

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
CENTRO INTEGRADO DE SAÚDE – FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PPG – MESTRADO EM CLÍNICA ODONTOLÓGICA**

TAÍS CHAVES MAGALHÃES

**SUSPENSÃO DE PARTÍCULAS DE QUITOSANA CARREGADAS COM
FLUORETO DE SÓDIO: SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E EFEITO NO ESMALTE
DENTAL APÓS BIOFILME DE *S. MUTANS***

Juiz de Fora

2022

TAÍS CHAVES MAGALHÃES

**SUSPENSÃO DE PARTÍCULAS DE QUITOSANA CARREGADAS COM
FLUORETO DE SÓDIO: SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E EFEITO NO ESMALTE
DENTAL APÓS BIOFILME DE *S. MUTANS***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Odontológica, da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.
Área de concentração: Clínica Odontológica.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Fabíola Galbiatti de Carvalho Carlo

Juiz de Fora

2022

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Chaves Magalhães, Taís.

Suspensão de partículas de quitosana carregadas com fluoreto de sódio: síntese, caracterização e efeito no esmalte dental após biofilme de *S. mutans*. / Taís Chaves Magalhães. -- 2022.

56 f. : il.

Orientadora: Fabíola Galbiatti de Carvalho

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Odontologia. Programa de Pós-Graduação em Clínica Odontológica, 2022.

1. Quitosana. 2. Fluoreto de Sódio. 3. Streptococcus mutans. 4. Biofilme. I. Galbiatti de Carvalho, Fabíola, orient. II. Título.

TAÍS CHAVES MAGALHÃES

SUSPENSÃO DE PARTÍCULAS DE QUITOSANA CARREGADAS COM FLUORETO DE SÓDIO: SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E ELEITO NO ESMALTE DENTAL APÓS BIOFILME DE *S. mutans*.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós graduação em Odontologia da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Mestra em Clínica Odontológica. Área de concentração: Clínica Odontológica

Aprovada em 18 de fevereiro de 2022.

BANCA EXAMINADORA

Profª Drª Fabíola Galbiatti de Carvalho Carlo - Orientador

Universidade Federal de Juiz de Fora - GV

Prof. Dr. Marcio José da Silva Campos

Universidade Federal de Juiz de Fora

Profª Drª Regina Maria Puppim Rontani

Universidade Estadual de Campinas

Juiz de Fora, 26/01/2022.



Documento assinado eletronicamente por **Fabiola Galbiatti de Carvalho Carlo, Professor(a)**, em 18/02/2022, às 16:26, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

Documento assinado eletronicamente por **regina maria puppin rontani, Usuário Externo**, em 21/02/2022, às 11:05, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do



[Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.](#)



Documento assinado eletronicamente por **Marcio Jose da Silva Campos, Professor(a)**, em 21/02/2022, às 12:44, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.](#)



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-U f (www2.uf.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **0658364** e o código CRC **F09DB8C7**.

Dedico este trabalho a você que é a minha eterna saudade, **PAI** Seus ensinamentos de fé, amor e humildade estarão sempre comigo. Dedico também a minha **MÃE**, que é meu maior exemplo de força e coragem.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus**, por colocar em meu coração esse sonho e me permitir realizá-lo me sustentando com força e sabedoria. À **minha família** por estarem sempre ao meu lado me apoiando em busca dos meus sonhos, e por acreditarem quando eu mesma duvidei de mim, vocês são minha base e eu amo vocês. Ao **Léo** por sempre me incentivar em busca dos meus sonhos e por sempre compreender os momentos em que estive ausente.

Ao **Programa de Pós Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Juiz de Fora**, representado pelo coordenador **Prof. Dr. Marcio José da Silva Campos**, pelos ensinamentos e orientações que foram fundamentais durante essa caminhada e execução desse trabalho.

Agradeço também ao **Departamento de Odontologia da Universidade Federal de Juiz de Fora – Campus Governador Valadares**, por me proporcionar realizar esse trabalho nos laboratórios Multiusuários de Biomateriais e Microbiologia.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - **Capex** e a **UFJF** pelo investimento através da bolsa de mestrado.

Agradeço à **FAPEMIG** pelo apoio financeiro para realização deste trabalho, via financiamento de projeto de pesquisa (APQ 02895-21) .

À minha orientadora **Prof^a. Dr^a Fabíola Galbiatti de Carvalho Carlo**, quem foi o meu incentivo no mundo da Pesquisa e da ciência desde a Graduação, minha eterna gratidão pela ótima convivência e por todos os ensinamentos tão valiosos que foram essenciais para meu crescimento profissional e pessoal.

Ao meu coorientador **Prof. Dr. Ângelo Márcio Leite Denadai**, pela paciência e conhecimento transmitido que foram primordiais para execução desse trabalho e por todo auxílio na realização dos testes de caracterização e interpretação dos dados.

À **Prof^a. Dr^a Laísa Araújo Cortines Laxe**, quem me amparou na chegada a Juiz de Fora, obrigada por me acolher tão bem. E juntamente com o **Prof. Dr. Bruno Salles Sotto-Maior**, obrigada pela disponibilidade e orientações durante essa jornada.

Ao **Prof. Dr. Hugo Lemes Carlo**, pelas brilhantes contribuições e auxílio no Laboratório Multiusuário de Biomateriais. E também à **Profª. Drª Gabriella Freitas Ferreira**, pelas contribuições e orientações para realização dos testes microbiológicos. Agradeço ao **Prof. Dr. Jeferson Gomes da Silva**, pela disponibilidade e ajuda na análise e interpretação dos dados do FTIR.

Ao aluno **Alan Reis**, pela disponibilidade e ajuda nas análises de caracterização das soluções.

Aos meus amigos, obrigada por todo apoio, em especial **aos amigos da 12ª Turma de Mestrado**, que dividiram esta caminhada comigo, seja nos congressos, nas atividades do mestrado e nos momentos de distração.

Agradeço também a **Alana**, minha dupla do mestrado, quem eu dividi a execução do projeto de pesquisa, e que melancolizou comigo quando algo deu errado, mas também se alegrou comigo quando deu certo, e que desde então tornou-se a minha amiga da vida, que está sempre ao meu lado e que me escuta quando preciso falar e que fala quando preciso ouvir, obrigada pela sua amizade.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito *in vitro* da aplicação de partículas de quitosana carregadas com fluoreto de sódio (Quit/NaF) no esmalte dentário após desafio cariogênico com *S. mutans* (UA159). A suspensão de partículas de Quit/NaF foram sintetizadas por gelificação iônica e a caracterização da suspensão foi avaliada por titulação em reômetro dinâmico avaliando a viscosidade (η) e interação molecular por espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FTIR). A estabilidade das partículas em suspensão foi avaliada por meio do ZP, D_h e pH durante um mês, com intervalo de uma semana entre as medidas. Após a obtenção da razão molar/estequiométrica do complexo NaF/Quit_{monômeros} pela titulação em reômetro, as suspensões de partículas de Quit/NaF com concentração de fluoreto de 0,05% e 0,2% foram preparadas pela mistura das soluções de quitosana (2 mg/mL - 0,0118 mol/L e 8,5 mg/mL - 0,0475 mol/L) e NaF (0,5 mg/mL - 0,0118 mol/L e 2 mg/mL - 0,0475 mol/L) em solução de ácido acético 1% v/v. Posteriormente foram realizados os testes de concentração inibitória mínima (CIM) e bactericida mínima (CBM) para os nove grupos foram formados: 1) Quit 0,05%; 2) NaF 0,05%; 3) Suspensão de Quit/NaF 0,05%, 4) Controle 0,05% (ácido acético); 5) Quit 0,2%; 6) NaF 0,2%; 7) Suspensão de Quit/NaF 0,2%; 8) Controle 0,2%; e 9) Digluconato de Clorexidina 0,12% (CLX) - controle positivo. O efeito na formação de biofilme sob a superfície do esmalte dentário humano foi avaliado por dureza de superfície (Knoop) e por contagem de unidades formadoras de colônia (UFC/mL). Vinte e três blocos de esmalte (4 x 4 mm) foram obtidos de terceiros molares e incluídos em resina acrílica. Nove grupos foram formados (n= 5) conforme citado anteriormente. Os dados de microdureza foram analisados por ANOVA de medidas repetidas, One Way ANOVA e Tukey ($\alpha= 0,05$) e os resultados de UFC/mL foram analisados por Shapiro-Wilk, Levene e ANOVA de medidas repetidas. No início da titulação a quitosana apresentou maiores valores de η . Com a adição de NaF, houve uma redução nos valores da viscosidade até a razão molar de $[NaF]/ [Quit] \approx 0,64$, que foi atribuído à neutralização da cadeia polimérica. Os espectros de FTIR mostraram interação entre Quit-NaF, evidenciando a formação de micropartículas. Os testes de estabilidade

mostraram a formação de micropartículas estáveis. A CIM da suspensão de partículas de Quit/NaF a 0,05% e 0,2% foi de 0,65 mg/mL e a CBM foi 0,65 mg/mL e 1,3 mg/mL, respectivamente. A suspensão de partículas de Quit/NaF 0,2% mostrou redução de UFC/mL de *S. mutans* quando comparado aos compostos isolados na mesma concentração (Quit 0,2% e NaF 0,2%). Os grupos Quit/NaF em ambas as concentrações (0,05% e 0,2%) e CLX apresentaram maiores valores de dureza e menor perda de dureza após o desafio cariogênico com *S. mutans*. A suspensão de Quit/NaF nas concentrações de 0,05% e 0,2% apresentaram atividade antimicrobiana contra *S. mutans* e minimizaram a desmineralização do esmalte após desafio cariogênico, demonstrando potencial para serem utilizadas em enxaguatórios bucais no controle da cárie dentária.

Palavras-chave: Quitosana . Fluoreto de sódio. *Streptococcus mutans*.
Biofilme.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the *in vitro* effect of application of chitosan particles loaded with sodium fluoride (NaF/Chit) on tooth enamel after cariogenic challenge with *S. mutans* (UA159). The suspension of NaF/Chit particles were synthesized by ionic gelation and the characterization of the suspension was evaluated by titration in a dynamic rheometer evaluating viscosity (η), molecular interaction by infrared absorption spectroscopy (FTIR). The stability of particles in suspension was evaluated using ZP, D_h and pH for one month, with an interval of one week between measurements. After obtaining the molar/stoichiometric ratio of the NaF/Chit_{monomers} complex by titration in a rheometer, the suspensions of Chit/NaF particles with a fluoride concentration of 0.05% and 0.2% were prepared by mixing the chitosan solutions (0.0118 mol/L and 0.0475 mol/L) and NaF (0.0118 mol/L and 0.0475 mol/L) in 1% v/v acetic acid solution. Subsequently, the minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal bactericidal (MBC) tests were performed for the nine groups: 1) Chit 0.05%; 2) NaF 0.05%; 3) suspension NaF/Chit 0.05%; 4) Control 0.05% (acetic acid); 5) Chit 0.2%; 6) NaF 0.2%; 7) suspension NaF/Chit 0.2%; 8) Control 0.2%; and 9) 0.12% Chlorhexidine Digluconate (CLX) - positive control. The effect on biofilm formation under the surface of human tooth enamel was evaluated by surface hardness (Knoop) and colony-forming unit count (CFU/mL). Twenty-three enamel blocks (4 x 4 mm) were obtained from third molars and embedded in acrylic resin. Nine groups were formed (n=5) as mentioned above. Microhardness data were analyzed by repeated measures ANOVA, One Way ANOVA and Tukey ($\alpha= 0.05$) and the results of CFU/mL were analyzed by Shapiro-Wilk, Levene and repeated measures ANOVA. At the beginning of the titration, chitosan showed higher values of η . With the addition of NaF, there was a reduction in the viscosity up to the molar ratio of $[NaF]/[Chit] \approx 0.64$, which was attributed to polymer chain neutralization. The FTIR spectra showed interaction between NaF-Chit, evidencing the formation of microparticles. Stability tests showed the formation of stable microparticles. The MIC of the 0.05% and 0.2% NaF/Chit particle

suspension was 0.65 mg/mL and the MBC was 0.65 mg/mL and 1.3 mg/mL, respectively. The suspension of particles of NaF/Chit 0.2% showed a reduction in CFU/mL of *S. mutans* when compared to compounds isolated at the same concentration (Chit 0.2% and NaF 0.2%). The NaF/Chit groups at both concentrations (0.05% and 0.2%) and CLX had higher hardness values and lower hardness loss after cariogenic challenge with *S. mutans*. The suspension of NaF/Chit at concentrations of 0.05% and 0.2% showed antimicrobial activity against *S. mutans* and minimized enamel demineralization after cariogenic challenge showing potential for use in mouthwashes to control caries.

Keyword: Chitosan. Sodium fluoride. *Streptococcus mutans*. Biofilm.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Preparo da suspensão de partículas de Quit/NaF 0,2% em agitação por 24h.....	26
Figura 2- Preparo das amostras. A) Bloco de esmalte embutido em resina acrílica; B) Polimento sob irrigação da amostra	30
Figura 3 - Blocos de esmalte com 20 μ L de <i>S. mutans</i> na superfície para adesão inicial	31
Figura 4- Amostras imersas em 1mL de BHI + 1% de sacarose nos poços da placa de poliestireno	32
Figura 5- Microduromêtro (HMV-2, Shimadzu, Kyoto, Japão) utilizado para determinar valores de dureza.....	33
Figura 6- Titulação viscosimétrica de NaF 190 mM em 15,0 mL de Quitosana 22,3 mM (de base monomérica). Medição realizada a 25,0 °C e 1000 s ⁻¹ . η = viscosidade; R= razão molar ou estequiométrica de [NaF]/[Quit _{monômero}].	35
Figura 7- Espectros de FTIR das soluções de NaF e Quit e das suspensões de partículas de Quit/NaF 0,05% e 0,2%	36
Figura 8 - Diagramas de box plot mostrando o efeito da aplicação das soluções e suspensões na UFC/mL de <i>S. mutans</i> colonizados no esmalte durante 7 dias.	38

LISTA DE TABELA

Tabela 1- Valores da Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) das substâncias testadas.....	37
Tabela 2- Valores de Dureza Knoop (KHN) do esmalte antes e após a aplicação das soluções e desafio cariogênico. Valores são expressos em média \pm desvio padrão.....	39

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
3 PROPOSIÇÃO	24
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
4 MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS SUSPENSÕES DE PARTÍCULAS DE QUITOSANA CARREGADAS COM NAF (QUIT/NaF) A 0,2% E 0,05%	25
4.1.1 Titulação viscosimétrica	25
4.1.2 Espectrofotometria de infravermelho com transformação de Fourier.....	27
4.1.3. Análise estabilidade coloidal de partículas das suspensões: potencial zeta (ZP), diâmetro hidrodinâmico (D _h) e pH	27
4.2 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM) DAS SUSPENSÕES DE PARTÍCULAS DE QUIT/NaF CONTRA <i>S. mutans</i>	28
4.3 DESAFIO CARIOGÊNICO COM BIOFILME DE <i>S. mutans</i>	29
4.3.1 Preparo das amostras e grupos de estudo	29
4.3.2 Desafio cariogênico com <i>S. mutans</i>	30
4.3.3 Análise de microdureza Knoop	32
4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	33
5 RESULTADOS	35
6 DISCUSSÃO	40
7 CONCLUSÃO	47
REFERÊNCIAS	48
ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP	53

1 INTRODUÇÃO

A cárie dentária é uma doença dinâmica mediada por biofilme, modulada pela dieta, multifatorial, não transmissível, e que resulta em perda de minerais dos tecidos duros dentários, a qual afeta bilhões de pessoas em todo o mundo, especialmente as crianças menores de 6 anos de idade (KASSEBAUM et al., 2015; PERES et al., 2019; TINANOFF et al., 2019; MACHIULSKIENE et al., 2020). Possui etiologia multifatorial e complexa, caracterizada principalmente por disbiose de biofilme oral (TINANOFF et al., 2019). *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) é o microrganismo cariogênico primário que participa do início da doença por meio do metabolismo dos carboidratos da dieta, produzindo ácidos que desmineralizam a estrutura dental (LEMOS et al., 2019). Após a ingestão de carboidratos, principalmente a sacarose, ocorre uma rápida queda do pH no biofilme aderido ao dente para abaixo de 5,0, o que conseqüentemente aumenta a proporção de espécies acidogênicas e acidúricas no biofilme e altera a composição da sua matriz, podendo desmineralizar o esmalte dental (LEMOS et al., 2019).

O controle mecânico do biofilme dentário, por meio da frequente e adequada escovação com dentifrício fluoretado, é considerado o principal mecanismo para prevenção da doença cárie, entretanto em pacientes com alta ingestão de açúcar, a frequência e a qualidade da higiene bucal não são suficientes para proteger contra a cárie (MARINHO et al., 2016). Assim, o uso de enxaguatórios fluoretados têm sido indicado como método auxiliar ao controle da doença, pois os íons fluoreto (F^-) podem atuar na redução da desmineralização e no aumento do processo de remineralização do esmalte (MARINHO et al., 2016; THE AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRIC DENTISTRY, 2016).

O composto fluoretado mais utilizado em enxaguatórios bucais para o controle da cárie é o fluoreto de sódio (NaF), pois é capaz de proteger tecidos duros dentais prevenindo a desmineralização e possibilitando a remineralização do esmalte (MOI; TENUTA; CURY, 2008; PARKINSON et al., 2018; THURNHEER; BELIBASAKIS, 2018). As soluções fluoretadas de NaF para bochechos contendo 225 ppm de F^- (0,05% de NaF - uso diário) e 900 ppm de F^- (0,2% de NaF - uso semanal) podem reduzir a formação de lesões de cárie em dentes permanentes de crianças (MARINHO et al., 2016). Porém, o efeito antimicrobiano do flúor ainda não está

totalmente esclarecido, sendo sugerido que este efeito seja relacionado à diminuição da produção de ácido ou polissacarídeo extracelular pelas bactérias do biofilme (THURNHEER; BELIBASAKIS, 2018). Dessa forma, protocolos clínicos de associação do fluoreto com agentes antimicrobianos para a prevenção da cárie estão sendo recomendados em produtos de higiene bucal (THE AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRIC DENTISTRY, 2016).

A quitosana é um polímero biodegradável e biocompatível que possui atividade antimicrobiana e tem sido utilizada como componente de produtos orais em estudos de prevenção da cárie (COSTA et al., 2014). A quitosana é obtida a partir da quitina, que é um biopolímero derivado de um componente estrutural de crustáceos e conchas de artrópodes (WIECKIEWICZ et al., 2017; IKONO et al., 2019). Em pH baixo, o grupo amina (NH_2) é protonado em grupo amino funcional (NH_3^+), que interage com componentes carregados negativamente, como proteínas, polissacarídeos aniônicos, fosfolipídios, membranas celulares bacterianas e fúngicas, e a superfície desmineralizada do esmalte (ING et al., 2012; GONDIM et al., 2018; ZHANG et al., 2019). Um enxaguatório bucal à base de quitosana mostrou capacidade de inibir a adesão microbiana e a formação de biofilme de *S. mutans*, sendo capaz de promover a dissolução do biofilme já formado (COSTA et al., 2014).

Alguns estudos na literatura investigaram a incorporação de NaF em partículas de quitosana para atuar na prevenção da cárie dentária (NGUYEN et al., 2017; FURTADO et al., 2018). O método utilizado para síntese das partículas foi a gelificação iônica utilizando o tripolifosfato de sódio (TPP) como agente reticulador. Esse método de preparo de partículas é bastante utilizado, pois é um método econômico para sintetizar partículas de tamanhos pequenos, além de ser seguro devido à ausência de solventes orgânicos prejudiciais, calor ou agitação vigorosa (DE CARVALHO et al., 2019).

A formação de partículas de Quit/NaF ocorre por interações eletrostáticas entre o fluoreto e a quitosana, de modo que a concentração destes compostos pode interferir no tamanho das partículas (FURTADO et al., 2018). No estudo de Nguyen et al. (2017), partículas de quitosana foram sintetizadas com a adição de NaF e houve liberação de íons fluoretos para prevenir a cárie dentária. No entanto, até o momento, o efeito das partículas de quitosana carregadas com NaF na desmineralização do esmalte dental e no biofilme de *S. mutans* ainda não foi investigado.

A formação de partículas de NaF adicionadas à quitosana teria interessante aplicação em enxaguatório de uso infantil, pois poderia atuar como um sistema de liberação lenta e controlada de fluoretos, além de apresentar atividade antimicrobiana na cavidade bucal de pacientes cárie-ativos ou de risco à doença, devido a quitosana. Assim, os íons F^- seriam disponibilizados em pequenas concentrações de forma lenta e gradual, o que poderia também minimizar o risco de fluorose dental.

Assim, neste trabalho as suspensões de partículas da quitosana carregadas com NaF (Quit/NaF) a 0,05% e 0,2% foram sintetizadas por gelificação iônica, e caracterizadas por titulação viscosimétrica (análise da viscosidade - η) em reômetro híbrido dinâmico e por espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FTIR). A estabilidade das partículas em suspensão foi avaliada por meio do potencial zeta (ZP), diâmetro hidrodinâmico (D_h) e pH. O efeito das partículas Quit/NaF a 0,05% e 0,2% foi avaliado na formação do biofilme de *S. mutans* colonizado na superfície do esmalte (por contagem de unidades formadoras de colônias - UFC/mL) e na desmineralização do esmalte, após este desafio cariogênico por análise da microdureza de superfície. A hipótese testada foi que as suspensões de partículas de Quit/NaF sintetizadas podem reduzir a formação de biofilme de *S. mutans* e diminuir a desmineralização do esmalte causada por desafio cariogênico.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Atualmente, estudos relacionados à quitosana estão sendo desenvolvidos, englobando diversas áreas nos âmbitos farmacêuticos e químicos, em função principalmente, das suas características de biocompatibilidade, biodegradabilidade e biodisponibilidade (COSTA et al., 2014). No estudo de revisão sistemática realizado por Cicciù; Fiorillo; Cervino, (2019), verificando o uso da quitosana em diferentes áreas da odontologia, foram avaliados doze estudos de ensaios clínicos e ensaios clínicos randomizados. Os estudos avaliaram o uso da quitosana como analgésico na cirurgia oral (4 estudos), em enxaguatórios (3 estudos) em creme dental (3 estudos), em material restaurador (1 estudo) e como solução irrigadora de condutos radiculares (1 estudo). Os autores concluíram que a quitosana é um composto seguro para uso com propriedades positivas para aplicações em diferentes campos da odontologia de forma segura e eficaz. Dentre eles, o uso em cirurgia oral, sendo capaz de reduzir os sinais clínicos de inflamação e com capacidade de regeneração e reparo ósseo. Além disso, relataram sobre a propriedade da quitosana de remineralização do esmalte, e propriedades antibacterianas e antifúngicas, podendo ser utilizada em pasta de dente como dessensibilizante e também em cimentos odontológicos.

A quitosana é um biopolímero obtido a partir da quitina, a qual é considerado o segundo polissacarídeo abundante da natureza. A quitina está presente nos exoesqueletos da maioria dos crustáceos e é constituída por unidades N acetil-D-glicosamina e D-glicosamina (DASH et al., 2011). Dependendo da origem do polímero, quando o grau de desacetilação da quitina atinge cerca de 50%, a mesma se torna solúvel em condições aquosas ácidas e é chamada de quitosana (DASH et al., 2011). A desacetilação da quitina acontece em meio básico, adicionando solução de hidróxido de sódio (NaOH), e ocorre de forma parcial, não sendo possível obter o polímero 100% desacetilado. Assim, a quitosana torna-se uma base fraca com o pKa variando de 6,2 a 7,0, solúvel apenas em ácidos fracos, como o ácido acético e o ácido fórmico (DASH et al., 2011).

A quitosana forma sais com ácidos orgânicos e inorgânicos, devido a presença de grupamentos amino (NH_2) que são protonados (NH_3^+), resultando em um polissacarídeo solúvel carregado positivamente. Dependendo do grau de desacetilação da quitosana e do pH do meio, os sais formados podem ser solúveis em água. Se o grau de desacetilação dos sais de quitosana for baixo (< 40%), estes são solúveis em pH de até 9. Enquanto, que os sais com alto grau de desacetilação (> 85%) são solúveis em pH até 6,5 (HEJAZI; AMIJI, 2003). Dessa modo, existe uma dificuldade para conseguir um grau de desacetilação alto da quitosana, visto que a medida que o processo de desacetilação aumenta, ocorre também de forma aumentada o processo de degradação do polímero (SILVA; DOS SANTOS; FERREIRA, 2006).

A caracterização da quitosana é possível ser realizada por análise do grau de desacetilação e da sua massa molar, os quais podem influenciar na degradação e na hidrólise do polissacarídeo (SILVA; DOS SANTOS; FERREIRA, 2006). A quitosana possui propriedades físico-químicas (como solubilidade, pka e viscosidade) que são capazes de serem modificadas conforme a desacetilação do polímero (CARVALHO et al., 2011). Desse modo, quando a quitosana possui baixo grau de desacetilação ocorre uma atração molecular, levando a uma conformação da molécula mais contraída (enovelada), o que diminui a sua viscosidade. No entanto, quando o grau de desacetilação é alto, ocorre o oposto, de forma que a densidade da carga aumenta e ocorre uma expansão da cadeia polimérica, obtendo-se uma cadeia de conformação aberta, aumentando a viscosidade da solução (KONG et al., 2010).

A quitosana é constituída por unidades de monômeros de β -(1 \rightarrow 4)-2-amino-2-desoxi-Dglicose e β -(1 \rightarrow 4)-2-acetamida-2-desoxi-Dglicose, e sua cadeia polimérica apresenta um grande número de grupos hidroxila e amino, o que permite seu uso como biomaterial na forma de gel, membrana, nanopartículas e micropartículas, que podem servir como veículo de liberação de fármacos (DE CARVALHO et al., 2019).

A síntese de partículas de quitosana pode ser realizada por vários métodos: electrospray, emulsificação, difusão de solvente, microemulsão e gelificação iônica (DE CARVALHO et al., 2019). O método de gelificação iônica é bastante utilizado para síntese de partículas (nano ou micro) por ser

um método simples, de rápida síntese e de baixo custo (ING et al., 2012). Esse método ocorre com a formação de ligações nas cadeias polipeptídicas (ligações intramoleculares e intermoleculares) formando uma estrutura em rede tridimensional, normalmente mais rígida que o material não reticulado (MAGALHÃES et al., 2021a). Além disso, o agente reticulante é utilizado com a finalidade de obter partículas menores através de complexação de polieletrólitos, com características de porosidade e de resistência mecânica melhorada (ING et al., 2012).

O desenvolvimento de partículas de quitosana para uso oral tem como interesse a capacidade de interação das partículas com os tecidos bucais (mucosa e estrutura dental) possibilitando a liberação controlada de compostos ativos (MATOS et al., 2020) e ou proteção à estrutura devido a formação de barreira física na superfície da estrutura dental (MAGALHÃES et al., 2021a).

O efeito anti-cárie da suspensão de partículas de quitosana em esmalte dental foi testado por Magalhães et al., 2021b, em estudo *in vitro* com ciclagem de pH. Os autores objetivaram avaliar os efeitos da suspensão de quitosana/TPP no esmalte humano após desafio cariogênico com ciclagem de pH. Os grupos que foram tratados com a suspensão de quitosana/TPP e solução de NaF 0,05% apresentaram os menores valores de alteração de dureza após o desafio.

Outros estudos também testaram o potencial da quitosana em controlar lesões cariosas iniciais (ZHANG et al., 2018; ZHANG et al., 2019). A solução de quitosana foi aplicada em lesões de cárie iniciais por um minuto, e em seguida agentes remineralizantes foram aplicados. Os autores encontraram que os grupos que foram pré tratados com a solução de quitosana apresentaram maior dureza, de modo que a quitosana melhorou o efeito de remineralização da superfície desmineralizada, por meio da interação entre espécies nitrogenadas carregadas positivamente e prismas de esmalte desmineralizados (ZHANG et al., 2018). Além disso em 2019, ZHANG et al., avaliaram a aplicação do complexo de quitosana-biovidro em lesões de mancha branca como pré tratamento, e também associada ao agente remineralizante. Foi demonstrado que a complexação de quitosana-biovidro apresentou maior recuperação de minerais e microdureza subsuperficial em comparação com a solução de remineralização "padrão" (saliva química), após

a remineralização estática (realizada somente pela aplicação de agentes remineralizantes na superfície da lesão) e remineralização de ciclagem de pH por 7 dias.

A quitosana apresenta atividade antimicrobiana contra uma gama de patógenos orais, dentre os quais *S. mutans* (CHAVEZ DE PAZ et al., 2011; NEILANDS et al., 2011; COSTA et al., 2013, COSTA et al., 2014). A atividade antibacteriana da quitosana pode estar relacionada às ligações eletrostáticas que podem ocorrer entre os grupos NH₂ do monômero e os grupos aniônicos presente nas paredes celulares bacterianas (derivados dos fosfolipídios e dos resíduos de ácidos carboxílicos) (BUSSCHER et al., 2008; COSTA et al., 2012, COSTA et al., 2013).

Com o objetivo de avaliar o mecanismo de ação e a capacidade antimicrobiana da solução de quitosana, como alternativa aos antimicrobianos tradicionais no tratamento de infecções orais, Costa et al. (2012) encontraram que a solução de quitosana em duas concentrações (3,0 mg/mL de alto peso molecular e 5,0 mg/mL baixo peso molecular) mostrou atividade antimicrobiana contra bactérias anaeróbicas, como *S. mutans*. Da mesma forma que Busscher et al., em 2008, que objetivaram verificar os efeitos de tratamentos com a quitosana na adesão e crescimento bacteriano de *Streptococcus mutans*, *Streptococcus oralis* e *Streptococcus sobrinus* em placas de vidro. Os autores observaram que o número e o crescimento de *S. mutans*, bem como sua viabilidade no biofilme, foram significativamente reduzidos em saliva tratadas com 0,1% quitosana. A viabilidade do biofilme tratado com o biopolímero foi três vezes menor comparada a do grupo sem tratamento com a quitosana. Os autores concluíram que a quitosana é um antimicrobiano promissor para uso em produtos de cuidados bucais.

Costa et al. (2013) também encontraram que a solução de quitosana pode inibir a adesão inicial de *S. mutans*. A solução de quitosana de alto peso molecular nas concentrações de 1 e 2 mg/mL não apresentaram diferenças significativas na inibição de aderência de *S. mutans* nos tempos de exposição de 30 s e 90 s, de forma que houve inibição de quase 100% do crescimento bacteriano. No entanto, para a solução de quitosana de baixo peso molecular, nas concentrações de 2 e 4 mg/mL, houve diferença significativa entre os tempos de exposição (30 e 90 s), sendo que o tempo com maior exposição

apresentou maior inibição de *S. mutans* (94 - 99% de inibição). Os resultados encontrados pelos autores foram que a quitosana possui potencial para minimizar a colonização de *S. mutans* na cavidade bucal, sendo que a solução de alto peso molecular apresentou maior inibição do microrganismo comparada a de baixo peso molecular.

Em 2014, Costa et al. avaliaram o efeito de enxaguatórios experimentais a base de quitosana na formação de biofilme. Foram utilizadas soluções de quitosana de alto e baixo peso molecular com concentração de 0,4%, e o enxaguatório bucal contendo quitosana foi capaz de interferir na aderência dos microrganismos, na formação e na dissolução do biofilme maduro de *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus acidophilus*, *Enterococcus faecium*, *Candida albicans* e *Prevotella intermedia*. A solução de quitosana como enxaguatório mostrou atividade antimicrobiana significativamente maior em todos os ensaios do estudo comparado aos enxaguantes bucais comercialmente vendidos à base de óleo essencial e de clorexidina.

Alguns estudos sintetizaram suspensão de nanopartículas de quitosana para avaliar seu efeito antibacteriano (CHÁVEZ DE PAZ et al., 2011; NEILANDS et al., 2011). Chávez de Paz et al. em 2011, investigaram a influência de diferentes pesos moleculares e graus de desacetilação das nanopartículas de quitosana contra *S. mutans*, de modo que as de baixo peso molecular mostraram alta atividade antimicrobiana (> 95% de células não viáveis) em pH neutro, interferindo de maneira homogênea na integridade da membrana de *S. mutans* e em variadas profundidades do biofilme formado por este microrganismo. O estudo de Neilands et al. (2011) mostrou que as nanopartículas de quitosana foram capazes de interferir na resposta a tolerância ácida do biofilme de *S. mutans*, através da interferência na biossíntese de ácidos graxos, de modo que quando foi exposta em pH 5,5 as células apresentaram maior viabilidade com integridade das membranas (94,5%), já quando foi exposto ao pH de 3,5 apresentou viabilidade menor (1,1%). Os autores concluíram que as nanopartículas de quitosana apresentaram efeitos diferentes em pH distintos.

Estudos recentes foram conduzidos com a finalidade de melhorar as propriedades de estabilidade e tamanho das partículas de quitosana, por meio da adição de quantidades moderadas de sal, como o NaCl (JONASSEN;

KJØNIKSEN; HIORTH, 2012; ANTONIOU et al., 2015). Pesquisadores encontraram um aumento da estabilidade coloidal e uma distribuição de tamanho de partícula mais uniforme das partículas de quitosana com a adição de NaCl (JONASSEN et al., 2012; ANTONIOU et al., 2015). O NaF é outro tipo de sal monovalente utilizado para adicionar a solução de quitosana e formar partículas de NaF/quitosana, por meio de um método simples de preparação que é a gelificação iônica (NGUYEN et al., 2017). Estudos tem desenvolvido partículas de quitosana carregadas com NaF com a formação de partículas nanométricas provenientes da reticulação pelo TPP, sendo tais partículas capazes de liberar íons fluoreto para uso na prevenção da cárie dentária (NGUYEN et al., 2017; FURTADO et al., 2018).

No estudo de Nguyen et al. (2017), a solução de NaF foi adicionada a solução de quitosana, e devido ao efeito de reticulação causado pelo agente reticulador -TPP, o polímero precipitou e houve formação de partículas nanométricas estáveis, esféricas e monodispersas. Além disso, foi observada maior liberação de flúor da suspensão de nanopartículas de quitosana comparadas aos produtos fluoretados já comercializados. A suspensão de nanopartículas de quitosana preparadas em NaF 0,2%, em pH 5 e 7, atingiu máxima liberação em 4 horas, a qual foi mantida por pelo menos 24 horas, já para a concentração de 0,4% perfis semelhantes foram encontrados, porém em pH 5 o fluoreto foi liberado em maiores concentrações (NGUYEN et al., 2017).

No estudo de Furtado et al. (2018) foi investigado a incorporação de NaF nas nanopartículas de quitosana/TPP em diferentes concentrações, com a técnica de gelificação iônica. A formação de nanopartículas de quitosana/TPP com NaF foi verificada, de modo que houve uma redução do tamanho das nanopartículas com o aumento da concentração de NaF. Os autores concluíram que esta técnica pode ser utilizada e sintetizar nanopartículas de quitosana/TPP carregadas com flúor com a possível liberação de fluoretos para prevenir cárie dentária (FURTADO et al., 2018).

Entretanto, poucos estudos na literatura investigaram o efeito da adição de NaF em solução quitosana para formar partículas de quitosana/NaF e avaliaram a ação em esmalte dental. Dessa forma torna-se relevante avaliar o efeito da suspensão de partículas de quitosana/NaF na desmineralização da

estrutura dental frente a um desafio cariogênico que simule o processo da cárie no meio bucal, justificando a realização deste estudo.

3 PROPOSIÇÃO

Avaliar o efeito das suspensões de partículas de quitosana carregadas com fluoreto de sódio (Quit/NaF) em duas concentrações de fluoreto (0,05% e 0,2%), avaliar o efeito antimicrobiano das suspensões em biofilme de *S. mutans* e o efeito das mesmas na desmineralização do esmalte dental após desafio cariogênico com biofilme de *S. mutans*.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Síntese da suspensão de partículas de quitosana carregadas com fluoreto de sódio (Quit/NaF) e titulação reológica da suspensão (Viscosidade - η) com o objetivo de verificar a razão molar e estequiométrica entre os compostos para síntese das suspensões de Quit/NaF nas concentrações de fluoreto de 0,05% e 0,2%;

2. Síntese das suspensões de Quit/NaF nas concentrações correspondentes de fluoreto de 0,05% e 0,2%, e caracterização das suspensões pelos métodos de espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FTIR), e análise da estabilidade das partículas por medidas de ZP, D_h e pH durante 1 mês;

3. Avaliação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) das suspensões de Quit/NaF (0,05% e 0,2%) contra *S. mutans*;

4. Avaliação do número de unidades formadoras de colônias (UFC) de *S. mutans* após aplicação das suspensões de Quit/NaF (0,05% e 0,2%) em desafio cariogênico com *S. mutans*;

5. Avaliação do efeito das suspensões de Quit/NaF (0,05% e 0,2%) na desmineralização da superfície do esmalte, após desafio cariogênico com biofilme de *S. mutans*, por meio da análise de microdureza de superfície.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS SUSPENSÕES DE PARTÍCULAS DE QUITOSANA CARREGADAS COM NaF (QUIT/NaF) A 0,2% E 0,05%

4.1.1 Titulação viscosimétrica

A solução de quitosana de baixo peso molecular (107 kDa, 75-85% de grau de desacetilação) (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) na concentração de 4,0 mg/mL foi preparada dissolvendo em uma solução de ácido acético a 1% v/v (Química Moderna, Barueri, São Paulo, Brasil) e mantida sob agitação por 24 h, em agitador magnético, à temperatura ambiente (DE CARVALHO et al., 2019). A solução de NaF (Auro's Química Indústria e Comércio Ltda, São Paulo, SP, Brasil) foi preparada em solução de ácido acético 1% v/v (Química Moderna, Barueri, São Paulo, Brasil) com concentração de 7,98 mg/mL, ao qual foi agitado por 30 s e dissolvido completamente.

O comportamento reológico da suspensão de partículas de Quit/NaF foi investigado por meio de curvas tensão x deformação, construídas com o reômetro híbrido dinâmico DHR-1 (TA Instruments®, New Castle, DE, EUA) avaliando a viscosidade (η). A formação do complexo Quit/NaF e ácido acético 1% v/v foi avaliada no modo estacionário (cisalhamento rotacional), utilizando o sistema padrão DIN 53019. Inicialmente, 15,0 mL da solução de quitosana (4,0 mg/mL) foram inseridos no dispositivo reômetro com taxa de cisalhamento de 1000 s^{-1} . Em seguida, a titulação da solução de NaF e da solução de ácido acético foi realizada manualmente, com a adição sucessiva de 100 μL das soluções na solução de quitosana, totalizando 35 alíquotas para obtenção de medidas de viscosidade em tempo real (η) em função da razão molar (R) entre a concentração do titulante (NaF) e a concentração de monômeros de quitosana (Quit): $[\text{NaF}]/[\text{Quit}_{\text{monômero}}]$. Os dados obtidos foram tratados no software Microcal Origin® 9.0, obtendo-se a titulação viscosimétrica do NaF em quitosana.

A formação do complexo Quit/NaF foi verificada e a razão molar $[\text{NaF}]/[\text{Quit}_{\text{monômero}}]$ foi $\approx 0,64$ e foi utilizada para o preparo das soluções de

Quitosana e NaF, bem como das suspensões de partículas de Quit/NaF nos demais testes deste estudo.

As soluções de quitosana (8,5 mg/mL) e NaF (2 mg/mL) foram preparadas individualmente. A quitosana utilizada foi de baixo peso molecular (107 kDa, 75-85% grau de desacetilação) (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), dissolvida em solução de ácido acético a 1% v/v (Química Moderna, Barueri, São Paulo, Brasil) e mantida sob agitação contínua a 700 rpm por 24 h em temperatura ambiente. A solução de NaF 0,2% (2 mg/mL) (Auro's Química Indústria e Comércio Ltda, São Paulo, SP, Brasil) também foi preparada em solução de ácido acético 1% v/v e agitada por 30 s até sua completa dissolução. Para preparar a suspensão de partículas de Quit/NaF a 0,2%, outra solução de NaF 0,2% foi preparada e o pó de quitosana foi incorporado a esta solução. A suspensão de partículas de Quit/NaF 0,2% (10,54 mg/mL) foi mantida sob agitação magnética contínua a 700 rpm durante 24 horas (Figura 1). A formação das partículas ocorreu espontaneamente pelo método de gelificação iônica visualizada pela turbidez da suspensão (DE CARVALHO et al., 2019), por meio da adição de quitosana à solução de NaF.

Figura 1- Preparo da suspensão de partículas de Quit/NaF 0,2% em agitação por 24h.



Fonte: Elaborada pela autora (2020).

As soluções de Quit e NaF 0,05% e da suspensão de Quit/NaF 0,05% foram obtidas a partir das soluções de Quit 0,2% e NaF 0,2% e suspensão de

partículas de Quit/NaF 0,2%. A solução de ácido acético 1% v/v foi considerada como controle negativo das soluções na concentração de 0,2%, e esta foi diluída, obtendo-se um controle negativo de 0,05%.

Para a análise de FTIR, uma parte do material foi filtrada, lavada com água Milli-Q e liofilizada para uso posterior. Para o desafio cariogênico com *S. mutans*, outra parte de Quit/NaF foi mantida em suspensão e seu pH foi ajustado para 5,5 adicionando solução de hidróxido de sódio para corresponder ao valor de pH de enxaguatórios bucais comerciais (SADAGHIANI; WILSON; WILSON, 2007; SUN et al., 2014).

4.1.2 Espectrofotometria de infravermelho com transformação de Fourier

O pó da Quitosana e do NaF foram utilizados para a análise. As suspensões de Quit/NaF a 0,05% e 0,2% foram preparadas e liofilizadas. Os sólidos obtidos de cada solução/suspensão foram analisados por espectros FTIR-ATR registrados na faixa entre 4000 e 700 cm^{-1} usando um espectrômetro Perkin Elmer Spectrum Two™ e FTIR acoplado a um acessório PIKE Attenuated Total Reflectance (ATR). As amostras foram colocadas diretamente na superfície diamante/ZnSe do módulo ATR e os espectros foram registrados como a média de 16 varreduras com resolução espectral de 2 cm^{-1} . Para o tratamento dos espectros, o software Perkin Elmer Spectrum ES foi usado (versão 10.03.08.0133) (DE CARVALHO et al., 2019).

4.1.3. Análise estabilidade coloidal de partículas das suspensões: potencial zeta (ZP), diâmetro hidrodinâmico (D_h) e pH

As suspensões de partículas Quit/NaF 0,05% e 0,2% foram armazenadas a 4°C. A estabilidade coloidal das partículas suspensas foi analisada por um período de 30 dias, considerando intervalo de 1 semana entre as medições de ZP e D_h . Os valores de ZP foram calculados com média de 5 medições realizadas em 5 corridas independentes, a 25°C após 30 s de tempo de equilíbrio, inserindo alíquotas das suspensões na célula capilar

dobrável descartável do dispositivo (Malvern Zetasizer Nano ZS - DPS1060). Para as medidas de D_h , as suspensões foram inseridas em cubeta específica de polietileno e foram realizadas em média 10 medidas a cada 5 execuções, com o mesmo tempo e temperatura de equilíbrio da análise ZP. O pH das suspensões de Quit/NaF também foi monitorado por um período de 30 dias, considerando intervalo de 1 semana entre as medições.

4.2 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM) DAS SUSPENSÕES DE PARTÍCULAS DE QUIT/NaF CONTRA *S. mutans*

Nove grupos foram formados de acordo com os agentes testados:

- Grupo 1- Solução de Quitosana 0,2%;
- Grupo 2- Solução de NaF 0,2%;
- Grupo 3- Suspensão de partículas Quit/NaF 0,2%;
- Grupo 4- Controle 0,2% - controle negativo;
- Grupo 5- Solução de Quitosana 0,05%;
- Grupo 6- Solução de NaF 0,05%;
- Grupo 7- Suspensão de partículas Quit/NaF 0,05%;
- Grupo 8- Controle 0,05% - controle negativo;
- Grupo 9- Digluconato de clorexidina 0,12% (CLX) - controle positivo.

A CIM dos compostos de cada grupo foi testada contra a cepa de *S. mutans* UA 159, presente na coleção de cepas do Laboratório Multiusuário de Microbiologia/UFJF-GV. O inóculo de 100 μ L de *S. mutans* (com densidade óptica de 0,6 com 600 nm) foi preparado em caldo de infusão de cérebro e coração (BHI) (DIFCO, Becton, Dickinson and Company, NJ, EUA), em seguida foi incubado em estufa por 18 h a 37°C em microaerofilia (uso da técnica da chama de vela) (FÚCIO et al., 2008). A determinação da CIM foi realizada por meio da técnica da microdiluição conforme o *Clinical and Laboratory Standards Institute: CLSI Guidelines* (CLSI, 2005). Para isso, placas de microdiluição de 96 poços, com fundo em forma de “U” (Nunclon, Thomas Scientific, NJ, USA) foram utilizadas. Inicialmente, 100 μ L de caldo de BHI foram inseridos em cada poço.

Em seguida, 100 µL de cada substância (conforme cada grupo), foram transferidos para o primeiro poço e diluídos seriadamente a partir da retirada de uma alíquota de 100 µL da cavidade anterior (mais concentrada) para a cavidade sucessora (menos concentrada). Por último, 100 µL do inóculo de *S. mutans* foi inserido em cada poço. Simultaneamente, o controle da viabilidade da cepa (controle de crescimento - meio de cultura com inóculo) e o controle de esterilidade do meio (somente meio de cultura) foram realizados. O ensaio foi realizado em triplicata, e as placas de microdiluição foram incubadas em estufa por 24 h a 37°C, em microaerofilia (uso da técnica da chama de vela). A CIM foi considerada a menor concentração da substância em teste capaz de produzir inibição visível sobre o crescimento bacteriano (formação ou não de aglomerados de células no fundo dos poços da placa - “botão”) (CLSI, 2005).

A CBM foi determinada pela menor concentração da substância que inibiu o crescimento visível do subcultivo, a qual foi capaz de eliminar o microrganismo. Para isso, alíquotas da CIM, e à concentração imediatamente mais concentrada (CIM x 2) e a menos concentrada (CIM/2) foram subcultivadas em placas de petri contendo ágar de Mueller Hinton, por 48 h a 37°C sob microaerofilia (uso da técnica da chama de vela).

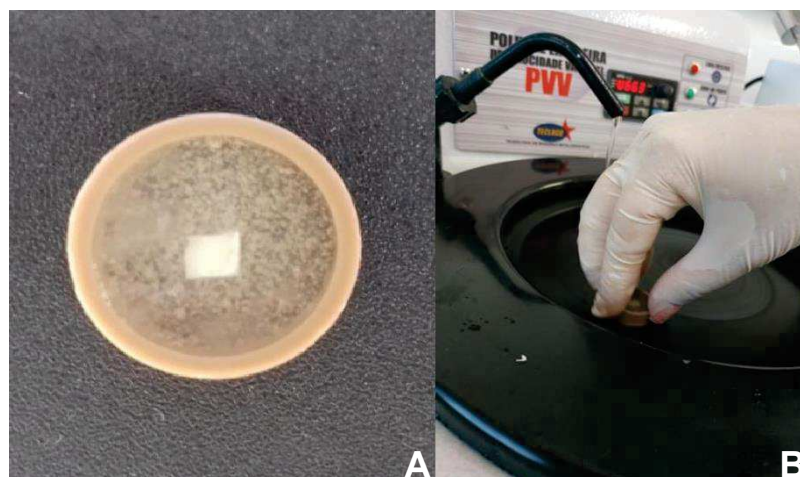
4.3 DESAFIO CARIOGÊNICO COM BIOFILME DE *S. mutans*

4.3.1 Preparo das amostras e grupos de estudo

Vinte e três terceiros molares hígidos foram obtidos com a aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal de Juiz de Fora (protocolo nº 13403819.2.0000.5147) (ANEXO A). Os dentes foram armazenados em timol 0,1% a 4 °C e usados dentro de 1 mês após a extração. Nas superfícies proximais de cada dente, foi desenhada uma janela de 4 mm x 4 mm. Dois blocos de esmalte (uma de cada superfície proximal) foram obtidos com caneta de baixa rotação e disco de dupla face diamantado (nº 7020, KG Sorensen, Barueri, SP, Brasil) sob irrigação constante, totalizando uma área de esmalte de 16 mm². Os blocos de esmalte foram incluídos em resina acrílica (Vipi Flash, Pirassununga, SP, Brasil) e submetidos ao polimento seriado, sob irrigação constante, com lixas de carboneto de silício (# 400, 600 e 1200) e finalizado com suspensão de alumina (1 µm) (Erios Corp., São Paulo, SP,

Brasil) e disco de feltro (Figura 2). As amostras foram limpas por 10 min em banho ultrassônico (Ultrasonic Cleaner, Unique Ind. E Com. Ltda, São Paulo, SP, Brasil).

Figura 2- Preparo das amostras. A) Bloco de esmalte embutido em resina acrílica; B) Polimento sob irrigação da amostra.



Fonte: Elaborada pela autora (2020).

4.3.2 Desafio cariogênico com *S. mutans*

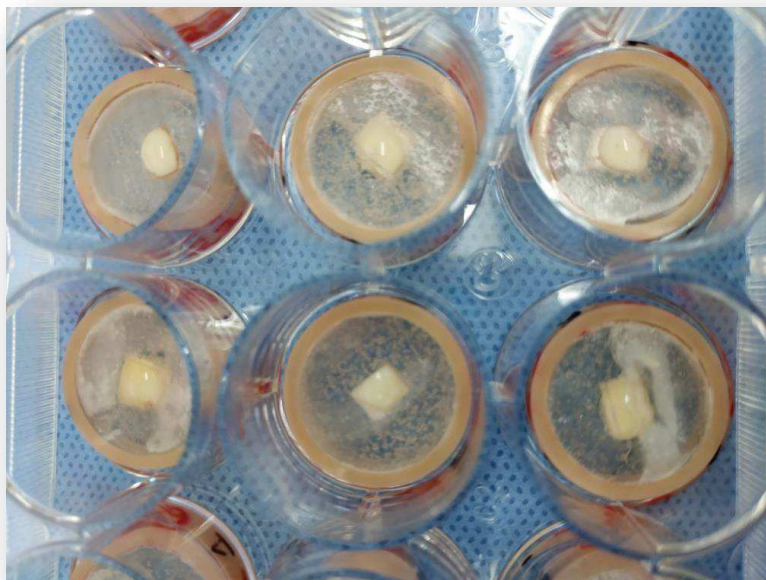
Nove grupos foram formados para o desafio cariogênico com *S. mutans*, os quais já foram descritos no item 4.2. O inóculo de *S. mutans* também foi preparado como descrito anteriormente.

As amostras de blocos de esmalte foram esterilizadas por óxido de etileno (ACECIL Central de Esterilização e Comércio Ltda, Campinas, SP, Brasil). Para obtenção da UFC inicial, o inóculo de *S. mutans* foi diluído serialmente (10^{-1} a 10^{-6}) para plaqueamento em ágar de Mueller Hinton. As placas foram incubadas por 48 h a 37°C em estufa, em microaerofilia (técnica da chama de vela).

As amostras foram inseridas individualmente em placas de 12 poços (Nunclon, Thomas Scientific, NJ, USA) e na superfície de esmalte de cada amostra foram depositados 20 μ L do inóculo de *S. mutans* e mantidos em repouso por 2 h para aderência inicial (FÚCIO et al., 2008) (Figura 3). Após, as amostras foram lavadas em água destilada esterilizada para eliminação das

células não aderidas. Em seguida, as soluções foram aplicadas de acordo com cada grupo, durante 90 s, para simular o bochecho na cavidade bucal (COSTA et al., 2014).

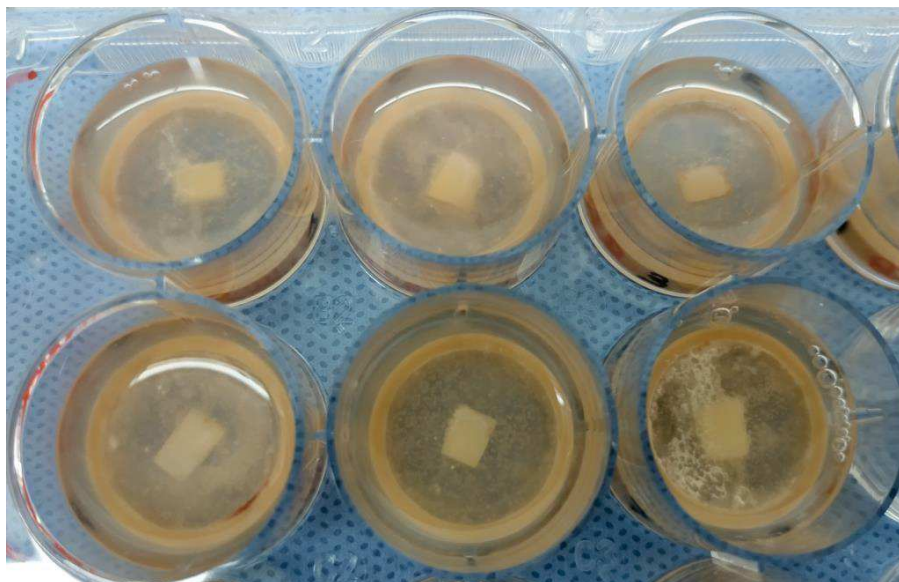
Figura 3 - Blocos de esmalte com 20 μL de *S. mutans* na superfície para adesão inicial.



Fonte: Elaborada pela autora (2021).

Após, as amostras foram lavadas com água destilada esterilizada e, subsequentemente, foram imersas em poços contendo 1 mL de caldo de BHI suplementado com 1% de sacarose (FÚCIO et al., 2008) (Figura 4). As placas foram incubadas por 24 h, a 37°C em estufa, em microaerofilia com o emprego do método da chama de vela. Este desafio cariogênico foi repetido por 7 dias, com aplicações diárias das soluções e troca de meio a cada 24 h. Após este período, com auxílio de uma alça de polipropileno de 10 μL , o biofilme foi removido e inserido em eppendorf contendo 1 mL de NaCl 0,9%. O conteúdo foi agitado em vortex por 1 min. A suspensão foi diluída serialmente em NaCl 0,9% (10^{-1} a 10^{-6}) para plaqueamento em ágar de Mueller Hinton. As placas foram incubadas por 48 h a 37°C em estufa para obtenção da UFC final de cada grupo. Assim, foi realizada uma comparação entre os valores de UFC inicial e de UFC final de *S. mutans* de cada grupo do estudo. Os blocos de esmalte foram lavados em ultrassom por 10 min para os testes de dureza de superfície.

Figura 4- Amostras imersas em 1mL de BHI + 1% de sacarose nos poços da placa de poliestireno.



Fonte: Elaborada pela autora (2021).

4.3.3 Análise de microdureza Knoop

As medidas de dureza Knoop foram realizadas antes e após o desafio cariogênico em cada amostra. As medidas de microdureza foram realizadas no microdurômetro (HMV-2, Shimadzu, Kyoto, Japão) (Figura 5), utilizando indentador Knoop e carga de 50 g aplicada por 15 s (DA SILVA, 2020). Cinco indentações, com distância de 100 μm uma das outras, foram realizadas em cada amostra.

Figura 5- Microduromômetro (HMV-2, Shimadzu, Kyoto, Japão) utilizado para determinar valores de dureza.



Fonte: Elaborada pela autora (2021).

A porcentagem de alteração de dureza de superfície (%KHN = % *surface microhardness measurement*) foi calculada pela fórmula (MAGALHÃES et al., 2021b):

$$\% \text{ KHN} = 100 \times [(KHN_{\text{pós desafio}} - KHN_{\text{inicial}}) / KHN_{\text{inicial}}]$$

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada por meio do pacote estatístico Jamovi (versão 1.8, computer Software, obtido em www.jamovi.org), considerando um erro α de 0,05. Os dados foram verificados quanto à distribuição normal (teste de Shapiro-Wilk) e igualdade de variâncias (teste de Levene), seguido de análise estatística paramétrica. Os dados de UFC/mL de *S. mutans* no biofilme foram transformados para Log_{10} para comparação entre os grupos. O teste de esfericidade (Shapiro-Wilk) apresentou distribuição normal, porém a

homogeneidade de variância (Teste de Levene) não apresentou ($p < 0.001$). Assim, o teste de ANOVA 2 critérios de medidas repetidas foi utilizado para comparação de UFC/mL dos grupos em dois fatores: soluções (9 soluções) e tempo (inicial e final), seguindo a recomendação de Cohen (2001), a qual afirma que testes paramétricos, como ANOVA, são suficientemente robustos em casos de violação de normalidade. Os resultados foram apresentados pela mediana (1º. quartil – 3º. quartil).

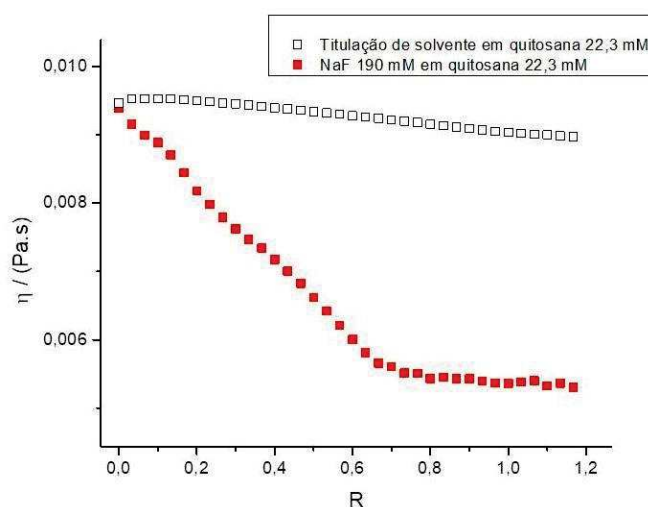
Dados de dureza apresentaram distribuição normal ($p < 0,001$) e variação semelhante entre os grupos ($p < 0,001$); portanto, a análise de variância de medidas repetidas (ANOVA RM) e o teste post-hoc de Tukey foram aplicados para: i) comparação intragrupo dos valores de KHN; ii) comparação de KHN entre os grupos em cada período experimental. A análise de variância unilateral (ANOVA) e os testes post-hoc de Tukey foram usados para analisar a % de mudança na dureza entre os grupos.

5 RESULTADOS

Os resultados da titulação viscosimétrica são mostrados na Figura 6, por meio da titulação de NaF - 190 mM em 15,0 mL de Quitosana - 22,3 mM (base monomérica). A titulação da solução de ácido acético 1,0% v/v (solvente) na solução de quitosana (4,0 mg/mL) foi realizada para, posteriormente, verificar a titulação do NaF na solução de quitosana, a fim de investigar a magnitude deste processo em viscosidade. Conforme observado na Figura 6, a diluição da quitosana por titulação da solução de ácido acético (solvente) teve um efeito não significativo na viscosidade quando comparada à curva de titulação do NaF na solução de Quitosana. No início da titulação, a viscosidade apresentou valores maiores, porém, com a adição de NaF houve redução na viscosidade até a relação molar de $[\text{NaF}]/[\text{Quit}_{\text{monômero}}] \approx 0,64$.

Após encontrar a razão molar $[\text{NaF}]/[\text{Quit}_{\text{monômero}}]$, as concentrações das suspensões de partículas de quitosana carregadas com NaF a 0,2% (2 mg/mL) e 0,05% (0,5 mg/mL) foram ajustadas com a razão molar de 1:1 entre os compostos, a qual foi calculada com base na quantidade de íons fluoreto livre. Assim, a concentração molar dos compostos para preparo das suspensões de Quit/NaF foi de 0,0475 mol/L para a concentração de 0,2%, e de 0,0118 mol/L para a de 0,05%.

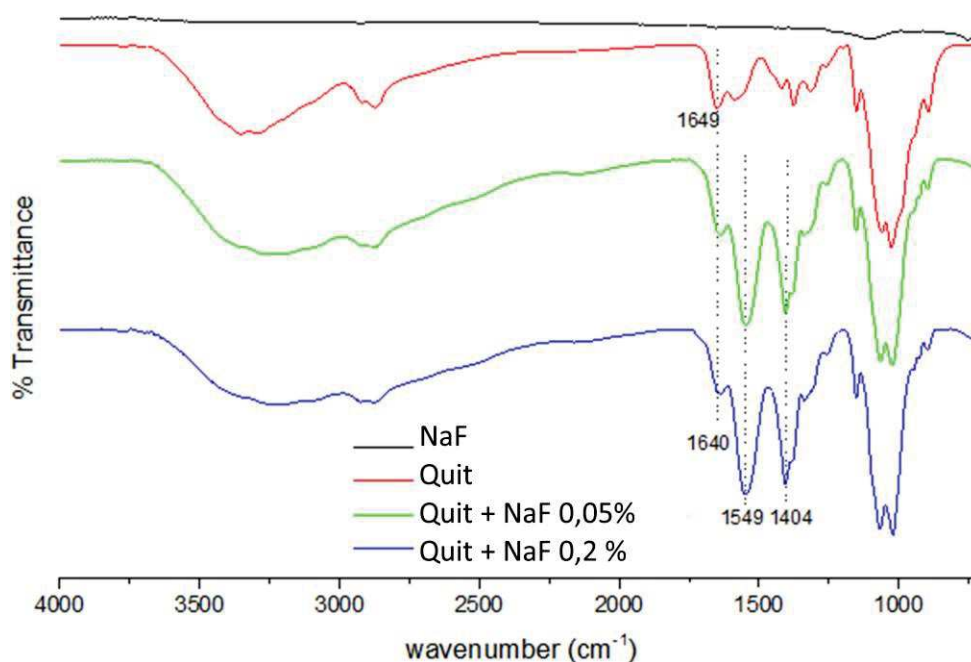
Figura 6- Titulação viscosimétrica de NaF 190 mM em 15,0 mL de Quitosana 22,3 mM (de base monomérica). Medição realizada a 25,0 °C e 1000 s⁻¹. η = viscosidade; R= razão molar ou estequiométrica de $[\text{NaF}]/[\text{Quit}_{\text{monômero}}]$.



Fonte: Elaborada pela autora (2020).

A Figura 7 demonstra os valores de absorção de FTIR para Quit, NaF e suspensões de partículas de Quit/NaF 0,05% e 0,2%. No espectro da quitosana, o pico amplo e médio na faixa de 3750-3200 cm^{-1} foi atribuído à vibração de alongamento O-H ligada por hidrogênio. O alongamento N-H da amida I e II foi observado a 1649 e 1584 cm^{-1} , respectivamente. Um pico de vibração de alongamento de amina C-N tipo I foi observado em 1318 cm^{-1} . Um pico fraco observado em 1422 cm^{-1} foi atribuído à deformação angular de CH_2 adjacente ao grupo carbonila. A absorção de NaF não foi observada na região de 4000-700 cm^{-1} . Os espectros das suspensões liofilizadas de Quit/NaF nas duas concentrações foram idênticos. Mudanças nos espectros das suspensões foram observadas em comparação ao precursor (quitosana). A banda O-H foi alargada aparecendo na região de 3700 - 2400 cm^{-1} . O pico de N-H da amida do grupo II foi aumentado e deslocado para 1549 cm^{-1} . O pico fraco a 1404 cm^{-1} indica a formação do sal acetato.

Figura 7- Espectros de FTIR das soluções de NaF e Quit e das suspensões de partículas de Quit/NaF 0,05% e 0,2%.



Fonte: Elaborada pela autora (2021).

A análise do tamanho de partículas (D_h - nm) das suspensões de Quit/NaF foram de $2160 \pm 180,24$ e $6581,98 \pm 264,68$ e potencial zeta (mV) de

29,56 ± 0,86 e 36,24 ± 0,90 (respectivamente para a concentração correspondente a 0,05% e 0,2%). Durante o período de 30 dias houve estabilidade coloidal das micropartículas, sem alteração de tamanho e potencial zeta. A concentração da solução de quitosana foi decisiva para definir o tamanho das micropartículas. Quanto maior a concentração da quitosana, maior o tamanho das partículas. Porém, a presença de NaF causou redução no tamanho, provavelmente por indução do colapso do complexo, pela interação dos compostos. O pH das suspensões de Quit/NaF foi igual a 4,01 ± 0,05 e 3,98 ± 0,04 (respectivamente para a concentração correspondente a 0,05% e 0,2%), e se mantiveram constantes durante o período de 30 dias, mostrando estabilidade das soluções.

Os valores de CIM e CBM das suspensões de Quit/NaF nas duas concentrações variaram de 0,65 - 1,31 mg/mL, conforme mostrado na Tabela 1.

Tabela 1- Valores da Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) das substâncias testadas.

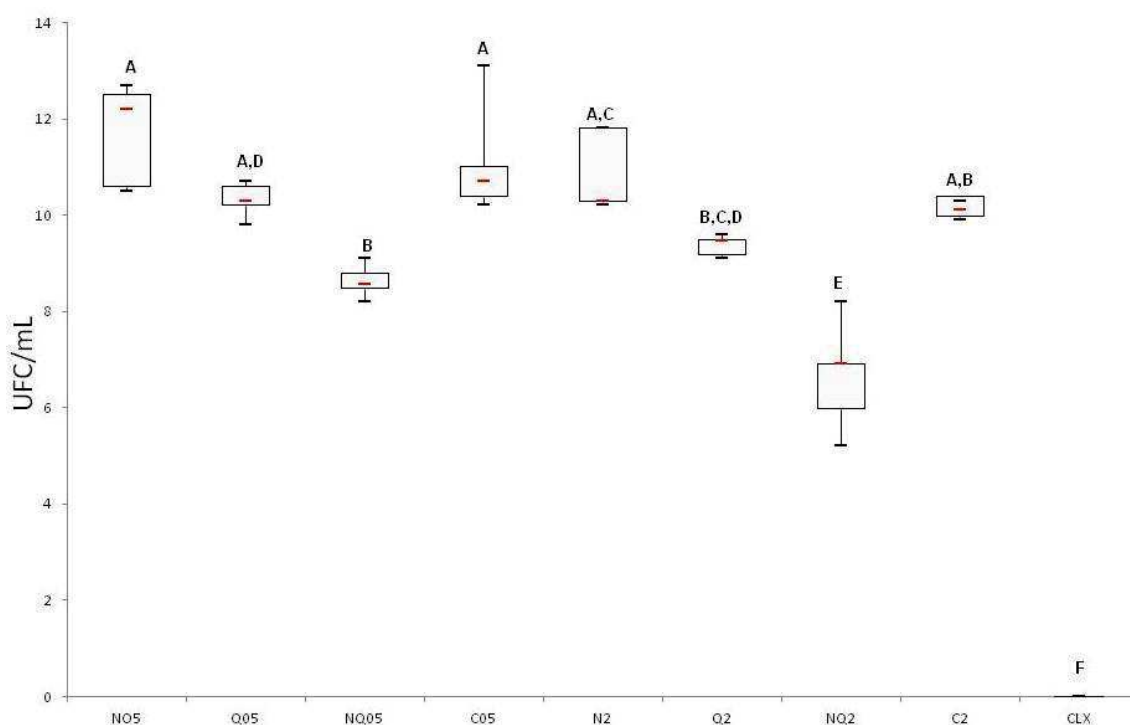
Substâncias testadas	CIM (mg/mL)	CBM (mg/mL)
Quit/NaF 0,2%	0,65	1,31
Quit 0,2 %	0,26	0,26
NaF 0,2%	0,24	0,49
Controle 0,2%	CC	CC
Quit/NaF 0,05%	0,65	0,65
Quit 0,05%	0,26	0,26
NaF 0,05%	0,06	0,06
Controle 0,05%	CC	CC
CLX 0,12%	SC	SC

Fonte: Elaborada pela autora (2021).

Não houve diferença significativa nos valores de UFC/mL do biofilme de *S. mutans* entre os grupos no período inicial. Todos os grupos apresentaram redução significativa nos valores de UFC/mL após a aplicação das soluções/suspensões. O grupo Quit/NaF 0,2% (QN2) apresentou menor número de UFC/mL comparado aos demais grupos ($p < 0,001$) (Figura 8). O grupo

Quit/NaF 0,05% (QN05) não apresentou diferença significativa em comparação com o grupo de Quit 0,2% (Q2) ($p = 0,954$) e controle negativo 0,2% (C2) ($p = 0,121$). Os grupos Quit 0,05% (Q05), NaF 0,05% (N05), NaF 0,2% (N2), controle negativo 0,2% (C2) e controle negativo 0,05% (C05) não apresentaram diferença estatística entre si ($p > 0,05$) e apresentaram os maiores valores de UFC/mL. O grupo controle positivo - CLX 0,12% não apresentou crescimento bacteriano (Figura 8).

Figura 8 - Diagramas de box plot mostrando o efeito da aplicação das soluções e suspensões na UFC/mL de *S. mutans* colonizados no esmalte durante 7 dias.



Barras horizontais (cor vermelha) dentro das caixas são os valores da mediana. Os limites inferiores e superiores das caixas são relacionados aos valores de percentis 25 e 75%, respectivamente. As extremidades das linhas verticais representam os valores mínimo e máximo de cada grupo. Letras maiúsculas diferentes mostram diferença significativa entre os grupos após biofilme de *S. mutans* pelo teste de ANOVA dois fatores de medidas repetidas ($P < 0,05$). N05= Solução de NaF 0,05%; Q05= Solução de Quitosana 0,05%; NQ05= Suspensão de partículas Quit/NaF 0,05%; C05= Controle 0,05%; N2= Solução de NaF 0,2%; Q2= Solução de Quitosana 0,2%; NQ2= Suspensão de partículas Quit/NaF 0,2%; C2= Controle 0,2%; CLX= Digluconato de clorexidina 0,12%.

Fonte: Elaborada pela autora (2021).

A Tabela 2 mostra as medidas de microdureza Knoop (KHN) iniciais e pós-desafio. O desafio cariogênico reduziu significativamente os valores de KHN em todos os grupos ($p < 0,001$). Os valores iniciais de KHN não diferiram significativamente entre os grupos ($p = 1,00$). Após o desafio cariogênico, as

amostras tratadas com as suspensões de Quit/NaF 0,2% e Quit/NaF 0,05%, e CLX apresentaram os maiores valores de KHN ($288 \pm 28,1$; $286 \pm 15,6$; $321 \pm 22,0$ respectivamente), sem diferença entre eles ($p = 1,00$). Não foram encontradas diferenças significativas nos valores de KHN entre os grupos Quit 0,05%, NaF 0,05%, Quit 0,2% e NaF 0,2% ($p = 1,00$), os quais apresentaram valores de KHN intermediários. Os grupos de suspensão de Quit/NaF 0,05% e 0,2% , e CLX também mostraram a menor % de mudança nos valores de KHN após o desafio cariogênico ($p = 1,00$).

Tabela 2- Valores de Dureza Knoop (KHN) do esmalte antes e após a aplicação das soluções e desafio cariogênico. Valores são expressos em média \pm desvio padrão.

Substâncias testadas	KHN		% mudança de KHN
	KHN inicial	KHN pós-desafio	
Quit/NaF 0,2%	$348 \pm 21,2$ ^{A,a*,**}	$288 \pm 28,1$ ^{A,b}	$17,3 \pm 6,0$ ^{C***}
Quit 0,2 %	$362 \pm 22,7$ ^{A,a}	$237 \pm 14,5$ ^{B,b}	$34,2 \pm 7,6$ ^B
NaF 0,2%	$350 \pm 11,9$ ^{A,a}	$235 \pm 29,7$ ^{B,b}	$32,8 \pm 8,9$ ^B
Controle 0,2%	$360 \pm 37,2$ ^{A,a}	$146 \pm 14,0$ ^{C,b}	$59,1 \pm 5,0$ ^A
Quit/NaF 0,05%	$350 \pm 9,33$ ^{A,a}	$286 \pm 15,6$ ^{A,b}	$18,3 \pm 6,1$ ^C
Quit 0,05%	$357 \pm 19,0$ ^{A,a}	$214 \pm 13,7$ ^{B,C,b}	$39,8 \pm 7,2$ ^{A,B}
NaF 0,05%	$361 \pm 9,08$ ^{A,a}	$237 \pm 19,5$ ^{B,b}	$34,3 \pm 6,2$ ^B
Controle 0,05%	$353 \pm 29,6$ ^{A,a}	$171 \pm 25,2$ ^{C,b}	$51,8 \pm 4,7$ ^A
CLX 0,12%	$350 \pm 4,49$ ^{A,a}	$321 \pm 22,0$ ^{A,a}	$8,35 \pm 7,2$ ^C

Fonte: Elaborada pela autora (2021).

* Valores expressos por letras maiúsculas iguais indicam que não houve diferença estatística significativa entre os grupos em cada período experimental ($p > 0,05$ por ANOVA dois fatores de medidas repetidas e Teste de Tukey).

** Valores expressos por letras minúsculas iguais indicam que não houve diferença estatística significativa em cada grupo antes e depois do desafio cariogênico ($p > 0,05$ por ANOVA dois fatores de medidas repetidas e Teste de Tukey).

*** Valores expressos por letras maiúsculas iguais indicam que não houve diferença estatística significativa entre os grupos para % de mudança de KHN ($p > 0,05$ por ANOVA unilateral e Teste de Tukey).

6 DISCUSSÃO

A hipótese testada no nosso estudo foi aceita, uma vez que as suspensões de micropartículas de Quit/NaF apresentaram efeito antibacteriano reduzindo a formação do biofilme de *S. mutans* e diminuindo a desmineralização do esmalte causada por desafio cariogênico. Entretanto, a suspensão de micropartículas de Quit/NaF 0,2% reduziu efetivamente a formação de biofilme de *S. mutans*, ao passo que a de 0,05% apresentou valores intermediários na redução de UFC/mL de *S. mutans*.

No presente estudo, as suspensões de partículas de quitosana carregadas com NaF foram sintetizadas pelo método de gelificação iônica, utilizando o fluoreto de sódio com o objetivo de fornecer íons fluoreto para atuar na prevenção da cárie dental. No processo de gelificação iônica agentes reticulantes podem ser utilizados para proporcionar a interação eletrostática entre o polímero da quitosana e a carga oposta do agente reticulador, o qual geralmente é de baixo peso molecular, como o tripolifosfato de sódio (TPP) (NGUYEN et al., 2017; FURTADO et al., 2018).

O agente reticulador não foi utilizado neste estudo no processo de gelificação iônica para a síntese de micropartículas, porém o fluoreto de sódio foi adicionado, por ser um sal monovalente, de baixo peso molecular (41,99 g/mol) e massa molar (18,01 g/mol) (NGUYEN et al., 2017), além de ser o composto fluoretado mais utilizado na prevenção da cárie (MARINHO et al., 2016). A hipótese elaborada no nosso estudo foi que, após o processo de dissociação, ocorresse a liberação de íons F^- que poderiam interagir com os grupos amino da quitosana, favorecendo a formação de partículas de quitosana em menor escala, da mesma forma como ocorre com o TPP. A interação da molécula de quitosana com o NaF foi verificada por meio da análise da viscosidade e FTIR, os quais são parâmetros característicos para a caracterização de partículas (DU et al., 2009; DE CARVALHO et al., 2019).

A análise da viscosidade também realizada no estudo é uma propriedade mecânica macroscópica que depende diretamente do tamanho e da carga das partículas, e do equilíbrio entre partículas-solvente, partícula-partícula e interações solvente-solvente (DE CARVALHO et al., 2019). A titulação envolve uma diluição de titulante, como descrito na metodologia, com

o intuito de verificar a interação entre a quitosana e NaF e a formação espontânea de partículas de Quit/NaF. Observou-se redução dos valores de viscosidade quando o NaF foi titulado em quitosana devido à neutralização dos grupos catiônicos, como também ocorre quando um agente reticulador é utilizado (DE CARVALHO et al., 2019). A titulação da solução de ácido acético 1,0% v/v na solução de quitosana (4,0 mg/mL) foi realizada como o "branco", e demonstrou um efeito baixo na viscosidade quando comparada à curva de titulação do NaF 190.0 mM na solução de quitosana (Figura 6).

No início da titulação, a viscosidade apresentou valores superiores. Nessa região, as moléculas de quitosana estavam em um estado de conformação estendida (cadeia aberta), com repulsão intramolecular máxima devido às suas cargas positivas. Com a adição de NaF, houve uma redução da viscosidade para a razão molar de $[\text{NaF}]/[\text{Quit}] \approx 0,64$, o que foi atribuído à neutralização da cadeia polimérica devido à interação dos grupos positivos da quitosana (NH_3^+) com as cargas negativas NaF (F^-) (DE CARVALHO et al., 2019). Provavelmente houve uma interação iônica entre os grupos amino carregados positivamente ($-\text{NH}_3^+$) da quitosana e os grupos fluoreto carregados negativamente ($-\text{F}^-$) do NaF, como já citado por Nguyen et al., 2017. Assim, a neutralização das cargas entre a quitosana e o NaF promoveu uma contração das cadeias da molécula de quitosana, levando-a a uma conformação menor, causando redução nos valores de viscosidade (Figura 6). Esse resultado reforça a hipótese da formação do complexo de partículas de quitosana com a adição de NaF. À medida que as cadeias são compactadas, o atrito hidrodinâmico entre as partículas torna-se menor, a fim de facilitar a movimentação de quantidades significativas de moléculas de água durante o cisalhamento (DE CARVALHO et al., 2019), e assim há uma redução na viscosidade da suspensão de partículas de Quit/NaF.

A análise de FTIR mostrou diferentes picos relacionados às vibrações das ligações químicas causadas pela quebra ou formação de ligações e interações intermoleculares entre os compostos. Mudanças foram observadas em comparação com a quitosana (Figura 7). A banda O-H foi alargada aparecendo na região de $3700\text{-}2400\text{ cm}^{-1}$, sugerindo um aumento nas ligações de hidrogênio. O pico de N-H da amida do grupo II foi aumentado e deslocado para 1549 cm^{-1} (DE CARVALHO et al., 2019). O pico em 1404 cm^{-1} revela

vibrações do ânion carboxilato -COO^- , devido à presença do acetato utilizado para dissolver a quitosana (MAURICIO-SÁNCHEZ et al., 2018). Por fim, esses dados sugerem protonação de NH_2 com a formação de pares de íons em suspensões.

Alguns fatores podem interferir no tamanho das partículas formadas, como o método de síntese, o pH do meio, a concentração e o peso molecular da quitosana (IKONO et al., 2019). Assim, as soluções foram preparadas e avaliadas por 30 dias quanto à estabilidade do ZP, D_h e pH.

O potencial zeta é um método utilizado para compreender a estabilidade das dispersões coloidais por meio do controle das interações eletrostáticas das partículas, de modo que ao ser aplicado uma tensão no par de elétrons do eletrodo, as partículas carregadas são atraídas para o eletrodo de carga oposta, e sua velocidade é medida e expressa em força de campo unitária como mobilidade eletroforética (KASZUBA et al., 2010). Valores de ± 30 mV demonstram estabilidade entre as partículas (BARRERAS et al., 2016).

A suspensão de micropartículas de Quit/NaF apresentou potencial zeta positivo de $+36,24 \pm 0,9$ mV e $+29,56 \pm 0,86$ (respectivamente para a concentração correspondente a 0,05% e 0,2%), o que justifica a interação eletrostática e estabilidade coloidal das partículas. A concentração de quitosana teve efeito mínimo nos valores de ZP e a adição de NaF causou redução dos valores de ZP, de modo que a estabilidade das partículas de Quit/NaF foi mantida durante 30 dias. A redução dos valores de ZP obtidos com a adição de NaF pode estar relacionada à neutralização dos grupos catiônicos da quitosana (Furtado et al., 2018). Nguyen et al. (2017) também apontou estabilidade das nanopartículas de quitosana/TPP incorporadas com NaF nas duas concentrações avaliadas (0,2% e 0,4%) no período de 30 dias.

O tamanho das partículas de Quit/NaF foi avaliado pelo método de espalhamento de luz dinâmico, o qual é a tecnologia mais popular em dimensionamento de partículas, e tem sido usado para medir pequenas partículas em suspensão (DE CARVALHO et al., 2019). As suspensões de Qui/NaF apresentaram tamanho igual a $2160 \pm 180,24$ nm e $6581,98 \pm 264,68$ nm (respectivamente para as concentrações de 0,05% e 0,2%). Esses tamanhos caracteriza a formação de micropartículas (SREEKUMAR et al., 2018).

As micropartículas de Quit/NaF apresentaram estabilidade de tamanho no período de 4 semanas, sendo que a concentração de quitosana foi determinante para a formação do tamanho das partículas. Com a adição do NaF, houve redução do tamanho das partículas, devido a uma indução do colapso da estrutura conforme discutido anteriormente. Dados semelhantes foram encontrados no estudo de Furtado et al. (2018) em que as partículas permaneceram estáveis durante o período de 21 dias, porém a presença de NaF não impediu o colapso das partículas após o período estudado.

O pH do meio pode afetar as características físico-químicas relevantes das suspensões de partículas de quitosana e sua estabilidade, alterando parâmetros como hidrofobicidade das partículas, molhabilidade e homogeneidade de superfície (ALISON et al., 2018). Durante o período de 30 dias verificou-se que o pH das soluções permaneceu estável.

O presente estudo testou a aplicação de suspensão de micropartículas de Quit/NaF na superfície do esmalte humano quando o modelo microbiano de desafio cariogênico com *S. mutans* foi utilizado para simular o processo de cárie. Os modelos microbianos são usados para avaliar a desmineralização (ou inibição da desmineralização) de tecidos dentários e possui vantagens sobre outros modelos de cárie *in vitro*, pois permite a atuação dos agentes anti-cárie nos microrganismos, e assim os efeitos antibacterianos dos mesmos podem ser estudados (MASKE et al., 2017; AMAECHI et al., 2019).

As suspensões de micropartículas de Quit/NaF a 0,05% e 0,2% apresentaram CIM igual 0,65 mg/mL e CBM de 0,65 mg/mL e 1,3 mg/mL, respectivamente. A solução de Quit 0,2% e 0,05% apresentaram valores de CIM e CBM de 0,26 mg/mL, enquanto para NaF os valores variaram entre 0,24 mg/mL e 0,12 mg/mL para ambas as concentrações (Tabela 1). Os resultados da CIM estão de acordo com outros estudos, que também utilizaram quitosana de baixo peso molecular contra *S. mutans*, em que a CIM variou de 0,5 a 2 mg/mL (BAE et al., 2006; COSTA et al., 2012). O digluconato de clorexidina 0,12%, o padrão ouro contra a formação de biofilme (VARONI et al., 2012), foi considerado controle positivo neste estudo e apresentou crescimento bacteriano.

Os valores de UFC/mL inicial do biofilme de *S. mutans* foi obtida com o intuito de comparação após o desafio cariogênico. Todos os grupos

apresentaram redução significativa dos valores de UFC/mL após a aplicação das soluções. O grupo de micropartículas de Quit/NaF a 0,2% apresentou menor número de UFC/mL em comparação aos demais grupos ($p < 0,001$); e o grupo Quit 0,2% apresentou maior redução de microrganismos comparado aos grupos Quit 0,05%, NaF 0,05% e NaF 0,2% (Figura 8). Isso pode ser explicado devido a maior concentração da quitosana. Diversas concentrações de quitosana já foram testadas na literatura, e ainda não há uma concentração definida sobre qual seria a mais indicada para agir contra *S. mutans* (BUSSCHER et al., 2008; NEILANDS et al., 2011; COSTA et al., 2013, 2014; ABEDIAN et al., 2019). Porém, já foi verificado que quanto maior a concentração e o tempo de exposição da quitosana ao microrganismo, maior a sua atividade antibacteriana (BUSSCHER et al., 2008; CHÁVEZ DE PAZ et al., 2011; COSTA et al., 2012) Kawakita et al. (2019) avaliaram o efeito de duas formulações de quitosana (dispersão e micropartículas) nas concentrações de 0,25% e 1% contra biofilme maduro de *S. mutans*, de modo que os autores encontraram que as micropartículas apresentaram melhor efeito na maior concentração.

A quitosana apresenta vários mecanismos de ação antimicrobiana (KONG et al., 2010; CHÁVEZ DE PAZ et al., 2011; COSTA et al., 2012). Um deles é relacionado a natureza policatiónica da quitosana que pode interagir com a parede celular de bactérias, especialmente bactérias gram-positivas (que contêm aminoácidos ácidos, como ácido teicóico e isoglutamato em sua parede celular) (KONG et al., 2010). Assim, a carga positiva da quitosana fornece uma forte fixação à parede celular, resultando na lise celular da bactéria e na liberação de componentes celulares, podendo levar à morte celular (KONG et al., 2010). Além disso, o grupo amina da cadeia da quitosana também pode interromper as ligações eletrostáticas entre as bactérias do biofilme e a superfície do dente (CHÁVEZ DE PAZ et al., 2011). A quitosana pode penetrar na parede celular bacteriana e se ligar ao DNA, inibindo a síntese de mRNA, afetando a produção de proteínas e enzimas essenciais, demonstrando um efeito quelante. Esse efeito pode interferir na síntese de ácidos graxos e proteínas da bactéria, mostrando outro mecanismo de ação antimicrobiano da quitosana (KONG et al., 2010; CHÁVEZ DE PAZ et al., 2011; NEILANDS et al., 2011).

O fluoreto de sódio, em ambas as concentrações (0,2% e 0,05%), mostrou baixo efeito no biofilme de *S. mutans*, assim como no estudo de Thurnheer & Belibasakis (2018) (Figura 8). O efeito antimicrobiano dos íons fluoreto ainda não foi estabelecido, e sua maior atuação é no processo de desmineralização e remineralização do esmalte (THURNHEER & BELIBASAKIS, 2018). Thurnheer & Belibasakis, em 2018, avaliaram o efeito do NaF na desmineralização do esmalte no biofilme oral, e encontraram que o fluoreto não afetou a composição do biofilme. O maior efeito encontrado foi na redução da desmineralização do esmalte, provavelmente por causar diminuição na produção de ácido ou EPS pelas bactérias do biofilme, ou por promover remineralização do esmalte devido aos íons fluoreto. Assim, acreditamos que ao associar a quitosana ao NaF no grupo Quit/NaF 0,2% a maior inibição no crescimento de colônias de *S. mutans* observada em comparação aos grupos Quit/NaF 0,05% e dos compostos isolados pode ser relacionada a presença de quitosana em maior concentração. Esse resultado nos mostra que um composto com suspensão de micropartículas de Quit/NaF 0,2% pode ser interessante para uso clínico na prevenção da cárie já que NaF nas concentrações de 0,05% e 0,2% já são comercialmente utilizados. Porém, futuros ensaios devem ser realizados para comprovar a efetividade anti-cárie deste composto.

O teste de microdureza foi utilizado para determinar mudanças na superfície do esmalte durante os estágios iniciais do desenvolvimento de cárie (ZERO, 1995; MOHD SAID; EKAMBARAM; YIU, 2017; ZHANG et al., 2018). Embora este teste não possa apontar as diferenças no conteúdo mineral, a avaliação da microdureza superficial é apropriada para investigar a resistência de um tecido duro, como o esmalte, apresenta microestrutura fina, não homogênea e com tendência a rachaduras (MOHD SAID; EKAMBARAM; YIU, 2017; MAGALHÃES et al., 2021).

No presente estudo, não encontramos diferença nos valores iniciais de KHN (entre 300 e 400 KHN) entre os grupos (Tabela 3), o que sugere que todas as amostras foram padronizadas quanto à dureza, e os valores estão de acordo com a literatura (CHUENARROM; BENJAKUL; DAOSODSAI, 2009; MAGALHÃES et al., 2021). No período pós-desafio, os grupos Quit/NaF 0,2%, Quit/NaF 0,05% e CLX apresentaram maiores valores de dureza, sem

diferença estatística entre eles. Os grupos Quit e NaF não apresentaram diferença estatística entre si, nas duas concentrações. Esses resultados mostram que o efeito das suspensões de Quit/NaF no esmalte dental, nas duas concentrações, ambos compostos (Quit e NaF) tiveram ação para fortalecer a estrutura do esmalte, minimizando a perda de dureza da estrutura (processo de desmineralização).

O efeito da quitosana na desmineralização do esmalte é relacionado ao fato da solução de quitosana poder interagir com a superfície do esmalte formando uma barreira física contra a penetração de ácidos (ARNAUD; DE BARROS NETO; DINIZ, 2010; ZHANG et al., 2019); além de ter a capacidade de transportar íons minerais mais profundamente nas lesões de cárie (ZHANG et al., 2019). No estudo de Arnaud et al. (2010) a quitosana interferiu no processo de desmineralização do esmalte, prevenindo a liberação de fósforo da estrutura, atuando como um inibidor de penetração de ácidos advindos do meio bucal.

Nesse estudo possuiu a limitação de não ter testado a liberação de flúor da suspensão de micropartículas de Quit/NaF. Nguyen et al. (2017) mostraram que a suspensão de partículas de NaF/quitosana em maior concentração apresentou maior liberação de íons fluoreto. Existe forte interação eletrostática entre os ânions F^- e o grupo amina protonada NH_3^+ da quitosana durante a preparação das partículas de Quit/NaF, o que reduz a quantidade de flúor liberado no ambiente oral, porém com um padrão de liberação de flúor contínuo durante 24 h (NGUYEN et al., 2017). Por este motivo, testamos a suspensão de micropartículas de Quit/NaF a 0,2% com aplicação uma vez ao dia, ao invés de uma vez por semana, como os enxaguatórios bucais contendo NaF a 0,2% são recomendados (MARINHO et al., 2016).

Em suma, este estudo mostrou que as suspensões de micropartículas de Quit/NaF, nas duas concentrações (0,2% e 0,05%), podem minimizar a desmineralização do esmalte após desafio cariogênico contra *S. mutans*. Embora este modelo de biofilme não simule a complexidade das condições bucais, foi possível verificar que a suspensão de partículas de Quit/NaF, principalmente a 0,2%, conseguiu impedir o crescimento do principal microrganismo relacionado à carie. Os resultados deste estudo mostraram que as suspensões de micropartículas de Quit/NaF a 0,05% e 0,2% possuem

potencial de uso como produtos de higiene bucal para atuar na prevenção da cárie, principalmente em crianças cárie-ativas ou de risco à doença, já que pode apresentar potencial antimicrobiano e liberação de íons F^- de forma lenta e gradual, o que poderia também minimizando o risco de fluorose dental. Entretanto futuros estudos tornam-se necessários para avaliar as limitações encontradas: 1) avaliar o perfil de liberação de flúor das suspensão de micropartículas de Quit/NaF, avaliando sua potencialidade como sistema de liberação controlada de íons F^- ; 2) analisar o efeito antimicrobiano das suspensões com modelos de biofilme multiespécies, além de avaliar o potencial citotóxico das mesmas; e 3) investigar o mecanismo de ação das suspensões de micropartículas de Quit/NaF no esmalte desmineralizado.

7 CONCLUSÃO

Nosso estudo mostrou que houve interação dos compostos quitosana e fluoreto de sódio formando a suspensão de micropartículas de Quit/NaF pelo método de gelificação iônica. As suspensões de micropartículas de Quit/NaF (principalmente a de 0,2%) apontaram efeito antibacteriano contra biofilme de *S. mutans* e diminuíram a desmineralização do esmalte humano após o desafio cariogênico, mostrando um interessante potencial de uso como formulação oral para prevenção da cárie.

REFERÊNCIAS

- ABEDIAN, Z. et al. Antibacterial activity of high-molecular-weight and low-molecular-weight chitosan upon oral pathogens. **Journal of Conservative Dentistry**, v. 22, n. 2, p. 169-174, 2019.
- ALISON, L. et al. Emulsions stabilized by chitosan-modified silica nanoparticles: pH control of structure-property relations. **Langmuir**, v. 34, n. 21, p. 6147-6160, 2018.
- AMAECHEI, B. T. et al. Protocols to study dental caries *in vitro*: Microbial caries models. **Methods in Molecular Biology**, v. 1922, p. 357-368.
- ANTONIOU, J. et al. Physicochemical and morphological properties of size-controlled chitosan-tripolyphosphate nanoparticles. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 465, p. 137-146, 2015.
- ARNAUD, T. M. S.; DE BARROS NETO, B.; DINIZ, F. B. Chitosan effect on dental enamel de-remineralization: An *in vitro* evaluation. **Journal of Dentistry**, v. 38, n. 11, p. 848-852, 2010.
- BAE, K. et al. Effect of water-soluble reduced chitosan on *Streptococcus mutans*, plaque regrowth and biofilm vitality. **Clinical Oral Investigations**, v. 10, n. 2, p. 102-107, 2006.
- BARRERAS, U. S. et al. Chitosan nanoparticles enhance the antibacterial activity of chlorhexidine in collagen membranes used for periapical guided tissue regeneration. **Materials Science and Engineering C**, v. 58, p. 1182-1187, 2016.
- BUSSCHER, H. J. et al. Influence of a chitosan on oral bacterial adhesion and growth *in vitro*. **European Journal of Oral Sciences**, v. 116, n. 5, p. 493-495, 2008.
- CHAVEZ DE PAZ, L. E. et al. Antimicrobial effect of chitosan nanoparticles on *Streptococcus mutans* biofilms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 11, p. 3892-3895, 2011.
- CHUENARROM, C.; BENJAKUL, P.; DAOSODSAI, P. Effect of indentation load and time on knoop and vickers microhardness tests for enamel and dentin. **Materials Research**, v. 12, n. 4, p. 473-476, 2009.
- CICCIÙ, M.; FIORILLO, L.; CERVINO, G. Chitosan use in dentistry: A systematic review of recent clinical studies. **Marine Drugs**, v. 17, p. 417, 2019.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE - NCCLS.

Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; fifteenth informational supplement. CLSI/NCCLS document M100-S15 (ISBN 1 - 56238-556-9).

COHEN, M. E. Analysis of ordinal dental data: Evaluation of conflicting recommendations. **Journal of Dental Research**, v. 80, n. 1, p. 309-313, 2001.

COSTA, E. M. et al. Evaluation and insights into chitosan antimicrobial activity against anaerobic oral pathogens. **Anaerobe**, v. 18, n. 3, p. 305-309, 2012.

COSTA, E. M. et al. Study of the effects of chitosan upon *Streptococcus mutans* adherence and biofilm formation. **Anaerobe**, v. 20, p. 27-31, 2013.

COSTA, E. M. et al. A comprehensive study into the impact of a chitosan mouthwash upon oral microorganism's biofilm formation *in vitro*. **Carbohydrate Polymers**, v. 101, n. 1, p. 1081-1086, 2014.

DA SILVA, P. DA S. L. P. Effect of pit and fissure sealants on the prevention of enamel demineralization after exposure to *Streptococcus mutans* Biofilm: *In Vitro* study. **Journal of Pediatric Dentistry**, v. 6, n. 1, p. 00-00, 2020.

DASH, M. et al. Chitosan - A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. **Progress in Polymer Science (Oxford)**, v. 36, n. 8, p. 981-1014, 2011.

DE CARVALHO, F. G. et al. Synthesis and characterization of TPP/chitosan nanoparticles: Colloidal mechanism of reaction and antifungal effect on *C. albicans* biofilm formation. **Materials Science and Engineering C**, v. 104, 1 nov. 2019.

DU, W. L. et al. Antibacterial activity of chitosan tripolyphosphate nanoparticles loaded with various metal ions. **Carbohydrate Polymers**, v. 75, n. 3, p. 385-389, 2009.

FÚCIO, S. B. P. et al. The influence of 30-day-old *Streptococcus mutans* biofilm on the surface of esthetic restorative materials-An *in vitro* study. **Journal of Dentistry**, v. 36, n. 10, p. 833-839, 2008.

FURTADO, G. T. F. DA S. et al. Chitosan/NaF particles prepared via ionotropic gelation: Evaluation of particles size and morphology. **Materials Research**, v. 21, n. 4, p. e20180101, 2018.

GONDIM, B. L. C. et al. Effect of chitosan nanoparticles on the inhibition of *Candida spp.* biofilm on denture base surface. **Archives of Oral Biology**, v. 94, p. 99-107, 2018.

- HEJAZI, R.; AMIJI, M. Chitosan-based gastrointestinal delivery systems. **Journal of Controlled Release**, v. 89, p. 151-165, 2003.
- IKONO, R. et al. Nanochitosan antimicrobial activity against *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* dual-species biofilms. **BMC Research Notes**, v. 12, p. 383, 2019.
- ING, L. Y. et al. Antifungal activity of chitosan nanoparticles and correlation with their physical properties. **International Journal of Biomaterials**, v. 2012, 2012.
- JONASSEN, H.; KJØNIKSEN, A. L.; HIORTH, M. Stability of chitosan nanoparticles cross-linked with tripolyphosphate. **Biomacromolecules**, v. 13, n. 11, p. 3747-3756, 2012.
- KASSEBAUM, N. J. et al. Global burden of untreated caries: A systematic review and metaregression. **Journal of Dental Research**, v. 94, n. 5, p. 650-658, 2015.
- KASZUBA, M. et al. High-concentration zeta potential measurements using light-scattering techniques. **Philosophical Transactions of the Royal Society**, v. 368, p. 4439-4451, 2010.
- KAWAKITA, E. R. H. et al. Effect of chitosan dispersion and microparticles on older *Streptococcus mutans* biofilms. **Molecules**, v. 24, n. 9, p. 1-11, 2019.
- KONG, M. et al. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 144, p. 51-63, 2010.
- LEMOS, J. A. et al. The Biology of *Streptococcus mutans*. **Microbiology Spectrum**, v. 7, n. 1, p. GPP3-0051, 2018.
- MACHIULSKIENE V, et al. Terminology of dental caries and dental caries management: consensus report of a workshop organized by ORCA and cariology research group of IADR. **Caries Research**, v. 54, n. 1, p.7-14. doi: 10.1159/000503309
- MAGALHÃES, T. C. et al. Antibacterial effect of chitosan against *Streptococcus mutans*: An alternative for mouthrinse on dental caries control and prevention? **Revista Brasileira de Odontologia**, v. 78, p. e1897, 2021a.
- MAGALHÃES, T. C. et al. Synthesis of a chitosan nanoparticle suspension and its protective effects against enamel demineralization after an *in vitro* cariogenic challenge. **Journal of Applied Oral Science**, v. 29, p. e20210120, 2021b.
- MARINHO, V. C. C. et al. Fluoride mouthrinses for preventing dental caries in children and adolescents. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 7,

n. 7, p. CD002284, 2016.

MASKE, T. T. et al. *In vitro* biofilm models to study dental caries: a systematic review. **Biofouling**, v. 33, n. 8, p. 661-675, 2017.

MATOS, B. N. et al. Chitosan nanoparticles loading oxaliplatin as a mucoadhesive topical treatment of oral tumors: Iontophoresis further enhances drug delivery *ex vivo*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 154, p. 1265-1275, 2020.

MAURICIO-SÁNCHEZ, R. A. et al. FTIR spectroscopy studies on the spontaneous neutralization of chitosan acetate films by moisture conditioning. **Vibrational Spectroscopy**, v. 94, p. 1-6, 2018.

MOHD SAID, S. N. B.; EKAMBARAM, M.; YIU, C. K. Y. Effect of different fluoride varnishes on remineralization of artificial enamel carious lesions. **International Journal of Paediatric Dentistry**, v. 27, n. 3, p. 163-173, 2017.

MOI, G. P.; TENUTA, L. M. A.; CURY, J. A. Anticaries potential of a fluoride mouthrinse evaluated *in vitro* by validated protocols. **Brazilian Dental Journal**, v. 19, n. 2, p. 91-96, 2008.

NEILANDS, J. et al. Chitosan nanoparticles affect the acid tolerance response in adhered cells of *Streptococcus mutans*. **Caries Research**, v. 45, n. 6, p. 501-505, 2011.

NGUYEN, S. et al. Fluoride loaded polymeric nanoparticles for dental delivery. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 104, p. 326-334, 2017.

PARKINSON, C. R. et al. A randomised clinical evaluation of a fluoride mouthrinse and dentifrice in an *in situ* caries model. **Journal of Dentistry**, v. 70, p. 59-66, 2018.

PERES, M. A. et al. Oral diseases: a global public health challenge. **Lancet**, v. 394, p. 249-60, 2019.

SADAGHIANI, L.; WILSON, M. A.; WILSON, N. H. F. Effect of selected mouthwashes on the surface roughness of resin modified glass-ionomer restorative materials. **Dental Materials**, v. 23, n. 3, p. 325-334, 2007.

SILVA, H. S. R. C.; DOS SANTOS, K. S. C. R.; FERREIRA, E. I. Chitosan: hydrossoluble derivatives, pharmaceutical applications and recent advances. **Quimica Nova**, v. 29, n. 4, 776-785, 2006.

SREEKUMAR, S. et al. Parameters influencing the size of chitosan-TPP nano- and microparticles. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1-11, 2018.

SUN, F. C. et al. Impact of an anticaries mouthrinse on *in vitro* remineralization and microbial control. **International Journal of Dentistry**, v. 2014, 2014.

THE AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRIC DENTISTRY. Guideline on caries risk assessment and management for infants, children, and adolescents. **American Academy of Pediatric Dentistry**, v.38, n.6, p.142-149, 2016.

THURNHEER, T.; BELIBASAKIS, G. N. Effect of sodium fluoride on oral biofilm microbiota and enamel demineralization. **Archives of Oral Biology**, v. 89, p. 77-83, 2018.

TINANOFF, N. et al. Early childhood caries epidemiology, aetiology, risk assessment, societal burden, management, education, and policy: Global perspective. **International Journal of Paediatric Dentistry**, v. 29, p. 238-248, 2019.

VARONI, E. et al. Chlorhexidine (CHX) in dentistry: State of the art. **Minerva stomatologica**, v. 24, p. 1808, 2012.

ZERO, D. T. **In situ caries models. Advances in dental research**, 1995.

ZHANG, J. et al. In-vitro subsurface remineralisation of artificial enamel white spot lesions pre-treated with chitosan. **Dental Materials**, v. 34, n. 8, p. 1154-1167, 2018.

ZHANG, J. et al. Chitosan-bioglass complexes promote subsurface remineralisation of incipient human carious enamel lesions. **Journal of Dentistry**, v. 84, p. 67-75, 2019.

ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Efeito in vitro de nanopartículas de quitosana na formação do biofilme de *Streptococcus mutans* e no esmalte dentário após desafio cariogênico.

Pesquisador: Fabiola Galbiatti de Carvalho Carlo

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 64959517.3.0000.5147

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA UFJF

Patrocinador Principal: FUNDACAO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE MINAS GERAIS

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.998.589

Apresentação do Projeto:

Apresentação do projeto esta clara, detalhada de forma objetiva, descreve as bases científicas que justificam o estudo, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/12 de 2012.

Objetivo da Pesquisa:

O Objetivo da pesquisa está bem delineado, apresenta clareza e compatibilidade com a proposta, tendo adequação da metodologia aos objetivos pretendido, de acordo com as atribuições definidas na Norma Operacional CNS 001 de 2013, item 3.4.1 - 4.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos que o projeto apresenta estão caracterizados e adequadamente descritos, considerando que os indivíduos não sofrerão qualquer dano ou sofrerão prejuízo pela participação ou pela negação de participação na pesquisa e benefícios esperados.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto está bem estruturado, apresenta o tipo de estudo, número de participantes, critério de inclusão e exclusão, forma de recrutamento. As referencias bibliográficas são atuais, sustentam os objetivos do estudo e seguem uma normatização. O cronograma mostra as diversas etapas da pesquisa, além de mostra que a coleta de dados ocorrerá após aprovação do projeto pelo CEP.

Endereço: JOSE LOURENCO KELMER S/N
Bairro: SAO PEDRO **CEP:** 36.036-900
UF: MG **Município:** JUIZ DE FORA
Telefone: (32)2102-3788 **Fax:** (32)1102-3788 **E-mail:** cep.propesq@ufjf.edu.br



Continuação do Parecer: 1.998.589

Declaração de Instituição e Infraestrutura	declaracao_infraestrutura_assinada_direcao.pdf	26/01/2017 15:40:52	Fabiola Galbiatti de Carvalho Carlo	Aceito
--	--	------------------------	-------------------------------------	--------

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

JUIZ DE FORA, 04 de Abril de 2017

Assinado por:
Vânia Lúcia Silva
(Coordenador)

Endereço: JOSE LOURENCO KELMER S/N
Bairro: SAO PEDRO **CEP:** 36.036-900
UF: MG **Município:** JUIZ DE FORA
Telefone: (32)2102-3788 **Fax:** (32)1102-3788 **E-mail:** cep.propesq@ufjf.edu.br