparado aos outros grupos, sugerindo ser um potencial antimicrobiano.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 EQUIPAMENTOS

- Balança analítica (CELTAC, modelo FA2104N, São Paulo, Brasil);
- Centrífuga (Hermle Z326K, Wehingen, Alemanha);
- Destilador de água (FANEM LTDA, modelo 724/2-A, São Paulo, Brasil);
- Equipamento DSC/TG (STA 6000, Perkin Elmer, Waltham, MA, Estados Unidos);
- Espectrômetro infravermelho com transformada de Fourier (SHIMADZU, modelo IR Prestige-21, Quioto, Japão);
- Evaporador rotatório (FISATOM, modelo 801, Diadema, Brasil);
- Liofilizador (LIOTOP, L202, São Paulo, Brasil);
- Metalizador (SHIMADZU, modelo IC-50 Ion Coater, Quioto, Japão);
- Microscópio eletrônico de varredura por emissão de campo (TESCAN, modelo Mira 3, Brno, República Tcheca);
- Potenciômetro hidrogeniônico digital (HANNA, HI 2221, São Paulo, Brasil);
- Placa de agitação e aquecimento (FISATOM, modelo Q261-22, Diadema, Brasil);
- Reômetro DRH-2 (TA Instruments, New Castle, DE, EUA)
- Ultrafreezer (REVCO, modelo ULT-2186-3-D37, Carolina do Norte, Estados Unidos);
- Zetasizer Nanoseries (Malvern Instruments, NANO ZS 90, Malvern Reino Unido).

4.2 REAGENTES E SOLVENTES

4.2.1 Fármaco

- Eugenol ($\geq 99\%$ de pureza, Sigma-Aldrich, MO, EUA).

4.2.2 Polímero

- Eudragit® RS 100 (Mw 150.000 g.mol⁻¹, Röhm, Darmstadt, Alemanha).

4.2.3 Água Purificada

- Água purificada pelo processo de destilação (H₂O destilada), em equipamento tipo Pilsen (Fanem LTDA, modelo 724/2-A, São Paulo, Brasil);
- Água ultrapurificada pelo sistema de ultrapurificação em equipamento Milli-Q (Merck, Integral 5, Darmstadt, Alemanha).

4.2.4 Solventes e Demais Reagentes

- Acetonitrila grau HPLC (Hexis Científica, Phillipsburg, Estados Unidos);
- Acetona ((CH₃)₂CO) (Synth, Diadema, Brasil);
- Ácido Fórmico (CH₂O₂) (Biotec Produtos Químicos, São José dos Pinhais, Brasil);
- Brometo de potássio grau espectroscópico (KBr) (Aldrich Co., St. Louis, Estados Unidos);
- Lactose Mono-Hidratada PA (Biotec Produtos Químicos, São José dos Pinhais, Brasil);
- Metanol (CH₃OH) grau HPLC (Hexis Científica, Phillipsburg, Estados Unidos);
- Monooleato de sorbitano etoxilado 20 (polissorbato 80, Tween® 80, Delaware, Porto Alegre, Brasil);
- Monooleato de sorbitano (Span 80®, OXITENO, Mauá, São Paulo);
- Triglicerídeos dos ácidos cáprico /caprílico (FOCUS QUÍMICA, São Paulo, Brasil).

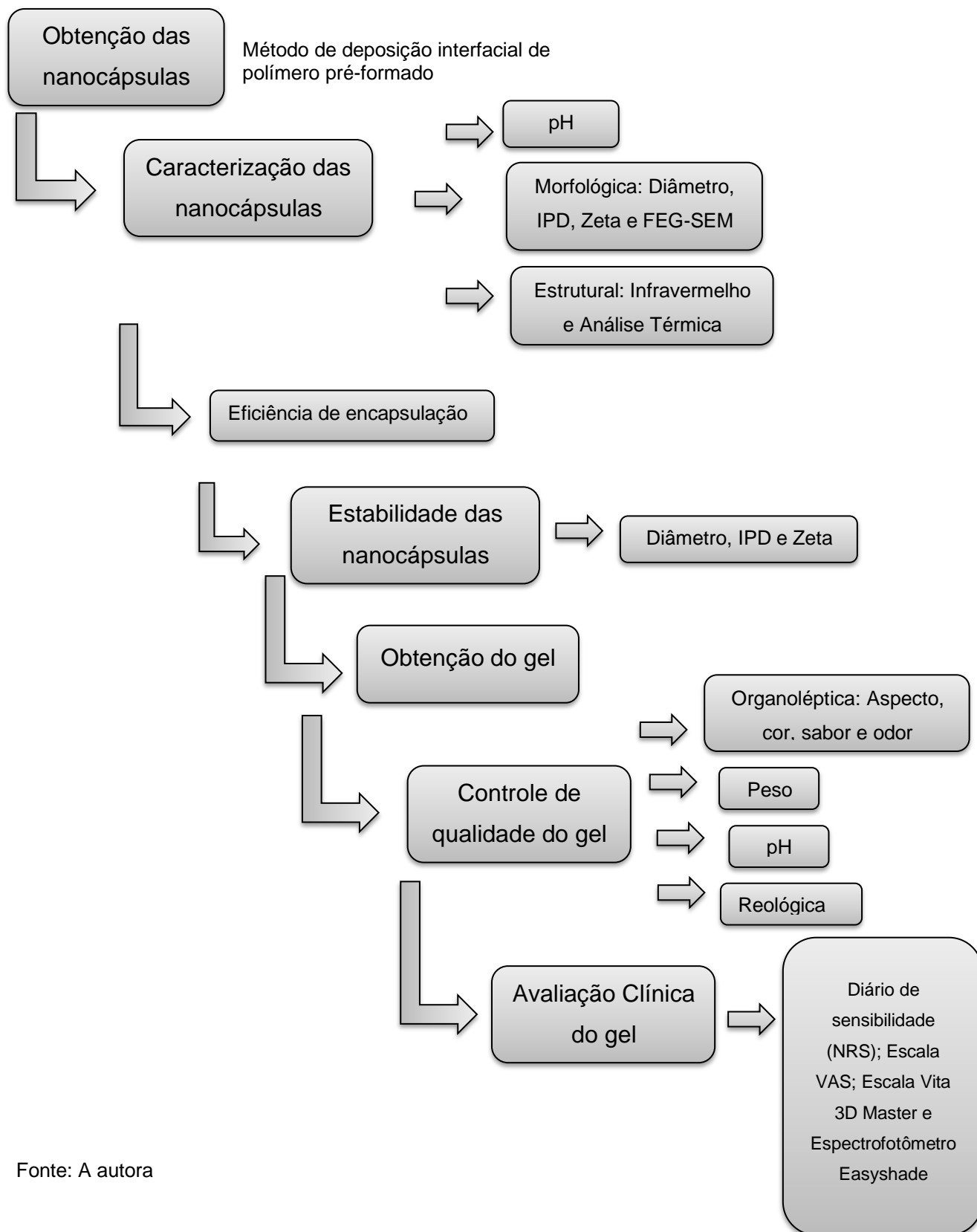
4.2.5 Material

- Amicon® Ultra – 0,5 mL, dispositivo de ultrafiltração com membrana de celulose regenerada 10000 Da, Tullagreen, Carrigtwohill, Irlanda;

- Chromafil® Xtra PTFE-20/13, filtro hidrofílico, 0,20 μm de abertura dos poros, Macherey-Nagel, Düren, Alemanha.

4.3 DESENHO EXPERIMENTAL

FIGURA 8 – Desenho experimental

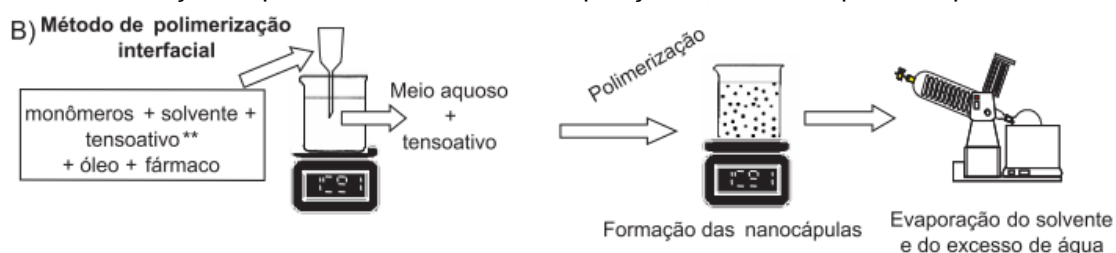


Fonte: A autora

4.4 PREPARO DAS NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS CONTENDO EUGENOL

As nanocápsulas poliméricas foram preparadas pelo método da deposição interfacial de polímero pré-formado (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). De forma resumida o polímero Eudragit® RS 100 (0,100 g) foi solvatado em acetona (27 mL) na presença de Span80® (0,0770 g), eugenol (0,150 g) e triglicerídeos de cadeia média (TGCM) (0,150 g) sob agitação mecânica a 40 °C até completa dissolução, em seguida, a fase orgânica foi vertida lentamente sobre a fase aquosa (53 mL), contendo Tween 80® (0,0770 g) através de uma bureta na forma de gotejamento e após o término a mistura foi mantida sob agitação magnética a 40 °C, durante 10 minutos (Tabela 1). O solvente orgânico foi então eliminado através da evaporação em um rotaevaporador (Quimis, São Paulo, Brasil) até o volume final de 10 mL (1,5 mg/mL) (Figura 9).

FIGURA 9 - Ilustração esquemática do método de deposição interfacial do polímero pré-formado



Fonte: Schaffazick et al. (2003, p. 727)

TABELA 1 - Composição da formulação de nanocápsulas poliméricas contendo eugenol

COMPOSIÇÃO	FORMULAÇÃO	
	NC-E	NC-C
Fase Orgânica		
Span 80® (g)	0,077	0,077
TCM (g)	0,150	0,300
Eudragit® RS100 (g)	0,100	0,100
Eugenol® (g)	0,150	0
Acetona (mL)	27	27
Fase Aquosa		
Tween 80® (g)	0,077	0,077
Água purificada (mL)	53	53

Fonte: A autora

4.5 CARACTERIZAÇÃO DAS SUSPENSÕES DE NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS

4.5.1 Determinação do pH

A determinação do pH foi realizada em um potenciômetro digital previamente calibrado com soluções tampão pH 4,0 e 7,0, diretamente nas suspensões coloidais, após a preparação. Os resultados obtidos representam a média de três amostras diferentes.

4.5.2 Liofilização

Para realizar a caracterização por alguns métodos, fez-se necessário a liofilização das nanocápsulas poliméricas contendo Eugenol. Para isso 1 g de lactose (LAC) monohidratada foi dispersa na nanossuspensão sob agitação magnética. Em seguida, a suspensão foi congelada em ultrafreezer (REVCO, modelo ULT-2186-3-D37, Carolina do Norte, Estados Unidos) a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 horas e liofilizada em liofilizador (LIOTOP, L202, São Paulo, Brasil) por 48 horas, até total remoção da água.

4.5.3 Análise Morfológica e de Superfície

4.5.3.1 Determinação do diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta

O tamanho médio de partícula, o índice de polidispersidade (IPD) (distribuição do tamanho de partícula) e potencial zeta foram medidos ($n = 3$) por Espectroscopia de Correlação de Fótons (*PCS*) de acordo com o Dispersão Dinâmica de Luz (*DLS*) após a diluição de uma alíquota da suspensão de nanocápsulas em água ultrapurificada (1:500) (Zetasizer Nanoseries, Malvern Instruments, Reino Unido). Para verificar a diferença estatística entre os diâmetros médios, foi realizado teste ANOVA 1 via entre os valores da média dos resultados.

4.5.3.2 Microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo

A avaliação morfológica e da superfície das nanocápsulas foram realizadas usando a Microscopia Eletrônica de Varredura por Emissão de Campo (*FEG-SEM*)

(TESCAN, modelo Mira 3, Brno, República Tcheca). As amostras foram submetidas à metalização com ouro em um metalizador IC-50 Ion Coater (SHIMADZU, Quioto, Japão), e depositadas sobre um *stub* polido. Para obtenção das eletromicrografias, foi empregada voltagem de aceleração de 8 a 10 kV com aumento de 20 a 200 Kx utilizado *software* específico (*Electron Optical Design*).

4.5.4 Análise Estrutural

4.5.4.1 Avaliação por espectroscopia na região do infravermelho

As nanocápsulas poliméricas foram analisadas por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (*FTIR*), utilizando pastilhas de brometo de potássio (KBr), empregando 4 mg de cada amostra e 196 mg de KBr grau espectroscópico (2%, m/m), no equipamento IR Prestige-21 (SHIMADZU, Quioto, Japão), na faixa de 4000-400 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} e 32 scan.min^{-1} . Os espectros obtidos foram avaliados frente aos espectros do fármaco puro, polímero e formulação sem a adição do eugenol.

4.5.4.2 Análise térmica

A estabilidade térmica das amostras foi estudada por meio das curvas de Termogravimetria (*TG*), que foram obtidas na faixa de temperatura entre 20 à 600°C. Para isso, foi empregada uma termobalança modelo TGA-50 (Shimadzu), sob razão dinâmica de nitrogênio (50 mL.min^{-1}), empregando uma razão de aquecimento de 10°C. min^{-1} , em microcadinho cilíndrico de alumina contendo aproximadamente $5 \pm 0,1$ mg da amostra. O equipamento foi previamente calibrado com índio (In; P.F = 156,6 °C; $\Delta H_{\text{fusão}} = 28,54 \text{ J.g}^{-1}$).

4.6 AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO

A concentração do eugenol encapsulado nas NCPs (mg.mL^{-1}) foi determinado através de ensaios de quantificação desenvolvidos no equipamento de cromatografia líquida de ultra eficiência (UHPLC Acquity Waters HClass) equipado com autoinjeter

refrigerado (Sample Manager FTN) e bomba quaternária (Quaternary Solvent Manager) para obtenção dos cromatogramas. A análise de espectrometria de massas foi feita em um equipamento Xevo TQD (Waters) triplo-quadrupolo equipado com uma fonte de ionização eletrospray usando os seguintes parâmetros: temperatura de desolvatação, 400 °C; fluxo do gás de desolvatação, 60 L/h; fluxo do gás do cone, 35 L/h; capilaridade, 3,7 kV; modo de operação, positivo; cone, 35 V, energia de colisão de 68V. Todas as operações foram realizadas pelo programa MassLynx (Waters).

4.6.1 Preparo das Soluções Padrão

A solução padrão de eugenol foi preparada em acetonitrila: água, a 500,0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Diluições foram realizadas com objetivo de obter soluções com concentração entre 2,4 - 240,0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, onde a concentração de 30,0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ foi definida como 100%. Antes de serem injetadas no cromatógrafo, as soluções foram filtradas em filtro de politetrafluoretileno (PTFE, Cromafil® Xtra, 0,2 μm x 13 mm, Macherey-Nagel GNBH & Co. KG, Düren, Alemanha).

4.6.2 Desenvolvimento e Validação do Método

Para obter a melhor condição para a corrida cromatográfica, foi realizado um experimento em gradiente exploratório, variando a concentração de acetonitrila de 5 a 100% em 20 minutos. Após isso, as condições cromatográficas foram otimizadas para se obter melhor resolução do pico para o eugenol. Uma amostra contendo os polímeros foi injetada como controle negativo.

A validação do método analítico por UPLC-MS/MS foi realizada segundo os critérios propostos pela *The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use* (ICH, 2005) e pela Resolução da Diretoria Colegiada, RDC nº 166 de 24 de julho de 2017 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, ANVISA (BRASIL, 2017). Foram avaliados os seguintes parâmetros: linearidade, limites de detecção e de quantificação, precisão, exatidão e robustez.

A linearidade do método foi avaliada por regressão linear usando o método dos mínimos quadrados, pela média dos pontos de três curvas analíticas autênticas, nas concentrações de: 2,4, 4, 12, 24, 48, 72, 96, 192 e 240 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. A inclinação e outros parâmetros das curvas analíticas foram calculados por regressão linear e análise de variância (ANOVA). Avaliação de cada ponto foi realizada em triplicata. A análise de resíduos foi realizada com o auxílio do *software* Statistica 8.0 (STATSOFT).

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram obtidos experimentalmente injetando soluções com concentrações menores a faixa de trabalho.

A repetibilidade foi avaliada por meio da análise de três concentrações diferentes (12,8, 48 e 192 ng.mL^{-1}), totalizando nove determinações em diferentes períodos de um mesmo dia (manhã, tarde e noite), pelo mesmo analista, utilizando um mesmo instrumento. A precisão intermediária foi determinada pela análise nas mesmas concentrações utilizadas para a repetibilidade, porém as medidas foram realizadas em dias diferentes, com analistas diferentes, ainda empregando o mesmo instrumento. Os resultados destas análises foram expressos na forma de Desvio Padrão Relativo (DPR), de acordo com a equação 1 abaixo, onde DP é o desvio padrão da série de medições e CMD a concentração média determinada.

$$DPR=(DP/CMD)X 100 \quad (1)$$

A exatidão foi determinada aplicando o método proposto na análise da amostra, na qual quantidade conhecida do fármaco foi adicionada à solução do produto terminado. As concentrações utilizadas foram as mesmas para calcular a precisão. O resultado foi expresso em % de recuperação do analito (equação 2).

$$\% \text{ Exatidão} = \frac{(CAF-CA)x100}{CTA} \quad (2)$$

Na Equação 2, temos:

- CAF: concentração experimental da amostra fortificada;
- CA: concentração experimental da amostra não fortificada;
- CTA: concentração teórica adicionada.

A robustez foi avaliada nas amostras a 30,0 µg.mL⁻¹, por variações na taxa de fluxo para 0,33 mL.min⁻¹, a concentração da fase móvel acetonitrila e água acidificada com ácido fórmico 82:18 (V/V) e temperatura do forno para 25 °C. Os resultados foram analisados utilizando o CV comparando com os valores obtidos para a condição padrão.

4.6.3 Quantificação do Eugenol Encapsulado

Considerando os resultados obtidos no desenvolvimento e validação do método, a eficiência de encapsulação (EE) foi calculada a partir da diferença entre a massa do fármaco inicialmente adicionado em cada formulação e a massa presente nas formulações (NADAL *et al.*, 2015) conforme a equação 3.

$$EE (\%) = \left(\frac{\text{Concentração teórica} - \text{Concentração obtida}}{\text{Concentração teórica}} \right) \times 100 \quad (3)$$

A EE (%) foi determinada por método indireto, quantificando a concentração de fármaco não encapsulado. Assim sendo, 500 µL da nanossuspensão foram submetidas a ultrafiltração/centrifugação usando um dispositivo (Amicon® 10.000 Mw, Milipore) a 6000 rcf por 30 minutos. O eugenol livre foi determinado no ultrafiltrado.

4.7 ANÁLISE DE ESTABILIDADE

4.7.1 Determinação do Diâmetro Médio, Índice de Polidispersão e Potencial Zeta

As suspensões de NC-C e NC-E foram armazenadas em geladeira e protegidas da luz em frasco âmbar. O tamanho médio de partícula, o índice de polidispersidade (IPD) (distribuição do tamanho de partícula) e potencial zeta foram medidos (n=3) nos tempos de 0, 30, 60 e 90 dias. Todos os dados resultantes da estabilidade foram avaliados pelo programa GraphPad Prism, versão 6.01 para Windows. Os dados foram expressos como média ± desvio padrão. A ANOVA com pós-teste de Tukey, seguido de teste t de *Student* foi usada para comparações estatísticas, com nível de significância de 5% ($\alpha = 0,05$).

4.8 PREPARO DO GEL CONTENDO NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS DE EUGENOL

Foi preparado um gel base de natrosol (9 g), nipagin (0,15 g), propilenoglicol (7,5 g) e água destilada (133,35 mL), a mistura foi aquecida até que ela ficasse viscosa (Tabela 2). Para o gel de nanocápsulas foi pesado 33,3 g do gel base e acrescentado 66,7 mL da nanossuspensão, para o gel de eugenol puro a 1% foi pesado 33,3 g do gel base, acrescentado 1 g de óleo de eugenol e 65,7 mL de água destilada e para o gel controle foi pesado 33,3 g de gel base e acrescentado 66,7 mL de água destilada (Tabela 3), todos os géis foram homogeneizados no aparelho speed mix, para evitar a destruição das nanocápsulas, a 3500 rpm divididos em quatro seções de 2 minutos. Após a formulação pronta, o valor de pH medido ficou entre $6,0 \pm 6,5$. Então o gel foi embalado em seringas odontológicas para ser utilizado posteriormente no estudo clínico.

TABELA 2 - Formulação do gel base (150 g)

Composição	Quantidades
Natrosol (g)	9
Nipagin (g)	0,15
Propilenoglicol (g)	7,5
Água (mL)	133,35

Fonte: A autora

TABELA 3 - Formulação para os géis testados na clínica

Composição	Gel de nanocápsulas de eugenol	Gel controle
Gel base (g)	33,3	33,3
Nanosuspensão	66,7	0
Água destilada	0	66,7

Fonte: A autora

4.9 CARACTERIZAÇÃO DO GEL CONTENDO NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS DE EUGENOL

Após a etapa de manipulação dos géis, procedeu-se ao controle de qualidade dos dois géis deste estudo: um gel experimental contendo as nanocápsulas de eugenol chamado de gel NC-E e o gel controle sem fármaco chamado de gel base.

Todos os testes foram realizados em ambiente climatizado, com temperatura variando de 20° C e 25° C, além disso, o operador utilizou luvas descartáveis a fim de evitar qualquer contaminação. Os géis foram pesados (15 g) e acondicionados em frascos plásticos transparente e armazenados em temperatura ambiente, estufa e geladeira. Os testes foram realizados nos tempos 0, 30, 60 e 90 dias.

4.9.1 Características Organolépticas

Com o objetivo de verificar alterações como separação de fases, precipitação e turvação, possibilitando o reconhecimento primário do produto (BRASIL, 2007). As características organolépticas dos géis (NC-E e gel base) foram observadas durante 90 dias em diferentes temperaturas, tendo como parâmetro de comparação as características obtidas imediatamente após a manipulação dos géis dessensibilizantes experimentais.

Parâmetros avaliados:

- *Aspecto*

Observou-se visualmente alterações quanto à: separação de fases, precipitação e turvação. A amostra foi classificada segundo os seguintes critérios:

- normal, sem alteração;
- levemente separado, levemente precipitado ou levemente turvo;
- separado, precipitado ou turvo.
-

- *Cor*

Observou-se por meio visual, através de luz branca alterações relacionadas a cor, comparadas com as amostras no tempo 0. A amostra do produto foi classificada segundo os seguintes critérios:

- normal, sem alteração;
- levemente modificada;
- modificada;
- intensamente modificada.

- *Odor*

Avaliou-se diretamente através do olfato alterações relacionadas ao odor, comparadas com as amostras no tempo 0. A amostra foi classificada segundo os seguintes critérios:

- normal, sem alteração;
- levemente modificada;
- modificada;
- intensamente modificada.

- *Sabor*

Verificou-se qualquer alteração relacionada ao sabor comparadas com as amostras no tempo 0. A amostra foi classificada segundo os seguintes critérios:

- normal, sem alteração;
- levemente modificada;
- modificada;
- intensamente modificada.

4.9.2 Aspectos Físico-Químicos

Ensaio físico-químico são operações técnicas que consistem em determinar uma ou mais características de um produto, processo ou serviço, de acordo com um procedimento especificado. Estas avaliações permitem ao formulador detectar futuros problemas que podem afetar a estabilidade e a qualidade de seu produto (BRASIL, 2007).

4.9.2.1 Determinação dos valores de pH

Os valores de pH dos géis experimentais foram obtidos com um potenciômetro digital (DMPH-2) previamente calibrado, conforme descrito nos métodos gerais da Farmacopeia Brasileira 4ª edição (Comissão Permanente de Revisão da Farmacopeia Brasileira 1988). Cada verificação foi feita em triplicata nos tempos 0, 30, 60 e 90 dias), visando obter maior precisão dos resultados.

4.9.2.2 Determinação de perda de massa

Os valores de perda de massa foram verificados utilizando uma balança de precisão (CELTAC, modelo FA2104N, São Paulo, Brasil) as verificações foram feitas em triplicata e as alterações comparadas com tempo 0.

4.9.2.3 Análise reológica

As análises oscilatórias das formulações foram feitas em reômetro DRH-2 (TA Instruments, New Castle, DE, EUA) do Complexo de Laboratórios Multiusuários (C-LABMU) da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG). A geometria de eleição foi a de placas paralelas com as configurações de 40 mm de diâmetro com medidas com 1mm de gap. Os experimentos oscilatórios de varredura de frequência de 0,1 a 100 hz em uma temperatura de 37 °C e amplitude de deformação de 2%. Os procedimentos foram calibrados através do *software* TRIOS® (TA Instruments, New Castle, DE, EUA), utilizando a faixa de temperatura de 15-60°C com taxa de aquecimento de 5°C/min, conduzidos a uma taxa de estresse/tensão constante de 1%, para garantir que todas as formulações fossem testadas dentro de sua faixa viscoelástica linear, e varredura de frequência de 0,1-20 Hz. Após a configuração dos parâmetros, amostras de cada formulação foram cuidadosamente posicionadas no centro da placa inferior "*peltier plate*", aplicou-se o "*trim gap*", para remoção dos excessos em torno na geometria, e em seguida "*zero gap*" para o início dos experimentos. Os valores do módulo elástico ou de armazenamento (G' em Pa), viscoso ou de perda (G'' em Pa), viscosidade dinâmica (Γ' em Pa.s) e tangente de defasagem (δ) foram obtidos ao longo do teste por meio do *software*.

4.10 AVALIAÇÃO CLÍNICA DO GEL

O estudo primeiramente passou pela aprovação da comissão de ética em pesquisa da Universidade Estadual de Ponta Grossa, por meio do parecer nº 2.971.337 (Anexo A) e após foi registrado no Registro Brasileiro de Ensaios Clínicos (ReBEC), sob o nº RBR-23CH2P. O estudo clínico foi realizado nas clínicas de

Odontologia da Universidade Estadual de Ponta Grossa, durante o período de fevereiro e março de 2020.

Foram selecionados 56 voluntários que procuraram atendimento nas clínicas odontológicas da Universidade e que se enquadraram nos critérios de inclusão e exclusão do estudo. Após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo B).

4.10.1 Critérios de Exclusão e Inclusão

Os pacientes incluídos neste estudo enquadraram nos seguintes requisitos:

- Idade maior de 18 anos;
- Boa saúde bucal e geral,
- Possuía os dentes livres de lesão cariosa e de doença periodontal
- Não possuía prótese;
- Não possuía restaurações nos dentes anteriores;
- Não realizou clareamento anterior;
- Coloração dos caninos superiores fossem classificados como cor A2 ou de maior valor, por comparação com a escala Vitapan Classical (Vita Zahnfabrik, Bad Säckingen, Alemanha).

A avaliação de cor através da escala Vitapan Classical foi realizada por dois pesquisadores cegos e calibrados de forma independente, os quais apresentaram concordância de pelo menos 85% (Teste estatístico de Kappa) antes de iniciar a avaliação do estudo.

Foram excluídos do estudo os pacientes que estivessem grávidas ou amamentando, apresentassem retrações gengivais, sensibilidade dental, tratamento endodôntico nos dentes anteriores superiores, que apresentassem escurecimento dental severo (manchas por tetraciclina, fluorose ou endodontia), utilizassem aparelho ortodôntico fixo, apresentassem hábitos de bruxismo, fossem fumantes e que apresentem trincas visíveis nos dentes. Ainda foram excluídos os que apresentassem alterações sistêmicas, como patologias gástricas (gastrite, úlceras, azia), cardíacas,

renais, hepáticas, pacientes diabéticos e hipertensos ou que estiverem fazendo uso contínuo de algum medicamento, como analgésicos e anti-inflamatórios.

4.10.2 Cálculo Amostral

O desfecho primário desse estudo foi de avaliar o risco absoluto de SD decorrente do clareamento dental em consultório, o qual foi relatado em aproximadamente 93% (VOCHIKOVSKI, *et al.*, 2020; MARTINI, *et al.*, 2019) para o produto clareador Whiteness HP AutoMixx (FGM). Para detectar uma diferença no risco de SD sw 15% entre o grupo controle e o grupo experimental, foi necessário um tamanho mínimo de amostra de 56 pacientes, com um poder de 80% e alfa de 5%.

4.10.3 Randomização e Cegamento

Os voluntários foram randomizados em dois grupos, em um mesmo momento, através de um programa de computador disponível gratuitamente online no sítio <http://www.sealedenvelope.com>. O processo de aleatorização e ocultação da lista foi realizado por um pesquisador que não estava envolvido na pesquisa. Apenas no momento de iniciar o clareamento, o operador abriu o envelope selado que tinha a definição do dessensibilizante que seria aplicado na hemiarcada direita identificado pelas letras A ou B e obrigatoriamente o outro gel na hemiarcada esquerda. Dessa forma, o estudo foi triplo cego no qual o avaliador, o paciente e o estatístico estavam cegos em relação aos grupos que os voluntários foram designados.

4.10.4 Técnica de Clareamento

Todos os voluntários receberam profilaxia dentária com pedra-pomes e água duas semanas antes dos procedimentos de clareamento, assinaram um termo de consentimento e preencheram a ficha clínica (Anexo C).

Após o afastamento das bochechas lábios e língua com o afastador, foi realizada uma barreira de proteção gengival com resina fotopolimerizável Arcflex (FGM), em seguida aplicado o gel dessensibilizador contendo NC-E em uma

hemiarcada e o placebo em outra hemiarcada que permaneceu por 10 minutos, posteriormente o gel foi aspirado com um sugador e aplicado o gel clareador (Whiteness HP AutoMixx, FGM, Joinville, Brasil), exemplificado na Figura 10, na superfície vestibular dos dentes de pré-molares a pré-molares das arcadas superior e inferior, permanecendo durante 50 min, então foi aspirado com sugador descartável e os dentes limpos com gaze e lavados abundantemente com água.

FIGURA 10 - Gel clareador *Whiteness HP AutoMixx* (FGM)



Fonte: MedicaexpO (2021)

4.10.5 Sensibilidade Dental

A SD pós-clareamento foi avaliada imediatamente após o clareamento e até 1 h, 24 h e 48 h após a realização do clareamento dental, utilizando as escalas Diário de sensibilidade (NRS) e escala visual analógica (VAS) para SD (MARTINI, E. C. *et al.*, 2019; REZENDE, M. *et al.*, 2018). Foi solicitado que o paciente indique o valor numérico do grau de sua SD em cada período citado acima. Para isso, os pacientes registraram a ocorrência ou não de SD em um diário de sensibilidade, utilizando a NRS de 5 pontos, com escores de 0 - 4, sendo: 0 = nenhuma, 1 = leve, 2 = moderada, 3 = considerável e 4 = severa (Figura 11). Além disso, também foi utilizada a escala VAS com escores de 0 a 10, sendo 0 = ausência de sensibilidade e 10 = sensibilidade severa. O paciente assinalou com uma linha vertical, cruzando a linha horizontal da escala, o correspondente à intensidade da sua SD (Figura 12). Após foi realizada a mensuração em mm com o auxílio de uma régua milimétrica (PAULA *et al.*, 2013b).

FIGURA 11 - Diário de Sensibilidade (NRS)

Nome:					
Grupo:		1ª Sessão de Clareamento – LADO DIREITO			
	0 NENHUMA	1 LEVE	2 MODERADA	3 CONSIDERÁVEL	4 SEVERA
Imediatamente após					
1 hora após					
24 horas após					
48 horas após					

Nome:					
Grupo:		1ª Sessão de Clareamento – LADO ESQUERDO			
	0 NENHUMA	1 LEVE	2 MODERADA	3 CONSIDERÁVEL	4 SEVERA
Imediatamente após					
1 hora após					
24 horas após					
48 horas após					

Fonte: Adaptado de Siqueira (2014, p.42)

FIGURA 12 - Escala visual analógica (VAS)

1ª Sessão de Clareamento - LADO DIREITO

NOME:
GRUPO:
Marque com uma linha vertical no lugar que você considera o nível de sensibilidade: imediatamente após

Horário do término do clareamento: ____:____

1ª Sessão de Clareamento - LADO ESQUERDO

NOME:
GRUPO:
Marque com uma linha vertical no lugar que você considera o nível de sensibilidade: imediatamente após

Horário do término do clareamento: ____:____

Fonte: Siqueira (2014, p. 42)

4.10.6 Avaliação da Cor

A avaliação da cor foi registrada inicialmente, uma semana após a primeira e a segunda sessão de clareamento dental e um mês após o tratamento clareador (Figura 13). A avaliação da cor foi realizada subjetivamente com a escala de cor Vita Classical (Vita Zahnfabrik, Bad Säckingen, Alemanha) orientada por valor (Figura 13) e pela escala de cor Vita Bleachedguide 3D-MASTER (Vita Zahnfabrik, Bad Säckingen, Alemanha) (Figura 14). Além disso, uma avaliação objetiva da cor foi realizada com o espectrofotômetro Vita Easyshade (Vita Zahnfabrik, Bad Säckingen, Alemanha) (Figura 14).

FIGURA 13 - Tabela para avaliação de cor de acordo com a escala Vita e da escala Easyshade.

Períodos	VITA		BLEACHEDGUIDE					
	D - 11	E - 21	D - 11	E - 21				
Inicial								
1 semana após 1ª sessão								
1 semana após 2ª sessão								
1 Mês após								
Períodos	EASYSHADE							
	D - 11							
	Cor	Varição	Master	L	C	H	a	b
Inicial								
1 semana após 1ª sessão								
1 semana após 2ª sessão								
1 Mês após								
Períodos	EASYSHADE							
	E - 21							
	Cor	Varição	Master	L	C	H	a	b
Inicial								
1 semana após 1ª sessão								
1 semana após 2ª sessão								
1 Mês após								

Fonte: Siqueira (2014)

FIGURA 14 - Escala de cor, Vita Classical (Vita Zahnfabrik, Bad Säckingen, Alemanha) (a), escala de cor Vita Bleachedguide 3D-MASTER (Vita Zahnfabrik, Bad Säckingen, Alemanha) (b) avaliação objetiva da cor foi realizada com o espectrofotômetro Vita Easshade (Vita Zahnfabrik, Bad Säckingen, Alemanha) (c)



Fonte: MedicaexpO (2021)

4.10.7 Análise Estatística

A análise estatística seguiu o protocolo de intenção de tratar, que envolve todos os participantes que foram randomizados. Nos casos em que os dados estavam faltando, a última avaliação foi usada. Para a análise de risco absoluto de TS, ambos os grupos foram comparados usando o McNemartest ($\alpha = 0,05$). Risco relativo e intervalo de confiança para o tamanho do efeito foram calculados. A intensidade TS foi analisada usando o Wilcoxon teste de classificação sinalizada (NRS) e teste t pareado (VAS). Comparações entre tempos dentro de cada grupo foram realizados usando o teste de frias (NRS) e análise de variância unilateral seguido de pós teste de Tukey (VAS).

O teste t pareado foi empregado para comparar as mudanças de cor entre os grupos (Δ SGU e ΔE_{ab} , ΔE_{00} e WI_D entre a linha de base e semanas pós-clareamento). Em todos os testes estatísticos, o nível de significância foi de 5%. As análises foram realizadas com o software Sigma Plot versão 11.0 (Systat Software, San Jose, CA, EUA).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 OBTENÇÃO DAS NANOCÁPSULAS CONTENDO EUGENOL

As NC-E e as NC-C foram obtidas com excelência pelo método da deposição interfacial do polímero pré-formado (nanoprecipitação). Todas as formulações obtiveram um efeito de reflexo azulado, este efeito está relacionado ao movimento browniano das nanopartículas poliméricas conhecido como “efeito Tyndall” conforme relatado na literatura (CAMARGO *et al.*, 2020; GOMES *et al.*, 2019; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003) (Figura 15). A concentração de 1,5 mg/mL foi escolhida por ser comumente utilizada para óleos essenciais (ALI *et al.*, 2015).

FIGURA 15 - Nanossuspensão obtida pelo método de deposição interfacial do polímero pré-formado



Fonte: A autora

5.2 DETERMINAÇÃO DO pH

A Tabela 4 mostra os valores adquiridos para o pH das nanossuspensões no momento em que foram formuladas.

TABELA 4 - Valores de pH obtidos logo após o preparo das nanossuspensões

Formulações	Média	DP*
NC-E	5,40	0,09
NC-C	5,60	0,15

Fonte: Elaborado pela autora

DP* = Desvio padrão (n = 3)

Observando os valores obtidos para a determinação de pH, as formulações de NC-C apresentaram-se em conformidade com outras suspensões de nanocápsulas de Eudragit RS100 já citadas anteriormente na literatura e mantendo o caráter ácido esperado por conta da estrutura química do polímero utilizado que possui grupos ésteres (PATRA *et al.*, 2017; SCHAFFAZICK *et al.*, 2006).

5.3 ANÁLISE MORFOLÓGICA E DE SUPERFÍCIE

5.3.1 Determinação do Diâmetro Médio, Índice de Polidispersão e Potencial Zeta Logo Após a Formulação

Os resultados de diâmetro médio, índice de polidispersidade e potencial zeta para as NC-C e NC-E, estão apresentados na Tabela 5.

TABELA 5 - Valores obtidos de diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta para as NC-C e NC-E

Formulações	Diâmetro média (nm)		Índice de polidispersão		Potencial Zeta (mV)	
	Média	DP*	Média	DP*	Média	DP*
NC-E	121,80	4,81	0,25	0,02	25,89	2,84
NC-C	122,95	0,64	0,19	0,03	20,25	6,61

Fonte: A autora

Nota: DP* = Desvio padrão (n = 3)

Em todas as formulações foi possível encontrar diâmetro médio entre 121,80 (NC-E) e 122,95 (NC-C), estes valores condizem com a literatura, para Schaffazick *et al.* (2006) e Dalcin, Ourique e Gomes (2017), as nanopartículas poliméricas geralmente apresentam diâmetro entre 100 e 300 nm e isso deve-se a fatores determinantes como a formulação, método de preparo e, no caso de nanocápsulas, a natureza do óleo utilizado no núcleo, assim como, o polímero e a presença do fármaco.

Outros fatores também podem influenciar diretamente o diâmetro de partículas em sistemas nanoestruturados, como a natureza do óleo para a formação de nanocápsulas, influenciando algumas características das substâncias utilizadas, como viscosidade, hidrofobicidade e tensão superficial e também a presença do fármaco na fase orgânica antes da fase de precipitação do polímero no meio aquoso, pois este influencia o processo de nucleação resultando em partículas de diâmetro maior com grande distribuição de tamanho (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

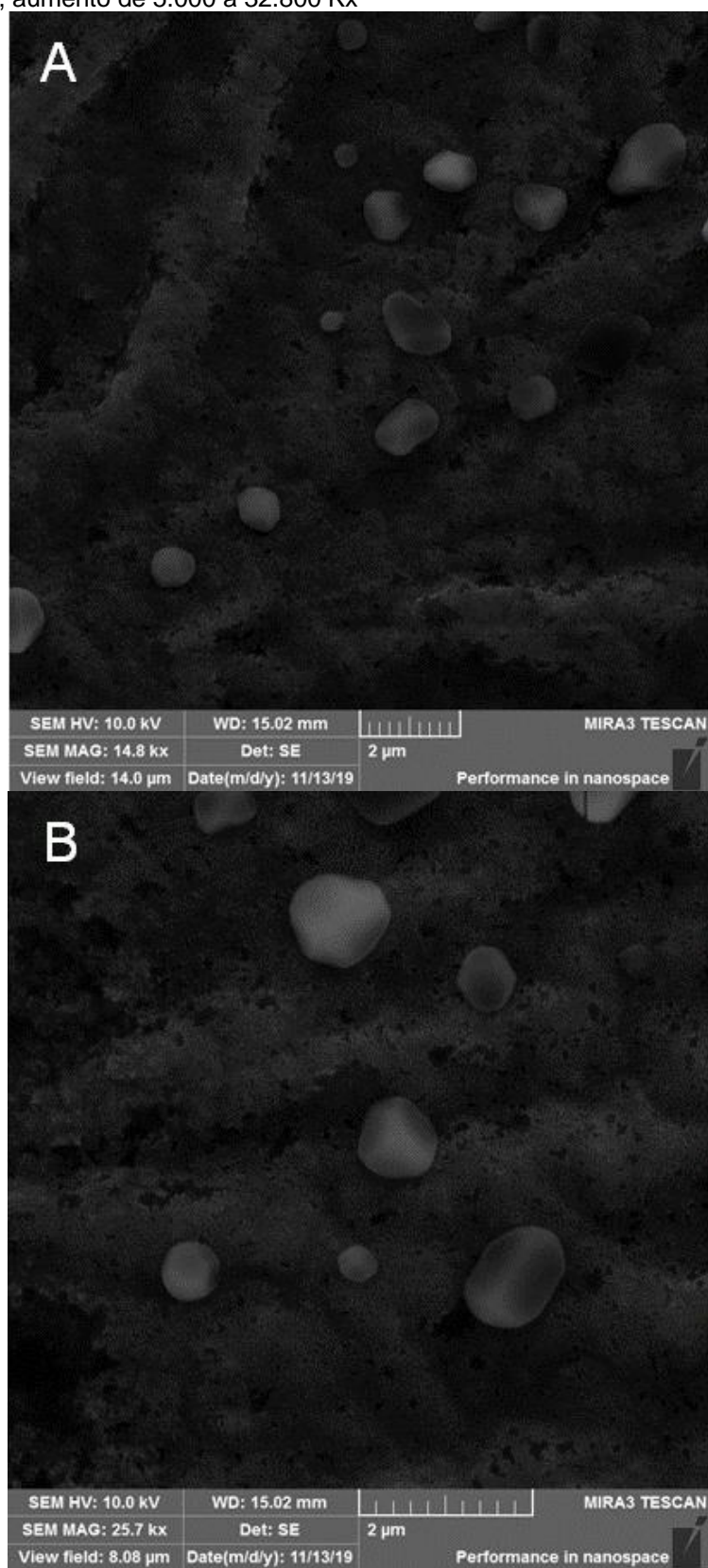
Valores de índice de polidispersão próximos a 0 são considerados monodispersos e próximos ou maiores a 0,5 indicam uma dispersão heterogênea (MARKWALTER *et al.*, 2019; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). As nanossuspensões apresentaram valores entre 0,19 e 0,25, demonstrando pequena variação, indicando que os valores foram adequados. Valores semelhantes foram encontrados por Adibkia *et al.* (2011) em análise de estabilidade de NCPs de Eudragit RS100 contendo naproxeno obteve valores de 0,12 a 0,29.

A análise de potencial zeta permite identificar as cargas elétricas que se encontram na superfície das nanopartículas, são consideradas estáveis quando o valor do potencial zeta for próximo a 30 mV (BHATIA, 2016). Podemos observar que as formulações apresentaram os valores do potencial zeta positivo que variaram 20,25 (NC-C) à 25,89 mV (NC-E). As nanopartículas mostraram valores positivos, devido a carga positiva dos grupamentos amônio quartenários do polímero (Eudragit® RS100) que é um polímero de natureza catiônica (ADIBKIA *et al.*, 2011; CHAVES *et al.*, 2017; DOMINGUES *et al.*, 2008).

5.3.2 Microscopia Eletrônica de Varredura por Emissão de Campo

A análise morfológica das partículas foi realizada por meio de microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo (FEG-SEM), as fotomicrografias obtidas para NC-C e NC-E liofilizadas com lactose 1% estão apresentadas na Figura 16 (a e b respectivamente). As imagens confirmaram a formação de nanocápsulas através da metodologia de nanoprecipitação bem como as dimensões nanométricas das formulações em estudo. As formulações apresentaram em sua maioria partículas com formato esférico, superfície lisa e sem a presença de poros.

FIGURA 16 - Fotomicrografias das nanocápsulas poliméricas liofilizadas NC-C (a) e NC- E (b) por FEG-SEM, aumento de 5.000 a 32.800 Kx



Fonte: A autora

5.4 ANÁLISE ESTRUTURAL

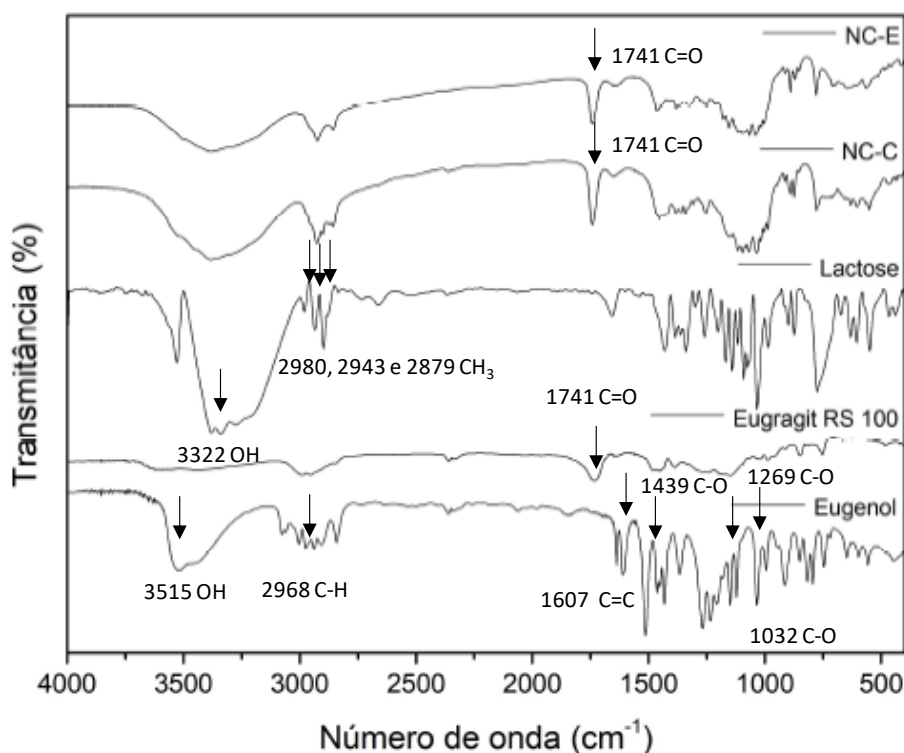
5.4.1 Avaliação por Espectroscopia na Região do Infravermelho

Esta análise é de grande importância, pois permite a identificação estrutural de substâncias orgânicas através da detecção de suas ligações e grupos funcionais além de demonstrar possíveis interações moleculares entre os fármacos e os polímeros na nanoencapsulação quando comparado com os compostos puros (LOPES; FASCIO, 2004).

A Figura 17 mostra o espectro do FTIR do eugenol puro, do polímero puro, da lactose monohidratada e das formulações de nanocápsulas. Em relação ao Eugenol puro, foi possível observar bandas de estiramento do grupo OH em 3515 cm^{-1} , C-H do grupo CH_3 em 2968 cm^{-1} e também bandas de vibrações de estiramento de C=C em 1607 cm^{-1} , do grupo CH_2 em 1439 cm^{-1} e da ligação C-O em 1269 e 1032 cm^{-1} . Para o polímero foi possível notar a banda de vibração de estiramento C=O da carbonila em 1741 cm^{-1} , sendo o mesmo sinal encontrado nos FTIR das formulações. Em relação a lactose, foi possível observar bandas de vibrações de estiramento do grupo OH em 3322 cm^{-1} e do grupo CH_3 em 2980 , 2943 e 2879 cm^{-1} .

Nos espectros de FTIR das NC-C e NC-E houve uma sobreposição dos espectros da lactose e do polímero sendo possível notar que em ambos não houve nenhum sinal do fármaco, indicando a sua encapsulação.

FIGURA 17 - Espectros de FTIR do eugenol puro, do polímero Eudragit RS100, da lactose e das NC-C e NC-E. (2 cm^{-1} , 64 scans, pastilha com KBr)



Fonte: A autora

Com base nos resultados obtidos, conclui-se que as bandas características do fármaco desapareceram nos espectros do FTIR relacionados a NC-C e NC-E indicando que não houve interação físico-química entre os componentes da formulação. Assim, esses resultados indicam que o eugenol pode ser completamente encapsulado e o polímero está servindo apenas como carreador.

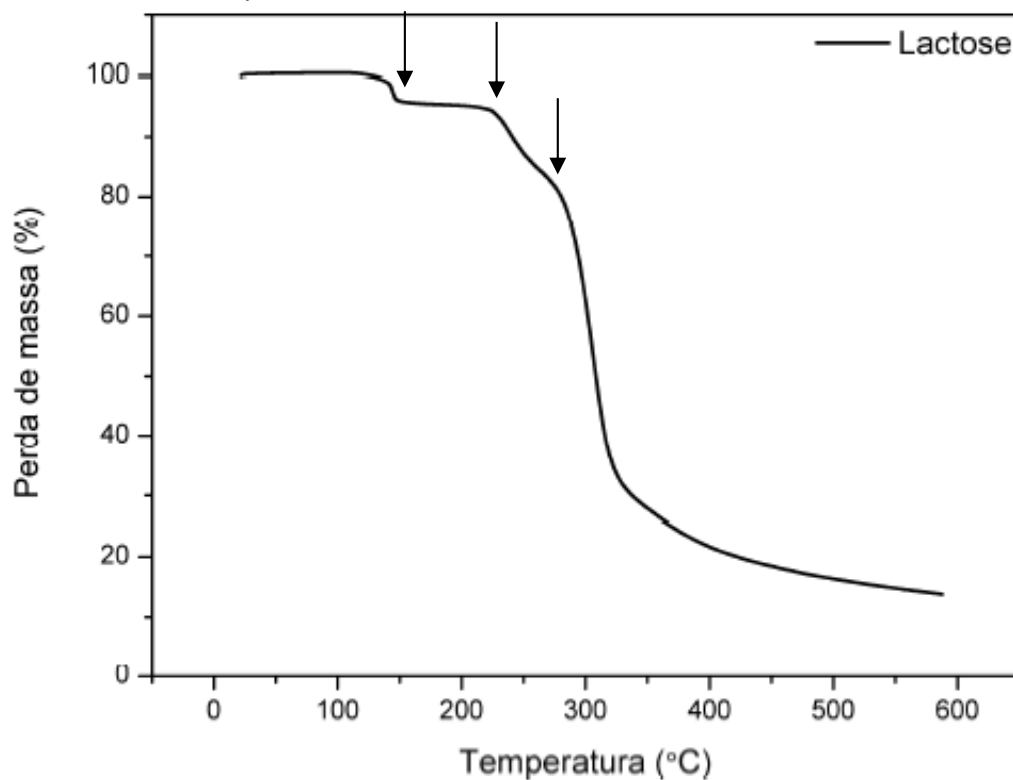
5.4.2 Análise Térmica

A TG é uma técnica utilizada para medir a variação de massa (ganho ou perda) de determinado composto em função da temperatura possibilitando observar mudanças em seu comportamento como desidratação, oxidação, decomposição entre outros (OLIVEIRA; YOSHIDA; GOMES, 2011).

A curva de TG obtida para a lactose utilizada como agente crioprotetor está representada na Figura 18. A lactose apresentou três eventos, o primeiro estágio de degradação térmica em $150\text{ }^\circ\text{C}$ relacionado à perda de água de cristalização característico da perda de água, já que a mesma é mono-hidratada, e o segundo e

terceiro estágio de perda de massa relacionado ao seu processo de degradação que começou em 230 até 325 °C, respectivamente.

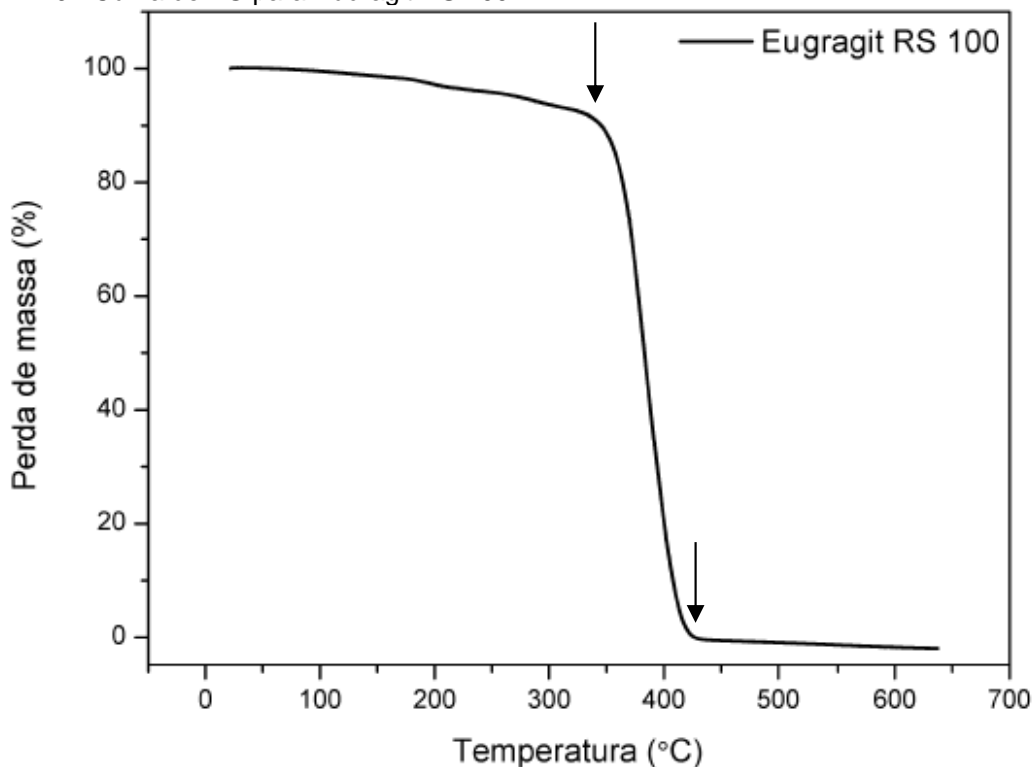
FIGURA 18 - Curva de TG para a lactose



Fonte: A autora

A curva de TG para o polímero eudragit RS 100 apresentou dois eventos de perda de massa, o primeiro em 350 °C e o segundo em 410 °C, perdendo completamente sua massa em 650 °C, conforme a Figura 19.

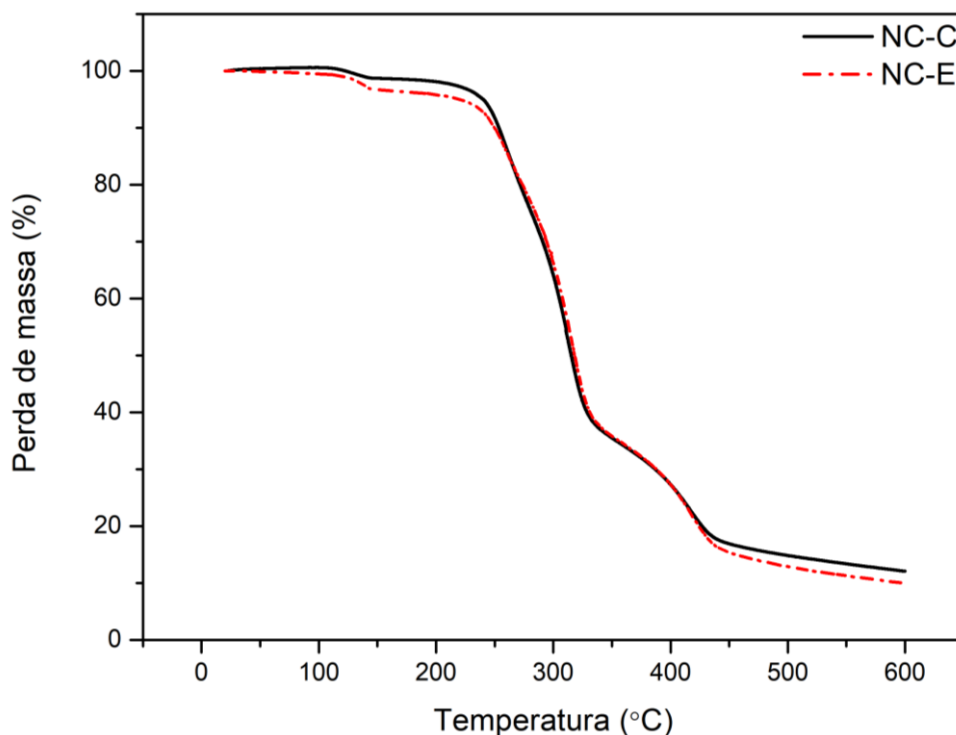
FIGURA 19 - Curva de TG para Eudragit RS 100



Fonte: A autora

A curva de TG representada para as NC-C e NC-E (Figura 20) demonstraram semelhança independentemente da presença do fármaco ou não, com isso foi verificado a existência de três eventos de degradação nas amostras, sendo o primeiro idêntico ao da degradação da água na lactose em 320 °C e o segundo e o terceiro evento típico da degradação do polímero eudragit em 350 °C e 410 °C. Também foi possível observar que a nanoencapsulação do fármaco melhorou sua estabilidade térmica, já a quantidade de massa degradada ao final foi superior a apresentada no polímero.

FIGURA 20 - Curvas de TG para NC-C e NC-E



Fonte: A autora

5.4.3 Avaliação da Eficiência de Encapsulação

5.4.3.1 Desenvolvimento e validação do método analítico para quantificação do eugenol

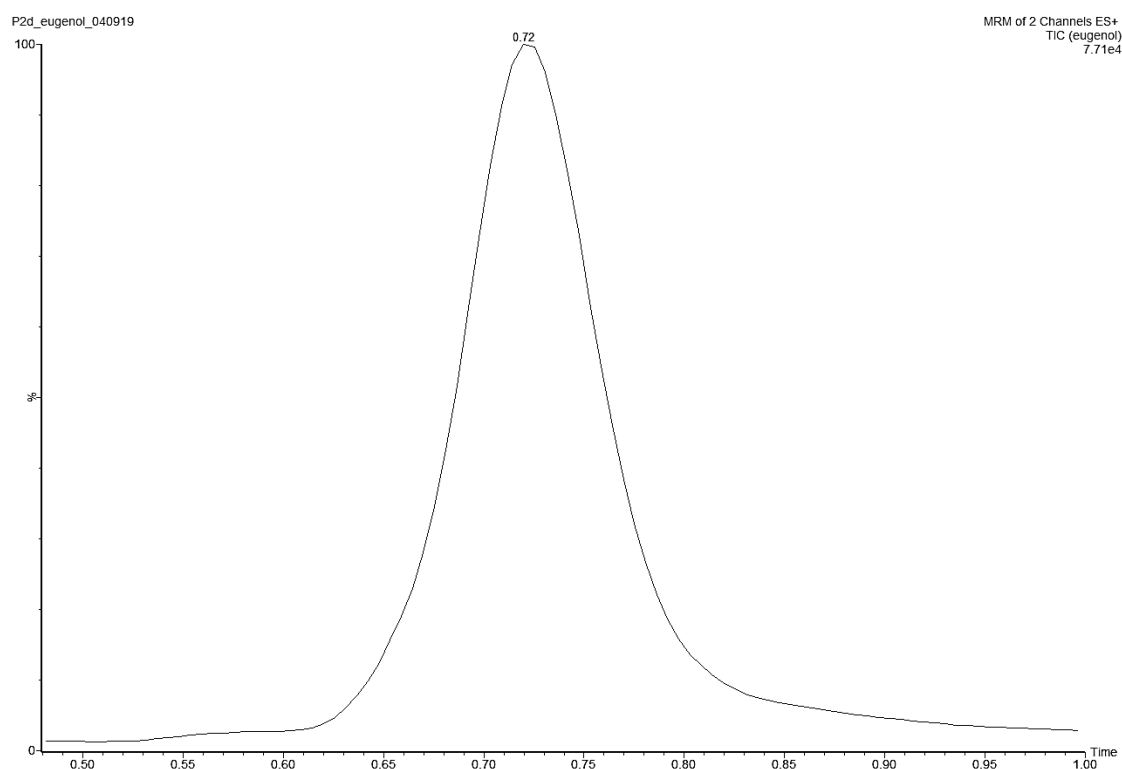
Para o desenvolvimento do método analítico levamos em conta informações contidas em trabalhos já citados na literatura, porém estes utilizavam de matrizes mais complexas como sangue e urina (SHEN *et al.*, 2015; MELLES *et al.*, 2013). Por esse motivo uma corrida em gradiente exploratório foi feita para a determinação das condições cromatográficas a serem utilizadas, representadas na Tabela 6. A Figura 21 demonstra o cromatograma do método desenvolvido, onde foi possível verificar que o eugenol saiu em até 0,72 minuto, considerado ótimo tempo para análise de rotina.

TABELA 6 - Parâmetros utilizados para os cromatogramas

CARACTERÍSTICA	DESCRIÇÃO
Fluxo	0,3mL/min
Coluna	Acquity BEH HSS T3 C18 (1,7 μ m, 2,1 x 50 mm)
Temperatura	25 °C
Fase móvel	Acetonitrila e água acidificada com 1% de ácido fórmico PA (80:20, v/v)
Volume de injeção	5 μ L/min
Tempo de análise	2 min

Fonte: A autora

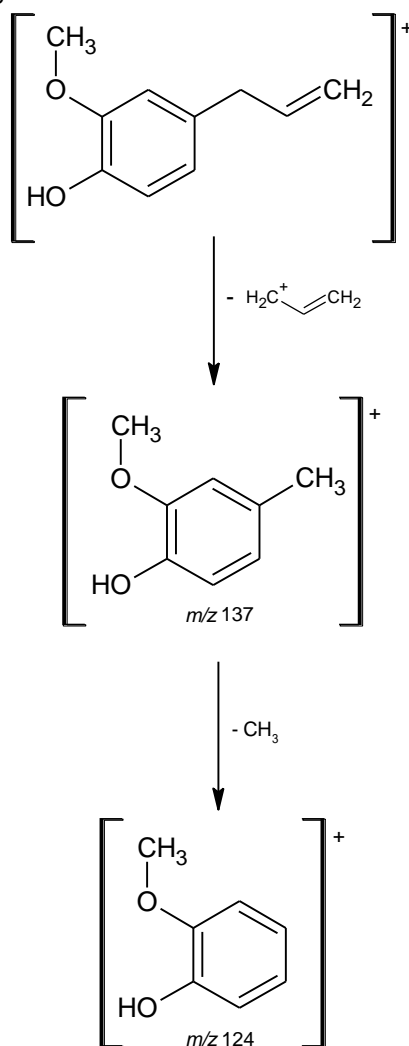
FIGURA 21 - Cromatograma do eugenol



Fonte: A autora

O equipamento UHPLC-MS/MS é considerado seletivo para as substâncias analisadas, sendo necessário realizar a fragmentação do eugenol. A partir dessa fragmentação foi possível identificar dois íons majoritários, um qualitativo de $m/z = 124$ e outro quantitativo de $m/z = 137$ pois apresentou maior área sob a curva, portanto maior concentração em relação ao primeiro íon. A Figura 22 é a representação dos fragmentos do eugenol.

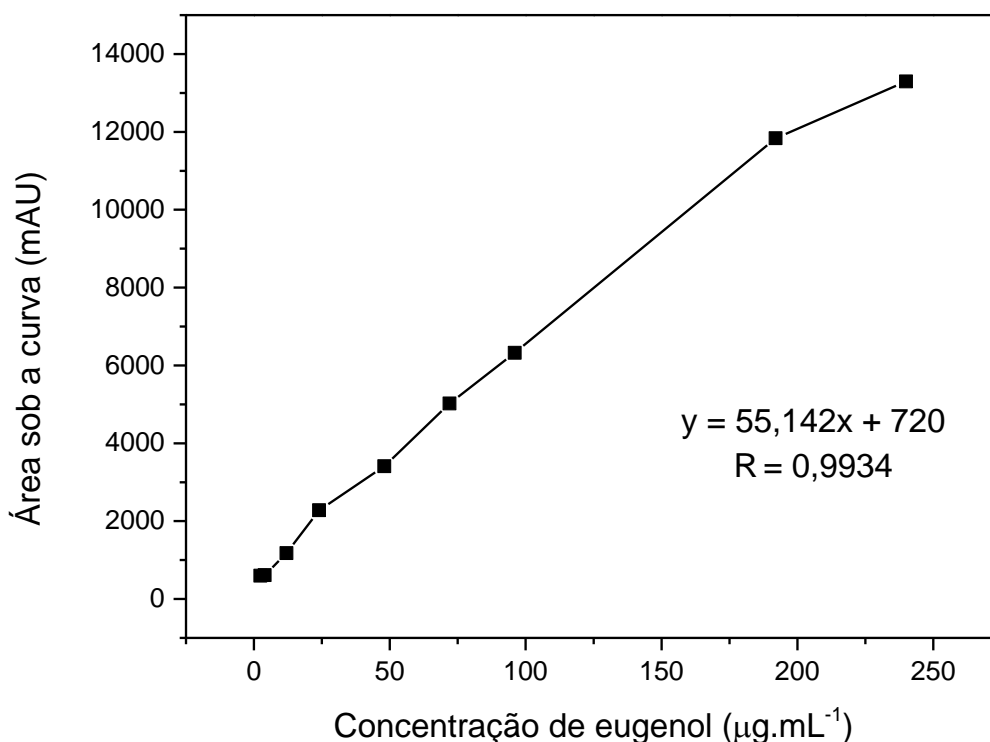
FIGURA 22 - Fragmentos do eugenol



Fonte: A autora

De acordo com a Anvisa (2017), linearidade de um método deve ser demonstrada por meio da capacidade de obter respostas analíticas diretamente proporcionais a concentração de um analito em uma amostra. Para isso o teste foi realizado em cinco concentrações diferentes do analito e em triplicata, a curva analítica está representada na Figura 23.

FIGURA 23 - Representação gráfica da curva analítica padrão para a determinação do eugenol obtida por UHPLC na faixa de concentração de 2,4 a 240 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (n = 3)



Fonte: A autora

Por meio da análise de regressão linear, foram obtidos os valores de coeficiente angular (inclinação da reta), coeficiente linear (intercepto com o eixo y) e coeficiente de correlação (r), sendo este último o valor responsável por evidenciar a qualidade da regressão linear obtida, pois quanto mais próximo de 1 menor é a dispersão entre os pontos e maior a segurança dos resultados (BRASIL, 2017; RIBANI *et al.*, 2004). Os resultados obtidos estão descritos na Tabela 7 para serem mais bem observados.

TABELA 7 - Dados obtidos através da regressão linear

PARÂMETROS	RESULTADOS
Faixa de trabalho	2,4 a 240 $\mu\text{g}/\text{mL}$
Equação da reta ($y = ax + b$)	$y = 55,142x + 720$
Inclinação da reta (a)	55,142
Intercepto com eixo y (b)	720
Coefficiente de determinação (r^2)	0,9966
Coefficiente de correlação Pearson (r)	0,9934

Fonte: A autora

O limite de detecção (LD) representa a menor concentração da substância a ser analisada pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, já o limite de quantificação (LQ) representa a menor concentração da substância em exame que pode ser medida, utilizando um determinado procedimento experimental, os valores de LD e LQ podem ser calculados de três maneiras diferentes: método visual, método relação sinal-ruído, método baseado em parâmetros da curva analítica (RIBANI *et al.*, 2004). Os valores de LD e LQ do nosso método analítico foram determinados experimentalmente sendo estabelecidos como LD = 48 ng/mL e LQ = 480 ng/mL.

A precisão representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, conforme descrito no método analítico a ser validado. A precisão compreende a repetibilidade que mostra a concordância entre os resultados encontrados de uma mesma amostra executado nas mesmas condições, em um breve intervalo de tempo e a precisão intermediária que mostra o efeito das variações, dentro de um mesmo laboratório, considerando dias diferentes de execução do método e analistas ou até mesmo equipamentos (BRASIL, 2017; RIBANI *et al.*, 2004). Os valores de CV obtidos foram inferiores a 5,0%, e a análise estatística ($p < 0,05$) mostrou que os resultados não possuem diferença significativa, indicando, portanto, que o método foi considerado preciso, Tabela 8.

TABELA 8 - Valores experimentais obtidos dos ensaios de repetibilidade e precisão intermediária

PARÂMETROS	CONCENTRAÇÃO ($\mu\text{g/mL}$)	CV* (%)
Repetibilidade n = 5	12,8	3,07
	48	3,38
	192	2,71
Precisão intermediária n = 9	12,8	3,89
	48	3,83
	192	4,69

Fonte: A autora

Nota: *CV = Coeficiente de variação

A exatidão representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro. O parâmetro foi avaliado usando um método de recuperação e mostrou valores de porcentagem de recuperação entre 97,95 e 98,89% para os três níveis de

concentração avaliados, o que caracteriza o método como exato (BRASIL, 2017). Resultados descritos na Tabela 9.

TABELA 9 - Valores experimentais obtidos no ensaio de exatidão

Concentração teórica do eugenol ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)*	CV (%)	Recuperação (%)
12,8	3,07	97,95
48	3,38	98,53
192	2,71	98,89

Fonte: A autora

Nota: *n = 9

A robustez é um parâmetro tipicamente realizado no desenvolvimento do método analítico que indica a sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações das condições analíticas (BRASIL, 2017). Para isso, a avaliação da robustez do método analítico foi baseado nos valores de CV obtidos a partir da alteração dos parâmetros de análise, tais como a temperatura da coluna analítica (25 °C), o fluxo isocrático (0,33 mL/min), e composição da fase móvel (acetonitrila: água acidificada 82:18 v/v). Com relação a esses valores, os valores de CV% foram inferiores a 5%, o que caracteriza o método como robusto para todos os parâmetros analisados conforme resumido na Tabela 10.

TABELA 10 - Parâmetros analisados

PARÂMETROS	CV
Temperatura (25 °C)	3,41
Fluxo (0,33 mL/min)	3,06
Fase móvel (acetonitrila: água acidificada 82:18)	4,62

Fonte: A autora

5.4.3.2 Eficiência de encapsulação

A EE (%) foi realizada a partir do método de UPLC-MS/MS desenvolvido, devidamente validado apresentando resultado de 93,6% de encapsulação, valor condizente com Contri *et al.* (2013) que verificaram em seu trabalho encapsulamento maior que 80%.

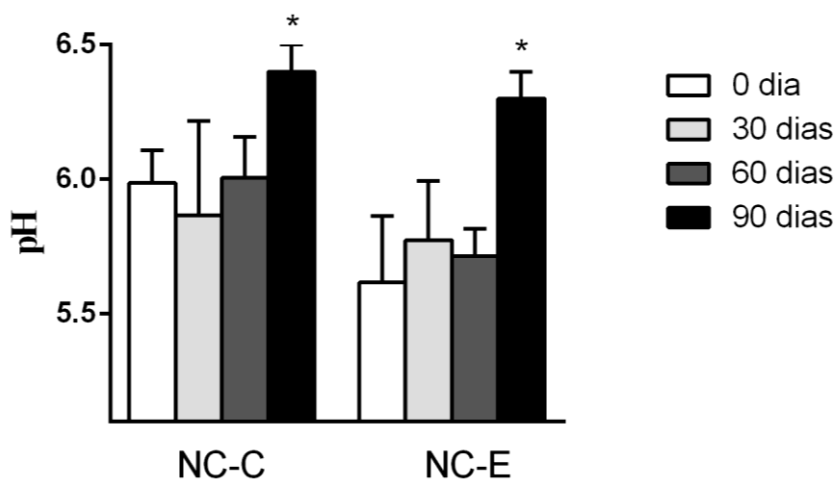
5.5 ANÁLISE DE ESTABILIDADE

5.5.1 Determinação do pH, Diâmetro Médio, Índice de Polidispersão e Potencial Zeta nos Tempos: 0, 30, 60 e 90 Dias

De acordo com Schaffazick *et al.* (2003), as suspensões coloidais normalmente não possuem tendência à separação de fases até alguns meses após a preparação, pois o processo de sedimentação é lento para partículas manométricas, sendo minimizado pelo movimento browniano. No entanto, com o tempo, pode ocorrer a aglomeração das partículas e, conseqüentemente, a sedimentação. É necessário enfatizar que o estudo da estabilidade é relevante para confirmar a importância de se armazenar a formulação adequadamente, já que qualquer alteração pode acelerar esse processo e com isso diminuir a estabilidade do polímero, do fármaco ou qualquer outra matéria-prima e, conseqüentemente, liberar o fármaco antecipadamente. Por esse motivo fez-se necessário a avaliação da estabilidade físico-química das NC-C e NC-E armazenadas em geladeira com temperatura de 4 °C pelo período de 90 dias.

A Figura 24 mostra que houve uma alteração nos valores de pH referente a 90 dias após a preparação da formulação, isso deve-se provavelmente a hidrólise dos triglicerídeos de cadeia média que compõem o núcleo ou do tensoativo que são desprendidos da fase oleosa quando ocorre agregação do polímero (MELO NUNES *et al.*, 2010).

FIGURA 24 - Valores de pH nos tempos 0, 30, 60 e 90 dias

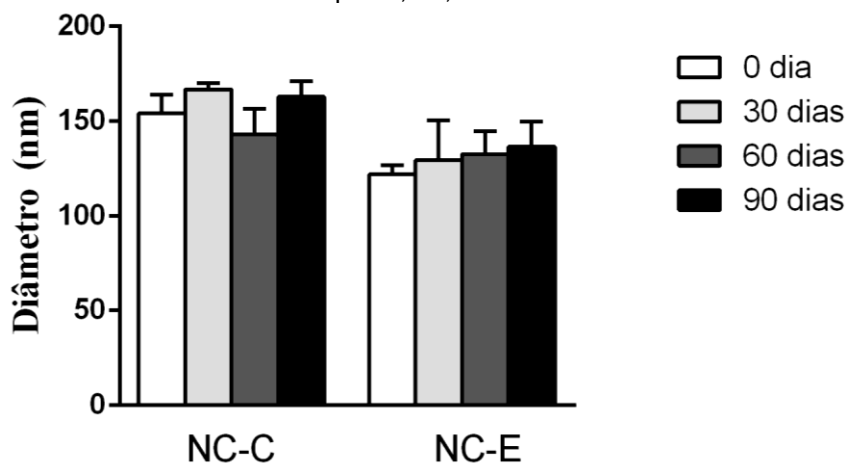


Fonte: A autora

Nota: Teste estatístico ANOVA 1 via com pós-teste de Tukey, seguido de teste t de Student, com significância de * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Em relação ao diâmetro de partícula, pode-se observar na Figura 25 que não houve diferença significativa para nenhum momento, indicando que as NC-C e as NC-E não são modificadas ao longo do tempo, sugerindo assim, que não houve coalescência e nem degeneração das amostras (SCHAFFAZICK *et al.*, 2006; DALCIN; OURIQUE; GOMES, 2017). A distribuição de tamanho e os diâmetros médios das partículas resultam em partículas em torno de 130-200 nm e baixo índice de polidispersividade, o que demonstra a boa homogeneidade dos sistemas (DALCIN; OURIQUE; GOMES, 2017).

FIGURA 25 - Valores de tamanho nos tempos 0, 30, 60 e 90 dias

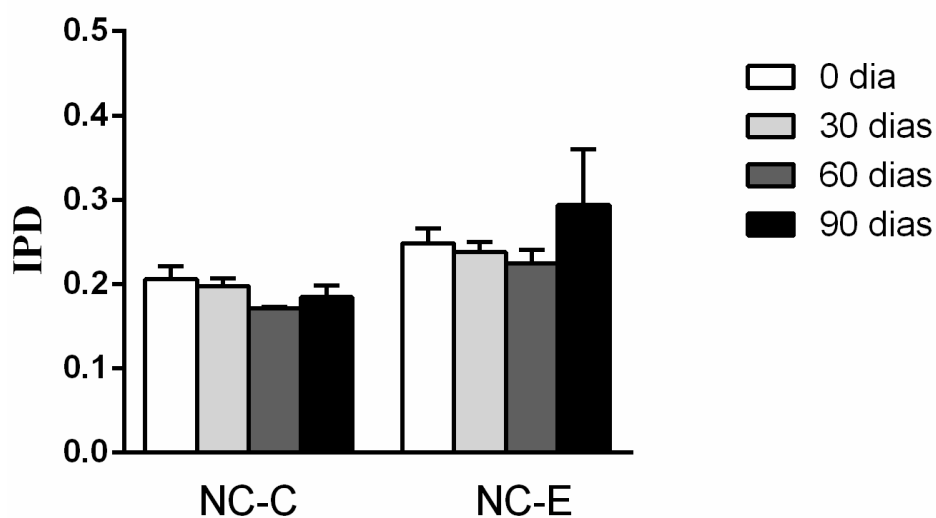


Fonte: A autora

Nota: Teste estatístico ANOVA 1 via com pós-teste de Tukey, seguido de teste t de Student, com significância de * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Com relação a Figura 26 para os valores de IPD, apesar de demonstrarem um pequeno aumento no tempo de 90 dias para as NC-E o mesmo não mostrou diferença significativa em relação aos demais tempos, os valores obtidos foram se mantiveram abaixo de 0,5 demonstrando que as amostras permanecem em uma distribuição unimodal de seus diâmetros médios, indicando que ao longo do tempo, as amostras continuaram dispersas sem ocorrer agregação ou floculação (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; MARKWALTER *et al.*, 2019).

FIGURA 26 - Valores de IPD nos tempos 0, 30, 60 e 90 dias

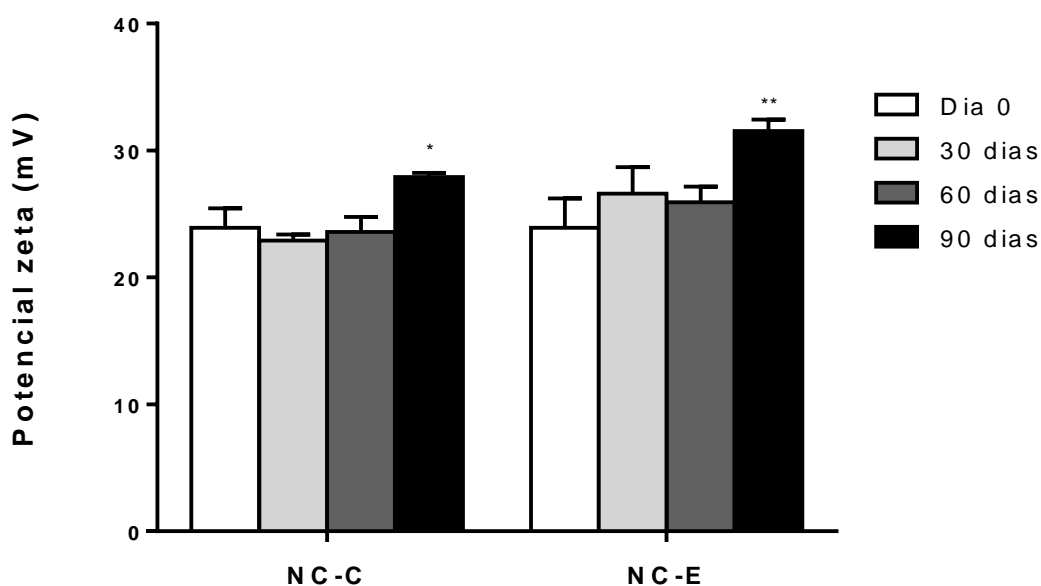


Fonte: A autora

Nota: Teste estatístico ANOVA 1 via com pós-teste de Tukey, seguido de teste t de Student, com significância de * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Em relação a Figura 27 o potencial zeta das amostras sofreram mudanças significativas após 90 dias de armazenamento. Essa mudança pode ser pela degradação do polímero após esse tempo, que começa a expor os grupos catiônicos da sua estrutura e pela sua carga positiva, acaba alterando o valor do potencial zeta das formulações (MELO NUNES et al., 2010).

FIGURA 27 - Valores de potencial zeta nos tempos 0, 30, 60 e 90 dias



Fonte: A autora

Nota: Teste estatístico ANOVA 1 via com pós-teste de Tukey, seguido de teste t de Student, com significância de * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

5.6 CARACTERIZAÇÃO DO GEL CONTENDO NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS DE EUGENOL

A avaliação da estabilidade do gel base e do gel contendo NC-E submetidas a diferentes temperaturas, conforme descrito no item 6.1 e monitoradas durante um período de 90 dias quanto aos parâmetros de características organolépticas, perda de peso e pH, tomando-se como referência os valores obtidos no tempo 0, cujos resultados estão apresentados nas Tabelas de 12 a 14.

Parâmetros utilizados no tempo 0:

- Aspecto gel base – transparente
- Aspecto gel de NC-E – leitoso
- Cor gel base – transparente
- Cor gel de NC-E – branco leitoso
- Odor gel base – sem odor
- Odor gel de NC-E – característico

- Sabor gel base – sem sabor
- Sabor gel de NC-E – característico

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 11, os géis não sofreram qualquer alteração entre si em relação ao tempo e ao local de armazenamento.

TABELA 11 - Resultados obtidos das características organoléticas do gel base e do gel de NC-E acondicionados em diferentes temperaturas

AMBIENTE		
Parâmetro	Gel base	Gel de NC-E
Aspecto	Normal sem alteração	Normal sem alteração
Cor	Normal sem alteração	Normal sem alteração
Odor	Normal sem alteração	Normal sem alteração
Sabor	Normal sem alteração	Normal sem alteração
ESTUFA		
Parâmetro	Gel base	Gel de NC-E
Aspecto	Normal sem alteração	Normal sem alteração
Cor	Normal sem alteração	Normal sem alteração
Odor	Normal sem alteração	Normal sem alteração
Sabor	Normal sem alteração	Normal sem alteração
GELADEIRA		
Parâmetro	Gel base	Gel de NC-E
Aspecto	Normal sem alteração	Normal sem alteração
Cor	Normal sem alteração	Normal sem alteração
Odor	Normal sem alteração	Normal sem alteração
Sabor	Normal sem alteração	Normal sem alteração

Fonte: A autora

5.6.1 Aspectos Físico-Químicos

5.6.1.1 Determinação da perda de peso

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 12, os géis que foram armazenados na estufa apresentaram maior perda de peso em relação aos armazenados em temperatura ambiente e na geladeira, sugerindo que o melhor método de conservação seria em temperaturas que não ultrapassassem 37 °C.

TABELA 12 - Valores de perda de peso do gel base e NC-E em diferentes lugares de armazenamento

AMBIENTE					
	Tempo em dias				% de peso final
Amostra (g)	0	30	60	90	
Gel base	15	14,78	14,59	14,56	97,06
Gel de NC-E	15	14,9	14,50	14,47	96,46
ESTUFA					
	Tempo em dias				% de peso final
Amostra (g)	0	30	60	90	
Gel base	15	14,76	13,76	13,74	91,60
Gel de NC-E	15	14,39	13,70	13,70	91,33
GELADEIRA					
	Tempo em dias				% de peso final
Amostra (g)	0	30	60	90	
Gel base	15	14,80	14,61	14,60	97,33
Gel de NC-E	15	14,92	14,86	14,80	98,66

Fonte: A autora

5.6.1.2 Determinação dos valores de pH

De acordo com os valores de pH apresentados na Tabela 13, não apresentaram diferença em relação ao tempo nem ao local de armazenamento, os géis continuaram apresentando valores muito próximos aos valores iniciais da análise.

TABELA 13 - Valores de pH do gel base e do gel de NC-E em diferentes lugares de armazenamento

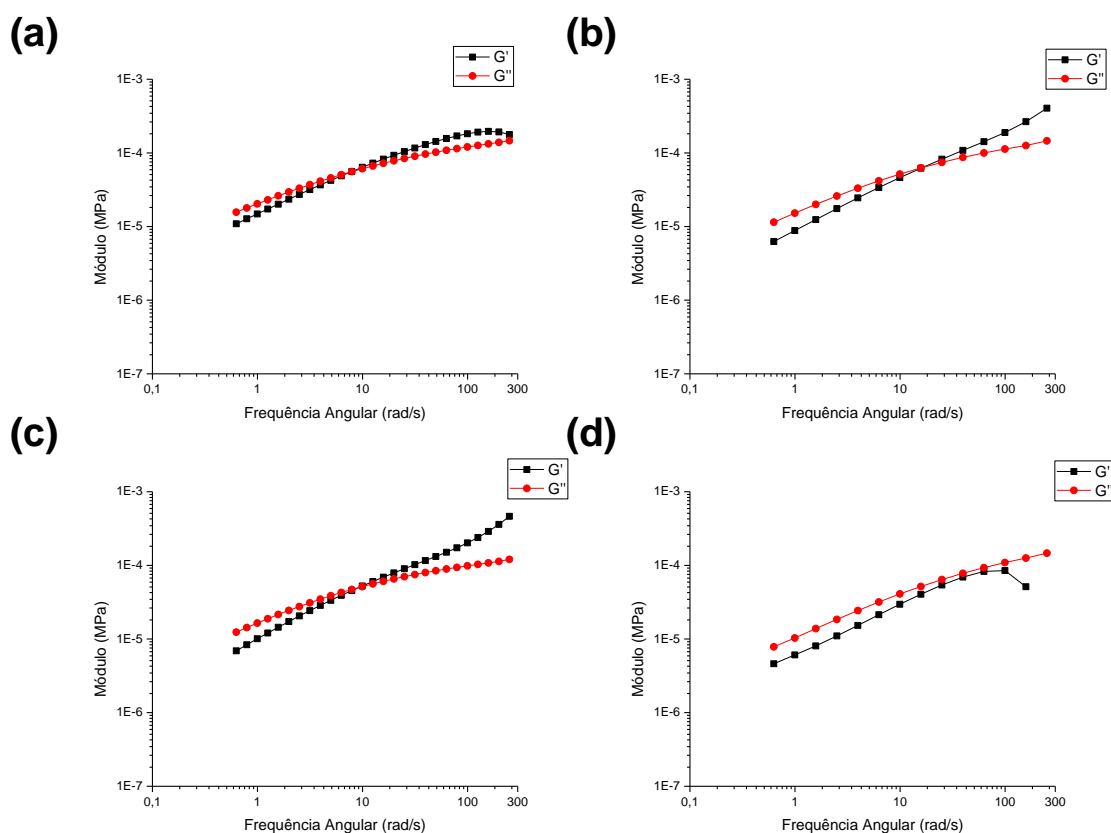
AMBIENTE					
	Tempo em dias				Média
Amostra	0	30	60	90	
Gel base	6,8	6,7	6,8	6,8	6,77
Gel de NC-E	6,7	6,6	6,7	6,6	6,65
ESTUFA					
	Tempo em dias				Média
Amostra	0	30	60	90	
Gel base	6,8	6,8	6,9	6,8	6,82
Gel de NC-E	6,7	6,7	6,6	6,7	6,67
GELADEIRA					
	Tempo em dias				Média
Amostra	0	30	60	90	
Gel base	6,8	6,7	6,7	6,8	6,75
Gel de NC-E	6,7	6,6	6,7	6,7	6,67

Fonte: A autora

5.6.2 Análise Reológica

A Figura 28 representa os gráficos da análise reológica do gel contendo nanocápsulas sem fármaco (NC-C) imediatamente após o preparo e mensalmente até 90 dias de armazenamento. Foi possível observar que em toda a análise as curvas G'' são superiores a G' o que significa que há predomínio dos efeitos viscosos em relação ao elástico, ou seja, apresenta o comportamento de um líquido. Com o aumento da velocidade angular há um cruzamento das curvas de G' e G'' até 60 dias de armazenamento, ocorrendo, então, uma inversão da predominância de G'' para G' indicando que ocorreu aumento das forças elásticas em relação as viscosas. Em relação a análise de 90 dias não há esse cruzamento e ocorre um rompimento e uma perda de estrutura do modo elástico provavelmente por perda das forças das ligações poliméricas que formam o gel e acabam o deixando mais fluído (SHAO *et al.*, 2012).

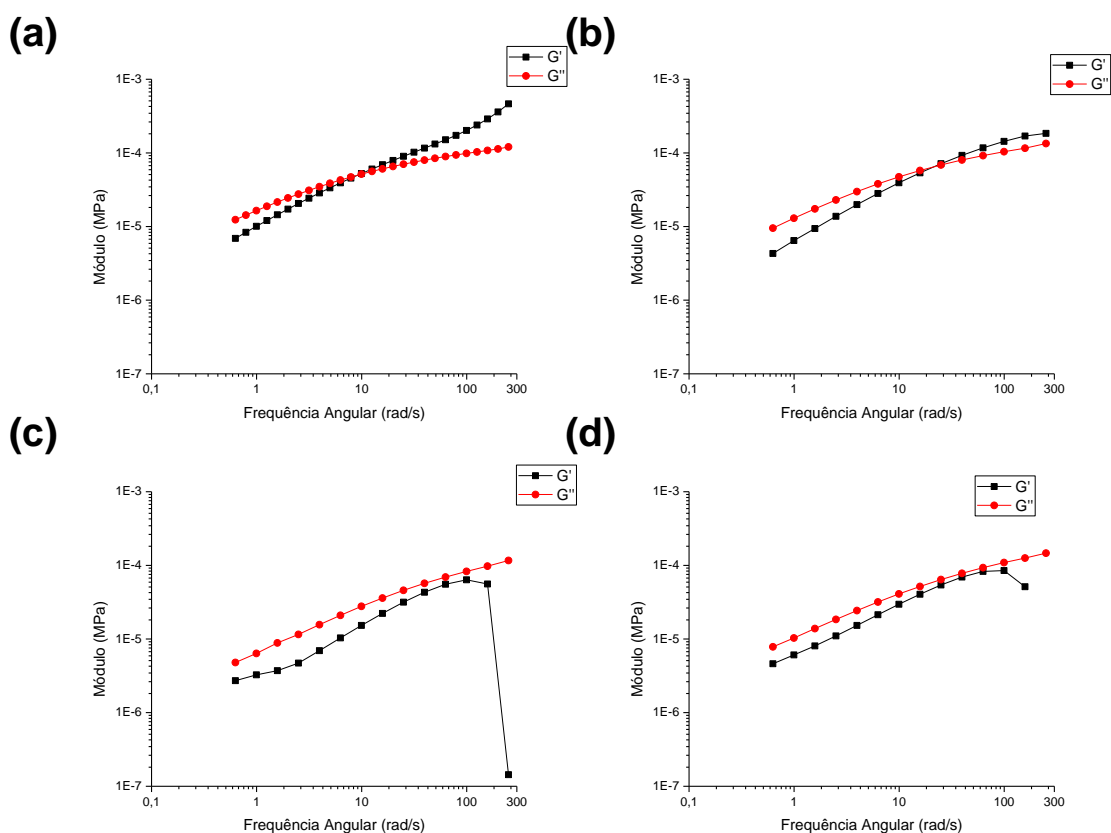
FIGURA 28 – Análise reológica do gel contendo as nanocápsulas sem fármaco (NC-C) após o preparo (a), após 30 dias (b), após 60 dias (c) e após 90 dias de armazenamento (d)



Fonte: A autora

Para os gráficos (Figura 29) do gel contendo as nanocápsulas contendo Eugenol (NC-E) foi possível notar que no tempo 0 e 30 dias após o preparo, ambos obtiveram o mesmo comportamento do gel contendo NC-C em relação ao predomínio de $G'' > G'$ e o cruzamento das curvas com o aumento da frequência angular. Em 60 dias e 90 dias não há cruzamento das curvas e com o aumento da velocidade há uma perda da propriedade elástica por conta do declínio brusco ao final da curva (SHAO *et al.*, 2012).

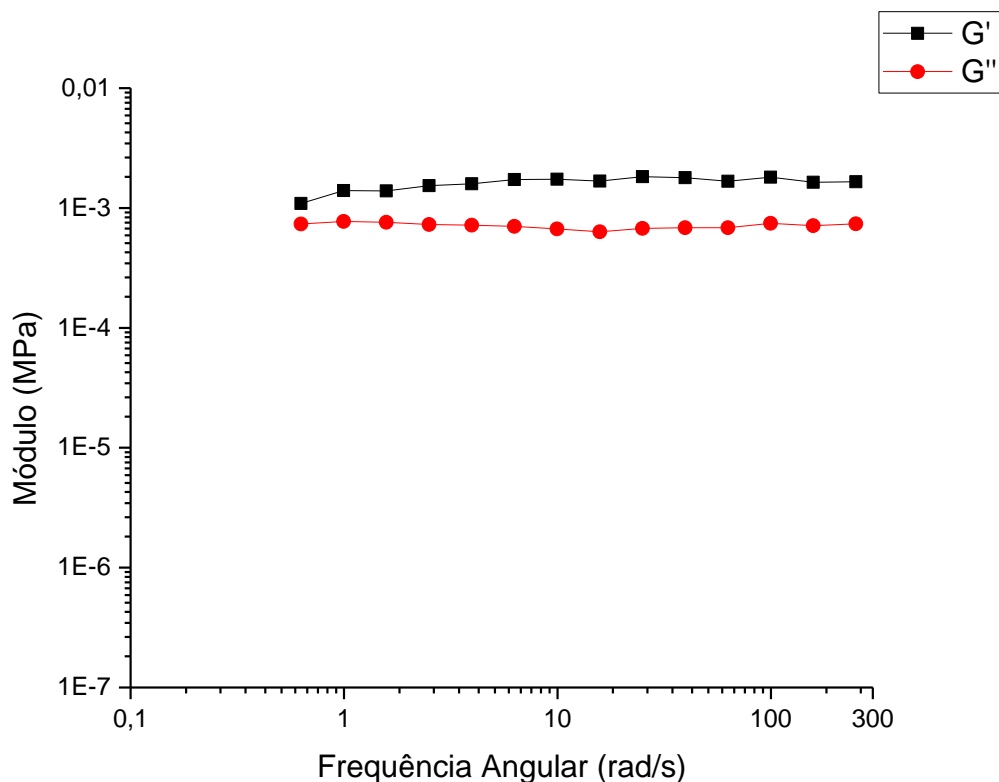
FIGURA 29 – Análise reológica do gel contendo as nanocápsulas contendo Eugenol (NC-E) após o preparo (a), após 30 dias (b), após 60 dias (c) e após 90 dias de armazenamento (d)



Fonte: A autora

Em relação ao gel comercial (Figura 30) as curvas de G' e G'' mostraram-se paralelas e G' ficou acima de G'' , indicando que o fator elástico sobrepôs o fator viscoso e durante todo o arranjo de frequência não houve alteração dos mesmos, comprovando assim que o gel comercial utilizado na clínica possui região viscoelástica próximo ao linear e praticamente não há perda por degradação, mantendo-se o mais ideal que os géis amostras (SHAO *et al.*, 2012).

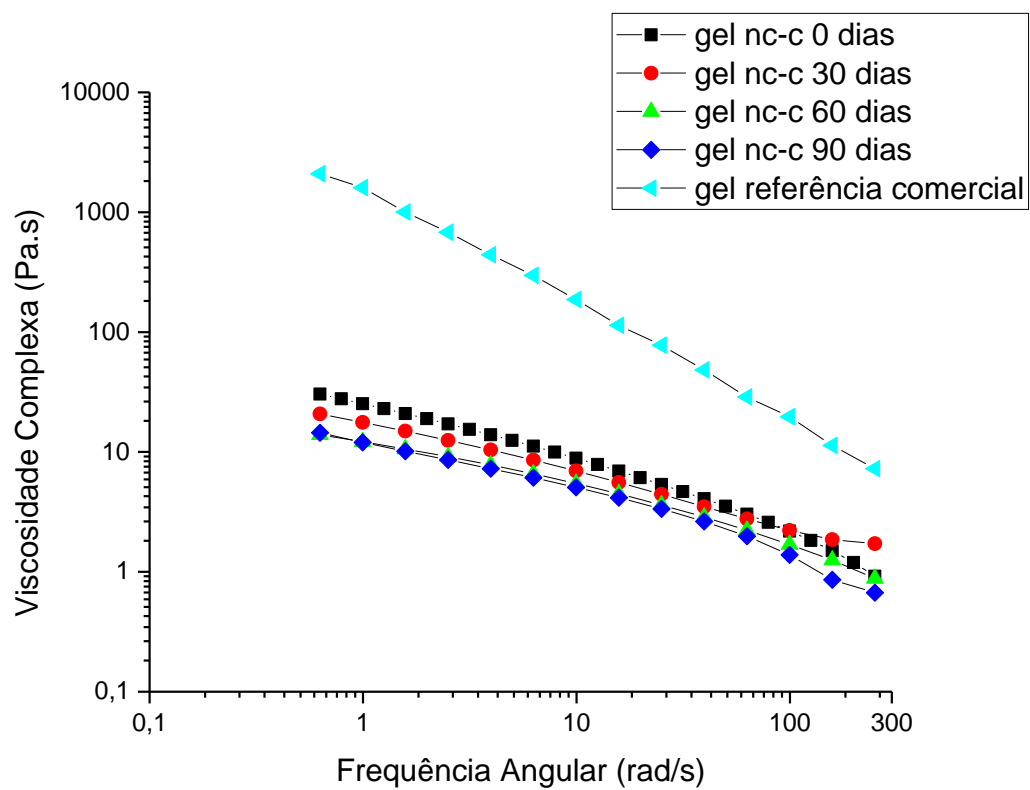
FIGURA 30 – Análise reológica do gel comercial utilizado na clínica



Fonte: A autora

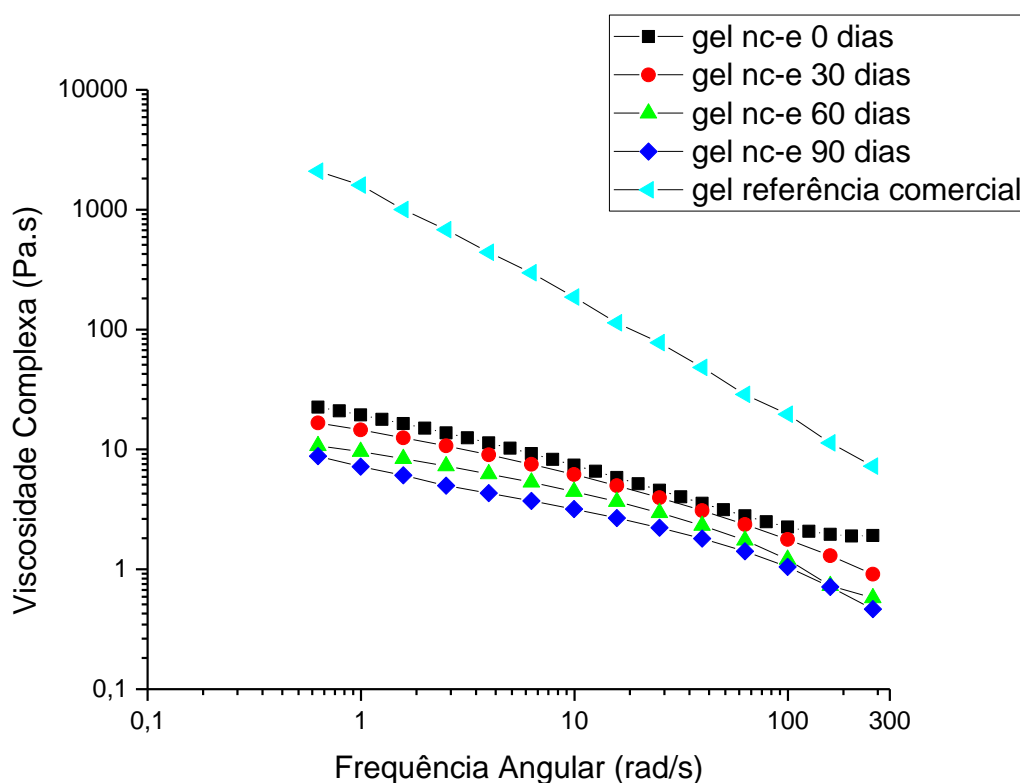
As Figuras 31 e 32 comparam as curvas de viscosidade dos géis comercial com o gel contendo NC-C e o gel contendo NC-E, respectivamente. Em relação a Figura 31 foi possível observar que ocorreu uma perda da viscosidade do gel comercial e das amostras (que possuem viscosidade bem abaixo do comercial) com relação a frequência, porém a perda de viscosidade das amostras ocorre de maneira mais sutil quando comparada com o comercial e também foi possível observar que com o passar do tempo de armazenamento, as amostras ficaram mais fluidas. O mesmo ocorreu para as amostras de gel contendo NC-E (Figura 32), porém com a diferença de que essas amostras possuíam uma maior perda de viscosidade com o tempo e isso foi observado no gráfico, já que as curvas aparecem mais separadas entre si quando comparado com o gel controle sem fármaco (SHAO *et al.*, 2012).

FIGURA 31 – Análise reológica do gel comercial e gel contendo as nanocápsulas sem fármaco (NC-C)



Fonte: A autora

FIGURA 32 – Análise reológica do gel comercial e gel contendo as nanocápsulas contendo Eugenol (NC-E)



Fonte: A autora

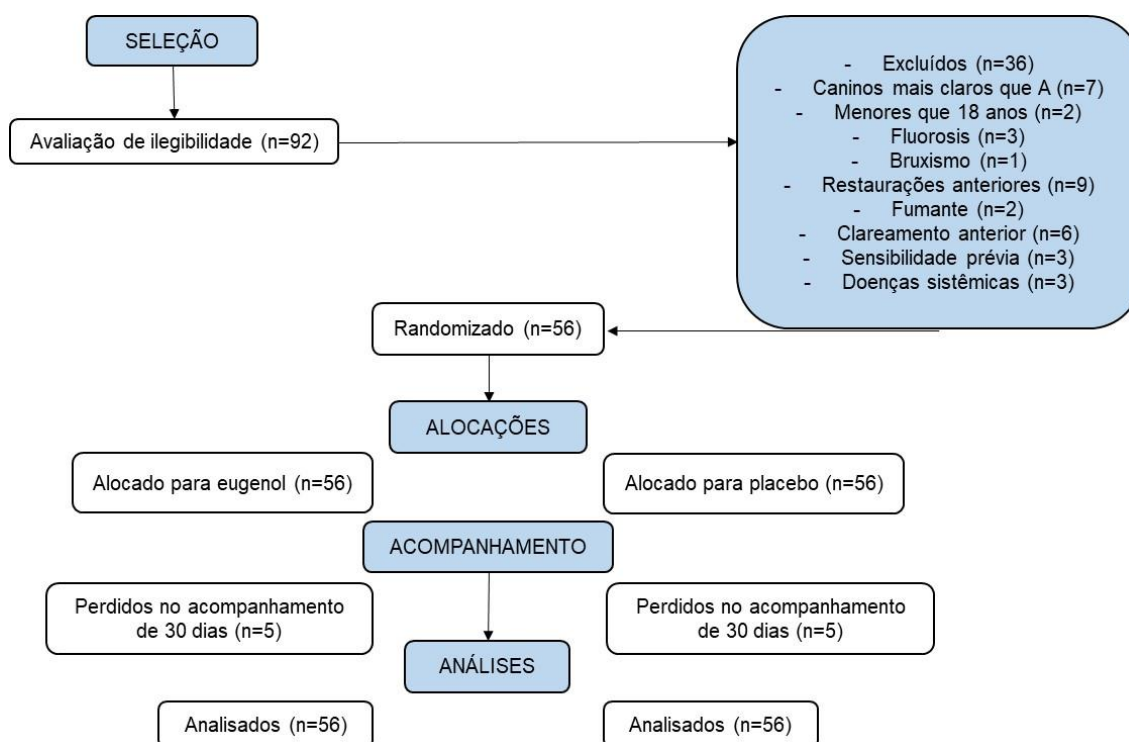
A partir dessas análises ficou claro que o gel contendo NC-E possui uma menor viscosidade do que o gel controle quando submetido a altas frequências de rotação já que o mesmo perde viscosidade e com isso, o mesmo se mantém estável até 30 dias após o preparo de desenvolvimento (SHAO *et al.*, 2012).

5.7 AVALIAÇÃO CLÍNICA DO GEL

5.7.1 Características dos Participantes Incluídos

Foram selecionados 56 participantes de acordo com os critérios de elegibilidade (Figura 33). Setenta e sete por cento dos participantes eram mulheres e a idade dos pacientes variou de 18 a 39 anos, com média de idade de $22,4 \pm 4,0$ anos. A cor da linha de base dos pacientes com SGU (Vita Classical) foi de $10,1 \pm 2,3$ para o grupo eugenol e $10,3 \pm 2,5$ para o grupo placebo.

FIGURA 33 – Diagrama do fluxo do ensaio clínico, incluindo informações detalhadas sobre os pacientes



Fonte: A autora

5.7.2 Adesão ao Protocolo e Abandono

Cinco pacientes interromperam a intervenção nesta investigação clínica após a primeira sessão de clareamento por motivos pessoais. Todos os participantes compareceram às visitas de *recall* duas semanas após o clareamento, com exceção dos cinco participantes que desistiram do estudo. A Figura 33 mostra o fluxograma dos participantes nas diferentes fases do desenho do estudo.

5.7.3 Sensibilidade Dental

Em relação ao risco absoluto de SD, não foi observada diferença significativa entre os grupos, conforme pode ser visto na Tabela 14 ($p = 0,51$). O risco relativo, juntamente com o intervalo de confiança de 95% (0,94 [IC 95%] 0,78 - 1,12), também é evidência de que o uso do eugenol tópico não teve efeito na redução da SD. Os

dados de sensibilidade dental nas duas escalas de dor foram estatisticamente semelhantes ($p > 0,05$; Tabelas 15 e 16).

TABELA 14 – Comparação do número de pacientes que apresentaram ou não sensibilidade entre os grupos

Tratamento	Sensibilidade dentária (n de participantes)			
	Sim	Não	Risco Absoluto (95% CI)	Risco Relativo (95% CI)
Eugenol	44	12	78 (66-87)	0.94 (0,78-1,12)
Placebo	47	9	84(72-87)	

Fonte: A autora

*Nota: Mc Nemar test ($p=0,51$)

Abreviações: IC Intervalo de confiança

TABELA 15 – Médias dos valores de sensibilidade dental em diferentes tempos usando a escala NRS

Tempos de avaliação	Eugenol ^a	Placebo	Valor de p^b
Durante o clareamento	0 (0-1) A	0 (0-1) A	0,43
Após 1 hora	1 (0,5-2) B	1 (0-2) B	0,56
Após 24 horas	1 (0-2) B	1 (0-2) A, B	0,33
Após 48 horas	0 (0-0) C	0 (0-0,5) C	0,85

^a Teste de Friedman

^b Teste de Wilcoxon pareado

TABELA 16 – Médias e desvio padrão da intensidade de DS em diferentes pontos de avaliação usando a escala VAS

Tempos de avaliação	Eugenol ^a	Placebo ^a	Valor de p^b	Diferença de médias (95%CI)
Durante o clareamento	0,8+-1,6B	1,1+-1,9 b	0,25	-0,3(-0,96 a 0,36)
Após 1 hora	2,4 +-2,9A	2,4 +-2,7 a	0,94	0,0 (-1,05 a 1,05)
Após 24 horas	2,1 +-2,6A	2,1+-2,6 a	0,54	0,0 (0,97 a 0,97)
Após 48 horas	0,3+-0,6C	0,3+-0,6 c	0,83	0,0 (0,22 a 0,22)

^a ANOVA uma via seguido de pós-teste de Tukey

^b Teste t pareado

5.7.4 Avaliação de Cor

Utilizando o espectrofotômetro easysshade no final do protocolo de clareamento, foi detectado aproximadamente 5 unidades de cor para ambos os grupos e o ΔE e ΔE 2000 variaram em aproximadamente 11 e 7 unidades respectivamente (Tabela 18), indicando a eficácia do clareamento. Os resultados das análises por meio das escalas (Vita Clássica: $p = 0,35$; Vita Bleachedguide: $p = 0,17$) e do espectrofotômetro ΔE ($p = 0,70$) e ΔE 2000 ($p = 0,69$) confirmam a hipótese de equivalência de cores entre os grupos analisados. O tamanho do efeito e o intervalo de confiança para a diferença média geral também são evidências de que não há diferença estatística entre os grupos (Tabela 17).

TABELA 17 – Médias e desvio padrão de Δ SGU obtidos com VitaPan Classical, Vita Bleachedguide, ΔE , $\Delta E00$ e Wld entre a linha de base e 2 semanas após o clareamento junto com o valor p e a diferença média (IC 95%)

Ferramenta de avaliação de cor	Eugenol ^a	Placebo ^a	Valor de p^b	Diferença de médias (95%CI)
Vita Classical	4,6+-4,0	4,9+-4,0	0,35	-0,3(-1,80 a 1,20)
Vita Bleached	4,9+-5,0	5,1+-5,0	0,17	-0,2(-2,07 a 1,67)
ΔE_{ab}	11,6+-4,3	11,4+-4,4	0,70	-0,2(1,43 a 1,83)
ΔE_{00}	7,3+-2,4	7,4+-2,4	0,69	-0,1(1,00 a 0,80)
Wld	32,2+-6,6	32,4+-6,8	0,82	-0,2(2,71 a 2,31)

^a Teste t pareado

5.7.5 Efeitos Adversos

Nenhum paciente relatou alergia ou quaisquer efeitos adversos além da sensibilidade dentária, após a aplicação tópica de eugenol. Cinco pacientes fizeram uso de analgésicos ou anti-inflamatórios para alívio da dor. Três tomaram paracetamol, um dos quais também tomou dipirona e dois pacientes tomaram ibuprofeno. Destes cinco pacientes, todos, exceto um, sentiram SD em ambos os

grupos. Apenas um participante sentiu apenas a sensibilidade na hemiarcada que o gel placebo foi aplicado.

Nenhum paciente relatou sensibilidade gengival durante e após as duas sessões de clareamento.

A partir dos resultados obtidos concluiu-se que a administração do gel dessensibilizante de NC-E a 1% antes do clareamento dental em consultório não reduziu o risco ou intensidade de SD induzida por clareamento dental e não interferiu na cor do clareamento dental.

6 CONCLUSÕES

No presente trabalho, NC-E, foram obtidos com sucesso pelo método da deposição interfacial do polímero pré-formado.

As análises de diâmetro médio, IPD e potencial zeta demonstraram que as NC-C e as NC-E apresentaram diâmetro dentro dos padrões de sistemas nanoestruturados, monodispersos e estáveis.

A análise morfológica e de superfície FEG -SEM demonstrou que NC-C e NC-E apresentaram um formato esférico com superfície lisa e regular.

A análise estrutural por FTIR confirmou que não houve reação química que mudasse a estrutura química do fármaco ou polímero, indicando que ambos não interagem significativamente. A análise térmica por TG também indicou que não há interação térmica entre ambos e que a nanoencapsulação melhorou a estabilidade térmica do fármaco.

Os ensaios para verificar a estabilidade físico-química das nanocápsulas mostraram que todas as formulações se mantiveram estáveis até o período de 60 dias, portanto, permanecem resultando em valores confiáveis nesse tempo.

O método desenvolvido por UHPLC foi, linear, preciso, exato e robusto para uma rápida determinação do fármaco e pode ser utilizado para estudos da estabilidade e quantificação do eugenol. A formulação apresentou alta eficiência de encapsulação e o método analítico empregado mostrou-se capaz de quantificar o eugenol nanoencapsulado no sistema polimérico desenvolvido, fornecendo resultados confiáveis.

As análises reológicas demonstraram que o gel contendo NC-E possui uma menor estabilidade do que o gel controle quando submetido a altas frequências de rotação e o mesmo se mantém estável até 30 dias após o preparo de desenvolvimento.

A partir dos resultados obtidos na avaliação clínica conclui-se que a administração do gel dessensibilizante de nanocápsulas de eugenol a 1% antes do clareamento dental em consultório não reduziu o risco ou intensidade de SD induzida por clareamento dental e não interferiu na cor do clareamento dental.

REFERÊNCIAS

- ADIBKIA, K. et al. Naproxen-eudragit® RS100 nanoparticles: Preparation and physicochemical characterization. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 83, n. 1, p. 155-159, 2011.
- AHMAD, N. et al. Quantification and Brain Targeting of Eugenol-Loaded Surface Modified Nanoparticles Through Intranasal Route in the Treatment of Cerebral Ischemia. **Drug Research**, v. 68, n. 10, p. 584-595, 2018.
- ALI et al. Essential oils used in aromatherapy: A systemic review. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 5, n. 8, p. 589-598, 2015.
- ALKAHTANI, R. Dentin desensitizing agents: too many options. **Academy of General Dentistry**, p. 17-20, 2016.
- ARMÊNIO, R. V et al. The Effect of Fluoride Gel Use on Bleaching Sensitivity: A Double-Blind Randomized Controlled Clinical Trial. **The Journal of the American Association**, v. 139, p. 591-597, 2010.
- BARANOVA et al. Tooth Formation: Are the Hardest Tissues of Human Body Hard to Regenerate? **Molecular Sciences**, v. 21, p. 1-31, 2020.
- BHATIA, S. **Natural Polymers Drug Delivery Systems**. 1. ed. Springer, 2016.
- BIZERRA, A.; SILVA, V. Sistema de liberação controlada: Mecanismos e aplicações. **Revista Saúde e Meio Ambiente**, v. 3, n. 2, p. 1-12, 2016.
- BORTOLATTO J.F.; PRETEL H.; FLOROS M.C.; LUIZZI A.C.; DANTAS A.A.; FERNANDEZ E.; MONCADA G.; de OLIVEIRA O.B., Jr. Low concentration H₂O₂/TiO₂ in office bleaching: A randomized clinical trial. **J. Dent. Res.**, v. 93, n. 7, p. 66S-71S, 2014.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia de controle de qualidade de produtos cosméticos**. Brasília: Anvisa, 2007.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. Resolução nº 166, de 24 de julho de 2017. **Diário Oficial da União**, Brasília, 25 jul. 2017. p. 22.
- CAMARGO, G. A. et al. Stability testing of tacrolimus-loaded poly(ϵ -caprolactone) nanoparticles by physicochemical assays and Raman spectroscopy. **Vibrational Spectroscopy**, v. 110, p. 1-11, 2020.
- CARDOSO, P. C. et al. Clinical effectiveness and tooth sensitivity associated with different bleaching times for a 10 percent carbamide peroxide gel. **Journal of the American Dental Association**, v. 141, n. 10, p. 1213-1220, 2010.

CARTAXO, A. Nanoparticles types and properties – understanding these promising devices in the biomedical area. **International Journal of Nanomedicine**, p. 1–8, 2018.

CERQUEIRA, R. R. DE et al. Efeito do uso de agente dessensibilizante na efetividade do clareamento e na sensibilidade dental. **Revista da Associação Paulista de Cirurgiões Dentistas**, v. 67, n. 1, p. 64-67, 2013.

CHARAKORN, P. et al. The effect of preoperative ibuprofen on tooth sensitivity caused by in-office bleaching. **Operative dentistry**, v. 34, n. 2, p. 131-135, 2009.

CHAVES, P. S. et al. Carvedilol-loaded nanocapsules: Mucoadhesive properties and permeability across the sublingual mucosa. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 114, p. 88-95, 2017.

CHEN, H. et al. Nanonization strategies for poorly water-soluble drugs. **Drug Discovery Today**, v. 16, n. 7-8, p. 354-360, 2011.

CHUNG, G. et al. Activation of transient receptor potential ankyrin 1 by eugenol. **Neuroscience**, v. 261, p. 153-160, 2014.

CONTRI, R. V et al. Vegetable oils as core of cationic polymeric nanocapsules: influence on the physicochemical properties. **Journal of Experimental Nanoscience**, v. 8, n. 5, p. 913-924, 2013.

COSTA, C. A. S. et al. Human pulp responses to in-office tooth bleaching. **Journal of Esthetic and Restorative Dentistry**, v. 26, n. 5, p. e59-e64, 2014.

DALCIN, A. J. F.; OURIQUE, A. F.; GOMES, P. Cationic Nanocapsules Containing Eudragit Rs100® and Its Potential for Application in Nanomedicine 1. **Disciplinarum Scientia**, v. 18, n. 3, p. 545-566, 2017.

DANIEL, A. N. et al. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of eugenol essential oil in experimental animal models. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, n. 1 B, p. 212-217, 2009.

DARRIBA, I. L. et al. Influence of treatment duration on the efficacy of at-home bleaching with daytime application: a randomized clinical trial. **Clinical Oral Investigations**, v. 1, p. 1-9, 2018.

DIMER, F. A. et al. Impact of nanotechnology on public health: Production of medicines. **Química Nova**, v. 36, n. 10, p. 1520-1526, 2013.

DOMINGUES, G. S. et al. Micropartículas nanorrevestidas contendo um fármaco modelo hidrofóbico: preparação em etapa única e caracterização biofarmacêutica. **Química Nova**, v. 31, n. 8, p. 1966-1972, 2008.

ESMAEILI, F. et al. Anti-inflammatory effects of eugenol nanoemulsion as a topical delivery system. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 21, n. 7, p. 887-893, 2016.

FARAJI, A. H.; WIPF, P. Nanoparticles in cellular drug delivery. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 8, p. 2950-2962, 2009.

Food and Drug Administration. **Guidance for industry: Considering Whether and FDA-Regulated Product Involves the Application of Nanotechnology**, 2014.

Disponível em:

<http://www.fda.gov/RegulatoryInformation/Guidances/ucm257698.htm>. Acesso em: 07 jan. 2019.

GHOSH, V.; MUKHERJEE, A.; CHANDRASEKARAN, N. Eugenol-loaded antimicrobial nanoemulsion preserves fruit juice against microbial spoilage. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 114, p. 392-397, 2014.

GOMES, M. L. S. et al. Long-lasting anti-platelet activity of cilostazol from poly(ϵ -caprolactone)-poly(ethylene glycol) blend nanocapsules. **Materials Science and Engineering C**, [s. l.], v. 94, p. 694–702, 2019.

HEERA, P.; SHANMUGAM, S. Nanoparticle characterization and application: an overview. **International journal of current Microbiology and Applied Sciences**, v. 4, n. 8, p. 379-386, 2015.

HERMAN, R. A., et al. Essential Oils and Their Applications -A Mini Review. **Advances in Nutrition & Food Science**, v. 4, n. 1, p. 1-13, 2019.

HU, Q. et al. Antimicrobial eugenol nanoemulsion prepared by gum arabic and lecithin and evaluation of drying technologies. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 87, p. 130-140, 2016.

ICH, H. T. G. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1). **Japan Journal of Medical Informatics**, v. 18, n. 1, p. 71-77, 2005.

JAVIDI, M. et al. Cytotoxicity of a new nano zinc-oxide eugenol sealer on murine fibroblastos. **Iranian Endodontic Journal**, v. 10, n. 4, p. 231-235, 2015.

KAMATOU, G. P.; VERMAAK, I.; VILJOEN, A. M. Eugenol - From the remote Maluku Islands to the international market place: A review of a remarkable and versatile molecule. **Molecules**, v. 17, n. 6, p. 6953-6981, 2012.

KUMARI, A.; YADAV, S. K.; YADAV, S. C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 75, n. 1, p. 1-18, 2010.

LAL, R. et al. Biochemistry of microbial degradation of hexachlorocyclohexane and prospects for bioremediation. **Microbiology and molecular biology reviews: MMBR**, v. 74, n. 1, p. 58-80, 1 mar. 2010.

LIU et al. Pathogenesis, diagnosis and management of dentin hypersensitivity: an evidence-based overview for dental practitioners. **BMC Oral Health**, v. 20, p. 1-20, 2020.

LOPES, W.A.; FASCIO, M. Esquema para interpretação de espectros de substâncias orgânicas na região do infravermelho. **Química Nova**, Salvador, v. 27, n. 4, p. 670-673, 2004.

MARKWALTER, C. E. et al. Flash nanoprecipitation for the encapsulation of hydrophobic and hydrophilic compounds in polymeric nanoparticles. **Journal of Visualized Experiments**, v. 2019, n. 143, p. 1-13, 2019.

MARQUES, I.; LOPES, C.; SOUTO, E. Novos sistemas terapêuticos nanotecnológicos. **Revista da Faculdade de Ciências da Saúde**, v. 6, n. 1, p. 60-68, 2009.

MARTINI, E. C., et al. Bleaching-induced tooth sensitivity with application of a desensitizing gel before and after inoffice bleaching: a triple-blind randomized clinical trial. **Clin Oral Investig**. V. 24, n. 1, p. 385-394, 2019.

MELLES, D. et al. In chemico evaluation of skin metabolism: Investigation of eugenol and isoeugenol by electrochemistry coupled to liquid chromatography and mass spectrometry. **Journal of Chromatography**, v. 913-914, n. 1, p. 106-112, 2013.

MELO NUNES, N. F. S. et al. Desenvolvimento e caracterização de nanocápsulas de poli (L-lactídeo) contendo benzocaína. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 65-69, 2010.

MOURA, I. R.; RABELLO, T. B.; PEREIRA, K. F. A influência do eugenol nos procedimentos adesivos. **Revista Brasileira Odontologia**, v. 70, p. 28-32, 2013.

NADAL, J. M. et al. A stability-indicating HPLC-DAD method for determination of ferulic acid into microparticles: Development, validation, forced degradation, and encapsulation efficiency. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, v. 2015, p. 7-11, 2015.

NAGAVARMA, B. V. N. et al. Different techniques for preparation of polymeric nanoparticles- A review. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 5, n. 3, p. 16-23, 2012.

NECKEL, G. L.; LEMOS-SENNA, E. Preparação e caracterização de nanocápsulas contendo camptotecina a partir do ácido poli (D,L-lático) e de copolímeros diblocos do ácido poli (D,L-lático) e polietilenoglicol. **Acta Farmacêutica Bonaerense**, v. 24, n. 4, p. 504-511, 2005.

- OLDOINI, G. et al. Effects of Amorphous Calcium Phosphate Administration on Dental Sensitivity during In-Office and At-Home Interventions. **Dentistry Journal**, v. 6, n. 52, p.1-8, 2018.
- OLIVEIRA, M. A.; YOSHIDA, M. I.; GOMES, E. C. L. Análise térmica aplicada a fármacos e formulações farmacêuticas na indústria farmacêutica. **Química Nova**, v. 34, n. 7, p. 1224-1230, 2011.
- OLIVEIRA, R. et al. Volatile chemical constituents of rich spices in eugenol. **Brasilian Journal of Pharmacognosy**, v. 3, p. 771-775, 2009.
- PASZKO, E. et al. Nanodrug applications in photodynamic therapy. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 8, n. 1, p. 14-29, 2011.
- PATRA, C. N. et al. Pharmaceutical significance of Eudragit: A review. **Future Journal of Pharmaceutical sciences**, v. 1, n. 1, p. 1-52, 2017.
- PAULA, E. A. et al. Administration of Ascorbic Acid to Prevent Bleaching-induced Tooth Sensitivity: A Randomized Triple-blind Clinical Trial. **Operative Dentistry**, v. 39, n. 2, p. 128-135, 2014.
- PAULA, E. A. et al. In-office bleaching with a two- and seven-day intervals between clinical sessions: A randomized clinical trial on tooth sensitivity. **Journal of Dentistry**, v. 43, n. 4, p. 424-429, 2015.
- PAULA, E. A. et al. Perioperative use of an anti-inflammatory drug on tooth sensitivity caused by in-office bleaching: a randomized, triple-blind clinical trial. **Clinical Oral Investigations**, v. 1, p. 1-7, 2013a.
- PAULA, E. A. et al. The Effect of Perioperative Ibuprofen Use on Tooth Sensitivity Caused by In-Office Bleaching. **Operative Dentistry**, v. 38, n. 6, p. 601-608, 2013b.
- PERRICONE, M. et al. Bioactivity of essential oils: are view on their interaction with food componentes. **Frontier in Microbiology**, v. 6, p. 1-7, 2017.
- PIGNATELLO, R. et al. Preparation and analgesic activity of eudragit RS100® microparticles containing diflunisal. **Drug Delivery: Journal of Delivery and Targeting of Therapeutic Agents**, v. 8, n. 1, p. 35-45, 2001.
- PRAMOD, K. et al. Eugenol nanocapsule for enhanced therapeutic activity against periodontal infections. **Journal of Drug Targeting**, v. 24, n. 1, p. 24-33, 2016.
- PRAMOD, K.; ANSARI, S.; ALI, J. Eugenol: a natural compound with versatile pharmacological actions. **Natural product communications**, v. 5, n. 12, p. 1999-2006, 2010.
- QI, Y. et al. The mutually beneficial relationship of patents and scientific literature: topic evolution in nanoscience. **Scientometrics**, v. 115, n. 2, p. 893-911, 2018.

RAO, J. P.; GECKELER, K. E. Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. **Progress in Polymer Science**, v. 36, n. 7, p. 887-913, 2011.

REIS, A et al. Assessment of tooth sensitivity using a desensitizer before light-activated bleaching. **Operative dentistry**, v. 36, n. 1, p. 12-17, 2011.

REIS A et al. Efficacy of and effect on tooth sensitivity of in-office bleaching gel concentrations: A randomized clinical trial. **Oper. Dent.**, v. 38, p. 386-393, 2013.

REIS, C. P. et al. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 2, n. 1, p. 8-21, 2006.

REIS, C. P. et al. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 2, n. 1, p. 8-21, 2006.

REZENDE, M. et al. Pre-and postoperative dexamethasone does not reduce bleaching-induced tooth sensitivity. **The Journal of the American Association**, v. 1, p. 41-49, 2016b.

REZENDE, M. et al. Predictive factors on the efficacy and risk/intensity of tooth sensitivity of dental bleaching: A multi regression and logistic analysis. **Journal of Dentistry**, v. 45, p. 1-6, 2016a.

REZENDE, M. et al. Tooth Sensitivity After Dental Bleaching With a Desensitizer-containing and a Desensitizer-free Bleaching Gel: A Systematic Review and Meta-analysis. **Operative Dentistry**, v. 44, n. 2, p. e58-e74, 2019.

REZENDE, M. et al. Effect of topical application of dipyrone on dental sensitivity reduction after in-office dental bleaching: a randomized, triple-blind multicenter clinical trial. **Journal of American Dental Association**, v. 149, n. 5, p. 363-371, 2018.

RIBANI, M. et al. Validação em Métodos Cromatográficos e Eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

SCHAFFAZICK, S. R. et al. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 726-737, 2003.

SCHAFFAZICK, S. R. et al. Development of nanocapsule suspensions and nanocapsule spray-dried powders containing melatonin. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 17, n. 3, p. 562-569, 2006.

SCHAFFAZICK, S. R.; POHLMANN, A. R. Caracterização e Estudo de Estabilidade de Suspensões de Nanocápsulas e de Nanoesferas Poliméricas Contendo Diclofenaco. **Acta Farmacêutica Bonaerense**, v. 21, n. 2, p. 99-106, 2002.

SEVERINO, P. et al. Polímeros Sintéticos biodegradáveis: Matérias-primas e métodos de produção de micropartículas para uso em drug delivery e liberação controlada. **Polímeros**, v. 21, n. 4, p. 286-292, 2011b.

SEVERINO, P. et al. Polímeros Usados como Sistemas de Transporte de Princípios Ativos. **Polímeros**, v. 1, n. 1, p. 1-8, 2011a.

SHAH, A. Desensitizing Agents: A Review. **Medical & Clinical Reviews**, v. 3, n. 3, p. 1-3, 2017.

SHAO, Z. et al. Synthesis and suspension rheology of titania nanoparticles grafted with zwitterionic polymer brushes. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 386, p. 135-140, 2012.

SHEN, Y. et al. In vivo and in vitro metabolism of aspirin eugenol ester in dog by liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Biomedical Chromatography**, v. 29, n. 1, p. 129-137, 2015.

SIQUEIRA, L. B. O. et al. Clove oil nanoemulsion showed potent inhibitory effect *Candida ssp*. **Nanotechnology**, p. 1-40, 2019.

SIQUEIRA, M. F. R. **Uso da dexametasona para prevenção da sensibilidade dental pós-clareamento em consultório: Estudo clínico randomizado, triplo cego, placebo-controlado**. 2014. 74 f. Tese (Doutorado em Odontologia) – Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2014.

SOUTO, E. B.; SEVERINO, P.; SANTANA, M. H. A. Preparação de Nanopartículas Poliméricas a partir da Polimerização de Monômeros. **Polímeros**, v. 1, n. 1, p. 1-5, 2011.

TAY, L. Y. et al. Assessing the effect of a desensitizing agent used before in office-tooth bleaching. **The Journal of the American Dental Association**, v. 140, n. 10, p. 1245-1251, 2009.

TEIXEIRA, M. J. Mecanismos de Ocorrência de Dor. **Revista de Medicina FMUSP**, São Paulo, v. 83, n. 3-4, p. 69-113, 2004.

TRAVASSOS, K. et al. Influência de cimentos contendo eugenol em restaurações adesivas: uma revisão de literatura. **Revista Ciência Saúde**, v. 13, p. 101-107, 2011.

TSUCHIYA, H. Anesthetic agents of plant origin: A review of phytochemicals with anesthetic activity. **Molecules**, v. 22, n. 8, p. 1-34, 2017.

VILLANOVA, J. C. O.; ORÉFICE, R. L.; CUNHA, A. S. Aplicações Farmacêuticas de Polímeros. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 20, n. 1, p. 1-14, 2010.

VOCHIKOVSKI, M. L., et al. Bleaching sensitivity with a desensitizing in-office bleaching gel: a randomized doubleblind clinical trial. **Quintessence Int**, v. 51, n. 10, p. 788-797, 2020.

ANEXO A - PARECER CONSUBSTANCIADO DE APROVAÇÃO DA PESQUISA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE
PONTA GROSSA - UEPG

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Efeito da aplicação tópica de Eugenol na sensibilidade dental causada pelo Clareamento em Consultório.

Pesquisador: Alessandro Dourado Loguercio

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 21585519.2.0000.0105

Instituição Proponente: Universidade Estadual de Ponta Grossa

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.606.971

Apresentação do Projeto:

Projeto de Pesquisa:

Efeito da aplicação tópica de Eugenol na redução da sensibilidade dental decorrente do clareamento dental em consultório: estudo clínico

randomizado, triplo cego, placebo-controlado, boca-dividida. Será um ensaio clínico randomizado, onde os voluntários de um grupo receberá aplicação tópica de dessensibilizante contendo eugenol antes do clareamento dental e para os voluntários do outro grupo será aplicado gel placebo previamente ao clareamento dental.

O clareamento dental é realizado frequentemente sem a aplicação tópica de dessensibilizantes, contudo um grande percentual de pacientes

submetidos ao clareamento dental relatam sensibilidade em algum momento do clareamento, que pode variar de leve a severa. Tal fato, tem

motivado pesquisadores a testarem substâncias dessensibilizantes com o intuito de reduzir a sensibilidade dental pós-clareamento, trazendo maior

conforto aos pacientes que desejam ter os seus dentes clareados.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar o efeito da o efeito da aplicação tópica de eugenol 1% nanoencapsulado, em comparação

Endereço: Av. Gen. Carlos Cavalcanti, nº 4748. UEPG, Campus Uvaranas, Bloco M, Sala 116-B
Bairro: Uvaranas **CEP:** 84.030-900
UF: PR **Município:** PONTA GROSSA
Telefone: (42)3220-3108 **E-mail:** coep@uepg.br

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE
PONTA GROSSA - UEPG



Continuação do Parecer: 3.606.971

com um placebo, no risco absoluto e intensidade da sensibilidade dental pós-operatória decorrente da realização da técnica de clareamento dental de consultório, através das escalas visual analógica (VAS 0-10) e numérica (NRS 0-4).

Objetivo Secundário:

Avaliar o efeito da aplicação tópica de eugenol 1% nanoencapsulado, na eficácia do clareamento obtido com a técnica de clareamento dental em consultório com peróxido de hidrogênio 35%, através das escalas de cor Vita Classical e Vita Bleachedguide, e pelo espectrofotômetro Vita Easyshade.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

O contato direto do agente clareador com o tecido gengival pode ocasionar ardência, descamação e ulceração. Áreas com eventuais ulcerações serão tratadas pelos pesquisadores responsáveis sintomaticamente com pomada anestésica de lidocaína (xylocaína pomada 5%) e Omcilon-A

Orabase. Aos voluntários que apresentarem sensibilidade será prescrito analgésico e/ou anti-inflamatórios. Em relação ao dessensibilizante contendo eugenol, estudos prévios indicam que o eugenol tem sido aplicado com segurança topicamente até 5% (Esmaeili et al. 2015). O gel de eugenol que será utilizado no presente estudo apresentar uma menor concentração, e a consistência gel evitará o escoamento. Além disso, o gel de eugenol será aplicado apenas na superfície dental, após a proteção da gengiva com a resina TopDam e dos afastadores de lábio e bochecha. Caso o gel entre em contato com os tecidos moles será lavado abundantemente com água e aspirado com sugadores descartáveis.

Benefícios:

A técnica de clareamento dental em consultório e os produtos que serão empregados neste estudo são utilizados rotineiramente na prática odontológica de maneira segura. Os indivíduos da pesquisa receberão gratuitamente todo o clareamento, o gel dessensibilizante, bem como o agente para o tratamento de uma eventual sensibilidade dental. O monitoramento dos voluntários

Endereço: Av. Gen. Carlos Cavalcanti, nº 4748. UEPG, Campus Uvaranas, Bloco M, Sala 116-B
 Bairro: Uvaranas CEP: 84.030-900
 UF: PR Município: PONTA GROSSA
 Telefone: (42)3220-3108 E-mail: coep@uepg.br

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE
PONTA GROSSA - UEPG



Continuação do Parecer: 3.606.971

durante todo o período de experimentação clínica será realizado pelos pesquisadores responsáveis. O efeito esperado da utilização do dessensibilizante tópico beneficiará todos os pacientes que desejam ter seus dentes clareados. A resposta da pesquisa pode ainda trazer benefício clínico, pois se espera que a administração prévia do gel dessensibilizante (eugenol 1%) reduza ou previna a sensibilidade pós-operatória decorrente da realização da técnica de clareamento dental de consultório

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Número de pacientes que relatam dor espontânea em algum momento durante a técnica de clareamento dental e até 48 horas após o procedimento, através de auto-relato. Este número será transformado em percentual de pacientes com dor e será denominado de risco absoluto de sensibilidade dental. A intensidade da sensibilidade dental será avaliada através da escala numérica de 5 pontos (NRS 0-4), sendo os valores apresentados como mediana (1º e 3º intervalos interquartil) e pela escala visual analógica VAS (0-10), onde os valores serão apresentados como média e desvio padrão; em diferentes períodos (durante o clareamento dental, até 1 h, de 1 h a 24 h e de 24 a 48 h pós-clareamento).

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Em anexo e de acordo com as normas 466/2012 e 510/2018

Recomendações:

Enviar o relatório final após o término do projeto por Notificação via Plataforma Brasil para evitar pendências

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P	29/07/2019		Aceito

Endereço: Av. Gen. Carlos Cavalcanti, nº 4748. UEPG, Campus Uvaranas, Bloco M, Sala 116-B
 Bairro: Uvaranas CEP: 84.030-900
 UF: PR Município: PONTA GROSSA
 Telefone: (42)3220-3108 E-mail: coep@uepg.br

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE
PONTA GROSSA - UEPG



Continuação do Parecer: 3.608.971

Básicas do Projeto	ETO_1401586.pdf	20:52:08		Aceito
Folha de Rosto	Folha_Rosto_Eugenol.pdf	29/07/2019 20:26:51	Alessandro Dourado Loguercio	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.doc	29/07/2019 02:14:29	Alessandro Dourado Loguercio	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_eugenol.doc	29/07/2019 02:14:22	Alessandro Dourado Loguercio	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PONTA GROSSA, 28 de Setembro de 2019

Assinado por:
ULISSES COELHO
(Coordenador(a))

Endereço: Av. Gen. Carlos Cavalcanti, nº 4748. UEPG, Campus Uvaranas, Bloco M, Sala 116-B
 Bairro: Uvaranas CEP: 84.030-900
 UF: PR Município: PONTA GROSSA
 Telefone: (42)3220-3108 E-mail: coep@uepg.br

ANEXO B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

A pesquisa “Efeito da aplicação pré-operatória de eugenol na redução da sensibilidade dental decorrente do clareamento dental em consultório: estudo clínico randomizado, triplo cego, placebo-controlado, boca-dividida”, tem como objetivo verificar a eficácia do eugenol 1%, na prevenção da sensibilidade dental causada pelo clareamento em consultório.

A resposta da pesquisa pode trazer benefício clínico, pois se espera que a administração tópica do eugenol reduza ou previna a sensibilidade gerada durante o clareamento dental, decorrente da realização da técnica em consultório.

Esta pesquisa clínica será realizada nas clínicas odontológicas da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pelos pesquisadores Dra. Márcia Fernanda de Rezende Siqueira e a mestranda Renata Maria Terra, sob orientação do professor Dr. Alessandro Dourado Loguercio. Para a execução da pesquisa serão necessários 80 voluntários que atendam aos critérios de seleção e concordem em participar de livre e espontânea vontade.

O clareamento dental será realizado nas clínicas odontológicas da UEPG, onde o cirurgião-dentista aplicará o produto clareador sobre os dentes do voluntário. Será utilizado um gel clareador contendo peróxido de hidrogênio 35% (HP Maxx, FGM, Joinville, Santa Catarina, Brasil). Para proteger a gengiva, será utilizada uma resina (Top Dam, FGM) que funciona como uma barreira garantindo que apenas os dentes entrem em contato com o gel clareador, evitando possíveis queimaduras do gel na gengiva. Todo este procedimento leva aproximadamente 1 hora, e serão realizadas 2 sessões com intervalo de 1 semana entre elas. Antes da aplicação do gel clareador, o gel experimental será aplicado em uma hemiarcada enquanto que o gel placebo será aplicado na outra hemiarcada.

O eugenol será aplicado na superfície dental por 20 s em cada dente com auxílio de um pincel descartável e ficará em contato com o dente até completar 10 min. Após esse período o gel será removido com uma gaze e será iniciado o

Alguns pacientes durante o clareamento apresentam sensibilidade dos dentes, que é ocasionada pela ação do produto. Se o voluntário da pesquisa apresentar sensibilidade muito forte, será aplicado um gel dessensibilizante (Desensibilize KF 2%, FGM) e se necessário o paciente será medicado com analgésicos e/ou anti-inflamatórios. A utilização de qualquer agente químico utilizado para o clareamento dental pode ocasionar efeitos adversos como sensibilidade, ardência, descamação e ulceração das mucosas bucais, dependendo da sensibilidade individual. Após o relato de qualquer efeito adverso (exceto sensibilidade), o tratamento com o clareador será imediatamente suspenso, com a retirada do sujeito da pesquisa.

O uso do eugenol pode causar queimação e coceira, mas somente foram verificadas essas reações em concentrações maiores do que do dessensibilizante utilizado nesse estudo. Caso o paciente apresente alguma reação, o uso do eugenol será suspenso imediatamente, a região será lavada abundantemente com água e se necessário o paciente receberá assistência médica. O voluntário será removido da pesquisa, porém seu tratamento clareador será concluído. Para o tratamento de efeitos adversos os custos estão previstos no orçamento do projeto.

Quanto aos benefícios, os indivíduos da pesquisa terão seus dentes clareados, e receberão gratuitamente o clareamento. Os indivíduos terão a garantia de que receberão esclarecimento a qualquer dúvida, acerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados com a pesquisa. Os pesquisadores responsáveis assumem o compromisso de proporcionar informação atualizada obtida durante o estudo, ainda que esta possa afetar a vontade do indivíduo em continuar participando dele.

Os voluntários têm a liberdade de se recusar a participar da pesquisa ou de retirar seu consentimento a qualquer momento, sem sofrer qualquer tipo de prejuízo, ou represálias de qualquer natureza.

Os pesquisadores se comprometem a resguardar todas as informações individuais, tratando-as com impessoalidade e não revelando a identidade do sujeito que as originou.

Eu, _____,
certifico que tendo lido as informações acima e suficientemente esclarecido de todos os itens, pelos pesquisadores clínicos responsáveis: Dra. Márcia Fernanda de Rezende Siqueira, Renata Maria Terra e Dr. Alessandro Dourado Loguercio. Estou plenamente de acordo com a realização do experimento. Assim, eu concordo em participar como voluntário do trabalho de pesquisa, exposto acima. Certifico também ter recebido uma cópia deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Ponta Grossa, _____ de _____ de 2019.

Nome:

Assinatura:

Pesquisador

responsável:

1ª via da instituição, 2ª via do sujeito da pesquisa

Para entrar em contato com os pesquisadores:

Márcia Fernanda de Rezende Siqueira (42) 3220-3741

Renata Maria Terra (42) 3220-3741

Alessandro Dourado Loguercio (42) 3220-3741

ATENÇÃO: A sua participação em qualquer tipo de pesquisa é voluntária. Em caso de dúvida quanto aos seus direitos, entre em contato com a Comissão de Ética em Pesquisa da UEPG. Endereço – Av. Carlos Cavalcanti, n.4748, Bloco

ANEXO C – FICHA CLÍNICA**Grupo:**

Nome: _____ **Idade:** _____ **Gênero:** _____
Endereço: _____ **Email:** _____
Cidade: _____ **UF:** _____ **CEP:** _____ **Celular:** _____
Profissão: _____ **RG:** _____ **CPF:** _____
Endereço Comercial: _____ **Telefone comercial:** _____
Telefone Fixo/Familiar: _____

História médica

Está ou esteve em tratamento médico nos últimos 6 meses?			
Faz ou fez uso contínuo de algum medicamento nos últimos 6 meses?			
Quais? Anti-inflamatórios ()	Corticóides ()	Antibiótico ()	
Depressor do SNC ()			
Imunossupressores ()	Anti-hipertensão ()	Outros ()	
ALERGIA: Anestésico: Sim() Não()		Antibiótico: Sim () Não()	
Antiinflamatórios: Sim () Não()		Alérgico a lactose: Sim() Não()	
Outros:			
Doenças cardíacas:		Hipertensão:	PA:
Diabetes()	Doenças hepáticas()	Doenças renais ()	Doenças no estômago(Como úlcera e gastrite) ()
Doença no intestino() Doenças Reumáticas () DST()			
Grávida: Sim() Não()		Amamentando: Sim() Não()	
Fumante: Sim() Não()		Quantos cigarros por dia:	

Hábitos de higiene bucal:

Números de vezes que escova os dentes por dia:
 Tipo de escova: Macia () Média () Dura ()
 Uso do fio dental: Sim () Não()

HIPERSENSIBILIDADE PRÉVIA: () Nenhuma() Leve () Moderada ()
 Considerável () Severa
 AR: () Sim () Não
 FRIO: () Sim () Não
 PERCUSSÃO HORIZONTAL: () Sim () Não
 PERCUSSÃO VERTICAL: () Sim () Não
 PALPAÇÃO: () Sim () Não

HÁBITO PARAFUNCIONAL: () Sim () Não

ANEXO D – ARTIGO 1 PUBLICADO NO JOURNAL OF ESTHETIC AND RESTORATIVE DENTISTRY



Received: 31 January 2021 | Revised: 12 February 2021 | Accepted: 23 February 2021

DOI: 10.1111/jerd.12728

RESEARCH ARTICLE

WILEY

Effect of topical application of nanoencapsulated eugenol on dental sensitivity reduction after in-office dental bleaching: a randomized, triple-blind clinical trial

Ana Paula Vilela DDS, MS, PhD¹ | Márcia Rezende DDS, MS, PhD² |
Renata Maria Oleniki Terra DDS, MS³ | Karine Letícia da Silva DDS, MS³ |
Elisama Sutil DDS, MS³ | Abraham L. Calixto DDS, PhD³ |
Alessandra Reis DDS, PhD³ | Alessandro D Loguercio DDS, MS, PhD³ |
Paulo Vitor Farago PhD¹

¹Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Department of Pharmaceutical Sciences, State University of Ponta Grossa, Ponta Grossa, Paraná, Brazil

²School of Dentistry, School Paulo Picanço, Fortaleza, Ceará, Brazil

³School of Dentistry, Department of Restorative Dentistry, State University of Ponta Grossa, Ponta Grossa, Paraná, Brazil

Correspondence

Alessandro Dourado Loguercio, School of Dentistry, State University of Ponta Grossa, Rua Carlos Cavalcanti, 4748, Bloco M, Sala 64-A, Uvaranas, Ponta Grossa, Paraná 84030-900, Brazil.

Email: aloguercio@hotmail.com

Funding information

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Grant/Award Number: 303332/2017-4, 308286/2019-7; Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Grant/Award Number: 001

Abstract

Purpose: This randomized, split-mouth, triple-blind clinical study evaluated the effect of application of nanoencapsulated eugenol (NE) on the absolute risk and intensity of tooth sensitivity (TS) resulting from in-office bleaching.

Methods: Fifty-six patients received a NE in one hemiarch and a placebo gel in the other hemiarch, determined by random sequence, before in-office bleaching. A visual analogue scale (VAS) (0–10) and a numeric rating scale (NRS) (0–4) were used to record TS during bleaching and 1 and 48 h after bleaching. The tooth color was performed from baseline to 2 weeks after bleaching with shade guides (Δ SGU) and a spectrophotometer (ΔE_{ab} , ΔE_{00} , and W_{10}). The TS was assessed through the McNemar test ($\alpha = 0.05$) and by the Wilcoxon signed-rank test (NRS) and paired t-test (VAS). The paired test-t was employed to compare the color changes (Δ SGU and ΔE_{ab} , ΔE_{00} and W_{10}). The significance level was 5%.

Results: No statistically significant difference was found in the absolute risk or intensity of TS between both groups ($p > 0.05$). A significant color change was observed in both groups ($p > 0.05$).

Conclusion: Administration of the gel containing NE before the in-office dental bleaching did not reduce the TS and did not interfere in the bleaching effect.

Clinical relevance statement: The use of desensitizing gel containing NE did not reduce in-office bleaching-induced tooth sensitivity.

KEYWORDS

dental bleaching, dentin sensitivity, eugenol, hydrogen peroxide, nanotechnology

1 | INTRODUCTION

The desire for whiter teeth has made whitening one of the most sought-after cosmetic procedures in dentistry, as it is a very satisfactory, conservative, and safe treatment.^{1–3}

Among the options of whitening techniques, the in-office dental bleaching technique using 35% hydrogen peroxide gels has been widely requested by patients, because most want quick results or do not adapt to the use of the tray involved in at-home bleaching.^{4–6}

ANEXO E – ARTIGO 2 ACEITO NO THE JOURNAL OF THE AMERICAN DENTAL ASSOCIATION

JADA: Author's PDF Proof



Coadministration of ibuprofen/caffeine on bleaching-induced tooth sensitivity: a randomized, parallel, triple-blind clinical trial

Journal:	<i>The Journal of the American Dental Association</i>
Manuscript ID	Draft
Manuscript Categories:	Original Contribution—Full Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Silva, Karine; Universidade Estadual de Ponta Grossa, Restorative Dentistry Sutil, Elisama; Universidade Estadual de Ponta Grossa, Restorative Dentistry Hortkoff, Diego ; Universidade Estadual de Ponta Grossa, Dentistry Terra, Renata; Universidade Estadual de Ponta Grossa, Restorative Dentistry Rezende, Márcia; State University of Ponta Grossa, Restorative Dentistry Reis, Alessandra; University Estadual of Ponta Grossa, Restorative Dentistry Loguercio, Alessandro; Universidade Estadual de Ponta Grossa, Restorative Dentistry Vilela, Ana Paula; Universidade Estadual de Ponta Grossa, School of Pharmacy Farago, Paulo; UEPG,
Keywords:	Tooth Bleaching, Randomized Controlled Clinical Trials, Sensitivity, Tooth

SCHOLARONE™
Manuscripts