



**UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara**



Mônica Irma Aparecida Valdeci de Souza

Atividade antibacteriana e capacidade remineralizadora de dentina afetada ou de lesão de mancha branca em esmalte, após aplicação de géis experimentais de nanopartículas ou vidro bioativo

**Araraquara
2020**



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Mônica Irma Aparecida Valdeci de Souza

Atividade antibacteriana e capacidade remineralizadora de dentina afetada ou de lesão de mancha branca em esmalte, após aplicação de géis experimentais de nanopartículas ou vidro bioativo

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (Unesp), para obtenção do título de Doutora na Área de Odontopediatria.

Orientadora: Profa. Dra. Ângela Cristina Cilense Zuanon

Araraquara
2020

Souza, Mônica Irma Aparecida Valdeci de

Atividade antibacteriana e capacidade remineralizadora de dentina afetada ou de lesão de mancha branca em esmalte, após aplicação de géis experimentais de nanopartículas ou vidro bioativo / Mônica Irma Aparecida Valdeci de Souza.-- Araraquara: [s.n.], 2020

72 f.; 30 cm.

Tese (Doutorado em Ciências Odontológicas) –
Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia
Orientadora: Profa. Dra. Ângela Cristina Cilense Zuanon

1. Nanopartículas 2. Remineralização dentária
3. Anti-infecciosos I. Título

Mônica Irma Aparecida Valdeci de Souza

Atividade antibacteriana e capacidade remineralizadora de dentina afetada ou de lesão de mancha branca em esmalte, após aplicação de géis experimentais de nanopartículas ou vidro bioativo

Comissão Julgadora

Tese para obtenção do grau de Doutora em Odontopediatria

Presidente e Orientador: Profº Drº Ângela Cristina Cilense Zuanon

2º Examinador: Profº Drº Fábio Cesar Braga Abreu e Lima

3º Examinador: Profº Drº Diego Giroto Bussaneli

4º Examinador: Profa. Dra. Patrícia Aleixo dos Santos Domingos

5º Examinador: Profa. Dra. Marcela de Almeida Gonçalves

Araraquara, 17 de março de 2020

Dados Curriculares

Mônica Irma Aparecida Valdeci de Souza

Nascimento

- 20.02.1990 – Osasco, São Paulo.

Filiação

- Dair Augusto de Souza
- Marinete Valdeci de Souza

2009-2013

- Curso de graduação – Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP.

2013-2013

- Curso de Extensão “DENTÍSTICA ESTÉTICA INTEGRADA” - Fundação Araraquarense de Ensino e Pesquisa em Odontologia – FAEPO.

2014-2016

- Curso de pós-graduação, nível em mestrado, área de concentração Odontopediatria - Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP.

2016-2020

- Curso de pós-graduação, nível em doutorado, área de concentração Odontopediatria - Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP

Dedico este trabalho primeiramente à *Deus*

Obrigado Senhor por me proporcionar sabedoria e paciência para compreender as atitudes e pensamentos humanos. Obrigado por me manter em calma nos momentos em que a turbulência se fazia constante.

Obrigado pela minha vida.

Ao meu amado filho *Bento,*

Meu amor, ainda não te conheço pessoalmente
Mas quero que saiba que no dia que puder ler e compreender essa dedicatória você sinta orgulho e admiração por mim; assim como eu me sinto honrada em ter sido escolhida por Deus para ser sua mãe. Te amo!

À minha orientadora *“Cris”,*

Que sempre demonstrou total confiança em mim e em meu trabalho. São praticamente 10 anos de orientação desde a Iniciação Científica em 2009. À você meu muito obrigado por contribuir em minha formação profissional, acadêmica e pessoal. Seus exemplos e atitudes levarei por toda vida. Muito obrigado!

Dedico ao meu esposo *Gustavo,*

Que durante essa caminhada foi muito mais que um companheiro, foi o meu grande incentivo e apoio para que eu pudesse chegar até aqui.
Obrigado por tornar minha caminhada mais calma e agora mais feliz com a chegada cada vez mais próxima do nosso filho. Te amo!

Aos meus *pais*

Dair e Marinete,

Obrigado por me darem tantos exemplos bons: de amor, humildade, dignidade e me fazer acreditar que tudo com esforço e dedicação tudo dará certo. Sinto-me honrada em ser filha de vocês.

Amo vocês!

Ao meu *irmão*

André,

André, obrigado por toda ajuda e incentivo nessa caminhada!

A minha sogra *Marina* (*In Memoriam*)

Dona Marina,

Como a saudade dói, hein! Muito obrigado por todos os ensinamentos e lições de vida. O Bentinho vai ouvir falar muito da senhora. Que esteja em um bom lugar

À minha amada *Kiki* (*In Memoriam*)

Meu amorzinho, que saudades de você. Você era mais que minha cachorrinha, você tinha um brilho e jeito especial. Talvez as pessoas não entendam a nossa ligação, mas com sua partida repentina pude sentir na pele a efemeridade da vida. Você me ensinou a viver o hoje com toda força e vontade do mundo.

Obrigado por ter sido minha bebezinha. Te amo para sempre. Minha

Eterna Kiki!

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP, na pessoa de seu Magnífico Reitor, Prof. Dr. Sandro Roberto Valentini e Vice-Reitor, Prof. Dr. Sérgio Roberto Nobre.

À Faculdade de Odontologia de Araraquara – Universidade Estadual Paulista, representada pela digníssima Diretora, Profa. Dra. Elaine Maria Sgavioli Massucato e pelo Vice-Diretor, Prof. Dr. Edson Alves de Campos.

À Coordenação da Pós-Graduação em Ciências Odontológicas da Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr – UNESP, representada pelo Coordenadora Profa. Dra. Fernanda Lourenção Brighenti e Vice-Coordenadora Profa. Dra. Alessandra Nara de Souza Rastelli.

Ao Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, representada pela Chefe de Departamento, Prof^a. Dra. Ângela Cristina Cilense Zuanon e Vice-chefe, Prof. Dr. Luiz Paulo Sérgio Cerri.

À minha orientadora, Profa. Dra. Ângela Cristina Cilense Zuanon, pela contribuição e ensinamentos dedicados a este trabalho.

Ao Grupo de Crescimento de Cristais e Materiais Cerâmicos do Instituto de Física de São Carlos, da Universidade de São Paulo – USP.

Aos funcionários do Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Araraquara - FOAr – UNESP, em especial a Flávia e Dulce.

A Seção de Pós-Graduação, em especial ao Cristiano e Alexandre, por sempre serem solícitos em tudo que precisei.

Ao Evandro, do laboratório de Microscopia Eletrônica por ser sempre solícito em realizar as imagens no MEV da minha tese.

A Cristiane, da Faculdade de Farmácia, que me ajudou prontamente na elaboração dos géis experimentais.

À todos os funcionários da Biblioteca da FOAr - UNESP pela disposição de sempre.

Aos professores da Disciplina de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Araraquara - FOAr – UNESP, Ângela Cristina Cilense Zuanon, Cyneu Aguiar Pansani, Elisa Maria Aparecida Giro, Fabio César Braga de Abreu e Lima, Fernanda L. Brighenti, Josimeri Hebling Costa, Lourdes Aparecida Martins dos Santos-Pinto, Rita de Cássia Loiola Cordeiro, pelo conhecimento compartilhado.

Aos colegas do curso de pós-graduação em Ciências Odontológicas em especial a Aline e Diego que sempre se mostraram solícitos em sanar minhas as dúvidas, principalmente na realização da parte metodológica dessa tese.

À CAPES:

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À minha amiga *Andressa*,

Muito obrigado pelos 10 anos de convivência diária e por me orientar na realização da estatística desse trabalho.

À minha amiga *Jéssica*,

"Jeh" quanta coisa passamos e vivemos nesses 4 anos de doutorado. Obrigado sempre pela disposição e animo em me ajudar em tudo que precisei.

Ao meu amigo *Dany*,

Obrigado por se empenhar em me ajudar em todos momentos que precisei durante o desenvolvimento dessa tese.

À vocês obrigado por tudo!

NÃO SEI

Não sei se a vida é curta ou longa para nós,
mas sei que nada do que vivemos tem sentido,
se não tocarmos o coração das pessoas.

Muitas vezes basta ser: colo que acolhe,
braço que envolve, palavra que conforta,
silêncio que respeita, alegria que contagia,
lágrima que corre, olhar que acaricia,
desejo que sacia, amor que promove.

E isso não é coisa de outro mundo,
é o que dá sentido à vida.
É o que faz com que ela não seja nem curta,
nem longa demais, mas que seja intensa,
verdadeira, pura enquanto durar*

Cora Coralina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVO	16
3 REVISÃO DE LITERATURA	17
3.1 Biofilme	18
3.2 Remineralização das Estruturas Dentárias	20
3.3 Nanopartículas de Hidroxiapatita (NPHA)	20
3.4 Nanopartículas de Dióxido de Titânio (NPTiO ₂)	22
3.5 Nanopartículas de Óxido de Zinco (NPZnO)	24
4 MATERIAL E MÉTODO	28
4.1 Desenvolvimento dos Géis	29
4.1.1 Preparo do gel CMC	29
4.1.2 Preparo dos Géis Experimentais	29
4.2 Atividade Antibacteriana – Método de Difusão em Ágar/Técnica do Disco	30
4.3 Atividade Antibiofilme	31
4.4 Análise do Biofilme em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	33
4.5 Indução Artificial de Lesão de Mancha Branca em Esmalte e de Cárie em Dentina (modelo mono espécie) - Preparo dos Dentes Bovinos	34
4.5.1 Aplicação dos Géis sobre a Dentina Afetada	36
4.5.2 Aplicação dos Géis sobre a Lesão de Mancha Branca	36
4.5 Teste de Microdureza KNOOP	37
4.6 Morfologia da Interface Dentina/Restauração e da Face Interna do Esmalte	37
4.7 Teste de Rugosidade Superficial	38
4.8 Análise Estatística	38
5 RESULTADOS	40
6 DISCUSSÃO	49
7 CONCLUSÃO	57
REFERÊNCIAS	58
ANEXO A- COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA EM ANIMAIS	68

Souza MIAV. Atividade antibacteriana e capacidade remineralizadora de dentina afetada ou de lesão de mancha branca em esmalte, após aplicação de géis experimentais de nanopartículas e vidro bioativo [tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP, 2020.

RESUMO

O tratamento da dentina afetada e das lesões de mancha branca com agentes antibacterianos e remineralizadores tem sido uma alternativa eficaz na longevidade das restaurações, porém não há estudos em que um gel de uso odontológico seja composto por nanopartículas de dióxido de titânio (NPTiO₂), hidroxiapatita (NPHA), óxido de zinco (NPZnO), vidro bioativo F 18 (VBF18) e fluoreto de sódio (NaF). O objetivo deste estudo foi avaliar a capacidade antibacteriana e remineralizadora de géis experimentais que compuseram os grupos G0- Glicerina (controle negativo), G1- NPHA 3%, G2- NPTiO₂ 3%, G3- NPZnO 3%, G4- VB F18 3%, G5- NaF 5%, G6- NPTiO₂+NaF 5%, G7- NPZnO 3% + NaF 5%, G8- CLX 0.2%, G9- NPHA 3% + NaF 5% e G10- VB F18 3% + NaF 5%, utilizados no tratamento prévio da dentina afetada antes do selamento da cavidade com cimento de ionômero de vidro (CIV) e na remineralização de lesões de mancha branca. Blocos de dentina e esmalte bovinos passaram por desafio cariogênico monoespécie (*S. mutans*) induzindo mancha branca em esmalte e cárie em dentina. Os espécimes (esmalte e dentina após remoção da dentina infectada) foram tratados com os géis experimentais e, os de dentina, restaurados com o CIV. Foi avaliada a atividade antibacteriana por meio do teste de halo de inibição e atividade antibiofilme, por meio contagem de unidades formadoras de colônias (UFC/ml), sendo o último também analisado em microscopia eletrônica de varredura (MEV). Todos espécimes foram submetidos aos testes de rugosidade superficial e de microdureza, sendo que o último, quando realizado em dentina, abrangeu região adjacente a restauração e ao redor da mesma. A análise da morfologia da interface dentina-restauração e da superfície do esmalte após o uso do gel foi realizada MEV. A análise estatística para atividade antibacteriana e antibiofilme não apresentaram distribuição normal e homogeneidade de variância, quando foi realizado o teste não paramétrico de Kruskal Wallis, seguido do pós teste de Dunn para atividade antibacteriana e para a atividade antibiofilme foi avaliada pelo teste Anova two-way e pós teste de Bonferroni. Para as variáveis microdureza (esmalte e dentina da área adjacente e ao redor da restauração), e rugosidade (esmalte e dentina) foi aplicado o teste de ANOVA one-way com correção de Welch. O teste de Games Howell foi aplicado para identificação das diferenças entre os grupos, adotando nível de significância de 5%. Na avaliação antibacteriana (halo de inibição) os grupos G2, G3, G4, G5, G6, G8 e G10 apresentam os melhores resultados. Maior capacidade antibiofilme após 24 horas foi demonstrada pelo G2 e G4. Os grupos 3, 6 e 8 apresentaram bons resultados quanto à microdureza da dentina, e os G1 e G9 obtiveram melhores de microdureza, semelhantes ao grupo controle. Menor rugosidade na dentina foi apresentada por G5 e, por G1 em esmalte. Dessa forma, pode-se concluir que os géis experimentais demonstraram ser eficientes contra lesão inicial de cárie em esmalte e na dentina, sendo alternativas promissoras para o uso odontológico.

Palavras-chave: Nanopartículas. Remineralização dentária. Anti-infecciosos.

Souza MIAV. Antibacterial activity and remineralizing capacity of affected dentin or White enamel lesion after application of experimental nanoparticle gels or bioactive glass [tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP, 2020.

ABSTRACT

The treatment of affected dentin and white spot lesions with antibacterial and remineralizing agents has been an effective alternative in the longevity of restorations, but there are no studies in which a gel for dental use is composed of titanium dioxide (NPTiO₂) nanoparticles, hydroxyapatite (NPHA), zinc oxide (NPZnO), bioactive glass F 18 (VBF18) and sodium fluoride (NaF). The objective of this study was to evaluate the antibacterial and remineralizing capacity of experimental gels that comprised the groups G0- Glycerin (negative control), G1- NPHA 3%, G2- NPTiO₂ 3%, G3- NPZnO 3%, G4- VB F18 3% , G5- 5% NaF, G6- NPTiO₂ + 5% NaF, G7- NPZnO 3% + 5% NaF, G8- CLX 0.2%, G9- NPHA 3% + 5% NaF and G10- VB F18 3% + NaF 5 %, used in the previous treatment of the affected dentin before the cavity was sealed with glass ionomer cement (GIC) and in the remineralization of white spot lesions. Bovine dentin and enamel blocks underwent a monospecies cariogenic challenge (*S mutans*) inducing white enamel stain and dentin caries. The specimens (enamel and dentin after removal of the infected dentin) were treated with the experimental gels and, the dentin, restored with the GIC. Antibacterial activity was evaluated by means of the inhibition halo test and antibiofilm activity, by counting colony-forming units (CFU / ml), the latter also being analyzed by scanning electron microscopy (SEM). All specimens were subjected to surface roughness and microhardness tests, the last of which, when carried out on dentin, covered the region adjacent to and around the restoration. The analysis of the morphology of the dentin-restoration interface and the enamel surface after using the gel was performed by SEM. The statistical analysis for antibacterial and antibiofilm activity did not show normal distribution and homogeneity of variance, when Kruskal Wallis' nonparametric test was performed, followed by Dunn's post-test for antibacterial activity and for antibiofilm activity was assessed by the two-way Anova test. and Bonferroni post-test. For the variables microhardness (enamel and dentin of the adjacent area and around the restoration), and roughness (enamel and dentin), the one-way ANOVA test with Welch correction was applied. The Games Howell test was applied to identify the differences between the groups, adopting a significance level of 5%. In the antibacterial evaluation (inhibition halo) the groups G2, G3, G4, G5, G6, G8 and G10 present the best results. Greater antibiofilm capacity after 24 hours was demonstrated by G2 and G4. Groups 3, 6 and 8 showed good results regarding dentine microhardness, and G1 and G9 obtained better microhardness, similar to the control group. Less dentin roughness was shown by G5 and by G1 in enamel. Thus, it can be concluded that the experimental gels proved to be effective against initial caries lesion in enamel and dentin, being promising alternatives for dental use.

Keywords: Nanoparticles. Tooth remineralization. Anti-infectives.

1 INTRODUÇÃO

A cárie dentária é uma doença biofilme açúcar dependente de natureza multifatorial, de evolução lenta na maioria das vezes, e que, na ausência de tratamento, progride até destruir totalmente a estrutura dentária. Em virtude de sua alta incidência na população, ainda é considerada um problema de saúde pública¹.

As manchas brancas representam o estágio inicial da lesão de cárie, caracterizado por apresentar esmalte opaco e poroso, ocasionado pela desmineralização. Há inúmeros fatores que interferem no processo de desmineralização e remineralização (DES-RE), resultando, muitas vezes em maior desmineralização do esmalte dentário, e conseqüentemente no desenvolvimento da lesão de cárie².

Em estágios avançados, a desmineralização atinge também a dentina que, se não tratada, pode provocar comprometimento pulpar^{3,4}. Ao ser atingida pelos produtos bacterianos, a dentina mais superficial, também chamada de infectada, perde seus minerais, é colonizada por muitas bactérias cariogênicas, passa a ter coloração marrom, consistência amolecida não resistente ao corte e torna-se não passível de remineralização⁵. Na porção mais profunda da lesão cariosa, encontra-se a dentina afetada, que apresenta coloração marrom mais claro, resistência ao corte, menor quantidade de bactérias cariogênicas, maior quantidade de estrutura mineral, maior organização das fibras colágenas e é passível de remineralização⁶.

Atualmente, uma alternativa conservadora para o tratamento das lesões de cárie consiste na remoção somente da dentina infectada, e posterior selamento da cavidade com material restaurador, normalmente o cimento de ionômero de vidro (CIV)⁷.

Os CIV apresentam propriedades importantes, como a biocompatibilidade⁸, adesividade química às estruturas do dente, capacidade de liberação de flúor e coeficiente de expansão térmica linear semelhante ao da dentina⁹.

Com esta técnica é possível a remoção seletiva da lesão de cárie com instrumentos manuais e a realização de restaurações com menor risco de exposições pulpares, menor estresse e ansiedade do paciente, visto que raramente causa dor, não necessitando de anestesia, além de ser um método econômico⁷.

No entanto, ensaios clínicos com acompanhamento em longo prazo, demonstraram que microrganismos cariogênicos, entre eles o *S. mutans*, podem persistir

na dentina afetada sob restaurações, representando papel fundamental no desenvolvimento de lesões de cáries secundárias^{10,11}. Estas também se desenvolvem ao redor de restaurações, provocando falhas marginais¹², aumento de rugosidade¹³ e diminuição da microdureza¹⁴ na interface dente e restauração. Estas situações propiciam um ambiente de maior acúmulo de biofilme, que em conjunto com outros fatores, como saliva, dieta e higienização, acarreta no desequilíbrio do processo do processo DES-RE^{15,16}.

Para prevenir a formação de lesões de cáries, os fluoretos tópicos são utilizados pelo profissional sob diferentes formas, como mousses, vernizes e enxaguatórios bucais, além de géis, que representam uma alternativa de baixo custo e bastante eficácia¹⁷⁻¹⁹. Apesar de ser uma excelente estratégia para a diminuição da lesão de cárie, deve ser levado em conta que o excesso de flúor pode resultar em risco potencial de desenvolvimento da fluorose dental, a qual é um defeito de desenvolvimento do esmalte, que decorre da ingestão crônica e excessiva de fluoreto, o que resulta em um esmalte hipomineralizado com níveis variados de porosidade, mais susceptível ao desenvolvimento de cárie dentária²⁰.

Diferentes alternativas de materiais que possuam capacidade remineralizadora e antibacteriana para paralisação da lesão de cárie e que tragam poucos riscos ao paciente têm sido pesquisadas. Atualmente, as nanopartículas (NP) têm sido usadas amplamente na Odontologia com a finalidade de remineralização dos tecidos dentais e ação antibacteriana²¹. Entre as NP pesquisadas, podem-se observar as de titânio²², óxido de zinco²³ e de hidroxiapatita²⁴. Tem-se pesquisado também como agente remineralizador os vidros bioativos²⁵ (VB), sendo que ambos representam menores riscos ao paciente quando comparados ao flúor²⁶.

A NP de hidroxiapatita (NPHA) e de dióxido de titânio (NPTiO₂) são biologicamente compatíveis. A NPHA é considerada um composto substituto do componente mineral natural da dentina²⁷, desempenhando ótima função remineralizadora. As NPTiO₂ e NPZnO possuem alto poder antimicrobiano, utilizadas para controlar a formação de biofilmes, pois seu tamanho nanométrico permite sua penetração através das membranas celulares, desorganizando os processos metabólicos intracelulares^{22,23}.

O VB apresenta atividade antimicrobiana, função osteocondutora e biocompatibilidade. Já foi incorporado em dentifrícios²⁸ e dessensibilizantes²⁹. Com o passar dos anos, muitas formulações de VB foram desenvolvidas, quando em 2015, surgiu

o F18, com importante ação anti-biofilme, por possuir propriedades bactericida e remineralizadora³⁰.

Outro material muito utilizado na clínica odontológica é a Clorexidina, antimicrobiano utilizado para limpar campos operatórios, desinfetar canais radiculares, inibir a formação da placa, lesões de cáries e gengivite, sendo considerada padrão ouro na literatura³¹.

Para a utilização de diferentes materiais na clínica odontológica, meios veiculadores devem ser pesquisados para que se possa oferecer ao paciente praticidade, efetividade e segurança, principalmente quando são atendidas crianças. Um ótimo veículo encontra-se no estado gel, uma vez que é de fácil manipulação, de baixo custo, possui bom espalhamento, não-gorduroso e bastante eficaz³². Assim, espera-se que a utilização do mesmo associado as NP ou aos VB, conserve as propriedades inerentes desses materiais.

Dessa forma, este estudo propõe avaliar o uso de NP e VB na formulação de géis para atividade antibacteriana e potencial remineralizador, respectivamente, na busca de novas opções para a paralisação do progresso da mancha branca e redução do risco potencial de cáries secundárias.

2 OBJETIVO

Avaliar a atividade antibacteriana, antibiofilme, remineralizadora, rugosidade, microdureza e a morfologia de superfície da dentina afetada e do esmalte com lesão de mancha branca sob microscopia eletrônica de varredura (MEV) após o tratamento das superfícies com os géis experimentais compostos de NP (NPHA, NPTiO₂, NPZnO) ou VB18, associadas ou não com NaF 5%.

3 REVISÃO DE LITERATURA

A nanotecnologia é a área da ciência, de caráter multidisciplinar, que estuda o fenômeno da manipulação e organização de átomos e moléculas, em uma escala conhecida como nano ($10^{-9} = 1\text{nm}$); na qual a matéria deve permanecer na dimensão de 0,1-100nm³³. Porém, um nanomaterial não se caracteriza somente por sua dimensão, mas também pelos seus componentes, os quais exibem propriedades físicas, químicas e/biológicas diferenciadas³⁴.

A manipulação de materiais em níveis atômico e molecular parece ser um conceito moderno. No entanto, caso sejam considerados os processos químicos, físicos e biológicos que ocorrem no meio ambiente, é possível identificar a presença da nanociência desde a História da Antiguidade. Como os vitrais das igrejas da Europa, na Idade Média, que possuíam o efeito multicolorido por conter nanopartículas (NP) de ouro e de outros óxidos metálicos. Além de funcionarem como purificadores de ar fotocatalíticos de alta eficiência, as NP de ouro absorvem a luz e degradam determinadas matérias orgânicas presentes no ar³⁵.

A miniaturização dos elementos afeta suas propriedades fundamentais principalmente devido ao aumento da área superficial, a qual é inversamente proporcional ao tamanho das partículas. Além disso, há mudança também da disposição dos átomos na superfície, que pode conferir novas propriedades eletrônicas, ópticas, térmicas e magnéticas³³.

Na Odontologia, a nanotecnologia tem sido utilizada em várias especialidades. Como exemplo, pode-se citar a área de Dentística Restauradora, na qual as NP são incorporadas em materiais restauradores como as resinas compostas³⁶ e cimentos ionoméricos³⁷ para lhes conferir melhores propriedades físicas, mecânicas e ópticas. Na implantodontia, são auxiliares nos materiais de enxertos ósseos, para promoverem a bioregeneração e formação óssea³⁸. Na Odontologia Preventiva e Odontopediatria pode-se destacar a capacidade antibacteriana^{22,23,39-43}, antibiofilme^{44,45} e remineralizadora^{24,27,46,47}. Assim conferem propriedades importantes na paralisação das lesões de cárie em seu estágio inicial, considerada um problema de saúde bucal, na dentição decídua⁴⁸.

As NP, além de apresentarem variação de tamanho, também apresentam diferenças em seu formato, podendo apresentar-se esféricas, cúbicas, triangulares,

filamentosas, estelares e muitas outras. Sua composição também varia e podem ser formadas por diversos materiais como ouro, prata, zinco, carbono, cobre, dióxido de titânio, tungstênio entre outros. As NP metálicas têm apresentado excelentes propriedades antimicrobianas e bacteriostáticas, com destaque para as nanopartículas de TiO_2 ^{22,49,50} ZnO ^{21,23,39,42,49,51,52}. Entre as NP com capacidade de remineralização, temos a HA ^{24,27,46,47,53}.

Considerando a importância das propriedades de remineralização e antibacteriana na Odontologia, em nossa revisão abordaremos acerca das NP metálicas (titânio e óxido de zinco) e hidroxiapatita.

3.1 Biofilme

O biofilme é definido como uma comunidade microbiana cooperativa, organizada e aderida à uma superfície úmida e aglomerada por matriz de polissacarídeos. No ambiente bucal, o biofilme é formado por microrganismos que se encontram sobre uma camada de proteína, a qual é constituída de glicoproteínas salivares, fosfoproteínas, lipídeos e componentes do fluido gengival^{3,54}. Diferentes fases são conhecidas para o crescimento e desenvolvimento do biofilme. A primeira compreende a formação da película adquirida até chegar na última, a qual consiste na estruturação da placa madura⁵⁵.

Na formação da película adquirida ocorre a adsorção de bactérias à superfície dentária, e logo após, inicia-se a síntese de exopolissacarídeos (EPS) insolúveis, resultante de uma dieta rica em açúcares, quando aumenta o número de microrganismos acidogênicos^{56,57}. Assim, tem-se uma matriz capaz de armazenar nutrientes e água, além de proteger bactérias de respostas imune e de agentes antimicrobianos. Esse processo garante a aderência de bactérias em uma matriz tridimensional denominada biofilme, que se torna maduro pela multiplicação bacteriana e pelo acúmulo de EPS. O *S mutans* é uma bactéria acidogênica com capacidade de utilizar ampla variedade de carboidratos para produzir EPS, ácidos e garantir sua resistência em biofilmes^{57,58}.

Os biofilmes são comunidades extremamente organizadas que permitem a manutenção de microrganismos em seu interior com poucos nutrientes, oscilações de pH, além de serem resistentes a alguns antibióticos e às forças físicas, como a ação salivar⁵⁹.

Caso o biofilme permaneça sobre os dentes e o consumo de dietas ricas em carboidratos persistir, a quantidade de matriz de EPS e a extensão da acidificação aumentam, combinadas com atividades metabólicas dos microrganismos, resultam em microambientes de pH altamente ácidos⁶⁰, quando as espécies sensíveis ao ácido perecem

e a microbiota acidogênica torna-se mais potente⁶¹. Assim, este biofilme, associado à dieta, saliva e a susceptibilidade do hospedeiro resulta no desenvolvimento da cárie dentária, ou seja, a destruição da estrutura dentária mineralizada⁵⁶.

O controle do biofilme, da ação salivar entre outros fatores, permite que contínuos processos de desmineralização possam ser seguidos por processos de remineralização e assim, restabelecer a integridade do esmalte dentário. Quando a fase de acidificação (desmineralização) não é controlada pela fase de tamponamento (remineralização), tem-se como resultado o desenvolvimento da lesão de cárie⁴.

A presença de carboidratos também favorece a proliferação bacteriana no biofilme, sendo os lactobacilos os primeiros microrganismos envolvidos com o desenvolvimento da lesão de cárie. Os *S. mutans*, espécie também envolvida neste processo, produz quantidades consideráveis de ácido lático na presença de fontes de açúcares fermentáveis⁵⁸. Assim ocorre diminuição do pH em valores abaixo do pH crítico (5,3-5,5) para desmineralização da superfície do dente, alterando o equilíbrio DES-RE e consequentemente, a perda de minerais³.

No início da desmineralização o dente apresenta lesões de manchas esbranquiçadas e opacas, e em estágios subsequentes, estas se tornam cavitadas. A dentina infectada e afetada pela lesão de cárie são substratos distintos que têm diferenças na composição química e na estrutura morfológica. A dentina infectada por cárie é uma área de vasta desmineralização com degeneração das fibras colágenas e possui aspecto amolecido com coloração marrom, não passível de remineralização. A dentina afetada é considerada uma variação da dentina reacional, formada em reação aos estímulos brandos, com alterações da reticulação das fibras colágenas, presença de dentina peritubular, processos odontoblásticos íntegros, apresenta resistência ao corte e é passível de remineralização^{2,62}.

Apesar dos avanços significativos na prevenção da cárie dentária, as características do biofilme cariogênico torna o seu controle ainda desafiador, pois os microrganismos estão presentes e protegidos em uma matriz rica em EPS, a qual reduz a eficácia dos tratamentos contra a placa bacteriana⁶¹.

A clorexidina, excelente antimicrobiano, tem sua ação comprometida nas camadas mais profundas do biofilme^{55,63}. Além de possuir menos eficácia contra biofilmes estabelecidos, não previne o desenvolvimento da lesão de cárie e não é adequada para uso diário devido aos seus efeitos adversos, como a formação de cálculo, mudança de paladar e na coloração de dentes⁶⁴.

Abordagens terapêuticas contra biofilmes cariogênicos devem romper a matriz de EPS e simultaneamente, matar as bactérias contidas nos biofilmes. Porém, são limitadas, principalmente àquelas relacionadas aos antimicrobianos convencionais de amplo espectro, os quais são incapazes de degradar a matriz EPS ou afetar os aspectos físico-químicos da lesão de cárie.

A utilização do flúor, pilar da prevenção da lesão de cárie⁵⁸, favorece a remineralização e reduz a desmineralização do esmalte dentário, porém com efeitos limitados contra o biofilme, apesar da inibição do metabolismo bacteriano⁶⁵.

A utilização de nanomateriais, como as NP metálicas de TiO₂ e ZnO, ou aquelas de HA, têm recebido maior atenção, em função do controle que exercem sobre o biofilme e prevenção que oferecem ao desenvolvimento da lesão de cárie, uma vez que possui propriedades antibacterianas intrínsecas, como moléculas bioativas e agentes remineralizantes^{27,66}.

3.2 Remineralização das Estruturas Dentárias

Há várias aplicações da nanotecnologia com objetivo de remineralizar os estágios iniciais da lesão de cárie, sendo uma abordagem terapêutica não invasiva para o tratamento da cárie dentária. Proporcionam a remineralização por meio do fornecimento de íons de cálcio e fósforo as estruturas dentárias, a fim de melhorar a precipitação dos mesmos sobre a superfície desmineralizada e proporcionar a remineralização das estruturas dentárias^{27,36,38,46}.

3.3 Nanopartículas de Hidroxiapatita (NPHA)

A HA é um componente inorgânico que compõe 95% da fase mineral de ossos e dentes e pode ser encontrada também em calcificações patológicas (cálculo dentário humano, cálculos de glândulas salivares e renais)⁶⁷.

A HA possui características como biocompatibilidade, baixa toxicidade (local ou sistêmico), capacidade de ligação aos tecidos (bioatividade) e propriedade osteocondutora, a qual induz a regeneração tecidual. Em escala nanométrica, a HA tem suas propriedades potencializadas, como a solubilidade, biocompatibilidade, biodegradabilidade, bioatividade e capacidade de formação de tecidos duros⁶⁸.

Na Odontologia, a HA tem sido utilizada em reparos de defeitos ósseos³⁸, em dentifrícios⁴⁷, hipersensibilidade dentinária, remineralização de lesões de cárie em

esmalte⁶⁸ e dentina²⁷, quando podem estar associados na modificação aos adesivos resinosos ou outros materiais restauradores.

Souza et al.⁵³, em 2015, avaliaram o efeito de uma pasta experimental contendo NPHA e fluoreto na desmineralização dentária in situ. Treze pessoas participaram deste estudo clínico randomizado, duplo-cego realizado em 4 fases (14 dias cada). Quatro amostras sadias e 4 pré-desmineralizadas foram usadas intraoral em cada fase, correspondendo aos seguintes tratamentos: Nanop Plus (10% HA, 0,2% NaF, nano-HA / fluoreto), MI Paste Plus (fosfopeptídeo de caseína - fosfato de cálcio amorfo, 0,2 NaF), F (0,2% NaF) e placebo. Foram realizados testes de microdureza em amostras de dentina e esmalte. Todos os espécimes foram expostos a uma pasta de dentifrício fluoretada 2 vezes por dia durante 1 min, e depois por 4 min. A desmineralização foi quantificada por microradiografia transversal. O Nano Plus foi o único tratamento capaz de reduzir significativamente a desmineralização da dentina e melhorar a remineralização do esmalte em comparação com o placebo. Nenhum tratamento foi capaz de reduzir a desmineralização do esmalte, enquanto que para a remineralização da dentina, todos os tratamentos foram igualmente eficazes em comparação ao placebo. Os autores atribuíram este achado ao fato da dentina ser menos mineralizada que o esmalte, facilitando a difusão de NP.

Sua eficiência em dentina foi observada também por Besinis et al.⁴⁶ investigaram a capacidade de NP de sílica coloidal e HA de se infiltrarem na estrutura do colágeno da dentina desmineralizada. A matriz de colágeno das amostras de dentina foi subsequentemente infiltrada com a sílica coloidal e soluções de HA. A eficácia e extensão da infiltração foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura (MEV), microscopia eletrônica de transmissão (MET) e espectroscopia de raios X por dispersão de energia (EDS). Foi observado que as NP de sílica têm a capacidade de penetrar na dentina e permanecem incorporadas dentro da matriz de colágeno. Os autores sugeriram que o tamanho das NP desempenha um papel importante na infiltração da dentina e o colágeno infiltrado com HA e NP de sílica pode fornecer suporte para a remineralização da dentina, quando as partículas infiltradas atuam como iniciadoras do crescimento mineral dentro da matriz de colágeno¹⁶.

Uskoković et al.⁴³, em 2017, avaliaram pastas para enxerto ósseo a base de NPHA e sílica de 5 a 15 nm carregadas por antibiótico. Observaram que o tempo de ação do medicamento pode ser controlado com ajuste de seu conteúdo em seu peso na pasta ou na relação pó-líquido. Notaram também que a liberação de vancomicina foi lenta, cerca de

8% após 2 semanas. As pastas carregadas com vancomicina foram eficazes na redução da concentração de todas as espécies bacterianas analisadas. Os efeitos bacteriostáticos eficazes das pastas foram contra *S. liquefaciens* e *E. coli*. Bacilos de *S. liquefaciens* sofreram ruptura e filamentação durante o tratamento, sugerindo que os efeitos antimicrobianos foram atribuídos à ruptura da parede celular pela NPHA. Assim a mesma capacidade de penetrar no interior dos microorganismos, permite que as NPHA adentrem nos túbulos dentinários e favoreçam a remineralização da dentina¹⁶. A NPHA adsorve à superfície externa da célula bacteriana, interfere na sua adesão e impede a formação de biofilme, com subsequente melhora no processo de remineralização.

Por meio de um modelo ativo de biofilme sobre esmalte desmineralizado *in vitro*, Zhang et al.⁴⁵, em 2015, não encontraram diferenças na contagem de UFC e produção de ácido láctico, quando compararam o uso de NaF ou NPHA. Na presença de NPHA, o conteúdo médio de cálcio no biofilme foi 8 vezes maior que o grupo experimental ($60,7 \pm 15,3$ mmol/g de peso úmido) e resultou em maior remineralização quando comparado à aplicação de NaF. Os autores observaram também que tal efeito aumentou na presença de biofilme. Dessa forma, concluíram que a presença de biofilme pode alterar a eficácia de agentes antibacterianos e remineralizadores e que, os biofilmes devem estar presentes nos modelos experimentais *in vitro*.

Huang et al.⁶⁷, 2011, avaliaram o efeito de diferentes concentrações de NPHA sobre lesões iniciais de cárie em esmalte, sob condições dinâmicas de ciclagem de pH. Os grupos incluíram NaF (controle positivo), água deionizada (controle negativo) e NPHA (1%, 5%, 10% e 15% em peso). Os autores observaram que as NPHA foram regularmente depositadas na estrutura celular da superfície do esmalte desmineralizada, sugerindo a formação de novas camadas superficiais. Com isso, concluíram que a concentração de 10% NPHA tem potencial para remineralizar as lesões iniciais do esmalte, por meio da avaliação de sua microdureza superficial que demonstrou ser completa em 3 dias.

3.4 Nanopartículas de Dióxido de Titânio (NPTiO₂)

O titânio (Ti) é um metal sólido, representa o nono elemento mais abundante do planeta e é utilizado pela indústria na forma de óxido, cloreto e metal. O TiO₂ é um pó branco, biologicamente inerte e não tóxico quando em microescala, muito utilizado pelas indústrias farmacêutica, química, alimentícia, na medicina e Odontologia⁴⁷ inerte e não tóxico em microescala⁶⁹.

Seu interesse na Odontologia ocorre por possuir um custo relativamente baixo, ser atóxico (para seres humanos e meio ambiente) e apresentar elevada atividade fotocatalítica⁷⁰.

A presença da atividade antimicrobiana e/ou bacteriostática ocorre em função dos elétrons (e⁻) e hidroxilas (h⁺) gerados pelo Ti, resultando em diferentes espécies reativas de oxigênio (ERO) como o O₂⁻, OH e H₂O₂, as quais podem reagir com compostos orgânicos como as bactérias, quando atingem suas membranas celulares, levando a morte do microorganismo⁷¹.

As ERO podem atuar sinergicamente atacando os fosfolípidios poli-insaturados de bactérias, ocasionando vazamento de minerais, proteínas e materiais genéticos, culminando em morte celular⁷².

Com intuito de acrescentar atividade antimicrobiana nos materiais restauradores, a adição das NPTiO₂ tem sido muito estudada. Alguns autores citam que uma das grandes vantagens é o fato destas não interferirem na estabilidade da cor dos materiais restauradores, porém podem alterar suas propriedades mecânicas. Andreotti AM et al.⁷³, 2014, avaliaram o efeito da adição de NPZnO, NPTiO₂ e sulfato de bário em concentrações de peso de 1%, 2% e 2,5% à resina acrílica sobre sua estabilidade de cor, microdureza e resistência flexural. A NPTiO₂ apresentou melhor estabilidade de cor em todas as concentrações, entretanto, demonstrou menores valores de resistência flexural, independente da concentração em comparação com as demais NP estudadas.

Em contrapartida, Yu et al.^{73,74}, em 2009, observaram que a adição de NPTiO₂ em resinas compostas experimentais aumentou significativamente sua opalescência, não alterou os espectros de fluorescência, diminuiu significativamente sua translucidez e ocasionou mudança de cor.

Na tentativa de controlar possíveis alterações das propriedades ópticas dos materiais restauradores, Welch et al.⁷⁵, em 2010, avaliaram *in vitro* a bioatividade, força de ligação mecânica e propriedades bactericidas fotocatalíticas, induzidas pela irradiação ultravioleta-A (UV-A) em adesivos dentários contendo 20% em peso de NPTiO₂. Os autores observaram que estes materiais se mostraram bioativos com formação espontânea de hidroxiapatita. A atividade antibacteriana (*S.epidermidis*) foi dependente da aplicação de irradiação fotocatalítica UV. A combinação da bioatividade e do efeito bactericida foi considerada importante pois permite a redução da incidência de cárie dentária e melhora a interface dente/adesivo por meio da remineralização dentária adjacente, bem como a prevenção de invasões bacterianas.

Ahrari et al.⁷⁶, em 2016, avaliaram a capacidade antibacteriana de diferentes NP metálicas em enxaguatórios bucais (NPZnO, NPCuO, NPTiO₂ e NPAg) em comparação com 2,0% de fluoreto de sódio e 0,2% de enxaguatórios bucais com clorexidina, como soluções controle, contra *S. mutans* e *S. sangius*. O enxaguatório bucal com fluoreto de sódio não apresentou efeito antibacteriano. A solução contendo NPTiO₂ apresentou a menor concentração inibitória mínima (CIM) contra ambos os microorganismos e a menor concentração bactericida mínima (CBM) contra *S. mutans*. As soluções contendo NPTiO₂ e NPZnO apresentaram a menor CBM contra *S. sangius*. A clorexidina apresentou a maior CIM e CBM contra ambas as bactérias. O enxaguatório bucal contendo NPTiO₂ mostrou-se um agente antimicrobiano eficaz e, portanto, pode ser considerado como uma alternativa aos enxaguatórios bucais de clorexidina ou fluoreto de sódio na cavidade oral.

Westas et al.⁵⁰, em 2017, avaliaram o efeito bactericida fotocatalítico da NPTiO₂ sobre biofilmes de *S. oralis* e observaram capacidade antibacteriana, mesmo sem a utilização da luz UV, nas primeiras 24 horas; com a utilização da luz a redução bacteriana foi observada em 6 horas. No entanto, após 24 horas sem utilização da luz foi observado a redução na eficácia da morte das bactérias em 40%.

Lavaee et al.⁷⁷, em 2016, compararam os efeitos antimicrobianos da clorexidina, penicilina, eritromicina, clindamicina, tetraciclina e vancomicina associadas às NP Ag, NPTiO₂ e NPFe₃O₄ contra *S. mutans* e *S. sanguinis*. O uso de NP isoladamente mostrou maior concentração inibitória mínima (CIM) quando comparado ao seu uso em sinergia com outras NP. A solução sinérgica mais eficaz foi aquela que continha TiO₂, NP Ag e NPFe₃O₄ esta solução apresentou a menor concentração inibitória de biofilme (CIB) e unidades formadoras de colônia do que os outros antibióticos e a clorexidina. Sendo dessa forma uma alternativa no tratamento da cárie dentária e infecções bucais.

3.5 Nanopartículas de Óxido de Zinco (NPZnO)

O ZnO, é considerado um material seguro e atóxico aos seres humanos. A ascensão e fabricação de NPZnO abrem um leque de possibilidades para que as mesmas possam ser incorporadas em diferentes matrizes conferindo propriedades diversas, como capacidade de absorver tanto raios UV-A quanto raios UV-B, propriedade antimicrobiana⁵² e melhora de algumas propriedades mecânicas de materiais restauradores^{23,42}.

A NPZnO tem demonstrado efeito antibacteriano contra vários tipos de bactérias, incluindo *S. mutans*^{23,34,39}, sendo a capacidade de modificação na membrana celular, seu provável mecanismo de ação⁷⁸.

Apesar de apresentar aumento da atividade antibacteriana com exposição à luz, a ausência da mesma também permite que as NPZnO produzam espécies de superóxido, o que indica a produção de espécies reativas com ou sem iluminação⁷⁹.

Outro potencial mecanismo de ação antimicrobiano das NPZnO, seria a lixiviação do Zn²⁺ para o meio de crescimento. Os íons de zinco podem inibir a formação de biofilme impedindo o transporte e metabolismo dos açúcares, bem como desorganizar os sistemas enzimáticos, deslocando íons de magnésio essenciais para a atividade enzimática do biofilme dental³⁶.

Na tentativa de conferir capacidade antimicrobiana para os materiais restauradores odontológicos, muitos pesquisadores têm analisado a eficácia dessa adição.

Aydin Sevinc e Hanley³⁹, em 2010, obtiveram redução na contagem bacteriana e no crescimento de biofilme monoespécie em 80% (*S. sobrinus*) quando 10% de NPZnO foi adicionado à uma resina composta. Os autores sugeriram que mesmo que 20% da população bacteriana tenha sobrevivido, a resina composta com adição de NPZnO manteve a atividade inibitória por pelo menos, até a terceira geração de crescimento de biofilme. No MEV foi observado que houve formação contínua de biofilme, entretanto estes apresentaram baixa dispersão. Contudo, após três dias não houve redução significativa do biofilme.

Em outro estudo, Brandão et al.²³, em 2008, avaliaram a ação antibacteriana de diferentes concentrações de NPZnO contra biofilme de *S. mutans* sobre resinas compostas. A atividade antibiofilme contra *S. mutans* foi avaliada pela atividade metabólica e produção de ácido lático. Foi observado que a incorporação de 2 e 5% em peso de NPZnO conferiram atividade antibacteriana às resinas compostas, sem comprometer suas propriedades físico-químicas, como a resistência flexural, módulo de elasticidade, dureza, solubilidade em água e translucidez.

Wang et al.⁸⁰, em 2017, estudaram a CIM, CBM e curva de inibição de crescimento de *S. mutans* a partir da utilização de nanocompósitos compostos por NPAg e/ou NPZnO. Os resultados demonstraram que o nanocompósito contendo NPAg e NPZnO apresentou maior atividade contra *S. mutans* quando comparado àquele com NPZnO somente. A interrupção da função e oxidação da membrana celular desempenharam importante papel na ação antibacteriana do nanocompósito.

Para investigar a desinfecção de canais radiculares, Kishen et al.⁸¹, em 2008, examinaram as propriedades físicas de NPZnO, NP de quitosana, associação de NPZnO e quitosana e associação de NPZnO com revestimento multicamada de quitosana. Este estudo mostrou que a incorporação de nanoparticulados melhorou a propriedade antibacteriana direta e a capacidade de lixiviar os componentes antibacterianos. Houve uma redução significativa na adesão de *E. faecalis* à dentina tratada com NP.

Com o intuito de aumentar a capacidade antibacteriana do TiO₂, Liu et al.⁸² desenvolveram diferentes associações das NPTiO₂ com NPZnO a partir de diferentes concentrações de NPZnO. As amostras nanotubulares de TiO₂ impregnadas com NPZnO inibiram o crescimento de *S. mutans* e *P. gingivalis* em comparação com amostras de TiO₂ não modificadas. Especificamente, o crescimento de *S. mutans* e *P. gingivalis* foram ambos reduzidos de 45 a 85% nas amostras de TiO₂ impregnadas com NPZnO em comparação com os controles de TiO₂ após 7 dias de cultura. Ao examinar o mecanismo de ação, foi descoberto pela primeira vez, que as amostras de TiO₂ impregnadas com NPZnO inibiram a expressão de adesão bacteriana do *S. mutans* proporcionaram melhora nas propriedades antibacterianas.

Além de sua capacidade antimicrobiana, as NPZnO têm demonstrado serem capazes de reduzir a expressão de algumas metaloproteinases (MMP). Recentemente foi relatado que o zinco reduz efetivamente a degradação de colágeno mediada por MMP⁸³. O zinco tem papel importante na estruturação das proteínas, levando à proteção dos locais de clivagem das MMPs⁶³. Autores relataram que o zinco pode não apenas agir como inibidor de MMP, mas também influenciar nas vias de sinalização e estimular um efeito metabólico na mineralização do tecido duro⁶⁴. As inibições das MMPs nas interfaces da ligação resina-dentina protegeriam as fibrilas de colágeno da degradação

Assim, a incorporação de NPZnO tem sido proposta em adesivos dentinários, para lhes conferirem melhoria nanomecânica por meio da inibição de MMPs⁸³ e pela formação de cristais minerais dentro da interface resina-dentina. Além disso, substratos de dentina afetados por cárie podem ser alterados quando os adesivos dopados de NPZnO forem usados, resultando em remineralização funcional e bioquímica.

Essa capacidade das NPZnO em inibir as MMPs se deve pelo fato do zinco ser um elemento essencial encontrado em muitas enzimas. A produção de ERO, até um certo nível, melhora a migração, adesão e proliferação de fibroblastos, além de apresentar capacidade anti-inflamatória e antioxidante⁸⁴.

A nanotecnologia conseguiu produzir um forte impacto na Odontologia. Há uma variedade de nanoestruturas incorporadas nos materiais dentários com aplicações inovadoras, na qual lhes conferem grandes vantagens, como auxílio na prevenção de lesões de cáries, reparo biomimético, adesão dentária de restaurações e atividade antibacteriana. No entanto, são necessárias mais investigações, a fim de avaliar os efeitos sinérgicos das NP para entender os possíveis riscos, se houver, para a saúde humana e se suas características podem ser melhoradas.

4 MATERIAL E MÉTODO

Para a realização do estudo foram utilizados géis experimentais desenvolvidos em associação com três tipos de NP (NPHA, NPTiO₂, NPZnO), com o VB F18, NaF 5%, um CIV convencional e Clorexidina (Quadro 1).

Quadro 1- Material, composição e fabricante. Araraquara, 2020

Material	Composição	Fabricante
NPTiO ₂	TiO ₂	Sigma- Aldrich, EUA
NPHA	Ca ₅ (PO ₄) ₃ (OH)	Sigma- Aldrich, EUA
NPZnO	ZnO	Sigma- Aldrich, EUA
VB F18	Si, Ca, Na, K, Mg e Ph	Vetra Ltda, Brasil
NaF	NaF [22.600ppm]	Sigma- Aldrich, EUA
Ketac Molar	Pó: Al, Ca, La e SiF ₆ ²⁻ Líquido: CO ₃ H ₂ , C ₄ H ₆ O ₆ e H ₂ O o	3M, EUA
CLX	(C ₂₂ H ₃₀ Cl ₂ N ₁₀)	Sigma- Aldrich, EUA

Fonte: Elaboração própria.

Todos os grupos (géis experimentais) foram compostos por 10% de glicerina vegetal, 2% de gel de carboximetilcelulose de sódio (CMC) e pelas NP, VB e NaF.

Durante estudo piloto para a preparação dos géis experimentais, utilizou-se o gel CMC em duas concentrações (2% e 3%). Após a adição das NP, NaF ou VB observou que o gel de 2% apresentou melhor homogeneização do sistema. Os grupos experimentais estão descritos no quadro 2.

Quadro 2- Grupos experimentais. Araraquara, 2020

Géis (grupos) Experimentais	Composição
0 (Controle negativo)	glicerina vegetal 10% + CMC 2%
1	NPHA 3%
2	NPTiO ₂ 3%
3	NPZnO 3%
4	VB F18 3%
5	NaF 5%
6	NPTiO ₂ 3% + NaF 5%
7	NPZnO 3% + NaF 5%
8 (Controle positivo)	CLX Gel 0,12%
9	NPHA 3% + NaF 5%
10	VB F18 3%+ NaF 5%

Fonte: Elaboração própria.

Os grupos experimentais foram numerados pelo pesquisador A e os testes propostos foram realizados pelo pesquisador B, previamente calibrado e cego quanto a identificação dos grupos.

Para avaliar a confiabilidade dos dados coletados intra-examinador, foi realizado o estudo de reprodutibilidade. O pesquisador B fez validação dos corpos de prova, em duplicata, relativos aos testes propostos. A concordância inter-examinador foi realizada por meio do Coeficiente de Correlação Intraclassa (σ). Neste estudo o nível de concordância foi de 0,90.

4.1 Desenvolvimento dos Géis

4.1.1 Preparo do gel CMC

Adicionou-se nipagim à água purificada a 75°C, e a mistura foi homogeneizada com auxílio de bastão de vidro, em ambiente asséptico em câmara de fluxo laminar horizontal. O CMC foi adicionado aos poucos sob agitação em agitador (modelo VX-200, São Paulo) a 400 rpm por 30 minutos até sua total dissolução. A solução final (gel) foi esterilizada em autoclave a 121°C durante 15 min. No quadro 3 encontram-se os componentes do gel CMC 2%.

Quadro 3 - Componentes gel CMC 2%. Araraquara, 2020

Componentes	Quantidade	Função
Gel carboximetilcelulose de sódio (CMC)	0,4g	base
Nipagim (metilparabeno 0,18%)	0,036g	conservante
Água purificada qsp 20g	19,57g	veículo
Glicerina Vegetal	0,036 g	veículo

Fonte: Elaboração própria.

4.1.2 Preparo dos Géis Experimentais

Por meio de balança analítica (Gehaka Ltda- modelo BG 440), foram pesadas as NP e o VB de modo a resultar geis experimentais com 3% de NP e/ou VB.

As NP diluídas na glicerina vegetal (NC Aromas, Brasil) foram adicionadas à solução gel CMC (Adcer, São Paulo – SP), com auxílio de um bastão de vidro, em um

tubo falcon. Logo após, o pH das soluções foi aferido com auxílio de um PHmetro (modelo 8010, Qualxtron, Brasil), na busca de um pH neutro. O mesmo processo foi realizado com o VB.

4.2 Atividade Antibacteriana – Método de Difusão em Àgar/Técnica do Disco

Cepas de *S. mutans* ATCC25175 (Coleção de Culturas Tropical Fundação André Toselo) foram mantidas congeladas até o momento de sua utilização.

As cepas foram reativadas em ágar BHI (Brain Heart Infusion, Brain Heart Infusion, Becton Dickinson and Company, Sparks, MD, EUA) por 48 h em incubadora (37°C e 5% CO₂). Em seguida, com auxílio de uma alça bacteriológica, as colônias foram inseridas em um tubo de vidro esterilizado e ajustadas em solução salina esterilizada (0,85%) (NaCl, Sigma- Aldrich- EUA) para obter concentração de 10⁸ UFC mL⁻¹ (Unidades Formadoras de Colônia por mL), utilizando-se um espectrofotômetro (Bel photonics, modelo 1105) no comprimento de onda de 630 nm.

Em placas de petri foi vertido o meio de cultura Mueller Hinton (Kasvi, Brasil). Após sua solidificação, 100 µL do inóculo de *S. mutans* foi semeado com uma alça de *drigalski*, realizando-se a semeadura em três direções para garantir a total deposição do mesmo sobre o meio de cultura (Figura 1). Discos de papel filtro (6mm) secos e estéreis foram dispostos em placas de petri e em cada um deles foi transferido 10µL de cada gel experimental, com auxílio de uma pipeta.

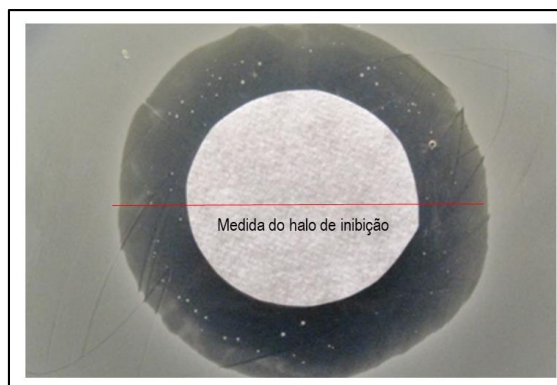
O controle negativo foi a glicerina vegetal 10% + CMC 2% (Grupo 0) e o controle positivo, a CLX gel a 0,12% (Grupo 8). As placas de petri foram incubadas em estufas a 37±1 °C por 24h, e decorrido este período, mensurou-se o halo de inibição de crescimento microbiano (Figura 2) com auxílio de um paquímetro digital (Mitutoyo 500-196, EUA).

Figura 1- Inóculo de *S. mutans* sobre meio Mueller Hinton para o teste de difusão em ágar. Araraquara, 2020



Fonte: Elaboração própria.

Figura 2- Medida do halo de inibição para avaliação da atividade antibacteriana. Araraquara, 2020.



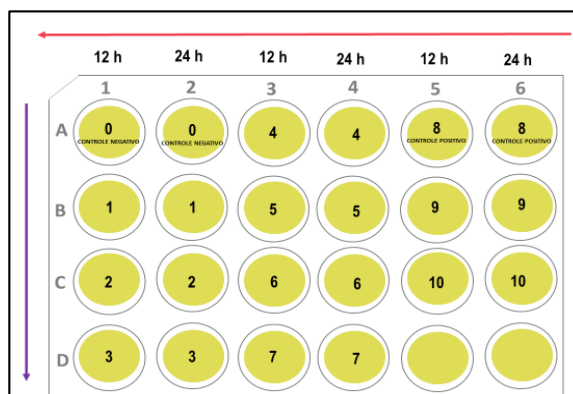
Fonte: Elaboração própria.

4.3 Atividade Antibiofilme

Para avaliação da atividade antibiofilme sob ação dos géis experimentais, foi utilizada uma placa de poliestireno, com 24 poços de fundo chato. Os poços foram preenchidos com 220 μ L de suspensão de *S. mutans* em solução salina e 1980 μ L de meio cariogênico. O último foi composto de 100 mL de água destilada, 3,7 g de BHI, 1 g de glicose (D-Glucose Anidra, Brasil), 2 g de sacarose (Cristalçúcar União, Brasil) e 0,5 g de extrato de levedura (Becton Dickinson and Company, EUA). Essa solução foi esterilizada em autoclave a 120°C por 20 minutos e posteriormente resfriada em temperatura ambiente.

Na direção vertical da placa foi feita a marcação para os 11 grupos experimentais, e na horizontal, marcação para os tempos de estudo, 12h e 24h. Todo o teste para contagem de colônias foi realizado em triplicata. (Figura 3).

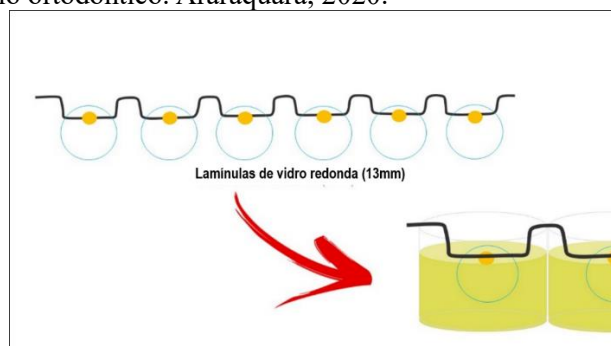
Figura 3- Esquema da placa de 24 poços de acordo com os grupos experimentais e tempo de incubação. Araraquara, 2020



Fonte: Elaboração própria.

Para o crescimento do biofilme foram utilizadas lamínulas de vidro redondas (13mm de diâmetro), suspensas nos poços com auxílio de um varal confeccionado com fio ortodôntico, para evitar a adesão dos microrganismos pela força da gravidade (Figura 4).

Figura 4 - Lamínulas de vidro suspensas em um dispositivo de fio ortodôntico. Araraquara, 2020.



Fonte: Elaboração própria.

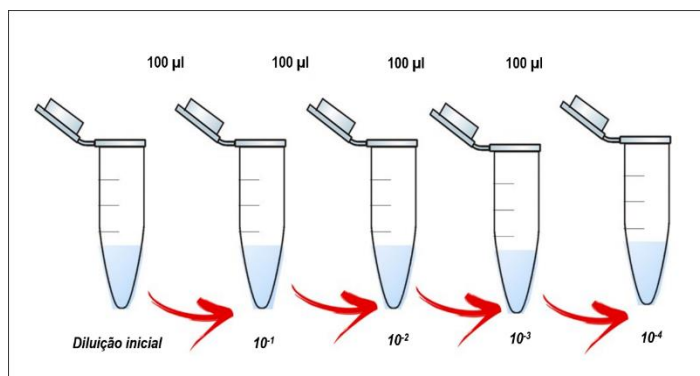
Para cada tempo de incubação, foram realizados os mesmos procedimentos.

Com auxílio de uma pipeta automática, o meio foi retirado completamente de cada poço, em seguida, foi injetado 2ml de PBS esterilizado para lavagem da superfície das lamínulas, sendo este procedimento repetido por 3 vezes.

Após a lavagem, as lamínulas foram cuidadosamente retiradas dos poços com uma pinça esterilizada e colocadas em um tubo de vidro contendo 10 mL de PBS. Estes tubos foram agitados em um agitador “Vortex” por 1 min, e imersos em água dentro de uma cuba ultrassônica, por 8 min (Digital Ultrasonic Cleaner, Kondortech), com força de limpeza de 160 W, para a desagregação do biofilme.

O método utilizado para contagem de colônias foi o da diluição seriada, no qual, a partir da suspensão resultante, após a desagregação de biofilme, quatro diluições foram realizadas (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}). Da solução inicial para o tubo com 9 ml de solução salina inoculou-se 1 ml, originando a diluição 10^{-1} . Depois de um tubo para o outro inoculou-se 100 μ L, pois em cada tubo havia 900 μ L de solução salina, sendo originadas assim as demais diluições (Figura 5).

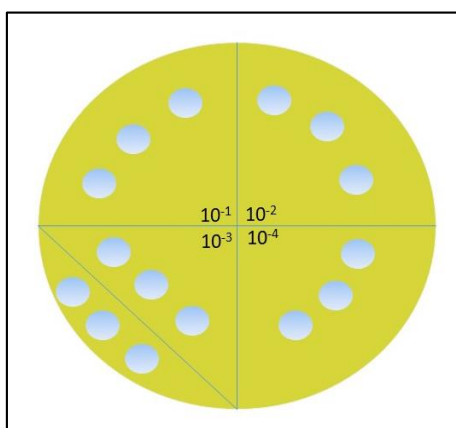
Figura 5 - Esquema de diluição seriada. Araraquara, 2020



Fonte: Elaboração própria.

Após a obtenção das diluições, estas foram plaqueadas pelo método da gota em placas de petri no meio BHI, onde foram depositadas 3 gotas de 5 µL (Figura 6). As placas foram incubadas a 37°C por 24h, para que ocorresse a multiplicação bacteriana a ponto de surgirem colônias visíveis a olho nu. Para a contagem das unidades formadoras de colônia (UFC), foi utilizado um contador de colônias digital (Phoenix, Modelo CP 600 Plus, EUA), sendo que cada colônia correspondeu a uma UFC. Segundo esta técnica de contagem, deve-se escolher as placas que apresentam de 20 a 100 UFC para cálculo do número de UFC/ml.

Figura 6- Esquema da técnica da gota para avaliação antibacteriana. Araraquara, 2020



Fonte: Elaboração própria.

4.4 Análise do Biofilme em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A observação em MEV (Jeol, modelo JSM 5900 LV) da aderência e formação de biofilme de *S mutans* sobre a superfície das lamínulas foi realizada após 24h de incubação. Os procedimentos para incubação foram os mesmos realizados para o

experimento de contagem de UFC, até o momento da lavagem com PBS.

Logo após, as lamínulas foram imersas em glutaraldeído a 2,5% durante 1 h para a fixação dos microrganismos, seguida por três lavagens com PBS, desidratação gradual em séries de álcoois (70, 90% por 1h cada um e cinco lavagens por 15 minutos cada de álcool absoluto). As lamínulas foram secas em temperatura ambiente e colocadas em dessecador a vácuo por 7 dias com sílica gel.

Como as amostras analisadas não apresentavam condutividade elétrica, foram metalizadas e cobertas com liga de ouro-paládio e para fixa-las nos *stubs* foi utilizado um adesivo condutor.

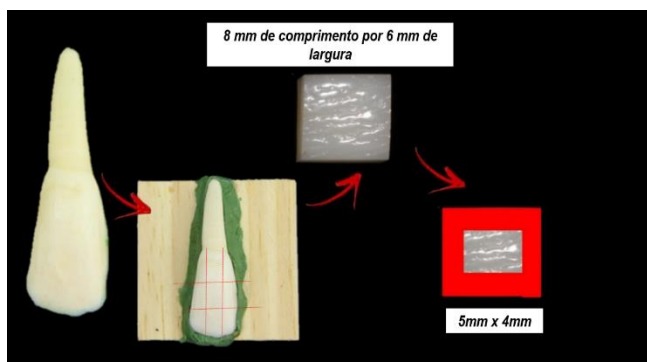
4.5 Indução Artificial de Lesão de Mancha Branca em Esmalte e de Cárie em Dentina (modelo mono espécie) - Preparo dos Dentes Bovinos

Após aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) sob número de protocolo 06/2018 (anexo A) foram selecionados incisivos bovinos sem alterações de forma, cor, sem trincas ou fraturas. Os dentes foram limpos e mantidos congelados até o início do experimento. A partir da superfície vestibular dos dentes foram obtidos espécimes medindo 8,0 mm de comprimento por 6,0mm de largura e com a altura referente a espessura da dentina. Para isso, foram utilizados discos diamantados acoplados a um cortador metalográfico (Isomet 2000, USA) sob refrigeração.

A superfície vestibular (esmalte) dos espécimes foi polida com lixas de carbetto de silício nº 2511 (Hawe Occlubrush, Switzerland) e pasta para polimento (Extec, USA). Logo após, foram limpos em ultrassom (Unique, Ultrasonic Cleaner, Brazil) com água destilada, durante 10 minutos, para remoção de resíduos.

Receberam então, duas camadas de verniz (Colorama, Brasil), em toda extensão de suas superfícies, deixando exposta apenas uma área de 5mm x 4mm em sua face vestibular. (Figura 7). Foram então fixados em lamínulas de vidro e estas, em fios ortodônticos, quando o conjunto foi esterilizado em autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Figura 7- Dentes bovinos seccionados em espécimes e com a superfície impermeabilizada com verniz para a indução de mancha branca. Araraquara, 2020



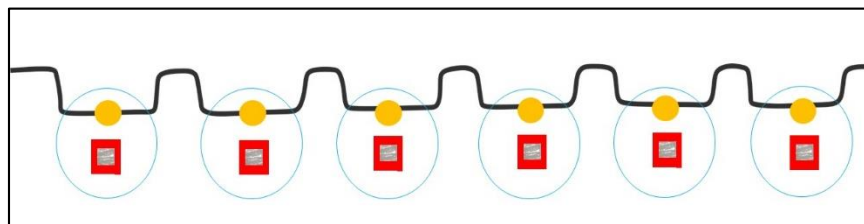
Fonte: Elaboração própria.

Foram utilizadas cepas de *S. mutans* ATCC25175 (Coleção de Culturas Tropical Fundação André Toselo), as quais foram mantidas congeladas até o momento de sua utilização.

As cepas foram reativadas em ágar BHI (Brain Heart Infusion, Brain Heart Infusion, Becton Dickinson and Company, Sparks, MD, EUA) por 48 h em incubadora (37°C e 5% CO₂). Em seguida, com auxílio de uma alça bacteriológica, as colônias foram colocadas em um tubo de vidro esterilizado e ajustadas em solução salina estéril (0,85%) (NaCl, Sigma Aldrich) para uma concentração de 10⁸ UFC mL⁻¹ (Unidades Formadoras de Colônia por mL) utilizando-se um espectrofotômetro (Bel photonics, modelo 1105) no comprimento de onda de 630 nm.

O conjunto (blocos de dentes bovinos, lamínulas de vidro e fio ortodôntico) (Figura 8) foi inserido em placa de 24 poços de fundo chato na qual foi colocado 1980 µL de meio cariogênico e 180 µL de inóculo. Os blocos de esmalte, suspensos pelo fio ortodôntico, ficaram imersos em meio cariogênico por período total de 14 dias em incubadora a 37°C e 5% CO₂, para formação de mancha branca e 21 dias para indução de lesão de cárie em dentina (tempo estipulado em decorrência dos resultados do estudo piloto). A troca desse meio ocorreu a cada 48 horas, por outro meio recém-preparado, porém, sem inoculação de novos microrganismos. Concluído o protocolo de indução de mancha branca ou indução de cárie, o biofilme formado sobre os dentes foi removido com gaze estéril, e os dentes foram lavados abundantemente em água corrente.

Figura 8- Esquema do conjunto para desmineralização dos espécimes de dentes bovinos. Araraquara, 2020



Fonte: Elaboração própria.

4.5.1 Aplicação dos Géis sobre a Dentina Afetada

A dentina infectada foi removida delicadamente, com auxílio de escavador de dentina (Golgran, Brasil) afiado e aplicando leve pressão de modo a preservar a dentina afetada.

Sobre a dentina afetada, inicialmente foi realizado o condicionamento com ácido poliacrílico a 10% por 10 segundos, a região foi lavada com auxílio de seringa tríptica e seca com papel absorvente. Logo após, dentina foi condicionada com 5 μ L dos géis experimentais com auxílio de um pincel descartável. Os géis foram mantidos passivamente sobre a superfície de dentina afetada por 60 segundos e os excessos removidos com papel absorvente. Em seguida com auxílio de seringa Centrix (DFL, Brasil) foi inserido o CIV convencional sobre a dentina afetada.

O material restaurador permaneceu em posição por 21 dias a 37°C em saliva artificial com pH de aproximadamente 7,4. A saliva não foi substituída, pois o monitoramento diário de seu pH (pHmetro modelo 8010, Qualxtron, Brasil), demonstrou estabilidade. Foi utilizado mesmo protocolo para os diferentes géis experimentais.

4.5.2 Aplicação dos Géis sobre a Lesão de Mancha Branca

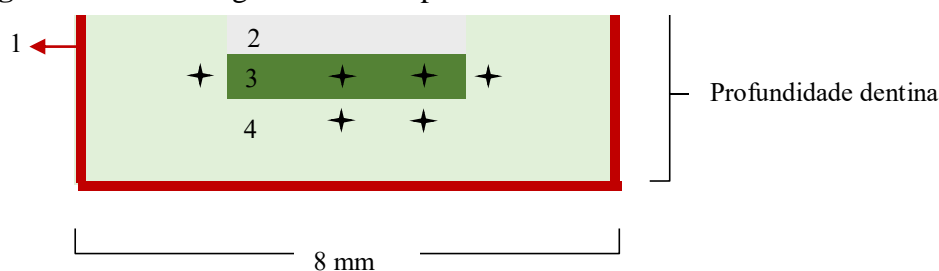
Sobre a lesão de mancha branca foi aplicado 5 μ L de cada gel experimental, com auxílio de um pincel descartável e mantido passivamente por 60 segundos, sendo os excessos removidos com papel absorvente. Logo após a aplicação, o dente permaneceu em saliva artificial com pH de aproximadamente 37°C por 7 dias. A saliva não foi substituída, pois o monitoramento diário de seu pH (pHmetro modelo 8010, Qualxtron, Brasil), demonstrou estabilidade.

4.5 Teste de Microdureza KNOOP

Foram utilizados 8 espécimes para análise da microdureza na dentina afetada e 8 espécimes na lesão de mancha branca

Após decorridos os sete dias de armazenamento, os espécimes foram fixados em dispositivos de madeira com auxílio de godiva (Kota, Brasil) para serem seccionados em cortador metalográfico com auxílio de discos diamantado. A secção dos espécimes foi realizada no sentido longitudinal, de modo que as paredes laterais e o fundo da lesão ficaram expostos (Figura 9). Foram realizadas medidas de dureza sobre a dentina afetada e ao redor da mesma.

Figura 9 - Corte longitudinal do espécime de dentina bovino



- 1- Verniz
- 2- CIV (ketac Molar Easymix)
- 3- Dentina afetada tratada superficialmente com diferentes géis
- 4- Dentina hígida
- ✦ Edentações (sobre a dentina afetada e ao seu redor)

A leitura da microdureza KNOOP foi realizada por meio de microdurômetro digital (Micromet 2100, EUA), aplicando-se carga de 50 kgf durante 30s sobre as superfícies dos espécimes⁶. Os resultados inicialmente expressos em micrometros (μm), foram transformados em valores de dureza (KHN) diretamente pela máquina de teste.

Para a avaliação da microdureza do esmalte com lesão de mancha branca foram realizados 8 leituras equidistantes, na área correspondente a indução da mancha branca, seguindo o mesmo protocolo descrito acima. Finalmente, foram obtidas as médias para todos os espécimes.

4.6 Morfologia da Interface Dentina/Restauração e da Face Interna do Esmalte

Foi utilizado 1 espécime de cada grupo experimental para avaliação da morfologia.

Para a análise da morfologia da interface dentina-restauração, realizou-se fratura do espécime com auxílio de um cinzel e martelo cirúrgicos. Os fragmentos foram montados em *stubs* de alumínio, cobertos por uma fina camada de ouro-paládio e submetidos a vácuo (10 mA). No MEV foi utilizada aceleração de voltagem de 15kV e distância de trabalho de 10 mm, com o aumento de 500x.

Para a análise da morfologia do esmalte (lesão de mancha branca) após tratamento com os géis, os espécimes foram fraturados e receberam o mesmo protocolo de preparo para análise em MEV.

4.7 Teste de Rugosidade Superficial

Foram utilizados 8 espécimes para análise da rugosidade na dentina afetada e 8 na lesão de mancha branca.

Para avaliar a rugosidade da dentina afetada e da lesão de mancha branca do esmalte após o tratamento com os géis experimentais, utilizou-se um rugosímetro (Mitutoyo, EUA),

Para cada corpo de prova foram realizadas cinco leituras de forma aleatória, sempre passando pelo centro do espécime e percorrendo 4 mm sobre sua superfície. O protocolo utilizado para a determinação da rugosidade superficial (Ra) foi baseado no cálculo da média (μm) das 5 leituras.

4.8 Análise Estatística

Neste estudo, foram avaliadas as variáveis atividade antibacteriana (halo de inibição), antibiofilme (contagem de UFC) e avaliação qualitativa do biofilme em MEV em 11 níveis (controle negativo, NPHA 3%, NPTiO₂ 3%, NPZnO 3%, VB F18 3%, NaF 5%, NPTiO₂ 3% + NaF 5%, NPZnO 3%+ NaF 5%, CLX 0, 12%, NPHA 3%+ NaF 5%, VB F18 3%+ NaF 5%).

A microdureza KNOOP (KHN) e a rugosidade (Ra) da dentina afetada e lesão branca em esmalte foram avaliadas em doze níveis, sendo 12 níveis correspondente aos grupos experimentais citados acima, além da dentina afetada e da mancha branca.

Após o agrupamento dos dados, estes foram analisados estatisticamente utilizando o software SPSS for Windows (versão 15.0; SPSS Inc.). Todas as análises foram realizadas utilizando-se $\alpha = 0,05$.

Para a variável halo de inibição e contagem de colônias não foram constatados

distribuição normal e homogeneidade de variância, assim, realizou-se o teste não paramétrico de Kruskall Wallis, seguido do teste de pós hoc de Dunn. A variável UFC foi avaliada pelo teste Anova two-way e pós teste de Bonferroni.

Aderência à normalidade foi detectada para as variáveis microdureza em dentina e esmalte, rugosidade em dentina e esmalte. Dessa forma foi aplicado o teste Anova One-Way. Os dados foram analisados por meio de análise de variância com correção de Welch. O teste de Games Howell foi aplicado para identificação das diferenças entre os grupos por meio de comparações múltiplas, adotando-se nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS

A tabela 1 apresenta a média e o desvio padrão de cada um dos grupos experimentais, onde pode-se observar que os grupos com melhor atividade antibacteriana foram: G2, G3, G4, G5, G6, G8 e G10.

Tabela 1- Média e desvio-padrão do halo de inibição (mm) dos géis experimentais após 24 horas de incubação. Araraquara, 2020.

Grupos	Composição	Halo de Inibição
G0	Glicerina (Controle negativo)	6 (0,00)D
G1	NPHA 3%	6 (0,00)D
G2	NPTiO ₂ 3%	15,18 (0,10)AB
G3	NPZnO 3%	15,27 (0,17)AB
G4	VB F18 3%	10,06 (0,05)ABCD
G5	NaF 5%	13,88 (0,19)ABC
G6	NPTiO ₂ 3% + NaF 5%	9,03 (0,04)BCD
G7	NPZnO 3% + NaF 5%	7,12 (0,13)CD
G8	CLX 0,12% (Controle positivo)	16,09 (0,08)A
G9	NPHA 3% + NaF 5%	7,15 (0,17)CD
G10	VB F18 3% + NaF 5%	10,91 (0,08)ABCD

Letras maiúsculas distintas indicam diferença estatística (Teste de Kruskal Wallis seguido do pós teste de Dunn, $p < 0,05$)

Fonte: Elaboração própria.

A tabela 2 apresenta o sumário da análise de variância dos géis experimentais e suas interações com a UFC/ml.

Tabela 2- Sumário da análise de variância para avaliação dos diferentes géis experimentais, e suas interações sobre a UFC/ml. Araraquara, 2020.

Efeito	SQ	gl	QM	P
Tempo	23914,020	1	23914,020	0,000*
Grupos* Tempo	29539,313	10	2953,931	0,000*
Resíduo	2815,722	176	15,998	
Total	96,823	119		

Fonte: Elaboração própria.

* Significante ($P < 0,05$)

Pode-se observar na tabela 3 as médias e desvio-padrão da contagem das unidades formadoras de colônias (UFC), de acordo com o tempo e géis experimentais.

Tabela 3 - Médias e desvio padrão da contagem das unidades formadoras de colônias (UFC), de acordo com o tempo e géis experimentais. Araraquara, 2020.

Grupos	Composição	Período	
		12 horas	24 horas
G0	Controle negativo (Glicerina)	7,33 (0,07) Aa	7,77 (0,07) Aa
G1	NPHA 3%	7,32 (0,07) Aa	6,33 (0,07) Bb
G2	NPTiO ₂ 3%	7,33 (0,07) Aa	3,64 (0,07) Bc
G3	NPZnO 3%	7,33 (0,07) Aa	5,80 (0,00) Bd
G4	VB F18 3%	3,89 (0,03) Ae	4,11 (0,03) Be
G5	NaF 5%	5,13 (0,05) Af	5,90 (0,00) Bf
G6	NPTiO ₂ 3% + NaF 5%	5,13 (0,05) Af	4,44 (0,07) Bg
G7	NPZnO 3% + NaF 5%	7,16 (0,05) Ah	7,66 (0,05) Bh
G8	Controle positivo (CLX 0, 12%)	5,27 (0,05) Ai	5,20 (0,00) Bi
G9	NPHA 3%+ NaF 5%	5,40 (0,00) Aj	7,24 (0,07) Bj
G10	VB F18 3% + NaF 5%	5,88 (0,04) Ak	6,57 (0,05) Bk

Letras maiúsculas distintas, no sentido horizontal, indicam diferença significativa. Letras minúsculas distintas, no sentido vertical, indicam diferença significativa (Teste Anova two-way, seguido do pós teste de Bonferroni, $p < 0,05$).

Fonte: Elaboração própria.

Observa-se que na tabela 3, quando se considera 12 horas de experimento, que o grupo com a menor formação de UFC foi o G4, seguido pelos grupos G5 e G6, ambos com NaF 5% em sua composição, sendo estes, melhores que o controle positivo (G8). Em 24 horas o grupo G2 apresentou maior eficácia, seguido pelo grupo G4.

A comparação de cada grupo, nos dois períodos de incubação, demonstra que, grupos com melhor desempenho em 12 horas como G4, G5, G9 e G10, tiveram sua eficácia comprometida após 24 horas.

Os grupos compostos por NP (G1, G2 e G3), assim como o G6 e G8 obtiveram melhor atividade antibiofilme em 24 horas. Os grupos compostos por VBF18 (G4 e G10) apresentaram os melhores resultados em 12 horas.

A tabela 4 apresenta o sumário da análise de variância dos géis experimentais e suas interações sobre a microdureza da dentina afetada ao redor da área restaurada (KHN).

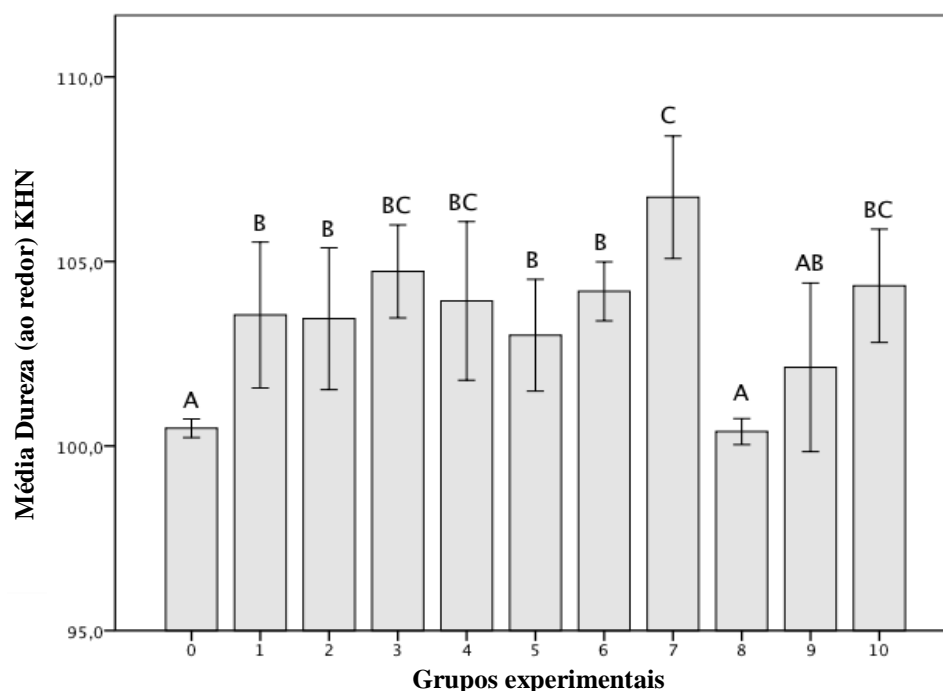
Tabela 4 - Sumário da análise de variância para avaliação dos grupos de géis experimentais, e suas interações sobre a microdureza da dentina afetada ao redor da área restaurada (KHN).

Efeito	SQ	gl	QM	P
Grupos	340,794	10	34,079	0,000*
Resíduo	245,112	99	2,476	
Total	585,906	109		

Fonte: Elaboração própria. * Significante ($P < 0,05$)

O Gráfico 1, ilustra os valores observados quanto a microdureza dos grupos experimentais.

Gráfico 1. Valores médios e desvios-padrão da microdureza da dentina afetada ao redor da área restaurada (KHN) para os grupos avaliados. Araraquara, 2020.



Grupos: 0- Glicerina (controle negativo); 1-NPHA 3%; 2-NPTiO2 3%; 3-NPZnO 3%; 4-VB F18 3%; 5-NaF 5%; 6-NPTiO2 3% + NaF 5%; 7-NPZnO 3%+ NaF 5%; 8-CLX 0, 12%; 9-NPHA 3%+ NaF 5%; 10-VB F18 3%+ NaF 5%. (Teste de Anova One- Way com correção de Welch pós-teste de Games Howell, $p < 0,05$). Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos.

Fonte: Elaboração própria.

Pode-se observar que todos os grupos experimentais apresentam valores de dureza superior em comparação com aqueles dos grupos controles G0 e G8, sendo que o G3, G4, G7 e G10 apresentaram os maiores valores entre todos os grupos.

A tabela 5 apresenta o sumário da análise de variância dos géis experimentais e suas interações sobre a microdureza (KHN) da dentina afetada adjacente a área restaurada.

Tabela 5 - Sumário da análise de variância para avaliação dos diferentes géis experimentais, e suas interações sobre a microdureza da dentina afetada adjacentes a área restaurada (KHN). Araraquara, 2020.

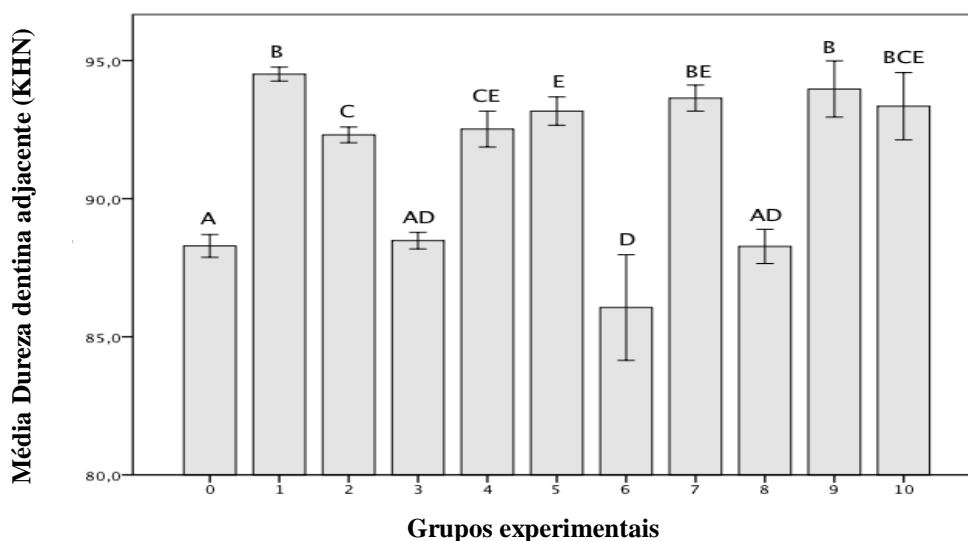
Efeito	SQ	gl	QM	P
Grupos	867,447	10	86,745	0,000*
Resíduo	70,879	99	1,716	
Total	938,326	109		

Fonte: Elaboração própria. * Significante ($P < 0,05$)

A partir da análise de variância com correção de Welch, na Tabela 5 pode-se observar que os fatores de variação exerceram influência sobre a microdureza ($P < 0,05$).

A partir da observação do gráfico 2, que representa os valores de microdureza da dentina afetada adjacentes à restauração (KHN), nota-se que não houve diferença estatística entre G0, G3 e G8, os quais apresentaram os menores valores para microdureza. Os maiores valores de dureza foram observados nos grupos G1, G7, G9 e G10.

Gráfico 2. Valores médios e desvios-padrão da microdureza (KHN) da dentina afetada adjacentes a restauração para os grupos avaliados. Araraquara, 2020



Grupos: 0- Glicerina (controle negativo); 1-NPHA 3%; 2-NPTiO₂ 3%; 3-NPZnO 3%; 4-VB F18 3%; 5-NaF 5%; 6-NPTiO₂ 3% + NaF 5%; 7-NPZnO 3%+ NaF 5%; 8-CLX 0, 12%; 9-NPHA 3%+ NaF 5%; 10-VB F18 3%+ NaF 5%. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos (Teste de Anova One- Way com correção de Welch pós-teste de Games Howell, $p < 0,05$)

Fonte: Elaboração própria.

A tabela 6 apresenta o sumário e análise de variância para avaliação dos diferentes géis experimentais e sua influência sobre microdureza do esmalte ($P < 0,05$).

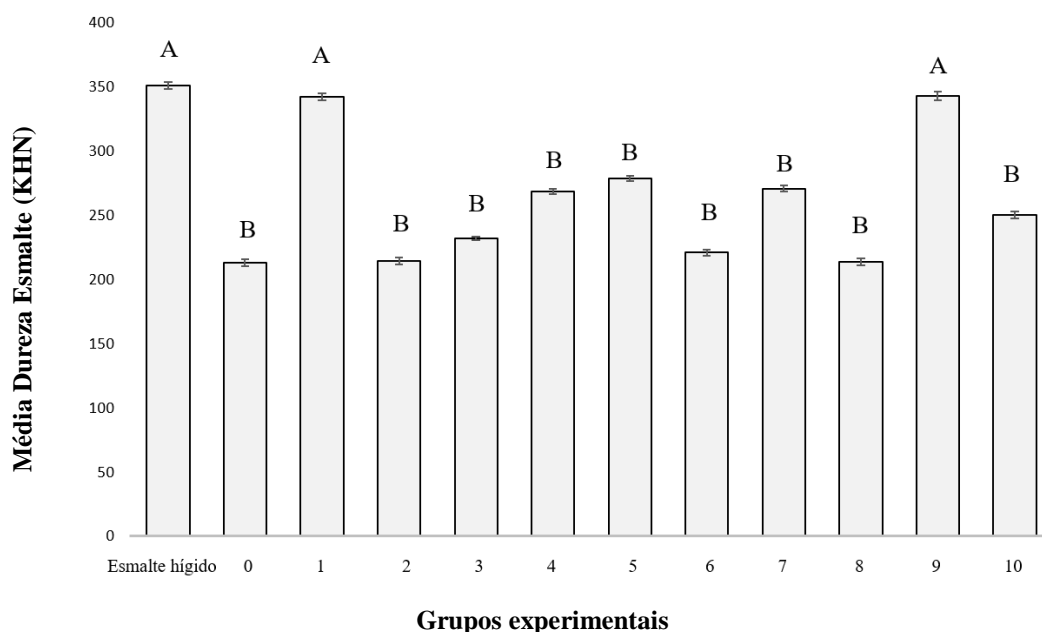
Tabela 6 - Sumário da análise de variância para avaliação dos diferentes grupos, e suas interações sobre microdureza (KHN) do esmalte.

Efeito	SQ	gl	QM	P
Grupos	,330	9	,100	0,000*
Resíduo	,115	102	,001	
Total	,445	111		

Fonte: Elaboração própria. * Significante ($P < 0,05$)

O gráfico 3 apresenta os valores observados quando a microdureza do esmalte dos grupos experimentais. Observa-se que os grupos G1 e G9 apresentaram os maiores valores de microdureza do esmalte, apresentando resultados similares ao esmalte hígido.

Gráfico 3. Valores médios e desvios-padrão da microdureza do esmalte (KHN) para os grupos avaliados. Araraquara, 2020.



Grupos: 0- Glicerina (controle negativo); 1-NPHA 3%; 2-NPTiO2 3%; 3-NPZnO 3%; 4-VB F18 3%; 5-NaF 5%; 6-NPTiO2 3% + NaF 5%; 7-NPZnO 3%+ NaF 5%; 8-CLX 0, 12%; 9-NPHA 3%+ NaF 5%; 10-VB F18 3%+ NaF 5%. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os os grupos (teste de Anova One-Way com correção de Welch pós teste de Games Howell, $p < 0,05$)

Fonte: Elaboração Própria

A partir da análise de variância com correção de Welch, a Tabela 7 demonstra que

os fatores de variação estudados para os diferentes géis experimentais exerceram influência sobre a rugosidade da dentina ($P < 0,05$).

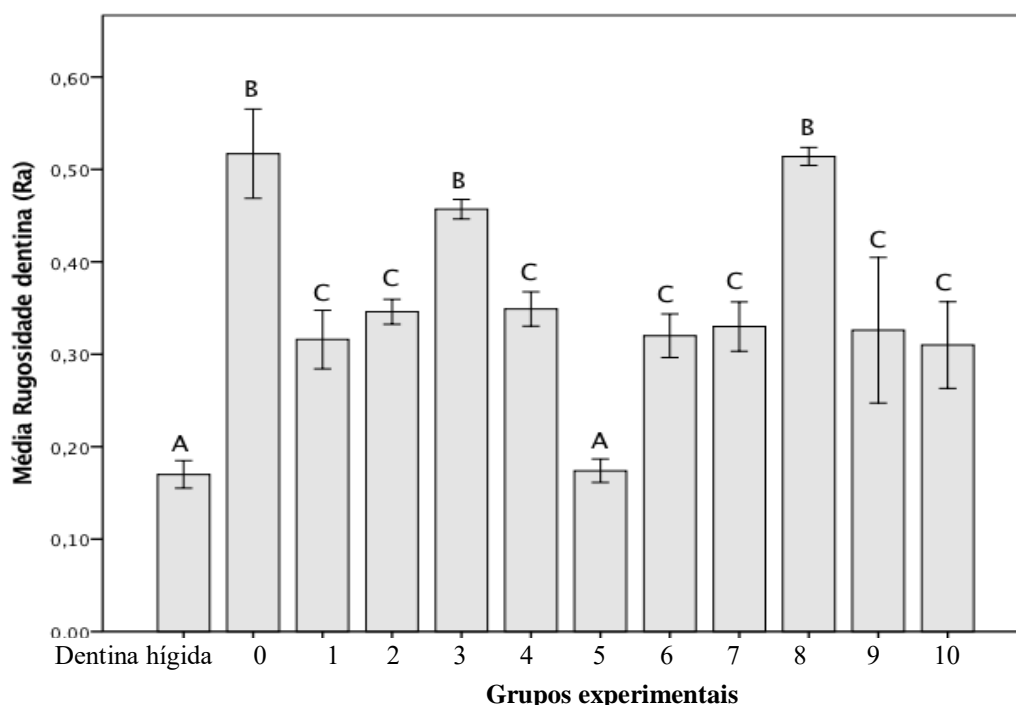
Tabela 7 - Sumário da análise de variância para avaliação dos diferentes grupos, e suas interações sobre a rugosidade (Ra) da dentina. Araraquara, 2020.

Efeito	SQ	gl	QM	P
Grupos	,338	11	,122	0,000*
Resíduo	,127	108	,001	
Total	1,465	119		

Fonte: Elaboração própria. * Significante ($P < 0,05$)

O gráfico 4 apresenta os valores observados quando a rugosidade da dentina dos grupos experimentais. Observa-se que o grupo G5 apresentou o menor valor da rugosidade, sendo este, estatisticamente igual a rugosidade da dentina hígida.

Gráfico 4. Valores médios e desvios-padrão da rugosidade da dentina (Ra) para os grupos avaliados. Araraquara, 2020.



Grupos: 0- Glicerina (controle negativo); 1-NPHA 3%; 2-NPTiO₂ 3%; 3-NPZnO 3%; 4-VB F18 3%; 5-NaF 5%; 6-NPTiO₂ 3% + NaF 5%; 7-NPZnO 3%+ NaF 5%; 8-CLX 0, 12%; 9-NPHA 3%+ NaF 5%; 10-VB F18 3%+ NaF 5%. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos (teste de Anova One-Way com correção de Welch pós teste de Games Howell, $p < 0,05$).

Fonte: Elaboração própria.

A partir da análise de variância com correção de Welch, a Tabela 8 demonstra que os fatores de variação estudados para os diferentes géis experimentais exerceram influência sobre a rugosidade do esmalte ($P < 0,05$).

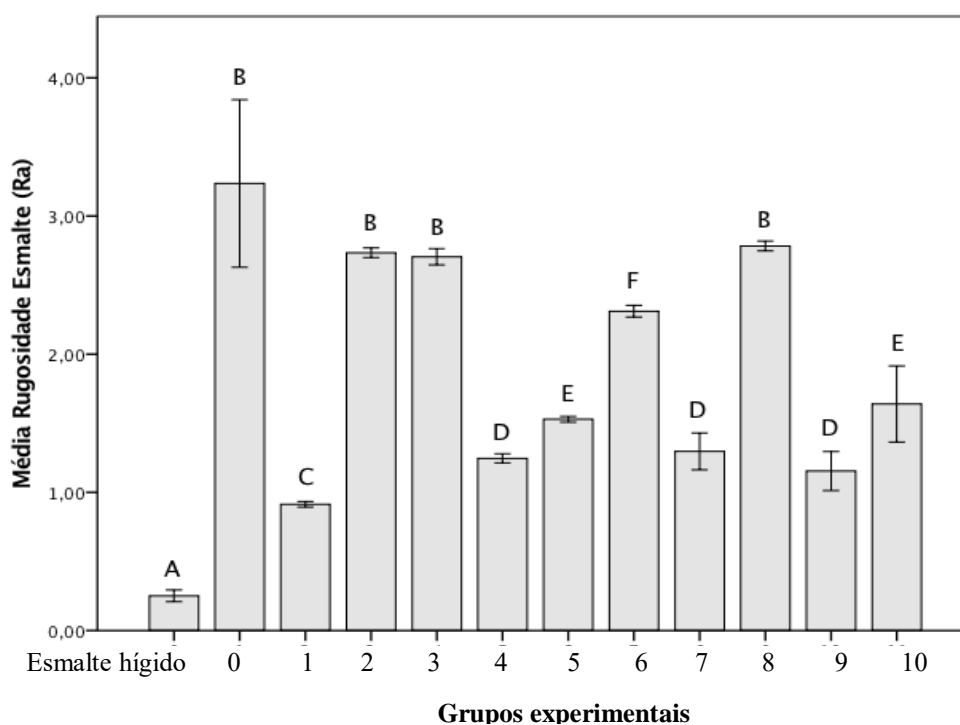
Tabela 8 - Sumário da análise de variância para avaliação dos diferentes grupos, e suas interações sobre a rugosidade do esmalte (Ra). Araraquara, 2020

Efeito	SQ	gl	QM	P
Grupos	92,386	11	8,399	0,000*
Resíduo	4,437	108	,041	
Total	96,823	119		

Fonte: Elaboração própria. * Significante ($P < 0,05$)

O gráfico 5 apresenta os valores observados quanto a rugosidade do esmalte dos grupos experimentais. O grupo G1 apresentou os menores valores de rugosidade do esmalte, seguido dos grupos G4, G7 e G 9.

Gráfico 5- Valores médios e desvios-padrão da rugosidade do esmalte (Ra) para os grupos avaliados. Araraquara, 2020

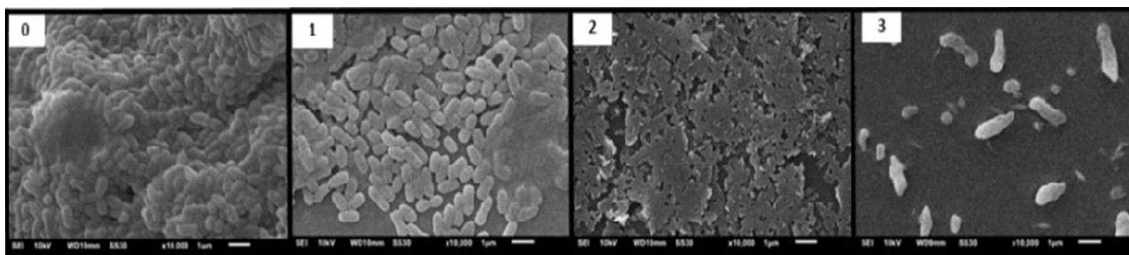


Grupos: 0- Glicerina (controle negativo); 1-NPHA 3%; 2-NPTiO₂ 3%; 3-NPZnO 3%; 4-VB F18 3%; 5-NaF 5%; 6-NPTiO₂ 3% + NaF 5%; 7-NPZnO 3%+ NaF 5%; 8-CLX 0, 12%; 9-NPHA 3%+ NaF 5%; 10-VB F18 3%+ NaF 5%. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos (Teste de Anova One-Way com correção de Welch pós teste de Games Howell, $p < 0,05$).

Fonte: Elaboração própria.

A figura 10 representa a imagens dos biofilmes (24horas) após a utilização dos géis experimentais.

Figura 10. Imagens em MEV do biofilme (24h) *S mutans* com os diferentes géis experimentais (10.000X). Araraquara, 2020.



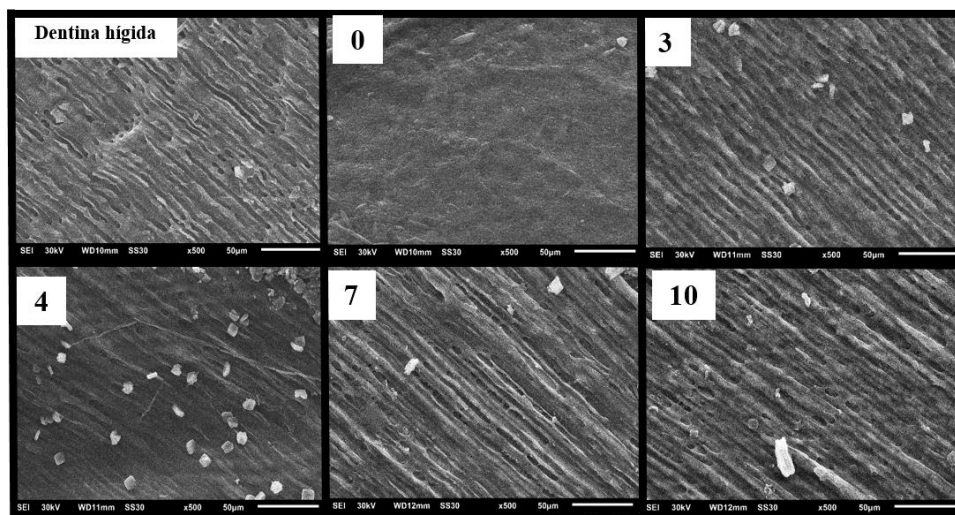
Grupos: 0- Glicerina (controle negativo); 1-NPHA 3%; 2-NPTiO₂ 3%; 3-NPZnO 3%.

Fonte: Elaboração própria.

Na figura 10 podemos notar no G0 (controle negativo) a formação de um biofilme com células abundantes bem estruturado e organizado. No G1 observamos uma redução significativa do *S mutans*. No grupo 2 (NPTiO₂) observou-se deposição de uma camada de gel sobre o biofilme. No G3, encontra-se quantidade bem reduzida de bactérias com padrão de morfologia celular diferente do grupo controle negativo, característico de morte celular.

A Figura 11 representa imagens em MEV da dentina após aplicação dos géis experimentais. Observa-se que os grupos G4 e G10 apresentaram túbulos dentinários expostos, semelhante a dentina hígida e partículas que sugerem ser fragmentos de VB.

Figura 11. Imagens em MEV (500X) da dentina após aplicação dos géis experimentais. Araraquara, 2020.

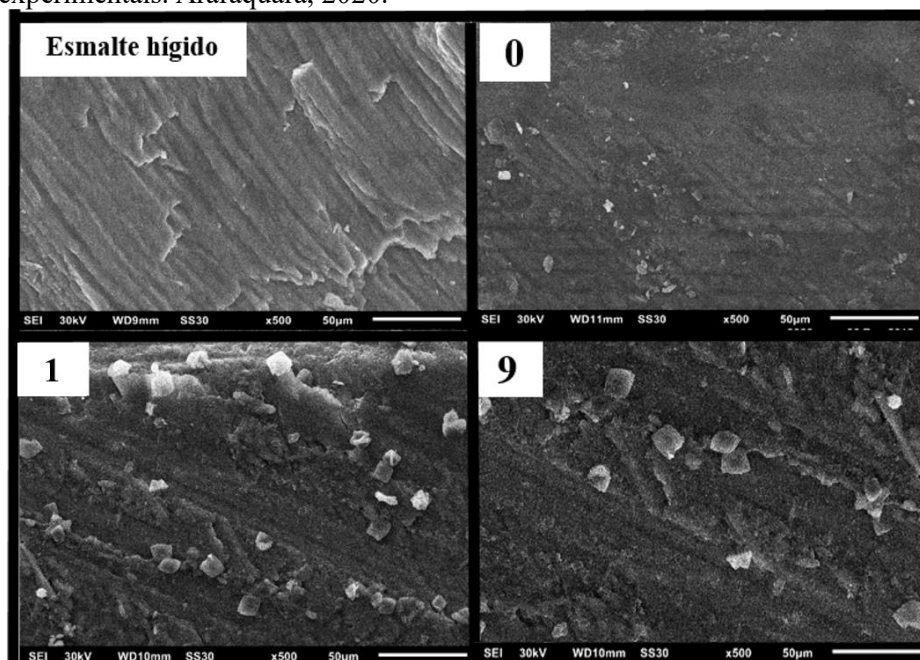


Grupos: 0- Glicerina (controle negativo); 3-NPZnO 3%; 4-VB F18 3%; 7-NPZnO 3%+ NaF 5%; 10- VB F18 3%+ NaF 5%.

Fonte: Elaboração própria.

A imagem 12 representa o MEV do esmalte após a aplicação dos géis experimentais.

Figura 12. Imagens do MEV (500X) do esmalte após aplicação dos géis experimentais. Araraquara, 2020.



Grupos: 0- Glicerina (controle negativo); 1-NPHA 3%; 9-NPHA 3%+ NaF 5%

Fonte: Elaboração própria.

As superfícies de esmalte apresentaram diferentes morfologias devido aos diferentes géis experimentais (Figura 12)

6 DISCUSSÃO

Saber se um microrganismo é susceptível a determinado agente antimicrobiano é de extrema importância para o planejamento e conduta terapêutica na clínica odontológica.

Diversos estudos^{23,39,44,50,69,76,78,85,86} apontam o aumento da susceptibilidade destes microrganismos à capacidade antibacteriana e antibiofilme das NP metálicas e dos VB.

Esta susceptibilidade pode ser avaliada por meio do teste de difusão em ágar, o qual é indicado para o estudo com microrganismos de crescimento rápido, anaeróbico ou anaeróbico facultativo²². Assim, no teste de difusão em ágar realizado neste estudo, utilizou-se o modelo monoespécie com *S. mutans* para avaliação da atividade antibacteriana, considerado uma bactéria anaeróbia facultativa, produtora de ácido láctico e não sensível ao O₂.

A realização do teste de difusão em ágar se faz comparativamente um padrão de referência. Neste estudo, foi utilizada a clorexidina 0,12% como grupo controle positivo, ou referência. Pôde-se observar que os grupos G2, G3, G4, G5, G6 e G10 apresentaram os maiores halos de inibição, sendo que o G6 apresentou o menor deles, com diferença estatisticamente significativa do G8 (controle positivo), o qual demonstrou a melhor atividade antibacteriana (Tabela 1). De acordo com Karaman et al.⁸⁷, halos de inibição com diâmetro menor que o grupo controle em até 3mm, indica que o microorganismo é sensível à substância analisada. Neste estudo, G2 (15,27), G3 (15,18) e G5 (13,88mm) apresentaram halo de inibição em até 3mm menor que o G8 (halo de inibição de 16,09mm de diâmetro), demonstrando segundo Karaman et al.⁸⁷, boa atividade antibacteriana do NaF e das NP^{21,22,26,39,44,49,66,76,78,79,86,88}.

Wang et al.⁸⁶, 2019, avaliaram a capacidade antibacteriana da NPZnO por meio do teste de difusão em ágar e observaram halos inibitórios de 18,09 mm e 12,05 mm para *P. gingivalis* e *A. naeslundii* respectivamente, valores próximos ao G3 deste estudo (Tabela 1), representado pela mesma NP. Os autores citaram que a capacidade de liberação de oxigênio e de radicais livres OH⁻ e H⁺ reagem, formando H₂O₂, que, em contato com a membrana celular pode causar danos irreversíveis ao microrganismo.

Na tabela 3, que expõe valores referentes à atividade antibiofilme, nota-se que, o G4 e o G2 apresentaram as menores contagem de UFC, após 12 e 24 horas, respectivamente. O G4 apresentou o menor número de UFC em 12 horas, neste mesmo período de tempo, o NaF a 5% também apresentou importante ação antibacteriana (Tabela

3), uma vez que, segundo Watson et al.⁸⁹, 2005, é capaz de interferir com o metabolismo enzimático e controle do pH intracelular. Este fato pode ser observado, pois tanto o G5, quanto o G6, resultou em números de UFC ainda menores que G8 (Tabela 3).

Quando as NP e VBF18 foram associados ao NaF, observou-se que com o passar de 12 para 24 horas, houve diminuição do halo de inibição, uma vez que a liberação e ação dos fluoretos são limitadas a determinado período de tempo⁹⁴. Provavelmente, o NaF potencializou os efeitos antibacterianos das NP nas primeiras horas, possivelmente por ser altamente reagente, uma vez que é o elemento químico mais eletronegativo da tabela periódica. Por apresentarem partículas maiores, também podem ter atrapalhado o mecanismo de ação das NP pois, provavelmente interferiram no contato direto das mesmas com a membrana celular dos microrganismos, necessário para efetivar sua atividade antibacteriana.

A aplicação de altas concentrações de flúor leva a formação de minerais precipitados que ficam retidos sobre o biofilme⁹³. Foi utilizado neste estudo, NaF a 5% em forma de gel, durante 60 segundos, mesmo tempo despendido para a aplicação de todos os géis experimentais. Watson et al.⁸⁹ observaram que a penetração do NaF no biofilme dental se deve ao tempo de exposição, e que os tempos de 30 e 120 segundos, não apresentaram diferenças estatísticas quanto aos seus efeitos sobre o biofilme dental. Verificaram que ambos os tempos proporcionaram aumento das concentrações de fluoreto e que nível elevado de flúor salivar, após escovação de dentes com dentifrício com alto teor de flúor, manteve feito duradouro de até 12 horas.

Todos os grupos contendo NP isoladas, apresentaram melhor desempenho em 24 horas (Tabela 3). Há várias teorias que procuram elucidar o comportamento das NP diante de sua atividade antibacteriana contra o *S. mutans*^{23,34,39}, sendo a capacidade de modificação da membrana celular, seu provável mecanismo de ação⁷⁸. Ai et al.³⁶, 2017, citaram que ocorre inibição da formação de biofilme a partir dos íons Zn, impedindo o transporte e metabolismo dos açúcares, bem como desorganizando os sistemas enzimáticos, por meio do deslocamento de íons de Mg.

Sabe-se também que a liberação de elétrons (e^-) e hidroxila (OH^+), produz diferentes ERO como o O_2^- , OH^+ e H_2O_2 , os quais podem reagir com compostos orgânicos. As ERO atua atacando os fosfolipídios poli-insaturados de bactérias, ocasionando vazamento de minerais, proteínas e materiais genéticos, levando a morte celular⁵⁰. Além disso, o tamanho extremamente reduzido das NP é essencial pois sua facilidade de difusão na camada de EPS, possibilita a desorganização do biofilme⁹⁰.

O valor extremamente reduzido de UFC apresentado por G2, após 24 horas (Tabela 3), diverge daqueles obtidos por Poosti et al.⁴¹, 2013, os quais, no mesmo período de tempo, não encontraram diferença no efeito antibacteriano de um cimento ortodôntico, após a adição de NPTiO₂ a 1% contra o *S. mutans*. Alguns autores^{50,75,91} acreditam que a NPTiO₂ apresenta capacidade antibacteriana predominantemente em função de sua propriedade fotocatalítica. Zane et al.⁹¹, 2016, observaram, em uma resina composta, aumento na absorbância da luz ultravioleta e nos radicais superóxido e hidroxila contra *E. coli*, após o material ser associado à NPTiO₂. Novo adesivo com 20% de NPTiO₂ foi estudado por Welch et al.⁷⁵, 2010, quando os autores observaram a eliminação de *S. epidermidis*, após indução de suas propriedades bactericidas por luz ultravioleta.

Contudo, Westas et al.⁵⁰, 2017, após avaliar o efeito antibacteriano de NPTiO₂ em biofilme de *S. oralis* por 24 horas, não observaram células vivas, independente da aplicação do UV. Assim, os autores demonstraram falta de consenso na literatura com relação a necessidade de ativação das propriedades bactericidas desta NP por meio de fonte de luz.

Neste estudo não foram exploradas as propriedades fotocatalíticas das NP para avaliar seus efeitos antibacterianos. Em 24 horas de incubação, o G2 apresentou menor número de UFC, demonstrando diferença estatisticamente significativa com relação aos demais grupos (Tabela 3). Pode-se sugerir que, tempo de pelo menos 24 horas é necessário para que as NP possam apresentar melhor desempenho, pois os grupos G2, G3 e G4 compostos por NP apresentaram este comportamento. Esse resultado corrobora com Westas et al.⁵⁰ que observaram que as NPTiO₂ só apresentaram redução significativa na redução bacteriana em 40% após 24 horas, sem a utilização de luz.

Ahrari et al.⁷⁶, 2015, avaliaram a capacidade antibacteriana, contra *S. mutans* e *S. sangius*, de enxaguatórios bucais contendo diferentes NP metálicas (NPZnO, NPCuO, NPTiO₂ e NPAg), CLX a 2% (controle) ou 2,0% de NaF. O enxaguatório bucal contendo NPTiO₂ mostrou-se o melhor agente antimicrobiano e, portanto, pôde ser considerado como uma alternativa aos enxaguatórios bucais de clorexidina ou fluoreto de sódio.

A concentração ideal de NP a ser utilizada não se encontra determinada na literatura, pois existem alterações de resultados em função dos microrganismos estudados^{78,79,82,92} e diferentes protocolos experimentais. A concentração de NP utilizada neste estudo, baseou-se em indicação segura quando considera-se as propriedades dos materiais restauradores e sua biocompatibilidade^{26,40}.

Os resultados deste estudo corroboram outras pesquisas^{21,92}, as quais

demonstraram melhor eficiência antibacteriana das NPZnO e NPTiO₂ após 24 horas. Mousavi et al.⁹², 2019, avaliaram a atividade antimicrobiana das NPZnO, em diferentes concentrações para diferentes microrganismos e também observaram que para o *S. mutans* a concentração de 10% foi a mais efetiva após 24 horas de experimento. Ramazanzadeh et al.⁹³, 2015, observaram, que no período de 6 a 24 horas, o crescimento de *S. mutans* foi significativamente reduzido pelas NPZnO associadas ao CuO, demonstrando, neste caso, ação sinérgica entre estas substâncias.

Os VB, também possuem a atividade antibacteriana, além da capacidade remineralizadora, extremamente importante na regeneração óssea por meio da deposição da camada de carbonato de apatita^{94,95}. O VBF18 demonstrou melhor eficácia em 12 horas de incubação (Tabela 3), provavelmente porque este tempo foi o suficiente para ocorrer o aumento de pH causado por liberação e dissolução de íons, o qual leva a morte dos microorganismos²⁸, envolvidos em processos cariosos, periodontais e endodônticos⁹⁶.

Allan et al.⁹⁷, corroboram com nossos achados, pois observaram eficácia na capacidade antibacteriana do VB (Bioglass) contra *S. mutans*, pois houve redução de 91% da viabilidade celular. Os autores atribuíram esses resultados em função da alteração do pH do meio (9,8).

As imagens do MEV referente aos biofilmes ilustram no G0 (controle negativo) a formação de um biofilme com células abundantes bem estruturado e organizado, sendo que no G1, ocorreu redução significativa do *S. mutans*. No grupo representado pela NPZnO encontramos uma quantidade bem reduzido de células com padrão de morfologia celular diferente do grupo controle negativo, característico de morte celular, uma vez que as NPZnO possuem capacidade de alteração na morfologia celular para desorganização das atividades metabólicas do microorganismo, culminando em morte celular⁷⁹.

Outros fatores importantes que devem ser considerados quando da alteração da composição, maneira e tempo de aplicação, ou mesmo na utilização de novos produtos para a potencialização da ação antibacteriana na cavidade bucal, são as propriedades físicas, mecânicas e químicas, tanto dos materiais odontológicos quanto das estruturas dentárias.

Neste estudo foram avaliadas a microdureza e a rugosidade superficial, importantes propriedades físicas que devem ser consideradas na prática clínica. Prejuízos na microdureza é indicativo de que a estrutura analisada está mais propensa a fraturas e/ou desenvolvimento de lesões de cárie, e sua avaliação é fundamental pois é um método de análise indireta do conteúdo mineral dos substratos dentários⁹⁸. Alterações na

rugosidade por sua vez, podem favorecer a deposição de biofilme, com posterior alterações do substrato dentário e finalmente, diminuição da longevidade do elemento dental.

As NP, quando associadas aos materiais restauradores, interagem física e quimicamente com os mesmos e com a estrutura dentária²⁷. Ao avaliar as possíveis alterações que as NP poderiam oferecer à dentina afetada, este estudo demonstrou que a microdureza ao redor da área restaurada foi maior nos grupos G3, G4, G7 e G10 (Gráfico 1) e nas áreas adjacentes, imediatamente após as restaurações, os melhores resultados foram para os grupos G1, G7, G9 e G10 (Gráfico 2), demonstrando boa remineralização do G7 e o grande potencial que os VB possuem na remineralização dos tecidos dentais^{94, 95}.

Diferentes valores de microdureza da estrutura dentária refletem diferentes graus de desmineralização da mesma, conceito que levou a análise do teste de microdureza, neste estudo, após a utilização dos géis experimentais. A remineralização e o aumento da dureza da dentina é possível, pois sua rede de colágeno permanece após o comprometimento de sua porção orgânica, quando submetida ao processo de desmineralização³⁴.

Considerando a técnica minimamente invasiva, e a possibilidade de recuperação da dentina afetada, é de grande importância sua remineralização para a longevidade da restauração e conseqüentemente do elemento dentário, uma vez que a presença de minerais auxilia na proteção das fibras colágenas⁹⁸.

O uso de géis contendo NPHA, NPZnO ou VBF18 isolados ou associados ao NaF representaram ser possíveis estratégias para potencializar a remineralização. Comar et al²⁷, após avaliação da microdureza da superfície do esmalte e dentina induzidos ao desenvolvimento de lesão de cárie, observaram melhores resultados na remineralização destes tecidos, após a utilização de creme dental fluoretado (NaF 0,2%), quando comparado com cremes experimentais contendo NPHA a 10% e 20%. Os autores sugeriram que a presença de NPHA proporcionou a formação de minerais apenas na camada externa do esmalte e não no interior da lesão de cárie. A utilização das NPHA porém, tem sido encorajada por vários autores para remineralização tanto em lesões no esmalte como em dentina^{27,35,36}.

Embora este estudo tenha demonstrado que as NPZnO não apresentaram a mesma capacidade de deposição de minerais na região desmineralizada adjacente à restauração, como a NaF e NPHA (Gráfico 2), o Zn possui propriedades antibacterianas, que impedem

a progressão da demineralização por meio da apoptose das células bacterianas²¹. Deve-se considerar também que a melhora da microdureza também está diretamente relacionado a associação das NP ao NaF (Gráficos 1 e 2), com maior deposição de agentes minerais na dentina. Alguns estudos relatam que as NP apresentam melhor difusão pelos túbulos dentinários, o que facilitaria a remineralização dessa estrutura^{46,53}.

Os componentes do VBF18 utilizado neste estudo, não se apresentavam em escala nanométrica, mas foi possível seu íntimo contato com a dentina, diante de suas características físicas e químicas, como porosidade, conteúdo orgânicos, água e presença de túbulos dentinários. Quando associado ao NaF, a potencialização da remineralização pode ser observada por meio do aumento do valor numérico da microdureza tanto adjacente como ao redor da dentina afetada (Gráficos 1 e 2).

A dentina é composta predominantemente pela porção inorgânica, representada pela fase mineral composta pela hidroxiapatita, e, diferentemente do esmalte, possui menor quantidade de cálcio³². Seus cristais hidroxiapatita são menores em comparação aos do esmalte, aumentando dessa forma, a área superficial da dentina³³.

Tirapelli et al.¹⁷, por meio de ensaios clínicos, observaram que as partículas de VB aderiram à dentina e formaram uma camada hidroxiapatita similar à composição do esmalte dentário, bloqueando assim, os túbulos dentinários e aliviando a dor do paciente por períodos de tempo mais longos. Besinis et al.³⁵ observaram boa infiltração de sílica coloidal na dentina desmineralizada. Imagens em microscopia eletrônica de transmissão indicaram que as NP de sílica que penetram nos espaços inter-tubulares, também são capazes de penetrar na rede de colágeno. Isso também foi confirmado pela análise em MEV. As NP de sílica, com tamanho entre 10 e 20 nm de diâmetro penetraram nos espaçamentos inter-fibrilares e infiltraram-se em profundidade na matriz de colágeno.

Huang et al.³⁷ observaram que as NPHA foram mais eficazes em regiões desmineralizadas, sendo capazes de penetrar com maior facilidade nas áreas de maior desmineralização. De acordo Amaechi⁴, as presenças das NPHA proporcionaram a precipitação e atração contínua de uma grande quantidade de Ca^{2+} e (PO_3) .

Na observação das fotomicrografias da dentina após a aplicação dos géis experimentais (Figura 11) nota-se que os grupos G3, G4, G7 e G10 apresentaram padrão de morfologia semelhante a dentina hígida, com exposição de túbulos dentinários. No G4 e G10 nota-se a presença de partículas sobre a dentina, sugerindo ser partículas de VBF18. Embora os G3 e G7 também apresentem partículas em sua superfície, pode-se contar com possível contaminação dos espécimes, uma vez que foram construídos com NP e essas

partículas não se encontram em escala manométrica. O padrão de organização da estrutura mineral da dentina leva a pensar que está de acordo com os resultados expressos pela microdureza na dentina (Gráfico 1 e 2).

No gráfico 3 observamos que os grupos 1 e 9 demonstraram os maiores valores de microdureza no esmalte. As NPHA apresentam estrutura semelhante a porção mineralizada do esmalte e dentina^{67,99,100}. Sua capacidade de reparação do esmalte com lesão inicial de cárie é atribuída através da fixação de moléculas à superfície do tecido ou até mesmo a possibilidade de preencher defeitos e microporos nos dentes desmineralizados¹⁰⁰. Haghgo et al.⁹⁹ ao compararem os efeitos da associação das NPHA com NaF em bochechos sobre lesões de cárie em esmalte, encontraram que as soluções estatisticamente eficazes.

As superfícies de esmalte no MEV apresentaram diferentes morfologias devido aos diferentes géis experimentais. A comparação com a superfície de esmalte hígido, demonstrou neste estudo que o grupo G1 apresentou menor valor de rugosidade (Gráfico 5), uma vez que a NPHA possui a capacidade de remineralização das superfícies dentárias, consequentemente diminuindo sua rugosidade.

Em relação a rugosidade da dentina, o G5 apresentou os menores valores de rugosidade superficial, estatisticamente igual a G0 (Gráfico 4). Como a dentina possui a maior quantidade de cálcio que o esmalte³² e menores cristais de hidroxiapatita, possui maior área superficial³³, que pode ter facilitado a ação do NaF. Alencar et al.¹⁰¹ corroboram com nosso estudo, uma vez que os autores observaram que a rugosidade superficial da dentina bovina com erosão dentinária foi diminuída quando tratada com verniz fluoretado NaF (22.500 ppm) ou creme dental com 9.00 ppm contendo fluoreto de fosfopéptido de caseína amorfo de cálcio. Isso se deve ao teor aumentado de Ca e P aumentado após o tratamento, com alteração da topografia da superfície dentinária, onde os túbulos dentinários encontravam-se parcial ou totalmente ocluídos após o tratamento.

A maior rugosidade apresentada pelos demais grupos experimentais (Gráfico 4) pode ser atribuída à característica inerente das NP em formarem aglomerados devido a sua alta energia superficial que, segundo Prentice et al.⁹⁸, podem provocar diminuição da microdureza e aumento da rugosidade. O vidro bioativo F18 por não se tratar de uma NP pode ter contribuído para deixar a superfície da dentina de forma irregular, e assim não proporcionar melhora na rugosidade superficial da dentina.

Diante do exposto, os bons resultados observados após a utilização das NP e VB quando se consideram a microdureza, rugosidade superficial e capacidade antibacteriana,

aplicados por meio de um excelente veículo em forma de gel, encorajam o desenvolvimento de novas pesquisas para seu uso na Odontologia.

7 CONCLUSÃO

Pode-se concluir que os géis experimentais demonstraram ser eficientes contra lesão inicial de cárie em esmalte e na dentina, sem afetar significativamente as propriedades físicas estudadas, podendo ser considerados então, alternativas promissoras para o uso odontológico.

REFERÊNCIAS*

1. Fitzgerald RJ, Keyes PH. Demonstration of the etiologic role of streptococci in experimental caries in the hamster. *J Am Dent Assoc.* 1960; 61: 9-19.
2. ten Cate JM. Remineralization of deep enamel dentine caries lesions. *Aust Dent J.* 2008; 53(3): 281-5.
3. Hara AT, Zero DT. The caries environment: saliva, pellicle, diet, and hard tissue ultrastructure. *Dent Clin North Am.* 2010; 54(3): 455-67.
4. Amaechi BT. Remineralisation - the buzzword for early MI caries management. *Br Dent J.* 2017; 223(3): 173-82.
5. Innes NP, Frencken JE, Bjørndal L, et al. Managing Carious Lesions: Consensus Recommendations on Terminology. *Adv Dent Res.* 2016; 28(2): 49-57.
6. Croft K, Kervanto-Seppälä S, Stangvaltaite L, Kerosuo E. Management of deep carious lesions and pulps exposed during carious tissue removal in adults: a questionnaire study among dentists in Finland. *Clin Oral Investig.* 2019; 23(3): 1271-80.
7. Menezes-Silva R, Velasco SRM, Bastos RS, Molina G, Honório HM, Frencken JE, et al. Randomized clinical trial of class II restoration in permanent teeth comparing ART with composite resin after 12 months. *Clin Oral Investig.* 2019; 23(9): 3623-35.
8. Chen S, Mestres G, Lan W, Xia W, Engqvist H. Cytotoxicity of modified glass ionomer cement on odontoblast cells. *J Mater Sci Mater Med.* 2016; 27(7): 116.
9. McLean JW, Nicholson JW, Wilson AD. Proposed nomenclature for glass-ionomer dental cements and related materials. *Quintessence Int.* 1994; 25(9): 587-9.
10. Weerheijm KL, Groen HJ. The residual caries dilemma. *Community Dent Oral Epidemiol.* 1999; 27(6): 436-41.

* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca:

<http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/guia-de-normalizacao-atualizado.pdf>

11. Bönecker M, Grossman E, Cleaton-Jones PE, Parak R. Clinical, histological and microbiological study of hand-excavated carious dentine in extracted permanent teeth. *SADJ*. 2003; 58(7): 273-8.
12. Koch MJ, García-Godoy F. The clinical performance of laboratory-fabricated crowns placed on first permanent molars with developmental defects. *J Am Dent Assoc*. 2000; 131(9): 1285-90.
13. Wang Z, Jiang T, Sauro S, Wang Y, Thompson I, Watson TF, et al. Dentine remineralization induced by two bioactive glasses developed for air abrasion purposes. *J Dent*. 2011; 39(11): 746-56.
14. Pini NI, Sundfeld-Neto D, Aguiar FH, Sundfeld RH, Martins LR, Lovadino JR, et al. Enamel microabrasion: An overview of clinical and scientific considerations. *World J Clin Cases*. 2015; 3(1): 34-41.
15. Prabhakar AR, Paul M J, Basappa N. Comparative Evaluation of the Remineralizing Effects and Surface Micro hardness of Glass Ionomer Cements Containing Bioactive Glass (S53P4):An in vitro study. *Int J Clin Pediatr Dent*. 2010; 3(2): 69-77.
16. Jokstad A. Secondary caries and microleakage. *Dent Mater*. 2016; 32(1): 11-25.
17. Sharma G, Puranik MP, Sowmya KR. Approaches to Arresting Dental Caries: An Update. *J Clin Diagn Res*. 2015; 9(5): ZE08-11.
18. Mohd Said SN, Ekambaram M, Yiu CK. Effect of different fluoride varnishes on remineralization of artificial enamel carious lesions. *Int J Paediatr Dent*. 2017; 27(3): 163-73.
19. Oliveira MRC, Oliveira PHC, Oliveira LHC, Horliana ACRT, Cesar PF, Moura SK, et al. Microhardness of bovine enamel after different fluoride application protocols. *Dent Mater J*. 2019; 38(1): 61-7.
20. Moimaz SA, Saliba O, Marques LB, Garbin CA, Saliba NA. Dental fluorosis and its influence on children's life. *Braz Oral Res*. 2015;29.
21. Almoudi MM, Hussein AS, Abu Hassan MI, Mohamad Zain N. A systematic review on antibacterial activity of zinc against. *Saudi Dent J*. 2018; 30(4): 283-91.
22. Jayaseelan C, Rahuman AA, Roopan SM, et al. Biological approach to synthesize TiO₂ nanoparticles using *Aeromonas hydrophila* and its antibacterial activity. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*. 2013; 107: 82-9.

23. Brandão NL, Portela MB, Maia LC, Antônio A, Silva VLME, Silva EMD. Model resin composites incorporating ZnO-NP: activity against *S. mutans* and physicochemical properties characterization. *J Appl Oral Sci.* 2018; 26: e20170270.
24. Lin X, Xie F, Hao Y, Qin H, Long J. Synthesis and Characterization of Polyamidoamine Dendrimers/Nano-hydroxyapatite and Its Role in Dentin Tubule Occlusion. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao.* 2017; 39(2): 163-8.
25. Gabbai-Armelin PR, Souza MT, Kido HW, Tim CR, Bossini PS, Fernandes KR, et al. Characterization and biocompatibility of a fibrous glassy scaffold. *J Tissue Eng Regen Med.* 2017; 11(4): 1141-51.
26. Gutiérrez MF, Alegría-Acevedo LF, Méndez-Bauer L, Bermudez J, Dávila-Sánchez A, Buvinic S, Hernandez- Moya N, et al. Biological, mechanical and adhesive properties of universal adhesives containing zinc and copper nanoparticles. *J Dent.* 2019; 82: 45-55.
27. Besinis A, van Noort R, Martin N. Remineralization potential of fully demineralized dentin infiltrated with silica and hydroxyapatite nanoparticles. *Dent Mater.* 2014; 30(3): 249-62.
28. Stoor P, Söderling E, Salonen JI. Antibacterial effects of a bioactive glass paste on oral microorganisms. *Acta Odontol Scand.* 1998; 56(3): 161-5.
29. Tirapelli C, Panzeri H, Lara EH, Soares RG, Peitl O, Zanotto ED. The effect of a novel crystallised bioactive glass-ceramic powder on dentine hypersensitivity: a long-term clinical study. *J Oral Rehabil.* 2011; 38(4): 253-62.
30. Souza M, Rennó A, Peitl O, Zanotto E. New highly bioactive crystallization-resistant glass for tissue engineering applications. *Translational Materials Research.* 2017; 4(1): 014002.
31. Loe H. Does chlorhexidine have a place in the prophylaxis of dental diseases? *J Periodontal Res Suppl.* 1973; 12: 93-9.
32. Almeida IF, Bahia MF. Reologia: interesse e aplicações na área cosmético-farmacêutica. *Cosmet Toiletries.* 2003; 15: 96-100.
33. The 15th Anniversary of the U.S. National Nanotechnology Initiative. *ACS Nano.* 2018; 12(11): 10567-69.

34. Melo MA, Guedes SF, Xu HH, Rodrigues LK. Nanotechnology-based restorative materials for dental caries management. *Trends Biotechnol.* 2013; 31(8): 459-67.
35. Sahoo SK, Parveen S, Panda JJ. The present and future of nanotechnology in human health care. *Nanomedicine.* 2007; 3(1): 20-31.
36. Ai M, Du Z, Zhu S, et al. Composite resin reinforced with silver nanoparticles-laden hydroxyapatite nanowires for dental application. *Dent Mater.* 2017; 33(1): 12-22.
37. Paiva L, Fidalgo TKS, da Costa LP, Maia LC, Balan L, Anselme K, et al. Antibacterial properties and compressive strength of new one-step preparation silver nanoparticles in glass ionomer cements (NanoAg-GIC). *J Dent.* 2018; 69: 102-9.
38. Bryington MS, Hayashi M, Kozai Y, Vandeweghe S, Andersson M, Wennerberg A, et al. The influence of nano hydroxyapatite coating on osseointegration after extended healing periods. *Dent Mater.* 2013; 29(5): 514-20.
39. Aydin Sevinç B, Hanley L. Antibacterial activity of dental composites containing zinc oxide nanoparticles. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2010; 94(1): 22-31.
40. Nguyen TMT, Wang PW, Hsu HM, Cheng FY, Shieh DB, Wong TY et al. Dental cement's biological and mechanical properties improved by ZnO nanospheres. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2019; 97: 116-23.
41. Poosti M, Ramazanzadeh B, Zebarjad M, Javadzadeh P, Naderinasab M, Shakeri MT. Shear bond strength and antibacterial effects of orthodontic composite containing TiO₂ nanoparticles. *Eur J Orthod.* 2013; 35(5): 676-9.
42. Tavassoli Hojati S, Alaghemand H, Hamze F, Ahmadian Babaki F, Rajab-Nia R, Rezvani MB, et al. Antibacterial, physical and mechanical properties of flowable resin composites containing zinc oxide nanoparticles. *Dent Mater.* 2013; 29(5): 495-505.
43. Uskoković V, Ghosh S, Wu VM. Antimicrobial Hydroxyapatite-Gelatin-Silica Composite Pastes with Tunable Setting Properties. *J Mater Chem B.* 2017; 5(30): 6065-80.
44. Eshed M, Lellouche J, Matalon S, Gedanken A, Banin E. Sonochemical coatings of ZnO and CuO nanoparticles inhibit *Streptococcus mutans* biofilm formation on teeth model. *Langmuir.* 2012; 28(33): 12288-95.

45. Zhang M, He LB, Exterkate RA, Cheng L, ten cate J, Li JY, et al. Biofilm layers affect the treatment outcomes of NaF and Nano-hydroxyapatite. *J Dent Res*. 2015; 94(4): 602-7.
46. Besinis A, van Noort R, Martin N. Infiltration of demineralized dentin with silica and hydroxyapatite nanoparticles. *Dent Mater*. 2012; 28(9): 1012-23.
47. Makeeva IM, Polyakova MA, Avdeenko OE, Paramonov YO, Kondrat'ev SA, Pilyagina AA. Effect of long term application of toothpaste Apadent Total Care Medical nano-hydroxyapatite. *Stomatologiia (Mosk)*. 2016; 95(4): 34-6.
48. Corrêa-Faria P, Paixão-Gonçalves S, Paiva SM, Pordeus IA. Incidence of dental caries in primary dentition and risk factors: a longitudinal study. *Braz Oral Res*. 2016; 30(1).
49. de Almeida CM, da Rosa WLO, Meereis CTW, de Almeida SM, Ribeiro JS, da Silva AF et al. Efficacy of antimicrobial agents incorporated in orthodontic bonding systems: a systematic review and meta-analysis. *J Orthod*. 2018; 45(2): 79-93.
50. Westas E, Hayashi M, Cecchinato F, Wennerberg A, Andersson M, Jimbo R et al. Bactericidal effect of photocatalytically-active nanostructured TiO surfaces on biofilms of the early oral colonizer, *Streptococcus oralis*. *J Biomed Mater Res A*. 2017; 105(8): 2321-28.
51. Lynch RJ. Zinc in the mouth, its interactions with dental enamel and possible effects on caries; a review of the literature. *Int Dent J*. 2011; 61 Suppl 3: 46-54.
52. Sirelkhatim A, Mahmud S, Seeni A, et al. Review on Zinc Oxide Nanoparticles: Antibacterial Activity and Toxicity Mechanism. *Nanomicro Lett*. 2015; 7(3): 219-42.
53. Souza BM, Comar LP, Vertuan M, Fernandes Neto C, Buzalaf MA, Magalhães AC. Effect of an Experimental Paste with Hydroxyapatite Nanoparticles and Fluoride on Dental Demineralisation and Remineralisation in situ. *Caries Res*. 2015; 49(5): 499-507.
54. Flemming HC, Wingender J, Szewzyk U, Steinberg P, Rice SA, Kjelleberg S. Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nat Rev Microbiol*. 2016; 14(9): 563-75.

55. Xiao J, Klein MI, Falsetta ML, Bingwen Lu, Claire M. Delahunty, John R. Yates, III, et al. The exopolysaccharide matrix modulates the interaction between 3D architecture and virulence of a mixed-species oral biofilm. *PLoS Pathog.* 2012; 8(4): e1002623.
56. Takahashi N, Nyvad B. The role of bacteria in the caries process: ecological perspectives. *J Dent Res.* 2011; 90(3): 294-303.
57. Koo H, Yamada KM. Dynamic cell-matrix interactions modulate microbial biofilm and tissue 3D microenvironments. *Curr Opin Cell Biol.* 2016; 42: 102-112.
58. Moye ZD, Zeng L, Burne RA. Fueling the caries process: carbohydrate metabolism and gene regulation by *Streptococcus mutans*. *J Oral Microbiol.* 2014; 6.
59. Peterson BW, He Y, Ren Y, Aidan Z, Matthew RL, Prashant KS, et al. Viscoelasticity of biofilms and their recalcitrance to mechanical and chemical challenges. *FEMS Microbiol Rev.* 2015; 39(2): 234-45.
60. Hwang G, Liu Y, Kim D, Victor S, Alejandro AR, Jessica KK, et al. Simultaneous spatiotemporal mapping of in situ pH and bacterial activity within an intact 3D microcolony structure. *Sci Rep.* 2016; 6: 32841.
61. Marsh PD, Zaura E. Dental biofilm: ecological interactions in health and disease. *J Clin Periodontol.* 2017; 44 Suppl 18: S12-S22.
62. de Almeida Neves A, Coutinho E, Cardoso MV, Lambrechts P, Van Meerbeek B. Current concepts and techniques for caries excavation and adhesion to residual dentin. *J Adhes Dent.* 2011; 13(1): 7-22.
63. Liu Y, Kamesh AC, Xiao Y, Sun V, Hayes M, Daniell H, Koo H, et al. Topical delivery of low-cost protein drug candidates made in chloroplasts for biofilm disruption and uptake by oral epithelial cells. *Biomaterials.* 2016; 105: 156-66.
64. Autio-Gold J. The role of chlorhexidine in caries prevention. *Oper Dent.* 2008; 33(6): 710-16.
65. Marquis RE, Clock SA, Mota-Meira M. Fluoride and organic weak acids as modulators of microbial physiology. *FEMS Microbiol Rev.* 2003; 26(5): 493-510.
66. Elkassas D, Arafa A. The innovative applications of therapeutic nanostructures in dentistry. *Nanomedicine.* 2017; 13(4): 1543-62.

67. Huang S, Gao S, Cheng L, Yu H. Remineralization potential of nano-hydroxyapatite on initial enamel lesions: an in vitro study. *Caries Res.* 2011; 45(5): 460-68.
68. de Carvalho FG, Vieira BR, Santos RLD, Carlo HL, Lopes PQ, de Lima BASG. In Vitro Effects of Nano-hydroxyapatite Paste on Initial Enamel Carious Lesions. *Pediatr Dent.* 2014; 36(3): 85-9.
69. Zhang AP, Sun YP. Photocatalytic killing effect of TiO₂ nanoparticles on Ls-174-t human colon carcinoma cells. *World J Gastroenterol.* 2004; 10(21): 3191-93.
70. Gogniat G, Thyssen M, Denis M, Pulgarin C, Dukan S. The bactericidal effect of TiO₂ photocatalysis involves adsorption onto catalyst and the loss of membrane integrity. *FEMS Microbiol Lett.* 2006; 258(1): 18-24.
71. Tsuang YH, Sun JS, Huang YC, Lu CH, Chang WH, Wang CC. Studies of photokilling of bacteria using titanium dioxide nanoparticles. *Artif Organs.* 2008; 32(2): 167-74.
72. Liu P, Duan W, Wang Q, Li X. The damage of outer membrane of Escherichia coli in the presence of TiO₂ combined with UV light. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2010; 78(2): 171-6.
73. Andreotti AM, Goiato MC, Moreno A, Nobrega AS, Pesqueira AA, dos Santos DM. Influence of nanoparticles on color stability, microhardness, and flexural strength of acrylic resins specific for ocular prosthesis. *Int J Nanomedicine.* 2014; 9: 5779-87.
74. Yu B, Ahn JS, Lim JI, Lee YK. Influence of TiO₂ nanoparticles on the optical properties of resin composites. *Dent Mater.* 2009; 25(9): 1142-47.
75. Welch K, Cai Y, Engqvist H, Strømme M. Dental adhesives with bioactive and on-demand bactericidal properties. *Dent Mater.* 2010; 26(5): 491-99.
76. Ahrari F, Eslami N, Rajabi O, Ghazvini K, Barati S. The antimicrobial sensitivity of Streptococcus mutans and Streptococcus sanguis to colloidal solutions of different nanoparticles applied as mouthwashes. *Dent Res J (Isfahan).* 2015; 12(1): 44-9.
77. Lavaee F, Faez K, Hadi N, Modaresi F. Antimicrobial and antibiofilm activity of silver, titanium dioxide and iron nano particles. *Am J Dent.* 2016; 29(6): 315-320.

78. Kasemets K, Ivask A, Dubourguier HC, Kahru A. Toxicity of nanoparticles of ZnO, CuO and TiO₂ to yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Toxicol In Vitro*. 2009; 23(6): 1116-22.
79. Jones N, Ray B, Ranjit KT, Manna AC. Antibacterial activity of ZnO nanoparticle suspensions on a broad spectrum of microorganisms. *FEMS Microbiol Lett*. 2008; 279(1): 71-6.
80. Wang S, Wu J, Yang H, Liu X, Huang Q, Lu Z. Antibacterial activity and mechanism of Ag/ZnO nanocomposite against anaerobic oral pathogen *Streptococcus mutans*. *J Mater Sci Mater Med*. 2017; 28(1): 23.
81. Kishen A, Shi Z, Shrestha A, Neoh KG. An investigation on the antibacterial and antibiofilm efficacy of cationic nanoparticulates for root canal disinfection. *J Endod*. 2008; 34(12): 1515-20.
82. Liu W, Su P, Chen S, Wang N, Ma Y, Liu Y, et al. Synthesis of TiO₂ nanotubes with ZnO nanoparticles to achieve antibacterial properties and stem cell compatibility. *Nanoscale*. 2014; 6(15): 9050-62.
83. Toledano M, Sauro S, Cabello I, Watson T, Osorio R. A Zn-doped etch-and-rinse adhesive may improve the mechanical properties and the integrity at the bonded-dentin interface. *Dent Mater*. 2013; 29(8): e142-52.
84. Nethi SK, Das S, Patra CR, Mukherjee S. Recent advances in inorganic nanomaterials for wound-healing applications. *Biomater Sci*. 2019; 7(7): 2652-74.
85. Gabbai-Armelin PR, Souza MT, Kido HW, Tim CR, Bossini PS, Magri AM, et al. Effect of a new bioactive fibrous glassy scaffold on bone repair. *J Mater Sci Mater Med*. 2015; 26(5): 177.
86. Wang J, Du L, Fu Y, Jiang P, Wang X. ZnO nanoparticles inhibit the activity of *Porphyromonas gingivalis* and *Actinomyces naeslundii* and promote the mineralization of the cementum. *BMC Oral Health*. 2019; 19(1): 84.
87. Karaman I, Sahin F, Güllüce M, Ogütçü H, Sengül M, Adigüzel A. Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of *Juniperus oxycedrus* L. *J Ethnopharmacol*. 2003; 85(2-3): 231-35.
88. Hannig C, Hannig M. Natural enamel wear--a physiological source of hydroxylapatite nanoparticles for biofilm management and tooth repair? *Med Hypotheses*. 2010; 74(4): 670-72.

89. Watson PS, Pontefract HA, Devine DA, Shore RC, Nattress BR, Kirkham J et al. Penetration of fluoride into natural plaque biofilms. *J Dent Res.* 2005; 84(5): 451-55.
90. Morones JR, Elechiguerra JL, Camacho A, Holt K, Kouri JB, Ramírez JT, et al. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology.* 2005; 16(10): 2346-53.
91. Zane A, Zuo R, Villamena FA, Antal R, Ann MDF, Kristin F, et al. Biocompatibility and antibacterial activity of nitrogen-doped titanium dioxide nanoparticles for use in dental resin formulations. *Int J Nanomedicine.* 2016; 11: 6459-70.
92. Mousavi SA, Ghotaslou R, Akbarzadeh A, Azima N, Aeinfar A, Khorramdel A. Evaluation of antibacterial and antifungal properties of a tissue conditioner used in complete dentures after incorporation of ZnO–Ag nanoparticles. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospects.* 2019; 13(1): 11-8.
93. Ramazanzadeh B, Jahanbin A, Yaghoubi M, Nasser S, Kiarash G, Mohammadtaghi S, et al. Comparison of Antibacterial Effects of ZnO and CuO Nanoparticles Coated Brackets against *Streptococcus Mutans*. *J Dent (Shiraz).* 2015; 16(3): 200-5.
94. Bakry AS, Tamura Y, Otsuki M, Kasugai S, Ohya K, Tagami J. Cytotoxicity of 45S5 bioglass paste used for dentine hypersensitivity treatment. *J Dent.* 2011; 39(9): 599-603.
95. Hench LL. The story of Bioglass. *J Mater Sci Mater Med.* 2006; 17(11): 967-78.
96. Waltimo T, Brunner TJ, Vollenweider M, Stark WJ, Zehnder M. Antimicrobial effect of nanometric bioactive glass 45S5. *J Dent Res.* 2007; 86(8): 754-7.
97. Allan I, Newman H, Wilson M. Antibacterial activity of particulate bioglass against supra- and subgingival bacteria. *Biomaterials.* 2001; 22(12): 1683-87.
98. Attin T, Schmidlin PR, Wegehaupt F, Wiegand A. Influence of study design on the impact of bleaching agents on dental enamel microhardness: a review. *Dent Mater.* 2009; 25(2): 143-57.
99. Haghgoo R, Rezvani MB, Salehi Zeinabadi M. Comparison of nano-hydroxyapatite and sodium fluoride mouthrinse for remineralization of incipient carious lesions. *J Dent (Tehran).* 2014; 11(4): 406-10.

100. Huang S, Gao S, Cheng L, Yu H. Combined effects of nano-hydroxyapatite and *Galla chinensis* on remineralisation of initial enamel lesion in vitro. *J Dent.* 2010; 38(10): 811-19.
101. Alencar CM, Leite KLF, Ortiz MIG, Magno MB, Rocha GM, Silva CM, et al. Morphological and chemical effects of in-office and at-home desensitising agents containing sodium fluoride on eroded root dentin. *Arch Oral Biol.* 2020; 110: 104619.

ANEXO A- COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA EM ANIMAIS



Proc. CEUA nº 06/2018

Araraquara, 29 de maio de 2018

Senhores Pesquisadores:

A Comissão de Ética no Uso de Animal – CEUA desta Faculdade, em sessão hoje realizada, procedeu a análise do Protocolo do projeto de pesquisa de sua responsabilidade intitulado *“TRATAMENTO DA DENTINA AFETADA COM DIFERENTES SOLUÇÕES ANTIBACTERIANAS E REMINERALIZADAS EM TRATAMENTO RESTAURADOR ATRAUMÁTICO (TRA)”* (Proc. CEUA nº 06/2018), e considerou-o APROVADO. No entanto, essa Comissão solicita que, na ocasião do Relatório Final, atualize as seguintes informações: 1) na indução de cárie das amostras, a concentração do inóculo de *S. mutans* precisa ser reportado em células/mL ou UFC/ml e 2) o título do projeto, devido à incompatibilidade ocorrida entre a declaração de origem dos dentes bovinos e os demais documentos apresentados.

Lembramos que o Relatório Final deste projeto deverá ser entregue em **MARÇO/2019**.

Atenciosamente.


Profa. Dra. CARINA APARECIDA FABRÍCIO DE ANDRADE
 Coordenadora da CEUA

À
Profª Drª ÂNGELA CRISTINA CILENSE ZUANON
 DID. Pesquisador Responsável
 Departamento de Clínica Infantil



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
JULIO DE MESQUITA FILHO
Câmpus de Araraquara



FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Proc. CEUA nº 06/2018

Araraquara, 03 de abril de 2018


Senhor Pesquisador:

De ordem superior, esta Comissão após a apreciação pelos senhores relatores do projeto de sua responsabilidade (Proc. CEUA 06/2018), vem solicitar que sejam realizadas algumas modificações (em anexo), para que o mesmo se atesque aos princípios éticos na experimentação animal, conforme prevê a legislação brasileira em vigor.

Encaminho, juntamente com este ofício, o CD contendo os arquivos originalmente entregues para que sejam **acrescentados (no mesmo CD)** novos arquivos com as respostas solicitadas pelos Relatores, **em uma pasta distinta**. Lembro que os novos arquivos deverão ser acrescentados de modo que um deles contenha a identificação do pesquisador e outro, não. Além da devolução do CD com os arquivos contendo as respostas, uma via impressa da mesma, com identificação, deverá ser entregue.

Esclareço que Vossa Senhoria tem o prazo de 60 dias a contar do recebimento deste, para atender à solicitação do mesmo. Transcorrido tal prazo sem que haja qualquer manifestação, seu pedido será definitivamente arquivado.

Atenciosamente.


ANA FERNANDA BIAVA SENE
CEUA

À
Profa. Dra. ÂNGELA CRISTINA CILENSE ZUANON
DD. Pesquisador Responsável
Departamento de Clínica Infantil

Não autorizo a publicação deste trabalho até o dia 17 de março de 2022

(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 17 de março de 2020

Mônica Irma Aparecida Valdeci de Souza