

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

CARLOS CONDARCO GIRONDA

**Potencial anti-erosivo de uma nova cistatina derivada da cana-de-
açúcar: definindo concentrações e veículos a serem utilizados**

BAURU
2018

CARLOS CONDARCO GIRONDA

Potencial anti-erosivo de uma nova cistatina derivada da cana-de-açúcar: definindo concentrações e veículos a serem utilizados

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências no Programa de Ciências Odontológicas Aplicadas, na área de concentração Estomatologia e Biologia Oral.

Orientadora: Profa. Dr^a Marília Afonso Rabelo Buzalaf

Versão corrigida

BAURU
2018

Carlos Condarco Gironda

C75p

Potencial anti-erosivo de uma nova cistatina derivada da cana-de-açúcar: definindo concentrações e veículos a serem utilizados / Carlos Condarco Gironda – Bauru, 2018.

84 p. : il. ; 31cm.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo

Orientadora: Profa. Dr^a Marília Afonso Rabelo Buzalaf

Nota: A versão original desta dissertação encontra-se disponível no Serviço de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia de Bauru – FOB/USP.

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação/tese, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Data:

Comitê de Ética da FOB-USP

Protocolo nº: 59786416.9.0000.5417

Data: 21/11/2017

(Cole a cópia de sua folha de aprovação aqui)

DEDICATÓRIA

A Deus

Por me dar chance de recomeçar todos os dias. Senhor obrigado por me amparar nos momentos de fraqueza.

Aos meus pais Carlos e Lucy

A vocês que sempre prezaram tanto pela minha formação pessoal e intelectual dedico este trabalho.

Tudo o que conquistei até agora devo a vocês

Mãe, obrigada pelo apoio, amor incondicional.

Pai, obrigado por sempre me incentivar e por ser meu exemplo de ética e seriedade.

Obrigado por muitas vezes abdicarem de seus sonhos para que os meus pudessem ser realizados.

A minha irmã Carla

Você sempre presente e disposta a ajudar no meu crescimento profissional e pessoal.

Obrigado.

AGRADECIMENTOS

A Deus,

Aos meus pais **Lucila e Carlos**

Só consegui chegar ao final desta jornada por me sentir amparado por vocês. Vocês foram amigos, confidentes, companheiros, compreensivos e, demonstraram um amor incondicional.

À minha querida irmã **Carla**, *pelo incentivo em cada palavra de apoio até o final.*

À meus avós **Hermínia e Donato.**

Por acreditar em mim desde criança.

Ao meu amigo **Ever Mena,**

Obrigado amigo por me ajudar desde o início até aqui.

Ao meu amigo **Angel Terrero,**

Obrigado amigo por todos os conselhos que você me deu ao longo destes dois anos.

A minha amiga **Mariela Peralta,**

Obrigado por toda ajuda prestada, por cada dúvida que me esclareceu, em todos os momentos que precisei você me ajudou prontamente!

Ao meu amigo **Vinícius Taioqui Pelá,**

Vinicius, obrigado por me transmitir um pouco do seu conhecimento durante esses anos de pesquisa, você me auxiliou em todos os momentos.

À minha amiga **Aline Silva Braga,**

Obrigada amiga por sua ajuda e disponibilidade cada vez que eu precisei.

À minha amiga **Cíntia Tokuhara,**

Amiga sempre ajudando e guiando.

Aos meus **queridos colegas e amigos do Laboratório de Bioquímica,**

Aline Dionizio, Beatriz Souza, Cíntia Souza, Daiana Moreli, David Lucas, Even Taira, Flávia Amadeu, Flávia Levy, Gabriela Neubern. Heloisa Pereira, Isabela Tomazini, João Paulo Domezi, Juliana Pires, Juliano Pessan, Juliana Trevizol, Maria Aparecida, Mariana Santesso, Mileni Fernandez, Priscila Salomão, Sara Zabini, Talita Ventura, Tamara Araújo e Tatiana Martini.

Às técnicas e especialistas do Laboratório de Bioquímica, **Larissa, Thelma e Aline,**

Por todas as palavras de alento e ajuda. Por estarem sempre solucionando nossos problemas por transmitirem cada conhecimento que aprendi com cada uma de vocês.

Aos professores da Disciplina de Bioquímica, **Professor Dr. Rodrigo Cardoso de Oliveira e Professora Dra. Ana Carolina Magalhães.**

Professores, muito obrigado por compartilharem o conhecimento, por me ajudarem durante a disciplina até mesmo fora da sala de aula.

À secretária do Departamento **Dalva Ribeiro de Oliveira,**

Sempre disposta e prestativa, obrigado por me atender sempre de forma muito educada, por dar os melhores conselhos em nos piores momentos. Obrigado por toda atenção e paciência.

Às secretárias da Pós-graduação **Fátima, Leila, Letícia, Meg e Maristela,**

Por me ajudar com as documentações e por solucionar minhas todas as dúvidas e por me dar as informações.

Aos **voluntários** desta pesquisa,

Faculdade de Odontologia de Bauru- FOB/USP, na pessoa do diretor **Prof. Dr Carlos Ferreira dos Santos** e vice-diretor, **Guilherme dos Reis Pereira Janson.**

Foi um prazer para ter realizado minha pós-graduação, em nível de mestrado, nesta grande instituição. Obrigado FOB-USP por tudo que me proporcionaram nesse período.

À todos os **funcionários da FOB-USP** que colaboraram de forma direta ou indireta para o desenvolvimento deste trabalho.

À **Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de Nível superior (CAPES),**
Pela concessão da minha bolsa de Mestrado, importante para meu aprimoramento profissional e pessoal.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Profª. Marília Afonso Rabelo Buzalaf,

Eu antes de vir até o Brasil pensei que Deus tinha se esquecido de mim, pois só Ele sabe todas as coisas que eu passei, mas isso nunca me deixou desistir, pois eu sabia que um dia minha oportunidade chegaria. Todas essas coisas só me fortaleceram pois eu nunca desistir de lutar para conseguir minha oportunidade.

E foi assim que um dia em janeiro de 2016, a Senhora respondeu meu e-mail e quando li com imensa alegria, enxerguei uma oportunidade que eu não poderia perder, foi então que comecei a pensar em uma carreira acadêmica, onde eu teria minha oportunidade. Dizer que foi tudo fácil, seria muito hipocrisia minha, pois muitas coisas aconteceram, passei por momentos de alegrias, tristezas, tive medo, mas graças a Deus ocorreu tudo certo, pois a Senhora sempre esteve ali para me dar total suporte.

O primeiro ano passou e eu fui sobrevivendo todos os dias a cada obstáculo que surgia, alguns foram para meu crescimento outros nem tanto, mas eu só pensava que eu gostaria de resolver tudo da melhor forma possível e foi assim que eu sempre procurei dar o melhor de mim.

No segundo ano tudo melhorou, eu consegui entender melhor todas as instruções, embora não conseguia falar de modo que todos conseguissem me entender bem, mas todos com muita paciência sempre me trataram muito bem.

Agradeço imensamente por tudo que fez e faz por mim. Foram dois anos de aprendizado e eu tenho muito a agradecer a Senhora por cada momento que vivi. Tentei resumir em poucas palavras tudo que sinto por esse período trabalhando ao seu lado.

Obrigado por tudo que me ensinou, Muito Obrigado.

*“Uma vida sem desafios não vale a pena ser vivida, a vida sem
ciência é uma espécie de morte,
O início da sabedoria é a admissão da própria ignorância; todo o
meu saber consiste em saber que nada sei.
O homem para ser completo tem que estudar, trabalhar e lutar”.*

Sócrates

RESUMO

A erosão dentária apresenta uma etiologia multifatorial, com isto, existem várias possibilidades preventivas e terapêuticas. A saliva é um dos mais importantes fatores biológicos envolvidos, tendo um papel protetor contra desafios erosivos, por contribuir na formação da película adquirida. Já a incorporação de proteínas á película adquirida, através da sua adição a produtos odontológicos, como soluções para bochecho ou géis, por exemplo, pode afetar sua habilidade em proteger contra a erosão. Experimentos preliminares revelaram que uma cistatina clonada recentemente a partir da cana-de-açúcar, denominada CaneCPI-5, tem uma grande força de interação com o esmalte, sendo capaz de protegê-lo contra a erosão inicial. O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito de soluções ou géis contendo CaneCPI-5, em diferentes concentrações, na proteção contra a erosão inicial do esmalte *in vitro*. Foram confeccionados 150 blocos de esmalte bovino (4 X 4 mm). Para cada um dos veículos a ser testado (solução ou gel) foram constituídos 5 grupos, sendo um grupo controle, constituído por água deionizada ou gel placebo e 4 grupos experimentais. Para as soluções, os grupos experimentais foram constituídos de: Mucina 0,27% + Caseína 0,5%, CaneCPI-5 0,025 µg/µL, CaneCPI-5 0,1 µg/µL e CaneCPI-5 1,0 µg/µL. Para os géis, os grupos experimentais foram: Mucina 0,27% + Caseína 0,5%, CaneCPI-5 0,1 µg/µL, CaneCPI-5 1,0 µg/µL e CaneCPI-5 2,0 µg/µL. O tratamento dos espécimes com as soluções foi feito por 2 h a 30°C, sob agitação, enquanto com os géis foi feito por 1 min. Saliva estimulada foi coletada de 3 voluntários para formação da película adquirida (durante 2 h) sobre os espécimes. Os espécimes foram então incubados em solução de ácido cítrico 0,65% (pH = 3,4) por 1 min a 30°C sob agitação constante. Cada espécime foi assim tratado uma vez ao dia durante 3 dias. As análises de microdureza de superfície (SHM) foram feitas e as alterações na SMH ($SHM_{baseline} - SMH_{pós-erosão}$; %SHC) foram calculadas nos dias 1 e 3. Os dados foram analisados pelos teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn ($p < 0,05$). As soluções contendo CaneCPI-5 a 0,1 e 1,0 µg/µl reduziram significativamente %SHC em comparação aos demais tratamentos, para ambos os períodos experimentais, sem diferença entre si. Para os géis resultados semelhantes aos das soluções foram obtidos apenas no primeiro dia de tratamento. Após 3 dias, entretanto, o efeito protetor foi perdido. Em conclusão, o tratamento com solução

contendo CaneCPI-5 a 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ parece ser uma boa alternativa para prevenir a erosão inicial do esmalte, o que deve ser confirmado em estudos utilizando condições experimentais mais similares às situações clínicas.

Palavras-chave: Película Dentária; cana-de-açúcar; cistatinas; anti-erosivo; in vitro.

ABSTRACT

ANTI-EROSIVE POTENTIAL OF A NEW CISTATIN DERIVED FROM SUGAR CANE: DEFINING CONCENTRATIONS AND VEHICLES TO BE USED

Dental erosion has a multifactorial etiology, thus, there are several preventive and therapeutic possibilities. Saliva is one of the most important biological factors involved, having a protective role against erosive challenges and contributing to the formation of the acquired enamel pellicle. The incorporation of proteins in the acquired enamel pellicle, by their addition to dental products such as mouthwashes or gels, for example, can affect its ability to protect against erosion. Preliminary experiments from our group have shown that a sugar cane-derived protein that was recently cloned, known as CaneCPI-5 has a strong interaction force with the enamel and is capable of protecting it against initial erosion. The aim of this study was to evaluate the effect of solutions or gels containing CaneCPI-5, in different concentrations, on the protection against initial enamel erosion in vitro. Bovine enamel blocks (n=150) (4X4 mm) were prepared. For each of the vehicles tested (solution or gel) 5 groups (one control, constituted by deionized water or placebo gel and four experimental) were constituted. For the solutions, the experimental groups were constituted of: 0.27% mucin + 0.5% casein, 0.025 µg/µL CaneCPI-5, 0.1 µg/µL CaneCPI-5 or 1.0 µg/µL CaneCPI-5. For the gels, they were: 0.27% mucin + 0.5% casein, 0.1 µg/µL CaneCPI-5, 1.0 µg/µL CaneCPI-5 or 2.0 µg/µL CaneCPI-5. The specimens were treated with the solutions for 2 h at 30°C under stirring or with the gels for 1 min. Stimulated saliva was collected from three volunteers and the acquired enamel pellicle was formed for 2 h. Then the specimens were incubated in a solution of 0.65% citric acid (pH = 3.4) for 1 min at 30°C under stirring. Each specimen was treated once a day for 3 days. Surface hardness analysis (SHM) was made and changes in SMH (SHM baseline - post-erosion SMH; %SHC) was calculated on days 1 and 3. Data were analyzed by Kruskal-Wallis and Dunn's tests (p<0.05). The solutions containing 0.1 and 1.0 µg/µL CaneCPI-5 significantly reduced %SHC when compared with the other treatments, for both experimental periods, without significant difference between them. As for the gels, similar results were obtained but only at the first day of treatment. After 3 days, the

protective effect was lost. In conclusion, the treatment with solution containing 0.1µg/µL CaneCPI-5 seems to be a good alternative to prevent initial enamel erosion, what needs to be confirmed using experimental conditions that more closely resemble the clinical situation.

Key words: Dental Pellicle ; Saccharum; cystatins; anti-erosive; in vitro.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURAS

Figura 1	- Fluxograma da etapa <i>in vitro</i>	45
Figura 2	- Porcentagem média de perda de dureza superficial do esmalte após 3 dias.....	49
Figura 3	- Porcentagem média de perda de dureza superficial do esmalte após 1 dia	50
Figura 4	- Porcentagem média de perda de dureza superficial do esmalte após 3 dia	51
Figura 5	- Porcentagem média de perda de dureza superficial do esmalte após 3 dia	51

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

pH	potencial hidrogeniônico
<i>in situ</i>	(latim) – em sitio, no local (no caso, a cavidade bucal)
<i>in vitro</i>	(latim) – em vidro
<i>in vivo</i>	(latim) – no ser humano ou animal
nm	nanômetros
µm	micrômetro
PRPs	proteínas ricas em prolina
CaneCPI-5	canacistatina 5
MFA	Microscópio de Força Atômica
µg	micrograma
µL	microlitro
DRGE	Doença do refluxo gastroesofágico
IgA	imunoglobulina A
PA	Película adquirida
MMPs	Metaloproteinases
PAs	Películas adquiridas
%MDS	% de alteração de microdureza de superfície
nN	nano nêutons
DE3	<i>E. coli</i> Rosetta
mL	mililitro
min	minuto
h	hora
g	gravidade
s	segundo
SMH	microdureza de superfície
g	grama
PAE	película adquirida de esmalte

LISTA DE SÍMBOLOS

%	por cento
°C	graus Celsius
±	mais o menos
=	igual
R\$	real (moeda)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO DE LITERATURA	25
2.1	EROSÃO DENTÁRIA	25
2.2	SALIVA	28
2.2.1	Composição salivar	29
2.3	PELICULA ADQUIRIDA	30
3	PROPOSIÇÃO	39
4	MATERIAL E MÉTODOS	43
4.1	Aspectos Éticos	43
4.2	Expressão heteróloga da canacistatina 5	43
4.3	Obtenção dos blocos de esmalte bovino	43
4.4	Coleta de saliva total	44
4.5	Incubação dos blocos em saliva e ácido cítrico	45
4.6	Microdureza de superfície	46
4.7	Análise estatística	46
5	RESULTADOS	49
5.1	Canacistatina 5 em solução (microdureza superficial)	49
5.2	Canacistatina 5 em gel (microdureza superficial)	50
6	DISCUSSÃO	55
7	CONCLUSÕES	61
	REFERÊNCIAS	65
	ANEXOS	73

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

O aumento geral do consumo global de alimentos e bebidas ácidas no aumento da prevalência de desgaste dentário erosivo observado em alguns estudos pode refletir as mudanças na percepção da erosão dentária. Durante as últimas décadas, um interesse cada vez maior na erosão dentária tem sido observado na prática clínica, na saúde pública e na pesquisa dentária. (LUSSI AND CARVALHO, 2014)

O desgaste dentário erosivo, é caracterizada pela perda de tecido dentário duro ocasionada por ácidos de origem não bacteriana, podendo ser provenientes da dieta (extrínsecos) (BARBOUR AND LUSI, 2014) ou do conteúdo gástrico do hospedeiro (intrínsecos) (MOAZZEZ AND BARTLETT, 2014). De fato, sua etiologia é multifatorial, sendo sua progressão guiada por fatores relacionados ao paciente e fatores nutricionais, sofrendo ainda influência do comportamento, educação, nível de conhecimento e ocupação (LUSSI AND CARVALHO, 2014).

Os poucos dados disponíveis revelam um aumento de prevalência, variando de 1 a 79% em dentes decíduos de crianças de 2 a 5 anos, 14% nos dentes permanentes de crianças de 5 a 9 anos, de 7 a 100% em adolescentes de 9 a 20 anos e de 4 a 100% em adultos (18 a 88 anos) (JAEGGI, T. AND A. LUSI, 2014) Uma revisão sistemática recente estimou a prevalência de desgaste dentário erosivo em dentes permanente de crianças e adolescentes em 30,4% (SALAS et al., 2015) Deve ser considerado que o desgaste dentário erosivo é progressivo e, se não forem instauradas medidas preventivas apropriadas em tempo, a prevalência tende a aumentar com a idade (JAEGGI AND LUSI, 2014). Sendo a prevalência elevada e suas sequelas indesejáveis, a prevenção é altamente necessária.

No erosão, embora não exista um pH crítico característico fixo, existe subsaturação tanto em relação à hidroxiapatita quanto em relação à fluorapatita, ocasionando inicialmente um amolecimento da superfície dentária, seguido por dissolução contínua de camadas mais superficiais dos cristais do esmalte, culminando em uma perda permanente de volume, com uma camada amolecida na superfície do tecido remanescente. Nos estágios mais avançados, a dentina pode acabar sendo

exposta (LUSSI et al., 2011). Com a exposição dentinária, a erosão sofre uma mudança expressiva, em decorrência da composição do tecido dentinário.

Devido à etiologia multifatorial da erosão dentária, várias possibilidades preventivas e terapêuticas têm sido propostas para o controle destas lesões. Estas estratégias são, em primeira instância, focadas nos fatores biológicos (MAGALHÃES, WIEGAND et al., 2009; DAVIES AND BLINKHORN, 2013; RUGG-GUNN, 2013; LUSSI AND HELLWIG, 2014; CARVALHO, COLON et al., 2015; SANTIAGO, MIGUEL et al., 2017). A saliva é um dos mais importantes fatores biológicos envolvidos na erosão, tendo um papel protetor devido às suas diferentes funções (BALZ, 1999; HANNIG et al., 2004; LUSSI; JAEGGI; ZERO, 2004; VAN NIEUW AMERONGEN; BOLSCHER; VEERMAN, 2004; HARA et al., 2006). Ela dilui os ácidos e promove a sua eliminação da cavidade bucal, através do *clearance*; tem capacidade tampão, neutralizando os ácidos; é supersaturada em relação ao mineral dentário, fornecendo íons cálcio, fosfato e fluoreto para a remineralização; tem um rico conteúdo proteico, com diferentes propriedades protetoras, além de contribuir para a formação da película adquirida (NICOLAU, 2009; BUZALAF; HANNAS et al., 2012). Que é uma camada orgânica, livre de bactérias, que se forma *in vivo* como resultado da adsorção seletiva de proteínas salivares à superfície do esmalte dentário (DAWES, JENKINS et al. 1963). Sua formação é um processo dinâmico, influenciado por vários fatores, como ciclo circadiano, composição da microbiota bucal, capacidade proteolítica do ambiente bucal e propriedades físico-químicas das superfícies dentárias, bem como localização na cavidade bucal (LENDENMANN; GROGAN; OPPENHEIM, 2000).

A formação da película inicia-se apenas alguns segundos depois da exposição do esmalte à saliva, ocorrendo um rápido aumento na sua espessura, atingindo cerca de 10-20 nm nos primeiros minutos, a qual fica estável por cerca de 30 minutos (HANNIG, 1999). Inicialmente ocorre a aderência seletiva de proteínas precursoras, com alta afinidade pela hidroxiapatita, as quais interagem eletrostaticamente com a superfície do esmalte (HAY, 1973). Dentre elas encontram-se as proteínas ricas em prolina (PRPs), estaterina e histatinas, conforme identificado por estudos *in vitro*, embora estudos *in situ* tenham confirmado a presença também de mucinas, amilase, cistatinas, lisozima e lactoferrina (SIQUEIRA; CUSTODIO; MCDONALD, 2012). Esta primeira camada de proteínas que se adere parece ser a que confere a maior proteção contra a desmineralização dentária, uma vez que se trata de uma camada bastante

elétron densa. As camadas subsequentes têm um arranjo muito mais frouxo quando comparado àquele das películas basais (HANNIG, 1999). Foi relatado que não há diferença no potencial protetor contra a desmineralização de películas formadas depois de 3 minutos de exposição à saliva, quando comparadas com aquelas formadas 2 horas após (HANNIG et al., 2004).

No segundo estágio de formação da película, chamado estágio maturacional, ocorre um rápido aumento na sua espessura (100-1000 nm), o que, juntamente com a presença de estruturas globulares, sugere o envolvimento de agregados proteicos, mais do que proteínas individuais, no seu desenvolvimento (HANNIG AND BALZ, 2001). A espessura da película atinge um *plateau*, entre 30 e 90 minutos, ficando com uma espessura entre 100 e 1000 µm, dependendo da sua localização na cavidade bucal, sendo mais espessa na região vestibular quando comparada à lingual (HANNIG, 1999). A película ainda pode sofrer maturação intrínseca e extrínseca, o que pode afetar a sua solubilidade. A maturação intrínseca pode ser causada pela presença de transglutaminase, derivada de células epiteliais bucais, que pode fazer ligações cruzadas entre as PRPs básicas e a estaterina (YAO; LAMKIN, 2000; HANNIG et al., 2008), bem como pela presença de fosfatase alcalina. De fato, as ligações cruzadas enzimáticas e a desfosforilação parecem ser os eventos mais importantes para a maturação intrínseca da película, enquanto que a proteólise parece ser de menor importância (HANNIG et al., 2008). Já a proteólise salivar, que pode ocorrer antes (Helmerhorst, Alagl et al. 2006) ou após a adsorção à hidroxiapatita (MCDONALD et al., 2011), desempenha um importante papel na maturação extrínseca da película, já que muitos dos seus componentes são fragmentos peptídicos (VITORINO, CALHEIROS-LOBO et al., 2007; SIQUEIRA AND OPPENHEIM, 2009). A formação e maturação da película também podem ser influenciadas por fatores extrínsecos, como produtos de clareamento dentário, dentifrícios abrasivos e ingestão de alimentos e bebidas ácidos (HARA; ZERO, 2010).

O conhecimento da composição da película adquirida do esmalte sem dúvida ganhou corpo quando passaram a ser empregadas técnicas proteômicas para sua elucidação, ao invés das técnicas enzimáticas ou imunológicas, que eram empregadas anteriormente (SIQUEIRA; CUSTODIO; MCDONALD, 2012). Isto se deve à alta sensibilidade das técnicas proteômicas, e ao fato de que estas permitem que sejam identificadas muitas proteínas ao mesmo tempo. No entanto, o número de

trabalhos existentes na literatura empregando esta ferramenta analítica ainda é pequeno, de forma que há muito a ser estudado.

A incorporação de proteínas salivares na película adquirida pode afetar sua habilidade em proteger contra a erosão. Pacientes com erosão têm a metade da quantidade de proteínas na película adquirida formada *in situ* quando comparados ao grupo controle, o que reforça a importância do papel protetor das proteínas presentes na película adquirida (CARPENTER et al., 2014). Entre estas proteínas encontra-se a mucina, que, quando aderida à superfície do esmalte, sozinha ou combinada com outras proteínas, inibe a desmineralização causada por ataque erosivo (CHEAIB; LUSSI, 2011). Além da mucina, as estaterinas e proteínas ricas em prolina (PRPs) são capazes de manter um estado de supersaturação em relação ao cálcio e ao fosfato na cavidade bucal, por inibir a precipitação deles em pH neutro e liberar estes íons após um ataque ácido e durante a desmineralização. Foi relatado recentemente que a concentração de cálcio na película adquirida em pacientes com erosão está reduzida em 50% e a concentração de estaterina (uma proteína ligadora do cálcio) está reduzida em 35% (CARPENTER et al., 2014). Em relação às proteínas presentes na dieta, a caseína parece ter propriedades ácido-protetoras (BARBOUR et al., 2008), especialmente quando combinada com a mucina (CHEAIB; LUSSI, 2011). Similarmente à caseína, a ovalbumina também pode reduzir a dissolução da hidroxiapatita por soluções ácidas *in vitro* (HEMINGWAY et al., 2008). Num estudo recente do nosso grupo de pesquisa, identificamos proteínas que restaram na película adquirida formada *in situ* sobre a dentina e *in vivo* sobre o esmalte após exposição a ácido cítrico ou ácido láctico, simulando processos erosivo ou carioso, respectivamente. Foram identificadas proteínas ácido resistentes, como as mucinas e a cistatina B (DELECRODE et al., 2015a, 2015b).

Assim, o reforço da película adquirida pela alteração da sua composição, através da “engenharia de película”, tem sido sugerido como uma medida promissora para prevenção da desmineralização dentária (VUKOSAVLJEVIC et al., 2014). Dentro deste conceito, a busca por proteínas ácido-resistentes na película, bem como por compostos que, uma vez incorporados à película possam aumentar o seu potencial ácido-resistente, reveste-se de extrema importância. Uma vez identificados, estas proteínas ou compostos protetores poderão ser incorporados a produtos odontológicos, como dentifrícios, enxaguatórios ou géis, visando a enriquecer a

película com os mesmos e, conseqüentemente aumentar a sua capacidade ácido-resistente.

A cistatina B demonstrou ser de grande interesse (DELECRODE et al., 2015b) para incorporação em produtos odontológicos. Entretanto, a enzima proveniente de humanos tem um alto custo de produção. Recentemente foi clonada uma cistatina derivada da cana-de-açúcar, denominada canacistatina 5 ou CaneCPI-5, que demonstrou, por MFA (Microscópio de Força Atômica), ter uma alta força de adesão ao esmalte (SANTIAGO et al., 2017). Esta proteína foi testada em solução na concentração de 0,025 µg/µL e se mostrou efetiva para prevenir a erosão inicial do esmalte, especialmente quando aplicada antes da formação da película adquirida (SANTIAGO et al., 2017).

Estes resultados deixam claro o grande potencial da canacistatina 5 em prevenir a erosão dentária pela sua capacidade de interação com o esmalte dentário. Trata-se ainda de uma proteína de baixo custo de produção, o que a torna ideal para inclusão em produtos odontológicos. Entretanto, antes que novos produtos sejam desenvolvidos são necessários mais estudos. Seria interessante avaliar se concentrações maiores de CaneCPI-5 em solução poderiam melhorar seu efeito protetor contra a erosão dentária. Em adição, é importante testar diferentes veículos de aplicação, pois estudos prévios mostraram um efeito melhor de géis contendo inibidores de metaloproteinases da matriz para prevenção da erosão dentinária (KATO et al., 2010) em relação a soluções contendo estes inibidores (MAGALHÃES et al., 2009). Estes dados são extremamente importantes para formarem a base para futuros estudos *in situ* e clínicos que darão respaldo à utilização de produtos à base de canacistatina 5 para prevenção da erosão dentária.

2 Revisão de Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Erosão dentária

O desgaste do dente *per se* é um processo fisiológico e pequenos sinais de desgaste não devem ser classificados como patológicos. A diferenciação entre desgaste patológico e fisiológico não é fácil. A definição de Smith e Knight - "O desgaste do dente pode ser considerado como patológico se os dentes se tornam tão desgastados que não funcionam de forma efetiva ou têm uma aparência muito prejudicada séria antes de serem perdidos por outras causas. A distinção entre desgaste dentário aceitável e patológico em uma determinada idade baseia-se na predição de se o dente sobreviverá à taxa de desgaste" (Smith and Knight, 1984) - fornece assistência nessa diferenciação (SCHLUETER; JAEGGI; LUSSI, 2012).

A erosão dentária é a perda de substância dentária induzida pelo impacto direto de ácidos exógenos ou endógenos, sem envolvimento de microorganismos. Isso resulta em uma perda de tecido duro dentário, que pode ser grave em alguns grupos, como aqueles com distúrbios alimentares, em pacientes com refluxo gastroesofágico, e também em pessoas que consomem grandes quantidades de bebidas e alimentos ácidos. Para estas pessoas, a erosão pode prejudicar o seu bem-estar, devido a alterações na aparência e / ou perda de função dos dentes, por exemplo, a ocorrência de hipersensibilidade dos dentes se a dentina estiver exposta. Se a erosão atingir um estágio avançado, podem ser necessárias terapias que consomem dinheiro e tempo. A terapia, por sua vez, representa um desafio para o dentista, particularmente se os defeitos são diagnosticados em estágio avançado. Embora os defeitos iniciais e moderados possam ser tratados principalmente de forma minimamente invasiva, os defeitos severos geralmente requerem estratégias terapêuticas complexas, que muitas vezes implicam em perda extensiva de tecido duro dentário devido a medidas preparatórias. Um objetivo principal deve ser, portanto, diagnosticar a erosão dentária em um estágio inicial, para evitar deficiências funcionais e estéticas, bem como sensações de dor e garantir a longevidade da dentição (SCHLUETER; JAEGGI; LUSSI, 2012).

Com o declínio da prevalência da cárie, uma atenção considerável tem sido focada na erosão dentária, que é uma condição multifatorial, ocorrendo pela interação entre fatores químicos, biológicos e comportamentais. O que é crucial e ajuda a explicar por que alguns indivíduos apresentam mais erosão do que outros. Também é importante diferenciar erosão dentária de desgaste dentário erosivo. A erosão dentária é caracterizada por uma desmineralização parcial inicial (amolecimento) e qualquer perda de superfície dentária causada apenas pela ação de ácidos não bacterianos, enquanto o desgaste dentário erosivo inclui os efeitos das forças mecânicas abrasivas (SHELLIS et al., 2011). Dados de prevalência de desgaste dentário erosivo são mais difíceis de serem encontrados, especialmente a nível nacional ou global, sem contar o fato de que os distintos sistemas de registro dificultam a comparação entre os diferentes estudos. Os poucos dados disponíveis revelam um aumento de prevalência, variando de 1 a 79% em dentes decíduos de crianças de 2 a 5 anos, 14% nos dentes permanentes de crianças de 5 a 9 anos, de 7 a 100% em adolescentes de 9 a 20 anos e de 4 a 100% em adultos (18 a 88 anos) (JAEGGI AND LUSSI, 2014). Uma revisão sistemática recente estimou a prevalência de desgaste dentário erosivo em dentes permanente de crianças e adolescentes em 30,4% (SALAS et al., 2015). Deve ser considerado que o desgaste dentário erosivo é progressivo e, se não forem instauradas medidas preventivas apropriadas em tempo, a prevalência tende a aumentar com a idade (JAEGGI AND LUSSI, 2014). Há alguma evidência de que a presença de erosão dental está crescendo de forma constante. No Reino Unido, a prevalência de erosão mostrou-se aumentada a partir do momento da pesquisa de saúde bucal infantil no ano de 1993, em comparação com 1996/1997. (WANG; LUSSI, 2012). Sendo a prevalência de desgaste dentário erosivo elevada e suas sequelas indesejáveis, a prevenção é altamente necessária (CARVALHO et al., 2015).

Existem dois tipos básicos de erosão, de acordo com o tipo de ácido que interage com a superfície dentária: erosão intrínseca e erosão extrínseca. Suas apresentações clínicas são bastante diferentes, o que é uma consideração diagnóstica importante. A erosão intrínseca resulta da expulsão do conteúdo do estômago para o esôfago, orofaringe e cavidade bucal. O pH do refluxo gástrico geralmente é inferior a 2, o que é consideravelmente menor do que o pH crítico do esmalte (~ 5,2) e da dentina radicular (~ 6,7). As duas principais causas de erosão

intrínseca são a bulimia e a doença do refluxo gastroesofágico (DRGE). As lesões erosivas com estas condições geralmente aparecem nas superfícies palatais dos dentes maxilares e nas superfícies oclusais dos dentes inferiores mandibulares. A erosão extrínseca é causada pelo consumo regular de alimentos e bebidas ácidas, ou seja, por ácidos exógenos. As lesões causadas por ácidos exógenos tendem a ocorrer nas superfícies vestibulares dos dentes anteriores e nas superfícies bucal e oclusal dos dentes posteriores. Muitos alimentos e bebidas têm baixo pH, incluindo refrigerantes, bebidas esportivas, frutas e sucos, vinagre, molhos para saladas e vinho branco. Quando se suspeita o desgaste de dente erosivo extrínseco, deve-se realizar uma análise formal da dieta para tentar identificar os agentes etiológicos primários. (AHMED; DONOVAN, 2015)

O “pH crítico” corresponde a um valor de pH no qual a solução é exatamente saturada em relação a um sólido específico, como por exemplo o esmalte. Isto depende tanto da solubilidade do sólido de interesse quanto das atividades dos constituintes minerais relevantes da solução (cálcio, fosfato, e fluoreto, numa menor extensão) (LUSSI AND CARVALHO, 2014). Na erosão existe subsaturação tanto em relação à hidroxiapatita quanto em relação à fluorapatita, ocasionando inicialmente um amolecimento da superfície dentária, seguido por dissolução contínua de camada por camada dos cristais do esmalte, culminando por levar a uma perda permanente de volume, com uma camada amolecida na superfície do tecido remanescente. Nos estágios mais avançados, a dentina pode ser exposta (LUSSI et al., 2011). Com a exposição dentinária, a progressão da lesão de erosão sofre uma mudança expressiva, em decorrência da composição do tecido dentinário.

Em resumo, a incidência do desgaste dentário erosivo parece estar aumentando a educação tanto dos pacientes quanto dos cuidadores de saúde bucal é imperativa. Assim, os primeiros sinais de erosão devem ser reconhecidos pelos prestadores de cuidados dentários, de modo a que possam ser iniciadas estratégias preventivas bem-sucedidas e a necessidade de cuidados reparadores extensivos e caros evitados (AHMED; DONOVAN, 2015; CARVALHO et al., 2015).

2.2 Saliva

Devido à etiologia multifatorial tanto da cárie quanto da erosão dentária, várias possibilidades preventivas e terapêuticas têm sido propostas para o controle destas lesões. Estas estratégias são, em primeira instância, focadas nos fatores biológicos (MAGALHÃES, WIEGAND et al., 2009; DAVIES AND BLINKHORN, 2013; RUGG-GUNN, 2013; LUSSI AND HELLWIG, 2014; CARVALHO, COLON et al., 2015).

A saliva é um dos mais importantes fatores biológicos envolvidos na cárie e na erosão, tendo um papel protetor devido às suas diferentes funções (BALZ, 1999, 2001; LUSSI; JAEGGI; ZERO, 2004; VAN NIEUW AMERONGEN; BOLSCHER; VEERMAN, 2004; HARA et al., 2006). Várias funções da saliva estão implicadas na manutenção da saúde bucal e na proteção dos nossos dentes: (i) a superfície do dente é protegida continuamente contra o desgaste por um filme de mucinas salivares e proteínas ricas em prolina (PRPs); (ii) as primeiras proteínas da película, PRPs e estaterina, promovem a remineralização do esmalte atraindo íons cálcio; (iii) a desmineralização é retardada pelas proteínas da película, em conjunto com íons de cálcio e fosfato na saliva e no fluido do biofilme; (iv) várias proteínas salivares impedem a aderência de microorganismos bucais à película adquirida e inibem seu crescimento; (v) o sistema tampão bicarbonato salivar é responsável pela neutralização rápida de ácidos. Em adição, a saliva tem importante ação antimicrobiana, devido à sua composição proteica. Várias proteínas contribuem para esta função, como mucinas, PRPs, imunoglobulinas, aglutinina, lactoferrina, cistatinas e lisozima, assim como peptídeos antimicrobianos catiônicos pequenos, defensinas, cathelicidina e histatinas, estando envolvidas na primeira linha de defesa na cavidade bucal. Estas últimas são potencialmente adequadas como modelos para o projeto de desenvolvimento de uma nova geração de antibióticos, uma vez que matam um amplo espectro de microorganismos, ao mesmo tempo em que não evocam resistência, em contraste com os antibióticos clássicos. (VAN NIEUW AMERONGEN; BOLSCHER; VEERMAN, 2004)

2.2.1 Composição salivar

A saliva é secretada por três pares de glândulas salivares principais (parótida, submandibular e sublingual), além de numerosas glândulas salivares menores. Este fluido é constituído por componentes inorgânicos e orgânicos. Entre os componentes inorgânicos, o bicarbonato está relacionado à capacidade de tamponamento da saliva, enquanto o cálcio e o fosfato permitem a manutenção da integridade do mineral dentário (BUZALAF; HANNAS; KATO, 2012).

Na composição orgânica, há uma série de proteínas e glicoproteínas na saliva humana que podem influenciar vários aspectos da saúde bucal. Muitas destas proteínas contêm níveis elevados (35-40%) de prolina e, portanto, são designadas proteínas ricas em prolina (PRPs), que compreendem quase 70% do teor total de proteína da saliva parotídea humana. Uma vez que a amilase compreende a maior parte do conteúdo protéico total da saliva parotídea, as outras proteínas (como lisozima, lactoferrina, peroxidase e IgA secretora) que receberam mais atenção nas tentativas de ligação entre a saliva e a saúde bucal são, de fato, componentes relativamente menores (DODDS et al., 2005).

A estaterina permite que a saliva mantenha seu estado de supersaturação em relação aos sais de cálcio e fosfato, contribuindo grandemente para a manutenção de uma dentição intacta, através da sua ligação e inibição da precipitação espontânea de fosfato de cálcio e crescimento de cristais, ao mesmo tempo em que proporciona possibilidades de heterogeneidades na colonização microbiana através dos seus padrões de ligação bacteriana específicos (GIBBONS et al., 1988; GIBBONS; HAY, 1989).

Histatinas intactas foram identificadas na película adquirida formada *in vivo* e, quando fosforiladas, são capazes de reduzir a desmineralização quando fosforiladas. Parece que a ligação de histatinas intactas à superfície do esmalte ocorre antes da sua degradação proteolítica e que a ligação ao mineral exerce um efeito protetor contra a degradação proteolítica enzimática adicional (SIQUEIRA et al., 2010).

As mucinas, principais componentes orgânicos da saliva da submandibular/sublingual, são glicoproteínas grandes. O alto grau de glicosilação e o potencial de hidratação impedem a dessecação, enquanto suas propriedades viscoelásticas proporcionam lubrificação. Elas também podem se unir a toxinas, aglutinar bactérias, interagir com células hospedeiras, e são componentes importantes da película adquirida (PA) e da matriz do biofilme bacteriano (AMERONGEN et al., 1987). As mucinas salivares têm contribuído, em larga medida, para o efeito protetor da película adquirida contra a erosão do esmalte (CHEAIB; LUSSI, 2011).

A saliva também contém metaloproteinases de matriz (MMPs) que foram recentemente implicadas na progressão da erosão dentinária (BUZALAF; HANNAS; KATO, 2012).

2.3 Película adquirida

Todas as superfícies sólidas expostas à cavidade oral são cobertas por uma camada proteinácea, denominada PA. Trata-se de um filme orgânico, livre de bactérias, que cobre os tecidos duros e moles bucais, composto por glicoproteínas e proteínas, incluindo várias enzimas, além de lipídeos (LENDENMANN et al., 2000; HANNIG et al., 2005; REICH et al., 2013).

A PA funciona como barreira de difusão ou membrana semipermeável, evitando o contato direto entre os ácidos e a superfície do dente e, assim, inibindo sua desmineralização (BUZALAF; HANNAS; KATO, 2012; VUKOSAVLJEVIC et al., 2014).

A formação da PA é um processo dinâmico, influenciado por vários fatores, como ciclo circadiano, composição da microbiota bucal, capacidade proteolítica do ambiente bucal e propriedades físico-químicas das superfícies dentárias, bem como localização na cavidade bucal (LENDENMANN; GROGAN; OPPENHEIM, 2000). Inicia-se apenas alguns segundos depois da exposição do esmalte à saliva, ocorrendo um rápido aumento na sua espessura, atingindo cerca de 10-20 nm nos primeiros minutos, a qual fica estável por cerca de 30 minutos (HANNIG, 1999). Inicialmente ocorre a aderência seletiva de proteínas precursoras, com alta afinidade pela hidroxiapatita, as quais interagem eletrostaticamente com a superfície do esmalte

(HAY, 1973). Dentre elas encontram-se as PRPs, estaterina e histatinas, conforme identificado por estudos *in vitro*, embora estudos *in situ* tenham confirmado a presença também de mucinas, amilase, cistatinas, lisozima e lactoferrina(SIQUEIRA; CUSTODIO; MCDONALD, 2012). Esta primeira camada de proteínas que se adere parece ser a que confere a maior proteção contra a desmineralização dentária, uma vez que se trata de uma camada bastante elétron densa. As camadas subsequentes têm um arranjo muito mais frouxo quando comparado àquele das películas basais (HANNIG, 1999). Foi relatado que não há diferença no potencial protetor contra a desmineralização de películas formadas depois de 3 minutos de exposição à saliva, quando comparadas com aquelas formadas 2 horas após(HANNIG et al., 2004).

No segundo estágio de formação da película, chamado estágio maturacional, ocorre um rápido aumento na sua espessura (100-1000 nm), o que, juntamente com a presença de estruturas globulares, sugere o envolvimento de agregados proteicos, mais do que proteínas individuais, no seu desenvolvimento (HANNIG AND BALZ, 2001). A espessura da película atinge um *plateau*, entre 30 e 90 minutos, ficando com uma espessura entre 100 e 1000 μm , dependendo da sua localização na cavidade bucal, sendo mais espessa na região vestibular quando comparada à lingual (HANNIG, 1999). A película ainda pode sofrer maturação intrínseca e extrínseca, o que pode afetar a sua solubilidade. A maturação intrínseca pode ser causada pela presença de transglutaminase, derivada de células epiteliais bucais, que pode fazer ligações cruzadas entre as PRPs básicas e a estaterina (YAO; LAMKIN, 2000; HANNIG et al., 2008), bem como pela presença de fosfatase alcalina. De fato, as ligações cruzadas enzimáticas e a desfosforilação parecem ser os eventos mais importantes para a maturação intrínseca da película, enquanto que a proteólise parece ser de menor importância(HANNIG et al., 2008). Já a proteólise salivar, que pode ocorrer antes (HELMERHORST et al., 2006) ou após a adsorção à hidroxiapatita (MCDONALD et al., 2011), desempenha um importante papel na maturação extrínseca da película, já que muitos dos seus componentes são fragmentos peptídicos (VITORINO, CALHEIROS-LOBO et al., 2007; SIQUEIRA AND OPPENHEIM, 2009). A formação e maturação da película também podem ser influenciadas por fatores extrínsecos, como produtos de clareamento dentário, dentifrícios abrasivos e ingestão de alimentos e bebidas ácidos (HARA; ZERO, 2010).

A capacidade da PA em proteger contra a erosão depende de suas propriedades físicas, como espessura e tempo de maturação (para revisão, ver (VUKOSAVLJEVIC et al., 2014). Uma PA mais espessa protege mais contra a erosão dentária (AMAECHI et al., 1999), embora em relação ao tempo de maturação não tem sido encontrada diferença na proteção contra a erosão entre PAs formadas por 3 minutos ou 2 horas (HANNIG et al., 2004), provavelmente devido ao grande potencial protetor da película basal, que é bastante elétron-densa (HANNIG et al., 2009).

O conhecimento da composição da película adquirida do esmalte sem dúvida ganhou corpo quando passaram a ser empregadas técnicas proteômicas para sua elucidação, ao invés das técnicas enzimáticas ou imunológicas, que eram empregadas anteriormente (SIQUEIRA; CUSTODIO; MCDONALD, 2012). Isto se deve à alta sensibilidade das técnicas proteômicas, e ao fato de que estas permitem que sejam identificadas muitas proteínas ao mesmo tempo. No entanto, o número de trabalhos existentes na literatura empregando esta ferramenta analítica ainda é pequeno, de forma que há muito a ser estudado.

A incorporação de proteínas salivares na película adquirida pode afetar sua habilidade em proteger contra a erosão. Pacientes com erosão têm a metade da quantidade de proteínas na película adquirida formada *in situ* quando comparados ao grupo controle, o que reforça a importância do papel protetor das proteínas presentes na película adquirida (CARPENTER et al., 2014). Entre estas proteínas encontra-se a mucina, que, quando aderida à superfície do esmalte, sozinha ou combinada com outras proteínas, inibe a desmineralização causada por ataque erosivo (CHEAIB; LUSSI, 2011). Além da mucina, as estaterinas e proteínas ricas em prolina (PRPs) são capazes de manter um estado de supersaturação em relação ao cálcio e ao fosfato na cavidade bucal, por inibir a precipitação deles em pH neutro e liberar estes íons após um ataque ácido e durante a desmineralização. Foi relatado recentemente que a concentração de cálcio na película adquirida em pacientes com erosão está reduzida em 50% e a concentração de estaterina (uma proteína ligadora do cálcio) está reduzida em 35% (CARPENTER et al., 2014). Em relação às proteínas presentes na dieta, a caseína parece ter propriedades ácido-protetoras (BARBOUR et al., 2008), especialmente quando combinada com a mucina (CHEAIB; LUSSI, 2011). Similarmente à caseína, a ovalbumina também pode reduzir a dissolução da hidroxiapatita por soluções ácidas *in vitro* (HEMINGWAY et al., 2008).

recente do nosso grupo de pesquisa, identificamos proteínas que restaram na película adquirida formada *in situ* sobre a dentina e *in vivo* sobre o esmalte após exposição a ácido cítrico ou ácido láctico, simulando processos erosivo ou carioso, respectivamente. Foram identificadas proteínas ácido resistentes, como as mucinas e a cistatina B (DELECRODE et al., 2015a, 2015b).

Assim, o reforço da película adquirida pela alteração da sua composição, através da “engenharia de película”, tem sido sugerido como uma medida promissora para prevenção da desmineralização dentária (VUKOSAVLJEVIC et al., 2014). Dentro deste conceito, a busca por proteínas ácido-resistentes na película, bem como por compostos que, uma vez incorporados à película possam aumentar o seu potencial ácido-resistente, reveste-se de extrema importância. Uma vez identificados, estas proteínas ou compostos protetores poderão ser incorporados a produtos odontológicos, como dentifrícios, enxaguatórios ou géis, visando a enriquecer a película com os mesmos e, conseqüentemente aumentar a sua capacidade ácido-resistente.

A cistatina B demonstrou ser de grande interesse (DELECRODE et al., 2015b) para incorporação em produtos odontológicos. Entretanto, a enzima proveniente de humanos tem um alto custo de produção. O grupo de pesquisa do Prof. Flávio Henrique da Silva, colaborador na presente proposta, clonou recentemente uma cistatina derivada da cana-de-açúcar (canacistatina 5, ou CaneCPI-5)(MIGUEL, 2014). Uma vez que o custo de produção desta proteína é relativamente baixo, sendo viável sua inserção em produtos odontológicos, é de grande interesse avaliar o seu potencial anti-erosivo, quando incorporada à película adquirida do esmalte, em comparação ao da cistatina B. Nosso grupo de pesquisa fez um primeiro estudo avaliando o efeito da modificação da película adquirida pela incorporação da CaneCPI-5 na proteção do esmalte contra a erosão inicial *in vitro*. Neste estudo foram utilizados 75 blocos de esmalte bovino (4X4 mm) divididos em 5 grupos, a saber: 1) água deionizada (controle), 2) solução contendo mucina 0,27% + caseína 0,5%, 3) solução contendo cistatina B recombinante humana 0,025 µg/µL, 4) solução contendo canacistatina 5 0,025 µg/µL, 5) solução contendo canacistatina 5 0,025 µg/µL aplicada antes da formação da película adquirida. Foi coletada saliva estimulada de 3 voluntários, que foi utilizada para formar película adquirida sobre os espécimes

durante 2 horas. Os espécimes (dos grupos 1-4) foram expostos às soluções proteicas sob agitação por 2 h a 30°C. Para o grupo 5, os espécimes foram expostos à solução de canacistatina 5 antes da formação da película. Todos os espécimes foram então incubados em ácido cítrico 0,65% (pH 3,4) por 1 min a 30°C. O tratamento foi feito 1 vez por dia durante 3 dias. Dureza superficial foi analisada no baseline e após o 1° e 3° dias, sendo calculada a porcentagem de alteração de dureza superficial (%SHC). No primeiro dia, o tratamento com a cistatina B (35,1±9,9%) e com a canacistatina 5 antes da formação da película (35,2±6,6%) reduziu significativamente a %SHC em comparação ao controle (46,9±6,7%). NO dia 3, todos os tratamentos com cistatinas (54,4±8,6, 55,5±10,7 e 53,1±9,3% para cistatina B, canacistatina 5 e canacistatina 5 aplicada antes da formação da película) reduziram significativamente a %SHC em comparação ao controle. Em adição, o tratamento com a canacistatina 5 antes da formação da película reduziu significativamente a %SHC em comparação à combinação mucina/caseína (64,4±9,4%). Convém ressaltar que as concentrações de cistatina B e de canacistatina 5 empregadas foram determinadas, pela disponibilidade de cistatina B no laboratório. Por ser este um reagente muito caro (R\$ 3000,00 o frasco com 50 µg), ao adquirirmos 50 µg da proteína a concentração máxima que conseguimos utilizar para tratar os 15 espécimes do grupo foi de 0,025 µg/µL. Assim, utilizamos a mesma concentração de canacistatina 5 no experimento, para que pudéssemos ter uma comparação fidedigna. Entretanto, é possível que concentrações maiores de canacistatina 5 tenham um melhor efeito preventivo, já que em um outro estudo realizado, as proteínas de interesse, incluindo a canacistatina 5 foram acopladas a pontas de nitrido de silicone de um microscópio de força atômica (AFM) através de um ligante de polietilenoglicol flexível, sendo feitas medições de força de interação com o esmalte bovino. A força medida para a canacistatina 5 foi de 0,933±0,108 nN, cerca de 6 vezes maior (sig.) em relação ao controle (0,177±0,031 nN). As forças obtidas para mucina e caseína não diferiram do controle. Também foram feitas imagens topográficas de amostras de esmalte recobertas com mucina 2,7 µg/µl, caseína 10 µg/µl e canacistatina 5 0,086 µg/µl, antes e após incubação com ácido cítrico (0,65%, pH 3,4 por 1 min). Apenas a canacistatina 5 protegeu o esmalte contra o dano induzido pelo ácido cítrico (SANTIAGO et al., 2017).

Estes resultados deixam claro o grande potencial da canacistatina 5 em prevenir a erosão dentária pela sua capacidade de interação com o esmalte dentário.

Trata-se ainda de uma proteína de baixo custo de produção, o que a torna ideal para inclusão em produtos odontológicos. Entretanto, antes que novos produtos sejam desenvolvidos são necessários mais estudos. No presente trabalho, propomo-nos a avaliar o efeito de diferentes concentrações de canacistatina 5, adicionadas a diferentes veículos (solução ou gel) para prevenção da erosão inicial do esmalte. É importante testar diferentes veículos de aplicação porque estudos prévios do nosso grupo mostraram um efeito melhor de géis contendo inibidores de metaloproteinases da matriz para prevenção da erosão dentinária (KATO et al., 2010) em relação a soluções contendo estes inibidores (MAGALHÃES et al., 2009). Estes dados são extremamente importantes para formarem a base para futuros estudos *in situ* e clínicos que darão respaldo à utilização de produtos à base de canacistatina 5 para prevenção da erosão dentária.

3 Proposição

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito de soluções ou géis contendo CaneCPI-5, em diferentes concentrações, na proteção contra a erosão inicial do esmalte *in vitro*. A fim de se atingir estes objetivos, o estudo foi conduzido em duas etapas:

A primeira etapa teve por objetivo avaliar *in vitro* o efeito de soluções contendo CaneCPI-5 em diferentes concentrações na proteção contra erosão inicial do esmalte.

A segunda etapa teve por objetivo avaliar *in vitro* o efeito de géis contendo CaneCPI-5 em diferentes concentrações na proteção contra erosão inicial do esmalte.

As hipóteses nulas consideradas foram:

- O tratamento com solução contendo diferentes concentrações de CaneCPI-5 não tem efeito na perda de dureza do esmalte bovino submetido à erosão inicial;
 - O tratamento com gel contendo diferentes concentrações de CaneCPI-5 não tem efeito na perda de dureza do esmalte bovino submetido à erosão inicial.
-
-

4 Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Aspectos Éticos

Este projeto foi submetido à aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da FOB-USP, CAAE: 59786416.9.0000.5417. Os voluntários participaram após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (anexo 1).

4.2 Expressão heteróloga da canacistatina 5

A produção da canacistatina 5 recombinante (denominada CaneCPI-5), foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Genética e Evolução da Universidade Federal de São Carlos. Para a expressão heteróloga, foi utilizada a cepa bacteriana *Escherichia coli* Rosetta (DE3), transformada com o plasmídeo pET28aCaneCPI-5, como descrito em Miguel, 2014. A proteína expressa foi purificada da fração solúvel de culturas bacterianas induzidas por IPTG (Isopropil-beta-D-Thiogalactosídeo), submetidas a centrifugação e sonicação. A purificação foi feita por cromatografia de afinidade, utilizando colunas contendo resina de níquel Ni-NTA Superflow (Qiagen), conforme descrito por (SOARES-COSTA et al., 2002; MIGUEL, 2014)

4.3 Obtenção dos blocos de esmalte bovino

Blocos de esmalte bovino (4 X 4 mm) foram preparados utilizando uma cortadeira de precisão (Buehler, EUA) e discos diamantados para corte e fixados em discos de resina acrílica. As superfícies vestibulares foram planificadas e polidas com lixas de granulação 320, 600 e 1200 (Extec, EUA) para alocação aos grupos de estudo de acordo com a microdureza superficial e randomização (n=150 blocos). Para as soluções foram constituídos 5 grupos, sendo um grupo controle, constituído por água deionizada e 4 grupos experimentais, constituídos por solução ou gel contendo:

Mucina 0,27% + Caseína 0,5% (CHEAIB; LUSSE, 2011), CaneCPI-5 0,025 µg/µL, CaneCPI-5 0,1 µg/µL e CaneCPI-5 1,0 µg/µL. Para os géis os 5 grupos constituídos foram: gel placebo (controle) e grupos experimentais contendo Mucina 0,27% + Caseína 0,5% (CHEAIB; LUSSE, 2011), CaneCPI-5 0,1 µg/µL, CaneCPI-5 1,0 µg/µL e CaneCPI-5 2,0 µg/µL. Estas concentrações de CaneCPI-5, bem como o cálculo amostral, foram definidos tomando como base nossos estudos prévios (SANTIAGO et al., 2017). Foi calculado um n=8, para encontrar diferença significativa entre o grupo controle e o tratado com solução contendo CaneCPI-5 0,025 µg/µL, considerando-se uma força de 80 % e um α de 5%. Por segurança, incluímos 15 espécimes em cada grupo, totalizando 150 espécimes ao todo para as soluções e os géis. As soluções de CaneCPI-5 e mistura de mucina e caseína foram preparadas em água deionizada. O gel tem a composição padrão utilizada em outros experimentos realizados pelo nosso grupo de pesquisa(KATO et al., 2010; ZARELLA et al., 2015), a não ser pelas proteínas acrescentadas nas concentrações específicas. O gel placebo não foi acrescido de nenhuma proteína.

4.4 Coleta de saliva total

Saliva total foi coletada de 3 voluntários saudáveis, na faixa etária de 24 a 32 anos, de gênero masculino, que após leitura e explicação minuciosa, a partir da carta de informações aos sujeitos de pesquisa, assinaram um termo de consentimento livre e Esclarecido (anexo 1), concordando em participar do estudo. Os critérios de exclusão adotados foram: Fumar, apresentar lesões de cárie ativa no estágio de cavitação, apresentar desgaste dentário acentuado, ter utilizado no últimos 2 meses ou estar utilizando medicamentos que afetassem o fluxo salivar, fluxo salivar abaixo de 1 mL/min, ter sofrido irradiação, praticar atividades aquáticas (cloro presente nas piscinas levam o individuo a ter contato com ambientes de baixo pH) ou trabalhar em ambientes poluídos por compostos de baixo pH (indústrias), apresentar doenças sistêmicas, tais como as autoimunes, xerostomia, diabetes tipo 1, má nutrição, problemas gastroesofágicos e distúrbios de regurgitação e vômito (TENOVUO; LAGERLOF, 1994). A coleta ocorreu entre 9 e 11 h da manhã, sob estímulo mastigatório utilizando Parafilm. As amostras foram centrifugadas a 3000 g por 20 min a 4°C. Os sobrenadantes foram coletados para constituir um *pool* de saliva.

4.5 Incubação dos blocos em saliva e ácido cítrico

Os espécimes foram expostos às soluções proteicas, sob agitação a 30°C por 2 h (CHEAIB; LUSSI, 2011). Nos grupos destinados à aplicação dos géis, os mesmos foram aplicados com *microbrush* e deixados em contato com os espécimes por 1 minuto (KATO et al., 2010), sendo após este período, removido o excesso com um cotonete. Os espécimes foram então incubados em saliva (2 h a 30°C sob agitação) para formação da película adquirida (CHEAIB; LUSSI, 2011). Em seguida, foram lavados em água deionizada e expostos em solução de ácido cítrico 0,65% (pH = 3,4) por 1 min a 30°C sob agitação constante. Foram então lavados cuidadosamente com água deionizada e secos por 5 s com ar. Cada espécime foi tratado uma vez ao dia durante 3 dias (FIGURA 1). Entre os tratamentos, os espécimes foram mantidos a 4°C (CHEAIB; LUSSI, 2011).

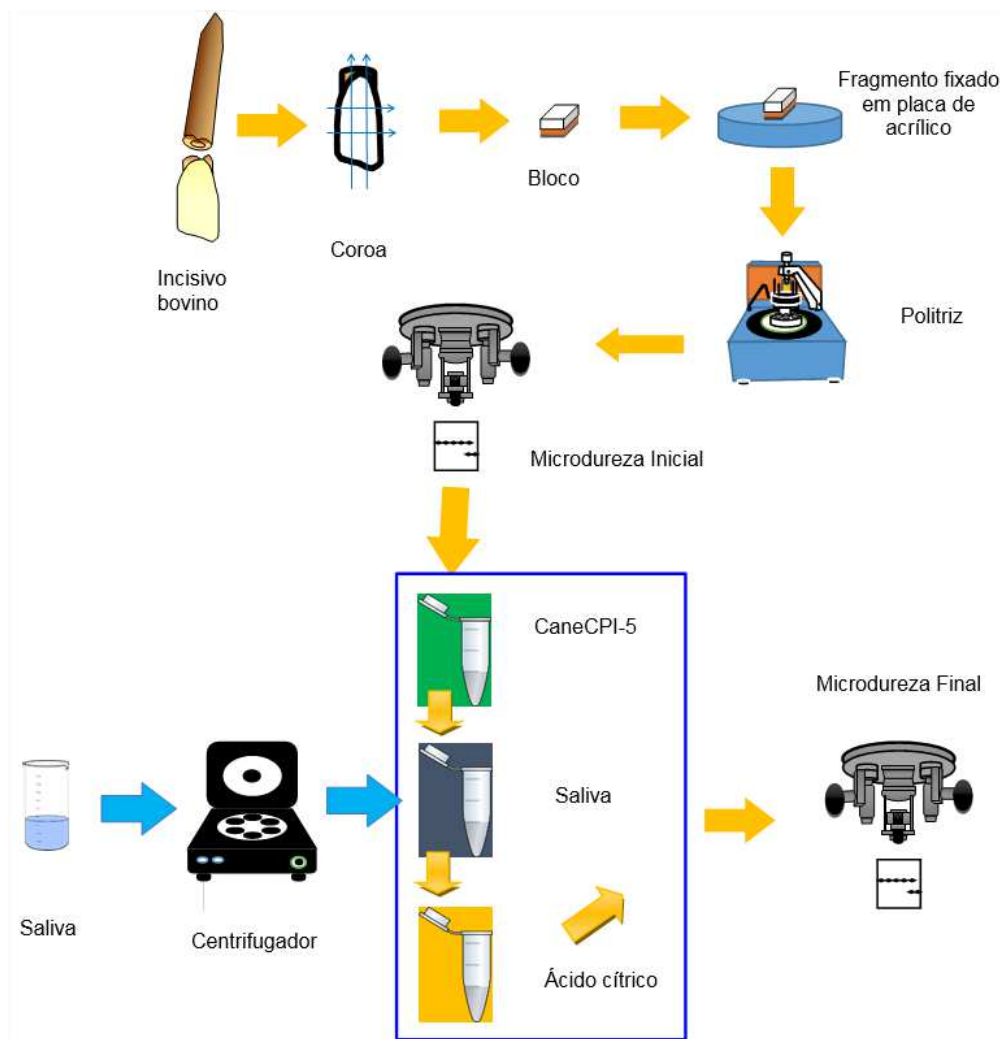


Figura - 1 Fluxograma da etapa in vitro

4.6 Microdureza de superfície

As análises de microdureza de superfície (SMH) foram feitas usando um penetrador Knoop, com uma carga de 50 g por 15 s no baseline e após o primeiro e o terceiro dia de tratamento. Foram feitas 5 indentações na região central de cada bloco a intervalos de 50 µm. Indentações controle de 2 e 5 g foram feitas para se detectar possível perda de superfície (CHEAIB; LUSSE, 2011). As alterações na SMH ($SMH_{baseline} - SMH_{pós-erosão}$) foram calculadas após o primeiro e terceiro dia e se constituíram numa medida de amolecimento do esmalte (Figuras 1).

4.7 Análise estatística

Os dados foram analisados utilizando-se o *software* GraphPad InStat e GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA), separadamente para os espécimes tratados com soluções e com géis. Para as soluções e os géis os dados passaram no teste de normalidade (teste de Kolmogorov-Smirnov), mas não no de homogeneidade (teste de Bartlett). Foram então analisados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn para comparações individuais. O nível de significância foi de 5%.

5 Resultados

5 RESULTADOS

5.1 CaneCPI-5 em solução (microdureza superficial)

A perda de microdureza do esmalte aumentou do primeiro para o terceiro ciclo de tratamento para todos os grupos (Figuras 2 e 3; Anexos 2).

Para ambos os períodos avaliados (1 e 3 dias), apenas os tratamentos com CaneCPI-5 a 0,1 e 1,0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ reduziram significativamente a perda de dureza superficial em relação ao controle (Figuras 2 e 3). Entretanto, estes tratamentos não diferiram significativamente entre si, o que indica que a CaneCPI-5 a 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ é provavelmente a melhor concentração a ser incorporada em uma solução, visando à prevenção da erosão dentária. Em adição, deve-se destacar que no primeiro dia de tratamento, os grupos tratados com CaneCPI-5 a 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ praticamente não apresentaram perda alguma de dureza superficial (Figura 2).

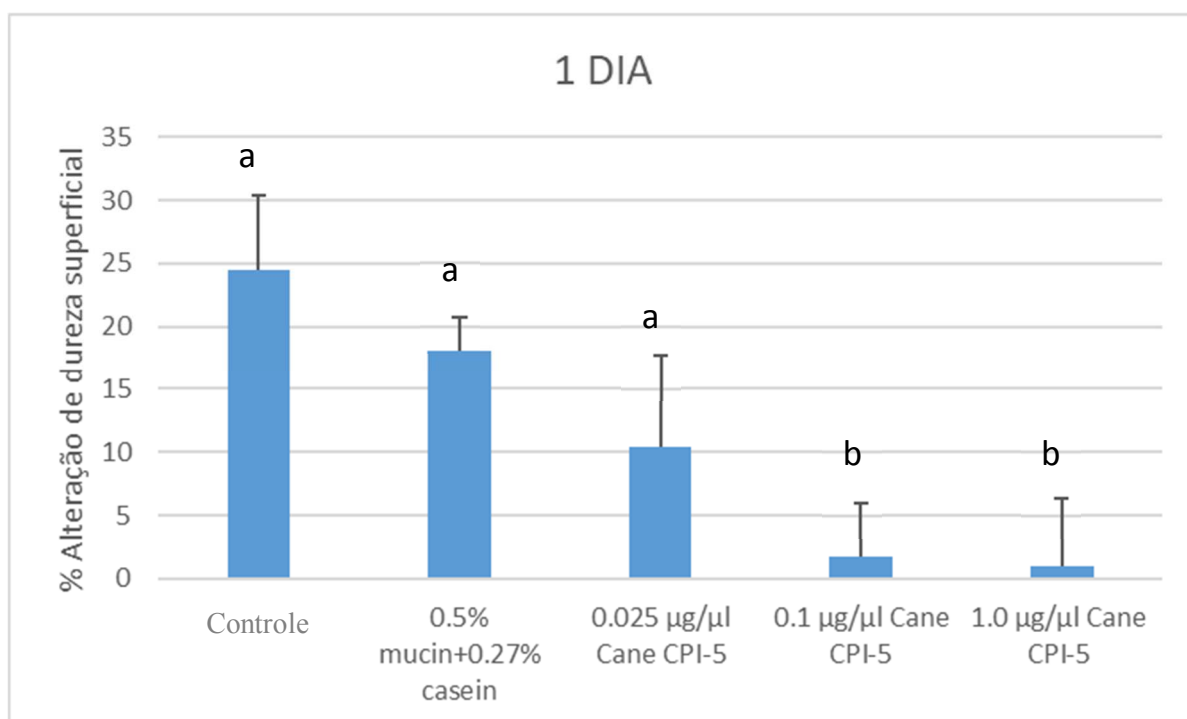


Figura 2 – Porcentagem média de perda de dureza superficial do esmalte após 1 dia. Os espécimes de esmalte bovino foram tratados com as soluções proteicas por 2 h e então incubados em saliva humana por 2 h, seguido por desafio com ácido cítrico 0,65% por 1 min. As barras indicam desvio-padrão (n=15). Letras distintas indicam diferença significativa entre os grupos (testes de Kruskal-Wallis e de Dunn, $p < 0,05$).

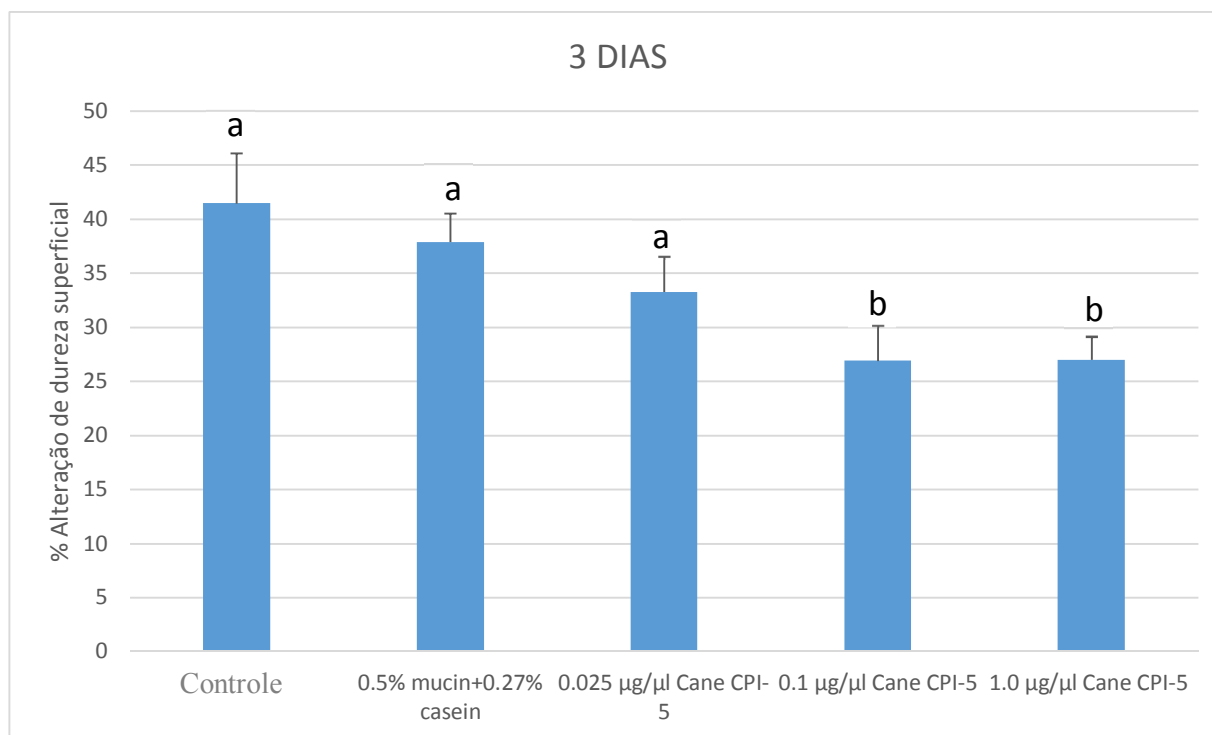


Figura 3 – Porcentagem média de perda de dureza superficial do esmalte após 3 dias. Os espécimes de esmalte bovino foram tratados com as soluções proteicas por 2 h e então incubados em saliva humana por 2 h, seguido por desafio com ácido cítrico 0,65% por 1 min. O tratamento foi feito uma vez ao dia por 3 dias. As barras indicam desvio-padrão (n=15). Letras distintas indicam diferença significativa entre os grupos (testes de Kruskal-Wallis e de Dunn, $p < 0,05$).

5.2 CaneCPI-5 em gel (microdureza superficial)

A perda de microdureza do esmalte aumentou do primeiro para o terceiro ciclo de tratamento para todos os grupos (Figuras 4 e 5; Anexos 3).

No primeiro dia de tratamento, apenas os géis contendo CaneCPI-5 a 0,1 e 1,0 µg/ml reduziram significativamente a perda de dureza superficial do esmalte em relação ao controle (Fig. 4; $p < 0,05$). Os géis contendo proteínas não diferiram estatisticamente entre si ($p > 0,05$). Entretanto, após 3 dias de tratamento, não houve diferenças significativas entre os grupos (Fig. 5; $p > 0,05$).

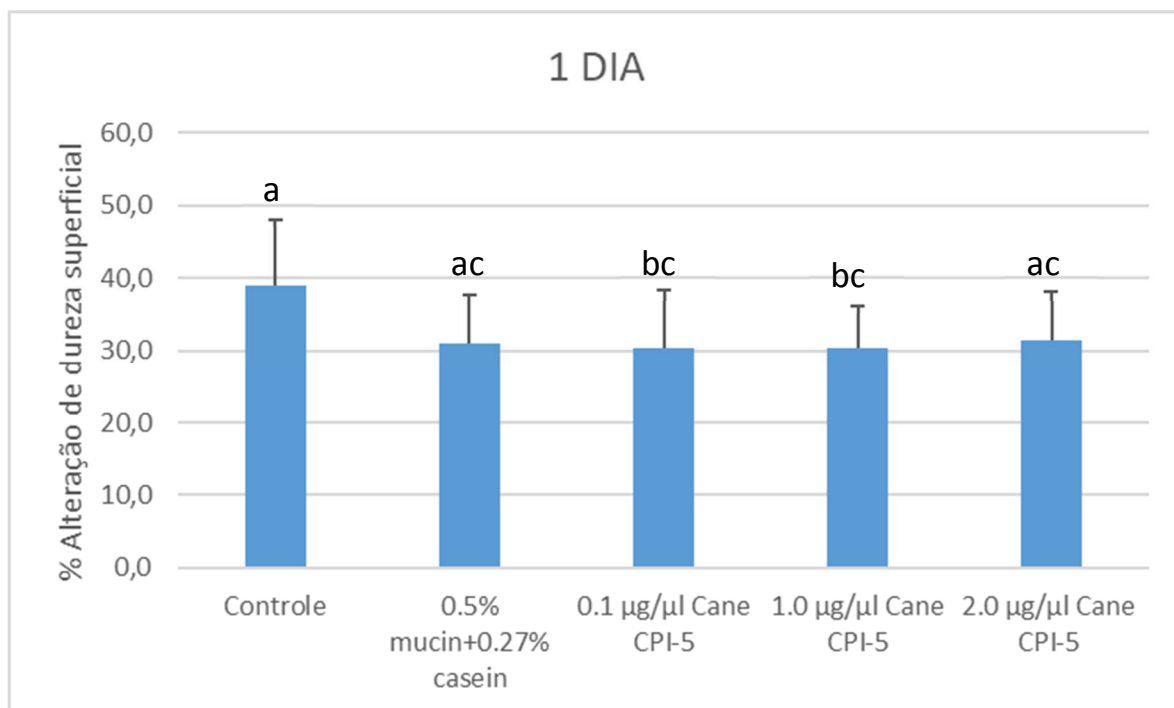


Figura 4 – Porcentagem média de perda de dureza superficial do esmalte após 1 dia. Os espécimes de esmalte bovino foram tratados com os géis contendo as proteínas por 1 min e então incubados em saliva humana por 2 h, seguido por desafio com ácido cítrico 0,65% por 1 min. As barras indicam desvio-padrão (n=15). Letras distintas indicam diferença significativa entre os grupos (testes de Kruskal-Wallis e de Dunn, $p < 0,05$).

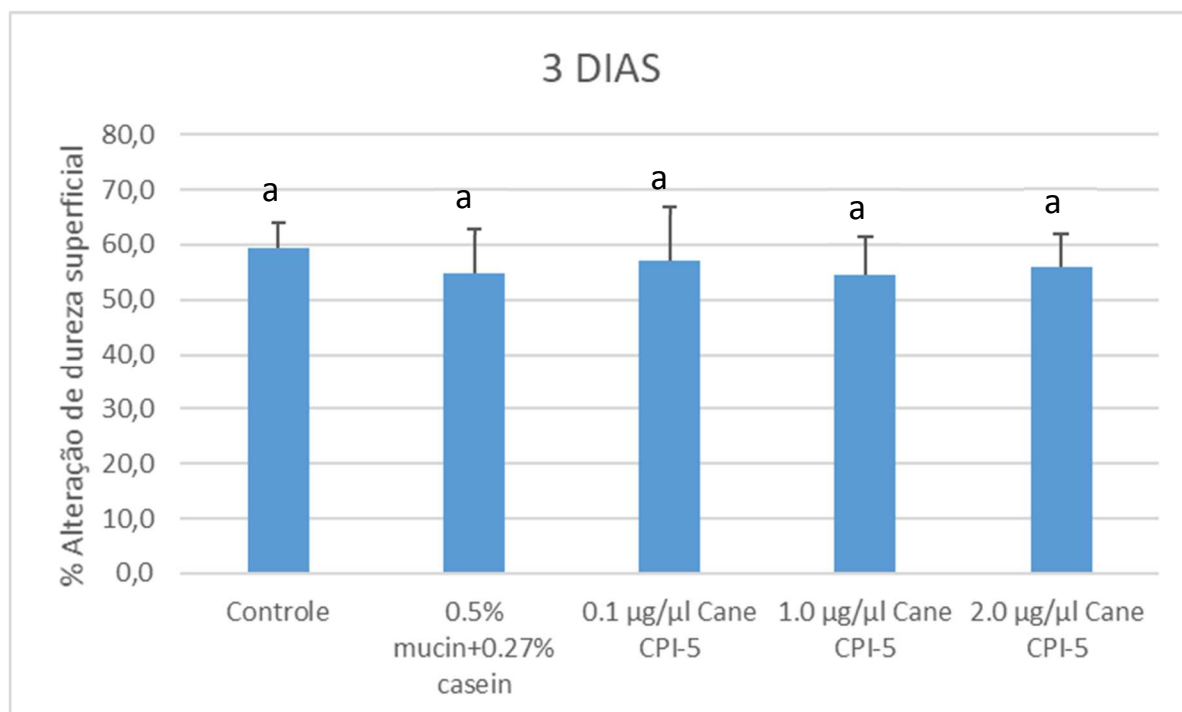


Figura 5 – Porcentagem média de perda de dureza superficial do esmalte após 3 dias. Os espécimes de esmalte bovino foram tratados com os géis contendo as proteínas por 1 min e então incubados em saliva humana por 2 h, seguido por desafio com ácido cítrico 0,65% por 1 min. O tratamento foi feito uma vez ao dia por 3 dias. As barras indicam desvio-padrão (n=15). Letras distintas indicam diferença significativa entre os grupos (testes de Kruskal-Wallis e de Dunn, $p < 0,05$).

6 Discussão

6 DISCUSSÃO

Este estudo *in vitro* teve como objetivo elucidar o efeito protetor da CaneCPI-5, aplicada no esmalte antes da formação da PAE, contra a desmineralização erosiva inicial, em dois tipos de veículos (solução ou gel) durante 3 dias. A razão para estudar a CaneCPI-5 originou-se de um trabalho prévio que revelou que a cistatina B humana é bastante resistente à remoção da película adquirida por tratamento com ácido cítrico, sendo uma proteína com importante potencial ácido-resistente e passível de incorporação a produtos odontológicos visando à prevenção da desmineralização (DELECRODE et al., 2015b). Entretanto, o custo da cistatina B recombinante humana é proibitivo quando se pensa na sua adição em produtos odontológicos. Nesse sentido, optou-se, no presente estudo, por testar a CaneCPI-5, derivada da cana de açúcar (SANTIAGO et al., 2017), que possui um custo de produção bastante convidativo.

Em experimentos iniciais, a CaneCPI-5 mostrou um alta força de ligação ao esmalte por MFA e também foi capaz de proteger contra a erosão inicial *in vitro*, principalmente quando aplicada antes da formação da película adquirida, utilizando um protocolo de desafio erosivo inicial semelhante ao utilizado no presente estudo (SANTIAGO et al., 2017). Este protocolo envolve desafios diários curtos (1 min) com ácido cítrico 0,65% (pH 3,5), o que é capaz de provocar um amolecimento do esmalte, o qual pode ser avaliado pela medição da alteração de microdureza superficial, uma vez que neste estágio inicial não se espera que haja perda em altura do esmalte (CHEAIB; LUSSI, 2011).

No primeiro experimento, foram avaliadas diferentes concentrações de CaneCPI-5 (0,025 a 10 µg/µL) em solução. A menor concentração foi escolhida baseada num experimento anterior (SANTIAGO et al., 2017), que na verdade levou em conta a disponibilidade de cistatina B recombinante humana para a realização do experimento, já que um frasco com 50 µg desta proteína custa cerca de R\$ 3000,00. No nosso primeiro experimento, o objetivo principal determinar ver se concentrações maiores de CaneCPI-5 aumentariam o potencial protetor desta proteína contra desafios erosivos iniciais, já que no experimento realizado por Santiago et al. (2017),

após 3 dias de desafios erosivos a % de redução na dureza de superfície foi de apenas 15%. Neste experimento, o grau de proteção no primeiro dia foi elevado e os grupos tratados com CaneCPI-5 a 0,1 e 1,0 µg/µL praticamente não tiveram alteração na dureza superficial. No dia 3, entretanto, esses grupos tiveram %SHC cerca de 13% mais baixa que o grupo controle, indicando que a melhor proteção ocorre quando a CaneCPI-5 se liga diretamente ao esmalte. Em adição, nossos resultados indicam que a melhor proteção ocorre com solução contendo caneCPI-5 a 0,1 µg/µL, já concentrações maiores não levaram a um efeito melhor.

Já no segundo experimento, nosso principal objetivo foi testar o efeito protetor da CaneCPI-5 adicionada a um outro veículo, um gel de aplicação tópica. A razão para se testar este veículo está relacionada ao fato de o gel, uma vez aplicado, ficar em contato direto com a superfície dentária enquanto não for removido mecanicamente. Em estudos prévios do nosso grupo envolvendo erosão dentinária, a utilização de géis contendo inibidores de proteases (KATO et al., 2010) apresentou um efeito melhor que soluções contendo os mesmos inibidores (MAGALHÃES et al., 2009), o que foi atribuído a um contato mais íntimo dos géis com as superfícies dentárias. Entretanto, no presente estudo a utilização da CaneCPI-5 aplicada em géis não teve um bom efeito, provavelmente por causa do curto tempo de contato do gel com a superfície do esmalte (1 min), já que as soluções, no primeiro experimento, foram deixadas em contato com o esmalte por 2 h. Outra razão para a falta de efeito protetor com os géis pode ser por conta da dificuldade de acesso da CaneCPI-5 ao esmalte, devido à presença da matriz do gel. Entretanto, antes que se abandone a idéia de utilizar géis contendo CaneCPI-5 para proteção do esmalte contra a erosão seria interessante avaliar tempos de aplicação tópica maiores (4 min), já que para a utilização de fluoretos na prevenção da cárie, um tempo de aplicação de 4 min fornece resultados melhores que a aplicação por 1 min apenas (WEYANT et al., 2013).

É importante reconhecer as limitações deste estudo de erosão inicial feito *in vitro*. Apesar de o protocolo ser considerado apropriado para investigações iniciais (CHEAIB; LUSSI, 2011), ele não simula adequadamente a condição clínica. A principal limitação, no caso das soluções, foi, sem dúvida o tempo de tratamento com as soluções proteicas (2 h). Na condição *in vivo*, os bochechos com soluções são realizados geralmente por 1 min apenas. Desta maneira, estudos adicionais deveriam ser conduzidos utilizando tempos de aplicação mais próximos da condição clínica (1

min para soluções e 4 min para géis). Em adição, o modelo utilizado é estático, já que a mesma saliva permaneceu em contato com os espécimes por 2 h para formar a PAE. Na condição clínica, a saliva é continuamente secretada, o que certamente pode afetar o padrão de adsorção de proteínas e o grau de proteção. Assim, experimentos futuros deveriam avaliar a utilização de soluções e géis contendo CaneCPI-5 utilizando tempos próximos daqueles empregados na condição clínica, e utilizando um protocolo *in situ*, que é mais próximo da condição clínica. Em adição, seria interessante incluir como controle positivo agentes mais estabelecidos para a prevenção da erosão, como soluções contendo estanho e fluoreto (HUYSMANS et al., 2014).

7 Conclusões

7 CONCLUSÕES

Baseado nas hipóteses nulas consideradas e diante dos resultados obtidos, pode-se concluir:

- O tratamento com soluções contendo 0,1 e 1,0 µg/µL de CaneCPI-5 reduziu significativamente a perda de dureza de esmalte bovino submetido a erosão inicial de esmalte em relação à solução placebo, não havendo diferença significativa entre estas duas concentrações.
 - O tratamento com géis contendo 0,1 e 1,0 µg/µL de CaneCPI-5 reduziu significativamente a perda de dureza de esmalte bovino submetido a erosão inicial de esmalte em relação à solução placebo, não havendo diferença significativa entre estas duas concentrações no primeiro dia de tratamento. Após 3 dias, entretanto o efeito protetor foi perdido.
-
-

Referências

REFERÊNCIAS

AHMED, S. N.; DONOVAN, T. E. Dental Erosion: The Unrecognized Epidemic. **Journal of Esthetic and Restorative Dentistry**, v. 27, n. 3, p. 119–121, 2015.

AMAECHEI, B. T.; HIGHAM, S. M.; EDGAR, W. M.; MILOSEVIC, A. Thickness of acquired salivary pellicle as a determinant of the sites of dental erosion. **Journal of Dental Research**, v. 78, n. 12, p. 1821–1828, 1999.

AMERONGEN, A. V. N.; ODERKERK, C. H.; DRIESSEN, A. A. Role of Mucins from Human Whole Saliva in the Protection of Tooth Enamel against Demineralization *Invitro*. **Caries Research**, v. 21, n. 4, p. 297-309, 1987.

BARBOUR, M. E.; LUSSI, A. Erosion in relation to nutrition and the environment. **Monogr Oral Sci**, v. 25, p. 143-54, 2014.

BARBOUR, M. E.; SHELLIS, R. P.; PARKER, D. M.; ALLEN, G. C.; ADDY, M. Inhibition of hydroxyapatite dissolution by whole casein: The effects of pH, protein concentration, calcium, and ionic strength. **European Journal of Oral Sciences**, v. 116, n. 5, p. 473–478, 2008.

BUZALAF, M. a; HANNAS, a R.; KATO, M. T. Saliva and dental erosion. **J Appl Oral Sci**, v. 20, n. 5, p. 493–502, 2012.

CARPENTER, G.; COTRONEO, E.; MOAZZEZ, R.; ROJAS-SERRANO, M.; DONALDSON, N.; AUSTIN, R.; ZAIDEL, L.; BARTLETT, D.; PROCTOR, G. Composition of enamel pellicle from dental erosion patients. **Caries Research**, v. 48, n. 5, p. 361–367, 2014.

CARVALHO, T. S.; COLON, P.; GANSS, C.; HUYSMANS, M. C.; LUSSI, A.; SCHLUETER, N.; SCHMALZ, G.; SHELLIS, R. P.; TVEIT, A. B.; WIEGAND, A. Consensus report of the European Federation of Conservative Dentistry: erosive tooth wear—diagnosis and management. **Clinical Oral Investigations**, v. 19, n. 7, p. 1557–1561, 2015.

CHEAIB, Z.; LUSSI, A. Impact of acquired enamel pellicle modification on initial dental erosion. **Caries Research**, v. 45, n. 2, p. 107–112, 2011.

DAVIES, R, M,; BLINKHORN, A.S. Preventing Dental Caries: Part 1 the scientific rationale for preventive advice. **Dent Update**, v. 40, n. 9, p. 814-820, 2013.

DAWES, C.; JENKINS, G. N.; TONGUE, C. H. The nomenclature of the integuments of the enamel surface of the teeth. **Brit Dent J**, v. 115, p. 65-68, 1963.

DELECRODE, T. R.; SIQUEIRA, W. L.; ZAIDAN, F. C.; BELLINI, M. R.; LEITE, A. L.; XIAO, Y.; RIOS, D.; MAGALHÃES, A. C.; BUZALAF, M. A. R. Exposure to acids changes the proteomic of acquired dentine pellicle. **Journal of Dentistry**, v. 43, n. 5, p. 583–588, 2015a.

DELECRODE, T. R.; SIQUEIRA, W. L.; ZAIDAN, F. C.; BELLINI, M. R.; MOFFA, E. B.; MUSSI, M. C. M.; XIAO, Y.; BUZALAF, M. A. R. Identification of acid-resistant proteins in acquired enamel pellicle. **Journal of Dentistry**, v. 43, n. 12, p. 1470–1475, 2015b.

DODDS, M. W. J.; JOHNSON, D. A.; YEH, C. K. Health benefits of saliva: A review. **Journal of Dentistry**, v. 33, n. 3 SPEC. ISS., p. 223–233, 2005.

GIBBONS, R. J.; HAY, D. I.; CISAR, J. O.; CLARK, W. B. Adsorbed salivary proline-rich protein 1 and statherin: Receptors for type 1 fimbriae of *Actinomyces viscosus* T14V-J1 on apatitic surfaces. **Infection and Immunity**, v. 56, n. 11, p. 2990–2993, 1988.

GIBBONS, R. J.; HAY, D. I.; CISAR, J. O.; CLARK, W. B. Adsorbed Salivary Acidic Proline-Rich Proteins Contribute to the Adhesion of *Streptococcus-Mutans* Jbp to Apatitic Surfaces. **Journal of Dental Research**, v. 68, n. 9, p. 1303-1307, 1989.

HANNIG, M.; BALZ, M. Influence of Pellicle on Enamel Erosion. **Caries Research** p. 372–379, 1999.

HANNIG, M. Ultrastructural investigation of pellicle morphogenesis at two different intraoral sites during a 24-h period. **Clinical oral investigations**, v. 3, n. 2, p. 88–95, 1999.

HANNIG, M.; BALZ, M. Protective properties of salivary pellicles from two different intraoral sites on enamel erosion. **Caries Research**, v. 35, n. 2, p. 142–148, 2001.

HANNIG, M.; FIEBIGER, M.; GÜNTZER, M.; DÖBERT, A.; ZIMEHL, R.; NEKRASHEVYCH, Y. Protective effect of the in situ formed short-term salivary pellicle. **Archives of Oral Biology**, v. 49, n. 11, p. 903–910, 2004.

HANNIG, C.; HANNIG, M.; ATTIN, T. Enzymes in the acquired enamel pellicle. **European Journal of Oral Sciences**, v. 113, n. 1, p. 2–13, 2005.

HANNIG, C.; SPITZMÜLLER, B.; MILLER, M.; HELLWIG, E.; HANNIG, M. Intrinsic enzymatic crosslinking and maturation of the in situ pellicle. **Archives of Oral Biology**, v. 53, n. 5, p. 416–422, 2008.

HANNIG, C.; BERNDT, D.; HOTH-HANNIG, W.; HANNIG, M. The effect of acidic beverages on the ultrastructure of the acquired pellicle-An in situ study. **Archives of Oral Biology**, v. 54, n. 6, p. 518–526, 2009.

HARA, A. T.; ANDO, M.; GONZÁLEZ-CABEZAS, C.; CURY, J. A.; SERRA, M. C.; ZERO, D. T. Protective effect of the dental pellicle against erosive challenges in situ. **Journal of Dental Research**, v. 85, n. 7, p. 612–616, 2006.

HARA, A. T.; ZERO, D. T. The caries environment: Saliva, pellicle, diet, and hard tissue ultrastructure. **Dental Clinics of North America**, v. 54, n. 3, p. 455–467, 2010.

HAY, D. I. The interaction of human parotid salivary proteins with hydroxyapatite. **Archives of Oral Biology**, v. 18, n. 12, 1973.

HELMERHORST, E. J.; ALAGL, A. S.; SIQUEIRA, W. L.; OPPENHEIM, F. G. Oral fluid proteolytic effects on histatin 5 structure and function. **Archives of Oral Biology**, v. 51, n. 12, p. 1061–1070, 2006.

HEMINGWAY, C. A.; SHELLIS, R. P.; PARKER, D. M.; ADDY, M.; BARBOUR, M. E. Inhibition of hydroxyapatite dissolution by ovalbumin as a function of pH, calcium concentration, protein concentration and acid type. **Caries Research**, v. 42, n. 5, p. 348–353, 2008.

HUYSMANS, M. C.; YOUNG, A.; GANSS, C.; The role of fluoride in erosion therapy. **Monogr Oral Sci**, v. 25, p. 230-243, 2014.

JAEGGI, T.;LUSSI, A. Prevalence, incidence and distribution of erosion. **Monogr Oral Sci**, v. 25, p. 55-73, 2014

KATO, M. T.; LEITE, A. L.; HANNAS, A. R.; BUZALAF, M. A. R. Gels containing MMP inhibitors prevent dental erosion in situ. **Journal of Dental Research**, v. 89, n. 5, p. 468–472, 2010.

LUSSI, A.; CARVALHO T.S. Erosive tooth wear: a multifactorial condition of growing concern and increasing knowledge. **Monogr Oral Sci**, v. 25: p. 1-15, 2014.

LUSSI, A.; HELLWIG, E. *Risk assessment and causal preventive measures*. **Monogr Oral Sci**, v. 25, p. 220-9, 2014.

LUSSI, A.; JAEGGI, T.; ZERO, D. The role of diet in the aetiology of dental erosion. **Caries Research**, v. 38, n. SUPPL. 1, p. 34–44, 2004.

LUSSI, A.; SCHLUETER, N.; RAKHMATULLINA, E.; GANSS, C. Dental erosion - An overview with emphasis on chemical and histopathological aspects. **Caries Research**, v. 45, n. SUPPL. 1, p. 2–12, 2011.

LENDENMANN, U.; GROGAN, J.; OPPENHEIM, F. G. Saliva and Dental Pellicle-A Review. **Advances in Dental Research**, v. 14, n. 1, p. 22–28, 2000.

MAGALHÃES, A. C.; WIEGAND, A.; RIOS, D.; HANNAS, A.; ATTIN, T.; BUZALAF, M. A. R. Chlorhexidine and green tea extract reduce dentin erosion and abrasion in situ. **Journal of Dentistry**, v. 37, n. 12, p. 994–998, 2009.

MCDONALD, E. E.; GOLDBERG, H. A.; TABBARA, N.; MENDES, F. M.; SIQUEIRA, W. L. Histatin 1 resists proteolytic degradation when adsorbed to hydroxyapatite. **Journal of Dental Research**, v. 90, n. 2, p. 268–272, 2011.

MIGUEL, M. C. Mariana Cardoso Miguel. 2014.

NICOLAU, J. Fundamentos de Odontologia. Fundamentos de Bioquímica Oral **Guanabara Koogan**, 2009.

REICH, M.; KÜMMERER, K.; AL-AHMAD, A.; HANNIG, C. Fatty acid profile of the initial oral biofilm (pellicle): An in-situ study. **Lipids**, v. 48, n. 9, p. 929–937, 2013.

RUGG-GUNN, A. Dental Caries: Strategies to control this preventable disease. **Acta Medica Academica**, v. 42, n. 2, p. 117–130, 2013.

SALAS, M. M. S.; NASCIMENTO, G. G.; HUYSMANS, M. C.; DEMARCO, F. F. Estimated prevalence of erosive tooth wear in permanent teeth of children and adolescents: An epidemiological systematic review and meta-regression analysis. **Journal of Dentistry**, v. 43, n. 1, p. 42–50, 2015.

SANTIAGO, A. C.; KHAN, Z. N.; MIGUEL, M. C.; GIRONDA, C. C.; SOARES-COSTA, A.; PELÁ, V. T.; LEITE, A. L.; EDWARDSON, J. M.; BUZALAF, M. A. R.; HENRIQUE-SILVA, F. A New Sugarcane Cystatin Strongly Binds to Dental Enamel and Reduces Erosion. **Journal of Dental Research**, v. 96, n. 9, p. 1051–1057, 2017.

SCHLUETER, N.; JAEGGI, T.; LUSSI, A. Is dental erosion really a problem? **Advances in dental research**, v. 24, n. 2, p. 68–71, 2012.

SHELLIS, R. P.; GANSS, C.; REN, Y.; ZERO, D. T.; LUSSI, A. Methodology and models in erosion research: Discussion and conclusions. **Caries Research**, v. 45, n. SUPPL. 1, p. 69–77, 2011.

SIQUEIRA, W. L.; OPPENHEIM, F. G. Small molecular weight proteins/peptides present in the in vivo formed human acquired enamel pellicle. **Archives of Oral Biology**, v. 54, n. 5, p. 437–444, 2009.

SIQUEIRA, W. L.; MARGOLIS, H. C.; HELMERHORST, E. J.; MENDES, F. M.; OPPENHEIM, F. G. Evidence of intact histatins in the in vivo acquired enamel pellicle. **Journal of Dental Research**, v. 89, n. 6, p. 626–630, 2010.

SIQUEIRA, W. L.; CUSTODIO, W.; MCDONALD, E. E. New insights into the composition and functions of the acquired enamel pellicle. **Journal of Dental Research**, v. 91, n. 12, p. 1110–1118, 2012.

SOARES-COSTA, A.; BELTRAMINI, L. M.; THIEMANN, O. H.; HENRIQUE-SILVA, F. A sugarcane cystatin: Recombinant expression, purification, and antifungal activity. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 296, n. 5, p. 1194–1199, 2002.

TENOVUO J., LAGERLÖF F. Saliva. In: Thylstrup A, Fejerskov O, **Clinical Cariology**, v. 2, p. 17-43, 1994.

VAN NIEUW AMERONGEN, A.; BOLSCHER, J. G. M.; VEERMAN, E. C. I. Salivary proteins: Protective and diagnostic value in cariology? **Caries Research**, v. 38, n. 3, p. 247–253, 2004.

VUKOSAVLJEVIC, D.; CUSTODIO, W.; BUZALAF, M. A. R.; HARA, A. T.; SIQUEIRA, W. L. Acquired pellicle as a modulator for dental erosion. **Archives of Oral Biology**, v. 59, n. 6, p. 631–638, 2014.

VITORINO, R.; CALHEIROS-LOBO, M. J.; WILLIAMS, J.; FERRER-CORREIA, A. J.; TOMER, K. B.; DUARTE, J. A.; DOMINGUES, P. M.; AMADO, F. M. L. *Peptidomic analysis of human acquired enamel pellicle*. **Biomed Chromatogr**, v. 21, n. 11, p. 1107-17, 2007

WANG, X.; LUSSI, A. Functional foods/ingredients on dental erosion. **European Journal of Nutrition**, v. 51, n. SUPPL.2, 2012.

WEYANT, R. I.; TRACY, S. L.; ANSELMO, T.; BELTRÁN-AGUILAR, E. D.; DONLY, K. J.; FRESE, W. A.; HUJOEL, P. P.; IAFOLLA, T.; KOHN, W.; KUMAR, J.; LEVY, S. M.; TINANOFF, N.; WRIGHT, J. T.; ZERO, D.; ARAVAMUDHAN, K.; FRANTSVE-

HAWLEY, J.; MEYER, D. M. Topical fluoride for caries prevention. **Journal of the American Dental Association**, v. 144, n. 11, p. 1279–1291, 2013.

Anexos

ANEXO 1 – TCLE



**Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru**

Departamento de Ciências Biológicas

Página 1 de 2

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Convido você estudante da Pós-Graduação desta Faculdade a participar doando saliva para este trabalho experimental intitulado "Potencial anti-erosivo de uma nova cistatina derivada da cana-de-açúcar". Você deverá comparecer ao laboratório de Bioquímica da Faculdade de Odontologia de Bauru – USP, no dia que será decidido pelo pesquisador que entrará em contato com você um dia antes da coleta da saliva. Além disso, o pesquisador estará disponível a qualquer momento para sanar possíveis dúvidas.

O objetivo deste trabalho será avaliar o efeito da modificação da película adquirida do esmalte, pela incorporação de canacistatina 5, na proteção contra a erosão inicial do esmalte *in vitro*.

Cada participante mastigará um Parafilm de 25 cm² (que é uma película plástica, sem cheiro, sem cor, resistente à água) com o objetivo de estimular a produção de saliva, para que então, seja realizada a coleta. Assim, 2 horas antes do procedimento, você não poderá fazer a ingestão de nenhum tipo de alimento e durante a coleta você cuspirá toda a saliva produzida na boca em um recipiente descartável que será distribuído pelo pesquisador. A saliva será coletada uma única vez, no dia a ser combinado entre 9:00 e 11:00 h da manhã. Toda a saliva coletada será utilizada no experimento.

Este projeto traz como benefício a importância de uma nova análise em favor a ciência, através da análise da película adquirida (camada de proteína proveniente da saliva) utilizando uma proteína que espera a proteção da erosão dentária, porém não há benefícios imediatos para os participantes da pesquisa. A participação será voluntária e entende-se que você poderá fazer qualquer pergunta sobre os procedimentos, sendo que será livre para desistir de participar a qualquer momento da pesquisa, sem nenhum prejuízo de sua parte. Em adição, você terá, também, por parte dos pesquisadores, a garantia do sigilo que assegura a sua privacidade e ainda receberá antes da pesquisa uma via, igualmente válida deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido assinado por ambas as partes (pesquisador e participante), no qual deixa claro seus direitos. Concordando em participar, você entende que este estudo será realizado em benefício das ciências médica e odontológica, e desta forma concorda com a divulgação dos dados obtidos por meio de publicações científicas.

A sua participação neste trabalho acarretará em risco mínimo, que acontecerá no caso de você ter alergia ao plástico utilizado para mastigação ou se você apresentar enjoos na hora da coleta, alguns participantes podem eventualmente apresentar. Nestes casos, você será acompanhado até um local apropriado e esperado até o enjoo passar, ou então, o pesquisador irá acompanhá-lo até um médico. E você será liberado da participação na pesquisa.

Importante ressaltar que não está sendo considerado nenhum pagamento ou recompensa material pela sua participação neste estudo. Em relação a incômodos, podemos afirmar que nada será acarretado, pois a sua participação será apenas na doação da sua saliva. Fica claro que você poderá, a qualquer momento, retirar seu CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO e deixar de participar do estudo a qualquer momento, e ciente que todo trabalho realizado torna-se informação confidencial guardada por força do sigilo profissional (Art. 9º do Código de Ética Odontológica).

Ainda, se caso houver qualquer tipo de despesas tidas pelos participantes da pesquisa e dela decorrentes, serão de responsabilidade do pesquisador os gastos provenientes e/ou o ressarcimento aos participantes. Por fim, Você terá garantido o direito a indenização compensatória caso fique comprovado que a sua participação acarretou algum problema a você.

A liberdade do consentimento deverá ser particularmente garantida para aqueles participantes de pesquisa que, embora plenamente capazes, estejam expostos a condicionamentos específicos, ou à influência de autoridade, caracterizando situações passíveis de limitação da autonomia, como estudantes, assegurando-lhes inteira liberdade de participar, ou não, da pesquisa, sem quaisquer represálias.

Qualquer dúvida ou maiores esclarecimentos o sujeito da pesquisa poderá recorrer a qualquer um dos membros da equipe do projeto (Laboratório de Bioquímica 14-3235-8247) ou o pesquisador responsável Carlos Condarco Gironda (telefone 14-991957131). Caso queira apresentar reclamações em relação a sua participação na pesquisa ou denúncias, poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, da FOB-USP, pelo endereço da Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 (sala no prédio da Pós Graduação FOB/USP) ou pelo telefone (14)3235-8356.

Rubrica do Participante da Pesquisa

Rubrica do Pesquisador Responsável

Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901 – C.P. 73
e-mail: danida@fob.usp.br – Fone (0xx14) 3235-8228 - Fax (0xx14) 3223-4679
<http://www.fob.usp.br>



**Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauri**

Departamento de Ciências Biológicas

Página 2 de 2

Pelo presente instrumento que atende as exigências legais, o Sr. (a) _____, portador da cédula de identidade _____, após leitura minuciosa das informações constantes neste TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO, devidamente explicada pelos profissionais em seus mínimos detalhes, ciente dos serviços e procedimentos aos quais será submetido, não restando quaisquer dúvidas a respeito do lido e explicado, DECLARA e FIRMA seu CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO concordando em participar da pesquisa proposta. Fica claro que o participante da pesquisa, pode a qualquer momento retirar seu CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO e deixar de participar desta pesquisa e ciente de que todas as informações prestadas tornar-se-ão confidenciais e guardadas por força de sigilo profissional (Art. 3º do Código de Ética Odontológica)

Por fim, como pesquisador(a) responsável pela pesquisa, DECLARO o cumprimento do disposto na Resolução CNS nº 466 de 2012, contidos nos itens IV.3 e IV.4, este último se pertinente, item IV.5.a e na íntegra com a resolução CNS nº 466 de dezembro de 2012.

Por estarmos de acordo com o presente termo o firmamos em duas vias igualmente válidas (uma via para o participante da pesquisa e outra para o pesquisador) que serão rubricadas em todas as suas páginas e assinadas ao seu término, conforme o disposto pela Resolução CNS nº 466 de 2012, itens IV.3.f e IV.5.d.

Bauri, SP, _____ de _____ de _____.

Assinatura do Participante da Pesquisa

Carlos Condamo Gironda
Responsável pela pesquisa

O Comitê de Ética em Pesquisa – CEP, organizado e criado pela FOB-USP, em 29/06/98 (Portaria GD/0888/FOB), previsto no item VII da Resolução CNS nº 466/12 do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde (publicada no DOU de 13/06/2013), é um Colegiado Interdisciplinar e Independente, de relevância pública, de caráter consultivo, deliberativo e educativo, criado para defender os interesses dos participantes da pesquisa em sua integridade e dignidade e para contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro de padrões éticos.

Qualquer denúncia e/ou reclamação sobre sua participação na pesquisa poderá ser reportada a este CEP:

Horário e local de funcionamento:

Comitê de Ética em Pesquisa

Faculdade de Odontologia de Bauri-USP - Prédio da Pós-Graduação (bloco E - pavimento superior), de segunda à sexta-feira, no horário das 14hs às 17 horas, em dias úteis.

Alameda Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75

Via Universitária – Bauri – SP – CEP 17012-901

Telefone/FAX: (14)3235-8356

e-mail: cep@fob.usp.br

ANEXO 2

CONTROLE (AGUA DEIONIZADA)

Blocos	SMH inicial	SMH dia 1	SMH dia 3	%PDS dia 1	%PDS dia 3
1	310,86	269,71	221,71	13,24	28,68
2	331,00	199,14	195,86	39,84	40,83
3	325,00	458,29	228,57	-41,01	29,67
4	333,29	296,86	225,00	10,93	32,49
5	341,00	293,00	194,71	14,08	42,90
6	331,71	202,43	211,71	38,98	36,18
7	322,14	295,71	234,86	8,20	27,10
8	327,29	305,86	215,29	6,55	34,22
9	318,29	293,86	149,71	7,68	52,96
10	311,86	152,71	220,57	51,03	29,27
11	315,00	261,43	41,86	17,01	86,71
12	323,71	98,57	189,29	69,55	41,53
13	313,86	246,71	176,86	21,39	43,65
14	319,00	293,57	224,14	7,97	29,74
15	311,57	316,29	207,71	-1,51	33,33
MEDIA	322,37	265,61	195,86	17,59	39,28
DP				25,44	14,97

MUCINA + CASEINA

Blocos	SMH inicial	SMH dia 1	SMH dia 3	%PDS dia 1	%PDS dia 3
1	320,43	212,71	201,43	33,62	37,14
2	311,57	224,86	202,43	27,83	35,03
3	335,86	223,14	185,29	33,56	44,83
4	352,00	296,00	192,14	15,91	45,41
5	300,86	247,00	172,71	17,90	42,59
6	322,43	273,00	204,71	15,33	36,51
7	318,43	258,00	164,86	18,98	48,23
8	300,86	296,14	164,43	1,57	45,35
9	339,00	219,43	171,71	35,27	49,35
10	311,57	246,00	176,86	21,05	43,24
11	342,57	258,43	219,14	24,56	36,03
12	301,14	283,86	259,86	5,74	13,71
13	303,57	274,43	116,86	9,60	61,51
14	315,00	236,29	216,14	24,99	31,38
15	316,00	287,29	192,57	9,09	39,06
MEDIA	319,35	255,77	188,55	18,67	40,87
DP				10,43	10,48

CaneCPI-5 0.02 µg/µL					
Blocos	SMH inicial	SMH dia 1	SMH dia 3	%PDS dia 1	%PDS dia 3
1	309,71	325,86	251,43	-5,21	18,82
2	337,29	81,00	148,86	75,98	55,87
3	319,43	256,29	102,29	19,77	67,98
4	311,14	305,29	173,29	1,88	44,31
5	310,71	342,57	209,57	-10,25	32,55
6	323,57	354,86	204,71	-9,67	36,73
7	317,71	276,43	198,57	12,99	37,50
8	342,43	253,00		26,12	100,00
9	310,86	323,29	221,71	-4,00	28,68
10	314,57	332,00	215,86	-5,54	31,38
11	352,43	347,71	190,00	1,34	46,09
12	331,57	365,00	81,14	-10,08	75,53
13	313,57	236,71	232,00	24,51	26,01
14	317,29	200,00	241,00	36,97	24,04
15	336,00	315,71	278,29	6,04	17,18
MEDIA	323,22	287,71	196,34	10,72	42,84
DP				23,41	23,19

CaneCPI-5 0.1 µg/µL					
Blocos	SMH inicial	SMH dia 1	SMH dia 3	%PDS dia 1	%PDS dia 3
1	307,14	325,86	153,71	-6,09	49,95
2	310,71	221,71	235,43	28,64	24,23
3	338,43	384,57	257,71	-13,63	23,85
4	303,00	280,29	282,57	7,50	6,74
5	321,57	328,71	239,29	-2,22	25,59
6	347,57	336,29	207,00	3,25	40,44
7	325,43	354,57	255,00	-8,96	21,64
8	357,14	232,43	251,43	34,92	29,60
9	356,29	314,57	257,14	11,71	27,83
10	332,71	401,57	168,43	-20,70	49,38
11	324,29	193,29	265,57	40,40	18,11
12	322,14	203,71	125,00	36,76	61,20
13	349,86	357,71	109,86	-2,25	68,60
14	342,14	326,00	283,14	4,72	17,24
15	317,29	367,43	198,43	-15,80	37,46
MEDIA	330,38	308,58	219,31	6,55	33,46
DP				19,99	17,39

CaneCPI-5 1,0 µg/µL					
Blocos	SMH inicial	SMH dia 1	SMH dia 3	%PDS dia 1	%PDS dia 3
1	319,00	215,00	249,00	32,60	21,94
2	307,00	305,57	223,86	0,47	27,08
3	323,29	370,14	207,43	-14,49	35,84
4	324,57	333,29	243,43	-2,68	25,00
5	319,29	360,14	147,14	-12,80	53,91
6	349,43	283,29	287,29	18,93	17,78
7	343,29	278,71	128,71	18,81	62,51
8	311,29	310,71	235,29	0,18	24,41
9	314,29	360,43	232,57	-14,68	26,00
10	311,57	304,43	238,43	2,29	23,48
11	346,43	319,29	234,14	7,84	32,41
12	314,71	354,00	177,57	-12,48	43,58
13	316,14	70,86	199,86	77,59	36,78
14	300,57	396,71	248,71	-31,99	17,25
15	322,71	238,57	229,86	26,07	28,77
MEDIA	321,57	300,08	218,89	6,38	31,78
DP				26,33	12,96

ANEXO 3

CONTROLE (GEL)

Blocos	SMH inicial	SMH dia 1	SMH dia 3	%PDS dia 1	%PDS dia 3
1	325,37	243,03	120,32	25,31	63,02
2	318,99	179,76	116,89	43,65	63,36
3	358,93	273,03	164,56	23,93	54,15
4	359,75	244,81	169,30	31,95	52,94
5	326,69	214,38	170,41		
6	359,34	221,87	131,35	38,25	63,45
7	374,25	212,35	179,33	43,26	52,08
8	372,16	258,23	167,04	30,61	55,12
9	333,59	220,84	134,58	33,80	59,66
10	316,63	193,44	132,58	38,91	58,13
11	331,10	153,44	120,14	53,66	63,71
12	375,20	193,25	114,45	48,49	69,50
13	319,93	160,94	140,43	49,69	56,10
14	314,89	179,16	123,08	43,10	60,91
15	362,55	214,59	152,81	40,81	57,85
MEDIA	343,29	210,87	142,48	38,96	59,28
DP				8,95	4,81

MUCINA + CASEINA

Blocos	SMH inicial	SMH dia 1	SMH dia 3	%PDS dia 1	%PDS dia 3
1	337,36	216,26	160,41	35,90	52,45
2	358,17	262,88	181,38	26,60	49,36
3	332,26	179,86	116,86		
4	331,03	274,48	161,27	17,08	51,28
5	349,91	222,72	168,47	36,35	51,85
6	349,29	263,16	194,87	24,66	44,21
7	358,25	252,49	157,23	29,52	56,11
8	359,30	244,84	115,38	31,86	67,89
9	361,66	252,76	157,75	30,11	56,38
10	359,05	254,78	136,67	29,04	61,94
11	364,34	275,31	164,58	24,44	54,83
12	334,37	199,63	107,62	40,30	67,81
13	360,24	239,45	143,84	33,53	60,07
14	329,08	194,49	201,28	40,90	38,83
15	330,22	205,71	162,78	37,70	50,71
MEDIA	348,37	235,92	155,00	30,93	54,71
DP				6,74	8,15

CaneCPI-5 2,0 µg/µL					
Blocos	SMH inicial	SMH dia 1	SMH dia 3	%PDS dia 1	%PDS dia 3
1	320,95	183,08	153,41	42,96	52,20
2	350,06	264,70	156,01	24,39	55,43
3	318,64	242,00	102,02	24,05	67,98
4	355,01	242,04	169,26	31,82	52,32
5	325,61	221,31	168,79	32,03	48,16
6	341,86	234,66	177,46	31,36	48,09
7	366,08	158,02	112,89		
8	359,27	269,80	159,41	24,90	55,63
9	344,23	272,28	130,32	20,90	62,14
10	362,81	258,03	180,49	28,88	50,25
11	364,40	233,11	162,90	36,03	55,30
12	368,54	221,86	156,68	39,80	57,49
13	346,97	218,64	150,99	36,99	56,48
14	333,44	237,85	116,16	28,67	65,16
15	318,60	199,81	135,26	37,29	57,54
MEDIA DP	345,10	230,48	148,80	31,43 6,57	56,01 5,92

CaneCPI-5 1,0 µg/µL					
Blocos	SMH inicial	SMH dia 1	SMH dia 3	%PDS dia 1	%PDS dia 3
1	344,76	264,94	182,13	23,15	47,17
2	341,50	237,20	160,89	30,54	52,89
3	356,86	228,15	160,57	36,07	55,00
4	315,98	217,03	160,84		
5	368,82	254,45	127,76	31,01	65,36
6	316,85	231,93	130,32	26,80	58,87
7	330,22	155,22	133,23		
8	343,09	250,73	130,31	26,92	62,02
9	343,84	247,13	207,11	28,12	39,77
10	362,04	234,75	139,60	35,16	61,44
11	351,80	226,80	156,03	35,53	55,65
12	340,26	243,49	162,59	28,44	52,22
13	325,80	236,12	173,10	27,53	46,87
14	358,51	203,17	167,64	43,33	53,24
15	309,96	239,89	133,91	22,61	56,80
MEDIA	340,69	231,40	155,07	30,40	54,41
DP				5,80	6,99

CaneCPI-5 0,1 µg/µL					
Blocos	SMH inicial	SMH dia 1	SMH dia 3	%PDS dia 1	%PDS dia 3
1	364,53	182,72	150,31	49,88	58,77
2	369,65	268,60	170,54	27,34	53,86
3	345,59	252,51	196,16	26,93	43,24
4	324,86	116,93	114,53		
5	328,43	229,49	99,61	30,12	69,67
6	318,41	229,16	170,57	28,03	46,43
7	328,54	253,74	178,57	22,77	45,65
8	367,38	255,31	137,70	30,51	62,52
9	312,98	198,62	148,30	36,54	52,62
10	308,28	236,09	100,45	23,42	67,41
11	320,30	151,77	150,08		
12	349,84	253,12	113,42	27,65	67,58
13	337,61	273,57	100,92	18,97	70,11
14	308,51	188,50	126,26	38,90	59,08
15	355,80	240,96	188,28	32,28	47,08
MEDIA	336,05	222,07	143,05	30,26	57,23
DP				7,98	9,78
