

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 17/03/2022.



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.

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.