

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

**EFEITO *IN VITRO* DE NANOPARTÍCULAS DE
QUITOSANA NA BIOCORROSÃO DO ESMALTE
DENTÁRIO**

Renata Cristina Sobreira França

SAPIENTIA AEDIFICAT

2016

RENATA CRISTINA SOBREIRA FRANÇA

**EFEITO *IN VITRO* DE NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA NA
BIOCORROSÃO DO ESMALTE DENTÁRIO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia – Área de Concentração em Ciências Odontológicas.

Orientador: Profa. Dra. Fabíola Galbiatti de Carvalho Carlo

João Pessoa

2016

F814e França, Renata Cristina Sobreira.
Efeito *in vitro* de nanopartículas de quitosana na
biocorrosão do esmalte dentário / Renata Cristina Sobreira
França. - João Pessoa, 2016.
48 f.: il. -

Orientadora: Fabíola Galbiatti de Carvalho Carlo.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/ CCS

1. Odontologia. 2. Quitosana. 3. Erosão dentária. 4. Testes
de dureza. I. Título.

UFPB/BC

CDU: 616.314(043)

RENATA CRISTINA SOBREIRA FRANÇA

EFEITO IN VITRO DE NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA NA
DESMINERALIZAÇÃO DO ESMALTÉ DENTÁRIO FRENTE AO
DESAFIO EROSIVO.

Banca Examinadora



Prof. Dr. Fabiola Galbiatti De Carvalho Carlo
Orientadora



Prof. Dr. Frederico Barbosa De Sousa
Examinador - UFPB



Profa. Dra. Ana Maria Gondim Valença
Examinador Externo

DEDICATÓRIA

À Deus,

Por ter permitido a realização de mais um sonho, por ter me dado a força necessária e o apoio em todos os momentos. Sentir a presença do Senhor me acalma e me sustenta.

Aos meus Pais,

Por tudo que fazem por mim, pelo amor e dedicação em todos os momentos da minha vida e por terem lutado pelo meu crescimento.

Ao meu noivo Leandro,

Por todo amor e atenção, além de ter sido o maior incentivador para o início e concretização desse trabalho.

À minha avó Maria Sobreira e minhas irmãs Rafaela e Rhaquel,

Agradeço pela força e carinho dedicados a mim todos os dias.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Fabíola Galbiatti, por toda dedicação no desenvolvimento da pesquisa e pela excelente orientação. Agradeço por ter acreditado na minha capacidade, pelos conhecimentos compartilhados e por todo o carinho.

À técnica do LABIO – PPGO/UFPB Rebeca, pela essencial ajuda em várias etapas da pesquisa, principalmente na realização da análise de perfilometria. Obrigada pela paciência, amizade e por todas as orientações durante esses dois anos.

Ao Professor Severino Jackson Guedes de Lima pela permissão para utilizar o Laboratório de Solidificação Rápida (LSR) do Centro de Tecnologia da UFPB para realizar os testes de dureza. **Ao Professor Pablo Queiroz Lopes** da Farmácia pelo auxílio na produção da solução remineralizadora.

Ao Professor Frederico Barbosa de Sousa, pela disponibilidade em utilizar o laboratório de microscopia e imagem biológica (LAMIB) sempre que necessitei.

A **Isabella Medeiros, Brenna Louise e Bruna Palmeira** por ter compartilhado seus conhecimentos e terem me auxiliado em algumas etapas do desenvolvimento da pesquisa.

Aos meus amigos de turma e de laboratório, funcionários e professores do PPGO pela parceria e amizade.

RESUMO

A quitosana é um biopolímero que possui atividade antimicrobiana contra patógenos orais, mas seu efeito na prevenção da desmineralização do esmalte dentário submetido ao desafio erosivo tem sido pouco investigado. O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito das nanopartículas de quitosana (ChNP) dispersas em solução, na prevenção da desmineralização do esmalte dentário submetido ao desafio erosivo. A solução de ChNP na concentração de 3,85 mg/mL foi obtida através da geleificação iônica. Foram utilizados 52 terceiros molares inclusos para obtenção de blocos de esmalte (4 x 4 mm) e 4 grupos foram formados (n=26) de acordo com as soluções testadas: G1 - 3,85 mg/mL ChNP; G2 - solução de fluoreto de sódio (NaF) 0,5 mg/mL (controle positivo); G3 - Solução de quitosana 5 mg/mL; G4 - água destilada (controle negativo). As amostras foram imersas em ácido cítrico 1% monohidratado por 90s, lavadas em água destilada e em seguida imersas por 2 horas em solução remineralizadora e lavadas com água destilada. Este ciclo foi repetido 4 vezes ao dia durante 7 dias. Após a 1^o e 4^o exposição ao ácido, as soluções foram aplicadas (tratamento) de acordo com cada grupo, por 2 min e imersas em solução remineralizadora. No final de cada dia, as amostras permaneceram em solução remineralizadora. A dureza Vickers (VHN) (n=26), e a análise do desgaste dentário por perfilometria (n=15) foram realizadas antes e após o desafio erosivo. A porcentagem de perda de dureza (%SMH) foi realizada após o desafio. Os dados foram analisados por Anova e Tukey com $\alpha=0,05$. Houve diferença estatística significativa nos valores de VHN e %SMH somente com o grupo controle negativo, o qual apresentou menor dureza ($258,3 \pm 41,9$) e maior %SMH ($34,5 \pm 10,5$). Entre as soluções teste não houve diferença estatística. Para os resultados de perda mineral, houve diferença significativa entre todos grupos com maior desgaste para o grupo controle negativo ($6,4 \pm 0,3 \mu\text{m}$) > quitosana ($4,5 \pm 0,4 \mu\text{m}$) > ChNP ($3,0 \pm 0,4 \mu\text{m}$) > NaF ($1,2 \pm 0,3 \mu\text{m}$). Conclusão: As nanopartículas de quitosana diminuíram o desgaste do esmalte ocasionado pela erosão dentária.

Palavras-chave: Quitosana; Erosão Dentária; Testes de Dureza; nanopartículas.

ABSTRACT

Chitosan is a biopolymer that has an antimicrobial activity against oral pathogens, but its effect on the prevention of enamel demineralization enslaving an erosive challenge has been little investigated. The objective of the study was to evaluate the effect of dispersed chitosan nanoparticles (ChNP) in solution in the prevention of the demineralization of dental enamel submitted to erosive challenge. A solution of ChNP at the concentration of 3.85 mg / mL was obtained by ionic gelation. (4 x 4 mm) and 4 groups were formed (n = 26) according to the tested solutions: G1 - 3.85 mg / mL ChNP; G2 - 0.5 mg / mL sodium fluoride (NaF) solution (positive control); Solution of G3-chitosan 5 mg / mL; G4 - distilled water (negative control). As the samples were made in 1% citric acid monohydrate to 90, washed in distilled water and then for 2 hours in remineralizing solution and washed with distilled water. This cycle was repeated 4 times daily for 7 days. After a 1st and 4th exposure to acid, how its solutions will be applied in each group, for 2 minutes and in terms of remineralizing solution. At the end of each day, like samples in remineralizer. The Vickers hardness (VHN) (n = 26), and an analysis of tooth wear by profilometry (n = 15) were before and after the erosive challenge. The percentage of hardness loss (% SMH) was performed after the challenge. Data were analyzed by Anova and Tukey with $\alpha = 0.05$. There was a statistically significant difference in the values of VHN and % of SMH only with the negative control group, which presented lower hardness (258.3 ± 41.9) and higher % SMH (34.5 ± 10.5). Among the test solutions there is no statistical difference. ($4.4 \pm 0.3 \mu\text{m}$) Chitosan ($4.5 \pm 0.4 \mu\text{m}$) ChNP ($3.0 \pm 0.4 \mu\text{m}$) $0.4 \mu\text{m}$ NaF ($1.2 \pm 0.3 \mu\text{m}$). Conclusion: As the chitosan nanoparticles decreased enamel wear caused by dental erosion.

Keywords: Chitosan; Tooth erosion; Hardness; Nanoparticles.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ChNP	Nanopartículas de quitosana
VHN	Número de Dureza Vickers
% SMH	Porcentagem de mudança de dureza de superfície
Na ₅ P ₃ O ₁₀ – TPP	Tripolifosfato de sódio
pH	Potencial hidrogeniônico
%	Porcentagem
HA	Hidroxiapatita
nm	Nanômetro
mm	Milímetro
µm	Micrômetro
KDa	Quilodalton
CH	Quitosana

SUMÁRIO

1. Introdução	10
2. Revisão da literatura.....	12
2.1 Erosão dentária	12
2.2 Quitosana e Nanopartículas de quitosana.....	14
2.3 Quitosana e Nanopartículas de quitosana na erosão dentária.....	17
3. Objetivos	21
4. Material e Métodos	22
4.1 Desenho do estudo	22
4.2 Comitê de Ética e Pesquisa	22
4.3 Local de realização.....	22
4.4 Métodos.....	22
4.4.1 Síntese das nanopartículas de quitosana em solução	22
4.4.2 Cálculo amostral.....	24
4.4.3 Obtenção das amostras de esmalte dentário	24
4.4.4 Microdureza Vickers (VHN)	25
4.4.5 Formação de película adquirida	26
4.4.6 Desafio erosivo com ácido cítrico e aplicação das ChNP.....	26
4.4.7 Análise do desgaste do esmalte dentário por perfilometria óptica	28
4.5 Análise dos dados	28
5. Resultados	30
5.1 Microdureza de superfície e % de perda de dureza(%SMH).....	30
5.2 Desgaste do esmalte dentário após erosão	31
6. Discussão.....	33
7. Conclusão	37
8. Referências	38
9. Apêndice	45
10. Anexo	47

1. INTRODUÇÃO

Uma das causas mais comuns de perda de estrutura dentária é a erosão, a qual é caracterizada pela perda patológica e progressiva de estrutura dentária causada por ação de ácidos sem envolvimento bacteriano, provenientes da dieta (origem extrínseca) ou do ácido clorídrico (HCl) do estômago que chega a cavidade bucal em decorrência de distúrbios gastroesofágicos (origem intrínseca) (AMARAL et al, 2012; BARTLETT, 2007).

Durante as fases iniciais, os sinais e sintomas são raramente percebidos pelos pacientes. Em casos avançados, surge o aparecimento da dor como resultado da exposição da dentina, bem como a perda da anatomia dentária e da dimensão vertical de oclusão. Dessa forma, é muito importante o tratamento precoce por implementação de medidas preventivas e terapêuticas. Com este propósito, a aplicação regular de fluoretos destinados a reduzir a solubilidade das superfícies dentárias tem sido utilizada (LUSSI et al., 2011). A formação de fluoreto de cálcio (CaF_2) na superfície dentária pelos compostos fluoretados é considerada o principal mecanismo de proteção contra a erosão, principalmente para o fluoreto de sódio (NaF), o fluoreto estanhoso (PINI et al., 2016) e o fluoreto de amina (WIEGAND et al., 2009).

Além da aplicação tópica de fluoretos, outra estratégia para controlar ou prevenir o aparecimento das lesões causadas por erosão é a aplicação de agentes com efeito terapêutico, como por exemplo biopolímeros. (GANSS et al., 2012; MEDEIROS et al., 2014).

Biopolímeros são vistos com grande interesse pela comunidade acadêmica em função de serem obtidos a partir de fontes renováveis de energia e por apresentarem, em sua grande maioria, biocompatibilidade e biodegradação superiores quando comparados aos polímeros sintéticos (HONARKAR; BARIKANI, 2009).

A quitina é um biopolímero linear de unidades de N-acetilglicosamina ligadas por uniões glicosídicas β -(1-4) presente nos exoesqueletos da maioria dos crustáceos, sendo considerado o segundo maior biopolímero disponível na natureza e sua produção é estimada em 10^9 - 10^{11} toneladas ao ano (DASH et al., 2011). A parcial desacetilação alcalina da quitina resulta na quitosana, a qual é um polissacarídeo composto de unidades D-glicosamina (2-amino-2-

deoxi-D-glicopiranoose) e N-acetilglicosamina (2-acetamido-2-deoxi-D-glicopiranoose) ligados por uniões glicosídicas β -(1-4). Nos últimos anos, a quitosana tem sido vastamente utilizada na veiculação de medicamentos, bem como na engenharia de biomateriais aplicada à odontologia (TAVARIA et al., 2013).

A quitosana é um dos biopolímeros de escolha para preparação de nanopartículas devido as suas propriedades de biodegradação, ausência de toxicidade, biocompatibilidade e atividade antimicrobiana (KONG, 2010, ING et al., 2012), além disso também tem sido utilizada na síntese de nanopartículas, devido a sua fácil obtenção, principalmente pelo método de geleificação iônica (SINHA et al., 2004). Produtos em nanoescala, como as nanopartículas, não apenas podem ser usadas como carregadores biológicos dentro do biofilme para atuação antimicrobiana, mas permitem contínua e controlada liberação do agente terapêutico, mantendo-o em níveis desejados no local e interagindo nos tecidos (AYDIN; PULAT, 2012), possuindo grande aplicação na odontologia.

Os estudos que investigaram a ação da quitosana na prevenção ou desenvolvimento da erosão dentária ainda são poucos, de modo que a maioria incorporou a quitosana em dentifrícios com outros agentes terapêuticos (fluoretos, estanho e triclosan) não sendo possível avaliar o efeito isolado da quitosana (CARVALHO et al., 2014). Além disso, ainda não foi investigado o efeito das nanopartículas de quitosana na prevenção da erosão dentária.

Diante da escassa literatura envolvendo nanopartículas de quitosana na prevenção da erosão dentária, este estudo avaliou o efeito das nanopartículas de quitosana na prevenção da desmineralização do esmalte dentário submetido ao desafio erosivo por meio dos testes de dureza e de desgaste do esmalte por perfilometria óptica.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 *Erosão dentária*

As superfícies dentárias são expostas a ataques químicos e físicos que podem ocasionar perda de tecido mineralizado e diminuição da função do elemento dentário ao longo da vida. A erosão dentária é a perda de estrutura dentária causada por um processo químico sem o envolvimento de bactérias (HUYSMANS, CHEW e ELLWOOD, 2011; CARVALHO et al., 2016).

Durante a última década, a erosão dentária cresceu em todas as faixas etárias, devido a um aumento na ingestão de bebidas e alimentos ácidos, contendo principalmente o ácido cítrico. Este ácido é comumente encontrado em refrigerantes e em sucos ácidos sendo o um dos responsáveis pelo potencial erosivo destas bebidas (KREULEN et al., 2010; HANNIG et al., 2005).

A sua etiologia é atribuída a fatores químicos, biológicos e comportamentais. Os fatores químicos podem ser classificados em intrínsecos quando provenientes do suco gástrico, e extrínsecos, quando originados de alimentos e bebidas ácidas. Os fatores que determinam o potencial erosivo de alimentos e bebidas são: pH (potencial hidrogeniônico), acidez titulável e concentrações de cálcio, fosfato e flúor (LUSSI et al., 2012). Dentre os fatores biológicos, o principal é a saliva, pois ela apresenta mecanismos protetores como a dissolução dos ácidos e a formação da película adquirida (LUSSI et al., 2011). Os fatores comportamentais são: qualidade da alimentação; frequência, tempo, forma e horário de consumo de alimentos e bebidas ácidas; presença de doenças psicossomáticas, como a bulimia; e ingestão de medicamentos que interferem no fluxo salivar (KANZOW et al., 2016). Além de todos esses fatores, a escovação dentária logo após a ingestão do alimento ácido, também pode influenciar no processo de erosão tendo em vista que, neste caso, existe associação entre erosão e a abrasão (ALI et al., 2002; GRIPPO et al., 2004).

Como as lesões podem ter etiologia multifatorial (química, biológica e mecânica), nos últimos anos têm sido questionada a terminologia “erosão dentária” para o uso da terminologia “biocorrosão” (GRIPPO, 2012). O fenômeno chamado de “biocorrosão”, que se refere a degradação química, eletroquímica e bioquímica da estrutura dental em organismos vivos, é considerado o termo mais adequado para designar este processo, o qual pode ocorrer por causa da

ação de ácidos e por efeitos proteolíticos e piezoelétricos da dentina. Diferentemente da “erosão dentária”, caracterizada pela degradação mecânica gerada pela movimentação e atrito de fluidos em contato com as estruturas dentais (GRIPO, 2012). Infelizmente, ainda não existe uma padronização na literatura quanto à terminologia mais adequada deste fenômeno que acomete a cavidade bucal.

Qualquer substância ácida com pH inferior ao crítico para o esmalte (5,5) e dentina (4,5) pode dissolver os cristais de hidroxiapatita do elemento dentário (HA). Esta situação pode ocorrer dependendo das concentrações de íons cálcio e fosfato da saliva, bem como da quantidade de flúor para que o processo de remineralização ocorra (ALI et al., 2002; GRIPPO et al., 2004; BARRON et al., 2003).

A desmineralização do esmalte por erosão inicia com uma perda de íons minerais, o que provoca um amolecimento superficial. Quando a superfície do dente continua exposta ao ácido a desmineralização pode, eventualmente, evoluir para uma perda irreversível de estrutura e redução da dureza (GANSS, 2006; SHELLIS et al., 2011; LUSSI et al., 2011).

Evitar o consumo excessivo de alimentos e bebidas ácidas é a forma mais eficaz de prevenção da erosão, no entanto, é impossível não ter contato com esses produtos durante toda a vida. Assim, medidas preventivas são estudadas, como o aconselhamento alimentar, a estimulação do fluxo salivar e mudanças no hábito de consumo de bebidas com potencial erosivo, bem como o uso de compostos fluoretados eficazes na prevenção da desmineralização dentária e desenvolvimento de formas de apresentação alternativas dos produtos e de protocolos de aplicação (MAGALHÃES et al., 2009).

Já é comprovado o efeito de fluoretos na proteção da cárie (MARINHO et al., 2004; WALSH et al., 2010). No entanto, na erosão dentária, o fluoreto por si só, utilizado principalmente em combinação com o sódio (Na^+), mostra uma eficácia limitada (PINI et al., 2016). Isso torna necessária a adição de cátions metálicos polivalentes, como por exemplo, o estanho para melhorar seu efeito protetor. Além disso, compostos alternativos, como os biopolímeros, também são estudados com o intuito de prevenir o processo de desmineralização causado por erosão dentária.

2.2 Quitosana e Nanopartículas de quitosana

Biopolímeros ou copolímeros são produzidos a partir de matérias-primas de fontes renováveis, como milho, cana-de-açúcar, celulose e quitina (Norma ABNT NBR 15448-1). Depois da celulose a quitina é o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza, sendo o principal componente do exoesqueleto de crustáceos e insetos, de modo que sua presença ocorre também em nematóides e parede celular de fungos e leveduras (KUBOTA et al., 2000).

A quitosana é um polissacarídeo obtido da desacetilação da quitina, extraído essencialmente da carapaça de caranguejo e camarão. Quitina e quitosana são constituídas por unidades *N*-acetil-*D*-glicosamina e *D*-glicosamina em proporções variáveis, sendo que o primeiro tipo dessas unidades predomina no caso de quitina, já a quitosana é composta principalmente, por unidades *D*-glicosamina (KUBOTA et al., 2000; PETRI et al., 2007).

O processo de desacetilação da quitina ocorre em meio básico com a solução de hidróxido de sódio (NaOH) a 40%, sob a temperatura de 120°C, durante um período de 3 horas, consistindo na remoção dos grupos acetil da cadeia de quitina, resultando grupos amino livres (NH₂) (FIGURA 1). Como a reação de desacetilação da quitina para obtenção da quitosana não ocorre de forma total (não se obtendo um homopolímero estruturalmente 100% desacetilado), a quitosana é considerada um copolímero com unidades 2-amino-2-desoxi-*D*-glicose e 2-acetamida-2-desoxi-*D*-glicose, as quais são unidas por ligações glicosídicas do tipo β (1-4), com sua estrutura C6 sendo composta de um grupo amino primário e dois grupos hidroxilas livres (SILVA, 2012).

O biopolímero é considerado quitosana quando o grau de desacetilação for superior a 40%. O grau da quitosana em produtos comerciais normalmente se encontra na faixa de 70 a 95%, e a massa molar média entre 10 e 1000kDa. A quitina e quitosana são semelhantes quimicamente, mas diferentes no grau de desacetilação, o que modifica suas características físico-químicas, biológicas, biomédicas, dentre outras. Essa diferença é percebida na solubilidade, sendo a quitina insolúvel em água e na maioria dos solventes

orgânicos e a quitosana é solúvel em ácidos fracos, como o ácido acético e o ácido fórmico (TAVARES, 2011; SILVA, 2012).

O polímero da quitosana obtido deve ser caracterizado de acordo com o seu grau de desacetilação e massa molar, pois tais características podem contribuir para a degradação e hidrólise do polissacarídeo (COSTA SILVA et al., 2006; SÃO PEDRO et al., 2009).

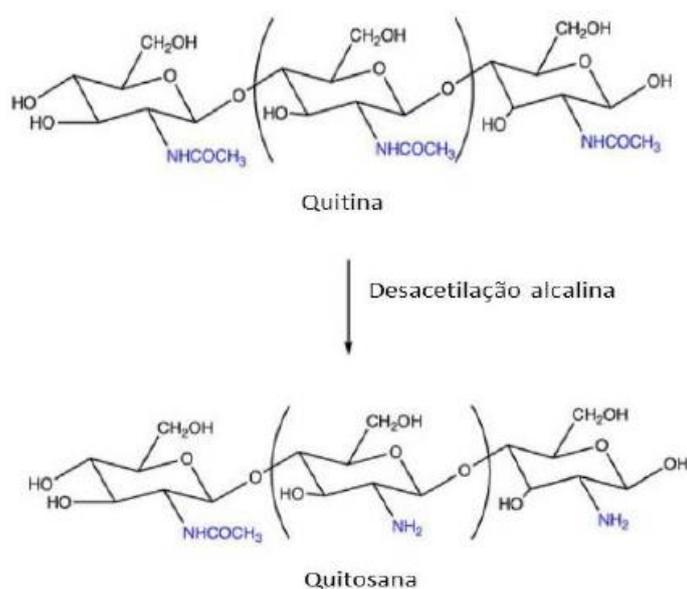


FIGURA 1. Processo de desacetilação da quitina e obtenção da quitosana.

FONTE: Adaptado de COELHO et al. (2010)

A quitosana possui propriedades de biocompatibilidade, biodegradabilidade, bioadesão, ação anti-inflamatória, antimicrobiana e cicatrizante (SENEL; KASSQUIER, 2000; TAVARIA et al., 2009; FUJIWARA, HAYASHI; OHARA, 2004). Algumas áreas de aplicação da quitosana são: biofarmacêutica, agricultura, tratamento de água, indústria alimentícia e indústria de cosméticos. Porém sua maior aplicação é na área biomédica (biomateriais, em suturas cirúrgicas, implantes dentários, reconstituição óssea, liberação controlada de fármacos em animais e encapsulamento de materiais) (AZEVEDO et al., 2007).

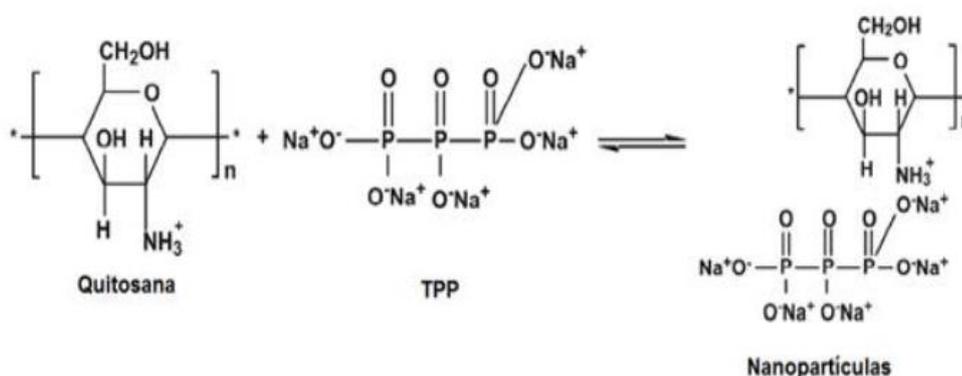
A quitosana pode ser sintetizada em microesferas ou em nanopartículas. Sendo muito utilizada como carregador de agentes terapêuticos para modificar a liberação de fármacos em formulações de administração oral, nasal,

transdérmica e t pica. As nanop rticulas se comportam semelhante a um fluido, quando dispersadas no ambiente, devido ao seu tamanho muito pequeno e elevada energia superficial (SILVA, 2012; NEVES, 2013).

As nanop rticulas de quitosana têm uma aplica o interessante na área médica e de saúde por sua capacidade de controlar a libera o de agentes ativos, além de evitar o uso de solventes perigosos durante a sua prepara o, devido   sua solubilidade em soluço ácida aquosa (WILSON et al., 2010).

Nos últimos anos, muitos métodos para a síntese de nanop rticulas de quitosana foram desenvolvidos, mas uma das técnicas mais utilizadas   a de gelifica o iônica (AGNIHOTRI et al., 2004). A forma o das nanop rticulas pelo método de geleifica o iônica está fundamentada na presença de liga es inter e intramoleculares entre a quitosana e o tripolifosfato de sódio ($\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ - TPP) que   um poliânion multivalente (AJUN et al., 2009). O TPP apresenta baixa toxicidade, baixo custo e ao contrário de outros agentes reticulantes, ele não apresenta graves restri es de manuseio e armazenamento.

Esta técnica envolve a adi o, a temperatura ambiente, de uma fase alcalina (pH 7-9) contendo TPP em uma fase ácida (pH 4-6) contendo quitosana. As nanop rticulas são formadas espontaneamente após a mistura das duas fases através de liga es inter e intramoleculares formadas entre os fosfatos do TPP e os grupos amina da quitosana (AOUADA, 2009) (FIGURA 2).



Fonte: Adaptado de ZHAO et al., 2011.

FIGURA 2: Obtenção de nanopartículas de quitosana pelo método de geleificação iônica com o TPP.

As aplicações da quitosana na odontologia devem-se as suas propriedades bioadesivas, permeabilizantes, anti-microbianas e anticariogênicas (DECKER et al., 2005).

A propriedade antimicrobiana da quitosana e seus derivados tem atraído grande atenção dos pesquisadores, visto que pode ser uma alternativa para tratamentos em saúde bucal, pois possui uma ação antimicrobiana de largo espectro, apresentando eficiência no combate a diferentes fungos, bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. No entanto, no que diz respeito a atividade contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas existem diferenças, pois a ação depende das características celulares (COSTA et al., 2014).

Costa et al. (2014) avaliaram o efeito da quitosana de alto peso molecular (624 kDa e grau de desacetilação de >75%) e baixo peso molecular (107 kDa e grau de desacetilação de 75-85%) em solução de bochecho na aderência microbiana em discos de alumínio, formação de biofilme e de biofilme maduro em microplacas com *S. mutans* e outros microrganismos. Os resultados mostraram que as soluções de quitosana interferiram na aderência e formação de biofilme, bem como na desintegração do biofilme maduro. Os autores salientaram que as soluções a base de quitosana podem ser uma alternativa natural e de grande potencial para uso em bochechos para auxiliar no controle e prevenção da cárie. O estudo de Costa (2015) mostrou que a ChNP apresentou atividade bactericida contra biofilme de *S. mutans* quando em contato contínuo com o micro-organismo, permanecendo ativa por 48h. Entretanto, a literatura é escassa quanto à avaliação do efeito das nanopartículas de quitosana na prevenção da desmineralização do esmalte dentário causado por erosão dentária.

2.3 Quitosana e nanopartículas de quitosana na erosão dentária

Os principais estudos envolvendo a eficácia da quitosana em proteger o esmalte dentário da erosão são realizados pela incorporação da quitosana em dentifrícios (UYSAL et al., 2011; GANSS et al., 2011; GANSS et al., 2012;

SCHLUETER et al., 2013; CARVALHO et al., 2014), devido aos agentes ativos incorporados nos mesmos, como por exemplo hidroxiapatita (HA), biopolímeros e íons de estanho que podem ser utilizados para prevenir a erosão dentária (GANSS, 2016). Além dos dentifrícios serem os principais veículos de liberação de F pela sua disponibilidade e utilização generalizada pela população (DANELON, 2014).

Uysal et al. (2011) avaliaram *in vivo* os efeitos de um dentifrício contendo apenas quitosana em reduzir a desmineralização do esmalte ao redor de bráquetes ortodônticos e compararam com o dentifrício não fluoretado e sem quitosana (controle). Houve menor desmineralização ao redor dos bráquetes no grupo experimental com quitosana comparado ao grupo controle.

Ganss et al. (2012), realizaram um estudo com o objetivo de investigar *in vitro* a prevenção da erosão e abrasão pelo uso de dentifrícios contendo fluoreto de sódio (NaF), íons de estanho (Sn_2^+) (NaF/SnCl₂, AmF/SnF₂, AmF/NaF/SnCl₂) e fluoreto com quitosana (AmF/NaF/SnCl₂ + 0,5% quitosana). O controle positivo foi o fluoreto de estanho (SnF₂) em gel. O estudo demonstrou que, após 10 dias de desafio erosivo e abrasivo, o AmF/NaF/SnCl₂ + quitosana a 0,5% foi capaz de reduzir a perda de esmalte em 67,3%, observado na perfilometria, enquanto que um creme dental contendo os mesmos componentes, exceto a quitosana, reduziu a perda de esmalte em somente 38,6%. Estes resultados demonstraram que a quitosana pode apresentar ação na prevenção da desmineralização, apresentando melhores resultados quando associada à fluoretos.

Estes resultados também corroboram com o estudo de Ganss et al. (2011) que demonstrou que o creme dental contendo apenas quitosana em sua composição (Chitodent®) reduziu a perda de esmalte de forma semelhante aos dentifrícios contendo apenas NaF (1400 ppm F⁻ 1490 ppm F⁻ NaF). O controle positivo Elmex Erosionsschutz® (AmF/NaF/SnCl₂) apresentou os melhores resultados (GANSS et al., 2011).

No trabalho *in situ* realizado por Schlueter et al., (2013) através da perfilometria, foi analisado o efeito de um dentifrício com NaF (0,31% NaF contendo 1400 ppm F⁻) e outro que tinha em sua composição a quitosana associada a fluoretos (F/Sn/quitosana) na prevenção da desmineralização. Foi possível observar uma redução na perda da estrutura de esmalte de 52,5%

após a utilização do produto que possuía quitosana, e isso pode ter ocorrido devido a sua capacidade de formar multicamadas que protegem a superfície do esmalte (SCHLUETER et al., 2013).

Carvalho et al. (2014) avaliaram *in vitro* o efeito do uso de dentifrícios e enxaguatórios, respectivamente, após desafio erosivo e abrasivo pelo teste de microdureza Knoop. Os grupos do estudo investigados foram: placebo (água destilada); NaF e água; F/Sn/quitosana e água; F/Sn/chitosan e enxaguatório com estanho; NaF e NaF. Foi possível observar uma maior redução da microdureza no placebo, e os grupos tratados com NaF e quitosana apresentaram menor redução de dureza comparada ao controle. Os grupos com quitosana apresentaram os melhores resultados, pois a quitosana formou uma camada orgânica sobre o esmalte, exercendo efeito de prevenção da desmineralização.

Lee et al. (2012) investigaram *in situ* a adsorção da quitosana (60 kDa e grau de desacetilação de 87%) na hidroxiapatita e a habilidade da camada adsorvida em proteger a hidroxiapatita da exposição ao ácido cítrico. Os resultados mostraram que a adsorção física da quitosana na superfície e a formação de cadeias cruzadas do polímero preveniram a erosão na superfície. A cobertura do polímero pode servir como um método eficiente para proteger a superfície da erosão, formando uma “camada protetora”.

Estudos testando soluções para atuarem na remineralização da estrutura dentária também são encontrados na literatura, como o de Arnaud, et al. (2010), os quais observaram que as soluções de quitosana (grau de desacetilação de 87%) em diferentes concentrações (1,25 mg/mL, 2,5 mg/mL e 5 mg/mL) interferiram na perda de minerais do esmalte. A concentração da solução e tempo de exposição do biopolímero ao esmalte influenciaram nesse processo, sendo os melhores resultados de microdureza obtidos com 2,5 mg/mL e 5 mg/mL e tempos de 60s e 90s de aplicação das soluções. Embora este estudo tenha avaliado o efeito das soluções de quitosana no esmalte dentário submetido a soluções ácidas, estas foram soluções de desmineralização e remineralização (ciclagem de pH) simulando a cárie.

Já o estudo *in vitro* realizado por Pini et al. (2016) avaliou o efeito da quitosana, com diferentes pesos moleculares e diferentes viscosidades, na prevenção da erosão e abrasão dentária. Foram produzidas soluções contendo

também íons de estanho e flúor associados à quitosana. Dois experimentos foram realizados com 5 soluções experimentais diferentes: 4 soluções de quitosana (grupos CH50, Ch500, Ch1000 e Ch2000, com viscosidade de 50, 500, 1.000 ou 2.000 mPas, respectivamente, 0,5% de quitosana, 500 ppm F⁻, 800 ppm Sn²⁺, pH 4,4), um controle positivo (500 ppm F⁻, 800 ppm Sn²⁺, pH 4,3). O controle negativo foi o grupo sem tratamento, para investigar o efeito na prevenção da erosão (experimento 1) e na prevenção da erosão/abrasão (experimento 2). Em ambos experimentos, o grupo controle negativo apresentou a maior perda de tecido nos resultados da perfilometria, com diferenças estatisticamente significativas para todos os grupos experimentais tratados com soluções que possuíam agente ativos. Desta forma, as soluções com quitosana foram eficientes em reduzir o desgaste do esmalte submetido à erosão dentária, associados ou não aos fluoretos investigados.

Embora os estudos citados tenham avaliado o uso da quitosana como agente preventivo/terapêutico na erosão dentária, a literatura é ainda escassa com relação ao efeito das nanopartículas de quitosana, dispersas em solução, na prevenção da desmineralização do esmalte dentário submetido ao desafio erosivo. Este fato justifica a condução de estudos relacionados a esta temática.

3. OBJETIVOS

O presente estudo objetivou avaliar o efeito das nanopartículas de quitosana, dispersas em solução, na prevenção da desmineralização do esmalte dentário submetido ao desafio erosivo com ácido cítrico, durante 7 dias, por meio dos testes de dureza Vickers, porcentagem de mudança de dureza de superfície (% SMH) e desgaste do esmalte dentário por perfilometria óptica.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Desenho do estudo

Este trabalho é caracterizado como um estudo *in vitro* laboratorial e experimental, o qual utilizou a técnica de observação direta e intensiva (MARCONI, LAKATOS, 2010).

4.2 Comitê de Ética e Pesquisa

A presente pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba – CEP/CCS (CAAE: 46087215.2.0000.5188) (ANEXO A).

4.3 Local de realização

O preparo das amostras e das soluções de quitosana, nanopartículas de quitosana, fluoreto de sódio (NaF), bem como os ensaios de erosão e de perfilometria óptica foram realizados no LABIO (Laboratório de Biomateriais do Programa de Pós-Graduação em Odontologia (PPGO) da UFPB e o ensaio de dureza foi realizado no Laboratório de Solidificação Rápida (LSR) do Centro de Tecnologia da UFPB.

4.4 Métodos

4.4.1 Síntese das nanopartículas de quitosana em solução

A quitosana utilizada em todos os ensaios deste estudo foi a de baixo peso molecular (107kDa, 75-85% DD) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) (FIGURA 3A). A quitosana foi dissolvida em solução de ácido acético 1% m/v (Química Moderna, Barueri, São Paulo, Brasil) (FIGURA 3B), na concentração de 5 mg/mL, sendo mantida sob agitação com agitador magnético (C-MAG HS 7 IKAMAG, Sovereign Com. Lab. Ltda, SP, Brasil) por 24h, em temperatura ambiente. Após este período a solução foi filtrada sob pressão positiva através de membranas de porosidades 5 e 0,8µm para eliminar os produtos sólidos resultantes do processo de obtenção da quitosana. As nanopartículas de quitosana foram obtidas pelo método de geleificação iônica com ânions tripolifosfato de sódio (TPP) (FIGURA 3C). (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA).

Assim, 3 mL de solução aquosa de TPP preparada com concentração de 2,4 mg/mL foram adicionadas a 10 mL das soluções de quitosana, sob agitação de 6000 rpm à temperatura ambiente, por meio de uma bomba de infusão (FIGURA 4) com adição contínua da solução aquosa de TPP sódico à taxa de 60 mL/h. A concentração final das nanopartículas de quitosana dispersas na solução foi de 3,85 mg/mL. O pH da solução foi ajustado para 5,5 com a adição de NaOH. A caracterização da formação das nanopartículas de quitosana foi realizada em estudo anterior do nosso grupo de pesquisa por microscopia eletrônica de transmissão e espectroscopia de absorção na região do infravermelho (COSTA, 2015).

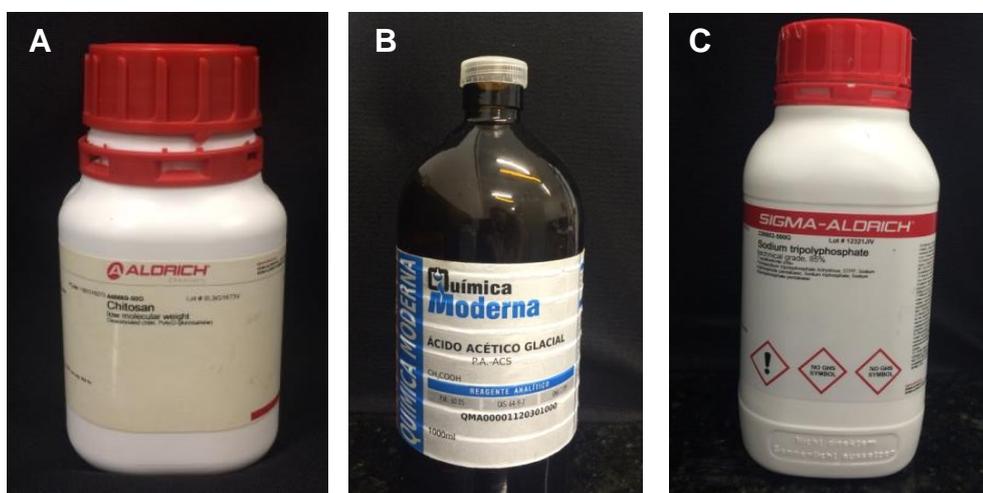


FIGURA 3. Agentes utilizados para a síntese das nanopartículas de quitosana.



FIGURA 4. Inserção de 3mL de TPP em 10 mL de quitosana (a mesma sob agitação magnética), em bomba de infusão.

4.4.2. Cálculo amostral

Para o cálculo amostral dos blocos de esmalte para o estudo foi utilizado um erro tipo I de 5% para alfa bicaudal, com uma magnitude de efeito “d” de 0,8, a qual é considerada alta, segundo Cohen (1988). O poder estatístico foi de 80%. Assim, o tamanho amostral foi de 26 amostras por grupo (n=26).

4.4 .3 Obtenção das amostras de esmalte dentário

Cinquenta e dois molares inclusos recém-extraídos, por razões ortodônticas ou por impactação, foram obtidos e doados para a pesquisa, após aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa do CCS/UFPB e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice A) e Termo de Doação de dentes (Apêndice B) pelos doadores. Estes dentes foram armazenados em solução de timol a 0,1% (em peso) no máximo por 1 mês, e congelados a 4°C até o momento de sua utilização.

Nas superfícies proximais de cada dente foi realizada uma janela de 4 mm x 4 mm, utilizando disco dupla face diamantado em peça de mão do micromotor, sob refrigeração (FIGURA 5A) e dois blocos de esmalte (um em cada superfície proximal) foram obtidos, com 16 mm² de área. Cada bloco foi embutido em cano de PVC com resina acrílica (VIPI, Pirassununga, São Paulo, Brazil) (FIGURA 5B), e a superfície de cada bloco foi polida serialmente em politriz (Arotec, Cotia, SP, Brasil) com discos de lixa de carbetto de silício de granulação 400, 600 e 1200 e suspensão de alumina 1µm, sob irrigação constante com água destilada para padronização da superfície (FIGURA 5C). Em seguida, as amostras foram inseridas em ultrassom (Ultrasonic Cleaner, model USC1400, Unique Ind. e Com. Ltda, São Paulo) com água destilada por 10 minutos para remoção de impurezas, e foram inspecionadas em microscópio óptico (Nikon 88286, Tokyo, Japan) com aumento de 40x para avaliação de trincas e fraturas. Caso as trincas e/ou fraturas fossem observadas, a amostra seria descartada.

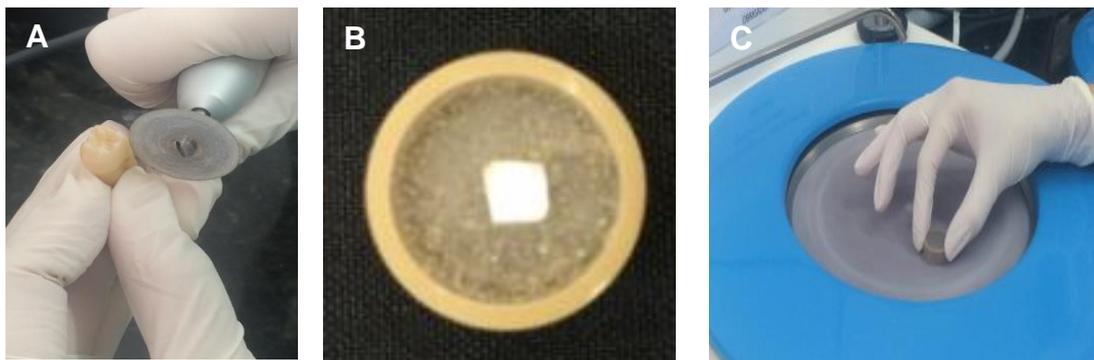


FIGURA 5. Preparo das amostras. **A.** Corte dos blocos de esmalte, **B.** Amostra embutida em resina acrílica, **C.** Polimento em politriz.

4.4.4 – Microdureza Vickers (VHN)

As medidas de dureza foram realizadas antes e após o desafio erosivo e aplicação das soluções utilizando microdurômetro HMV-2, Shimadzu, Kyoto, Japão), com indentador Vickers (e carga de 300 g aplicada por 15 s (KHAMVERDI et al., 2010) (FIGURA 6) . Cinco indentações, com distância de 100 µm uma das outras, foram realizadas em cada amostra, antes e depois do desafio erosivo.

A medida de porcentagem de mudança dureza de superfície (% SMH = % *surface microhardness measurement*) foi calculada pela fórmula (CARVALHO et al., 2013):

$$\% \text{ SMH} = 100 (\text{VHN}_{\text{Inicial}} - \text{VHN}_{\text{Final}}) / \text{VHN}_{\text{Inicial}}$$



FIGURA 6. Aparelho de microdurômetro (HMV-2, Shimadzu) utilizado no estudo.

4.4.5 Formação de Película adquirida

A resina acrílica ao redor do bloco de esmalte foi coberta com esmalte de unha para posterior desafio erosivo e análise em perfilometria óptica. A seguir, as amostras foram armazenadas em saliva humana por 3 horas a 37°C, sob agitação constante. A saliva foi coletada de um adulto saudável 1 hora após o consumo de bebidas ou alimentos (LUSSI; CARVALHO, 2015).

4.4.6 Desafio erosivo com ácido cítrico e Aplicação das ChNP

Quatro grupos foram formados de acordo com as soluções testadas. Para a análise de dureza foi utilizado o n=26 por grupo. Para análise em perfilometria, foi utilizado o n=15 por grupo.

- Grupo 1: ChNP em solução na concentração de 3,85 mg/mL – pH 5,5;
- Grupo 2- Solução de fluoreto de sódio na concentração de 0,5 mg/mL (0,05% – pH 6,0) (controle positivo);
- Grupo 3- Solução de quitosana na concentração de 5 mg/mL - pH 4,5;
- Grupo 4 - Água destilada (controle negativo) - pH 6,0.

As amostras de cada grupo foram sujeitas ao desafio erosivo seguindo metodologia adaptada do estudo de Souza et al. (2014). A FIGURA 7 mostra o fluxograma do desafio erosivo. As amostras foram imersas em ácido cítrico 1% monohidratado (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) (pH 2.35 mL/amostra) por 90s, lavadas em água destilada e em seguida imersas por 2 horas em solução remineralizadora e lavadas com água destilada. Este ciclo foi repetido 4 vezes por dia durante 7 dias (FIGURA 8). Após a 1° e 4° exposições ao ácido, as soluções foram aplicadas (tratamento) de acordo com cada grupo, por 2 min. Entretanto, após a aplicação das soluções as amostras não foram lavadas e foram imersas em solução remineralizadora. No final do desafio erosivo de cada dia, as amostras permaneceram em solução remineralizadora durante a noite. A solução remineralizadora foi composta por Cálcio (Ca^{2+}) - 1.5 mmol L⁻¹; Fosfato - 0.9 mmol L⁻¹; Cloreto de potássio (KCl) 150 mmol L⁻¹ em 0.1 mol L⁻¹ de tampão TRIS, pH 7.0 (CARVALHO et al., 2014).

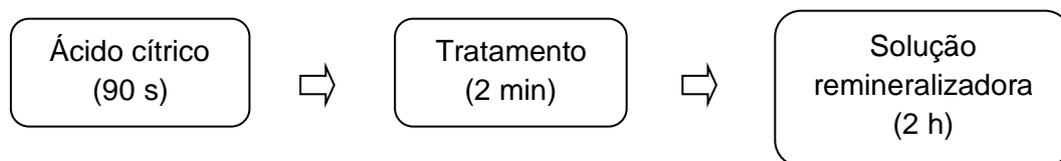
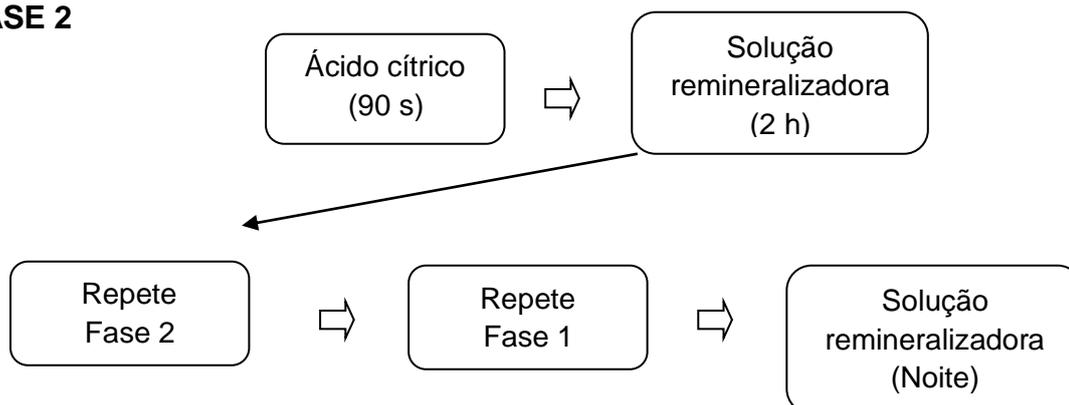
FASE 1**FASE 2**

FIGURA 7. Fluxograma da aplicação das soluções durante o desafio erosivo.

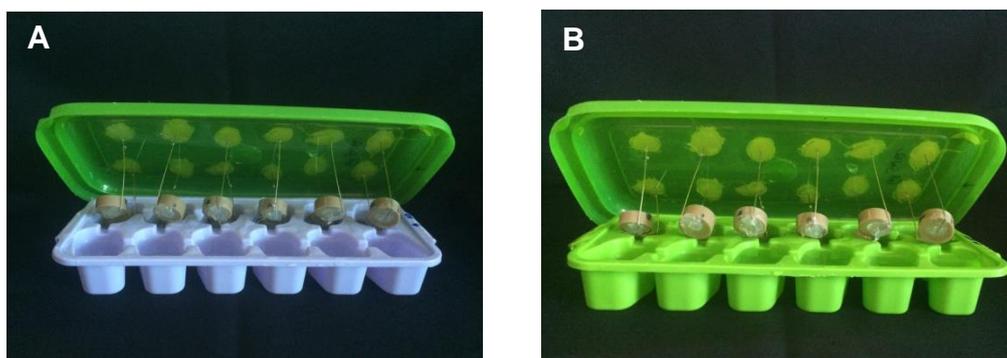


FIGURA 8. Recipientes utilizados durante o desafio erosivo para as soluções de ácido cítrico (A) e de remineralização (B).

4.4.7 Análise do desgaste do esmalte dentário por perfilometria óptica

Após o desafio erosivo, o esmalte de unha da resina acrílica foi retirado com lâmina de bisturi e a superfície das amostras foi escaneada com o perfilômetro óptico (Taylor Hobson - CCI MP, West Chicago, Illinois, USA) (FIGURA 9). O ponto de referência foi a resina acrílica do canto superior esquerdo. O comprimento de cada *scan* cobriu a área de referência da resina acrílica e a área tratada em uma área de 0,8 mm de comprimento (X) x 0,8 mm de largura (Y). Três medidas foram realizadas em intervalos de 0,2 mm. A distância vertical entre a linha horizontal da área experimental (resina acrílica) e a área tratada (erodida) foi definida como o desgaste do esmalte dentário. Os valores foram obtidos em μm pela média das medidas e tratadas com Software TalyMap Lite 7.2 (64-bit version).



FIGURA 9. Perfilômetro (Taylor Hobson - CCI MP) utilizado no estudo.

Após o desafio erosivo, as medidas de dureza nas amostras foram realizadas como descrito no item 4.4.4.

4.5. Análise dos dados

Os resultados foram analisados pelo software GraphPad InStat, versão 2.0 (GraphPad software, La Jolla, CA, USA). Os dados de dureza, % SMH e

desgaste de esmalte dentário foram testados quanto à normalidade pelo teste Kolmogorov- Smirnov. Os resultados de dureza e % SMH e desgaste de esmalte dentário foram analisados pelo teste de ANOVA One-Way e o Pós-teste de Tukey para comparação entre as médias dos grupos experimentais. O teste t-Student pareado foi utilizado para comparação entre os valores de dureza antes e depois do desafio erosivo em cada grupo experimental. O nível de significância foi de 0,05 ($\alpha = 0,05$).

5. RESULTADOS

5.1. Microdureza de superfície e % de perda de dureza (% SMH)

A Tabela 1 demonstra as médias de valores de dureza vickers (VHN) do esmalte dentário antes e após erosão e a % SMH. Ao se comparar os valores de dureza antes e após o desafio erosivo, todos os grupos apresentaram diminuição dos valores de dureza após desafio erosivo ($p=0,001$). Foi observado que não houve diferença entre os grupos nos valores de dureza inicial ($p=0,999$), possibilitando a comparação entre eles após o desafio erosivo e aplicação das soluções. Entretanto, após desafio houve diferença estatisticamente significativa nos valores de dureza entre todos os tratamentos (Nanopartículas de quitosana, Quitosana e Fluoreto de sódio) e o grupo controle (água destilada) ($p=0,001$), não apresentando diferença estatística entre si ($p>0,05$). O mesmo ocorreu para a % SMH, de modo que houve diferença estatística significativa entre todos os tratamentos e o grupo controle ($p=0,001$), sem ocorrer diferença entre eles ($p>0,05$).

Tabela 1. Valores de dureza Vickers (VHN - média \pm desvio padrão) e porcentagem de mudança de dureza de superfície obtida (%SMH) do esmalte dentário antes e após aplicação das soluções e erosão com ácido cítrico.

Grupos/Tratamento	VHN inicial	VHN final	%SMH
Nanopartículas de quitosana (3,8 mg/mL)	369,7 \pm 21,1 ^{*A,a}	303,6 \pm 28,7 ^{B,a}	20.2 \pm 7.4 ^a
Quitosana (5 mg/mL)	370,0 \pm 18,0 ^{A,a}	318,0 \pm 51,4 ^{B,a}	21.4 \pm 9.4 ^a
Fluoreto de Sódio (0,5 mg/mL)	369,5 \pm 21,4 ^{A,a}	294,6 \pm 37,4 ^{B,a}	22.8 \pm 8.2 ^a
Água destilada (Controle)	369,6 \pm 25,2 ^{A,a}	258,3 \pm 41,9 ^{B,b}	34.5 \pm 10.5 ^b

*Letras maiúsculas diferentes significam diferença estatística significativa entre os valores de dureza antes e depois do desafio para cada grupo (Teste t student pareado, $p < 0,05$). Letras minúsculas diferentes significam diferença estatística significativa entre os valores de dureza dos grupos em cada período experimental (ANOVA one-way e Tukey, $p < 0,05$).

5.2. Desgaste do esmalte dentário após erosão

A Tabela 2 demonstra a média dos valores do desgaste do esmalte dentário (μm) após aplicação das soluções e desafio erosivo obtidos a partir da distância vertical entre a linha horizontal da área experimental (resina acrílica) e a área tratada (erodida). Após o desafio erosivo houve diferença no desgaste do esmalte entre todos os tratamentos ($p=0,001$). O grupo de Fluoreto de sódio apresentou o menor desgaste e o grupo controle o maior desgaste. A ordem decrescente dos valores de desgaste dentário obtido foi: Fluoreto de sódio ($1,2 \pm 0,3$) < Nanopartículas de quitosana ($3,0 \pm 0,4$) < Quitosana ($4,5 \pm 0,4$) < Água destilada ($6,4 \pm 0,3$) (Tabela 2). A FIGURA 10 representa a análise de perfilometria para se medir o desgaste do esmalte.

Tabela 2. Valores médios do desgaste do esmalte dentário ($\mu\text{m} \pm$ desvio padrão) após aplicação das soluções e erosão com ácido cítrico.

Grupos/Tratamento	Desgaste dentário
Nanopartículas de quitosana (3,8 mg/mL)	$3,0 \pm 0,4$ ^{*B}
Quitosana (5 mg/mL)	$4,5 \pm 0,4$ ^C
Fluoreto de Sódio (0,5 mg/mL)	$1,2 \pm 0,3$ ^D
Água destilada (Controle)	$6,4 \pm 0,3$ ^A

*Letras maiúsculas diferentes significam diferença estatística significativa entre os grupos (ANOVA one-way e Tukey, $p < 0,05$).

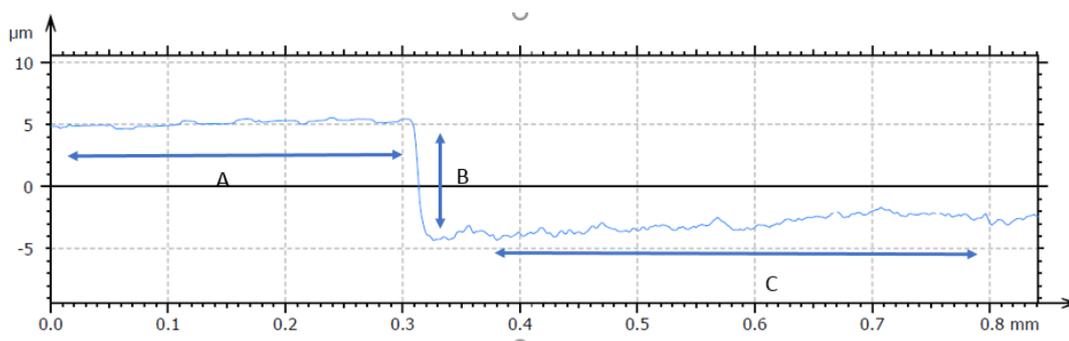


Figura 10: Exemplo do perfil analisado para obtenção do desgaste do esmalte em perfilômetro óptico. (A) Área de referência de resina acrílica (B) Área experimental de esmalte dentário (C) Desgaste de esmalte (μm) definido pela distância vertical entre área de referência e a experimental.

6. DISCUSSÃO

A nanotecnologia tem sido muito utilizada para desenvolvimento de produtos na área da saúde, com grande potencial de aplicações em odontologia inclusive no desenvolvimento de estratégias na prevenção de perda de estrutura dentária causada por erosão (DANELON, 2014). As propriedades especiais das nanopartículas derivam de sua elevada proporção entre área superficial e seu volume, apresentando uma porcentagem consideravelmente mais alta de átomos em sua superfície quando comparadas com partículas maiores, o que pode torná-las mais reativas e com efeito repostado superior (DANELON, 2014).

O efeito da quitosana em prevenir a desmineralização do esmalte dentário frente ao desafio erosivo já foi demonstrada, principalmente quando incorporada em dentifrícios (GANSS et al., 2012; SCHLUETER et al., 2013). Entretanto, a aplicação de nanopartículas de quitosana no esmalte dentário para prevenir sua desmineralização durante desafio erosivo ainda não foi investigado, sendo o presente estudo inovador nesta avaliação.

Neste estudo, as nanopartículas de quitosana foram sintetizadas pelo processo de geleificação iônica com o TPP, método muito utilizado na literatura (NEVES, 2013). Este método se baseia no princípio de que a quitosana carregada positivamente liga-se com o tripolifosfato de sódio negativamente carregado, o qual é atóxico (NEVES, 2013). A caracterização da formação das nanopartículas de quitosana na concentração utilizada no presente estudo foi realizado em estudo anterior do nosso grupo de pesquisa por microscopia eletrônica de transmissão e espectroscopia de absorção na região do infravermelho, de modo que as nanopartículas apresentaram formato esférico com tamanho médio de 27.8 ± 6.9 nm (COSTA, 2015).

Os ensaios de perfilometria e microdureza são bastante utilizados para avaliar a perda de tecidos dentários mineralizados causada pela ação de ácidos (FITA; KACZEMAREK, 2016; GANNS et al., 2012; SCHLUETER et al., 2013; CARVALHO et al., 2014; PINI et al., 2016). As mudanças na microdureza de superfície que ocorrem no processo de desmineralização e remineralização podem ser usadas para avaliar o desenvolvimento e reparo de lesões de cárie e erosão, bem como o impacto dos protocolos de tratamento

(VENASAKULCHAI et al., 2010). A perfilometria possibilita a quantificação de perda de estrutura dentária pelo desgaste que ocorre devido ao desafio erosivo (GANSS et al., 2012; SCHLUETER et al., PINI et al., 2016).

Após erosão com ácido cítrico todos os grupos apresentaram redução dos valores de dureza, de modo que o controle negativo (água destilada) apresentou os menores valores de dureza comparados aos outros grupos (Tabela 1). Este resultado mostrou que o ácido cítrico ocasionou “amolecimento” da superfície do esmalte e que todas as soluções investigadas foram capazes de prevenir perda adicional de estrutura de esmalte. Além disso, as soluções contendo quitosana e nanopartículas de quitosana possuíram o mesmo efeito preventivo que a solução de NaF, pois não apresentaram diferença nos valores de dureza e % SMH entre elas (Tabela 1). Da mesma forma, no estudo de Carvalho et al. (2014), embora com dentifrícios, foi possível observar maior redução da microdureza no grupo controle negativo, sendo que os grupos tratados com NaF e quitosana apresentaram menor redução de dureza quando submetidos a erosão e abrasão, porém as amostras tratadas com quitosana obtiveram o melhor efeito.

Como não existem estudos na literatura avaliando soluções de quitosana e nanopartículas de quitosana na erosão do esmalte, a comparação dos resultados do nosso trabalho torna-se dificultada. Arnaud et al., (2010) avaliaram o efeito da solução de quitosana a 5 mg/mL por 90 s, igual a do nosso estudo, no esmalte dentário submetido à ciclagem de pH, simulando desafio cariogênico, analisando dureza vickers e tomografia óptica. Foi encontrado menor perda de dureza do esmalte com a aplicação da quitosana e penetração da quitosana até a junção amelodentinária, concluindo que este biopolímero pode agir como uma barreira mecânica para a penetração do ácido no esmalte. A quitosana interfere no processo de desmineralização do esmalte e esta ação depende da concentração e do tempo de exposição do polímero à estrutura dentária (ARNAUD et al., 2010).

Diferente dos resultados de dureza, houve diferença estatística entre o desgaste dentário, obtido por perfilometria, após aplicação das soluções investigadas ($p= 0,001$) (Tabela 2). A diferença dos resultados encontrados entre as metodologias pode ser devido ao fato que no ensaio de dureza, a indentação pode ter ultrapassado a camada erodida e “amolecida” do esmalte,

alcançado o esmalte hígido subjacente (SHELLIS et al., 2011, CARVALHO et al., 2014,), não possibilitando ocorrer diferença de dureza no esmalte entre as soluções aplicadas.

Os resultados de perfilometria mostraram a perda de estrutura dentária, em altura, entre os grupos a partir de um ponto de referência (no nosso estudo foi a resina acrílica adjacente ao esmalte), quantificando o desgaste no esmalte dentário (Tabela 2). O menor desgaste ocorreu para a solução de fluoreto de sódio 0,5%, seguido das nanopartículas de quitosana, as quais apresentaram menor desgaste que a solução de quitosana e o grupo controle (Tabela 2).

A razão para o desgaste do grupo NaF ser menor provavelmente se devem à formação da camada de fluoreto de cálcio (CaF_2) depositada na superfície do esmalte, a qual é uma barreira física ácido resistente que protege o mineral da ação do ácido, causando parcial inibição do “amolecimento” do esmalte (GANNS et al., 2001; CARVALHO et al., 2014). Estudos relataram que o efeito de proteção do esmalte da quitosana frente aos desafios ácidos ocorre pela formação de uma camada orgânica na superfície do esmalte (ARNAUD et al. 2010, GANSS et al. 2012, LEE et al., 2012) formando também uma barreira mecânica para a penetração do ácido no esmalte (ARNAUD et al., 2010). A quitosana é potencial zeta positivo e com capacidade de se adsorver às estruturas sólidas com potencial zeta negativo, tal como o esmalte dentário (HORNER et al., 1997; PAUTLOWSKA, 1997). Essa camada adsorvida é resistente as condições de ciclagem de pH (GANSS et al. 2012). Além disso, tem sido observado que a quitosana pode se adsorver em multicamadas sobre o esmalte, providenciando maior proteção contra os agentes erosivos (GANSS et al., 2011, ARNAUD et al., 2010).

Entretanto, a capacidade de formação de camadas da quitosana em superfícies depende de fatores como concentração, pH, duração da aplicação e o pH da solução na qual a quitosana é dissolvida. Estas camadas são consideradas estáveis, entretando, mudanças no pH durante e após a aplicação podem modificá-las. No pH ácido a quitosana apresenta grupos amina catiônicos, que podem se associar através de ligações iônicas ao tecido dentário (KAMPF et al., 2004), mas um aumento do pH, no entanto, reduz a força da ligação iônica. Alguns fatores da estrutura da molécula, como por exemplo, o peso molecular, podem influenciar. Uma quitosana com peso

molecular menor, como foi o da soluções produzidas em nosso estudo, produzem cadeias mais curtas de moléculas, com locais de ligação mais disponíveis o que favorece a formação de multi-camadas na superfície do esmalte (PINI et al., 2016).

As nanopartículas de quitosana apresentaram menor desgaste do esmalte quando comparadas à solução de quitosana (Tabela 2). Estes resultados demonstram que o tamanho muito pequeno das partículas de quitosana pode ter facilitado sua interação com o esmalte dentário. Provavelmente a barreira mecânica formada pela deposição da camada orgânica das ChNP possuiu maior efeito protetor ao esmalte que a solução de quitosana. Liu et al., (2007) relataram que as partículas pequenas de quitosana possuem uma melhor capacidade de absorção e adesão à superfície dentária para exercerem sua atividade antimicrobiana, e conseqüentemente atuarem na desmineralização.

Embora seja uma solução experimental e mais estudos necessitem ser realizados para investigar o efeito das ChNP na erosão dentária, este estudo demonstrou que as nanopartículas de quitosana apresentam potencial como agente de prevenção da desmineralização do esmalte, pois foram capazes de prevenir o desgaste dentário, durante desafio erosivo, em maior extensão que a solução de quitosana.

7. CONCLUSÃO

As nanopartículas de quitosana dispersas em solução apresentaram efeito na prevenção da desmineralização do esmalte dentário submetido ao desafio erosivo, apresentando maiores valores de dureza e % SMH comparada ao grupo controle e menor desgaste do esmalte comparado à solução de quitosana.

REFERÊNCIAS

1. Agnihotri SA, Mallikarjuna NN, Aminabhavi TM. Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery B. 2004;100:5–28.
2. Ajun W, Yan S, Li G, Huili L. Preparation of aspirin and probucol in combination loaded chitosan nanoparticles and in vitro release study. *Carbohydrate Polymers*. 2009; 75(4): 566-574.
3. Ali DA, Brown RS, Rodriguez LO, Moody EL, Nasr MF. Dental erosion caused by silent gastroesophageal reflux disease. *J Am Dent Assoc*. 2002; 133:734-7; quiz 68-9.
4. Amaral SM, Abad EC, Maia KD, Weyne S, PINTO MPR. Lesões não cariosas: o desafio do diagnóstico multidisciplinar. *Arq. Int. Otorrinolaringol*. 2012; 16 (1):96-102.
5. Aouada MRM. Aplicação de nanopartículas em filmes utilizados em embalagens para alimentos. Tese [Doutorado em Ciências] - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos - SP, 2009.
6. Arnaud TMS; NETO BB; Diniz FB. Chitosan effect on dental enamel de-remineralization : An in vitro evaluation. 2010;38:848–52.
7. Aydın RST, Pulat M. 5-Fluorouracil Encapsulated Chitosan Nanoparticles for pH-Stimulated Drug Delivery: Evaluation of Controlled Release Kinetics. *Journal of Nanomaterials*. 2012.
8. Azevedo VVC, Chaves SA, Bezerra DC, Fook MVL, Costa ACFM. Quitina e Quitosana : aplicações como biomateriais. 2007;3:27–34.
9. Barron RP, Carmichael RP, Marcon MA, Sandor GK. Dental erosion in gastroesophageal reflux disease. *J Can Dent Assoc*. 2003;69:84-9.
10. Bds DB, Rcs FDS. in elderly people. *J Am Dent Assoc [Internet]*. 2007;138(September):S21–5.

11. Carvalho FG De, Vieira BR, Rogério DDS. Scientific Article. 2014 (3):85.
12. Carvalho FG, Brasil VL, Silva Filho TJ, Carlo HL, Santos RL, Lima BA. Protective effect of calcium nanophosphate and CPP-ACP agents on enamel erosion. *Braz Oral Res.* 2013 Nov-Dec;27(6):463-70.
13. Carvalho TS, Lussi A. ScienceDirect Combined effect of a fluoride- , stannous- and chitosan-containing toothpaste and stannous- containing rinse on the prevention of initial enamel erosion – abrasion. *J Dent [Internet].* 2014;42(4):450–9.
14. Carvalho TS, Schmid TM, Baumann T, Lussi A. Erosive effect of different dietary substances on deciduous and permanent teeth. *Clin Oral Investig [Internet].* 2016
15. Costa EM, Silva S, Madureira AR, Cardelle-cobas A, Tavaría FK, Pintado MM. A comprehensive study into the impact of a chitosan mouthwash upon oral microorganism's biofilm formation in vitro. *Carbohydr Polym.* 2014; 30(101):1081-6.
16. Costa BP. Inibitório da solução de nanopartículas de quitosana na aderência e no biofilme maduro de *Streptococcus mutans*. Dissertação [Mestrado em ciências odontológicas]. Universidade Federal da Paraíba. 2015.
17. Costa silva HSR, Santos KSCR, Ferreira EI. Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. *Química Nova.* 2006; 29(4):776-785.
18. Danelon M. Efeito de dentifrícios fluoretados e suplementados com nanopartículas de trimetafosfato de sódio sobre a desmineralização, remineralização e erosão dentária. Tese [Doutorado em Ciência odontológica]. Universidade Estadual Paulista; 2014.
19. Dash M, Chiellini F, Ottenbrite RM, Chiellini E. Chitosan – A versatile and semi-synthetic polymer in biomedical applications. *Prog Polym Sci.*

2011; 36(8):981–1014.

20. Decker EM, Von Ohle C, Weiger R, Wiech I, Brex M. A synergistic chlorohexidine/chitosan combination for improved antiplaque strategies. *Journal of Periodontal Research*. 2005; 40:373-7.

21. Ganss C. Definition of Erosion and Links to Tooth Wear. 2006;20(table 1):9–16.

22. Ganss C, Hinckeldey J Von, Tolle A, Schulze K, Klimek J, Schlueter N. Efficacy of the stannous ion and a biopolymer in toothpastes on enamel erosion / abrasion. *J Dent [Internet]*. 2012;40(12):1036–43.

23. Ganss C, Klimek J, Schäffer U, Spall T. Effectiveness of two fluoridation measures on erosion progression in human enamel and dentine in vitro. *Caries Res*. 2001 Sep-Oct;35(5):325-30.

24. Ganss C, Lussi A, Grunau O, Klimek J, Schlueter N. Conventional and anti erosion fluoride toothpastes: effect on enamel erosion and erosion abrasion. *Caries Res* 2011; 45:581–9.

25. Ganss C, Marten J, Hara AT, Schlueter N. Toothpastes and enamel erosion/abrasion- impact of active ingredients and the particulate fraction. *J Dent [Internet]*. 2016.

26. Grippo JO, Simring M, Schreiner S. Attrition, abrasion, corrosion and abfraction revisited: a new perspective on tooth surface lesions. *J Am Dent Assoc*. 2004; 135:1109-18; quiz 63-5.

27. Grippo JO. Biocorrosion vs. erosion: the 21st century and a time to change. *Compend Contin Educ Dent*. 2012 Feb;33(2):33-7.

28. Hannig C, Hamkens A, Becker K, Attin R, Attin T. Erosive effects of different acids on bovine enamel: release of calcium and phosphate in vitro. *Arch Oral Biol* 2005;50: 541–552.

29. Horner V, Pittermann W, Wachter, R. Efficiency of high molecular weight chitosan in skin care applications. In: Domard A, Roberts GAF e

Varum KM. *Advances in chitin science*. Lyon, Jacques Andre Publishers. 1997; 671-677.

30.Honarkar H, Barikani M. Applications of biopolymers I: chitosan. *Mon Fur Chem*. 2009; 140(12):1403-1420.

31. Huysmans MC, Chew HP, Ellwood RP. Clinical studies of dental erosion and erosive wear. *Caries Res*. 2011;45 Suppl 1:60-8. doi: 10.1159/000325947. Epub 2011 May 31.

32.Kanzow P, Wegehaupt FJ. Etiology and pathogenesis of dental erosion. 2016;47(4):275–8.

33.Katarzyna Fita, Urszula Kaczmarek. The Impact of Selected Fluoridated Toothpastes on Dental Erosion in Profilometric Measurement *Adv Clin Exp Med* 2016, 25, 2, 327–333.

34.Khamverdi Z, Kasraie SH, Rezaei-Soufi L, Jebeli S. Comparison of the Effects of Two Whitening Toothpastes on Microhardness of the Enamel and a Microhybride Composite Resin: An in Vitro Study 2010; Vol. 7, No.

35.Kreulen CM, Van't Spijker A, Rodriguez JM, Bronkhorst EM, Creugers NHJ, Bartlett DW, *Caries Res*. 44 (2010) 151.

36.Kubota N, Tastumoto N, Sano T, Toya K, *Carbohydr. Res*. 2000, 324, 268.

37.Lee H, Tsai S, Kuo C, Bassani AW, Pepe-mooney B, Miksa D, et al. *Journal of Colloid and Interface Science* Chitosan adsorption on hydroxyapatite and its role in preventing acid erosion. *J Colloid Interface Sci [Internet]*. 2012;385(1):235–43.

38.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*.2007;106:4248–4256.

- 39.Lussi A, Schlueter N, Rakhmatullina E, Ganss C. Dental erosion—an overview with emphasis on chemical and histopathological aspects. *Caries Research* 2011; 45:2–12.
- 40.Lussi, A. et al. Analysis of the erosive effect of different dietary substances and medications. *British Journal of Nutrition*. 2012; 107: 252–262.
- 41.Lussi A, Carvalho TS. Analyses of the Erosive Effect of Dietary Substances and Medications on Deciduous Teeth. *Plos one*. 2015; 10(12).
- 42.Magalhães AC. et al. Insights into preventive measures for dental erosion. *Journal of Applied Oral Science*, v. 17, n. 2, p.75–86,2009.
- 43.Marconi MA; Lakatos EM. *Fundamentos de metodologia científica*. 5.ed. São Paulo: Atlas, 2003.
- 44.Marinho VC, Higgins JP, 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 Syst Rev* 2004; 1:CD002781.
- 45.Medeiros IC, Brasil VL, Carlo HL, Santos RL, Lima BA, Carvalho FG. In vitro effect of calcium nanophosphate and high-concentrated fluoride agents on enamel erosion: an AFM study. *Int J Paediatr Dent*. 2014; 24(3):168-74, 2014.
- 46.Neves ALP. *Preparação e caracterização de nanopartículas de quitosana incorporadas com zinco com potencial atividade cicatrizante e antimicrobiana*. Tese [Doutorado em engenharia química] - Universidade Federal de Santa Catarina; 2013
- 47.Norma ABNT NBR 15448-1. *Embalagens plásticas degradáveis e/ou de fontes renováveis Parte 1: Terminologia*.

48. Pawtłowska E. The assessment of influence of chitosan on the dental pulp in rats. In: Domard A, Robert GAF, Varum KM. *Advances in chitin science*. Lyon: Jacques Andre Publishers. 1997; 671-667.
49. Petri DF, Donega J, Benassi AM, Bocangel JA. Preliminary study on chitosan modified glass ionomer restoratives. *Dent Mater*. 2007; 23:1004–1010.
50. Pini NIP, Lima DANL, Lovadino JR, Ganss C, Schlueter N. In vitro Efficacy of Experimental Chitosan-Containing Solutions as Anti-Erosive Agents in Enamel. 2016;337–45.
51. São Pedro AS, Cabral-Albuquerque E, Ferreira D, Sarmento B. Chitosan: an option for development of essential oil delivery systems for oral cavity care? *Carbohydrate Polymers*. 2009; 76:501-508.
52. Schlueter N, Klimek J, Ganss C. Randomised in situ study. On the efficacy of a tin/chitosan toothpaste on erosive-abrasive enamel loss. *Caries Research*. 2013; 47(6):574–581.
53. Shellis RP, Ganss C, Ren Y, Zero DT, Lussi A. Methodology and models in erosion research: discussion and conclusions. *Caries Res*. 2011;45 Suppl 1:69-77.
54. Silva, RLda. Sistema de liberação controlada de quitosana contendo antígeno capsular Vi de *Salmonella Typhi* [dissertação]. Belém: Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará; 2012.
55. Sinha VR.; Singla AK.; Wadhawan S; KAUSHIK R.; KUMRIA R.; BANSAL, K.; DHAWAN, S. Chitosan microspheres as a potencial carrier for drugs. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 274, n. 1-2, p. 1-33, 2004.
56. Souza BM, Lima LLM, Comar LP, Buzalaf MAR, Magalhães AC. Effect of experimental mouthrinses containing the combination of NaF and TiF₄ on enamel erosive wear in vitro. *Archives of oral biology*. 2014; 59(2014):621-624.

57. Tavares IS. Obtenção e caracterização de nanopartículas de quitosana [dissertação]. Natal: Universidade Federal do Rio Grande do Norte; 2011.
58. Tavararia FK, Costa EM, Pina-vaz I, Carvalho MF. Artigo de Revisão A quitosana como biomaterial odontológico : estado da arte. 2013;29:110–20.
59. Uysal T, Derya M, Amasyali M, Ozcan S, Yagci A. Does a chitosan-containing dentifrice prevent demineralization around orthodontic brackets ? 2011;81(2):319–25.
60. Venasakulchaia A, Williams NA, Gracia LH, Gareth D. A comparative evaluation of fluoridated and non-fluoridated mouthrinses using a 5-day cycling enamel erosion model. *Journal of dentistry*. 2010; 38:21–29.
61. Walsh T, Worthington HV, Glenny AM, Appelbe P, Marinho VC, Shi X: Fluoride toothpastes of different concentrations for preventing dental caries in children and adolescents. *Cochrane Database Syst Rev* 2010; 1:CD007868.
62. Wiegand A, Bichsel D, Magalhaes AC, Becker K, Attin T. Effect of sodium, amine and stannous fluoride at the same concentration and different pH on in vitro erosion. *Journal of Dentistry*. 2009; 37:591–5.
63. Wilson B, Samanta MK, Santhi K, Kumar KP, Ramasamy M, SURESH B. Chitosan nanoparticles as a new delivery system for the anti-Alzheimer drug tacrine. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2010; 6(1):144-152.

APÊNDICE

Apêndice A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA DA UFPB**

Prezado voluntário, esta pesquisa tem como título “EFEITO IN VITRO DAS NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA NA DESMINERALIZAÇÃO DO ESMALTE DENTÁRIO SUBMETIDO AO DESAFIO EROSIVO” e está sendo desenvolvida pela cirurgiã-dentista, RENATA CRISTINA SOBREIRA FRANCA mestranda em Odontologia pela Universidade Federal da Paraíba, sob orientação de Fabíola Galbiatti de Carvalho Carlo, professora do Departamento de Departamento de Clínica e Odontologia Social da mesma instituição.

O objetivo desse estudo laboratorial é avaliar a capacidade da solução de nanopartícula de quitosana de prevenir a desmineralização do esmalte dentário humano quando submetido a soluções que simularão o desenvolvimento de cárie e erosão dentária.

A sua participação neste estudo consistirá na doação de um dente terceiro molar hígido extraído por motivos de saúde identificado pelo cirurgião-dentista que lhe prestou assistência odontológica. Todas as partes moles (células, sangue e material genético) do dente serão desprezadas e não serão utilizadas. O dente doado ficará guardado com o pesquisador até 3 anos a contar da data de assinatura deste documento. Desse modo, solicitamos sua autorização para utilizar durante esse período o material doado para desenvolver o estudo mencionado acima. Após o período de 3 anos, o dente será aquecido a 900°C, por 2 horas, em seguida triturado até formar um pó e desprezado no sistema de esgotamento sanitário da cidade.

Sua participação é voluntária e, portanto, o (a) senhor (a) não é obrigado (a) a fornecer as informações e/ou colaborar com as atividades solicitadas pelo pesquisador. Caso decida não participar do estudo, ou decidir a qualquer momento desistir do mesmo, não sofrerá nenhum dano, nem haverá modificação na assistência que vem recebendo na Instituição, se for o caso.

Nesta pesquisa, o(a) senhor(a) não poderá se certificar pessoalmente de todas as análises laboratoriais a serem realizadas com o material doado. Desse modo, solicito a sua permissão para apresentar os resultados deste estudo em eventos da área da saúde e publicar em revista científica. Por ocasião da publicação dos resultados, seu nome será mantido em sigilo. O(s) pesquisador(es) estará(ão) à sua disposição para qualquer esclarecimento que considere necessário, em qualquer etapa da pesquisa, inclusive para informar sobre as conclusões finais.

Diante do exposto declaro que fui devidamente esclarecido(a) e dou o meu consentimento para participar do estudo e para a publicação dos resultados. Estou ciente que receberei uma cópia desse documento.

Em caso de analfabeto, acrescentar:

Assinatura do participante da
pesquisa/Responsável legal

Assinatura da Testemunha

Assinatura do (a) pesquisador(a) responsável

Assinatura do(a) pesquisador(a) participante

Endereço (setor de trabalho do pesquisador responsável):

Fabíola Galbiatti de Carvalho Carlo (matrícula UFPB/Siape 1827375), Departamento de Clínica e Odontologia Social., Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, campus I, João Pessoa, Paraíba. Telefone para contato: (0xx83) 3216-7251 (Departamento de Clínica e Odontologia Social.).

Qualquer dúvida, entrar em contato com o CEP/CCS da Universidade Federal da Paraíba, Cidade Universitária, João Pessoa, telefone: (0xx83) 3216-7791.

Apêndice B – TERMO DE DOAÇÃO DE DENTES HUMANOS**TERMO DE DOAÇÃO DE DENTES HUMANOS
UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**

Eu, _____, declaro que estou doando o(s) elemento(s) dentário(s) _____, que foi/foram extraído(s) por indicação terapêutica avaliado pelo cirurgião-dentista que me prestou assistência odontológica, para a pesquisa intitulada “EFEITO IN VITRO DAS NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA NA DESMINERALIZAÇÃO DO ESMALTE DENTÁRIO SUBMETIDO AO DESAFIO EROSIVO” que será desenvolvida pela cirurgiã-dentista RENATA CRISTINA SOBREIRA FRANCA, mestranda em Odontologia da Universidade Federal da Paraíba, sob orientação de FABÍOLA GALBIATTI DE CARVALHO CARLO, professora doutora do Departamento de Clínica e Odontologia Social do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba. Estou ciente de que este(s) dente(s) será(ão) utilizado(s) pelos alunos e pesquisadores da instituição para treinamento acadêmico laboratorial e realização de pesquisas.

_____, ____ de _____ de 20____.

Assinatura do Doador

ANEXO



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

CERTIDÃO

Certifico que o Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba – CEP/CCS aprovou por unanimidade na 5ª Reunião realizada no dia 01/07/2015, o Projeto de pesquisa intitulado: **“EFEITO IN VITRO DA SOLUÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA NA DESMINERALIZAÇÃO DENTÁRIO SUBMETIDO AOS DESAFIOS CARIOGÊNICO E EROSIVO”**, da pesquisadora Fabíola Galbiatti de Carvalho Carlo. Protocolo 0384/15. CAAE: 46087215.2.0000.5188.

Outrossim, informo que a autorização para posterior publicação fica condicionada à apresentação do resumo do estudo proposto à apreciação do Comitê.


Andréa M. da C. Lima
Mat. SIAPE 1117510
Secretária do CEP-CCS-UFPB