

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**

ALANA GAIL LOPES

**SÍNTESE DE SUSPENSÕES DE MICROPARTÍCULAS DE
QUITOSANA/FLUORETO DE SÓDIO E EFEITO NO ESMALTE DENTAL
APÓS DESAFIO CARIOGÊNICO**

Juiz de Fora
2022

ALANA GAIL LOPES

**SÍNTESE DE SUSPENSÕES DE MICROPARTÍCULAS DE
QUITOSANA/FLUORETO DE SÓDIO E EFEITO NO ESMALTE DENTAL
APÓS DESAFIO CARIOGÊNICO**

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

Orientadora: Profa. Dra. 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)

Lopes, Alana Gail.

Síntese de suspensões de micropartículas de quitosana/fluoreto de sódio e efeito no esmalte dental após desafio cariogênico / Alana Gail Lopes. -- 2022.

49 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. Micropartículas de quitosana. 2. Fluoreto de Sódio. 3. Agente antibacteriano. I. de Carvalho, Fabíola Galbiatti, orient. II. Título.

ALANA GAIL LOPES

SÍNTESE DE SUSPENSÕES DE MICROPARTÍCULAS DE QUITOSANA/FLUORETO DE SÓDIO E EFEITO NO ESMALTE DENTAL APÓS DESAFIO CARIOGÊNICO

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 21 de fevereiro de 2022.

BANCA EXAMINADORA

Profª Drª Fabíola Galbiatti de Carvalho Carlo - Orientadora

Universidade Federal de Juiz de Fora - GV

Prof. Dr Rogério Lacerda dos Santos

Universidade Federal de Juiz de Fora - GV

Prof. Dr Eliseu Aldrighi Munchow

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Juiz de Fora, 28/01/2022.



Documento assinado eletronicamente por **Fabiola Galbiatti de Carvalho Carlo, Professor(a)**, em 21/02/2022, às 16:23, 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 **ELISEU ALDRIGHI MUNCHOW, Usuário Externo**, em



21/02/2022, às 16:24, 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 **Rogério Lacerda dos Santos, Professor(a)**, em 21/02/2022, às 16:52, 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-Uffj (www2.uffj.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **0660705** e o código CRC **7ED207EF**.

AGRADECIMENTOS

Gratidão infinita ao senhor Deus, em primeiro lugar, por conduzir meus caminhos em direção a esse sonho, abrindo portas e me fazendo acreditar que eu sou capaz. Tudo por ti e para ti, Senhor!

À minha amada família, pelo amparo em todos os momentos dessa trajetória. Obrigada por sonharem comigo esse sonho e me incentivarem a buscar o melhor de mim e para mim dentro da minha profissão. Essa conquista é nossa!

À minha professora orientadora Fabíola Galbiatti, agradeço pelo carinho e parceria ao longo desses anos, pelos infinitos ensinamentos (acadêmicos e de vida) que recebi de você e também pelas incontáveis vezes em que nos acalmou dizendo que tudo no final daria certo... e deu! Comemoro hoje essa conquista e me sinto honrada de dividi-la com você, que é uma inspiração para mim! Muito obrigada!

Aos demais professores que me auxiliaram durante o estudo, elucidando as dúvidas e direcionando o trabalho: Prof. Dr. Ângelo Márcio Denadai, Profa. Dra. Gabriela Freitas, Prof. Dr. Jefferson Gomes pelas contribuições durante o processo da dissertação e ao Prof. Dr. Hugo Carlo e Profa. Dra. Ana Beatriz pelas valiosas contribuições durante o exame de qualificação no início da jornada, deixo aqui meus sinceros agradecimentos. Muito obrigada!

À minha grande amiga do coração e parceira de pesquisa, Tais, pelas incontáveis conversas e conselhos, discussão de casos e experimentos, pelos abraços e orações, por ter sido muito mais do que “ombro amigo” nessa trajetória. Amiga, você foi essencial na conquista desse título e em todo este trabalho! Fico muito grata por dividir essa conquista com você e te ter como amiga em minha vida! Nós conseguimos!!!

Agradeço aos demais amigos que fiz na décima segunda turma de mestrado da UFJF. Obrigada por compartilharem comigo angústias e alegrias ao longo dessa caminhada... Sucesso para cada um de nós!

Por fim, gostaria de deixar meu agradecimento à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) pelos auxílios financeiros através das bolsas de estudo durante o curso e ao apoio financeiro da

FAPEMIG para realização deste trabalho, via financiamento de projeto de pesquisa (APQ02895-21).

RESUMO

O uso do fluoreto de sódio (NaF) presente em enxaguatórios bucais é considerado um método auxiliar para o controle da doença cárie. Porém, o potencial antimicrobiano do flúor ainda é questionado, e seu uso pode ser associado a agentes antimicrobianos para a prevenção da cárie. A quitosana (Quit) é um polímero com potencial antimicrobiano, mas poucos estudos avaliaram a associação da Quit com NaF para prevenir o desenvolvimento de lesões de cárie em esmalte. Assim, o objetivo deste estudo foi sintetizar duas suspensões de partículas de quitosana carregadas com fluoreto de sódio (Quit/NaF) a 0,05% e 0,2% para avaliar *in vitro* seus efeitos no esmalte dental após desafio cariogênico com ciclagem de pH. As suspensões de partículas Quit/NaF foram sintetizadas pelo método de geleificação iônica e caracterizadas por titulação por meio do método de espalhamento de luz dinâmico (medidas de tamanho de partículas por diâmetro hidrodinâmico - D_h e análise do potencial zeta - ZP) e espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FTIR). A estabilidade das partículas em suspensão foi avaliada por meio do ZP e D_h durante um mês, com intervalo de uma semana entre as medidas. O desafio cariogênico foi realizado em blocos de esmalte humano (4 x 4 mm) pelo método de ciclagem de pH (3h na solução desmineralizante e 21h na solução remineralizante) por 7 dias, com aplicação das soluções e suspensões de partículas testadas (n = 10/grupo): 1) Quitosana 0,2% (Quit 2); 2) NaF 0,2% (NaF 2); 3) Quitosana/NaF 0,2% (Quit/NaF 2); 4) Controle 0,2% (C 2); 5) Quitosana 0,05% (Quit 05); 6) NaF 0,05% (NaF 05); 7) Quitosana/NaF 0,05% (Quit/NaF 05); 8) Controle 0,05% (C 05). Antes e após o desafio ácido, medidas de microdureza Knoop (KHN) foram realizadas na superfície das amostras. A análise estatística foi realizada por ANOVA de medidas repetidas e teste post-hoc de Tukey ($\alpha = 0,05$). Os resultados de ZP e D_h mostraram que houve interação da quitosana com NaF, sugerindo a formação de micropartículas ($1100 \pm 91,7$ nm). Observou-se redução dos valores de D_h quando o NaF foi titulado em quitosana e valores positivos de ZP ($+ 30$ mV $\pm 0,8$). Quit/NaF 0,05% e 0,2% apresentaram estabilidade de tamanho e ZP por 30 dias. Os espectros de FTIR mostraram interação entre Quit-NaF, evidenciando a formação de micropartículas. O grupo Quit/NaF 2 apresentou o

maior valor de dureza ($213,0 \pm 23,1$) e o menor valor de % KHN ($41,7 \pm 6,5$) pós-desafio cariogênico, sendo estatisticamente diferente dos outros grupos. A suspensão de micropartículas de quitosana carregadas com fluoreto de sódio a 0,2% reduziu a desmineralização do esmalte após desafio cariogênico, demonstrando potencial para ser utilizada como agente anti-cárie.

Palavras-chave: Micropartículas de quitosana. Fluoreto de Sódio. Agente antibacteriano.

ABSTRACT

The use of sodium fluoride (NaF) present in mouthwashes is considered an auxiliary method for the control of caries disease. However, the antimicrobial potential of fluoride is still questioned, and its use can be associated with antimicrobial agents for the prevention of caries. Chitosan (Quit) is a polymer with antimicrobial potential, but few studies have evaluated the association of Quit with NaF to prevent the development of enamel caries. Thus, the aim of this study was to synthesize two suspensions of chitosan particles loaded with sodium fluoride (Quit/NaF) at 0.05% and 0.2% to evaluate in vitro their effects on dental enamel after cariogenic challenge with pH cycling. . The Quit/NaF particle suspensions were synthesized by the ionic gelation method and characterized by titration using the dynamic light scattering method (particle size measurements by hydrodynamic diameter - D_h and zeta potential analysis - ZP) and absorption spectroscopy in the infrared region (FTIR). The stability of suspended particles was evaluated by means of ZP and D_h for one month, with an interval of one week between measurements. The cariogenic challenge was performed on human enamel blocks (4 x 4 mm) by the pH cycling method (3 h in the demineralizing solution and 21 h in the remineralizing solution) for 7 days, with application of the tested solutions and suspensions of particles (n = 10 /group): 1) Chitosan 0.2% (Quit 2); 2) 0.2% NaF (NaF 2); 3) Chitosan/NaF 0.2% (Quit/NaF 2); 4) Control 0.2% (C 2); 5) Chitosan 0.05% (Quit 05); 6) 0.05% NaF (NaF 05); 7) Chitosan/NaF 0.05% (Quit/NaF 05); 8) Control 0.05% (C 05). Before and after the acid challenge, Knoop microhardness (KHN) measurements were performed on the surface of the samples. Statistical analysis was performed by repeated measures ANOVA and Tukey's post-hoc test ($\alpha = 0.05$). The ZP and D_h results showed that chitosan interacted with NaF, suggesting the formation of microparticles (1100 ± 91.7 nm). A reduction in D_h values was observed when NaF was titrated in chitosan and positive values of ZP ($+ 30$ mV ± 0.8). Quit/NaF 0.05% and 0.2% showed stability in size and ZP for 30 days. The FTIR spectra showed interaction between Quit-NaF, evidencing the formation of microparticles. The Quit/NaF 2 group presented the highest hardness value (213.0 ± 23.1) and the lowest % KHN value (41.7 ± 6.5) after the cariogenic challenge, being statistically different from the other groups.

The suspension of chitosan microparticles loaded with 0.2% sodium fluoride reduced enamel demineralization after cariogenic challenge, demonstrating potential to be used as an anti-caries agent.

Keywords: Chitosan microparticles. Sodium Fluoride. Antibacterial agent.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 FLUORETO DE SÓDIO	13
2.2 QUITOSANA.....	14
2.3 QUITOSANA CARREGADA POR FLUORETO DE SÓDIO	17
3 PROPOSIÇÃO	19
4 MATERIAL E MÉTODOS	20
4.1 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DA SUSPENSÃO DE PARTÍCULAS DE QUITOSANA / NAF (QUIT/NAF) 0,2% E 0,05%	20
4.1.1 Potencial Zeta (ZP) e Diâmetro hidrodinâmico (D_h)	20
4.1.2 Espectrofotometria de infravermelho com transformação de Fourier (FTIR)	21
4.1.3 Análise de estabilidade coloidal de partículas.....	22
4.2 DESAFIO CARIOGÊNICO PELO MÉTODO DE CICLAGEM DE pH.....	22
4.2.1 Preparação de amostras de esmalte humano e grupos do estudo ..	22
4.2.2 Modelo de ciclagem de pH	23
4.3 TESTE DE MICRODUREZA KNOOP	24
5 RESULTADOS	26
5.1 POTENCIAL ZETA (ZP), DIÂMETRO HIDRODINÂMICO (D_h) E ESTABILIDADE COLOIDAL DE PARTÍCULAS	26
5.2 ESPECTROFOTOMETRIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMAÇÃO DE FOURIER (FTIR).....	28
5.3 DESAFIO CARIOGÊNICO QUÍMICO USANDO CICLAGEM DE PH	29
6 DISCUSSÃO	31
7 CONCLUSÃO	37
REFERÊNCIAS	38
ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP	44

1 INTRODUÇÃO

A cárie dentária é uma doença considerada um grande problema de saúde pública que afeta a cavidade oral de crianças em todo o mundo (FONTANA e GONZALEZ-CABEZAS, 2019), e possui etiologia multifatorial associada principalmente aos açúcares da dieta e presença de biofilme (WALSH et al., 2019). O principal mecanismo de prevenção da cárie é o controle mecânico do biofilme realizado pela frequente escovação com dentífrico fluoretado. Entretanto, o uso de enxaguatório bucal fluoretado tem sido indicado como método auxiliar no controle da doença em indivíduos que apresentam dificuldade para realizar a higiene dental; com alto risco ou atividade de cárie; usuários de aparelhos ortodônticos ou com alta ingestão de medicamentos cariogênicos (MARSH, 2010; MARINHO et al., 2016).

Os íons fluoreto têm um papel importante no controle da cárie e possui dois mecanismos de ação relevantes: inibição da desmineralização induzida por ácido (que pode levar à cárie) e aumento da remineralização do esmalte já desmineralizado (PARKINSON et al., 2018), sendo que o enxaguatório de fluoreto de sódio (NaF) é um dos compostos fluoretados mais utilizados para o controle da cárie (MOI, TENUTA, CURY, 2008; PARKINSON et al., 2018; THURNHEERA e BELIBASAKIS, 2018). Os enxaguatórios de NaF são freqüentemente usados a 0,05% de NaF (230 partes por milhão de fluoreto (ppm F) diariamente) ou a 0,2% de NaF (900 ppm F semanalmente); e ambas as concentrações mostraram que seu uso regular resulta em uma grande diminuição do incremento de lesões de cárie em dentes permanentes de crianças (MARINHO et al., 2016).

Porém, o efeito antimicrobiano do flúor não está totalmente esclarecido e seu efeito pode estar relacionado à diminuição da produção de ácido ou polissacarídeo extracelular pelas bactérias do biofilme (THURNHEERA e BELIBASAKIS, 2018). Assim, tem sido recomendada a associação de agentes antimicrobianos em enxaguatórios fluoretados para auxiliar na prevenção da cárie (THE AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRIC DENTISTRY, 2014). Biopolímeros, como a quitosana, foram investigados como componentes de enxaguatórios bucais, sendo que a quitosana demonstrou ser capaz de inibir a adesão microbiana e a formação de biofilme dental (COSTA et al., 2014).

A quitosana é um polímero composto por d-glucosamina ligada a β - (1-4) e N-acetil-d-glucosamina que possui propriedades antimicrobianas, biocompatíveis e de baixa toxicidade (WIECKIEWICZ et al., 2017; IKONO et al., 2019). Em pH baixo, a quitosana tem um caráter catiônico devido à protonação de grupos amino (NH^{3+}) que têm a capacidade de aderir a superfícies carregadas negativamente, como o esmalte dentário desmineralizado (ZHANG et al., 2018a; ZHANG et al. 2019), proteínas e polissacarídeos aniônicos (COSTA et al., 2014).

Devido à importância do flúor na prevenção da cárie, alguns estudos sintetizaram nanopartículas de quitosana carregadas com NaF (Quit/NaF) (NGUYEN et al., 2017; FURTADO et al., 2018) pelo método de geleificação iônica utilizando um agente de reticulação aniônico - tripolifosfato de sódio (TPP) (NGUYEN et al., 2017; FURTADO et al., 2018). A geleificação iônica é um dos métodos mais utilizados para sintetizar nanopartículas, pois é uma técnica rápida, barata e segura devido à ausência de solventes orgânicos prejudiciais, calor ou agitação vigorosa (DE CARVALHO et al., 2019). Nguyen et al. (2017) mostraram que pode ocorrer diminuição da liberação de íons fluoreto pelo complexo Quit/NaF, mas os íons são liberados de forma contínua. Consequentemente, as partículas de Quit/NaF podem ser usadas como um sistema de liberação controlada de flúor contra o desenvolvimento da cárie (NGUYEN et al., 2017). Essa propriedade da suspensão de partículas de Quit/NaF se torna interessante para aplicação do composto em enxaguatório bucal de uso infantil, pois poderia atuar como um sistema de liberação lenta e controlada de fluoretos, minimizando o risco de fluorose dental, além de apresentar atividade antimicrobiana causada pela quitosana.

Modelos de laboratório têm sido usados para simular o processo de cárie usando etapas alternadas de desmineralização (DES) e remineralização (RE) da estrutura dentária (modelo químico da ciclagem de pH), como ocorre clinicamente (MOI, TENUTA, CURY, 2008; ARNAUD, NETO, DINIZ, 2010; ZHANG et al., 2018a; AMAECHI, 2019; MAGALHÃES et al., 2021). Até o momento, de acordo com nosso conhecimento, não houve estudo que investigou o efeito da suspensão de partículas de Quit/NaF na desmineralização do esmalte dentário quando um desafio cariogênico foi usado para simular o processo de cárie.

Assim, visando um melhor entendimento sobre o mecanismo coloidal de formação de partículas do complexo Quit/NaF, as partículas foram sintetizadas pelo método de gelificação iônica por interação química da Quitosana com NaF. O processo de formação das partículas foi monitorado por titulações, medindo potencial zeta (ZP) e diâmetro hidrodinâmico (D_h), bem como por espectroscopia de infravermelho transformada de Fourier (FTIR). Adicionalmente, o efeito das suspensões de partículas de Quit/NaF 0,05% e 0,2% na desmineralização do esmalte humano foi avaliada após desafio cariogênico por ciclagem de pH e teste de microdureza Knoop. A hipótese testada foi que as suspensões de partículas de Quit/NaF 0,05% e 0,2% sintetizadas podem diminuir a desmineralização do esmalte após desafio cariogênico por ciclagem de pH.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 FLUORETO DE SÓDIO

Já se sabe que produtos contendo flúor, como dentifrícios e enxaguatórios bucais, desempenham um papel importante na prevenção da cárie dentária (HAN, 2021). Dessa forma, enxaguatórios bucais com NaF têm sido usados durante anos para prevenir a cárie dentária em crianças, com uso em escolas de países que experimentaram alta prevalência de cárie nas décadas de 1970 e 1980, mostrando resultados efetivos (MARINHO et al., 2016).

Dentro desse contexto, os íons fluoreto (F^-) possuem um efeito importante no processo de desenvolvimento da cárie por meio de sua ação físico-química que reduz a desmineralização e otimiza a remineralização do esmalte dental (FERNANDEZ et al., 2017; WASSEL e KHATTAB, 2017). A desmineralização do esmalte é inibida de maneira eficaz se o flúor estiver presente no momento do desafio ácido, pois as bactérias cariogênicas produzem ácido durante a metabolização dos carboidratos, e os íons fluoreto se difundem juntamente com o ácido produzido no biofilme aderido ao esmalte (na condição de baixo pH), podendo assim atuar reduzindo a perda mineral da estrutura dental. Quando o pH do esmalte aumenta após a desmineralização, os íons fluoreto liberados e aqueles presentes na saliva combinam com íons cálcio e fosfato dissolvidos e ocorre precipitação, formando um material cristalino semelhante a fluorapatita. Dessa forma, os íons fluoreto auxiliam no ganho mineral e fornece um esmalte mais resistente ao ataque ácido subsequente (TEN CATE, 1999).

O NaF é um dos compostos fluoretados mais utilizados na prevenção e no controle da doença cárie (MARINHO et al., 2016; THURNHEER e BELIBASAKIS, 2018), sendo que os enxaguatórios bucais com NaF 0,05% (para uso diário) ou com 0,2% (para uso semanal) são comprovadamente eficazes no controle da cárie (MARINHO et al., 2016; VALDIVIA-TAPIA et al., 2021). Revisões sistemáticas sobre enxaguatórios bucais com flúor relataram que o uso supervisionado deles por crianças está associado a uma redução

clara no incremento de cárie, independentemente da exposição à água fluoretada (MARINHO et al., 2004a, 2016b).

O flúor também inibe a adesão de *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) para a superfície de hidroxiapatita, além de inibir produção de ácido e tolerância ao ácido durante produção de biofilme de *S. mutans* (HAN, 2021), evidenciando mais uma via de mecanismo anti-cárie do fluoreto. Porém, a proteção anti-cárie mais eficaz ocorre quando o flúor é mantido de forma constante, em um baixo nível, na cavidade oral dos indivíduos atuando de maneira físico-química na desmineralização e remineralização do esmalte (PIACHAIAUKRIT et al., 2019). Sendo assim, polímeros como a quitosana já são utilizados para atuar no carregamento e liberação controlada de fluoreto na cavidade bucal, atuando na prevenção da doença cárie com excelentes resultados na literatura científica (NGUYEN et al., 2017; PIACHAIAUKRIT et al., 2019).

2.2 QUITOSANA

A quitosana é um composto derivado da quitina, que por sua vez é um biopolímero linear formado por união glicosídica β -(1-4) de unidades de N-acetilglicosamina. A quitina se faz presente no exoesqueleto da maioria dos crustáceos e cutículas de inseto, e é considerada o segundo maior biopolímero disponível na natureza, com produção anual estimada em 10^9 - 10^{11} toneladas (DASH et al., 2011). Ao atingir cerca de 50% no grau de desacetilação, a quitina se torna solúvel em condições aquosas ácidas e então passa a ser chamada de quitosana (RINAUDO, 2006; DASH et al., 2011). A quitosana é formada por cadeias de unidades 2-amino-2-desoxi-D-glicose e 2-acetamida-2-desoxi-D-glicose, que se unem através de ligações glicosídicas β (1-4) (FARIAS et al., 2019), sendo que sua conversão necessita ser feita de forma adequada de modo a fabricar um produto que seja de alta pureza e qualidade, isento de qualquer contaminação por metais tóxicos, endotoxinas e também proteínas (SÃO PEDRO et al., 2009). A quitina é desacetilada em ambiente básico, através da adição de hidróxido de sódio (NaOH), por 3h, com uma temperatura de 120°C, o que resulta na eliminação de grupos acetil da quitina em grupos amino livres (NH₂). No entanto, esse processo de desacetilação da

quitina ocorre de forma parcial, uma vez que não é possível obter um homopolímero estruturalmente 100% desacetilado, o que a torna solúvel apenas em ácidos fracos como o ácido fórmico e acético (TACHABOONYAKIAT, 2017).

A quitosana tem mostrado excelente biocompatibilidade, baixa ou nenhuma toxicidade em seres humanos e animais, bioatividade, biodegradabilidade, permeabilidade seletiva, atividade antimicrobiana e ação quelante, além de apresentar capacidade para formar gel e filmes (DE CARVALHO et al., 2011). Dessa forma, a quitosana se tornou um polímero com grande aplicabilidade nas diversas áreas da ciência: industrial, têxtil, agrícola, médica, farmacêutica e odontológica (KONG et al., 2010). Cicciù et al. (2019), realizaram uma revisão sistemática para verificar o uso da quitosana em diferentes áreas da odontologia. Foram avaliados 12 estudos de ensaios clínicos e ensaios clínicos randomizados, sendo a quitosana utilizada de diversas maneiras, como: analgésico na cirurgia oral, enxaguatório, creme dental, material restaurador e solução irrigadora de canais. Os resultados do estudo demonstraram que a quitosana é um composto seguro para uso e capaz de reduzir os sinais clínicos de inflamação e com capacidade de regeneração e reparo ósseo.

A quitosana obtida pode ser caracterizada através do grau de desacetilação e massa molar, e tais características podem influenciar na degradação e na hidrólise do polissacarídeo (SÃO PEDRO et al., 2009), sendo que, ao nível médio de desacetilação, ela pode ter suas propriedades físico-químicas alteradas de acordo com a viscosidade, a solubilidade e o pKa (DE CARVALHO et al., 2011). Ademais, a viscosidade da quitosana em solução aquosa pode ser alterada pelos diferentes graus de desacetilação, (HEJAZI e AMIJI, 2003), sendo que uma desacetilação de alto grau pode expandir a cadeia do polímero através da repulsão entre as cargas da molécula, tornando a quitosana mais viscosa. Ao contrário, quando seu grau de desacetilação é baixo, sua viscosidade diminui, o que torna o polímero mais enovelado pela diminuição da densidade da carga (ERRINGTON et al., 1993).

A quitosana é uma base fraca que é insolúvel em ambiente com o pH neutro e alcalino, e seu pKa varia sempre nos intervalos entre 6,2 a 7,0. Além disso, por ter seus grupamentos amino protonados, ela consegue formar sais

com ácidos orgânicos e inorgânicos, o que resulta em um polissacarídeo solúvel, de carga positiva. Esses sais são solúveis em água dependendo do pH e do grau de desacetilação, sendo que em um grau de desacetilação mais baixo (< 40%) estes serão solúveis em pH de até 9, enquanto que aqueles com alto grau de desacetilação (> 85%) serão solúveis em pH até 6,5 (HEJAZI e AMIJI, 2003). Sendo assim, é difícil obter uma quitosana altamente desacetilada, uma vez que a degradação dela aumenta na mesma medida em que o processo aumenta (COSTA SILVA, SANTOS, FERREIRA, 2006).

Além disso, a quitosana possui potencial antimicrobiano contra uma gama de patógenos orais, dentre eles se destaca o efeito fungicida contra *Candida albicans* e efeito bactericida/bacteriostático contra o *Streptococcus mutans*, possuindo dessa forma um potencial anticárie. Os mecanismos de ação antibacterianos da quitosana contra *S. mutans* já foram citados por autores, como: a interação da quitosana (policatiônica) com os poliânions do ácido teicóico da parede das bactérias gram-positivas via interações eletrostáticas (KONG et al., 2010; CHAVEZ DE PAZ et al., 2011; ZHANG et al., 2019; RAJOKA et al., 2020), atuação na membrana plasmática da bactéria (ZHENG e ZHU, 2003; KONG et al., 2010; TACHABOONYAKIAT, 2017), inibição da síntese de RNAm afetando a produção de proteínas e enzimas essenciais (KONG et al., 2010; CHAVEZ DE PAZ et al., 2011) do microrganismo; efeito quelante e interferência na síntese de ácidos graxos e de proteínas da bactéria (NEILANDS et al., 2011). Porém, o peso molecular, grau de desacetilação, pH e concentração da quitosana podem influenciar o efeito antibacteriano da mesma (ZHENG e ZHU, 2003; TAKAHASHI et al., 2008; ARNAUD, NETO, DINIZ, 2010; CHAVEZ DE PAZ et al., 2011; CHANG et al., 2015).

Além desses mecanismos antibacterianos, a quitosana também pode interferir no processo da cárie atuando no ciclo químico de desmineralização e remineralização (DES/RE) do esmalte dentário. Uma interação da quitosana com a superfície do esmalte e consequente formação de barreira física resistente à penetração de ácidos foi relatada no estudo de Arnaud et al. (2010, no qual a quitosana se mostrou efetiva na redução da desmineralização do esmalte dental. Além disso, Zhang et al. (2018b) revelou em seu estudo que uma solução de quitosana melhorou o efeito de remineralização de uma

superfície desmineralizada através da interação entre espécies nitrogenadas carregadas positivamente e prismas de esmalte desmineralizados. Ademais, o estudo de Zhang et al. (2019), encontraram que um complexo de quitosana com biovidro foi capaz de estabilizar o fosfato de cálcio amorfo e induzir a transformação em hidroxiapatita, potencializando a remineralização em regiões mais profundas das lesões de cárie em esmalte. Ademais, Cicciù et al. (2019) em seu estudo de revisão sistemática, revelou que a quitosana possui potencial para ser usada como componente de produtos para prevenção da cárie dentária.

Dentro desse contexto, a quitosana em solução, na forma de partículas ou associada a outros compostos, pode apresentar atuação na prevenção do desenvolvimento da cárie.

2.3 QUITOSANA CARREGADA POR FLUORETO DE SÓDIO

A hidroxiapatita (HA) presente no esmalte de exhibe locais de ligação que estão envolvidos em processos de adsorção e dessorção de elementos como os íons cálcio (Ca^{2+}) que possuem carga positiva, e íons fosfato (PO_4^{3-}) que possuem carga negativa (YIN et al., 2002). Dessa maneira, a superfície de HA do esmalte é considerada anfotérica e possui capacidade de interagir com cátions e ânions, a depender do pH e força iônica do meio oral. Nesse contexto, o NaF tem sido estudado juntamente com o quitosana para entrega controlada de íons F^- no ambiente oral e controle da cárie dentária (NYGUEN et al., 2017; FURTADO et al., 2018; PICHAIUKRIT et al., 2019).

Em seu estudo *in vitro*, Nyguen et al. (2017) verificou que houve entrega contínua de flúor, em baixa concentração, utilizando a quitosana como carreador, de forma que as nanopartículas de Quit/NaF podem servir como um agente de liberação controlada de flúor. Além disso, revelou que a liberação de íons fluoreto parece aumentar em um ambiente ácido, como ocorre quando há um desafio cariogênico (NYGUEN et al., 2017).

Por sua vez, Pichaiukrit et al. (2019) avaliaram a liberação controlada de flúor em um verniz fluoretado, utilizando soluções de quitosana a 20, 40, 60 e 80 $\mu\text{L/mL}$ incorporadas ao produto. Os resultados revelaram que o flúor

atingiu seu pico de liberação em 1h de aplicação e que o verniz contendo quitosana em maior concentração promoveu maior liberação de flúor.

Alguns estudos na literatura científica descreveram a interação entre partículas de quitosana e NaF como sendo através de uma interação eletrostática entre o grupo NH^{+3} da quitosana e o ânion F^{-} do fluoreto (NGUYEN et al., 2017; FURTADO et al., 2018). Devido ao flúor ser o elemento mais eletronegativo da natureza (FURTADO et al., 2018), ao realizar a sua interação com partículas de quitosana, observa-se redução do diâmetro das partículas Quit/NaF formadas (NGUYEN et al., 2017; FURTADO et al., 2018).

Devido a quitosana ser um dos biopolímeros mais utilizados para a síntese de nanopartículas e micropartículas, a mesma pode apresentar partículas de tamanho bastante reduzido (NEILANDS *et al.*, 2011), as quais possuem maior capacidade de penetrar no interior do biofilme e exercer seus efeitos antimicrobianos (CHAVÉZ DE PAZ *et al.*, 2011). Nyguen et al., (2017) e Furtado et al., (2018) sintetizaram suspensões de nanopartículas de quitosana carregadas com NaF e concluíram que as mesmas podem ser utilizadas como um agente de liberação de íons fluoreto. Além disso, foi relatado que com maior concentração de NaF, menor é o tamanho da partícula formada (FURTADO et al., 2018). Porém, não existem estudos que avaliaram as suspensões de partículas de Quit/NaF na estrutura de esmalte durante um desafio cariogênico, observando o efeito na prevenção da cárie, o que justifica a condução deste estudo.

3 PROPOSIÇÃO

Sintetizar suspensões de partículas de quitosana carregadas com fluoreto de sódio (0,05% e 0,2%) e caracterizá-las por métodos físico-químicos e avaliar seu efeito na desmineralização do esmalte dental após desafio cariogênico com ciclagem de pH.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Síntese das suspensões de micropartículas de quitosana carregadas com fluoreto de sódio (Quit/NaF) a 0,05% e 0,2%.
2. Caracterização das suspensões de micropartículas de Quit/NaF pelos métodos de espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FTIR), potencial zeta (ZP) e diâmetro hidrodinâmico (D_h), analisar a estabilidade das partículas por medidas de ZP , D_h e pH durante 1 mês;
3. Avaliação do efeito das suspensões de Quit/NaF (0,05% e 0,2%) na desmineralização da superfície do esmalte, após desafio cariogênico com ciclagem de pH, por meio da análise de microdureza de superfície.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DA SUSPENSÃO DE PARTÍCULAS DE QUITOSANA / NAF (QUIT/NAF) 0,2% E 0,05%

4.1.1 Potencial Zeta (ZP) e Diâmetro hidrodinâmico (D_h)

Foi utilizado um fotômetro de espalhamento de luz Zeta Sizer Nano ZS (Malvern Panalytical, Malvern, UK) para medir o ZP e o D_h da suspensão de Quit/NaF. Com este ensaio de titulação, a razão estequiométrica do complexo $[\text{NaF}]/[\text{Quit}_{\text{monômero}}]$ foi obtida, e o posterior ajuste da concentração de NaF foi realizado para síntese da suspensão de partículas de quitosana carregadas com NaF em concentrações de fluoreto de 0,05% e 0,2%.

Para as análises, a quitosana de baixo peso molecular (4,0 mg/mL) (107kDa, 75-85% de grau de desacetilação) (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) e o NaF (7,8 mg/mL) (Auro's Química Indústria e Comércio Ltda, São Paulo, SP) foram dissolvidos separadamente em solução de ácido acético a 1% (p/v) (Química Moderna, Barueri, São Paulo, Brasil). A concentração da solução de fluoreto de sódio utilizada (7,98 mg/mL - correspondente a 190 mM) foi calculada com base em um estudo anterior (DE CARVALHO et al., 2019).

Os experimentos de ZP e D_h foram realizados em regime de titulação, usando um capilar celular dobrado descartável (DPS1060). As titulações foram realizadas em um béquer e, imediatamente após a injeção do titulante (NaF), as amostras foram retiradas com uma seringa e inseridas na cubeta onde foram medidos o ZP e a condutividade. Para o ZP, a titulação foi realizada em duplicata por meio de 35 injeções consecutivas de alíquotas de 20 μL de NaF na solução de quitosana, após 60 s de equilíbrio a 25 °C (DE CARVALHO et al., 2019). Para D_h , os valores foram medidos 5 vezes de forma independente, com média de 35 contagens, a 25 °C após 60 s de tempo de equilíbrio, em uma cubeta quadrada de polietileno para medição do tamanho de partícula. As titulações foram plotadas contra a razão molar $[\text{NaF}]/[\text{Quit}_{\text{monômeros}}]$, onde o termo $[\text{Quit}_{\text{monômeros}}]$ indica a concentração de monômeros de quitosana (unidades de glucosamina).

Com base na razão molar $[\text{NaF}]/[\text{Quit}_{\text{monômeros}}]$ encontrada e considerando as concentrações de íons fluoreto de interesse deste estudo (0,2% ~ 2 mg/mL e 0,05% ~ 0,5 mg/mL), as soluções de Quitosana e NaF foram preparadas para sintetizar as suspensões de partículas de Quit/NaF nas duas concentrações (0,2% e 0,05%).

As soluções de Quitosana e NaF foram preparadas separadamente, pesando o pó de cada componente e dissolvendo-os em uma solução de ácido acético 1% v/v (Modern Chemistry, Barueri, São Paulo, Brasil) (DE CARVALHO et al., 2019). A solução de quitosana foi mantida sob agitação contínua a 700 rpm, durante 24 h, em temperatura ambiente e a solução de NaF foi mantida sob agitação por 30 s até a dissolução completa. Para a síntese da suspensão de Quit/NaF a 0,2% foi preparada a solução de 0,2% de NaF, e o pó de quitosana foi incorporado à solução. A suspensão de Quit/NaF foi mantida sob agitação magnética contínua, a 700 rpm, por 24 h.

As soluções e suspensões a 0,2% foram diluídas para obter as soluções e suspensões a 0,05%. O controle negativo foi solução de ácido acético 0,2% e 0,05%.

Para a análise de FTIR, uma parte das suspensões foi filtrada, lavada com água Milli-Q e liofilizada para uso posterior. Para o desafio de ciclagem de pH, outra parte das suspensões de Quit/NaF foi mantida, e seu pH foi ajustado para 5,5 pela adição de solução de hidróxido de sódio para corresponder ao valor de pH de alguns enxaguatórios bucais comerciais (SUN et al., 2014). O valor de pH das soluções de quitosana foi de 3,8 (ZHANG et al., 2018b) e o das suspensões de Quit/ NaF foi de 4.

4.1.2 Espectrofotometria de infravermelho com transformação de Fourier (FTIR)

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 foram analisados por espectros FTIR-ATR registrados na faixa entre 4000 e 700 cm^{-1} usando um espectrômetro Perkin Elmer Spectrum Two TM e FTIR acoplado a um acessório PIKE Attenuated Total Reflectance (ATR). As amostras foram colocadas diretamente na superfície diamante/ZnSe do módulo

de ATR e os espectros foram registrados como a média de 16 varreduras com uma resolução espectral de 2 cm^{-1} . Para o tratamento dos espectros, foi utilizado o software Perkin Elmer Spectrum ES (versão 10.03.08.0133) (DE CARVALHO et al., 2019).

4.1.3 Análise de estabilidade coloidal de partículas

As suspensões de Quit/NaF foram armazenadas em geladeira e sua estabilidade foi estudada por um mês. A estabilidade coloidal das partículas suspensas foi medida por ZetaSizer Nano ZS (Malvern, Reino Unido) por um período de 30 dias, considerando intervalo de 1 semana entre as medições. Os valores de ZP foram calculados com uma média de 5 medições realizadas em 5 corridas independentes, a 25°C após 30 s de tempo de equilíbrio, inserindo alíquotas da suspensão na célula capilar dobrável descartável do dispositivo (DPS1060). Para o D_h , as suspensões foram inseridas em cubeta quadrada 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.

4.2 DESAFIO CARIOGÊNICO PELO MÉTODO DE CICLAGEM DE pH

4.2.1 Preparação de amostras de esmalte humano e grupos do estudo

Quarenta terceiros molares humanos extraídos por motivos ortodônticos ou impactados foram obtidos com a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa de Juiz de Fora (CAAE 13403819.2.0000.5147) (ANEXO 1). Os dentes foram armazenados em solução de timol 0,1% (por peso) 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 mm^2 . Os blocos foram incluídos individualmente em tubos de PVC e resina acrílica (VIPI, VIPI Prod. Odontológico, Pirassununga, SP, Brasil). A superfície do esmalte das amostras foi polida

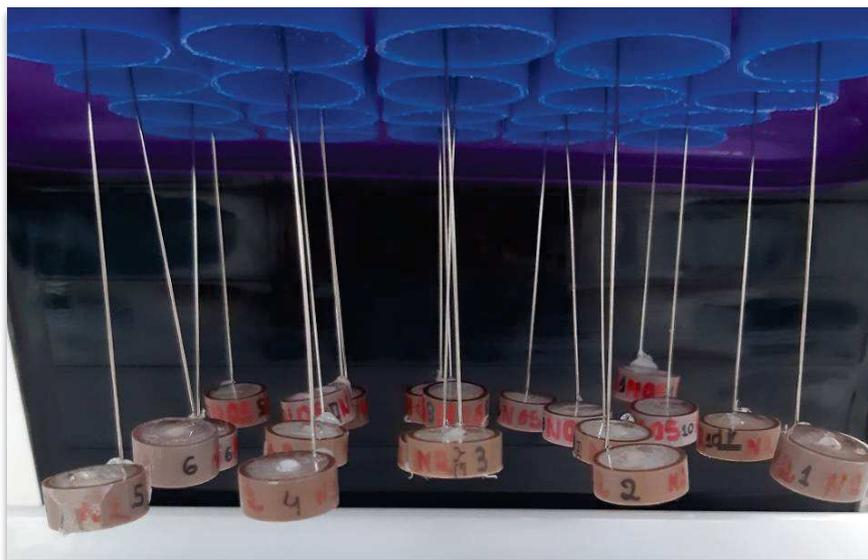
serialmente sob irrigação constante com carbeto de silício (# 400, 600 e 1200) e suspensão de alumina (1 μm) (Erios Corp., São Paulo, SP, Brasil). Em seguida, as amostras foram limpas em banho ultrassônico (Ultrasonic Cleaner, Unique Ind. E Com. Ltda, São Paulo, Brasil) por 10 min.

Foram formados oito grupos, de acordo com os agentes testados (n = 10): 1) Solução de Quitosana 0,2%; 2) Solução de NaF 0,2%; 3) Suspensão de Quit/NaF 0,2%; 4) Controle 0,2%; 5) Solução de Quitosana 0,05%; 6) Solução de NaF 0,05%; 7) Suspensão de Quit/NaF 0,05%; 8) Controle 0,05%.

4.2.2 Modelo de ciclagem de pH

Inicialmente, cada amostra foi fixada individualmente em uma tampa de tubo falcon com fio ortodôntico (Figura 1). A ciclagem de pH foi realizada por imersão das amostras por 3 h em solução de desmineralização (20 mL por amostra) a 37 °C, seguida de lavagem das amostras em água destilada e posterior imersão em solução de remineralização (10 mL por amostra) durante 21 h a 37 °C (ARNAUD; NETO; DINIZ, 2010). A solução de desmineralização foi composta de cálcio 2,0 mM e fosfato 2,0 mM em uma solução tampão de acetato de 74,0 mM a pH 4,7. A solução de remineralização foi composta por 1,5 mM de cálcio, 0,9 mM de fosfato e 150 mM de cloreto de potássio em uma solução tampão de 20 mM de TRIS (hidroximetilaminometano) em pH 7,0 (ARNAUD; NETO; DINIZ, 2010). Antes de cada ciclo de desmineralização, as amostras eram imersas nos agentes de cada grupo por 90 s, simulando o uso diário de enxaguatório bucal (ARNAUD; NETO; DINIZ, 2010). Esta ciclagem de pH foi repetida por 7 dias consecutivos.

Figura 1 – Amostras fixadas com fio ortodôntico em tampas de tubo falcon.



Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

4.3 TESTE DE MICRODUREZA KNOOP

As medidas de dureza Knoop (KHN) foram realizadas com uma carga de 50g sendo aplicada em cada amostra por 15 s, usando um indentador Knoop em microdurômetro (HMV-2, Shimadzu, Kyoto, Japão) (Figura 2) (PEREIRA DA SILVA et al., 2020). Foram feitas cinco indentações com distância de 100 µm entre si antes e após o desafio cariogênico.

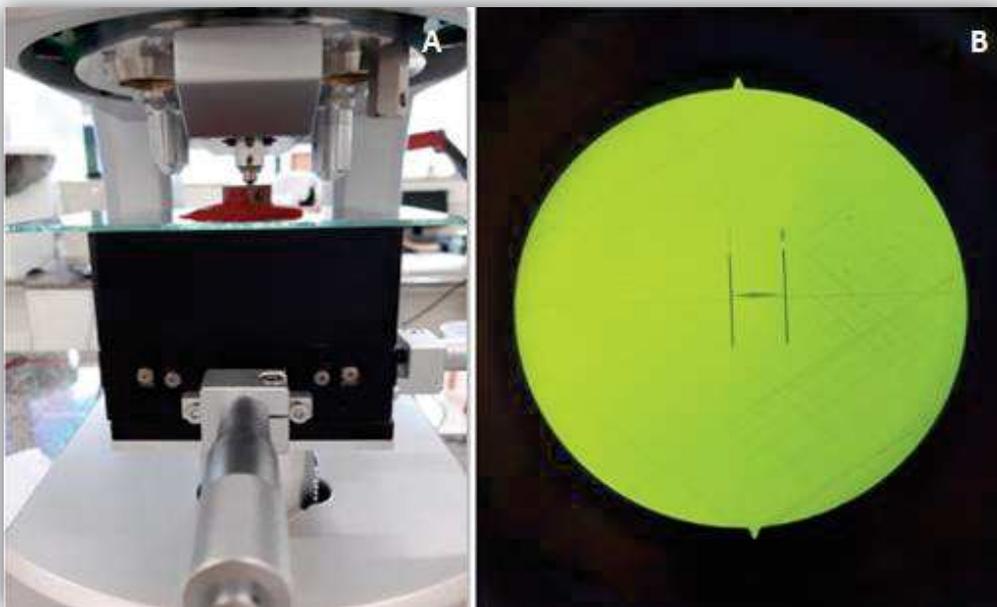
A porcentagem de alteração da dureza superficial (% KHN = % alteração da microdureza superficial) foi calculada usando a fórmula (MAGALHÃES et al., 2021):

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

A análise estatística das medidas de dureza Knoop foi realizada usando o pacote estatístico Jamovi (Versão 1.8, Software de Computador, obtido em www.jamovi.org), considerando um erro α de 0,05. Os dados tiveram distribuição normal pelo teste de Shapiro-Wilk ($p = 0,837$) e mostraram igualdade de variâncias (teste de Levene) ($p = 0,349$); portanto, a análise de variância de medidas repetidas (RM ANOVA) e o teste posthoc de Tukey foram aplicados para: i) comparação intragrupo dos valores de KHN antes e depois

do desafio cariogênico; ii) comparação dos valores 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.

Figura 2 – Análise da microdureza de superfície da amostra em Microdurômetro (HMV-2, Shimadzu, Kyoto, Japão) (A); Indentação na amostra utilizando indentador Knoop (B).



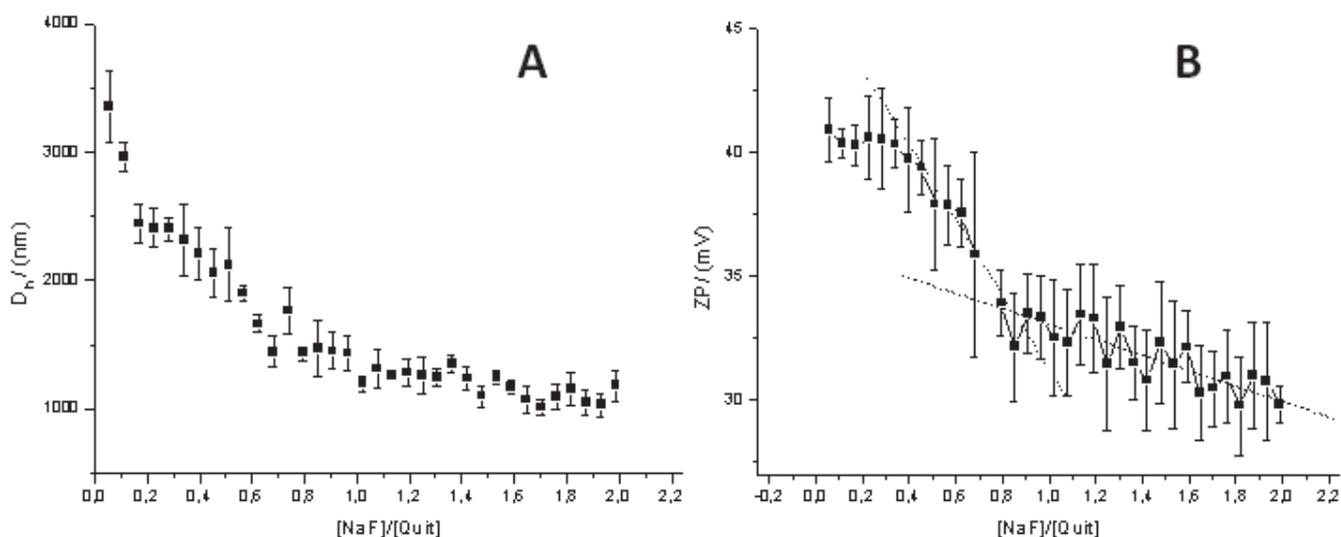
Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

5 RESULTADOS

5.1 POTENCIAL ZETA (ZP), DIÂMETRO HIDRODINÂMICO (D_h) E ESTABILIDADE COLOIDAL DE PARTÍCULAS

Os resultados de ZP e D_h mostraram que houve interação da quitosana com NaF, sugerindo a formação de micropartículas ($1100 \pm 91,7$ nm). A Figura 3 mostra a titulação de NaF 190,0 mM (7,98 mg / mL) em quitosana com 22,3 mM de monômeros de glucosamina (4,0 mg / mL) pelos métodos D_h e ZP (Figs. 3A e 3B, respectivamente). Observou-se redução dos valores de D_h a medida que o NaF foi sendo titulado em quitosana (DE CARVALHO et al., 2019).

Figura 3 - Titulação (A) D_h e (B) ZP de NaF 190,0 mM em Quitosana a 22,3 mM de monômeros (4,0 mg / mL) a 25°C.



Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

A Figura 3B mostra que as moléculas de quitosana exibiram valores de potencial zeta positivos de $+40 \text{ mV} \pm 1,2$ no início da titulação. O valor final de ZP da titulação de NaF em quit foi de $+30 \text{ mV} \pm 0,8$.

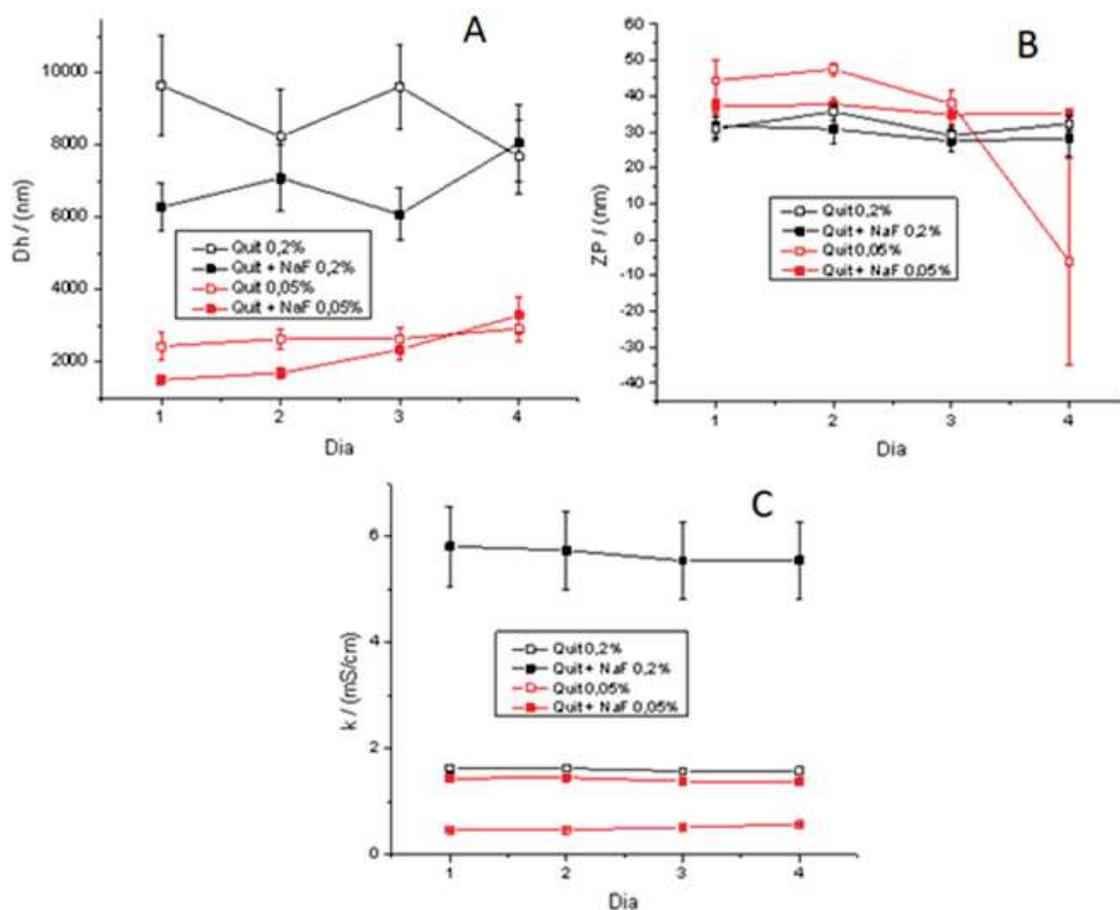
A Figura 4 mostra a estabilidade das partículas coloidais de 0,05% e 0,2% de suspensões de Quit/NaF pelos métodos D_h , ZP e condutividade

elétrica durante 30 dias. As micropartículas de Quit/NaF apresentaram estabilidade de tamanho por 30 dias, sendo que a concentração de quitosana foi determinante para a formação do tamanho das partículas (Fig. 4A). Quando o NaF foi adicionado, houve redução do tamanho das partículas. A concentração de quitosana teve efeito mínimo nos valores de ZP por 30 dias e a adição de NaF causou redução dos valores de ZP. A estabilidade das partículas de Quit/NaF foi mantida por 30 dias (Fig. 4B).

A solução de quitosana 0,05% mostrou diminuição dos valores de ZP com queda abrupta no 4º dia, porém quando o NaF foi adicionado, as partículas do complexo Quit/NaF 0,05% apresentaram valores de ZP estáveis por 30 dias (Fig. 4B).

Na presença de quitosana a 0,2%, os valores de condutividade foram maiores em comparação com quitosana a 0,05% (Fig. 4C). Aparentemente, os valores de condutividade não mudaram dentro do período estudado (Fig. 4C).

Figura 4 - Estabilidade de partículas coloidais de 0,05% e 0,2% de suspensões de Quit/NaF pelos métodos D_h (A), ZP (B) e condutividade elétrica (C) durante 30 dias.

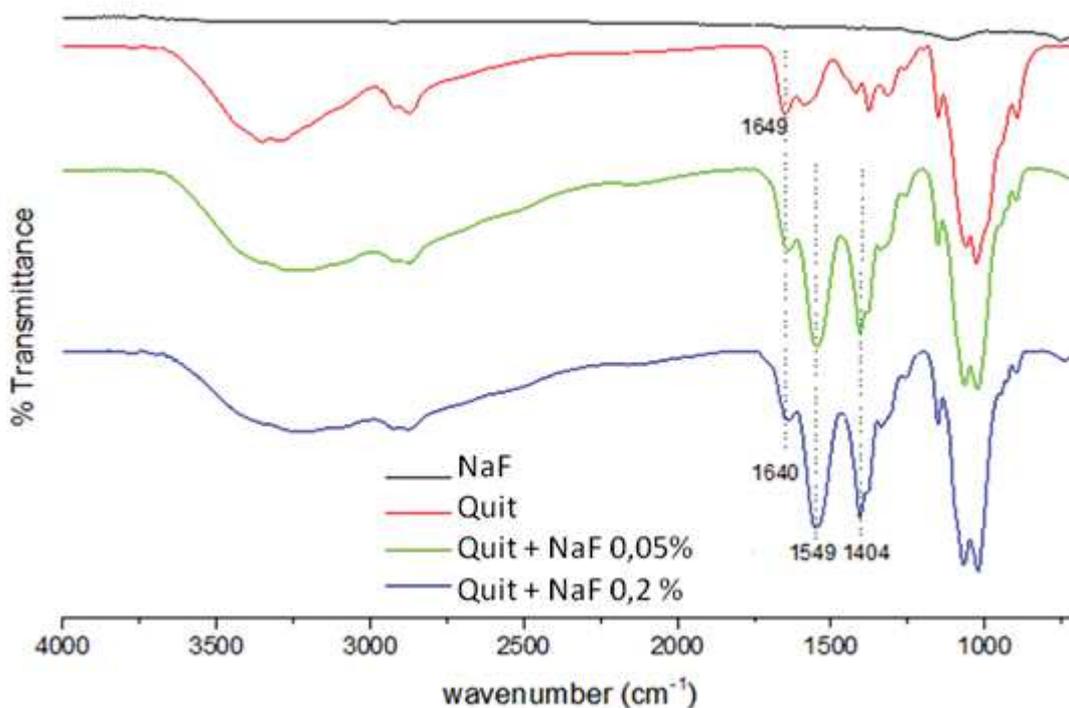


Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

5.2 ESPECTROFOTOMETRIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMAÇÃO DE FOURIER (FTIR)

A Figura 5 demonstra os espectros de FTIR da quitosana, NaF e Quit/NaF. No espectro da Quitosana, o pico largo e médio na faixa de $3750\text{--}3200\text{ cm}^{-1}$ 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. O pico de vibração de alongamento C-N da amina do tipo I foi observado em 1318 cm^{-1} . Um pico fraco observado em 1422 cm^{-1} foi atribuído à deformação angular de CH₂ adjacente ao grupo carbonila. Para o NaF, nenhuma absorção foi observada na região de $4000\text{--}700\text{ cm}^{-1}$.

Figura 5 - Espectros de FTIR das soluções de NaF e Quit e das suspensões de partículas de Quit/NaF 0,05% e 0,2%.



Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

5.3 DESAFIO CARIOGÊNICO QUÍMICO USANDO CICLAGEM DE PH

A Tabela 1 descreve os valores de dureza Knoop iniciais e pós-desafio e a mudança de % KHN encontrados para cada grupo. Como esperado, os valores iniciais de KHN não diferiram significativamente entre os grupos, sugerindo que todas as amostras foram padronizadas quanto à dureza inicial ($p = 0,064$).

Tabela 1 - Valores de dureza Knoop (KHN) do esmalte humano antes e depois do desafio cariogênico com ciclagem de pH e aplicação dos agentes testados. Os valores são expressos como média \pm desvio padrão.

Grupos (n = 10)	Desafio Cariogênico		
	KHN _{inicial}	KHN _{pós-desafio}	% KHN mudança
Fluoreto de sódio 0,05%	361,5 \pm 18,4 ^{A*,a**}	162,1 \pm 17,3 ^{B,C,b}	55,2 \pm 4,1 ^{C***}
Quitosana 0,05%	363,2 \pm 19,0 ^{A,a}	90,1 \pm 15,9 ^{D,E,b}	75,2 \pm 4,0 ^A
Suspensão de Quit/NaF 0,05%	346,1 \pm 18,8 ^{A,a}	143,1 \pm 28,0 ^{C,b}	58,8 \pm 6,6 ^{B,C}
Controle 0,05%	351,6 \pm 23,4 ^{A,a}	67,7 \pm 10,2 ^{E,b}	80,6 \pm 3,7 ^A
Fluoreto de sódio 0,2%	341,0 \pm 20,1 ^{A,a}	178,4 \pm 22,2 ^{B,b}	47,7 \pm 5,5 ^{C,D}
Quitosana 0,2%	349,5 \pm 25,9 ^{A,a}	120,0 \pm 28,7 ^{C,D,b}	65,8 \pm 7,0 ^B
Suspensão de Quit/NaF 0,2%	365,7 \pm 11,2 ^{A,a}	213,0 \pm 23,1 ^{A,b}	41,7 \pm 6,5 ^D
Controle 0,2%	362,5 \pm 19,9 ^{A,a}	68,8 \pm 21,6 ^{E,b}	80,9 \pm 6,0 ^A

Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

* Valores expressos com as mesmas letras maiúsculas não possuem diferença estatística entre as soluções/suspensões em cada período experimental ($p > 0,05$ por ANOVA de medidas repetidas e testes post-hoc de Tukey)

**Valores expressos com as mesmas letras minúsculas não apresentaram diferença estatística no mesmo grupo comparando os dois períodos experimentais (inicial e pós-desafio) ($p > 0,05$ por ANOVA de medidas repetidas e testes post-hoc 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).

Após o desafio cariogênico, todos os grupos tiveram redução significativa dos valores de KHN ($p < 0,001$). Os grupos Controle 0,2% e Controle 0,05% apresentaram os valores de dureza mais baixos ($68,8 \pm 21,6$ e $67,7 \pm 10,2$, respectivamente) e os maiores valores de % mudança de KHN ($80,9 \pm 6,0$ e $80,6 \pm 3,7$, respectivamente), sem diferença significativa entre eles ($p = 1,000$). Embora não haja diferença entre os valores de KHN pós-desafio entre os grupos Quitosana 0,05% e Quitosana 0,2%, o grupo de Quitosana 0,2% apresentou menor alteração % de KHN.

O grupo de suspensão de micropartículas de Quit/NaF 0,05% não apresentou diferença significativa comparado aos grupos de NaF 0,05% e Quitosana 0,2% para os valores de KHN pós-desafio ($p = 0,855$ e $p = 0,585$, respectivamente) e para os valores de % de KHN ($p = 0,869$ e $p = 0,153$, respectivamente).

O grupo Quit/NaF 0,2% apresentou os maiores valores de KHN pós-desafio ($213,0 \pm 23,1$) e a menor % de alteração de KHN ($41,7 \pm 6,5$) com diferença significativa comparada aos outros grupos ($p < 0,001$).

6 DISCUSSÃO

A hipótese testada no nosso estudo foi aceita porque a suspensão de 0,05% e 0,2% de partículas de Quit/NaF sintetizadas diminuiu a desmineralização do esmalte causada pelo desafio cariogênico de ciclagem de pH.

No presente estudo, as suspensões de partículas de quitosana carregadas com NaF foram sintetizadas pelo método de geleificação iônica, utilizando o fluoreto de sódio com o objetivo de fornecer íons fluoreto para atuar na prevenção da cárie dental. O agente reticulador não foi utilizado neste estudo no processo de geleificação iônica para a síntese de micropartículas, sendo utilizado o fluoreto de sódio, o qual é um sal monovalente, caracterizado como sólido branco ou incolor, com alta solubilidade em água (4,3 g/100 mL a 25°C), 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 comumente usado na prevenção da cárie (THUURNHERA E BELIBASAKIS, 2018). Como o NaF possui baixo peso molecular e pode liberar íons F^- após o processo de dissociação, hipotetizamos que estes íons poderiam interagir com os grupos amino da quitosana, favorecendo a formação de partículas de quitosana, como ocorre com o TPP, o agente reticulador.

Nesse contexto, a interação quitosana/NaF foi verificada nos ensaios espalhamento de luz dinâmico, pois os resultados de ZP e D_h mostraram que houve interação da quitosana com NaF, sugerindo a formação de micropartículas ($1100 \pm 91,7$ nm) (Fig. 3A). No início do experimento, as moléculas de quitosana estavam em estado de extensão devido à repulsão intramolecular com grau máximo de solvatação, o que explica os maiores valores de D_h ($3300 \pm 273,7$ nm) (Fig. 3A). Com a titulação do NaF, provavelmente houve uma ligação entre os ânions F^- da solução de NaF e os grupos amino (NH^{+3}) da quitosana, causando um encolhimento das cadeias de quitosana. Este fato pode confirmar a formação de micropartículas de Quit/NaF, com conseqüente diminuição dos valores de D_h , corroborando com os achados de Furtado et al. (2018).

O estudo de Furtado et al. (2018) testaram a adição de NaF em diferentes concentrações no tamanho das partículas de quitosana pelo método

de gelificação iônica. Estes autores demonstraram que o aumento da concentração de NaF nas concentrações de 0,05%, 0,2% e 2% causou uma redução proporcional do tamanho das partículas, provavelmente devido à interação dos ânions F^- e do grupo da amina protonada (NH^{+3}) da quitosana, como ocorreu em nosso estudo. Além disso, Furtado et al. (2018) utilizaram um agente de reticulação aniônico (TPP) durante o método de gelificação iônica, e obtiveram a formação de partículas de Quit/NaF com diâmetro de 679 nm a 10.000 nm, dependendo da concentração de NaF utilizada. Nguyen et al. (2017) também obtiveram a formação de nanopartículas de Quit/NaF usando o TPP durante o método de gelificação iônica. Em nosso estudo, as partículas de Quit/NaF formadas apresentaram maior diâmetro, sendo caracterizadas como micropartículas (SREEKUMAR et al., 2018), provavelmente pelo fato de não ter sido utilizado o agente reticulador - TPP. Quando o TPP é adicionado após o NaF, os ânions TPP podem se ligar aos remanescentes do grupo amina protonada da quitosana e levar a formação de partículas compactadas em nanoescala (NGUYEN et al., 2017; FURTADO et al., 2018).

Além disso, em nosso estudo houve uma redução gradual dos valores de ZP com a adição de NaF, o que pode estar relacionada à neutralização dos grupos catiônicos da quitosana (FURTADO et al., 2018). Ao final da titulação, as moléculas de quitosana exibiram valores de ZP positivos ($+ 30 \text{ mV} \pm 0,8$) (Fig. 3B). Esse resultado mostrou que a titulação do NaF causou a neutralização dos grupos catiônicos da quitosana, o que levou a uma carga menos positiva das moléculas de quitosana no final da titulação (NGUYEN et al., 2017; FURTADO et al., 2018). Além disso, esse valor pode confirmar a estabilidade do sistema Quit/NaF, uma vez que partículas com potencial zeta acima de $\pm 30 \text{ mV}$ são consideradas estáveis (BARRERAS et al., 2016).

A condutividade elétrica é uma propriedade não seletiva que reflete a concentração iônica global de uma determinada solução (DE CARVALHO et al., 2019). No presente estudo, a presença de quitosana em maior concentração aumentou os valores de condutividade (Fig. 4C) assim como a adição de NaF, provavelmente devido à presença de íons Na^+ livres no meio.

Os espectros obtidos por FTIR mostraram que as suspensões liofilizadas de Quit/NaF a 0,05% e 0,2% foram idênticos, isso se deve ao fato do solvente ter sido removido durante o processo de liofilização e somente o material sólido

foi avaliado. Várias mudanças foram observadas em comparação ao precursor (Quitosana). A banda OH foi alargada aparecendo na região de 3700-2400 cm^{-1} , sugerindo um aumento nas ligações de hidrogênio. O pico N-H do grupo amida II foi aumentado e deslocado para 1549 cm^{-1} , conforme obtido também no estudo de De Carvalho et al., 2019. O pico em 1404 cm^{-1} revela vibrações do ânion carboxilato $-\text{COO}-$, devido à presença do acetato utilizado para dissolver a quitosana. O espectro do acetato de quitosana foi relacionado em outro estudo com a banda em 1410 cm^{-1} (MAURICIO-SÁNCHEZ et al., 2018). Os dados, portanto, sugeriram a protonação de NH^2 e formação de pares iônicos em suspensão.

O efeito das suspensões de micropartículas de Quit/NaF no esmalte humano foi avaliado após ciclagem de pH para simular o processo de desenvolvimento da cárie. O método de ciclagem de pH é amplamente utilizado por mimetizar o desafio ácido e os efeitos protetores da saliva durante o processo de desenvolvimento de lesões de cárie, embora não haja presença de biofilme bacteriano (MOI, TENUTA, CURY, 2008; ARNAUD, NETO, DINIZ, 2010; AMAECHI, 2019; MAGALHÃES et al., 2021).

O teste de microdureza é um dos mais usados para determinar mudanças na superfície da estrutura dental durante desafios ácidos (ATTIN E WEGEHAUPT, 2014), e no esmalte dental nos estágios iniciais de desenvolvimento da cárie (ZERO, 1995; ZHANG et al. 2018a).

Em nosso estudo, não houve diferença entre os grupos para os valores de KHN iniciais (Tabela 1), os quais estão de acordo com outros estudos (entre 300 e 400 KHN) (CHUENARROM, BENJAKUL, DAOSODSAI, 2009; MAGALHÃES et al., 2021). Após o desafio cariogênico, todos os grupos tiveram redução de KHN, isso indica que nenhum agente - nem mesmo a solução de NaF 0,05% e 0,2% - foi capaz de inibir a desmineralização do esmalte. O grupo Quitosana 0,2% apresentou menor % de KHN inferior comparado ao grupo Quitosana 0,05%. Provavelmente, a concentração de quitosana influenciou esse resultado, pois ela pode atuar reduzindo a desmineralização do esmalte por formar uma barreira física à penetração de ácidos na superfície, minimizando a perda de conteúdo mineral (íons fosfato) (ARNAUD, NETO, DINIZ, 2010). Além disso, quanto maior a concentração de

quitosana, maior a formação da barreira física, favorecendo maior proteção ao esmalte.

A quitosana também pode atuar reduzindo a desmineralização do esmalte devido a sua capacidade de se ligar quimicamente aos minerais recém-precipitados, e ao esmalte desmineralizado, por meio de uma ligação de coordenação entre íons metálicos (Ca^{2+}) e os grupos amino da quitosana. Além disso, a quitosana pode auxiliar na estabilização e transporte do fosfato de cálcio amorfo para o esmalte desmineralizado, obstruindo os poros, promovendo remineralização da lesão (YAMAGUCHI et al., 2001; ZHANG et al., 2019).

A suspensão de micropartículas de Quit/NaF 0,05% não mostrou diferença significativa entre os grupos de NaF 0,05% e Quitosana 0,2% para os valores de KHN pós-desafio ($p = 0,855$ e $p = 0,585$, respectivamente) e valores de % de KHN ($p = 0,869$ e $p = 0,153$, respectivamente). Este resultado mostra que a mistura de NaF 0,05% com a solução de Quitosana 0,5% para preparo de suspensão de micropartículas de Quit/NaF 0,05% não interferiu na desmineralização do esmalte, uma vez que não foi encontrada diferença significativa quando comparada ao grupo NaF 0,05%. Provavelmente, a concentração de flúor liberado do sistema Quit/NaF não tenha sido suficiente para aumentar sua proteção contra a desmineralização do esmalte em relação ao NaF 0,05%. Estudos demonstraram que o uso de NaF a 0,05% (uma vez ao dia) demonstrou eficácia anticárie (PARKINSON et al., 2018; MAGALHAES et al., 2021), providenciando benefícios adicionais quando associado ao uso somente de dentifrício fluoretado (PARKINSON et al., 2018); e a mudança de % KHN no esmalte após desafio cariogênico (MAGALHAES et al., 2021), corroborando com o presente estudo. .

O grupo Quit/NaF 0,2% mostrou os maiores valores de KHN pós-desafio ($213,0 \pm 23,1$) e a menor % mudança de KHN ($41,7 \pm 6,5$) (Tabela 1). Assim, podemos sugerir que nas maiores concentrações de quitosana e NaF (0,2%), ambos os componentes tiveram ação para fortalecer a estrutura do esmalte, minimizando a perda de dureza (processo de desmineralização) do esmalte após o desafio cariogênico de ciclagem de pH.

Forte interação eletrostática é relatada na literatura entre os ânions F^- e o grupo amina protonada (NH^{+3}) da quitosana durante a preparação das

partículas de Quit/NaF, o que pode reduzir o conteúdo de flúor liberado no ambiente oral (NGUYEN et al., 2017). Neste estudo, ocorreu a limitação de não ter testado a liberação de flúor da suspensão de micropartículas de Quit/NaF. A suspensão de partículas de Quit/NaF em altas concentrações de NaF possuiu maior liberação de flúor em comparação com a concentração menor (NGUYEN et al., 2017). Provavelmente, neste estudo, o grupo Quit/NaF 0,2% apresentou menor perda de dureza em comparação com os outros grupos devido à maior liberação de íons de flúor. Porém, mais estudos são necessários para avaliar o perfil de liberação de íons fluoreto da suspensão de micropartículas de Quit/NaF a 0,05% e 0,2%.

Os níveis de íons fluoreto liberados das partículas de Quit/NaF demonstrados na literatura foram menores que àqueles dos enxaguatórios já comercializados, mas apresentaram um padrão de liberação prolongado (NGUYEN et al., 2017). Por causa disso, testou-se a suspensão de micropartículas de Quit/NaF a 0,2% com aplicação uma vez ao dia, ao invés de uma vez por semana, como é recomendado para enxaguatório de NaF a 0,2% (MARINHO et al., 2016).

Provavelmente, o flúor da suspensão de partículas de Quit/NaF permanece aprisionado nas cadeias do polímero de quitosana e pode ser liberado lentamente para o ambiente oral. A propriedade de liberação lenta das formulações fluoretadas é enfatizada por alguns estudos, que demonstraram que mesmo em nível baixo, mas contínuo, os íons flúor na cavidade oral podem ajudar a prevenir ou reverter o processo de cárie (FEATHERSTONE, 2006; PESSAN et al., 2008). Chow et al. (2002) relataram que a eficácia de um enxaguatório bucal com flúor em baixa concentração depende menos da dose e mais da capacidade do tratamento de usar o flúor de forma eficiente para remineralização. Crianças, especialmente aquelas menores de 6 anos de idade, podem engolir flúor do creme dental ou enxaguatório bucal, levando ao aparecimento de fluorose dentária (MARINHO et al., 2016). Assim, formulações com liberação contínua, baixa e controlada de íons fluoreto podem ser desejáveis para pacientes pediátricos.

Assim, o presente estudo demonstrou que a suspensão de micropartículas de Quit/NaF 0,2% pode minimizar a desmineralização do esmalte após desafio cariogênico. O modo de ação da suspensão de

micropartículas de Quit/NaF 0,2% estava mais relacionado a uma inibição parcial da desmineralização do que ao efeito de promover a remineralização do esmalte. Este estudo preliminar possui algumas limitações importantes a serem consideradas: i) o perfil de liberação de flúor da suspensão de micropartículas de Quit/NaF precisa ser investigado; ii) novas pesquisas devem testar o mecanismo de ação da suspensão de micropartículas de Quit/NaF no esmalte desmineralizado e seu efeito antimicrobiano contra o biofilme oral; iii) Concentrações mais altas de NaF e Quitosana, e outros regimes de aplicação no dente (mais de uma aplicação diária ou aplicações semanais), precisam ser testados para verificar o melhor efeito anti-cárie.

7 CONCLUSÃO

- 1) As suspensões de micropartículas de Quit/NaF 0,05% e 0,2% foram efetivamente sintetizadas pelo método de geleificação iônica.
- 2) A suspensão de micropartículas de Quit/NaF 0,2% mostrou efeito anti-cárie na superfície do esmalte, fortalecendo sua estrutura e minimizando a desmineralização após o desafio cariogênico com ciclagem de pH.

REFERÊNCIAS

- AMAECHEI, B.T. Protocols to study dental caries in vitro: pH cycling models. **Methods in Molecular Biology**, v.1922, p. 379-392, 2019.
- ARNAUD, T.M.S.; NETO, B.B.; DINIZ, F.B. Chitosan effect on dental enamel de-remineralization: an in vitro evaluation. **Journal of Dentistry**, v. 38, p. 848-852, 2010.
- ATTIN, T.; WEGEHAUPT, F.J. Methods for assessment of dental erosion. **Monographs Oral Science**, v.25, p.123-142, 2014.
- BARRERAS, U.S.; MÉNDEZ, F.T.; MARTÍNEZ, R.E.M.; VALENCIA, C.S.; RODRÍGUEZ, P.R.M.; RODRÍGUEZ, J.P.L. 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.
- CHANG, S.H.; LIN, H.T.V.; WU, G.J.; TSAI, G.J. pH Effects on solubility, zeta potential, and correlation between antibacterial activity and molecular weight of chitosan. **Carbohydrate Polymers**, v. 134, p. 74-78, 2015.
- CHÁVEZ DE PAZ, L.E.; RESIN, A.; HOWARD, K.A.; SUTHERLAND, D.S.; WEJSE, P.L. Antimicrobial effect of chitosan nanoparticles on *Streptococcus mutans* biofilms. **Applied and Environmental Microbiology**, v.77, p. 3892-3905, 2011.
- CHOW, L.C.; TAKAGI, S.; FRUKHTBEYN, S.; SIECK, B.A.; PARRY, E.E.; LIAO, N.S.; SCHUMACHER, G.E.; MARKOVIC, M. Remineralization effect of a low-concentration fluoride rinse in an intraoral model. **Caries Research**, v. 36, p. 136-141, 2002.
- 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, 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. 417-431, 2019.
- COSTA SILVA, H.S.R.; SANTOS, K.S.C.R.; FERREIRA, E.I. Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. **Química Nova**, v. 29, p. 776-785, 2006.
- COSTA, E.M.; SILVA, S.; MADUREIRA, A.R.; CARDELLE-COBAS, A.; TAVARIA, F.K.; PINTADO, M.M. A comprehensive study into the impact of a chitosan mouthwash upon oral microorganism's biofilm formation in vitro. **Carbohydrate Polymers**, v. 30, p.1081-1086, 2014.

DASH, M.; CHIELLINI, F.; OTTENBRITE, R.M.; CHIELLINI, E. Chitosan—a versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. **Progress in Polymer Science**, v. 36, p. 981-1014, 2011.

DE CARVALHO, F.G.; MAGALHÃES, T.C.; TEIXEIRA, N.M.; GONDIM, B.L.C.; CARLO, H.L.; SANTOS, R.L.; OLIVEIRA, A.R.; DENADAI, A.M.L. 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. 109, p. 109885, 2019.

DE CARVALHO, M.M.S.G.; STAMFORD, T.C.M.; DOS SANTOS, E.P.; TENÓRIO, P.; SAMPAIO, F. Chitosan as an oral antimicrobial agent. *In* Méndez-Vilaz A. **Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances**. Campina Grande: Formatex Research Center, p. 542-50, 2011.

ERRINGTON, N.; HARDING, S.E.; VÅRUM, K.M.; ILLUM, L. Hydrodynamic characterization of chitosans varying in degree of acetylation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 15, p. 113-117, 1993.

FARIAS, J.M.; STAMFORD, T.C.M.; RESENDE, A.H.M.; AGUIAR, J.S.; RUFINO, R.D.; LUNA, J.M.; SARUBBO, L.A. Mouthwash containing a biosurfactant and chitosan: An eco-sustainable option for the control of cariogenic microorganisms. **International Journal of Biological macromolecules**, v.129, p. 853–860, 2019.

FEATHERSTONE, J.D.B. Delivery challenges for fluoride, chlorhexidine and xylitol. **BMC Oral Health**, v. 6, p. S8, 2006.

FERNANDEZ, C.E.; TENUITA, L.M.A.; DEL BEL CURY, A.A.; NÓBREGA, D.F.; CURY, J.A. Effect of 5,000 ppm fluoride dentifrice or 1,100 ppm fluoride dentifrice combined with acidulated phosphate fluoride on caries lesion inhibition and repair. **Caries Research**, v. 51, p. 179-187, 2017.

FONTANA, M.; GONZALEZ-CABEZAS, C. Evidence-based dentistry caries risk assessment and disease management. **Dental Clinics of North America**, v.63, p.119-128, 2019.

FURTADO, G.T.F.S.; FIDELIS, T.B.; CRUZ, R.C.A.L.; SOUZA, J.W.L.; BARBERO, M.A.R.; FOOK, M.V.L. Chitosan/NaF particles prepared via ionotropic gelation: evaluation of particles size and morphology. **Materials Research**, v. 21, p. e20180101, 2018.

HAN, Y. Effects of brief sodium fluoride treatments on the growth of early and mature cariogenic biofilms. **Scientific reports**, v. 11, p.18290, 2021.

HEJAZI, R.; AMIJI, M. Chitosan–based gastrointestinal delivery systems. **Journal of Controlled Release**, v. 89, p. 151-165, 2003.

IKONO, R.; VIBRIANI, A.; WIBOWO, I.; SAPUTRO, K.E.; MULIAWAN, W.; BACHTIAR, B.M.; MARDLIYATI, E.; BACHTIAR, E.W.; ROCHMAN, N.T.; KAGAMI, H.; XIANQI, L.; NAGAMURA-INOUE, T.; TOJO, A. Nanochitosan antimicrobial activity against streptococcus mutans and candida albicans dual-species biofilms. **Research Notes**, v. 12, p. 383-389, 2019.

KONG, M.; CHEN, X.G.; XING, K.; PARK, H.J. 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.

LIU, H.; CHEN, B.; MAO, Z.; GAO, C. Chitosan nanoparticles for loading of toothpaste actives and adhesion on tooth analogs. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 106, p. 4248-4256, 2007.

MAGALHÃES, T.C.; TEIXEIRA, N.M.; FRANÇA, R.S.; DENADAI, A.M.L.; SANTOS, R.L.; CARLO, H.L.; MUNCHOW, E.A.; CARVALHO, F.G. 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, 2021.

MARINHO, V.C.; CHONG, L.Y.; WORTHINGTON, H.V.; WALSH, T. Fluoride mouthrinses for preventing dental caries in children and adolescents. **Cochrane Database Systematic Review**, v.7, p.CD002284, 2016b.

MARINHO, V.C.C.; HIGGINS, J.P.T.; SHEIHAM, A.; LOGAN, S. Combinations of topical fluoride (toothpastes, mouthrinses, gels, varnishes) versus single topical fluoride for preventing dental caries in children and adolescents. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v.1, 2004a.

MARSH, P.D. Controlling the oral biofilm with antimicrobials. **Journal of Dentistry**, v.38, p. 11-15, 2010.

MAURICIO-SÁNCHEZ, R.A.; SALAZAR, R.; LUNA-BÁRCENAS, J.G.; MENDOZA-GALVÁN, A. 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.; EKAMBARAM, M.; YIU, C.K. Effect of different fluoride varnishes on remineralization of artificial enamel carious lesions. **International Journal of Paediatric Dentistry**, v. 27, p.163-173, 2016.

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, p.91-96, 2008.

NEILANDS, J.; SUTHERLAND, D.; RESIN, A.; WEJSE, P.L.; CHÁVEZ DE PAZ, L.E. Chitosan nanoparticles affect the acid tolerance response in adhered cells of streptococcus mutans. **Caries Research**, v. 45, p. 501-505, 2011.

NGUYEN, S.; ESCUDERO, C.; SEDIQI, N.; SMISTAD, G.; HIORTH, M. Fluoride loaded polymeric nanoparticles for dental delivery. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 104, p. 326-334, 2017.

PARKINSON, C.R.; HARA, A.T.; NEHME, M.; LIPPERT, F.; ZERO, D.T. 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.

PEREIRA DA SILVA, P.S.L.; PORTELA, M.B.; FERREIRA-PEREIRA, A.; TOSTES, M.A. Effect of pit and fissure sealants on the prevention of enamel demineralization after exposure to *Streptococcus mutans* biofilm: an *in vitro* study. **Journal of Pediatric Dentistry**, v. 6, p. 00-00, 2020.

PESSAN, J.P.; AL-IBRAHIM, N.S.; BUZALAF, M.A.R.; TOUMBA, K.J. Slow-release fluoride devices: a literature review. **Journal of Applied Oral Science**, v. 16, p. 238-244, 2008.

PICHAIUKRIT, W.; THAMRONGANANSKUL, N.; SIRALERTMUKUL, K.; SWASDISON, S. Fluoride varnish containing chitosan demonstrated sustained fluoride release. **Dental Materials Journal**, v.38, p.1036–104, 2019.

RAJOKA, M.S.R.; MEHWISH, H.M.; WU, Y.; ZHAO, L.; ARFAT, Y.; MAJEED, K.; ANWAAR, S. Chitin/chitosan derivatives and their interactions with microorganisms: a comprehensive review and future perspectives. **Critical Reviews in Biotechnology**, 2020. DOI: 10.1080/07388551.2020.1713719.

RINAUDO, M. Chitin and chitosan: properties and applications. **Progress in Polymer Science**, v. 31, p. 603-632, 2006.

SÃO PEDRO, A.S.; CABRAL-ALBUQUERQUE, E.; FERREIRA, D.; SARMENTO, B. Chitosan: an option for development of essential oil delivery systems for oral cavity care?. **Carbohydrate Polymers**, v. 76, p. 501-508, 2009.

SREEKUMAR, S.; GOYCOOLEA, F.M.; MOERSCHBACHER, B.M.; RIVERA-RODRIGUEZ, G.R. Parameters influencing the size of chitosan-TPP nano- and microparticles. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1-11, 2018.

SUN, F.C.; ENGELMAN, E.E.; MCGUIRE, J.A.; KOSMOSKI, G.; CARRATELLO, L.; RICCINITTEL, D.; ZHANG, J.Z.; SCHEMEHORN, B.R.; GAMBOGI, R.J. Impact of an anticaries mouthrinse on in vitro remineralization and microbial control. **International Journal of Dentistry**, v. 2014, p. 982071, 2014.

TACHABOONYAKIAT, W. **Chitosan Based Biomaterials: tissue engineering and therapeutics**. Volume 2. Bangkok: Elsevier; 2017.

TAKAHASHI, T.; IMAI, M.; SUZUKI, I.; SAWAI, J. Growth inhibitory effect on bacteria of chitosan membranes regulated with deacetylation degree. **Biochemical Engineering Journal**, v. 40, p. 485-491, 2008.

TEN CATE, J.M. Current concepts on the theories of the mechanism of action of fluoride. **Acta Odontologica Scandinavica**, v. 57, p. 325-329, 1999.

THE AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRIC DENTISTRY. Guideline on caries risk assessment and management for infants, children, and adolescents. **American Academy of Pediatric Dentistry**, v.39, p.197-204, 2014.

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

VALDIVIA-TAPIA, A.C.; BOTELHO, J.N.; TABCHOURY, C.P.M.; RICOMINI-FILHO, A.P.; GIACAMAN, R.A.; CURY, J.A. Fluoride bioavailability on demineralized enamel by comercial mouthrinses. **Brazilian Dental Journal**, v. 32, p. 90-99, 2021.

WALSH, T.; WORTHINGTON, H.V.; GLENNY, A.M.; MARINHO, V.C.C.; JERONCIC, A. Fluoride toothpastes of different concentrations for preventing dental caries. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v.3, p. CD007868, 2019.

WASSEL, M.O.; KHATTAB, M.A. Antibacterial activity against *Streptococcus mutans* and inhibition of bacterial induced enamel demineralization of propolis, miswak, and chitosan nanoparticles based dental varnishes. **Journal of Advanced Research**, v.8, p. 387-392, 2017.

WIECKIEWICZ, M.; BOENING, K.W.; GRYCHOWSKA, N.; PARADOWSKA-STOLARZ, A. Clinical application of chitosan in dental specialities. **Mini reviews in Medicinal Chemistry**, v. 17, p. 401-409, 2017.

YAMAGUCHI, I.; TOKUCHI, K.; FUKUZAKI, H.; KOYAMA, Y.; TAKAKUDA, K.; MONMA, H. Preparation and microstructure analysis of chitosan/hydroxyapatite nanocomposites. **Journal of Biomedical Materials research**, v. 55, p. 20-27, 2001.

YIN, G.; LIU, Z.; ZHAN, J.; DING, F.; YUAN, N. Impacts of the surface charge property on protein adsorption on hydroxyapatite. **Chemical Engineering Journal**, v. 87, p. 181-186, 2002.

ZERO, D.T. In situ caries models. **Advances in Dental Research**, v. 9, p. 214-230, 1995.

ZHANG, J.; BOYES, V.; FESTY, F.; LYNCH, R.J.M.; WATSON, T.F.; BANERJEE, A. In-vitro subsurface remineralisation of artificial enamel white spot lesions pre-treated with chitosan. **Dental Materials**, v. 34, p. 1154-1167, 2018a.

ZHANG, J.; LYNCH, R.J.M.; WATSON, T.; BANERJEE, A. Remineralisation of enamel white spot lesions pre-treated with chitosan in the presence of salivary pellicle. **Journal of Dentistry**, v. 72, p. 21-28, 2018b.

ZHANG, J; LYNCH, R.J.M.; WATSON, T.F.; BANERJEE, A. Chitosan-bioglass complexes promote subsurface remineralisation of incipient human carious enamel lesions. **Journal of Dentistry**, v.84, p. 67-75, 2019.

ZHENG, L.Y.; ZHU, J.F. Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights. **Carbohydrate Polymers**, v.54, p. 527-530, 2003.

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: FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE MINAS GERAIS

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.998.589

Apresentação do Projeto:

A 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

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Estão corretamente apresentados.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Diante do exposto, o projeto está aprovado, pois está de acordo com os princípios éticos norteadores da ética em pesquisa estabelecido na Res. 466/12 CNS e com a Norma Operacional N° 001/2013 CNS. Data prevista para o término da pesquisa: Março de 2018.

Considerações Finais a critério do CEP:

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa CEP/UFJF, de acordo com as atribuições definidas na Res. CNS 466/12 e com a Norma Operacional N°001/2013 CNS, manifesta-se pela APROVAÇÃO do protocolo de pesquisa proposto. Vale lembrar ao pesquisador responsável pelo projeto, o compromisso de envio ao CEP de relatórios parciais e/ou total de sua pesquisa informando o andamento da mesma, comunicando também eventos adversos e eventuais modificações no protocolo.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_856645.pdf	15/02/2017 14:51:00		Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	declaracao_biorrepositorio.pdf	15/02/2017 14:49:37	Fabiola Galbiatti de Carvalho Carlo	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEBiorrepositorio_Fabiola.pdf	15/02/2017 14:49:03	Fabiola Galbiatti de Carvalho Carlo	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_nanoparticulas.pdf	02/02/2017 13:39:09	Fabiola Galbiatti de Carvalho Carlo	Aceito
Folha de Rosto	folhaderostoassinada.pdf	02/02/2017 13:28:22	Fabiola Galbiatti de Carvalho Carlo	Aceito
Declaração do Patrocinador	termofapemig.pdf	30/01/2017 16:23:56	Fabiola Galbiatti de Carvalho Carlo	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	declaracao_infraestrutura_perfilometrouf.pb.PDF	30/01/2017 16:12:17	Fabiola Galbiatti de Carvalho Carlo	Aceito

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