



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

MARIA CLARA MÜLLER DE ANDRADE

**INVESTIGAÇÃO DA AÇÃO REMINERALIZADORA E DA
PENETRAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA NA
DENTINA HUMANA**

Recife
2021

MARIA CLARA MÜLLER DE ANDRADE

**INVESTIGAÇÃO DA AÇÃO REMINERALIZADORA E DA
PENETRAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA NA
DENTINA HUMANA**

Dissertação apresentada ao programa de
Pós-Graduação em Química do Centro de
Ciências Exatas e da Natureza da
Universidade Federal de Pernambuco,
como requisito para obtenção do título de
mestre em Química.

Área de concentração: Química Inorgânica

Orientador (a): Prof. Dr. André Galembeck

Recife
2021

Catálogo na fonte
Bibliotecária Monick Raquel Silvestre da S. Portes, CRB4-1217

A553i Andrade, Maria Clara Müller de
 Investigação da ação remineralizadora e da penetração de nanopartículas
 de prata na dentina humana / Maria Clara Müller de Andrade. – 2021.
 122 f.: il., fig., tab.

 Orientador: André Galembeck.
 Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCEN,
 Química, Recife, 2021.

 Inclui referências.

 1. Química inorgânica. 2. Nanopartículas. I. Galembeck, André (orientador).
 II. Título.

 546 CDD (23. ed.) UFPE - CCEN 2022-58

MARIA CLARA MÜLLER DE ANDRADE

**INVESTIGAÇÃO DA AÇÃO REMINERALIZADORA E DA
PENETRAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA NA
DENTINA HUMANA**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Química do Centro de Ciências Exatas e da Natureza da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de mestre em Química.

Aprovado em: 22/03/2021

BANCA EXAMINADORA

Prof. André Galembeck (orientador)
Departamento de Química Fundamental
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Nelson Eduardo Duran Caballero
Instituto de Química
Universidade Estadual de Campinas

Prof^a. Ana Paula Paim
Departamento de Química Fundamental
Universidade Federal de Pernambuco

Dedico este trabalho a minha tia-avó, Miriam Cordeiro Campos (*in memoriam*). Orgulhosa ex profissional da área da educação, que, em tempos de lucidez, vibrava com entusiasmo pelas conquistas acadêmicas de seus entes queridos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, que, de acordo com as minhas crenças, concedeu-me saúde e coragem para que eu pudesse superar os desafios desta jornada. A minha família, por todo o apoio emocional e constante torcida. Ao meu noivo, pelo encorajamento, suporte e companheirismo, com extensão aos meus sogros e demais membros de sua família. A todos os meus amigos e familiares próximos, que acompanham e vibram pelas minhas conquistas acadêmicas desde a fase colegial.

Enorme gratidão ao Prof. André, meu orientador, por todo o conhecimento a mim transmitido e pela confiança em mim depositada. Também o agradeço pelo incentivo à persistência na execução e melhoria contínua deste trabalho, mesmo em tempos adversos. As inspiradoras discussões, críticas construtivas e paciência foram de importância inestimável.

Aos integrantes e egressos do grupo CHICO, Mônica, Lucas, Heliana, Aline, Yolice, Euzébio, Miguel, Cristal, Sidicleia, Thelma, Camilla, Helena, Ítalo e Beatriz, pelo auxílio nas pesquisas e pela prazerosa convivência.

Aos colegas e amigos dos Programas de Pós-Graduação em Química e em Ciências dos Materiais da UFPE, Lilian, Dyego, Sarah, Luisa, Hélder, Eric e Yuri, pelas experiências acadêmicas e momentos de ~~desespero~~ descontração compartilhados.

A Daniel (TESCAN), Fabiano (LNNano), Daniel e Márcio (DEN), pelo excelente suporte técnico com as análises realizadas neste trabalho.

Aos profissionais dentistas Laís Menezes, Joás Araújo, Eliane Arvored, profa. Aronita Rosenbalt e profa. Andrea Gadelha (do Banco de Dentes Humanos), pelo suporte com ocasionais dúvidas do domínio da odontologia ou pelo auxílio na etapa de coleta de amostras.

Às secretaria e vice coordenadora do programa de PG em Química, Patrícia e profa. Janaína, pela prontidão em sanar dúvidas e resolver burocracias, sempre com muita paciência e atenção.

A todos os docentes, pesquisadores, técnicos e funcionários do Departamento de Química Fundamental que de alguma forma contribuíram para a minha formação.

A CAPES, pela bolsa concedida.

RESUMO

O presente trabalho tem como objetivo investigar a ação remineralizadora e a penetração de nanopartículas de prata (AgNPs) na dentina humana. Formulações a base de AgNPs têm sido aplicadas no tratamento de cáries dentárias com bons resultados clínicos. Ademais, a atividade bactericida das AgNPs contra espécies cariogênicas é bastante documentada na literatura. Porém, os mecanismos envolvidos na ação cariostática das nanopartículas ainda não são completamente elucidados. Pouco se sabe sobre a interação das nanopartículas de prata com a estrutura dos dentes depois que a formulação é aplicada. A ação remineralizadora de agentes cariostáticos é considerada um aspecto importante na paralisação de cáries, pois provoca o endurecimento do tecido lesionado, tornando-o mais resistente à ação corrosiva das bactérias. Já a penetração das AgNPs na dentina pode ser um fator importante na durabilidade dos efeitos antibacterianos do tratamento, através da lenta liberação de íons Ag^+ para a região lesionada. A ação remineralizadora das AgNPs foi investigada através de um experimento *in vitro* no qual amostras de dentina foram submetidas a um procedimento de ciclagem de pH para formação de cárie artificial, após tratamento com as nanopartículas. Depois, as amostras foram caracterizadas por Microtomografia Computadorizada de Raios X (μTC), Difractometria de Raios X (DRX) e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Os resultados mostraram que a formulação de AgNPs é efetiva na remineralização da dentina e na diminuição da profundidade de lesão e foi detectada a formação de AgCl na superfície remineralizada. Para investigar a penetração de AgNPs nos túbulos dentinários, amostras de dentina tratadas com as NPs foram fraturadas manualmente ou seccionadas por feixe de íons focalizados (FIB), para observação de seções transversais por MEV. Foi detectada a presença de AgNPs no interior dos túbulos dentinários, canalículos microscópicos que compõem a dentina, confirmando sua capacidade de penetração nos mesmos. Além disso, foi observada uma dependência da profundidade de penetração com o tempo de aplicação do coloide e o tamanho médio das AgNPs.

Palavras-chave: nanopartículas de prata; dentina; remineralização; penetração; túbulos dentinários.

ABSTRACT

The present work aims to investigate the remineralizing action and the penetration of silver nanoparticles (AgNPs) in human dentin. Formulations based on AgNPs have been applied in the treatment of dental caries with good clinical results. Furthermore, the bactericidal activity of AgNPs against cariogenic species is well documented in the literature. However, the mechanisms involved in the cariostatic action of nanoparticles are not yet fully elucidated. Little is known about the interaction of silver nanoparticles within the tooth structure after the treatment is applied. The remineralizing action of cariostatic agents is considered an important aspect of caries arrestment, as it causes the injured tissue to harden, making it more resistant to the corrosive action of bacteria. The penetration of AgNPs in dentin, on the other hand, can be an important factor in the durability of the treatment's antibacterial effects, through the slow release of Ag⁺ ions to the injured region. The remineralizing action of AgNPs was investigated through an *in vitro* experiment in which the dentin was subjected to a pH cycling procedure to form artificial caries, after treatment with the nanoparticles. Then, samples were characterized by X-Ray Computed Microtomography (μ CT), X-Ray Diffractometry and Scanning (XRD) Electron Microscopy (SEM). The results revealed that the AgNPs formulation is effective in the remineralization of dentin. Also, the formation of AgCl was detected in the remineralized dentin. To investigate the penetration of AgNPs in the dentinal tubules, dentin samples treated with nanoparticles were either manually fractured or sectioned by focused ion beam (FIB), to observe cross-sections through SEM. The presence of AgNPs was detected inside the dentinal tubules, microscopic canaliculi that make up the dentin, confirming its ability to penetrate them. In addition, a dependence on depth of depth was observed with the time of application of the colloid and the average size of the AgNPs.

Keywords: silver nanoparticles; dentin; remineralization; penetration; dentinal tubules.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Abordagens Top-down e Bottom-up para síntese de nanopartículas	24
Figura 2 -	Mecanismo de formação das nanopartículas de prata por redução química da prata iônica utilizando NaBH ₄ como agente redutor.....	24
Figura 3 -	Estrutura do dente	30
Figura 4 –	Metodologia do experimento para investigar efeitos das AgNPs na remineralização da dentina em um processo de formação e progressão de carie artificial.....	39
Figura 5 –	Fotografias das amostras de dentina (n=9) divididas em 3 grupos, de acordo com os tratamentos experimentais aos quais foram submetidas (Grupo S = Formulação contendo nanopartículas de prata, quitosana e flúor; Grupo W = Água deionizada; Grupo F = Solução de quitosana e flúor).....	43
Figura 6 –	Metodologia do experimento para investigação da penetração de AgNPs na dentina.....	48
Figura 7 –	Ilustração da secção transversal regular obtida por desbastamento em forma de trincheira e da disposição da amostra em relação ao feixe de elétrons.....	53
Figura 8 -	Espectros de absorção UV-VIS dos colóides AgNP	55
Figura 9 -	Imagens de STEM das AgNPs. (a) S1; (b) S2. Composição dos colóides de AgNP em termos de morfologia e distribuição de tamanho de partícula; (c) S1; (d) S2.....	58
Figura 10 -	Imagens de μ TC mostrando secções transversais de amostras de dentina dos grupos (a) F (controle positivo; amostras tratadas com solução de quitosana e flúor); (b) S (amostras tratadas com AgNPs) e (c) W (controle negativo; amostras tratadas com água deionizada). O desnível entre as partes com e sem a proteção do esmalte de unha,	

	destacados pelos retângulos coloridos, evidenciam a formação da carie artificial.	60
Figura 11 -	Profundidade de lesão média para cada grupo experimental (W = controle negativo; S = Tratamento com AgNPs; F = controle positivo).	62
Figura 12 -	Imagens de MEV das superfícies de dentina após ciclagem de pH, mostrando túbulos dentinários abertos (a,d,g) Grupo W (controle negativo); (b, e, h) Grupo S (Tratamento com AgNPs); (c,f,i) Grupo F (controle positivo).	64
Figura 13 -	Curvas de calibração para determinação de concentrações de cálcio e fosforo por ICP-OES	67
Figura 14 –	Curvas de crescimento das quantidades de Ca e P removidas na desmineralização e absorvidas na remineralização da dentina durante Ciclagem de pH, para cada grupo experimental (Grupo W = Controle negativo; Grupo S = Tratamento com AgNPs; Grupo F = Controle positivo).	70
Figura 15 –	Reconstrução 3D das imagens de microtomografia de raios x das amostras de dentina e as respectivas medidas da área superficial (Asup) e do percentual de área superficial de esmalte (E).....	73
Figura 16 –	Diagramas de dispersão para os conjuntos de pares ordenados (Asup,[Ca]removida); (Asup, [P]removida); (E, [Ca]removida) e (E, [P]removida) referentes a cada amostra de dentina na etapa da formação de lesão inicial ...	75
Figura 17 –	Gráficos das quantidades médias de Ca e P removidas na desmineralização e absorvidas na remineralização por mm ² de área superficial de dentina, para os diferentes dias da ciclagem de pH (eixo x) e diferentes grupos experimentais (cores).....	77
Figura 18 –	Difratogramas de amostras de dentina dos diferentes grupos experimentais (Grupo W = Controle negativo;	

	Grupo S = Tratamento com AgNPs; Grupo F = Controle positivo).	79
Figura 19 -	Medidas de ângulo de contato entre superfícies de amostras de dentina e coloides.....	81
Figura 20 –	Imagens de MEV da superfície da dentina de uma amostra sem AgNPs (controle negativo); (a) exposição de túbulos dentinários; (b) região com alguns túbulos obstruídos; (c) região com túbulos abertos; (d) imagem de um único túbulo dentinário; (e) imagem com brilho aumentado e foco na região interna do túbulo	83
Figura 21 –	Superfície das amostras de dentina expostas aos coloides S1 e S2 por 20h (1200 min)	84
Figura 22 -	Paredes internas de túbulos dentinários vistos a partir da superfície da dentina. (a) amostra de controle negativo, sem AgNPs. (b, c, d) amostra tratada com o coloide S2 com tempo de exposição de 20h; (e) amostra tratada com o coloide S1 com tempo de exposição de 20h (f) partículas esféricas observadas no interior de um túbulo	85
Figura 23 –	Curva de variação do coeficiente de emissão de BSE com o número atômico do elemento presente na superfície analisada	87
Figura 24 –	Imagem de SE (esquerda) e BSE (direita) de região granulosa na superfície da amostra S2/1200	89
Figura 25 -	Imagens de MEV da superfície da dentina. (a, b) amostra do Grupo 0, controle negativo. (c, d) amostra do Grupo S2/30. As imagens com aumento menor (a, c) mostram a distribuição dos túbulos dentinários na superfície exposta da dentina, enquanto um único túbulo dentinário pode ser observado nas imagens (b) e (d).....	90
Figura 26 -	Imagens de MEV mostrando um túbulo dentinário a partir da superfície de uma amostra de dentina do grupo S1/03. (a) Imagem de SE; (b) Imagem de BSE, onde é possível ver pontos brilhantes referentes às AgNPs.	91

Figura 27 -	Canto superior esquerdo: Imagem de SE da região da amostra de dentina do Grupo 0 (controle negativo) analisada por EDS; Canto superior direito: Espectro de EDS mostrando os picos referentes aos elementos identificados na amostra; Mapas mostrando a distribuição dos principais elementos detectados na superfície da dentina.	92
Figura 28 -	Canto superior esquerdo: Imagem de SE da região da amostra de dentina do Grupo S1/30 analisada por EDS; Canto superior direito: Mapa mostrando a distribuição da prata (marcação vermelha) na superfície da dentina; Canto inferior: Espectro de EDS mostrando os picos referentes aos elementos identificados na amostra.	93
Figura 29 -	Imagens de MEV das superfícies da dentina de amostras (a,b) S1/03 e (c, d) S1/30, mostrando mais AgNPs nas entradas dos túbulos para um maior tempo de tratamento. ..	94
Figura 30 –	Secções transversais das amostras de dentina obtidas por ruptura; (a,b) amostra do grupo S1/30; (c,d) amostra do grupo S1/03; (e) Imagem de SE – esquerda; e BSE – direita; mostrando túbulos sem AgNPs abaixo da superfície obstruída da amostra S1/03.	96
Figura 31 –	Secção transversal de amostra de dentina obtida por ruptura da amostra S2/30.	97
Figura 32 –	MEV de secção transversal da amostra S1/30-B, mostrando a presença de partículas com sinal de BSE elevado no interior da dentina. (a,b,c,d) Imagens 50% SEI e 50% BSEI mostrando a localização das partículas em relação à superfície da dentina e aos túbulos dentinários; (e) imagem 100% SEI (à esquerda) e 100% BSEI (à direita) mostrando que o tamanho e a morfologia das partículas identificadas não condizem com os das AgNPs do coloide S1	99

Figura 33 –	Mapeamento elementar por EDS da amostra S1/30-B, revelando a penetração da prata mas também a presença de contaminantes (Al e S)	100
Figura 34 -	MEV de secção transversal da amostra S1/03-C (a) Imagem de SE mostrando longas extensões de túbulos expostos desde a superfície; (b) Defeitos morfológicos causados pela ruptura das amostras, impedindo o rastreamento das AgNPs em um único túbulo; (c) AgNPs dispersas nas paredes internas de um túbulo	102
Figura 35 –	MEV de secção transversal da amostra S1/03-C. (a,b) Imagens de SE; (c) Imagem de BSE; com magnificação crescente mostrando a região de maior profundidade onde as AgNPs foram detectadas.....	103
Figura 36 -	Áreas internas de túbulos expostos na secção transversal por ruptura de amostra S1/03-C. (a) AgNPs fixadas na parede vertical da secção tubular côncava; (b) AgNPs depositadas sobre fibra de colágeno; (c) Acumulo de AgNPs nas bordas de um poro	104
Figura 37 -	Resultados de FIB-MEV para amostra S1/03. (a) Secção transversal da dentina obtida pela ação do FIB, revelando o interior de quatro túbulos dentinários; (b,c) AgNPs detectadas nas paredes dos túbulos; (d) região abaixo da linha vermelha, onde não foram encontradas AgNPs.....	106
Figura 38 –	Resultados de FIB-MEV e EDS para amostra S1/30. (a) Secção transversal da dentina, obtida por FIB, mostrando aglomerados de AgNPs no interior dos túbulos; (b) Região interna dos túbulos próxima à superfície, mostrando a penetração de AgNPs com formação de aglomerados; (c) mapeamento elementar do oxigênio (azul) e prata (vermelho) sobrepostos à imagem de SE; (d) mapeamento elementar da prata mostrando as AgNPs dentro dos túbulos	108

Figura 39 - Resultados de FIB-MEV para amostra S2/30. (a) Secção transversal da dentina obtida pelo desbastamento por íons Ga^+ , em forma de trincheira; (b, c) AgNPs distribuídas na dentina intratubular; (d, e) As NPs detectadas no interior dos túbulos V e VI foram rastreadas até a região da linha vermelha tracejada; (f) Região do túbulo VII sem AgNPs.... 109

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Lista dos reagentes utilizados na síntese das formulações de AgNPs.....	35
Tabela 2 -	Descrição das soluções Desmineralizadora e Remineralizadora e dos reagentes utilizados no seu preparo	40
Tabela 3 -	Grupos amostrais para investigação do efeito de nanopartículas de prata na remineralização da dentina e composição das substâncias utilizadas em seus respectivos tratamentos	44
Tabela 4 -	Grupos amostrais para investigação da penetração de nanopartículas de prata na dentina e parâmetros dos respectivos tratamentos aplicados	50
Tabela 5 -	Medidas da profundidade da lesão nas amostras de dentina com cárie artificial.....	61
Tabela 6 -	Parâmetros associados ao desgaste e desmineralização da dentina. Resultados para cada grupo experimental. (W = Controle negativo; S = Tratamento com AgNPs; F = Controle positivo).	65
Tabela 7 –	Quantidades de cálcio e fósforo removidas na desmineralização e absorvidas na remineralização das amostras de dentina em diferentes dias da ciclagem de pH. (Grupo W = Controle negativo; Grupo S = Tratamento com AgNPs; Grupo F = Controle positivo).	68
Tabela 8 –	Coeficientes de correlação calculados para o conjunto de pares ordenados (Asup, [Ca]removida); (Asup, [P]removida); (Asup.pond, [Ca]removida); (Asup.pond, [P]removida); referentes a cada amostra na etapa da formação de lesão inicial.....	74
Tabela 9 –	Quantidades de Ca e P removidas de cada amostra de dentina na formação da lesão inicial e valores corrigidos em	

	função da área superficial das amostras correspondentes.	
	Parâmetros do teste de variância entre os dados.	76
Tabela 10 –	Medidas de ângulo de contato entre os coloides e superfícies dentinárias	81
Tabela 11 –	Números Atômicos (Z) da Prata e dos principais elementos que constituem a dentina (Ca, P e O - hidroxiapatita; C, O, H e N - colágeno)	88
Tabela 12 -	Resultados das medidas de FIB-MEV referentes à penetração de AgNPs nos túbulos dentinários e outras informações pertinentes	111

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	19
1.1	PROPRIEDADES BACTERICIDAS DA PRATA IÔNICA E DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA.....	21
1.1.1	Mecanismos	22
1.2	SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA.....	23
1.2.1	Síntese por redução química	25
1.3	CÁRIES	29
1.3.1	Estrutura e composição do dente.....	30
1.3.2	Mecanismos de formação e progressão da carie	31
2	OBJETIVOS	33
2.1	OBJETIVO GERAL	33
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
3	PARTE EXPERIMENTAL	34
3.1	SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS COLOIDES DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA.....	34
3.1.1	Síntese	34
3.1.2	Caracterização	36
3.2	INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA NA REMINERALIZAÇÃO DA DENTINA EM UM PROCESSO CARIOGÊNICO	38
3.2.1	Preparação das Soluções Desmineralizadora e Remineralizadora	40
3.2.2	Preparação das amostras de dentina com cárie artificial, tratamento e ciclagem de pH	41
3.2.3	Microtomografia Computadorizada de Raios X (μTC) das amostras de dentina com cárie artificial	44
3.2.4	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) da superfície das amostras de dentina com cárie artificial	45

3.2.5	Difratometria de Raios-X (DRX) da superfície das amostras de dentina com cárie artificial	45
3.2.6	Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-OES) das soluções coletadas durante ciclagem de pH.....	46
3.3	INVESTIGAÇÃO DA PENETRAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA NOS TÚBULOS DENTINÁRIOS	47
3.3.1	Preparação das amostras de dentina e tratamento com nanopartículas de prata.....	49
3.3.2	Medida do ângulo de contato entre a superfície da dentina e os coloides de nanopartículas de prata	50
3.3.3	Análise das superfícies das amostras por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia por Dispersão de Raios-X (EDS).....	50
3.3.4	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) de secções transversais das amostras obtidas por ruptura	51
3.3.5	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) de secções transversais das amostras obtidas por Feixe de Íons Focalizados (FIB)	51
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
4.1	CARACTERIZAÇÃO DOS COLOIDES DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA (AgNPs).....	54
4.1.1	Espectroscopia de absorção UV-Vis	54
4.1.2	Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS)	55
4.1.3	Potencial Zeta (PZ).....	56
4.1.4	Microscopia Eletrônica de Transmissão por Varredura (STEM)	57
4.2	INVESTIGAÇÃO SOBRE A HIPÓTESE DAS AgNPs PROMOVEREM REMINERALIZAÇÃO NA DENTINA.....	59
4.2.1	Profundidade da lesão de carie artificial	59
4.2.2	Morfologia da superfície da dentina com lesão de carie artificial	63

4.2.3	Quantificação de Ca e P perdidos na desmineralização e recuperados na remineralização da dentina	66
4.2.4	Investigação dos minerais formados na remineralização da dentina	78
4.3	INVESTIGAÇÃO DA PENETRAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA NA DENTINA.....	81
4.3.1	Ângulo de contato entre a superfície da dentina e os coloides de AgNP	81
4.3.2	Análise da superfície de amostras de dentina tratadas com AgNPs	82
4.3.3	Análise da secção transversal de amostras de dentina tratadas com AgNPs	95
5	PERSPECTIVAS	115
6	CONCLUSÕES.....	116
	REFERÊNCIAS	117

1 INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a cárie dentária é a doença mais prevalente no mundo (WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2020). Estima-se que mais de 95% da população humana será acometida durante a vida e, de acordo com o Estudo Global de Carga de Doenças publicado em 2015, mais de 2,3 bilhões de pessoas têm cáries não tratadas em dentes permanentes e 560 milhões crianças em dentes decíduos. Como consequência, quase 4,6% dos gastos globais em saúde são investidos anualmente em saúde bucal (LISTL et al., 2015).

A eficácia das formulações baseadas em nanopartículas de prata (AgNPs) para paralização de cárie em ensaios clínicos foi demonstrada há alguns anos pelo nosso grupo de pesquisa (DOS SANTOS et al., 2014). A ação bactericida das AgNPs contra o *Streptococcus mutans*, a principal bactéria responsável pela cárie, e muitas outras bactérias em estudos *in vitro* é amplamente documentada na literatura (TARGINO et al., 2014). Mais recentemente, as AgNPs também provaram ser eficazes contra bactérias resistentes (ZHENG et al., 2018).

Foi demonstrado que uma única aplicação de um coloide de AgNP diretamente nos dentes lesionados é capaz de paralisar 67% dos casos investigados, mesmo após um ano. Nenhuma restauração foi aplicada, e o tratamento dispensa o uso da fresadora e da anestesia. Além disso, os biofilmes de *S. mutans* submetidos a formulações de AgNP apresentaram 0% de viabilidade celular, enquanto um controle positivo (fluoreto de diamino de prata) apresentou 36,5% de viabilidade bacteriana (FREIRE et al., 2015). As formulações têm baixa citotoxicidade para os eritrócitos e nos testes de HET-CAM (FREIRE et al., 2015; TARGINO et al., 2014). Além dos resultados dos ensaios clínicos abrirem perspectivas para a aplicação de AgNPs no ambiente clínico, é importante entender os mecanismos subjacentes à ação dos AgNPs na paralisação da cárie.

A cárie dentária resulta da formação de um biofilme na superfície do esmalte dental, que amolece o tecido levando à exposição dos túbulos dentinários. Quando isso ocorre, as lesões avançam em um ritmo muito maior. Foi demonstrado por vários autores que bactérias patogênicas podem penetrar

nos túbulos dentinários e se multiplicar dentro deles (LOVE; JENKINSON, 2002; STAUFFACHER et al., 2017) sendo frequentemente responsáveis por infecções dentárias ainda mais graves. A abordagem geral desses estudos compreende a remoção do esmalte, cortando os dentes, seguido de inoculação com bactérias e corte longitudinal das amostras para observação no microscópio óptico ou eletrônico de varredura.

Os dentes humanos são compostos pelo esmalte, a parte mais externa e mais dura, e o complexo dentina-polpa. A dentina, composta principalmente por hidroxiapatita e fibras de colágeno tipo I, envolve a polpa, que é um tecido mole sensível feito de nervos dentários, tecido conjuntivo e vasos sanguíneos. Dentina e polpa são referenciadas como um único complexo porque são conectadas pelos túbulos dentinários, canais microscópicos que irradiam através da dentina, da polpa até aproximadamente a borda do esmalte, transportando fluidos e estruturas celulares. Os túbulos dentinários apresentam diâmetro de aproximadamente 2,5 μm (LOVE; JENKINSON, 2002), enquanto o diâmetro das nanopartículas de prata utilizadas no ensaio clínico era $8,7 \pm 3,7$ nm.

Considerando esse contexto, formulamos a hipótese de que a eficácia clínica a longo prazo das AgNPs estaria relacionada à sua penetração nos túbulos dentinários, seguida pela fixação nas paredes dos túbulos e uma liberação lenta de íons Ag^+ . Por meio desse mecanismo, a formulação seria capaz não só de inativar as bactérias presentes na superfície cariada no momento da aplicação, mas também de impedir a formação de novos biofilmes e a invasão bacteriana na região subsuperficial dos túbulos expostos. A penetração de outras substâncias cariostáticas nos túbulos dentinários já foi investigada. Diferentes estudos, ambos baseados principalmente na análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV) de seções longitudinais de amostras após a aplicação da substância, mostraram que o diamin-fluoreto de prata (SDF) penetrou até 40 μm (WILLERSHAUSEN et al., 2015) e mais profundo que 200 μm (SAYED et al., 2019)

O objetivo deste trabalho foi investigar a penetração de AgNPs nos túbulos dentinários usando feixe de íons focado (FIB) combinado com microscopia eletrônica de varredura (FIB-MEV). Esta técnica permite a fresagem controlada da superfície de materiais duros, o que preserva a maior parte das

informações de interesse da estrutura interna. Recentemente, foi empregado para investigar dentes humanos nas escalas micro e nano e para revelar aspectos morfológicos dos tecidos de esmalte e dentina com detalhes sem precedentes (SEZEN et al. 2018).

1.1 PROPRIEDADES BACTERICIDAS DA PRATA IÔNICA E DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA

A prata possui um longo histórico de aplicação como agente antibactericida, sendo utilizada de forma medicinal desde 1881, quando foi introduzida na forma de nitrato de prata para a prevenção de infecção ocular em recém-nascidos. (PAREEK; GUPTA; PANWAR, 2018) As nanopartículas de prata (AgNPs) têm sido reconhecidas por apresentarem excelentes propriedades antimicrobianas contra uma vasta gama de espécies bacterianas, fungicas e virais, com baixa toxicidade para seres humanos e melhor biocompatibilidade, em relação a outras NPs metálicas. (PAREEK; GUPTA; PANWAR, 2018) Recentemente, as AgNPs têm se mostrado eficazes, inclusive, contra bactérias que adquiriram resistência a antibióticos convencionais. (PANPALIYA et al., 2019)

Contra bactérias presentes na cavidade bucal, que estão relacionadas à temática deste trabalho, AgNPs sintetizadas de diferentes formas têm tido eficácia comprovada por estudos *in vitro*. (NORONHA et al., 2017)

INBAKANDAN et al. (2016) demonstrou a inibição do crescimento bacteriano das espécies *Streptococcus oralis*, *Streptococcus salivarius* e *Streptococcus mutans* causada por AgNPs de tamanho entre 100 e 120 nm e formato de flor. As espécies bacterianas citadas são importantes colonizadoras de superfícies dentárias.

EMMANUEL et al., (2015) testou o efeito sinérgico entre AgNPs de 10-20 nm e antibióticos tradicionais contra *S. mutans* e *Lactobacillus acidophilus*, reportando valores de concentração inibitória mínima (MIC) inferior à dos antibióticos sozinhos. *S. mutans* e *Lactobacillus* são considerados os principais agentes envolvidos na iniciação e progressão de caries, respectivamente. (NUNES et al., 2007)

Contra essas mesmas bactérias, AgNPs biosintetizadas a partir de componentes arbóreos, com dimensões de aproximadamente 100 nm, apresentaram maior eficácia do que uma solução de AgNO₃ com a mesma concentração de prata (ABUBACKER; SATHYA, 2015)

Já BESINIS, DE PERALTA e HANDY, (2014) reportaram que AgNPs (<100nm) possuem efeito bactericida contra o *S. mutans* superior aos efeitos de TiO₂NPs, SiO₂NPs e chlorhexidrina 0,12%, que é considerado um padrão de excelência para atividade bactericida em espécies orais.

1.1.1 Mecanismos

O mecanismo da ação bactericida e bacteriostática das AgNPs ainda não é completamente elucidado. A prata metálica possui baixa reatividade em comparação à prata iônica. Porém, quando em contato com fluidos corporais, os átomos superficiais das AgNPs podem ser oxidados, liberando íons Ag⁺ para o meio. O mecanismo mais reconhecido para a ação bactericida das AgNPs é explicado, na verdade, pelo mecanismo dos íons Ag⁺. (NORONHA et al., 2017)

Os íons Ag⁺ possuem afinidade por compostos com nitrogênio, fósforo e enxofre. Ao entrarem em contato com células bacterianas, os íons podem interagir com o esqueleto glicosídico da membrana citoplasmática, formando pequenos orifícios em sua estrutura que alteram a sua permeabilidade, desregulando o transporte de substâncias, ou rompendo-a e provocando quebra celular. (MORONES et al., 2005; SONDI; SALOPEK-SONDI, 2004)

Os íons podem também difundir pela membrana, penetrando a célula, onde desenvolvem interações com o enxofre ou o fósforo que compõem o DNA, impedindo a sua replicação. Alguns estudos também reportam aumento na frequência respiratória de células bacterianas expostas a íons Ag⁺, o que favorece a formação de radicais oxidantes reativos (ROR) no interior da célula, provocando danos às proteínas e ao DNA. Esse processo é atribuído à inibição de atividades enzimáticas importantes para a cadeia respiratória da célula bacteriana, causada por interações entre os íons Ag⁺ e grupos tiol presentes em sua estrutura. (CASTELLANO et al., 2007; LE OUAY; STELLACCI, 2015)

Também tem sido sugerido que AgNPs podem penetrar a parede celular de algumas espécies bacteriana mais facilmente do que os íons Ag⁺. Uma vez

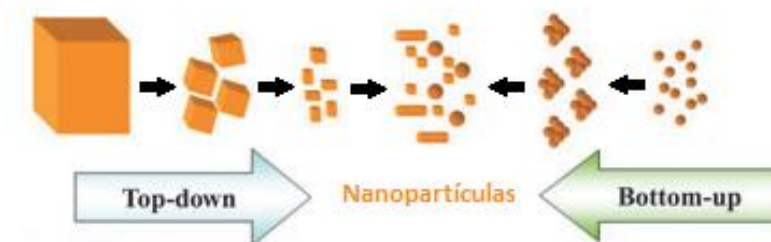
localizadas no interior das células, as AgNPs podem sofrer oxidação liberando íons Ag⁺ diretamente para a região intracelular. Presume-se que, através desse mecanismo, os processos bactericidas mencionados acima possam ser mais rapidamente ativados. (NORONHA et al., 2017; SURESH et al., 2010)

1.2 SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA

A escolha do método de síntese é considerada uma etapa importante na produção de nanopartículas. Diversos fatores devem ser levados em consideração para realizar essa escolha, dependendo da aplicação desejada, tais como: a uniformidade na distribuição de tamanho das NPs obtidas, a reprodutibilidade da síntese levando à possibilidade de controle do tamanho e da morfologia, o rendimento para a morfologia de partícula desejada, no caso de obtenção de partículas anisotrópicas (de morfologias variadas), e a facilidade de adaptação e otimização do processo para a produção em larga escala.

A classificação mais geral das abordagens utilizadas na síntese de nanopartículas consiste em duas categorias, fundamentalmente diferentes, conhecidas como “*top-down*” e “*bottom-up*”. Nos métodos classificados como *top-down*, as NPs são obtidas a partir de processos de desbastamento físicos ou químicos realizados em entidades maiores. Já nos métodos do tipo *bottom-up*, as NPs se formam a partir da junção de unidades menores, como átomos e moléculas, que interagem umas com as outras ao se aproximarem, formando pequenos agregados comumente chamados pelo termo em inglês *clusters*. Na Figura 1 observa-se um resumo visual simples das abordagens “*top-down*” e “*bottom-up*” para a síntese de nanopartículas. (KUMAR, 2009)

Figura 1- Abordagens Top-down e Bottom-up para síntese de nanopartículas



FONTE: Adaptado de Challa Kumar (2009)

Seja através de abordagem “*top-down*” ou “*bottom-up*”, em meio líquido ou em substrato sólido, o método utilizado na síntese de AgNPs também pode ser classificado como químico, físico ou biológico. Alguns exemplos de métodos físicos para produção de AgNPs são as técnicas de evaporação-condensação, ablação a laser e descarga por arco. Métodos químicos para obtenção de AgNPs incluem síntese por radiação, fotólise, eletroquímica, sono-eletroquímica, microemulsão e redução química. Os métodos biológicos são caracterizados pela aplicação de espécies biomoléculas ou microorganismos produzidas por organismos vivos, como agentes redutores ou estabilizantes, em um processo de oxirredução para obtenção de AgNPs em suspensão. Os organismos utilizados podem ser bactérias, fungos, algas, plantas ou extratos de plantas. (RAMANATHAN; GOPINATH, 2017; TARANNUM; GAUTAM, 2019)

Os métodos biológicos compreendem a maioria das chamadas “sínteses verdes”, que têm recebido grande destaque nas pesquisas recentes devido ao foco que a sociedade moderna tem conferido ao desenvolvimento sustentável. Embora a literatura se refira às sínteses verdes remetendo quase exclusivamente aos métodos biológicos, processos químicos e físicos também têm sido desenvolvidos e adaptados de modo a atender às demandas ecológicas contemporâneas. Para tal, consideram-se aspectos como economia de insumos e recursos energéticos, minimização dos resíduos e principalmente a utilização e obtenção de substâncias não nocivas ao meio ambiente (naturais, não tóxicas e biodegradáveis). Além disso, apesar de as AgNPs obtidas por métodos biológicos apresentarem boa estabilidade, métodos físicos e químicos costumam

resultar em partículas menores, mais puras e bem definidas. (BEYENE et al., 2017; EBRAHIMINEZHAD et al., 2017; RAMANATHAN; GOPINATH, 2017)

O método de síntese utilizado neste trabalho consiste na redução química de um agente percussor de prata, ou seja, um método químico de abordagem *bottom-up* que resulta em nanopartículas de prata dispersas em um coloide líquido. A próxima seção trata de aspectos fundamentais e especificidades da síntese de nanopartículas de prata por redução química.

1.2.1 Síntese por redução química

A redução química é uma das técnicas mais utilizados para a síntese de AgNPs. O método consiste em promover uma reação de oxirredução através da adição direta de um reagente orgânico ou inorgânico, atuando como agente redutor, a uma solução contendo uma espécie precursora de prata. Parte-se do princípio de que qualquer espécie metálica dotada de potencial padrão de redução suficientemente alto pode ser sintetizada a partir da redução do íon metálico correspondente, de modo a obter espécies reduzidas estáveis, isto é, que não tendem a ser imediatamente reoxidadas. Para que esse processo seja termodinamicamente favorecido, basta que obedeça à Equação 1 (KUMAR, 2009):

Equação 1

$$E^0(M^{z+}/M) - E^0(R^{z+}/R) > 0$$

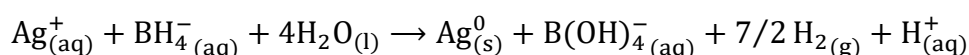
Em que $E^0(M^{z+}/M)$ e $E^0(R^{z+}/R)$ são os potenciais padrão de redução da espécie metálica a ser reduzida e do agente redutor, respectivamente. A prata, como um metal nobre, possui um potencial padrão de redução alto ($E^0(Ag^+/Ag) = + 0,80$ V). Isso confere uma certa liberdade na escolha de um agente redutor que satisfaça a equação 1. (KUMAR, 2009) Exemplos de espécies químicas utilizadas como agentes redutoras na síntese de AgNPs incluem o citrato de sódio ($Na_3C_6H_5O_7$), o borohidreto de sódio ($NaBH_4$), o ácido ascórbico ($C_6H_8O_6$), o etileno glicol ($C_2H_6O_2$), a hidroxilamina (H_3NO), a hidrazina (N_2H_4) e a hidroquinona ($C_6H_6O_2$), além de alguns açúcares e biopolímeros que têm sido aplicados recentemente com o intuito de desenvolver rotas de síntese mais

verdes. (DUPAS; HOUDY; LAHMANI, 2007; EBRAHIMINEZHAD et al., 2017; PACIONI et al., 2015; RAMANATHAN; GOPINATH, 2017; THANH; MACLEAN; MAHIDDINE, 2014)

A síntese de nanopartículas de prata usando borohidreto de sódio (NaBH_4) como agente redutor foi descrita pela primeira vez em uma publicação de 1998 (HYNING; ZUKOSKI, 1998) e permanece sendo uma das rotas mais utilizadas para essa finalidade. As AgNPs obtidas possuem baixa polidispersividade, morfologia perfeitamente esférica e diâmetro médio muito pequeno ($< 10 \text{ nm}$). Além disso, a síntese não necessita de elevadas temperaturas para se processar e é considerada rápida em relação aos processos envolvendo outros agentes redutores. (EBRAHIMINEZHAD et al., 2017; NUR et al., 2018)

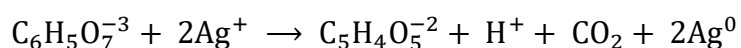
O NaBH_4 é um agente redutor forte ($E^0 = - 0,481 \text{ V}$). Logo, a primeira fase da produção de AgNPs por redução química, que consiste na redução dos íons Ag^+ , ocorre quase instantaneamente após a adição do agente redutor ao sistema contendo o precursor de prata, ou vice-versa. A reação química envolvida nesse processo é representada pela Equação 2 (KUMAR, 2009):

Equação 2



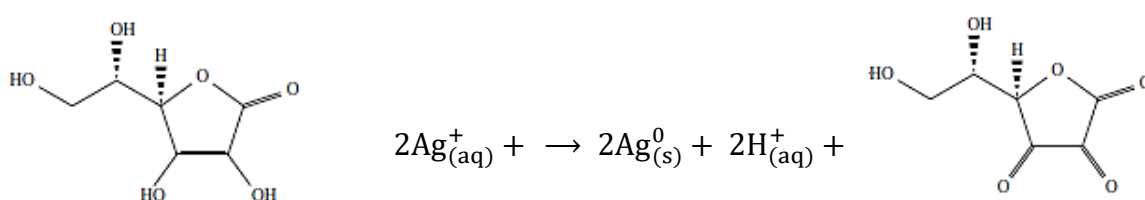
Já o citrato de sódio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) possui potencial de redução relativamente baixo ($E^0 = - 0,180 \text{ V}$). As nanopartículas de prata obtidas pelo uso desse agente redutor costumam ter morfologias variadas (esféricas, triangulares, em forma de bastão, entre outras) e tamanhos maiores do que as partículas obtidas por um agente redutor forte (30 – 115 nm). A reação de redução dos íons Ag^+ pelos íons citrato (Equação 3) é lenta e necessita de elevadas temperaturas ($>70 \text{ }^\circ\text{C}$) para se processar (KUMAR, 2009).

Equação 3



O ácido ascórbico, outro agente redutor fraco ($E^0 = -0,058 \text{ V}$), produz AgNPs uniformes de morfologia semiesférica, sendo necessário temperaturas superiores a 30°C . Nesse caso, a velocidade de redução dos íons Ag^+ e o tamanho das nanopartículas obtidas dependem fortemente do pH do meio. Para que a reação de redução se processe, é necessário ocorrer a desprotonação do ácido ascórbico, formando o íon ascorbato (Equação 4). Como o ácido ascórbico é um ácido fraco ($K_a = -1,6 \times 10^{-12}$), sua desprotonação é favorecida em meio alcalino, aumentando-se a velocidade da reação conforme o aumento do pH.

Equação 4



Comparando as características reportadas para as AgNPs obtidas através das metodologias citadas nesta seção, percebe-se que a espécie química utilizada como agente redutor possui forte influência sobre a distribuição de tamanho e a morfologia. Isso ocorre porque a cinética de redução dos íons Ag^+ e as possíveis interações entre as espécies redutoras e as superfícies das AgNPs recém-formadas podem levar a diferenças nos mecanismos de nucleação e crescimento das nanopartículas. (PACIONI et al., 2015; THANH; MACLEAN; MAHIDDINE, 2014)

Estudos realizados por HYNING e ZUKOSKI (1998) e, posteriormente, por POLTE et al. (2012) elucidam parte do mecanismo e da cinética de formação das nanopartículas de prata via redução química com NaBH_4 . Entende-se a partir desses trabalhos que o crescimento das AgNPs produzidas ocorre em 4 etapas, tanto na presença de um estabilizante quanto em um meio puramente aquoso. O estabilizante utilizado no experimento de POLTE et al. (2012) foi o polímero Polivinilpirrolidona (PVP).

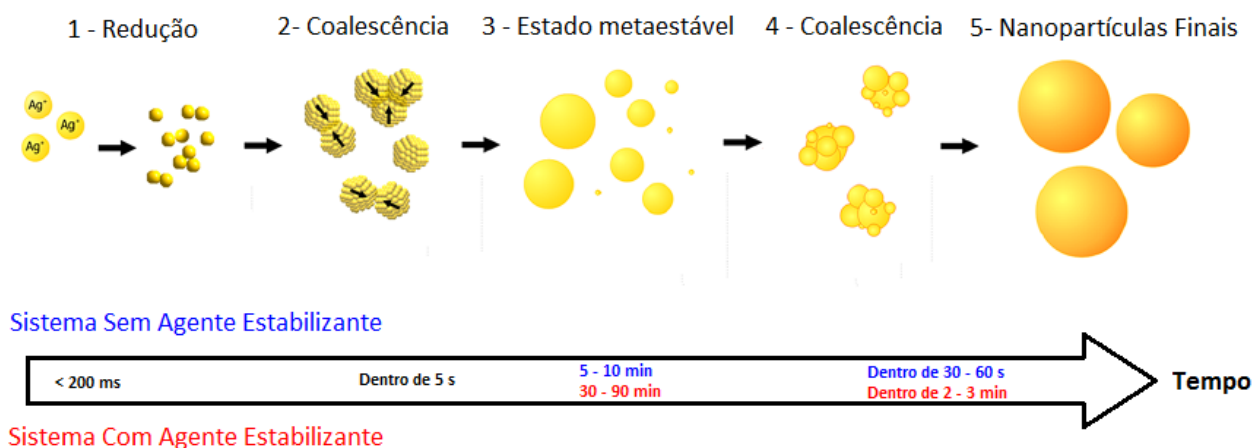
Na primeira etapa do mecanismo proposto, a prata iônica presente na solução é rapidamente reduzida pelos íons de borohidreto. Esse processo dura menos de 200 ms. A segunda etapa, que ocorre em aproximadamente 5 s, consiste na coalescência dos átomos de prata que foram reduzidos, formando

partículas pequenas, com diâmetro médio de 4 – 6 nm. Então, na terceira etapa, as partículas formadas na etapa anterior permanecem em um estado de metaestabilidade, que dura de 5 – 10 min na ausência do agente estabilizante e de 30 – 90 min na presença do mesmo.

A responsável por essa agregação inicial e pela momentânea estabilidade das partículas é uma interação entre o excesso de íons BH_4^- e a superfície das AgNPs formadas. Portanto, a estabilidade começa a decair à medida que o BH_4^- é consumido, acompanhando a formação de hidrogênio, de acordo com a equação: $\text{BH}_4^- + 4\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{B}(\text{OH})_4^- + 4\text{H}_2$. Uma vez que a presença de uma quantidade considerável de polímero na solução certamente dificulta e desacelera a reação de hidrólise, é justificável que o estado de estabilidade provocado pela presença do borohidreto permaneça por um maior período de tempo em um sistema contendo PVP ou outro agente estabilizante de mesma natureza química.

Já a quarta e última etapa, que tem início no momento em que o estado anterior se torna instável devido à quase ausência de íons BH_4^- , consiste em uma segunda coalescência das partículas, até que estas atinjam seu tamanho final, com o qual a estabilidade do coloide efetivamente se mantém. Esse processo leva um tempo de 30 – 60 s em meio reacional contendo apenas água e de 2 – 3 min quando em solução de PVP. O esquema apresentado na Figura 1 resume o mecanismo explicado nesta seção:

Figura 2 - Mecanismo de formação das nanopartículas de prata por redução química da prata iônica utilizando NaBH_4 como agente redutor.



FONTE: Adaptado de Polte *et al* (2012)

1.3 CÁRIES

A cárie dentária se trata de uma doença infecciosa e contagiosa, causada pela corrosão da superfície dental por ácidos gerados nos processos metabólicos das bactérias.

Considera-se que o agente etiológico das cáries não são as bactérias em si, mas os biofilmes por elas formados. Os biofilmes orais normalmente são uma estrutura tridimensional rígida contendo uma ou mais espécies bacterianas, que aderem a superfícies com interfaces sólido-líquido e líquido-ar, propícias a sua sobrevivência, e formam colônias, interagindo cooperativamente para criar um ambiente protegido contra ameaças do meio. No interior dessa comunidade celular bem-estruturada, as bactérias exercem funções vitais, como crescimento, nutrição e respiração. As atividades metabólicas desenvolvidas em conjunto pelas espécies do biofilme desencadeiam mecanismos que podem levar à deterioração progressiva da estrutura dentária. (NUNES et al., 2007)

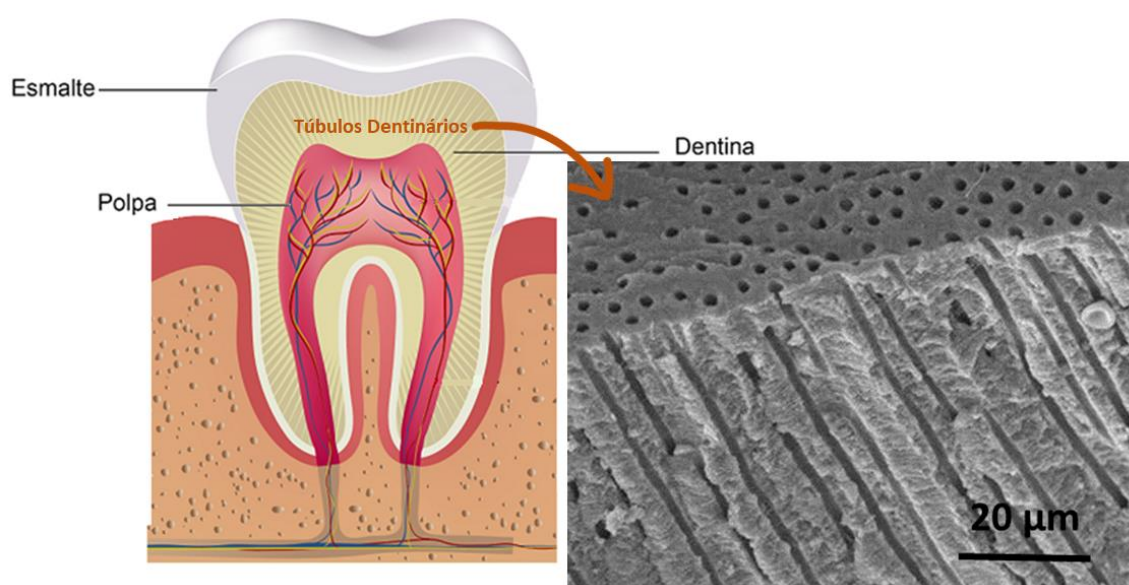
Embora a atividade bacteriana seja responsável pelo desenvolvimento da cárie, a formação do biofilme na superfície dentária, isoladamente, não é uma condição suficiente para que o processo ocorra. Fatores determinantes na formação de lesões de caries incluem as espécies microbiológicas presentes no biofilme, a composição e capacidade tampão da saliva, a velocidade da secreção salivar e aspectos da dieta do indivíduo, como a composição e a frequência. (CESAR; ROSA, 2005)

Do ponto de vista químico, a carie é resultado de uma série de processos desmineralizadores e remineralizadores, que, ao longo do tempo, tende a culminar em um desequilíbrio físico-químico em que a desmineralização é favorecida. (NEEL et al., 2016) Aspectos da estrutura do dente e de como ela é afetada pelo desenvolvimento da carie a partir da formação do biofilme serão abordados nas próximas seções.

1.3.1 Estrutura e composição do dente

Do ponto de vista histológico, a estrutura do dente é dividida essencialmente em três partes: esmalte, dentina e polpa, localizados conforme ilustrado na Figura 3. O esmalte dentário consiste no tecido mais externo e de maior dureza, constituído em cerca de 97% por minerais. Dentre esses minerais, o mais abundante é a hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$). A dentina, situada logo abaixo do esmalte, possui cerca de 70% de minerais em sua composição, sendo 30 % composta por matéria orgânica, na forma de fibras de colágeno. Na dentina, estão localizados os túbulos dentinários, que são canalículos microscópicos (com diâmetro de aproximadamente $2,5 \mu\text{m}$) que se conectam à polpa do dente. A polpa é um tecido mole, localizado na parte mais interna do dente, formada por vasos sanguíneos e nervos. (FEHRENBACH; POPOWICS, 2016; MADEIRA, 2007)

Figura 3 - Estrutura do dente



FONTE: Adaptado de <odontologia.com.br/dentina>

1.3.2 Mecanismos de formação e progressão da carie

Na formação inicial das lesões de carie, as espécies bacterianas consideradas mais importantes são os Estreptococos do Grupo Mutans (EGM), pois elas possuem boa aderência a superfícies dentárias lisas, que é uma característica importante para o processo de colonização. Além disso, essas espécies são capazes de produzir polissacarídeos extracelulares a partir da sacarose, favorecendo a formação de biofilmes espessos. Uma vez formado o biofilme, a característica das espécies bacterianas que irá conduzir o processo de formação de carie é a sua capacidade acidogênica. As EGM produzem ácido láctico ao metabolizar polímeros advindos de carboidratos da dieta do hospedeiro. Toda essa etapa do processo cariogênico ocorre na superfície do esmalte e a atividade acidogênica das bactérias que compõem o biofilme levam, principalmente, à dissolução da camada mineral que constitui esse tecido. Ao corroer a superfície do esmalte, a dentina fica exposta à ação acidogênica do biofilme bacteriano, dando-se início à etapa de progressão das lesões. (CESAR; ROSA, 2005)

Nessa etapa, as espécies bacterianas de maior atividade pertencem ao gênero *Lactobacillus*. Características específicas dessas espécies, como a respiração anaeróbica facultativa e a capacidade de sobreviver no meio ácido, são propícias à manutenção de atividades metabólicas acidogênicas em regiões mais profundas do dente, depois de sua cavitação inicial (CESAR; ROSA, 2005). Porém, além de envolver o protagonismo de espécies diferentes, os efeitos do biofilme bacteriano na dentina também são distintos do que foi relatado para o esmalte, devido à sua composição mista de minerais e matéria orgânica. Quando a carie atinge o nível da dentina, o potencial acidogênico das bactérias promove, além da perda mineral, a degradação das fibras de colágeno. (MEI et al., 2013)

Esse processo acontece a uma taxa muito mais acelerada, e, caso não haja uma intervenção, poderá resultar em caries de níveis profundos, infecção pulpar e perda total do dente. Dois fatores relevantes para o avanço acelerado e o agravamento das caries dentinárias são a interferência da degradação colagenosa na dinâmica de remineralização do tecido e a exposição de túbulos dentinários abertos. Nas próximas seções será explicado como esses fatores se

relacionam com a progressão rápida da cárie dentinária. (LOVE et al., 2000; MEI et al., 2013)

1.3.2.1 Dinâmica de desmineralização e remineralização na dentina

Enquanto a formação de lesão de carie no esmalte consiste basicamente na dissolução de minerais pelo ácido proveniente das bactérias, a progressão de cáries dentinárias se trata de um processo complexo envolvendo tanto a desmineralização quanto a degradação de seus componentes orgânicos. Acredita-se que ambos os fatores apresentam uma interdependência no processo de progressão da lesão, pois quando ocorre a desmineralização, as fibras de colágeno ficam expostas e desprotegidas, e quando a matriz colagenosa é danificada, o processo de remineralização é dificultado. (MEI et al., 2013)

Além disso, acredita-se que uma consequência da desmineralização da dentina pelo efeito acidogênico da bactéria seja a ativação de enzimas metaloproteinases presentes na própria estrutura da matriz colagenosa. Essas enzimas são conhecidas por catalisar a degradação de fibras de colágeno. (ZHAO et al., 2018)

Na remineralização do esmalte, cristais se depositam sobre uma camada mineral existente, naturalmente estruturada. Na dentina, o processo de remineralização é controlado por interações entre cristalitos recém-formados e a matriz colagenosa do tecido, que atua como substrato para a deposição mineral. Portanto, a eficácia de um agente remineralizador também pode depender da sua capacidade de preservar a integridade da estrutura orgânica que compõe a dentina. (MEI et al., 2013)

1.3.2.2 Invasão bacteriana dos túbulos dentinários

Estudos *in vitro* e *in situ* reportam que, quando a cárie atinge o nível da dentina e expõe os túbulos dentinários, diversas espécies bacterianas são capazes de invadir os túbulos, alcançando centenas de microns. Esse processo leva rapidamente ao agravamento das lesões. Profundidades de penetração de

382,3 ± 156,9 µm foram relatadas para *Streptococcus sanguis* e 25,9 ± 21 µm para *Prevotella intermedia* após incubação por 20 dias (BERKITTEN; OKAR; BERKITTEN, 2000). Estudos semelhantes com *S. mutans*, *Lactobacillus acidophilus* e *Enterococcus faecalis* incubados por 30 dias, reportaram penetrações de até 500 µm (TASANARONG et al., 2016)

O mecanismo de invasão bacteriana relatado para algumas bactérias, especialmente estreptococos orais, se inicia através do reconhecimento de fibras de colágeno nas paredes dos túbulos pelas células da bactéria. Os polipeptídeos do antígeno I / II produzidos pelas espécies bacterianas promovem sua adesão inicial às fibras de colágeno. Então, o crescimento e o metabolismo bacteriano auxiliam na desmineralização localizada com liberação simultânea de peptídeos de colágeno. A presença desses peptídeos estimula a produção adicional de polipeptídeos do antígeno I / II, o que aumenta a adesão das células bacterianas às paredes dos túbulos, permitindo a formação de biofilmes (LOVE; JENKINSON, 2002)

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a ação remineralizadora e a penetração de nanopartículas de prata na dentina humana

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar e caracterizar dispersões coloidais de nanopartículas de prata;
- Quantificar a perda e absorção de minerais pela dentina tratada com formulação de AgNPs no processo desmineralização-remineralização;
- Analisar superfície da dentina tratada com AgNPs após processo desmineralização-remineralização;
- Investigar se as AgNPs penetram nos túbulos dentinários quando coloide é aplicado na dentina exposta;
- Determinar profundidade de penetração das AgNPs, comparando efeitos do tamanho das AgNPs e do tempo de aplicação da substância sobre a dentina;

3 PARTE EXPERIMENTAL

Esta seção está dividida em três partes: (i) síntese e caracterização dos coloides de nanopartículas de prata (AgNPs); (ii) investigação dos efeitos das AgNPs na remineralização da dentina em um processo cariogênico simulado por ciclagem de pH e; (iii) investigação da capacidade de penetração das AgNPs nos túbulos dentinários *in vitro*.

As amostras de dentes humanos utilizadas nos experimentos deste trabalho foram obtidas no Banco de Dentes Humanos (BDH), do Departamento de Odontologia da UFPE. Para evitar riscos de contaminação, as amostras foram lavadas com água e sabão e desinfetadas com solução de hipoclorito de sódio 2% por 30 minutos antes da sua manipulação.

Este trabalho foi aprovado pelo comitê de Ética da Universidade Federal de Pernambuco sob protocolo de número 4.101.870.

3.1 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS COLOIDES DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA

3.1.1 Síntese

As sínteses seguiram a metodologia de publicações precedentes do nosso grupo de pesquisa. (DOS SANTOS JUNIOR et al., 2017; DOS SANTOS et al., 2014) Além das nanopartículas de prata, as formulações contêm quitosana como agente estabilizante, ácido acético 1% como solvente e NaF. O coloide de AgNPs que foi utilizado na maior parte dos experimentos deste trabalho será chamado de S1. Para o estudo da penetração das AgNPs nos túbulos dentinários, também foi sintetizado um coloide com nanopartículas de maior tamanho e diferentes morfologias, que será chamado de S2.

3.1.1.1 Materiais

Os reagentes usados na síntese das formulações de AgNPs estão descritos na Tabela 1. Nenhum dos reagentes passou por processos de purificação prévia. Todas as soluções foram produzidas com água deionizada com condutividade 18 MΩ.

Tabela 1 - Lista dos reagentes utilizados na síntese das formulações de AgNPs

Reagente	Procedência
nitrito de prata (AgNO_3), $\geq 99,0\%$ reagente ACS	Sigma-Aldrich
borohidreto de sódio (NaBH_4), $> 98,0\%$ reagente ACS	Sigma-Aldrich
quitosana de baixo peso molecular	Sigma-Aldrich
ácido acético glacial (CH_3COOH), $\geq 99,7\%$ reagente ACS	Sigma-Aldrich
L-ácido ascórbico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$), $\geq 99,0\%$ reagente ACS	Sigma-Aldrich
fluoreto de sódio (NaF), $\geq 98,0\%$ reagente P.A.	Nuclear

FONTE: A autora (2021)

3.1.1.2 Síntese do Coloide S1

Uma solução de quitosana ($0,01 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$) dissolvida em ácido acético $1,0\%$ foi centrifugada a 7500 RPM por 15 minutos. Em seguida, $30,0 \text{ mL}$ do sobrenadante foi transferido para um béquer de $50,0 \text{ mL}$ e colocado em banho de gelo. $1,50 \text{ mL}$ de AgNO_3 $0,11 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ foi adicionado ao sistema sob agitação magnética. Depois de 30 min, iniciou-se a adição gota a gota de $1,5 \text{ mL}$ de NaBH_4 $0,60 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. A redução dos íons Ag^+ foi imediatamente identificada pela mudança de coloração do meio reacional, que adquiriu um tom de amarelo intenso. Após a adição da solução de NaBH_4 , o sistema foi mantido em banho de gelo e sob agitação por mais 30 minutos, sendo posteriormente armazenado em frasco âmbar e mantido a temperatura ambiente.

Para a adição de íons fluoreto na formulação, na concentração de 5000 ppm, 0,11 g de fluoreto de sódio (NaF) foi adicionado a 10 mL do coloide após a síntese de AgNPs ser completada. O coloide foi mantido sob agitação até a completa dissolução do sal.

3.1.1.3 Síntese do coloide S2

A síntese do coloide S2 se dá pelo crescimento das nanopartículas de prata presentes no coloide S1, que são usadas como sementes. Nessa metodologia, 250 µL do coloide S1 foi adicionado à solução de quitosana 1 g.mL⁻¹ previamente dissolvida em ácido acético 1% e centrifugada. Depois, 0,75 mL de ácido ascórbico 0,11 M foi adicionado ao sistema, seguida da adição gota a gota de 0,40 mL de AgNO₃ 0,11 M, sob agitação magnética a temperatura ambiente. A medida em que os íons Ag⁺ eram adicionados ao sistema, a coloração do meio mudava, evidenciando sua redução lenta sobre a superfície das sementes produzindo nanopartículas maiores. A coloração final do coloide obtido foi vermelha escura. Ao final da síntese, o coloide também foi armazenado em frasco âmbar e mantido a temperatura ambiente.

3.1.2 Caracterização

3.1.2.1 Espectroscopia de absorção UV-Vis

Espectros de absorção na região do UV-Visível foram obtidos para os coloides de AgNPs logo após sua síntese, utilizando espectrofotômetro da Ocean Optics modelo DH-2000 com lâmpadas de deutério e tungstênio e cubeta retangular de quartzo com 10 mm de largura. As medidas foram realizadas na região de 300-900 nm de comprimento de onda, com tempo de integração de 3800 ms. Para evitar saturação do sinal do equipamento, os coloides foram diluídos em água deionizada com fator de diluição 1:50.

3.1.2.2 Microscopia eletrônica de Transmissão por Varredura (STEM)

As morfologias das nanopartículas foram investigadas por microscopia de transmissão e varredura (STEM). Os coloides foram diluídos em água deionizada com fator de diluição 1:10 e um volume de aproximadamente 10 µL foi depositado sobre grades de cobre revestidas com carbono e deixado secar a temperatura ambiente por 24h. A análise foi realizada em um microscópio eletrônico da TESCAN modelo Mira3, sob tensão de aceleração eletrônica de 25 KV.

As imagens obtidas também foram utilizadas para determinação da distribuição de tamanho das nanopartículas em cada coloide. Para tal, foram realizadas medidas de pelo menos 300 nanopartículas, utilizando o software Image-J para processamento de imagem.

3.1.2.3 Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS)

O diâmetro hidrodinâmico médio das nanopartículas de prata em cada coloide foi determinado por Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS), usando analisador de partículas da Brookhaven Instruments, modelo NanoBrook Omni. Para cada coloide, o equipamento realizou três ciclos de 30 medidas cada e forneceu o valor médio para o diâmetro e para o índice de polidispersividade.

As medidas do coloide S2 foram realizadas com diluição 1:50 em água deionizada, enquanto as do coloide S1 foram feitas sem diluição. O ângulo de espalhamento utilizado foi de 90° para a medida de ambos os coloides.

3.1.2.4 Potencial Zeta (PZ)

Medidas de Potencial Zeta foram realizadas utilizando analisador de partículas da Brookhaven Instruments, modelo NanoBrook Omni. Ambos os coloides foram diluídos em água deionizada com fator de diluição 1:100. Portanto, os parâmetros utilizados pelo software para calcular os valores de PZ foram equivalentes aos da água a 25° (viscosidade = 0,89 cP, índice de refração

= 1,331 e constante dielétrica = 78,54). O modelo de Smoluchowski foi utilizado para ajuste da curva das medidas obtidas pelo equipamento.

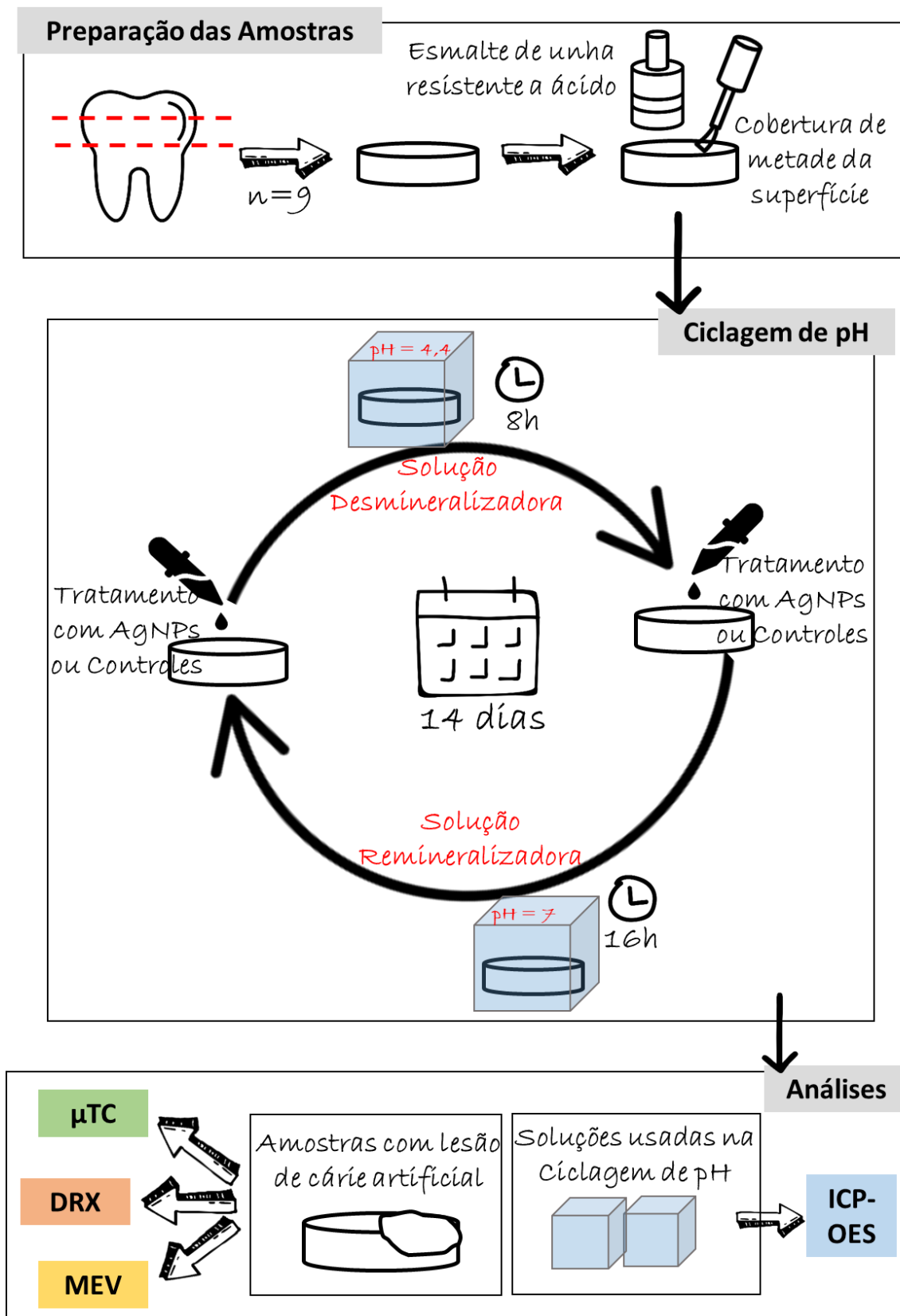
3.2 INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA NA REMINERALIZAÇÃO DA DENTINA EM UM PROCESSO CARIOGÊNICO

Os efeitos do tratamento com a formulação de AgNPs na remineralização da dentina durante um processo cariogênico foram investigados através da formação de uma lesão de cárie artificial em amostras de dentes humanos tratados com AgNPs. Em seguida, as foram feitas análises de Microtomografia Computadorizada de Raios-X (μ TC), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Difractometria de Raios-X (DRX) e Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-OES).

A formação de cárie artificial nas amostras se deu pelo método químico de simulação de processo cariogênico descrito por (DOS SANTOS JUNIOR et al., 2017) Esse método consiste na exposição da dentina por secção ou cavitação mecânica dos dentes, seguida de desmineralização do tecido por exposição a solução ácida.

Para investigar o efeito das nanopartículas de prata na remineralização dos dentes durante a progressão das lesões, realizou-se ciclagem de pH em amostras com cárie artificial tratadas com AgNPs (Grupo S). O mesmo procedimento foi realizado para amostras tratadas com água, como controle negativo (Grupo W) e com solução de quitosana e flúor nas mesmas concentrações da formulação de AgNPs, como controle positivo (Grupo F). A metodologia geral deste experimento encontra-se resumida na Figura 4 e será detalhada nas próximas seções.

Figura 4 – Metodologia do experimento para investigar efeitos das AgNPs na remineralização da dentina em um processo de formação e progressão de cárie artificial



FONTE: A autora (2021)

As análises de μ TC foram realizadas no Laboratório de Tomografia Computadorizada de Raios-X (LTC-RX) do Departamento de Energia Nuclear (DEN). As medidas de DRX e o ICP-OES foram obtidas na Central Analítica do Departamento de Química Fundamental (CA-DQF). Já as análises de MEV foram realizadas no Laboratório de Compostos Híbridos e Coloides (CHICO-DQF). Todas as instalações citadas nesta seção pertencem à Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

3.2.1 Preparação das Soluções Desmineralizadora e Remineralizadora

As soluções Desmineralizadora e Remineralizadora (VIEIRA COSTA E SILVA et al., 2018) que foram utilizadas na ciclagem de pH nas amostras de dentina com cárie artificial foram preparadas no laboratório CHICO, DQF-UFPE. Os reagentes utilizados em cada solução e suas respectivas funções e concentrações estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2 - Descrição das soluções Desmineralizadora e Remineralizadora e dos reagentes utilizados no seu preparo

Solução Desmineralizadora (pH = 4,40)			
Reagente	Procedência	Função na Solução	Concentração (mol,L ⁻¹)
Nitrato de Cálcio (Ca(NO ₃) ₂), ≥ 99,0%	Vetec	Fonte de íons Ca ²⁺	0,0002
Fosfato de Potássio Monobásico (KH ₂ PO ₄), ≥ 99,0%	Cinética	Fonte de íons PO ₄ ³⁻	0,0002
Ácido acético glacial (CH ₃ COOH), ≥ 99,7%	Sigma-Aldrich	Tampão*	0,075
Solução Remineralizadora (pH = 7,00)			
Reagente	Procedência	Função na Solução	Concentração (mol,L ⁻¹)

Nitrato de Cálcio (Ca(NO ₃) ₂), ≥ 99,0%	Vetec	Fonte de íons Ca ²⁺	0,0015
Fosfato de Potássio Monobásico (KH ₂ PO ₄), ≥ 99,0%	Cinética	Fonte de íons PO ₄ ³⁻	0,0009
Cloreto de Potássio (KCl), ≥ 99,0%	Sigma-Aldrich	Tampão**	0,15
Trizma® base, ≥ 99,0%	Sigma-Aldrich	Tampão**	0,02

*Junto com solução de NaOH, adicionada posteriormente até a solução atingir pH = 4,5

**Junto com solução de HCl, adicionada posteriormente até a solução atingir pH = 7,0

FONTE: Vieira Costa e Silva *et al.* (2018)

Os reagentes foram dissolvidos em 1000 mL de água deionizada, nas quantidades calculadas para obter 3000 mL de cada solução com as concentrações descritas acima. Então, o pH das soluções foi ajustado com a adição lenta de solução 1,0 mol.L⁻¹ de HCl (≥ 99;7%, Sigma-Aldrich) à solução remineralizadora e solução 1,0 mol.L⁻¹ de NaOH (≥99;0%, Sigma-Aldrich) à solução desmineralizadora, sob agitação. A mudança no pH foi acompanhada, por medidas realizadas em pHmetro digital, até que as soluções desmineralizadora e remineralizadora atingissem pH = 4,5 e pH = 7,0, respectivamente. Depois, as soluções foram transferidas para balões volumétricos de 3000 mL e acrescidas de água deionizada até completar o volume final.

3.2.2 Preparação das amostras de dentina com cárie artificial, tratamento e ciclagem de pH

Dentes previamente lavados e desinfetados tiveram a raiz e o terço apical da coroa removidos através de secções longitudinais, utilizando discos rotatórios de serra de diamante, de modo a obter espécimes cilíndricas com a dentina exposta na superfície. Espécimes obtidas a partir de dentes molares, que possuem maior área superficial, foram seccionadas transversalmente e divididas em quatro partes, a fim de obter maior número de amostras.

Depois, a região superficial de cada espécime foi polida manualmente utilizando uma sequência de seis lixas d'água, com granulometrias variando de 360 – 5000 mesh. Após o polimento, a regularidade das superfícies foi inspecionada por um microscópio USB e nove amostras foram selecionadas e distribuídas aleatoriamente em três grupos, de acordo com os tratamentos experimentais a que foram posteriormente submetidas.

Seguindo procedimento típico para formação de caries artificiais por método químico, duas camadas de esmalte de unha resistente a ácido foram aplicadas em parte da superfície das amostras antes de submetê-las ao processo de desmineralização. O objetivo da aplicação do esmalte é induzir a progressão da lesão por desmineralização apenas na parte desprotegida, a fim de observar os efeitos do tratamento com a substância teste na redução da profundidade da lesão ao final do processo de ciclagem de pH (MARQUEZAN et al., 2009) Nessa etapa foram escolhidos esmaltes de cores diferentes para facilitar a identificação dos grupos durante o experimento. Porém, os esmaltes foram padronizados em relação à marca e data de fabricação. As amostras de dentina obtidas após essa preparação e os grupos nos quais foram divididas estão apresentados na Figura 5.

Figura 5 – Fotografias das amostras de dentina (n=9) divididas em 3 grupos, de acordo com os tratamentos experimentais aos quais foram submetidas (Grupo S = Formulação contendo nanopartículas de prata, quitosana e flúor; Grupo W = Água deionizada; Grupo F = Solução de quitosana e flúor)



FONTE: A autora (2021)

Finalmente, as amostras ainda sem tratamento foram mergulhadas em 10 mL da solução desmineralizadora em recipientes separados e lacrados. As amostras foram mantidas dessa forma na estufa a 37 °C, que é a temperatura da cavidade bucal, durante 8h. Os frascos contendo o volume de solução desmineralizadora no qual cada uma das amostras ficou submersa foram estocados para posterior determinação da quantidade de cálcio e fósforo que foi removida da dentina. Depois disso, deu-se início o processo de ciclagem de pH intercalado por tratamento com a substância teste e os controles, que será descrito na próxima seção.

Após o primeiro processo de desmineralização, todas as amostras de dentina foram tratadas com as respectivas substâncias. O grupo S recebeu tratamento com formulação de AgNPs (Coloide S1 com adição de flúor), enquanto o grupo W foi tratado com água deionizada (controle negativo) e o grupo F com solução de quitosana e flúor (controle positivo). A Tabela 3 resume a composição das substâncias usadas no tratamento de cada grupo. O tratamento consiste na deposição de 40 µL da substância diretamente na superfície das amostras de dentina, deixando-as agir por 3 minutos. Em seguida, as amostras são lavadas com água deionizada.

Tabela 3 - Grupos amostrais para investigação do efeito de nanopartículas de prata na remineralização da dentina e composição das substâncias utilizadas em seus respectivos tratamentos

	Grupo S (n=3)	Grupo F (n=3)	Grupo W (n=3)
Concentração de quitosana (ppm)	1000	1000	-
Concentração de flúor (ppm)	5000	5000	-
Concentração de prata (ppm)	400	-	-

FONTE: A autora (2021)

Após o tratamento, todas as amostras foram mergulhadas em 10 mL da solução remineralizadora em frascos lacrados e separados e mantidas na estufa a 37 °C por 16 h. Depois, as amostras foram retiradas da solução remineralizadora, tratadas e mergulhadas em solução desmineralizadora novamente por 8h. Esse procedimento (tratamento-remineralização-tratamento-desmineralização) foi repetido sucessivamente por um período de 14 dias. Os recipientes contendo as soluções desmineralizadora e remineralizadora utilizadas para cada amostra no 1º, 5º, 9º e 14º dia do ciclo foram estocados para posterior determinação do teor de cálcio e fósforo. Após o último dia de ciclagem de pH, as amostras de dentina tiveram a camada de esmalte de unha gentilmente removida com um bisturi e foram lavadas com água destilada antes de serem analisadas por μ TC, DRX e MEV.

3.2.3 Microtomografia Computadorizada de Raios X (μ TC) das amostras de dentina com cárie artificial

Imagens de Microtomografia Computadorizada de Raios X (μ TC) das amostras de dentina submetidas a Ciclagem de pH foram adquiridas em um tomógrafo da Nikon Metrology, modelo XT H 225 ST. O feixe de raios X foi produzido utilizando-se uma diferença de potencial de 100 kV e uma corrente de 100 μ A. Além disso, um filtro de alumínio de 1,0 mm foi utilizado na saída do

canhão de raios X para atenuar o surgimento de artefatos devido ao efeito de endurecimento do feixe. Para cada amostra foram geradas 3016 projeções com tempo de exposição de 500 ms por projeção e tamanho de pixel de 8 μm . Na reconstrução do modelo 3D das amostras foi utilizado o software CT PRO 3D XT 3.0.3 (Nikon Metrology NV).

Dez imagens de μTC mostrando secções transversais das amostras foram aleatoriamente selecionadas. Nessas imagens, foi localizado um desnível na superfície da amostra, entre a parte com a lesão de cárie artificial e a parte que foi protegida por esmalte de unha. Então, esse desnível foi medido nas dez imagens de cada amostra, utilizando o software Image J. Depois, foi calculada a média entre as 30 medidas realizadas para cada grupo amostral (10 medidas para cada amostra).

3.2.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) da superfície das amostras de dentina com cárie artificial

Análises de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) foram realizadas para acessar os efeitos dos tratamentos e da ciclagem de pH na morfologia superficial das amostras de dentina. As medidas foram realizadas em microscópio eletrônico Tescan, modelo Mira3 sob tensão de aceleração eletrônica de 10 KV. Antes da análise, as amostras foram fixadas em *stubs* metálicos com fita de carbono e foram revestidas com uma fina camada de ouro ($\approx 20\text{ nm}$) por *sputtering*, a fim de mitigar efeitos de carregamento na superfície da dentina, que é isolante.

3.2.5 Difratometria de Raios-X (DRX) da superfície das amostras de dentina com cárie artificial

A difratometria de raios-X das amostras de dentina após a ciclagem de pH foi realizada em difratômetro de raios-X Bruker, modelo D8 Advance, com uma fonte de cobre ($K\alpha = 1,5418\text{ \AA}$), incremento de $0,05^\circ$, velocidade de varredura $0,33\text{ }^\circ/\text{s}$ e janela angular (2θ) de $20^\circ - 60^\circ$.

Os difratogramas obtidos foram refinados no software HighScore Plus e as fichas cristalográficas utilizadas para identificação dos picos pertencem à base de dados cristalográficos COD (Crystallography Open Database) – 2019.

3.2.6 Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-OES) das soluções coletadas durante ciclagem de pH

Medidas de Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-OES) foram realizadas em espectrômetro PERKIN ELMER, modelo Optima 7000 DV, com configuração Axial. O objetivo da análise neste trabalho foi detectar a concentração de cálcio e fósforo nas alíquotas de solução remineralizadora e desmineralizadora estocadas após retirada das amostras de dentina durante a ciclagem de pH.

Essa técnica detecta a radiação eletromagnética emitida por átomos neutros ou íons excitados nas regiões do espectro eletromagnético visível e ultravioleta. A intensidade do sinal detectado é convertida em valores de concentração do analito, de acordo com a lei de Lambert-Beer.

Antes de determinar a concentração dos analitos nas soluções problema, foram preparadas soluções com concentrações conhecidas de cálcio e fósforo, utilizando soluções padrão fornecidas pela Sigma-Aldrich. Curvas de calibração Concentração *versus* Intensidade foram obtidas para cada um dos elementos. Então, os valores dos coeficientes lineares e angulares da reta foram utilizados para calcular a concentração dos analitos em cada amostra, a partir da intensidade eletrônica detectada pelo equipamento.

Depois, as quantidades de Cálcio e Fósforo removidas das amostras imersas na solução desmineralizadora foram indiretamente determinadas através da Equação 5 $[Ca, P]_{Desm}^0$ corresponde às concentrações de cálcio e fósforo presentes na Solução Desmineralizadora antes do contato com as amostras de dentina. $[Ca, P]_{Desm.medida}$ são os valores obtidos por ICP para a concentração de Cálcio e Fósforo nas soluções estocadas. O índice *i* corresponde a cada amostra de dentina submetida ao experimento.

Equação 5

$$[Ca, P]_{Removida}^i = [Ca, P]_{Desm.medida}^i - [Ca, P]_{Desm}^0$$

De forma análoga, a Equação 2 foi utilizada para calcular a quantidade de Cálcio e Fósforo absorvidas pelas amostras de dentina imersas em Solução Remineralizadora durante a ciclagem de pH.

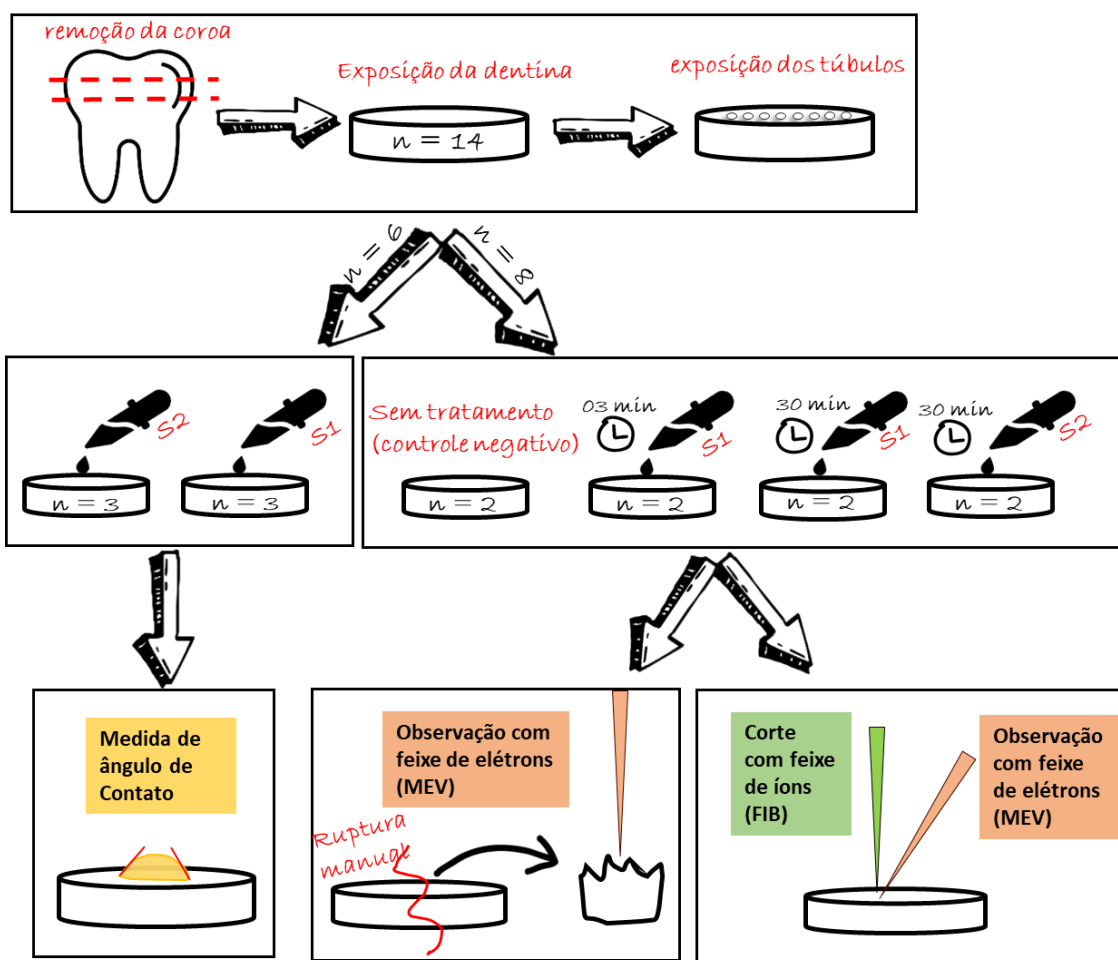
Equação 6

$$[Ca, P]_{absorvida}^i = [Ca, P]_{Rem}^0 - [Ca, P]_{Rem.medida}^i$$

3.3 INVESTIGAÇÃO DA PENETRAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA NOS TÚBULOS DENTINÁRIOS

Para investigar a penetração das AgNPs nos túbulos dentinários, os coloides foram aplicados diretamente sobre espécimes de dentes humanos com a dentina exposta e deixados agir por tempos pré-determinados. Medidas do ângulo de contato entre os coloides e a superfície da dentina foram realizadas. Decorrido o tempo de tratamento, as amostras de dentina foram lavadas com água deionizada e tiveram tanto as superfícies quanto secções transversais analisadas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Espectroscopia de Raios-X por Dispersão de Energia (EDS) e Microscopia de Feixe de íons Focalizado combinado a Microscopia Eletrônica de Varredura (FIB-MEV). A Figura 6 ilustra a metodologia geral utilizada nesse experimento.

Figura 6 – Metodologia do experimento para investigação da penetração de AgNPs na dentina



FONTE: A autora (2021)

As medidas de ângulo de contato foram realizadas no Laboratório de Polímeros não-convencionais, do Departamento de Física da UFPE. As análises por MEV foram realizadas no Laboratório de Compostos Híbridos e Coloides (CHICO-DQF-UFPE). Já as análises de FIB-MEV e EDS foram realizadas no Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNano) do Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), em Campinas-SP.

3.3.1 Preparação das amostras de dentina e tratamento com nanopartículas de prata

Para investigar a penetração das AgNPs nos túbulos dentinários, amostras de dentina foram preparadas de forma semelhante à descrita na seção 3.2.2, exceto o revestimento de parte das superfícies com esmalte de unha e a exposição das amostras à solução ácida. O terço apical da coroa e a raiz das amostras de dente foram removidos, resultando em discos de dentina. Além disso, três métodos diferentes foram utilizados para exposição dos túbulos dentinários na superfície da dentina:

- Metodologia A: Polimento simples, igual ao descrito na seção 3.2.2. (Sequência de seis lixas d'água, com granulometrias variando de 360 – 5000 mesh);
- Metodologia B: Polimento intensificado. Sequência de dez lixas d'água, com granulometrias variando de 360 – 5000 mesh, seguida de suspensão abrasiva de alumina 0,3 µm sobre disco de feltro;
- Metodologia C: Polimento simples seguido de desmineralização com ácido cítrico 10%. O procedimento da desmineralização consiste em deixar os espécimes de dentina imersos na solução ácida por 2 min;

Após qualquer um desses procedimentos, as amostras foram lavadas com água deionizada corrente por 1 min e depois colocada em 15 min de banho de ultrassom por três vezes consecutivas.

Depois da preparação da superfície, as amostras foram tratadas com os coloides de AgNPs. Neste experimento, foram utilizados os coloides S1 e S2, para verificar a dependência da penetração com o tamanho médio das nanopartículas. Também foi variada a duração do tratamento para o coloide S1, a fim de verificar a dependência da penetração com o tempo de contato entre o coloide e a dentina. Além disso, amostras de dentina sem nenhum tratamento foram analisadas, constituindo o grupo do controle negativo. A Tabela 4 resume o tratamento que foi aplicado a cada grupo de amostras.

Tabela 4 - Grupos amostrais para investigação da penetração de nanopartículas de prata na dentina e parâmetros dos respectivos tratamentos aplicados

Parâmetros do tratamento	Grupo 0	Grupo S2/30	Grupo S1/30	Grupo S1/03
Coloide de AgNP	-	S2	S1	S1
Tempo (min)	-	30	30	03

FONTE: A autora (2021)

3.3.2 Medida do ângulo de contato entre a superfície da dentina e os coloides de nanopartículas de prata

As medidas de ângulo de contato foram realizadas em um medidor óptico de ângulo de contato da KVS Instruments, modelo CAM 100, composto por uma seringa de precisão de 1mL (Hamilton/Analítica), um suporte regulável para colocar a amostra e mantê-la fixa, uma câmera para captura de imagens consecutivas e uma fonte de luz de LED monocromático.

Uma gota contendo 10 μ L do coloide de AgNP foi depositada pela seringa de precisão em duas regiões distintas da superfície de uma amostra de dentina. Então, uma imagem foi obtida e imediatamente analisada pelo software KSV NIMA CAM 100, que calculou o ângulo de contato entre a gota e a superfície, com base no método de Young-Laplace. (MERCHANT; KELLER, 1992) Esse procedimento foi repetido para três diferentes amostras de dentina para cada um dos coloides de AgNP (S1 e S2) e os valores médios foram calculados.

3.3.3 Análise das superfícies das amostras por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia por Dispersão de Raios-X (EDS)

As superfícies das amostras de dentina tratadas com nanopartículas de prata foram analisadas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia por Dispersão de Raios-X (EDS). As medidas de MEV foram realizadas tanto no Laboratório CHICO (DQF-UFPE), utilizando microscópio

eletrônico da Tescan modelo Mira 3, quanto no Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNano/CNPEM), utilizando microscópio de duplo feixe da FEI Helios modelo Nanolab 660. As análises de EDS foram realizadas no LNNano usando detector EDS Oxford X-MaxN com área de 80 mm², acoplado à plataforma de duplo-feixe.

Para essas análises, as amostras de dentina submetidas aos tratamentos descritos na Seção 2.3.1 foram fixadas em *stubs* e submetidas a revestimento metálico.

3.3.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) de secções transversais das amostras obtidas por ruptura

Para acessar a região interna dos túbulos dentários e verificar a presença das AgNPs, rupturas mecânicas foram induzidas nas amostras de dentina. As amostras foram fixadas em *stubs* metálicos com a secção transversal obtida virada para cima. Essas amostras foram submetidas a revestimento de carbono e analisadas por MEV, utilizando microscópio eletrônico Tescan Mira 3 sob tensão de aceleração eletrônica de 5 - 10 kV.

3.3.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) de secções transversais das amostras obtidas por Feixe de Íons Focalizados (FIB)

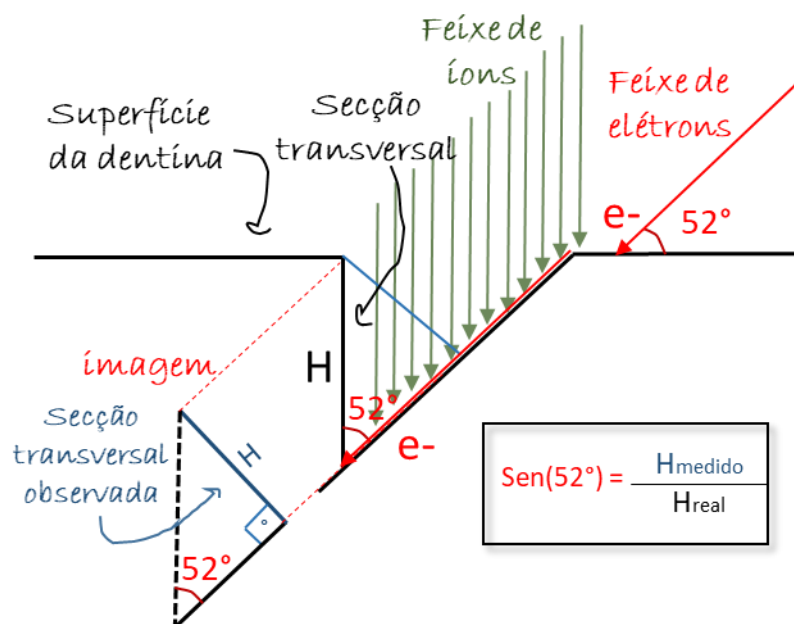
Como método alternativo para acessar a região interna dos túbulos dentinários e verificar a presença de AgNPs, secções transversais foram obtidas através do desbastamento da superfície das amostras pela ação do Feixe de Íons Focalizados (FIB), em microscópio de duplo-feixe FEI Helios Nanolab 660. Esse procedimento foi realizado em uma amostra de cada grupo, logo após a análise da superfície descrita na seção 3.3.3. Essa técnica possibilita realizar cortes com grande precisão a partir da superfície da amostra, pois volumes muito pequenos do material podem ser removidos controladamente pela interação da superfície da amostra com o feixe de íons incidente.

Regiões da superfície das amostras contendo túbulos dentinários expostos foram selecionadas após cuidadosa observação por imagens geradas pelo feixe de elétrons. Então, as regiões de interesse foram seccionadas pelo feixe de íons Ga^+ . Inicialmente, correntes iônicas relativamente altas (aproximadamente 21 nA) foram aplicadas em um procedimento de seção transversal regular (RCS), realizando um desbastamento em forma de trincheira. Então, correntes iônicas moderadas (9,4 nA e 2,5 nA) foram aplicadas em um processo de limpeza de seção transversal (CCS), para polir a região sub-superficial exposta.

As seções transversais obtidas para cada amostra foram imediatamente analisadas por imagens geradas pelo detector de elétrons retroespalhados, para identificação das AgNPs no interior dos túbulos. Na amostra em que foi detectada a maior quantidade de nanopartículas na seção transversal obtida por FIB, também foram realizadas análises de EDS da região, a fim de obter confirmação definitiva da penetração das AgNPs.

Para determinar a profundidade de penetração das nanopartículas nos túbulos, medidas foram realizadas nas imagens de FIB-MEV utilizando o software ImageJ. Um fator de correção foi aplicado às medidas para compensar o ângulo de 52° entre a amostra e o feixe de elétrons incidente, responsável por gerar as imagens. A Figura 7 ilustra a disposição da amostra em relação ao feixe de elétrons, motivo do fator de correção aplicado à medida.

Figura 7 – Ilustração da secção transversal regular obtida por desbastamento em forma de trincheira e da disposição da amostra em relação ao feixe de elétrons



FONTE: A autora (2021)

Logo, os valores apresentados para a profundidade de penetração das AgNPs (H) em cada amostra foram calculados pela Equação 7. H_{medido} é o valor medido no ImageJ para a distância entre a superfície das amostras e a região de maior profundidade do interior dos túbulos onde foi detectada a presença das AgNPs.

Equação 7

$$H = \frac{H_{\text{medido}}}{\text{sen}(52^\circ)}$$

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CARACTERIZAÇÃO DOS COLOIDES DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA (AGNPS)

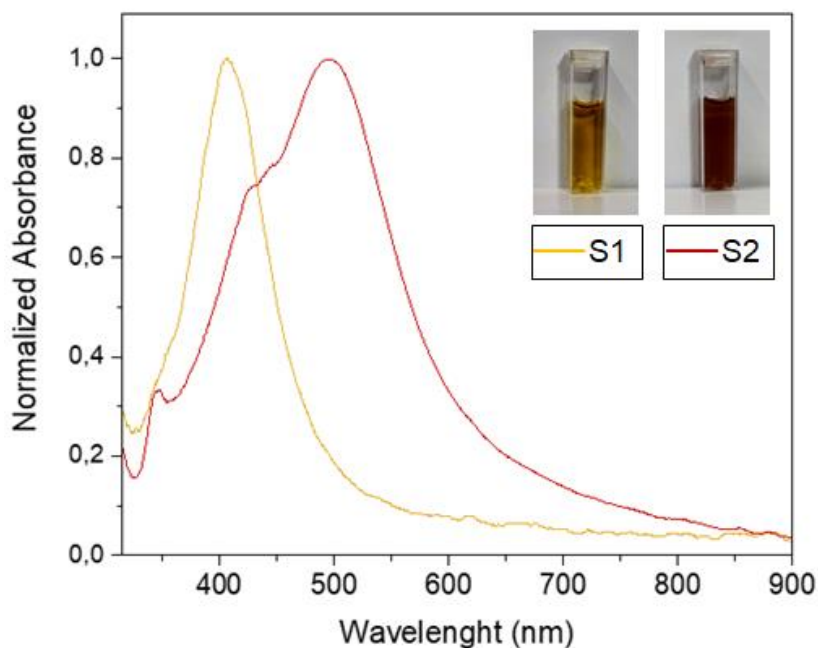
Os coloides de AgNPs utilizados nos experimentos deste trabalho, denominados S1 e S2 conforme consta na seção 3.1.1, foram caracterizados por espectroscopia de absorção UV-Vis, microscopia eletrônica de transmissão por varredura (STEM), espalhamento dinâmico de luz (DLS) e potencial zeta (PZ). Os resultados obtidos em cada análise serão apresentados e discutidos a seguir.

4.1.1 Espectroscopia de absorção UV-Vis

Os espectros de absorção no UV-Vis dos coloides de AgNP S1 e S2 são mostrados na Figura 8. A amostra S1 apresenta uma banda de ressonância plasmônica de superfície (SPR) única e estreita, com um máximo de 407 nm e com largura de linha à meia altura (FWHH) de 67 nm. Esses resultados são tipicamente observados em amostras formadas por nanopartículas de prata esféricas de pequeno tamanho (diâmetro médio < 10 nm).

Na amostra S2, a absorção máxima é deslocada para 493 nm e a banda apresentada é mais larga, indicando a presença de partículas maiores. Além disso, o espectro apresenta um ombro em 423 nm, o que sugere a presença de partículas com diferentes morfologias (DOS SANTOS JUNIOR et al., 2017).

Figura 8 - Espectros de absorção UV-VIS dos coloides AgNP



FONTE: A autora (2021)

4.1.2 Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS)

Tipicamente, medidas de DLS são realizadas com a amostra diluída e utiliza-se os parâmetros do solvente nos cálculos envolvidos. Porém, para a análise do coloide S1, que possui alta concentração de NPs, foi verificada interferência da diluição das amostras nos resultados da análise. Portanto, as medidas apresentadas neste trabalho foram realizadas com o coloide concentrado. Nesse caso, o valor inserido no software para a viscosidade do líquido analisado ($\eta = 4,306$ cP) foi equivalente a viscosidade de uma solução 1% de quitosana com baixo peso molecular, a $T = 25$ °C, determinada anteriormente por FLORES (2015)

A viscosidade do líquido é um parâmetro importante para a determinação do tamanho de NPs por DLS, uma vez que está diretamente envolvido no cálculo do diâmetro hidrodinâmico pela equação de Stokes-Einstein (Equação 8), onde K_B é a constante de Boltzman. A técnica utiliza esta equação para fornecer as medidas, após relacionar a intensidade de dispersão de luz detectada com o coeficiente de difusão (D) das partículas em movimento Browniano. (DELGADO, 2013)

Equação 8

$$d = \frac{TK_B}{3\pi\eta D}$$

O valor médio para o diâmetro das AgNPs no coloide S1 foi de $20,88 \pm 0,50$ nm, enquanto o índice de polidispersividade (PDI) foi de 0,29. Para o coloide S2, o diâmetro médio foi de $66,42 \pm 1,01$ nm o PDI foi de 0,32. Os valores de PDI obtidos indicam uma polidispersividade moderada para as AgNPs em ambos os coloides.

4.1.3 Potencial Zeta (PZ)

Os valores de potencial Zeta obtidos para os coloides S1 e S2 foram $+43,60 \pm 1,27$ mV e $+37,23 \pm 1,46$ mV, respectivamente. Esse valor está relacionado à carga superficial das nanopartículas no sistema. Além disso, sua magnitude representa uma evidência da estabilidade coloidal.

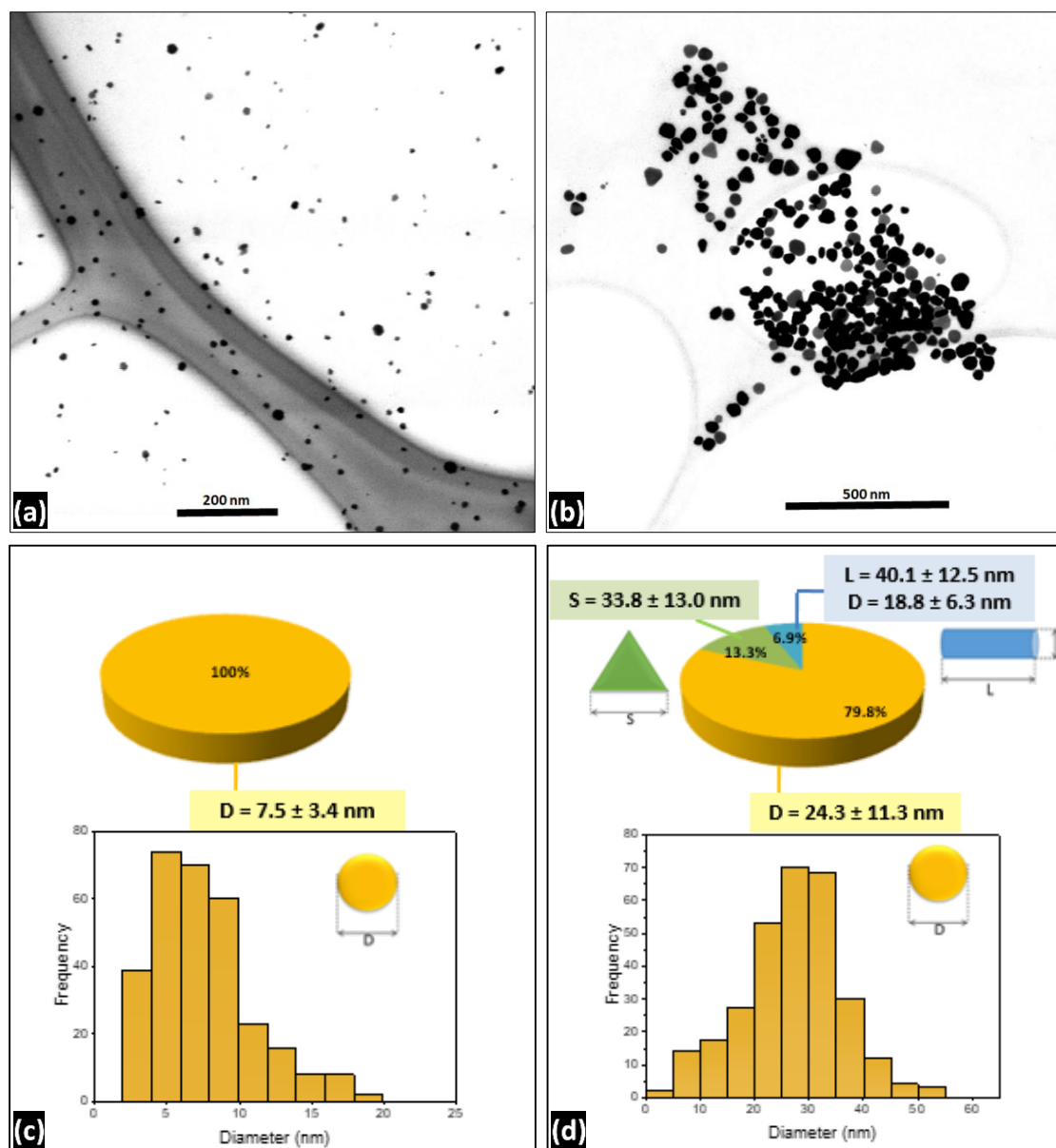
Em sistemas que utilizam agentes estabilizantes moleculares, uma carga superficial (negativa ou positiva) elevada das partículas em suspensão indica uma tendência à repulsão eletrostática interparticular, evitando a formação de agregados. Isso ocorre devido à adsorção das moléculas do agente estabilizante na superfície das NPs. No caso da quitosana, as cadeias poliméricas tendem a ser protonadas em meio ácido, adquirindo uma carga positiva na forma de grupos - NH_3^+ . (GAKIYA-TERUYA; PALOMINO-MARCELO; RODRIGUEZ-REYES, 2018; NUR et al., 2018)

Além disso, em sistemas cujo mecanismo de estabilização das nanopartículas se dá por interação eletrostática, medidas de PZ de valor absoluto superior a ± 30 mV, como foi o caso das medidas obtidas para ambos os coloides, geralmente são um indicativo de estabilidade coloidal de longo-prazo. (DELGADO, 2013; GAKIYA-TERUYA; PALOMINO-MARCELO; RODRIGUEZ-REYES, 2018)

4.1.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão por Varredura (STEM)

A Figura 9 mostra as imagens de STEM das amostras S1 (Figura 9 a) e S2 (Figura 9 b) e um resumo da análise da morfologia e do tamanho médio das NPs em cada coloide (Figura 9c – S1; Figura 9d – S2). Os resultados obtidos corroboram as observações feitas anteriormente na análise dos espectros de Uv-Vis. A amostra S1 apresenta apenas nanopartículas esféricas, enquanto a amostra S2 é formada por esferas (79,8%), triângulos (13,3%) e bastões (6,9%). O diâmetro médio calculado das nanopartículas esféricas na amostra S1 é $7,5 \pm 3,4$ nm. No coloide S2, o diâmetro das nanopartículas esféricas é $24,3 \pm 11,3$ nm, o lado das AgNPs triangulares mede $33,8 \pm 13,0$ nm, e as nanopartículas em forma de bastão apresentam $40,1 \pm 12,5$ nm e $18,8 \pm 6,3$ nm, respectivamente para os eixos axial e equatorial (razão de aspecto: $2,2 \pm 0,4$).

Figura 9 - Imagens de STEM das AgNPs. (a) S1; (b) S2. Composição dos colóides de AgNP em termos de morfologia e distribuição de tamanho de partícula; (c) S1; (d) S2.



FONTE: A autora (2021)

O cálculo do tamanho de partícula por DLS considera apenas partículas esféricas. A razão entre os diâmetros médios obtidos por DLS e os diâmetros médios para as partículas esféricas obtidos por medidas das imagens de STEM foi de 2,784 para o coloide S1 e 2,733 para o coloide S2. Essa diferença entre os diâmetros determinados pelos diferentes métodos se deve a efeitos de solvatação, pois enquanto as medidas por imagem de microscopia avaliam o diâmetro seco das partículas, o DLS avalia o diâmetro hidrodinâmico.

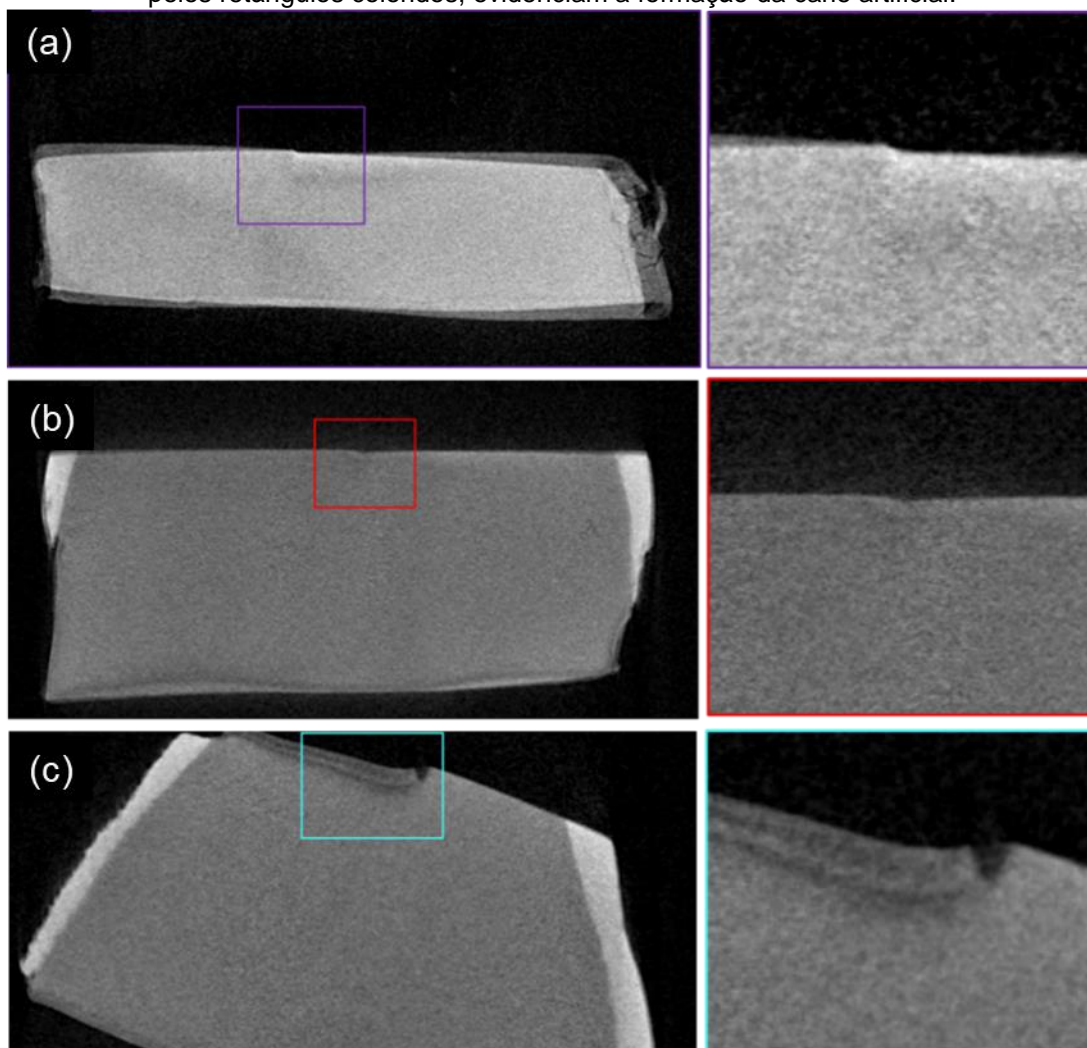
A razão relativamente alta entre os diâmetros hidrodinâmico e seco em ambos os coloides condiz com resultados reportados na literatura para AgNPs estabilizadas por quitosana e pode ser um indicativo da adsorção de moléculas de quitosana na superfície das NPs. (GAKIYA-TERUYA; PALOMINO-MARCELO; RODRIGUEZ-REYES, 2018; HAJJI et al., 2019; MEHR; KHANJANI; VATANI, 2015)

4.2 INVESTIGAÇÃO SOBRE A HIPOTESE DAS AGNPS PROMOVEREM REMINERALIZAÇÃO NA DENTINA

4.2.1 Profundidade da lesão de carie artificial

A Figura 10 mostra secções transversais de amostras de dentina após a ciclagem de pH, reveladas por imagens de microtomografia computadorizada de raios x (μ TC). A imagem da Figura 10(a) corresponde a uma amostra do grupo W, que recebeu tratamento com água deionizada durante o ciclo (controle negativo). Já as Figura 10(b,c) correspondem respectivamente a amostras do grupo S, tratada com formulação de AgNPs, e do grupo F, tratada com NaF dissolvido em quitosana 1%. As regiões destacadas e amplificadas nas inserções mostram um desnível em um ponto específico da superfície das amostras.

Figura 10 - Imagens de μ TC mostrando secções transversais de amostras de dentina dos grupos (a) F (controle positivo; amostras tratadas com solução de quitosana e flúor); (b) S (amostras tratadas com AgNPs) e (c) W (controle negativo; amostras tratadas com água deionizada). O desnível entre as partes com e sem a proteção do esmalte de unha, destacados pelos retângulos coloridos, evidenciam a formação da carie artificial.



FONTE: A autora (2021)

A parte mais alta da superfície das amostras corresponde à região em que foi aplicado o esmalte de unha resistente a ácido. O desnível entre as duas partes mostra que apenas a área desprotegida foi desgastada pela ação corrosiva da solução desmineralizadora (pH=4,4), indicando que a formação de lesão de carie artificial pelo método químico descrito por VIEIRA COSTA E SILVA et al. (2018) foi bem-sucedida.

A diferença de altura entre as partes intactas e lesionadas das superfícies foi medida em 10 imagens de secção transversal selecionadas aleatoriamente, para cada amostra. A profundidade de lesão média para cada grupo experimental (n=3) foi determinada a partir das médias das diferenças de altura medidas para cada amostra (n=10). Os valores obtidos estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 - Medidas da profundidade da lesão nas amostras de dentina com cárie artificial

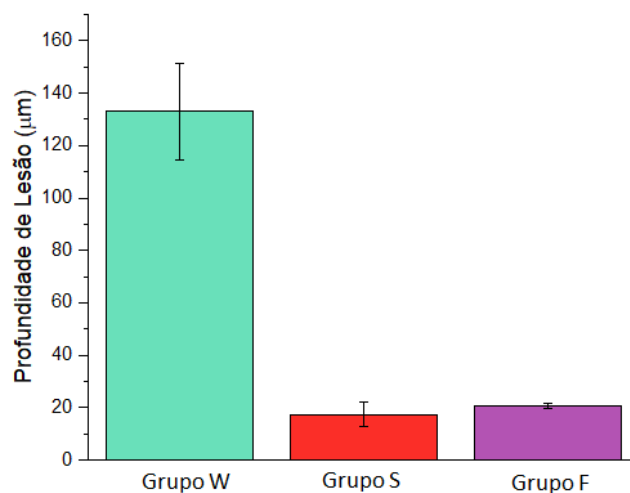
Grupo	W			S			F		
Tratamento	Água deionizada			AgNPs			NaF + Quitosana		
Amostra	Dw1	Dw2	Dw3	Ds1	Ds2	Ds3	Df1	Df2	Df3
Profundidade de lesão (µm); (n=10)	113,64 ± 15,44	135,33 ± 15,16	150,28 ± 21,66	19,11 ± 3,87	12,11 ± 1,69	21,23 ± 3,39	21,44 ± 6,30	20,82 ± 3,55	19,58 ± 3,59
Profundidade de lesão dos grupos (µm); (n=3)	133,08 ± 18,42^a			17,48 ± 4,77^b			20,61 ± 0,94^b		

Médias seguidas por letras distintas são estatisticamente diferentes (ANOVA, Teste de Tukey, p < 0,05)

FONTE: A autora (2021)

A Figura 11 mostra as profundidades de lesão médias de cada grupo, em forma de gráfico.

Figura 11 - Profundidade de lesão média para cada grupo experimental (W = controle negativo; S = Tratamento com AgNPs; F = controle positivo).



FONTE: A autora (2021)

A diferença entre as profundidades de lesão dos grupos S e W foi estatisticamente significativa (ANOVA; Teste de Turkey; $p < 0,05$). Esse resultado indica que a formulação de AgNPs é efetiva em evitar a desmineralização e/ou promover a remineralização da dentina, diminuindo a profundidade da lesão durante o processo de progressão da carie, simulado neste experimento pela ciclagem de pH.

Embora as lesões identificadas nas amostras do Grupo S tenham sido menos profundas do que nas amostras do Grupo F, a diferença entre as médias dos grupos não foi estatisticamente significativa ($p > 0,05$). Além das AgNPs, a formulação utilizada nas amostras do grupo S também contém NaF e quitosana em sua composição, nas mesmas concentrações usadas no tratamento das amostras do grupo F. Portanto, a partir desses resultados, não é possível sugerir um efeito sinérgico das AgNPs com os demais componentes da fórmula na redução da profundidade da lesão.

A ação remineralizadora dos íons fluoreto é bastante documentada e bem estabelecida, tanto no esmalte quanto na dentina. Acredita-se que esse processo seja mediado pela adsorção dos íons fluoreto a uma superfície cristalina, seguida da atração de íons cálcio e fosfato que foram dissolvidos durante a desmineralização. Essa interação resulta na formação de cristais com

composição entre hidroxiapatita e fluorapatita, que são estáveis e muito mais resistentes à dissolução por ataque ácido. Íons fluoreto são considerados os agentes remineralizadores mais eficazes que se tem conhecimento na odontologia clínica. (MEI et al., 2017; MEI; LO; CHU, 2018)

Os resultados aqui apresentados não são suficientes para confirmar ou descartar a hipótese de as AgNPs desempenharem algum papel no processo de remineralização da dentina. Porém, caso as AgNPs contribuam diretamente para a reposição de minerais, é provável que seus efeitos não sejam significativos para a redução da lesão em relação aos efeitos do flúor.

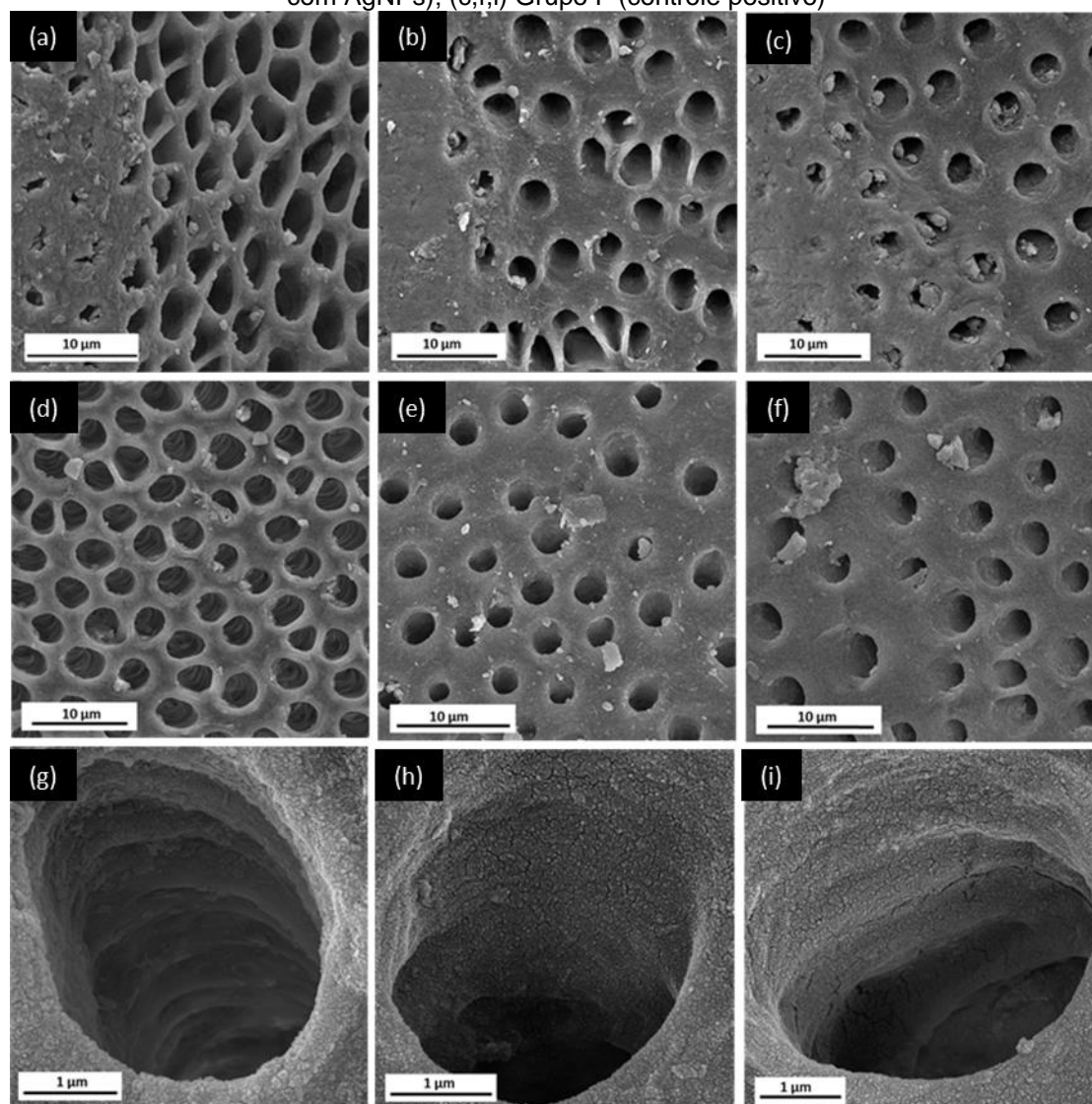
Por outro lado, os resultados indicam que os íons fluoreto mantêm sua eficácia em promover a remineralização da dentina de modo a reduzir a lesão de carie quando são incorporados à dispersão coloidal de AgNPs. A manutenção dessa função é um aspecto importante a ser considerado, uma vez que esse é o propósito do NaF na formulação à base de nanopartículas de prata desenvolvida para o tratamento de cáries (DOS SANTOS et al., 2014)

4.2.2 Morfologia da superfície da dentina com lesão de carie artificial

Enquanto a profundidade da lesão, a depender do nível da carie, pode ser avaliada clinicamente em escala macroscópica, danos microscópicos nos tecidos dentários causados por sua desmineralização só podem ser acessados através de estudos *in vitro*. (MEI et al., 2013)

A Figura 12 mostra imagens de MEV das superfícies da dentina após a ciclagem de pH, para os diferentes grupos (Figura 12 a,d,g - Grupo W; Figura 12 b,e,h – Grupo S; Figura 12 c,f,i – Grupo F). Na Figura 12 (a, b, c) são mostradas as regiões de interface entre a parte que foi protegida e a que foi exposta à desmineralização e remineralização, onde foram localizados os desníveis nas imagens de secção transversal de μ TC. Todas as superfícies apresentaram túbulos dentinários abertos. A Figura 12 (d,e,f) mostra áreas representativas de regiões localizadas nas partes desprotegidas de cada amostra. Já na Figura 12 (g,h,i), de maior magnificação, é possível observar aspectos da estrutura interna de um túbulo.

Figura 12 - Imagens de MEV das superfícies de dentina após ciclagem de pH, mostrando túbulos dentinários abertos (a,d,g) Grupo W (controle negativo); (b, e, h) Grupo S (Tratamento com AgNPs); (c,f,i) Grupo F (controle positivo)



FONTE: A autora (2021)

A partir das imagens de MEV percebe-se que a superfície dentinária dos grupos F e S apresentaram características semelhantes entre si e diferentes das observadas para o grupo W (controle negativo), tal qual o resultado de μ TC que evidenciou uma profundidade de lesão significativamente maior para esse grupo.

A Tabela 6 lista alguns parâmetros associados a indicadores numéricos que apontam para a diferença no nível de desmineralização da dentina entre o grupo W e os demais e que foram avaliados na análise das superfícies por MEV. A quantidade de túbulos expostos por área indica que a lesão atingiu uma região mais profunda da dentina, corroborando o resultado de μ TC. Quanto mais abaixo próxima da polpa for a região da dentina exposta, maior será a concentração

tubular por área. Já o diâmetro de abertura do túbulo é um efeito direto da desmineralização ou da deterioração das fibras de colágeno. (MADEIRA, 2007)

A quantidade de túbulos expostos por área de dentina foi determinada a partir da análise de 05 imagens de regiões distintas para cada amostra. Já o diâmetro médio de abertura dos túbulos foi determinado medindo um total de 60 túbulos para cada amostra.

Tabela 6 - Parâmetros associados ao desgaste e desmineralização da dentina. Resultados para cada grupo experimental. (W = Controle negativo; S = Tratamento com AgNPs; F = Controle positivo).

	Média de túbulos/ μm^2 de dentina	Diâmetro médio de abertura dos túbulos (μm)
Grupo W	0,044 \pm 0,005	3,485 \pm 0,459
Grupo S	0,028 \pm 0,003	2,867 \pm 0,361
Grupo F	0,026 \pm 0,003	2,500 \pm 0,479

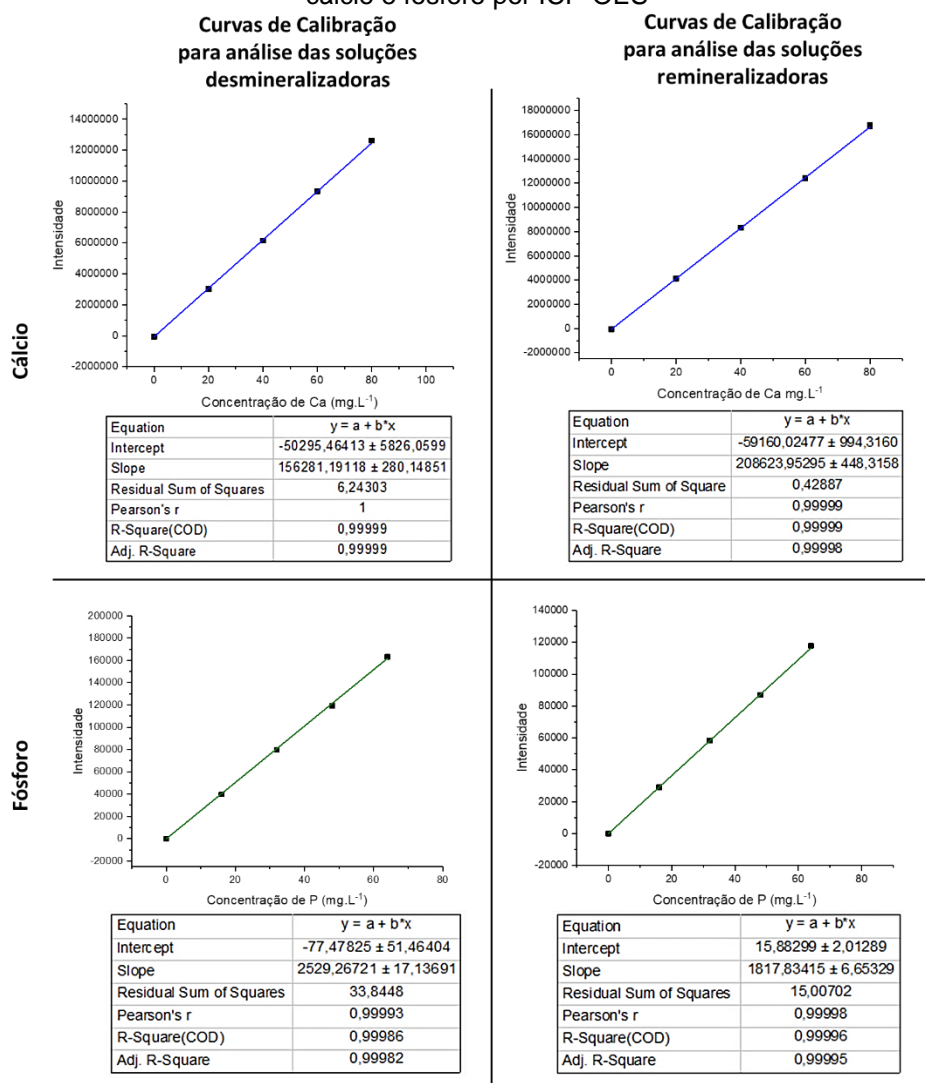
FONTE: A autora (2021)

A exposição e abertura dos túbulos dentinários é uma consequência bastante indesejável da progressão de caries, pois pode levar a uma conexão direta da superfície exposta com a polpa do dente. Essa configura a principal causa da hipersensibilidade dentinária, que pode causar muita dor ao paciente. De acordo com a teoria hidrodinâmica proposta por Brännström (1960), quando um estímulo térmico, químico ou mecânico é aplicado diretamente na dentina com túbulos expostos e conectados à polpa, o movimento do fluido dentinário provoca a deformação mecânica de fibras nervosas presentes no tecido pulpar. (TERSARIOL et al., 2010; VYAS et al., 2017) Além disso, o caminho de bactérias patogênicas para a polpa é motivo de grande preocupação, pois pode levar a infecções dentárias graves e irreversíveis. (LOVE et al., 2000; LOVE; JENKINSON, 2002)

4.2.3 Quantificação de Ca e P perdidos na desmineralização e recuperados na remineralização da dentina

As concentrações de cálcio e fósforo nas soluções utilizadas na ciclagem de pH foram determinadas na tentativa de acompanhar a dinâmica dos processos de desmineralização e remineralização. As soluções analisadas foram colhidas nos dias 1, 5, 9 e 14 do ciclo. A Figura 13 mostra as curvas de calibração obtidas a partir das intensidades dos sinais de Ca e P determinadas por ICP-OES para as soluções padrão de concentração conhecida. A análise de ICP-OES foi realizada em dias diferentes para as soluções remineralizadoras e desmineralizadoras. Portanto, duas curvas de calibração foram obtidas para cada analito, uma para cada dia de análise. Todas as curvas apresentaram alto coeficiente de determinação ($R^2 > 0,9998$).

Figura 13 - Curvas de calibração para determinação de concentrações de cálcio e fósforo por ICP-OES



FONTE: A autora (2021)

As concentrações de Ca e P nas soluções foram determinadas a partir da intensidade dos sinais dos analitos detectadas por ICP-OES, utilizando as equações das retas correspondentes às respectivas curvas de calibração. Então, as equações apresentadas na seção 3.2.6 da parte experimental foram aplicadas para determinar a quantidade de Ca e P removidos de e absorvidos por cada amostra de dentina durante os processos de desmineralização e remineralização, respectivamente.

A Tabela 7 mostra a quantidade média de cálcio e fósforo absorvidas e removidas da dentina no decorrer do ciclo para cada grupo experimental.

Tabela 7 – Quantidades de cálcio e fósforo removidas na desmineralização e absorvidas na remineralização das amostras de dentina em diferentes dias da ciclagem de pH. (Grupo W = Controle negativo; Grupo S = Tratamento com AgNPs; Grupo F = Controle positivo)

			Grupo W	Grupo S	Grupo F
Li**	D*	[Ca] _{removida} (mg.L ⁻¹)	88,28 ± 18,55	102,06±18,31	120,29±45,56
		[P] _{removida} (mg.L ⁻¹)	42,65 ± 9,07	44,99 ± 7,23	55,29 ± 19,40
Dia 1	R*	[Ca] _{absorvida} (mg.L ⁻¹)	0,47 ± 2,47	5,80 ± 6,20	6,36 ± 2,67
		[P] _{absorvida} (mg.L ⁻¹)	3,06 ± 1,08	3,81 ± 3,17	2,85 ± 3,27
	D*	[Ca] _{removida} (mg.L ⁻¹)	95,13± 9,44	56,28± 6,58	75,74 ± 19,09
		[P] _{removida} (mg.L ⁻¹)	71,02 ± 3,97	52,43 ± 5,63	62,75 ± 14,04
Dia 5	R*	[Ca] _{absorvida} (mg.L ⁻¹)	-0,55 ± 0,28	18,08 ± 4,29	12,56 ± 5,00
		[P] _{absorvida} (mg.L ⁻¹)	1,59 ± 0,24	12,87 ± 5,95	7,95 ± 2,96
	D*	[Ca] _{removida} (mg.L ⁻¹)	56,42 ±3,25	42,88 ±1,75	46,65 ± 12,37
		[P] _{removida} (mg.L ⁻¹)	47,07 ± 1,88	40,88 ± 2,29	43,14 ± 6,02
Dia 9	R*	[Ca] _{absorvida} (mg.L ⁻¹)	4,47 ± 1,55	7,66 ± 3,48	8,03 ± 6,84
		[P] _{absorvida} (mg.L ⁻¹)	4,70 ± 1,37	8,20 ± 3,71	8,34 ± 4,58
	D*	[Ca] _{removida} (mg.L ⁻¹)	47,21 ± 6,39	24,31 ± 1,03	18,60 ± 10,52
		[P] _{removida} (mg.L ⁻¹)	26,55 ± 2,04	16,43 ± 0,47	11,49 ± 6,13
Dia 14	R*	[Ca] _{absorvida} (mg.L ⁻¹)	-0,65 ± 2,83	4,22 ± 2,68	7,10 ± 7,05
		[P] _{absorvida} (mg.L ⁻¹)	0,01 ± 1,55	4,48 ± 5,44	6,77 ± 5,69
	D*	[Ca] _{removida} (mg.L ⁻¹)	41,48 ± 7,78	12,27 ± 1,28	23,21 ± 12,31
		[P] _{removida} (mg.L ⁻¹)	34,77 ± 7,25	14,38 ± 3,35	23,64 ± 5,18

*D = Desmineralização; R = Remineralização

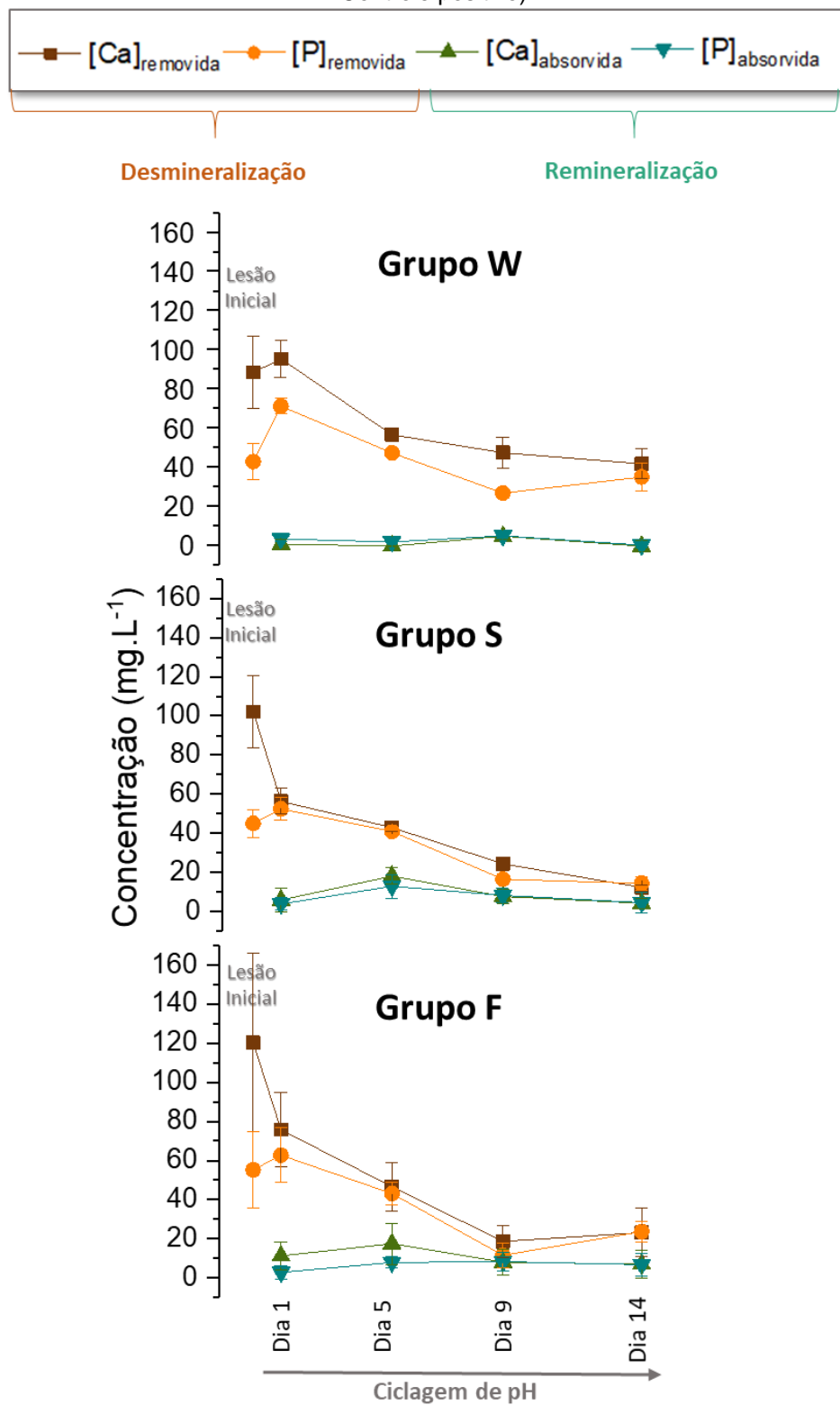
**Li = Lesão inicial, antes das amostras serem submetidas aos tratamentos

FONTE: A autora (2021)

Observa-se que alguns valores referentes à quantidade de cálcio absorvida pelas amostras de dentina do grupo W foram negativos (dias 5 e 14). Isso significa que a concentração de Ca na solução remineralizadora aumentou após o contato com amostras desse grupo, nesses dias específicos da ciclagem de pH, ao invés de diminuir. Embora esses valores negativos sejam próximos de zero, indicam que amostras desse grupo, que receberam tratamento apenas com água deionizada, continuaram a ser descalcificadas após o período de desmineralização, mesmo em pH básico e na presença de íons fosfato. O mesmo não foi observado para os grupos tratados com AgNPs e com NaF.

Outro ponto a ser observado é que durante a indução da lesão inicial, quando as amostras foram submetidas à solução desmineralizadora sem receber tratamento prévio, as amostras do Grupo W apresentaram a menor média de remoção de Ca e P. Depois, a média desse grupo foi ficando maior em relação às dos grupos S e F. A partir desses resultados, foram obtidos os gráficos apresentados na Figura 14, onde é possível observar o perfil de crescimento ou decrescimento das concentrações de Ca e P absorvidas e removidas das amostras de dentina durante o ciclo.

Figura 14 – Curvas de crescimento das quantidades de Ca e P removidas na desmineralização e absorvidas na remineralização da dentina durante Ciclagem de pH, para cada grupo experimental (Grupo W = Controle negativo; Grupo S = Tratamento com AgNPs; Grupo F = Controle positivo)



FONTE: A autora (2021)

Observando o gráfico da Figura 14, é possível notar que a inclinação da curva de Ca e P removidos da dentina na desmineralização é maior para o grupo F, seguida do grupo S e menor para o grupo W. Em todos os grupos, as quantidades de Ca e P absorvidas durante a remineralização no início do ciclo são muito menores do que as quantidades removidas na desmineralização. No decorrer do ciclo, existe uma tendência desses valores se aproximarem, indicando um equilíbrio entre os processos. No entanto, essa tendência é muito maior para os grupos S e F, onde as curvas de desmineralização e remineralização chegam a se encontrar no dia 9. Para o grupo W, a quantidade de minerais perdida se mantém muito superior à quantidade de minerais absorvida, até o dia 14. Essa observação é coerente com a maior profundidade de lesão observada para o grupo W.

Embora os resultados apresentados na Tabela 7 e na Figura 14 tenham possibilitado avaliar qualitativamente a influência dos tratamentos na taxa de absorção ou remoção mineral ao longo do ciclo, não é possível tirar conclusões quantitativas comparando as concentrações de Ca e P para cada grupo em um dia isolado. Por exemplo, as médias de [Ca] e [P] removidas das amostras nos três grupos após o processo de desmineralização do dia 5 foram estatisticamente iguais (Teste de Turkey; $p < 0,05$). Isso pode ser explicado com base na observação dos desvios padrão dentro de um mesmo grupo, que foram muito altos. A grande diferença entre os valores obtidos para as soluções desmineralizadoras utilizadas na indução inicial da lesão também indica que há fatores não controlados influenciando fortemente na quantidade de mineral dissolvida, prejudicando a avaliação dos efeitos dos tratamentos nesse parâmetro. A partir dessa observação, os seguintes fatores foram sugeridos para justificar e corrigir a flutuação dos dados:

- (i) A área superficial exposta dos espécimes de dentina submetidos à ciclagem de pH, que não foi padronizada para este experimento.
- (ii) A proporção, em termos de área superficial, das camadas de esmalte dentário envolvendo as laterais das amostras, que não foram removidas ou recobertas por esmalte de unha resistente a ácido.

É plausível que, quanto maior a área de contato entre as amostras e as soluções, maior a quantidade de minerais disponíveis para sofrer a ação

corrosiva da solução ácida, e também maior o sítio ativo para deposição de novos minerais na etapa de remineralização. Porém, não se sabe se esse fator, sozinho, seria o mais determinante para a quantidade de minerais dissolvidos ou absorvidos pelas amostras. O esmalte dentário apresenta aproximadamente 97 % de minerais em sua composição, enquanto a dentina apresenta cerca de 70 % (MADEIRA, 2007; NEEL et al., 2016). Portanto, também é possível que a proporção de esmalte nas amostras de dentina preparadas para este experimento influencie nos resultados.

Para investigar se um ou ambos os fatores se relacionam com os dados obtidos, de forma a possibilitar a sua normalização, as áreas superficiais das amostras foram calculadas através da reconstrução 3D das imagens de microtomografia de raios-X, utilizadas anteriormente para medir a profundidade de lesão nas amostras. Uma vez que o escaneamento das amostras foi realizado após a ciclagem de pH, os efeitos da desmineralização sobre a área superficial total foram desprezados. Isso é razoável, pois as lesões observadas tinham ordem de grandeza entre 10^{-2} e 10^{-1} mm enquanto as dimensões das amostras apresentam ordem de grandeza entre 1 e 10 mm.

Também foi calculada a área superficial correspondente apenas à camada de esmalte presente nas amostras, separadamente, para investigação da influência do item (ii) nos resultados de ICP-OES. O fator de normalização relacionado ao item (ii) foi definido como uma soma ponderada das áreas individuais do esmalte e da dentina, sendo atribuído à área do esmalte o peso 0,97 e à área da dentina, 0,70, correspondentes ao valor teórico da composição mineral de cada tecido. Ou seja, o fator de normalização relacionado ao item (ii) foi definido como o valor obtido pela Equação 9, onde D é a área superficial de dentina e E é a área superficial de esmalte nas amostras.

Equação 9

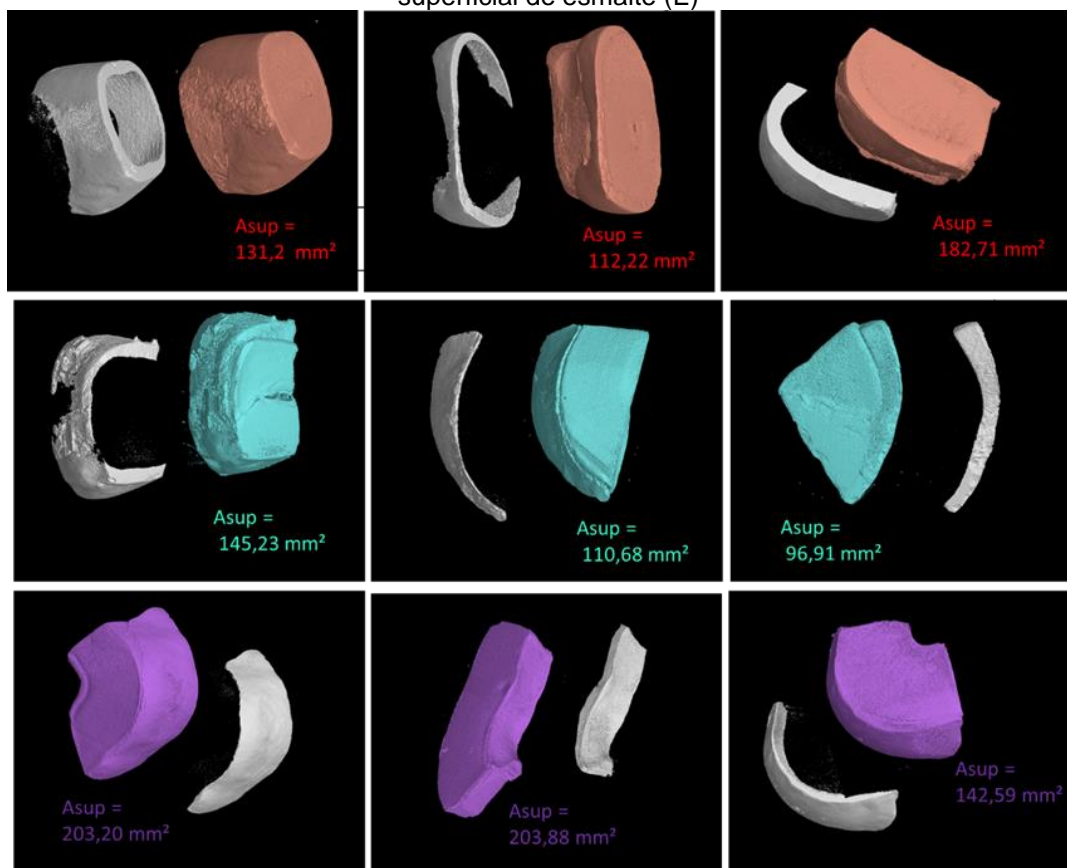
$$A_{\text{sup,pond}} = 0,7D + 0,97E$$

A diferenciação dos materiais nas imagens μTC , para cálculo da área superficial do esmalte e da dentina separadas, foi possível devido ao contraste apresentado entre as duas fases. Ao atravessar um material mais denso, o feixe

de raios-X transmitido é atenuado, resultando em diferentes tonalidades na escala de cinza quando o sinal coletado é convertido em imagem. (YU et al., 2018) A Figura 15 mostra as reconstruções 3D das amostras, obtidas pelas imagens de μ TC, e as respectivas medidas de área superficial total. As reconstruções 3D das amostras inteiras estão coloridas enquanto as reconstruções 3D correspondentes apenas às camadas de esmalte presentes em cada amostra, separadamente, estão mostradas em branco.

Para a obtenção dos valores apresentados, a área da região que foi protegida com esmalte de unha também foi identificada, medida e descontada das áreas superficiais calculadas pelo software, de maneira que só as superfícies expostas (disponíveis para perda mineral) fossem contabilizadas.

Figura 15 – Reconstrução 3D das imagens de microtomografia de raios x das amostras de dentina e as respectivas medidas da área superficial (Asup) e do percentual de área superficial de esmalte (E)



*Imagens de caráter ilustrativo. As reconstruções 3D do escaneamento das amostras não estão em escala.

FONTE: A autora (2021)

Para avaliar a adequação dos valores de A_{sup} e $A_{sup.pond}$ como fator de normalização para os dados da Tabela 7, analisou-se primeiramente as suas correlações com as respostas analíticas associadas a cada amostra de dentina ($[Ca]_{removida}$ e $[P]_{removida}$). Para esta análise, foram utilizados apenas os dados obtidos para a lesão inicial, uma vez que nessa etapa as amostras ainda não tinham recebido tratamento, então não havia interferência dos fatores controlados. As supostas correlações foram investigadas a partir do cálculo dos coeficientes de correlação de Pearson, Spearman e Kendall com teste de hipóteses bilateral e nível de significância 0,05. Os resultados obtidos para essa análise estão apresentados na **Tabela 8**.

Tabela 8 – Coeficientes de correlação calculados para o conjunto de pares ordenados (A_{sup} , $[Ca]_{removida}$); (A_{sup} , $[P]_{removida}$); ($A_{sup.pond}$, $[Ca]_{removida}$); ($A_{sup.pond}$, $[P]_{removida}$); referentes a cada amostra na etapa da formação de lesão inicial

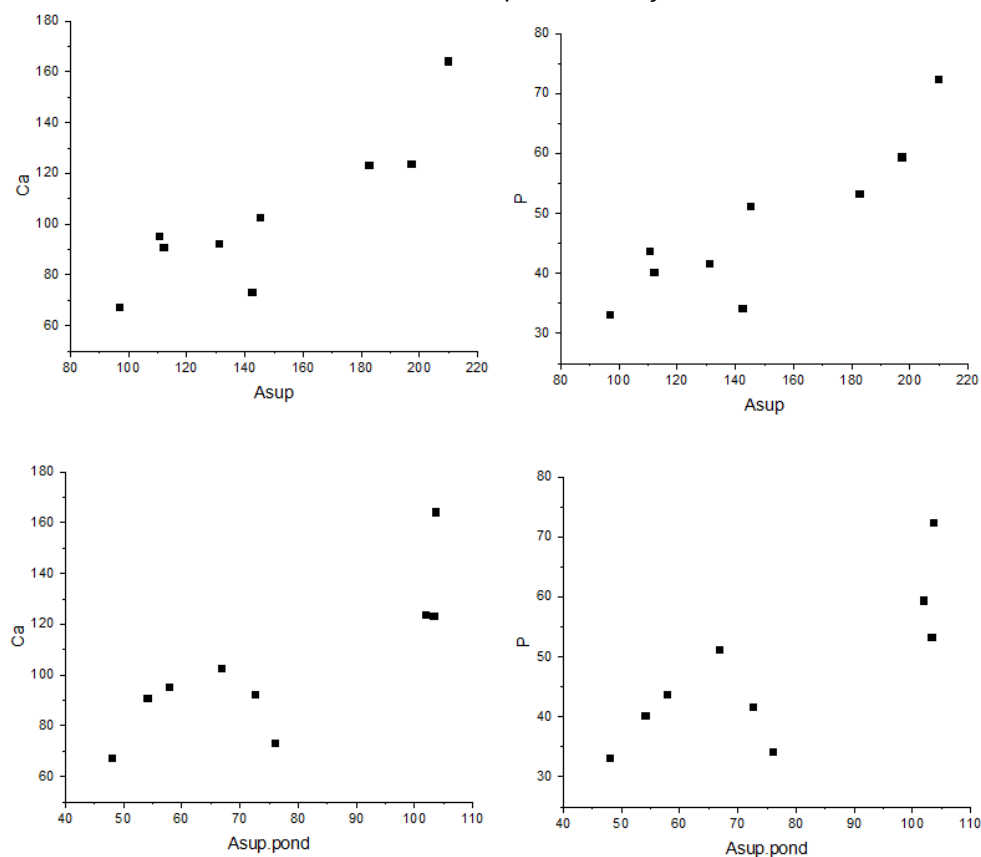
	Pearson		Spearman		Kendall	
	A_{sup}	$A_{sup.pond}$	A_{sup}	$A_{sup.pond}$	A_{sup}	$A_{sup.pond}$
$[Ca]_{removida}$	0,84935*	-0,00386	0,83333*	0,08333	0,66667*	0,05556
$[P]_{removida}$	0,86373*	-0,10456	0,83333*	0,08333	0,66667*	0,05556

*Correlação significativa a nível de significância 0,05

FONTE: A autora (2021)

O fator $A_{sup.pond}$ não apresentou correlação significativa com os valores de $[Ca]_{removida}$ e $[P]_{removida}$ em nenhum dos três testes aplicados, enquanto o fator A_{sup} apresentou. A Figura 16 apresenta gráficos de dispersões entre as medidas e os fatores A_{sup} e $A_{sup.pond}$, ilustrando os indícios de que apenas a área superficial tem influência sobre elas. Embora o esmalte possua maior quantidade de minerais em sua composição, a desmineralização dos dois tecidos ocorre por diferentes mecanismos. (MEI et al., 2013) A não identificação de uma correlação entre o fator $A_{sup.pond}$ e os valores de Ca e P dissolvidos descartou o seu uso como fator de normalização dos dados experimentais deste trabalho. Porém, é válido ressaltar que essa investigação não tinha o intuito de comparar a taxa de desmineralização do esmalte e da dentina. Um estudo muito mais detalhado e controlado seria necessário para fazer qualquer afirmação desta natureza.

Figura 16 – Diagramas de dispersão para os conjuntos de pares ordenados ($A_{sup}, [Ca]_{removida}$); ($A_{sup}, [P]_{removida}$); ($E, [Ca]_{removida}$) e ($E, [P]_{removida}$) referentes a cada amostra de dentina na etapa da formação de lesão inicial



FONTE: A autora (2021)

A partir dos indícios de que a área superficial das amostras se relaciona com as concentrações de cálcio e fósforo removidos, as medidas realizadas na etapa de lesão inicial foram divididas pela área da amostra de dentina correspondente. Então, a variância dos valores originais foi comparada à dos novos valores pelo teste f. Os valores originais e corrigidos estão apresentados na **Tabela 9**. Os valores corrigidos serão chamados de $[Ca,P]_{removidos/mm^2_{sup}}$ ou $[Ca,P]_{absorvidos/mm^2_{sup}}$.

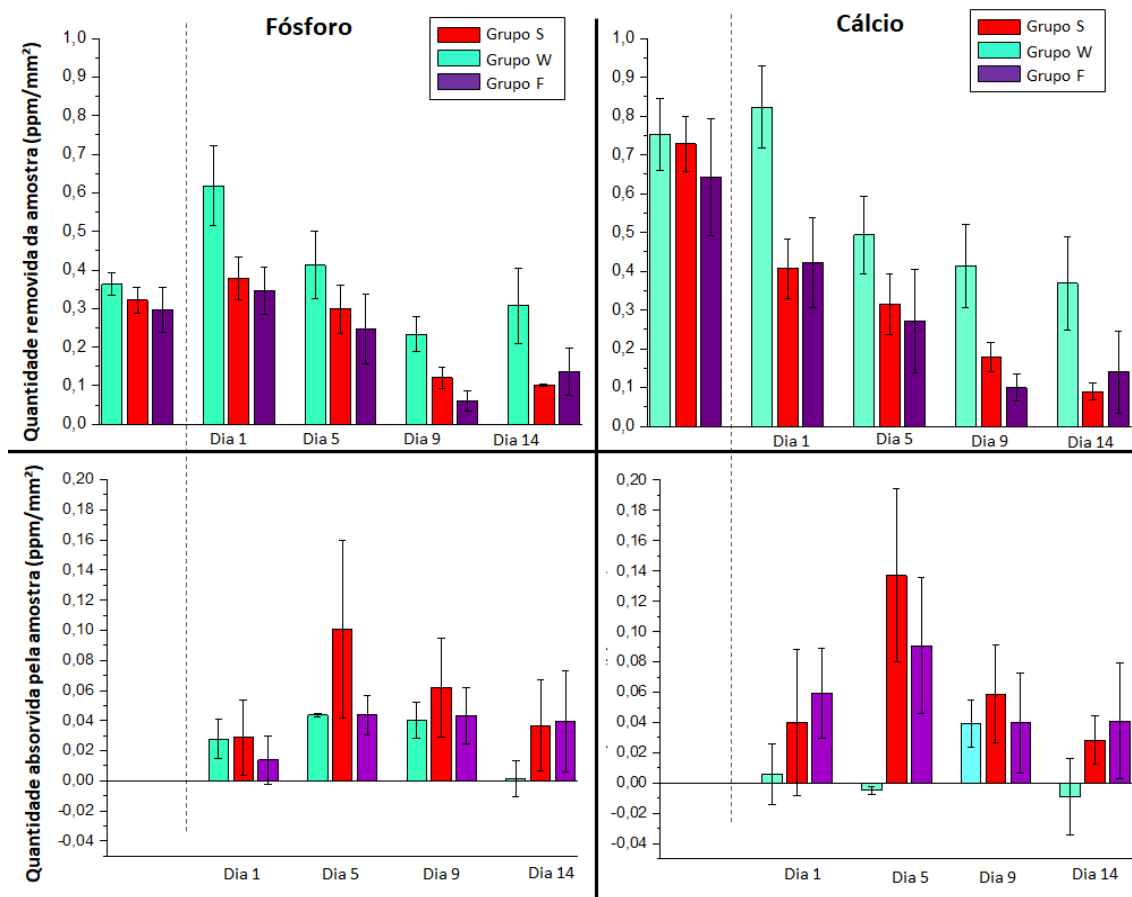
Tabela 9 – Quantidades de Ca e P removidas de cada amostra de dentina na formação da lesão inicial e valores corrigidos em função da área superficial das amostras correspondentes. Parâmetros do teste de variância entre os dados.

[Ca] removida		[P] removida	
Valor original	Valor corrigido	Valor original	Valor corrigido
90,67093023	0,807974784	40,13487581	0,357644589
92,33082463	0,703741041	41,54155494	0,316627705
123,1848937	0,674209916	53,3012741	0,291726091
123,4995011	0,605746032	59,35531888	0,291128698
164,1616605	0,807882188	72,33285537	0,355968776
73,21057503	0,513434147	34,18208827	0,2397229
67,29833436	0,694441589	33,08327664	0,341381453
95,05793104	0,858853732	43,73690276	0,395165366
102,4876285	0,705691858	51,12117176	0,352001458

FONTE: A autora (2021)

Finalmente, a média dos valores corrigidos foi calculada para cada grupo e para os diferentes dias da ciclagem de pH. A Figura 17 mostra a comparação entre as médias de $[Ca]_{\text{removida}}/\text{mm}^2_{\text{sup}}$, $[P]_{\text{removida}}/\text{mm}^2_{\text{sup}}$, $[Ca]_{\text{absorvida}}/\text{mm}^2_{\text{sup}}$ e $[P]_{\text{absorvida}}/\text{mm}^2_{\text{sup}}$ para cada grupo ao longo do clico de pH.

Figura 17 – Gráficos das quantidades médias de Ca e P removidas na desmineralização e absorvidas na remineralização por mm² de área superficial de dentina, para os diferentes dias da ciclagem de pH (eixo x) e diferentes grupos experimentais (cores)



FONTE: A autora (2021)

Comparando as médias dos grupos para cada dia do ciclo, observa-se primeiramente que as médias dos três grupos foram bastante próximas (significativamente iguais, $p > 0,05$) na etapa de formação da lesão inicial, com as médias do grupo W se diferenciando significativamente das demais nos dias subsequentes, em que as amostras já tinham sido submetidas aos respectivos tratamentos. Essa observação indica que o método de normalização funcionou conforme o esperado, pelo menos para proporcionar interpretações de nível qualitativo acerca do comportamento das amostras e dos efeitos do tratamento em cada dia do ciclo.

Nota-se que o grupo W foi o que apresentou maior perda e menor absorção de Ca e P para todos os dias do ciclo. Em relação ao Grupo S, destaca-se o alto valor de absorção de Ca e P, em relação aos outros grupos, observados

no meio do ciclo (dias 5 e 9). Isso pode estar associado à formação de minerais contendo Ca e P mediante interações com as AgNPs.

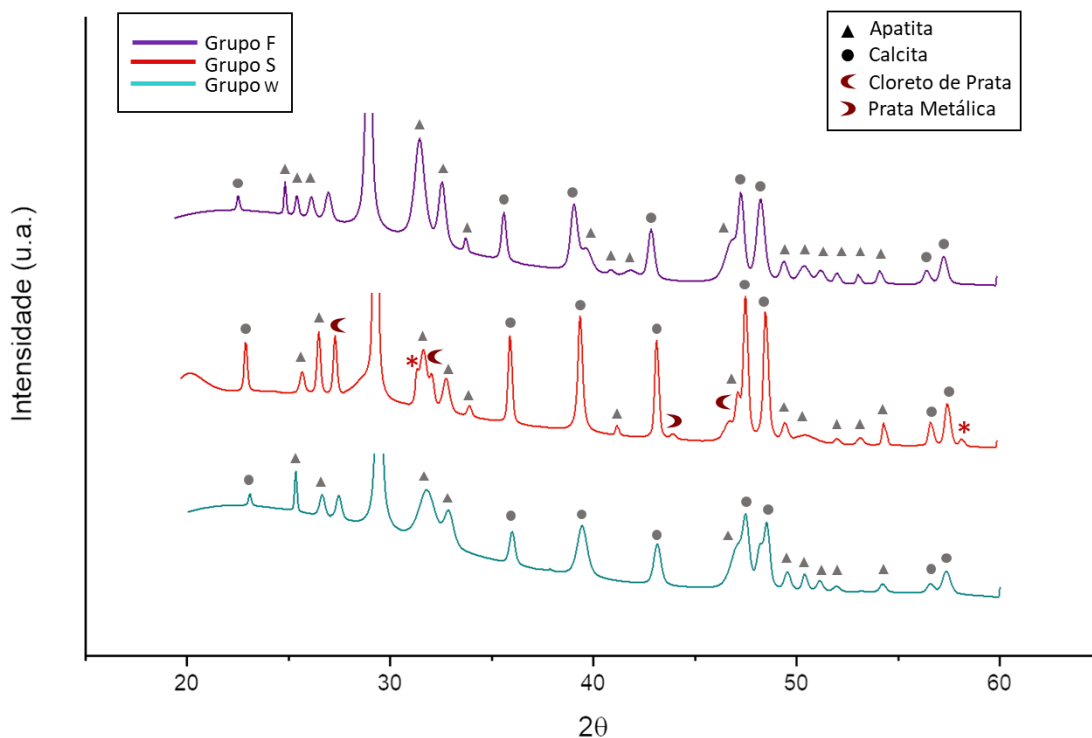
4.2.4 Investigação dos minerais formados na remineralização da dentina

A Figura 18 mostra os difratogramas obtidos pela análise de DRX para amostras de dentina dos três grupos experimentais, após a ciclagem de pH. Para identificação dos minerais correspondentes aos picos de difração apresentados, os dados cristalográficos da base COD foram filtrados através da seleção dos principais elementos encontrados nos minerais da dentina, além da prata e do flúor. Os elementos selecionados foram: Ca, P, O, H, C, Cl, Mg, K, Na, N, Cl, F e Ag. Em todas as amostras, foram identificados picos de difração referentes ao carbonato de cálcio (calcita) e a cristais de apatita.

Dentre os três grupos experimentais, o difratograma do Grupo F apresentou o maior número de picos identificados como apatita (16 picos, contra 12 para o grupo S e 11 para o grupo W). Os picos identificados como carbonato de cálcio foram os mesmos para os três grupos, porém apresentaram maior intensidade e menor largura para o grupo S.

Além das diferenças citadas, o grupo S apresentou 5 picos de difração que não foram identificados nos difratogramas dos grupos de controle F e W. Esses picos estão localizados (2θ) em $31,65^\circ$, $32,35^\circ$, $44,13^\circ$, $47,30^\circ$ e $58,30^\circ$. Dentre esses, não foram encontradas correspondências para os picos em $31,65^\circ$ e $58,30^\circ$ (indicados pelo asterisco na Figura 18. Já os picos em $32,35^\circ$ e $47,30^\circ$ foram identificados como cloreto de prata, correspondendo aos planos cristalográficos com índices (0 2 0) e (0 2 2), respectivamente, junto com um pico em $27,60^\circ$, identificado como AgCl (1 1 1). Esses três picos representam os picos de maior intensidade do cloreto de prata. O pico em $44,13^\circ$ foi identificado como prata metálica, correspondente ao plano cristalográfico com índice (2,0,0).

Figura 18 – Difratomogramas de amostras de dentina dos diferentes grupos experimentais (Grupo W = Controle negativo; Grupo S = Tratamento com AgNPs; Grupo F = Controle positivo)



FONTE: A autora (2021)

Os picos que foram identificados como apatita na Figura 18, na verdade corresponderam aos picos de difração da hidroxiapatita. Porém, o mecanismo de remineralização reportado para o NaF envolve a formação de fluorapatita através da substituição dos grupos hidroxila da HAp pelo íon fluoreto. Como os íons ocupam os mesmos sítios na estrutura cristalina, não há diferença clara entre as difrações apresentadas pelos dois minerais (YU et al., 2018)

Dentre os picos da apatita que foram identificados nas três amostras, os picos correspondentes às reflexões (1 2 1) e (0 3 0) ($2\theta = 31,79^\circ$ e $32,92^\circ$, respectivamente) apresentaram maior intensidade no difratograma do Grupo F. Esses também são os picos mais intensos da ficha cristalográfica da hidroxiapatita que foi utilizada como referência. Já O pico localizado em $34,09^\circ$, correspondente à reflexão (0 2 2) da HAp, só apareceu nos difratogramas dos grupos S e F. Isso pode ser um indicativo de que esses picos na verdade correspondem à fluorapatita. A fluorapatita é mais estável e menos solúvel do que a hidroxiapatita, sendo considerada a principal contribuinte no processo de remineralização e redução de lesões de carie. (ZHAO et al., 2018)

A deposição de AgCl na dentina pode ser importante para a inibição da progressão da carie. Alguns autores consideram que o AgCl pode contribuir para o endurecimento da lesão de carie, uma vez que se trata de um mineral de solubilidade relativamente baixa ($K_{ps} = 1,8 \times 10^{-10}$) (MEI et al., 2017; YU et al., 2018). Porém, não há estudos que evidenciem essa relação. (MEI; LO; CHU, 2018) Outro aspecto importante da formação de AgCl na dentina, entretanto, se deve a possibilidade de o mineral funcionar como uma reserva de íons Ag^+ com ação bactericida. (MEI et al., 2013)

A formação de AgCl também foi reportada por MEI et al (2013) em amostras de dentina submetidas a ciclagem de pH e tratadas com DFP ou $AgNO_3$. Os picos identificados nesse caso foram os mesmos do presente trabalho. Em um estudo recente, YIN et al (2020) comparou o efeito do DFP na remineralização da dentina com o de nanopartículas de prata estabilizadas com polietileno glicol (AgNPs-PEG; diâmetro médio = $2,56 \pm 0,43$ nm) em solução contendo NaF, também utilizando o método de ciclagem de pH. As concentrações de prata e de flúor no coloide de AgNPs-PEG utilizada nesse estudo foi baseada na formulação desenvolvida pelo nosso grupo de pesquisa, sendo, portanto, as mesmas concentrações da formulação utilizada no presente trabalho.

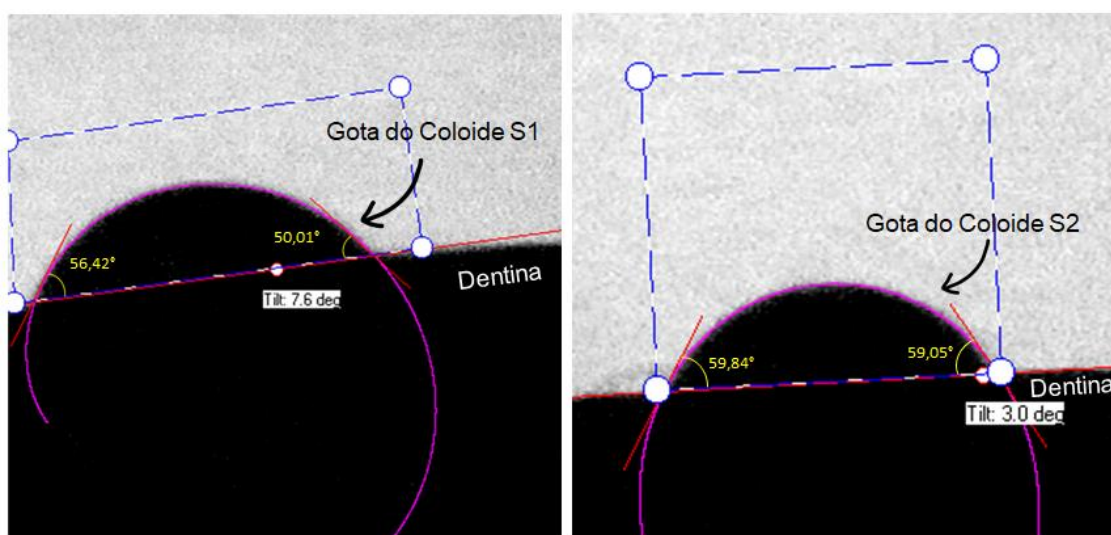
Os resultados de DRX reportados por YIN et al (2020) revelou a presença de AgCl apenas nas amostras tratadas com DFP. A taxa de liberação de íons e a reatividade das AgNPs depende de diversos fatores, entre eles, o tamanho de partícula e o agente estabilizante do coloide (MISRA et al., 2012). Pode-se deduzir que algum desses fatores não favoreceu a formação de AgCl pela ação das AgNPs-PEG, ao contrário do ocorrido para as AgNPs estabilizadas com quitosana utilizadas no presente trabalho.

4.3 INVESTIGAÇÃO DA PENETRAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA NA DENTINA

4.3.1 Ângulo de contato entre a superfície da dentina e os coloides de AgNP

A Figura 19 mostra o resultado da aquisição de imagem e da medida do ângulo de contato para espécimes de dentina tratadas com os coloides.

Figura 19 - Medidas de ângulo de contato entre superfícies de amostras de dentina e coloides



FONTE: A autora (2021)

Os ângulos de contato medidos e a média calculada para cada coloide estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 – Medidas de ângulo de contato entre os coloides e superfícies dentinárias

Amostra de dentina - medida	Coloide S1		Coloide S2	
	θ esquerdo (°)	θ direito (°)	θ esquerdo (°)	θ direito (°)
D1 - 1	56,42	50,01	63,00	61,58
D1 - 2	50,38	53,74	59,84	59,05
D2 - 1	61,09	64,53	40,06	47,30
D2 - 2	61,13	58,34	42,92	45,42
D3 - 1	37,72	37,60	51,40	49,39
D3 - 2	58,14	58,19	53,24	50,76
Média	51,74 ± 9,04		54,15 ± 8,97	

FONTE: A autora (2021)

Os valores médios obtidos para os coloides S1 e S2 foram $51,74^\circ \pm 9,04^\circ$ e $54,15^\circ \pm 8,97^\circ$, respectivamente. Esse resultado indica boa molhabilidade de ambos os coloides sobre a superfície da dentina. Segundo Merchant e Keller (1992), ângulos de contato inferiores a 90° são observados quando um líquido possui afinidade suficiente com a superfície de um substrato sólido para se espalhar sobre ela. (BESINIS; VAN NOORT; MARTIN, 2016; MERCHANT; KELLER, 1992)

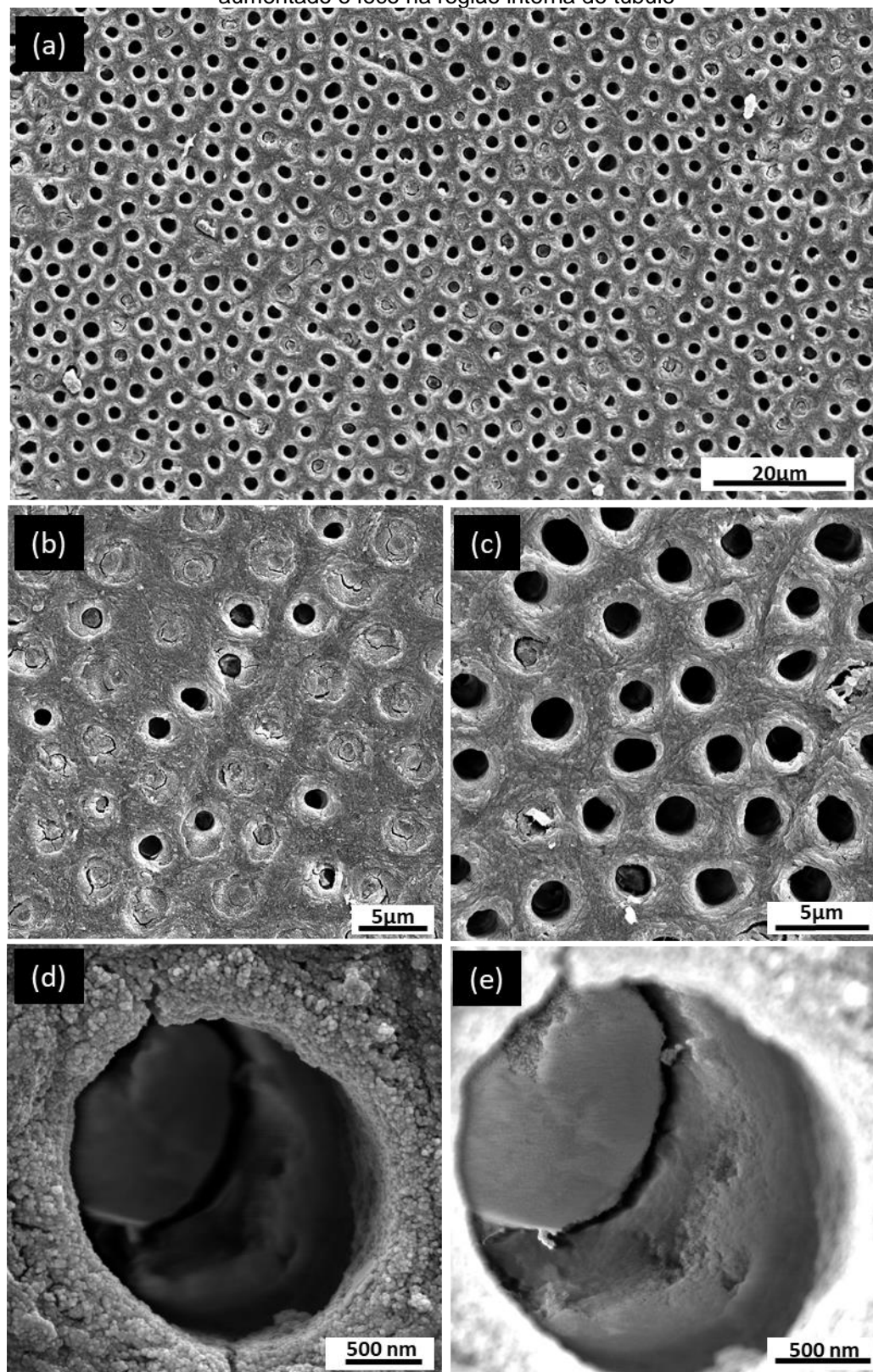
Portanto, uma vez que a superfície da dentina apresente túbulos dentinários abertos, levando em conta que as paredes dos túbulos apresentam composição semelhante à da dentina superficial, espera-se que forças capilares se desenvolvam levando ao escoamento dos coloides pelos túbulos e, conseqüentemente à penetração das AgNPs. (DUNCAN SHAW, 1992)

4.3.2 Análise da superfície de amostras de dentina tratadas com Anos

A hipótese investigada neste experimento trata da penetração de AgNPs na dentina via interações capilares entre o coloide e os canalículos microscópicos conhecidos como túbulos dentinários. Portanto, o método de preparação da amostra para o tratamento com AgNPs deve garantir a exposição de túbulos abertos na região da dentina exposta por secção dos dentes.

A Figura 20 mostra imagens de MEV da superfície de uma amostra de controle negativo (que não recebeu tratamento com AgNPs), preparada conforme metodologia A, descrita na seção 3.3.1 da Parte Experimental. Túbulos dentinários abertos foram encontrados em grande proporção em algumas regiões da dentina exposta (Figura 20a). Outras regiões, menos frequentes, apresentaram túbulos obstruídos (Figura 20b). Os túbulos expostos têm diâmetros de abertura entre 2,5 e 3 μm . Essa medida condiz com o valor reportado na literatura para a região da dentina coronária apical, onde os dentes foram seccionados (LOVE; JENKINSON, 2002; MADEIRA, 2007). As Figura 20 (c,d) mostram que é possível obter informações do interior do túbulo analisando a superfície da dentina, controlando parâmetros da corrente eletrônica que interferem no foco, brilho e contraste da imagem.

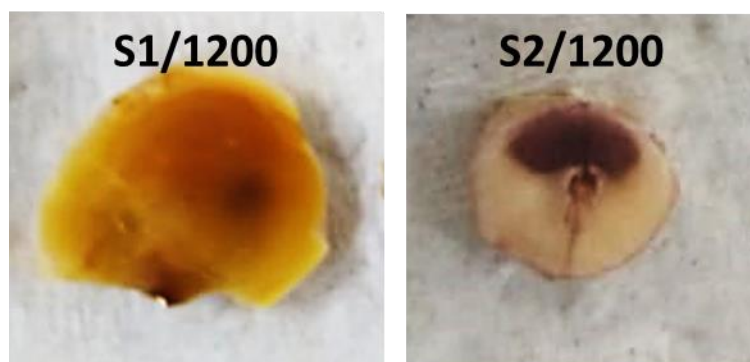
Figura 20 – Imagens de MEV da superfície da dentina de uma amostra sem AgNPs (controle negativo); (a) exposição de túbulos dentinários; (b) região com alguns túbulos obstruídos; (c) região com túbulos abertos; (d) imagem de um único túbulo dentinário; (e) imagem com brilho aumentado e foco na região interna do túbulo



FONTE: A autora (2021)

Em experimentos preliminares, partiu-se do pressuposto de que exposições intensificadas das amostras aos coloides poderiam facilitar a identificação das AgNPs na superfície dentinária. Portanto, as primeiras amostras analisadas tiveram suas superfícies tratadas pelos coloides com tempo de contato de 20h. Essas amostras serão chamadas de S1/1200 e S2/1200, referenciando o coloide que foi aplicado e o tempo do tratamento em minutos. A Figura 21 mostra as superfícies das amostras de dentina submetidas a esse tratamento. As superfícies ficaram com uma coloração semelhante à dos coloides aplicados, mesmo depois de lavadas com água.

Figura 21 – Superfície das amostras de dentina expostas aos coloides S1 e S2 por 20h (1200 min)

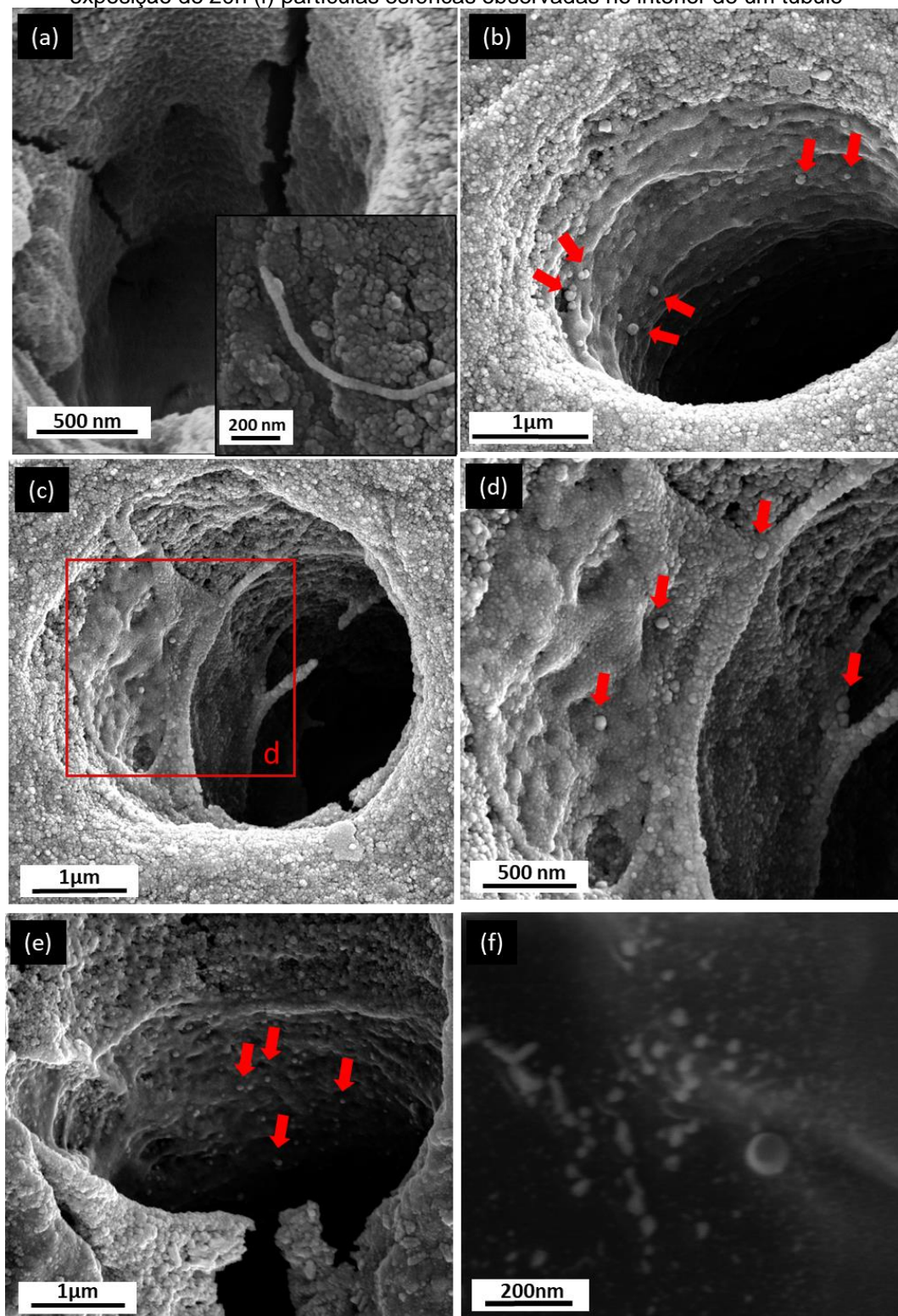


FONTE: A autora (2021)

A Figura 22 mostra imagens de MEV da superfície de amostras de dentina em que a disposição e orientação dos túbulos em relação ao detector de elétrons possibilitou observar áreas de suas paredes internas. A Figura 22a corresponde a uma amostra do controle negativo, para comparação. As Figura 22 (b,c,d) e (e,f) correspondem à amostras S2/1200 e S1/1200, respectivamente.

As setas vermelhas apontam para grãos esféricos isolados de tamanhos irregulares que foram encontrados dentro dos túbulos das amostras S1/1200 e S2/1200 e não foram observados na amostra de controle negativo. A Figura 22f, mostra uma dessas partículas em imagem de maior magnificação. É possível notar que ela está acompanhada de partículas menores, cujas morfologias não estão claramente definidas devido à resolução limitada alcançada na imagem.

Figura 22 - Paredes internas de túbulos dentinários vistos a partir da superfície da dentina. (a) amostra de controle negativo, sem AgNPs. (b, c, d) amostra tratada com o coloide S2 com tempo de exposição de 20h; (e) amostra tratada com o coloide S1 com tempo de exposição de 20h (f) partículas esféricas observadas no interior de um túbulo



FONTE: A autora (2021)

A partir desses resultados, porém, não é possível afirmar que AgNPs foram identificadas dentro dos túbulos. Em escala nanométrica, a própria superfície dentinária apresenta estrutura granular (MEI et al., 2013) Isso pode ser observado na inserção da Figura 22a, também correspondente a uma região da amostra de controle negativo. Dessa forma, outro tipo de análise seria necessário para distinguir as AgNPs dos grãos observados ao seu redor, pertencentes à superfície dentinária.

Na microscopia eletrônica de varredura, informações de natureza distintas podem ser obtidas a partir das diferentes interações do feixe eletrônico com a superfície da amostra. As imagens mostradas na Figura 22 são formadas pela detecção de elétrons secundários (SE). Esses elétrons são ejetados de átomos da amostra como resultado de interações inelásticas (com transferência de energia) desenvolvidas com os elétrons acelerados do feixe incidente.

Os elétrons do feixe incidente, também chamados de elétrons primários (PE), penetram na superfície da amostra e interagem com todos os átomos presentes no volume penetrado, gerando os SE. Porém, elétrons secundários deixam a eletrosfera com energias relativamente baixas e vão perdendo mais energia durante o seu caminho para fora da amostra. Nessa trajetória, eles podem ser reabsorvidos pelos átomos da superfície. Portanto, quanto mais distante da superfície de interação estiverem os átomos, menor será a quantidade de elétrons ejetados da amostra e menor o sinal coletado pelo detector. Isso resulta em imagens com diferença de contraste relacionada principalmente à topografia. (ION; SYSTEMS, 2000)

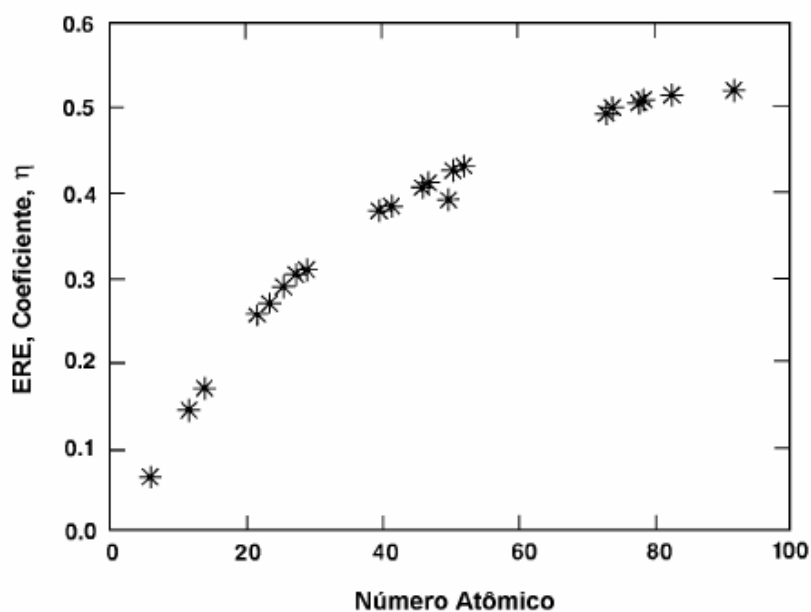
Os elétrons retroespalhados (BSE), por outro lado, são elétrons do feixe incidente que sofrem perda de energia ou mudança em sua trajetória inicial devido a interações elásticas e inelásticas com a superfície da amostra. A interação elétron-amostra de maior contribuição para o sinal de BSE coletado ocorre entre os elétrons primários e os núcleos dos átomos que compõem a amostra. A repulsão entre os PE e o núcleo positivamente carregado faz com que os elétrons se desviem da sua trajetória inicial sendo ejetados para fora da amostra. (ION; SYSTEMS, 2000)

Quanto maior o número atômico Z, maior a carga positiva e a massa do átomo em relação aos elétrons primários. Isso leva a uma força de repulsão mais

intensa que faz com que os BSE sejam ejetados da amostra com menor probabilidade de sofrer interações com perda de energia no caminho, chegando em maior número ao detector. Portanto, existe uma relação entre a intensidade do sinal de BSE com a composição elementar da amostra, que se reflete na diferença de contraste da imagem. (ION; SYSTEMS, 2000)

A Figura 23 mostra a variação do coeficiente de emissão de BSE em função do número atômico do elemento presente na superfície bombardeada pelos elétrons primários, demonstrada por Heinrich (1966) (“Livro de microscopia dos materiais.pdf”, [s.d.]) Além da correlação existente entre os valores, outras informações importantes podem ser obtidas sobre o mecanismo de contraste de composição nas imagens de BSE, que leva à uma melhor exploração do potencial analítico da microscopia eletrônica. Observa-se, por exemplo, que para elementos de número atômico próximo, o crescimento de η em função de Z não é bem definido. Além disso, a inclinação da curva diminui com o aumento de Z . Dessa forma, o contraste por composição em imagens de BSE tende a ser mais significativo em amostras compostas por elementos de números atômicos baixos e não adjacentes. (ION; SYSTEMS, 2000)

Figura 23 – Curva de variação do coeficiente de emissão de BSE com o número atômico do elemento presente na superfície analisada



FONTE: (ION; SYSTEMS, 2000)

Conforme já mencionado, a dentina humana é constituída basicamente de minerais, em cerca de 70%, e matéria orgânica, em aproximadamente 20%, além de água. Dentre os minerais, o que está presente em maior quantidade é a Hidroxiapatita, enquanto a parte orgânica é composta principalmente por colágeno. A Tabela 11 indica o número atômico dos elementos que constituem as estruturas citadas, em contraste com o da prata. De acordo com a curva apresentada na Figura 23, os coeficientes de emissão de BSE de todos os elementos da dentina estariam abaixo da metade do coeficiente da prata. Por esse motivo, espera-se que nas imagens de BSE as AgNPs apresentem um brilho muito mais intenso, que pode ajudar a distingui-las em meio a estrutura da dentina.

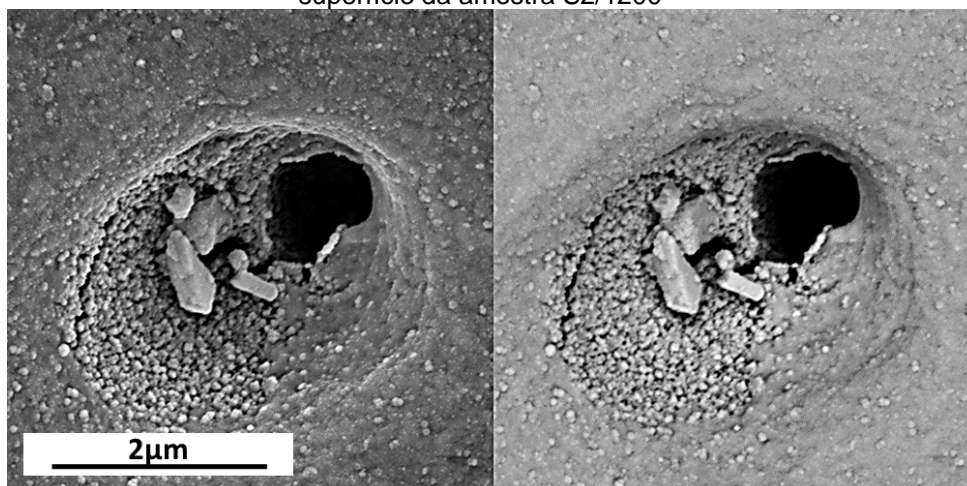
Tabela 11 – Números Atômicos (Z) da Prata e dos principais elementos que constituem a dentina (Ca, P e O - hidroxiapatita; C, O, H e N - colágeno)

Ag	Ca	P	O	N	C	H
Z = 47	Z = 20	Z = 15	Z = 8	Z = 7	Z = 6	Z = 1

FONTE: A autora (2021)

Na Figura 24 são apresentadas imagens de SE e BSE para uma mesma região da amostra S2/1200. A região mostra uma superfície particularmente granulosa obstruindo a abertura de um túbulo. Contudo, não foi observada diferença de contraste significativa para identificar as AgNPs. O mesmo ocorreu para as outras amostras analisadas nos experimentos preliminares.

Figura 24 – Imagem de SE (esquerda) e BSE (direita) de região granulosa na superfície da amostra S2/1200



FONTE: A autora (2021)

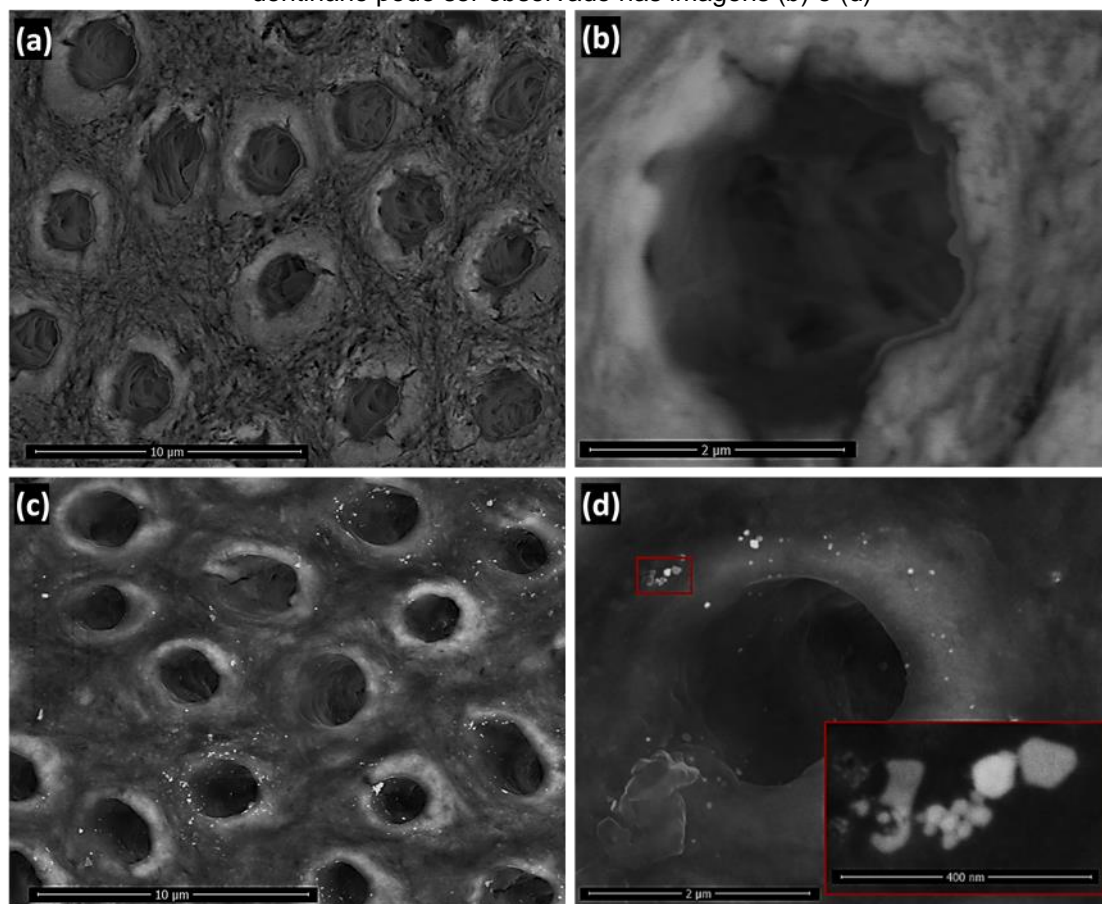
O preparo das amostras S1/1200 e S2/1200 para a análise de MEV envolveu revestimento da superfície com filme metálico de ouro ($Z=79$), seguindo metodologia tipicamente aplicada à análise de materiais isolantes como a dentina. Além disso, para evitar efeitos de carregamento alcançando resoluções altas o suficiente para a identificação das AgNPs, foi necessário aplicar revestimento metálico de espessura relativamente elevada. Essa observação pode justificar a ausência do contraste de composição na imagem de BSE apresentada na Figura 24.

Nesse contexto, o preparo das amostras para análise de MEV nos experimentos posteriores foi realizado com revestimento de carbono. Os resultados apresentados a seguir são referentes à análises de amostras dos grupos experimentais descritos na Tabela 4 da seção 3.3.1. A nomenclatura das amostras segue o padrão “coloide aplicado/tempo de tratamento em minutos”. O coloide S1 é constituído por partículas esféricas de tamanho médio menor que 10 nm, enquanto o coloide S2 é formado por NPs maiores e polimórficas.

A Figura 25 mostra ~~25 mostra25mostra25mostra~~ imagens da superfície da dentina formadas por uma mistura de sinais de elétrons secundários (SEI) e elétrons retroespalhados (BSEI), na proporção de 50:50, em amostras com revestimento de carbono. A Figura 25(a,b) corresponde à amostra que não recebeu tratamento com AgNPs (grupo 0), enquanto os resultados da Figura 25 (c,d) se referem a uma amostra do grupo S2/30. Nota-se que partículas de brilho

mais intenso aparecem apenas na superfície da amostra S2/30. Além disso, as morfologias e tamanhos dessas partículas, que podem ser observados na inserção da Figura 25d, são idênticos aos apresentados na imagem de STEM do coloide S2 (Figura 9; Seção 4.1.4)

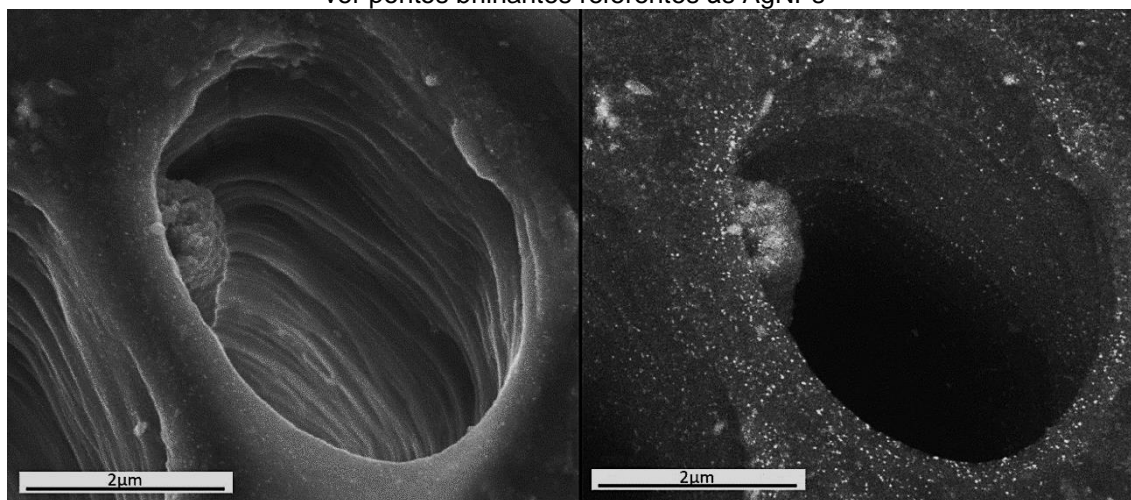
Figura 25 - Imagens de MEV da superfície da dentina. (a, b) amostra do Grupo 0, controle negativo. (c, d) amostra do Grupo S2/30. As imagens com aumento menor (a, c) mostram a distribuição dos túbulos dentinários na superfície exposta da dentina, enquanto um único túbulo dentinário pode ser observado nas imagens (b) e (d)



FONTE: A autora (2021)

A Figura 26 mostra imagens compostas apenas por SEI (à esquerda) e BSEI (à direita), correspondentes a uma mesma região da superfície de uma amostra S1/03. Partículas brilhantes de tamanho e morfologia correspondente às AgNPs do coloide S1 podem ser observadas na imagem de BSEI, destacando-se da superfície da dentina ao seu redor.

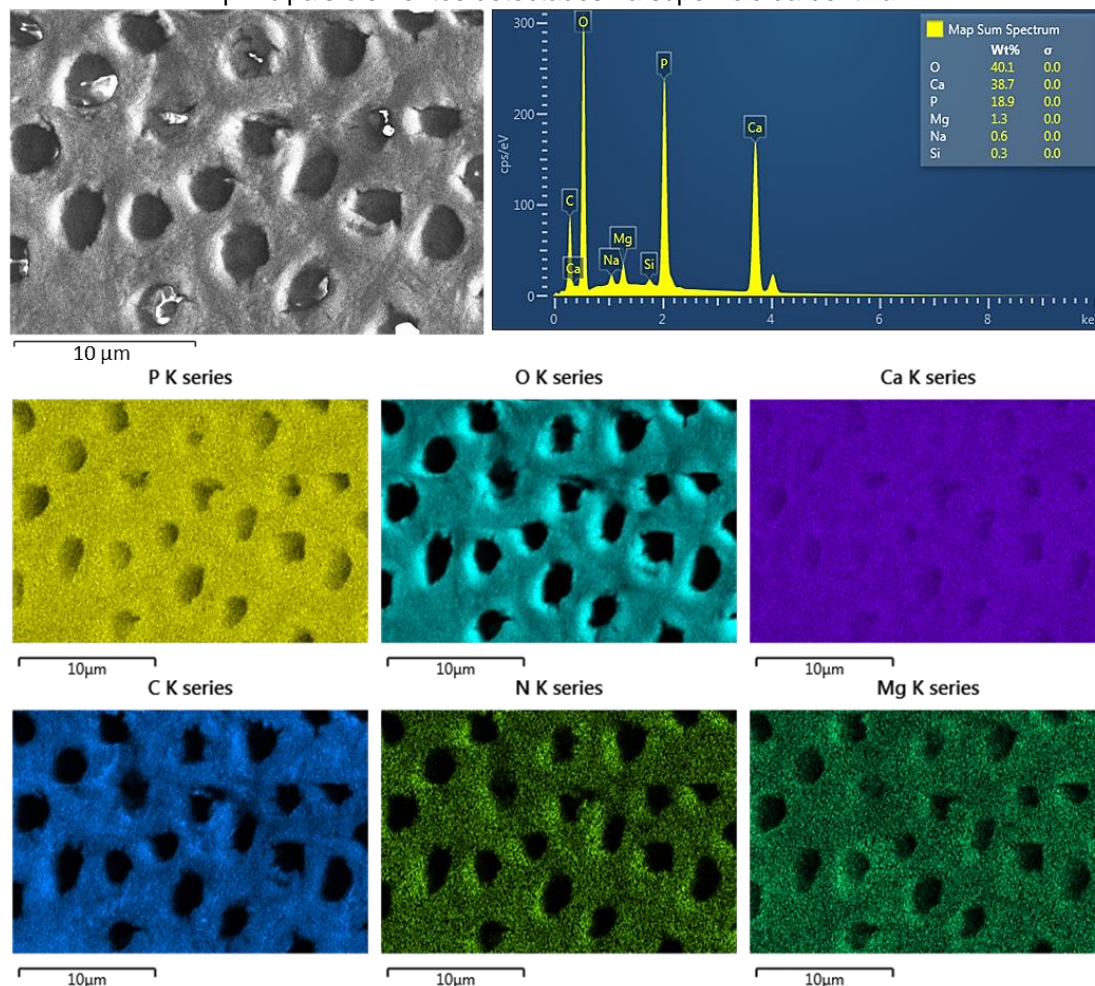
Figura 26 - Imagens de MEV mostrando um túbulo dentinário a partir da superfície de uma amostra de dentina do grupo S1/03. (a) Imagem de SE; (b) Imagem de BSE, onde é possível ver pontos brilhantes referentes às AgNPs



FONTE: A autora (2021)

Também foram realizadas análises da superfície das amostras por espectroscopia de raios X por dispersão de energia (EDS). Para uma amostra do Grupo 0, foi detectada a presença de cálcio, fósforo, oxigênio, carbono e nitrogênio, além de traços de magnésio, sódio e silício. Os elementos se distribuem na região analisada conforme mostrado nos mapas elementares da Figura 27. Esses resultados são semelhantes aos reportados na literatura para análise de EDS da dentina (SEZEN et al., 2018) e validam os argumentos usados anteriormente em favor da identificação das AgNPs por contraste de composição nas imagens de BSE.

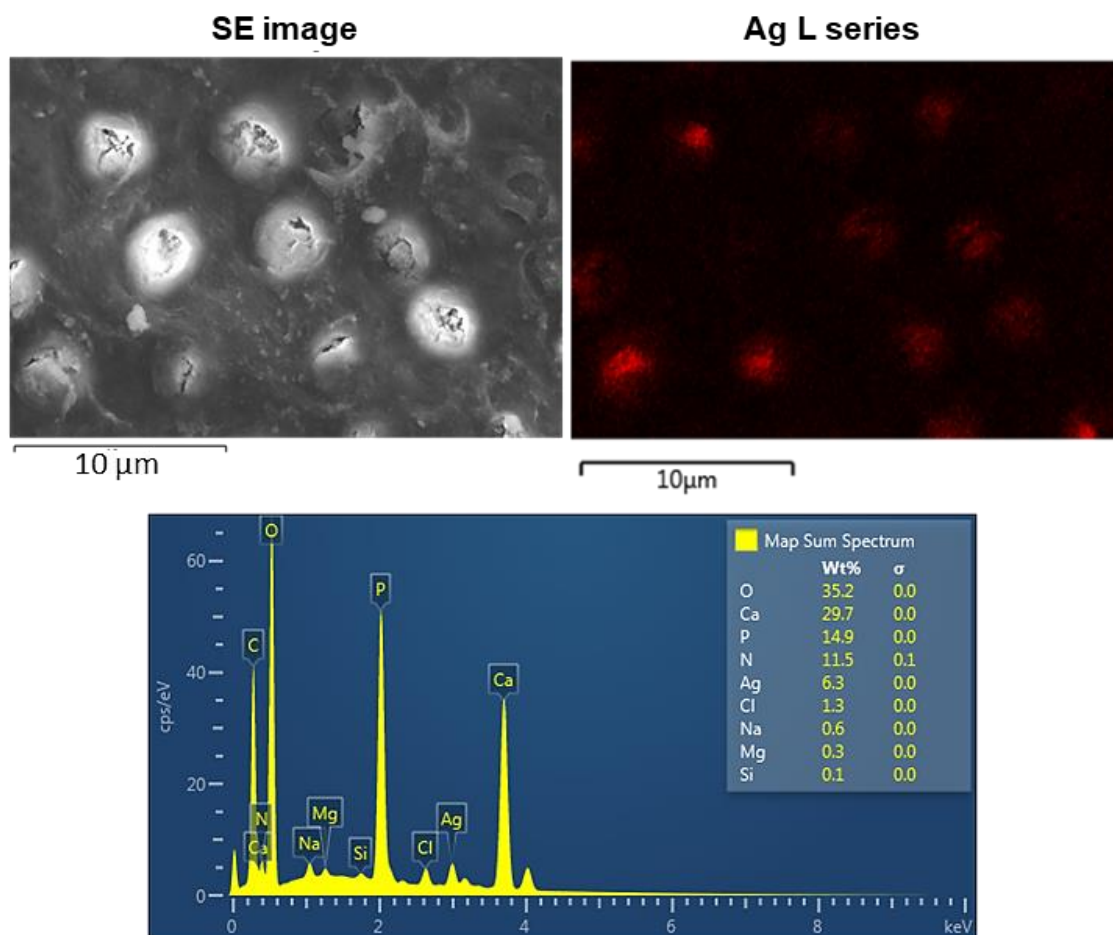
Figura 27 - Canto superior esquerdo: Imagem de SE da região da amostra de dentina do Grupo 0 (controle negativo) analisada por EDS; Canto superior direito: Espectro de EDS mostrando os picos referentes aos elementos identificados na amostra; Mapas mostrando a distribuição dos principais elementos detectados na superfície da dentina



FONTE: A autora (2021)

A Figura 28 mostra o resultado de EDS para uma amostra do grupo S1/30. Além dos mesmos elementos da amostra de controle, também foi detectado o sinal da prata. De acordo com o mapa elementar mostrado no canto superior direito, a prata se distribui na superfície da dentina de forma localizada, emitindo maior sinal nas regiões correspondentes às entradas dos túbulos.

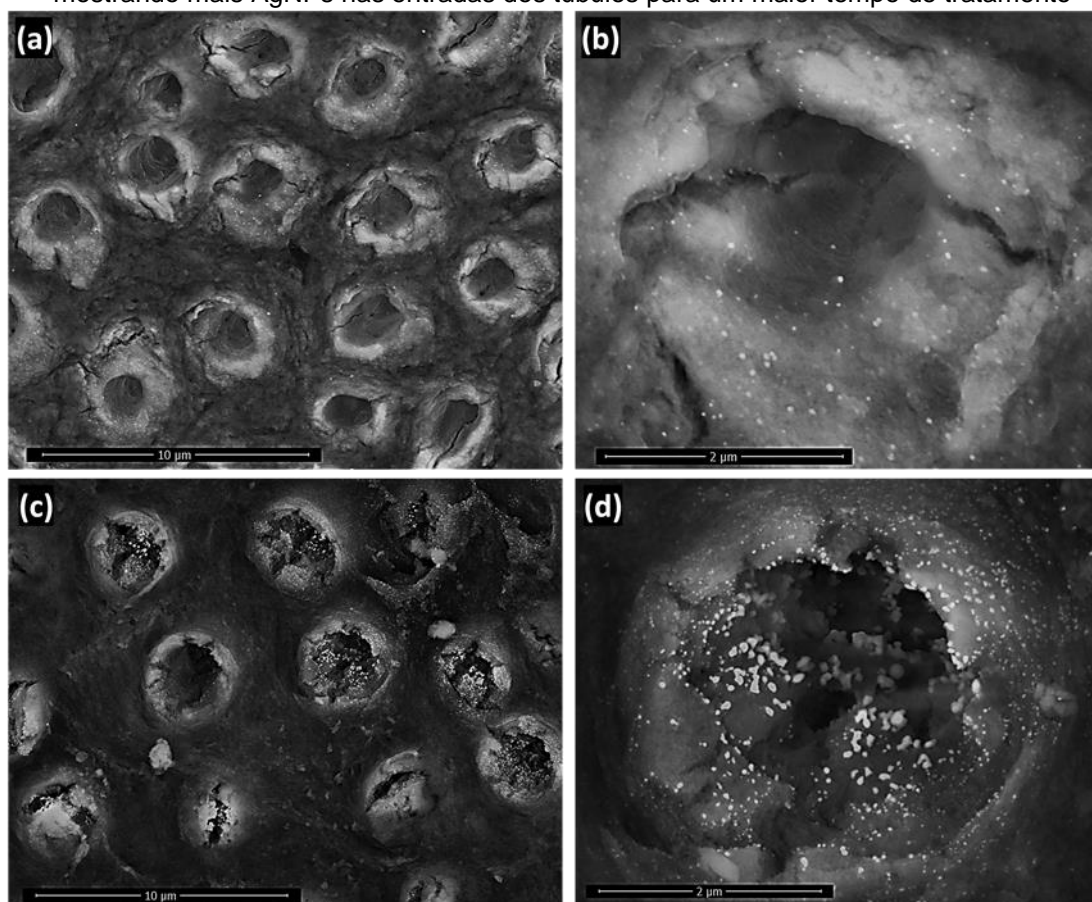
Figura 28 - Canto superior esquerdo: Imagem de SE da região da amostra de dentina do Grupo S1/30 analisada por EDS; Canto superior direito: Mapa mostrando a distribuição da prata (marcação vermelha) na superfície da dentina; Canto inferior: Espectro de EDS mostrando os picos referentes aos elementos identificados na amostra



FONTE: A autora (2021)

A Figura 29 mostra imagens de MEV (SEI:BSEI 50:50) de espécimes tratadas com o mesmo coloide, mas com diferentes tempos de tratamento (amostra S1/03 – Figura 29 a,b; amostra S1/30 – Figura 29 c,d). Observa-se que quanto maior o tempo de exposição da dentina ao coloide, maior o número de AgNPs detectadas dentro dos túbulos.

Figura 29 - Imagens de MEV das superfícies da dentina de amostras (a,b) S1/03 e (c, d) S1/30, mostrando mais AgNPs nas entradas dos túbulos para um maior tempo de tratamento



FONTE: A autora (2021)

A análise das superfícies de dentina com túbulos dentinários expostos tratadas com formulação de AgNPs, cujos resultados foram apresentados nesta seção, mostrou que as nanopartículas tendem a se acumular nas bordas e penetrar nos túbulos. As observações são coerentes com os fundamentos de capilaridade, suportados pelos baixos ângulos de contato entre a superfície da dentina e os coloides, demonstrados na seção anterior.

Os resultados apresentados descartam a hipótese de que as AgNPs poderiam se espalhar pela superfície da dentina intertubular, sem penetrar nos túbulos de forma significativa, ou ser carregadas para fora da dentina após a lavagem das amostras com água.

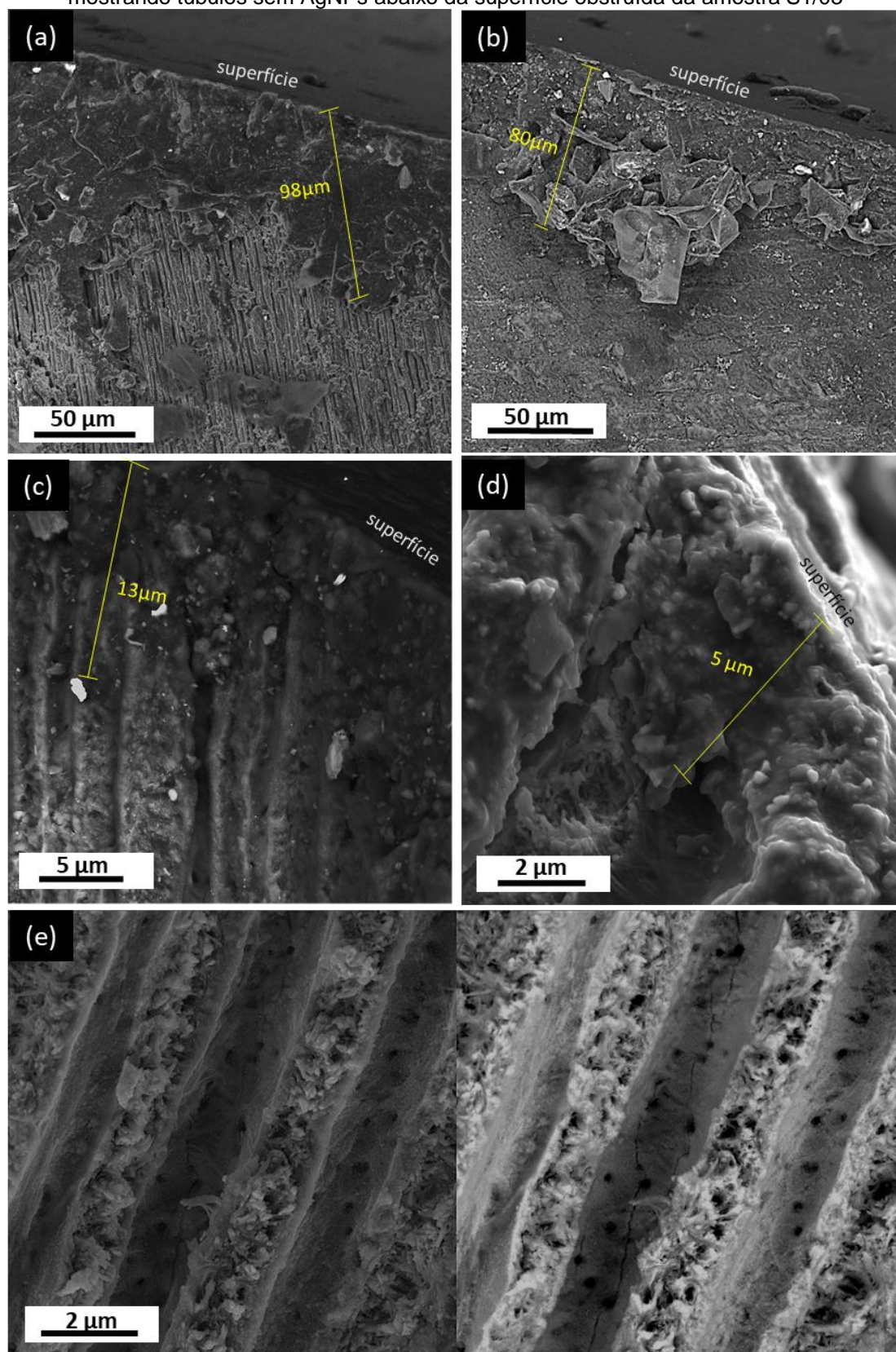
Além disso, foi possível estabelecer uma metodologia reprodutível e confiável para a identificação das AgNPs na superfície da dentina em análises de MEV, mesmo para NPs pequenas e baixo tempo de exposição da dentina ao coloide (amostra S1/03).

4.3.3 Análise da secção transversal de amostras de dentina tratadas com AgNPs

Para acessar regiões do interior da dentina, a fim de detectar a presença das AgNPs dentro dos túbulos, secções transversais das amostras foram obtidas e analisadas por MEV. O primeiro método utilizado para a obtenção das secções transversais consistiu na ruptura manual das amostras.

A Figura 30 mostra imagens de MEV de secções transversais obtidas para amostras dos grupos S1/30 (Figura 30 a,b) e S1/03 (Figura 30 c,d,e). A superfície da dentina onde foram aplicados os coloides, antes da ruptura das amostras, está identificada nas imagens. Nas Figura 30 (a - d) observa-se a presença de fragmentos cobrindo uma grande extensão dos túbulos expostos. As partes cobertas correspondem às regiões dos túbulos que se conectam à superfície. Sendo assim, não foi possível acompanhar o caminho de penetração das AgNPs nas amostras. As NPs tampouco foram detectadas nas regiões dos túbulos localizadas abaixo da área comprometida pelos detritos. A Figura 30 (e) mostra imagens de SE e BSE de um túbulo da amostra S1-03. Na imagem de BSE, não se observa contraste de composição.

Figura 30 – Secções transversais das amostras de dentina obtidas por ruptura; (a,b) amostra do grupo S1/30; (c,d) amostra do grupo S1/03; (e) Imagem de SE – esquerda; e BSE – direita; mostrando túbulos sem AgNPs abaixo da superfície obstruída da amostra S1/03



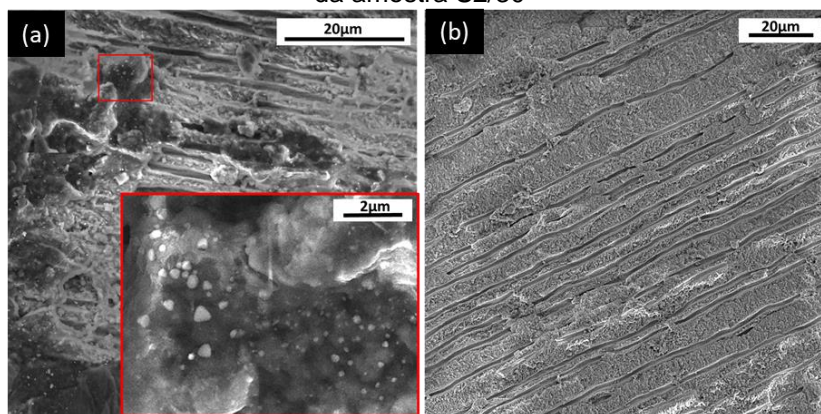
FONTE: A autora (2021)

Os fragmentos observados provavelmente são da própria dentina, provenientes do processo de ruptura. A dentina é um material relativamente duro (aproximadamente 2,5 na escala Mohs) e diversos autores que lidaram com sua ruptura ou corte mecânico para obtenção de secção transversal relataram problemas semelhantes (PLOMP et al., 2007) Para a região apresentada na d, a extensão dos túbulos cuja visualização foi prejudicada é relativamente pequena. Ainda assim, não foram detectadas AgNPs nos túbulos localizados abaixo dessa área.

Essa observação suscitou a hipótese de que esses túbulos poderiam já apresentar a entrada obstruída no momento do tratamento com o coloide. Isso seria plausível, pois durante a análise das superfícies, foram observadas regiões com túbulos fechados, embora a maioria estivesse aberta. Ao induzir manualmente a ruptura da amostra para obtenção da secção transversal, não é possível controlar a região da superfície que será seccionada.

A Figura 31 mostra imagens de MEV da secção transversal obtida para uma amostra do grupo S2/30. Nessa amostra, partículas com morfologia correspondente às do coloide S2 (inserção na Figura 31a) foram detectadas a uma distancia de 15,30 μm da superfície. Porém, elas não estavam no interior de um túbulo e sim depositadas sobre os fragmentos encontrados na secção transversal da amostra. Além disso, observa-se efeitos de carregamento em diversas regiões das amostras. A irregularidade da superfície exposta pela ruptura pode ter prejudicado o processo de deposição de carbono, interferindo na homogeneidade da cobertura.

Figura 31 – Secção transversal de amostra de dentina obtida por ruptura da amostra S2/30



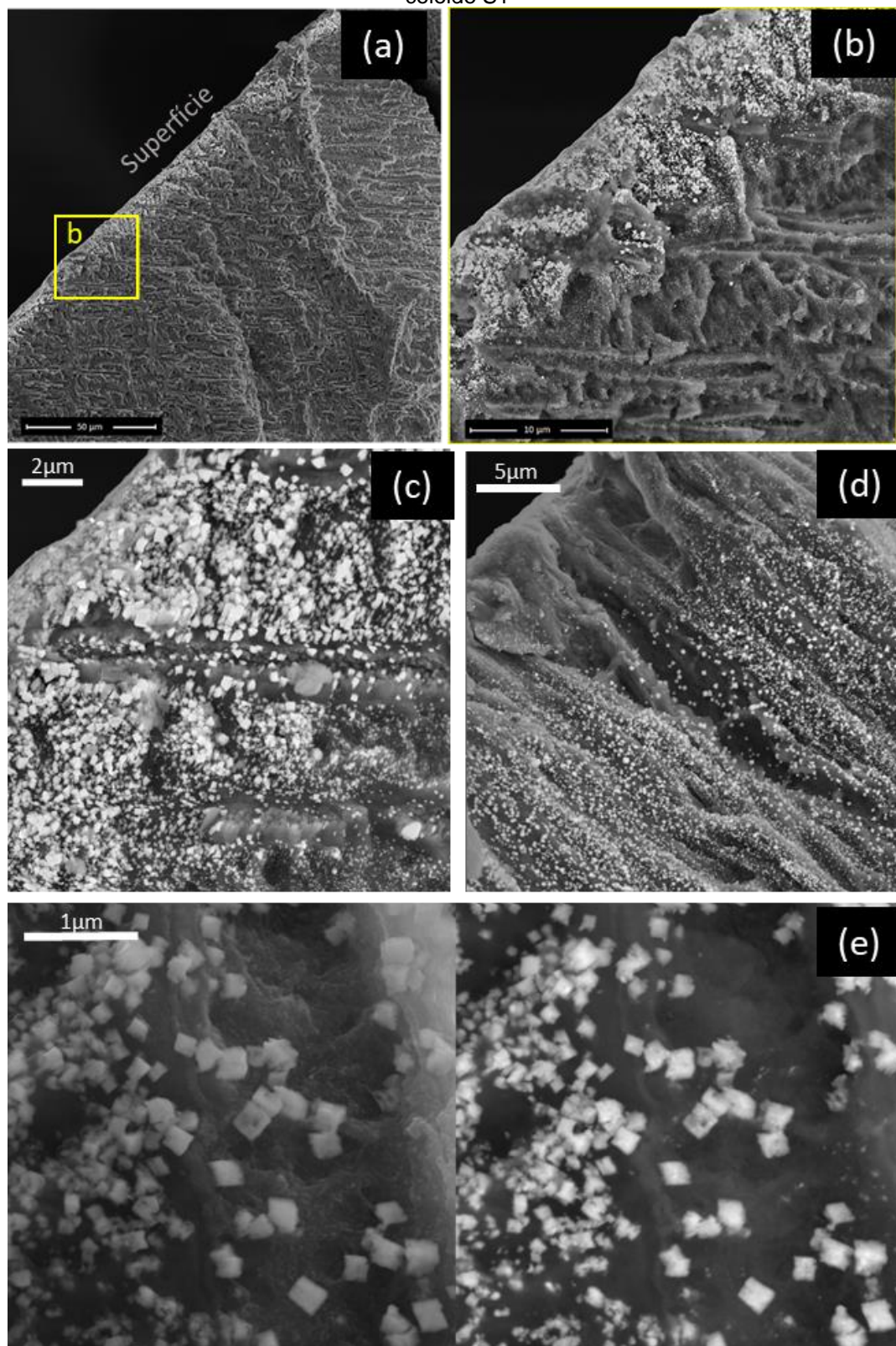
FONTE: A autora (2021)

Tendo em vista a possibilidade de a secção transversal obtida revelar o interior de túbulos que estavam obstruídos na superfície, a metodologia de preparo da amostra antes do tratamento com AgNPs foi modificada. Visando o aumento do número de túbulos dentinários expostos na superfície, testou-se a intensificação do polimento promovido após a secção da coroa (segundo metodologia B descrita na seção 3.3.1) e a desmineralização da superfície por exposição da amostra à solução de ácido cítrico (metodologia C; seção 3.3.1).

A **Figura 32** corresponde às imagens de MEV de uma secção transversal de amostra do grupo S1/30 que foi preparada com a metodologia B de polimento da superfície antes da aplicação do coloide. Essa amostra será chamada de S1/30-B. As imagens são formadas por uma mistura 50:50 dos sinais de SE e BSE, à exceção da **Figura 32(e)**, que mostra uma imagem de SEI 100% (à esquerda) e BSEI 100% (à direita), de regiões correspondentes. Nas **Figura 32 a** e **b** é possível notar partículas de brilho mais intenso no interior da dentina, em uma faixa cuja profundidade de penetração em relação à superfície é relativamente homogênea ($12,3 \pm 1,8 \mu\text{m}$).

Observa-se também que essas partículas não estão concentradas apenas no interior dos túbulos (canalículos de menor largura), aparecendo em grande quantidade na dentina intertubular e em regiões cujos limites dos túbulos dentinários não estão definidos (**Figura 32d**). Na **Figura 32(e)**, é possível observar que as partículas de maior brilho apresentam uma mistura de formas e tamanhos que não condizem com as AgNPs presentes no coloide S1, que foi aplicado na amostra. Além disso, algum tipo de mecanismo de contraste também é observado na imagem formada puramente por SE, pois as partículas se destacam com maior sinal em ambas as imagens.

Figura 32 – MEV de secção transversal da amostra S1/30-B, mostrando a presença de partículas com sinal de BSE elevado no interior da dentina. (a,b,c,d) Imagens 50% SEI e 50% BSEI mostrando a localização das partículas em relação à superfície da dentina e aos túbulos dentinários; (e) imagem 100% SEI (à esquerda) e 100% BSEI (à direita) mostrando que o tamanho e a morfologia das partículas identificadas não condizem com os das AgNPs do coloide S1

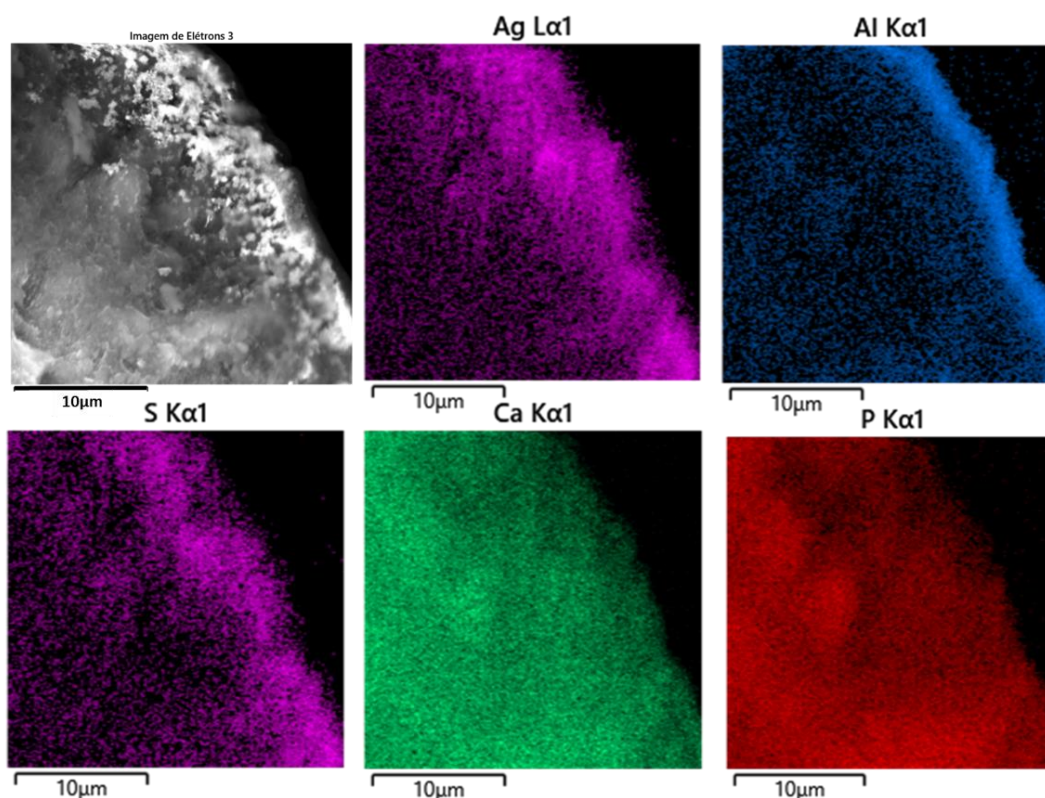


FONTE: A autora (2021)

Além do mecanismo de contraste de topografia, as imagens de SE também podem apresentar outros tipos de contraste, como por exemplo, o cristalográfico. Em um material de estrutura cristalina, os elétrons primários podem penetrar por canais preferenciais, o que leva a uma redução na perda de energia e aumenta o volume de interação, podendo gerar maior quantidade de elétrons secundários. (ION; SYSTEMS, 2000)

De uma forma geral, os resultados apresentados na **Figura 32** indicam que outro material pode estar interferindo na identificação das AgNPs no interior da amostra. Para confirmar essa hipótese, foi realizada uma análise de EDS, cujos resultados estão apresentados na **Figura 33**. O mapeamento elemental revelou a presença da prata, mas também de alumínio e enxofre, na faixa correspondente às partículas de brilho intenso localizadas próximas à superfície da dentina. A presença e a localização desses elementos suportam a hipótese de que outro material particulado interferiu na identificação das AgNPs na análise de MEV.

Figura 33 – Mapeamento elemental por EDS da amostra S1/30-B, revelando a penetração da prata mas também a presença de contaminantes (Al e S)



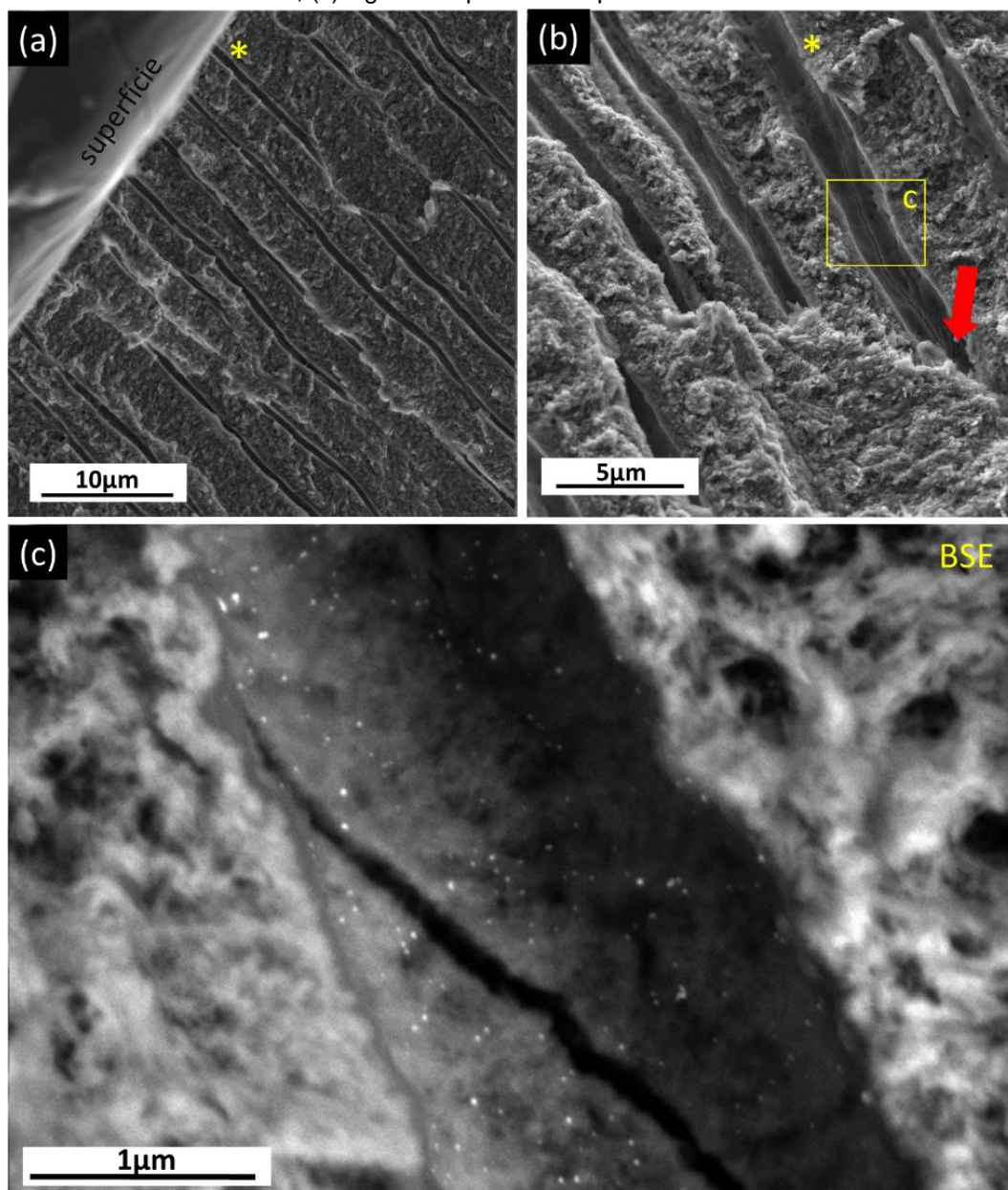
FONTE: A autora (2021)

Apesar da amostra ter sido lavada sucessivamente com água e banho ultrassônico após o polimento da superfície, o material interferente na amostra S1-30 pode ser atribuído a resíduos deixados por esse processo. Essa justificativa é provável, pois além da sequência de lixas d'água, foi utilizada uma suspensão abrasiva de alumina. Considerando esses resultados, o uso da metodologia B para intensificar a exposição de túbulos abertos nas superfícies das amostras foi descartado nos experimentos posteriores.

A Figura 34 mostra os resultados de MEV para a secção transversal de uma amostra S1/03-C (superfície desmineralizada com ácido cítrico antes do tratamento com as AgNPs, para promover maior abertura dos túbulos). Desta vez, a ruptura da amostra permitiu a observação de regiões internas dos túbulos dentinários desde a sua superfície (Figura 34a). As AgNPs foram detectadas no interior dos túbulos pelas imagens de BSE, conforme mostrado na Figura 34c. Os tamanhos das partículas esféricas brilhantes são condizentes com as AgNPs do coloide S1. Observa-se que as NPs foram encontradas dispersas sobre dentina intratubular.

O asterisco amarelo nas Figura 34 (a,b) indica que as imagens mostram regiões distintas de um mesmo túbulo (à esquerda do asterisco). Embora grandes extensões dos túbulos tenham sido expostas, não foi possível rastrear a presença das AgNPs em um único túbulo até que elas não fossem mais detectadas. Defeitos morfológicos microestruturados causados pela ruptura da amostra interferiram na continuidade dos túbulos expostos, como indicado pela seta vermelha na Figura 34b.

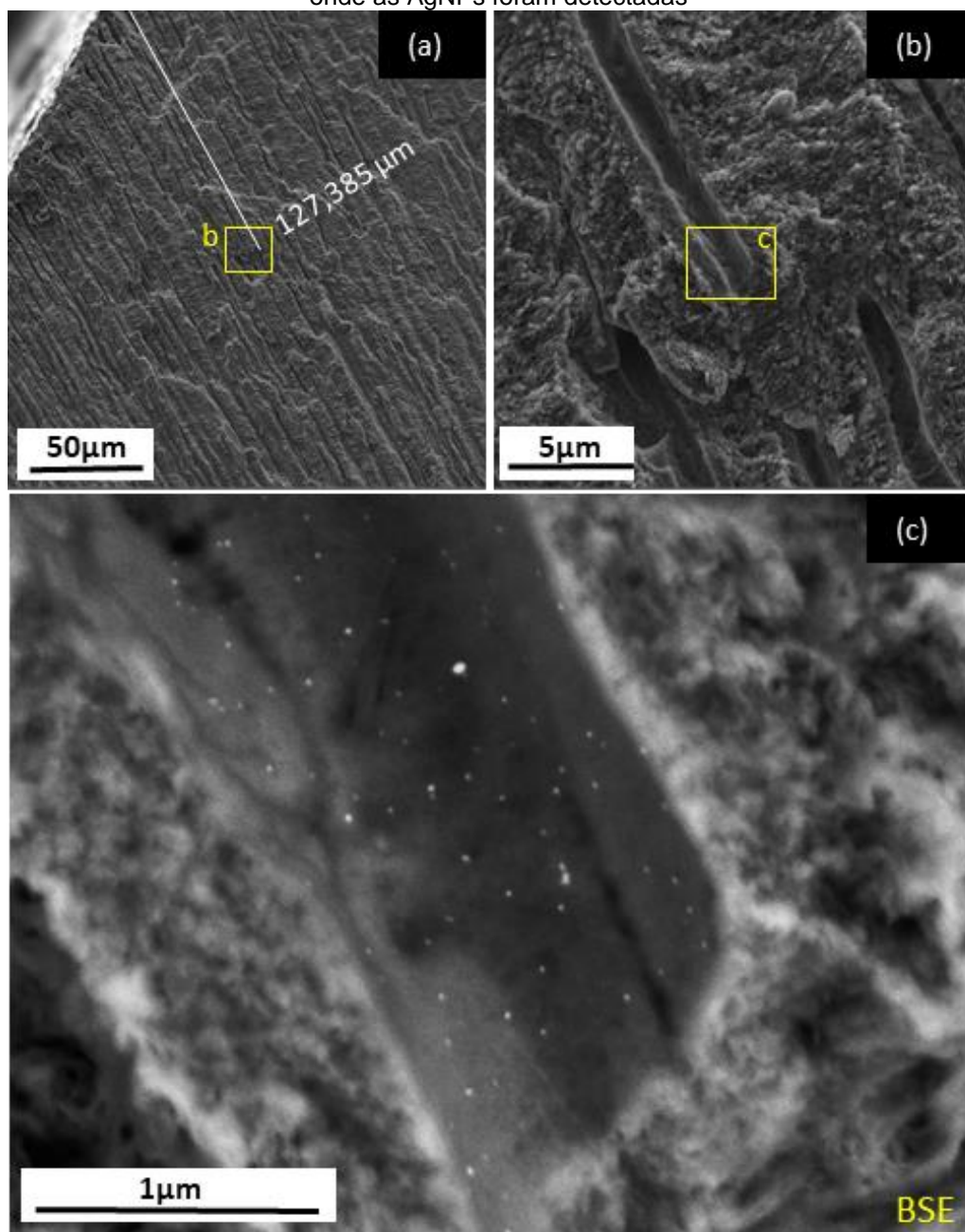
Figura 34 - MEV de secção transversal da amostra S1/03-C (a) Imagem de SE mostrando longas extensões de túbulos expostos desde a superfície; (b) Defeitos morfológicos causados pela ruptura das amostras, impedindo o rastreamento das AgNPs em um único túbulo; (c) AgNPs dispersas nas paredes internas de um túbulo



FONTE: A autora (2021)

A Figura 35 mostra a região tubular de maior profundidade onde as AgNPs foram detectadas na amostra S1/30-C. Embora a continuidade do túbulo tenha sido interrompida, não foram encontradas AgNPs em áreas pertencentes a outros túbulos localizados abaixo desta região. A distância da região até a superfície da amostra foi medida conforme indicado na Figura 35a (127,385 µm de profundidade).

Figura 35 – MEV de secção transversal da amostra S1/03-C. (a,b) Imagens de SE; (c) Imagem de BSE; com magnificação crescente mostrando a região de maior profundidade onde as AgNPs foram detectadas

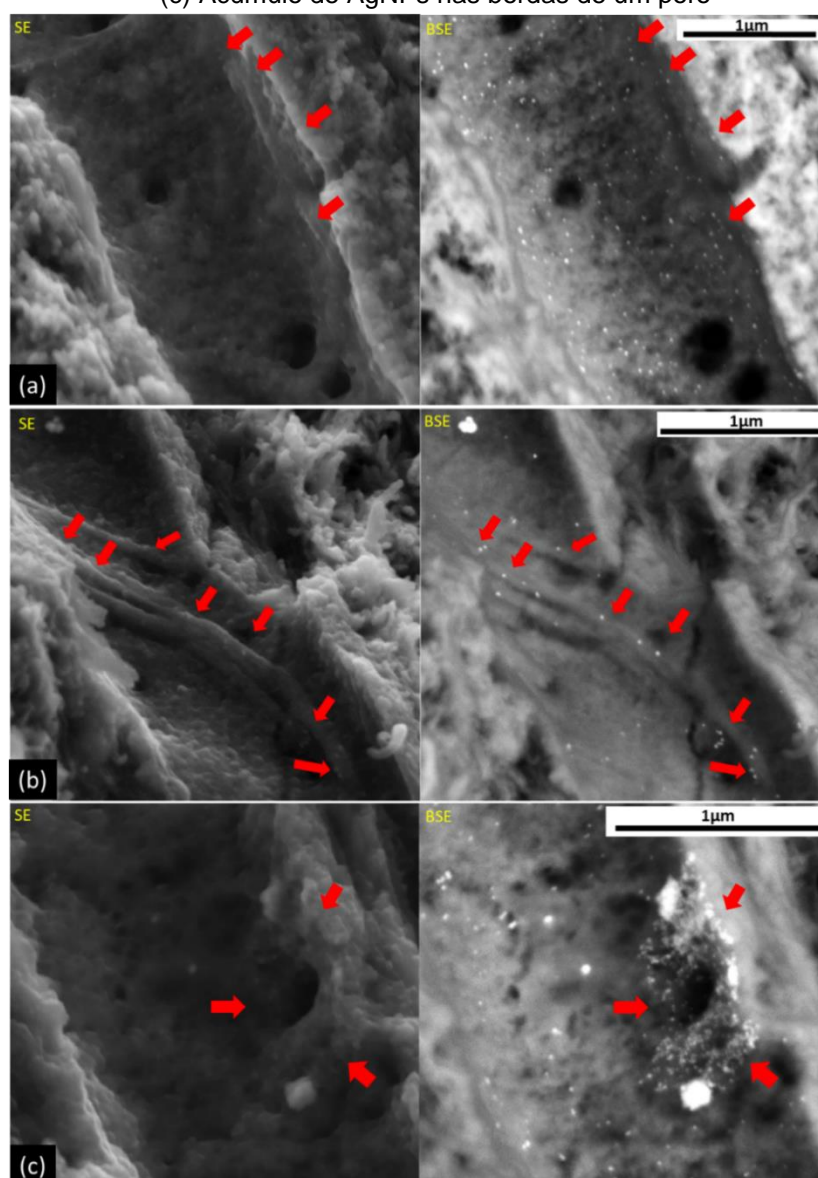


FONTE: A autora (2021)

A Figura 36 mostra outras regiões intratubulares da secção transversal da amostra S1/03-C. Imagens de SE são mostradas à esquerda enquanto imagens de BSE da região correspondente são mostradas à direita. Através da comparação entre os dois tipos de imagem, é possível combinar as informações obtidas pelo contraste de topografia com as do contraste de composição.

Utilizando esse artifício para interpretação da Figura 36a, observam-se partículas fixadas às partes laterais da secção côncava do túbulo (setas vermelhas). Isso sugere que o perfil de dispersão das AgNPs na área observada pode ser extrapolado para toda a área superficial interna do túbulo cilíndrico. Já na Figura 36b, as AgNPs se mostram distribuídas em um perfil que acompanha a extensão de fibras de colágeno aparentes, parecendo estar depositadas sobre a sua superfície. Na Figura 36c, AgNPs aparecem acumuladas nas bordas de um poro encontrado em uma parede vertical da secção côncava do túbulo.

Figura 36 - Áreas internas de túbulos expostos na secção transversal por ruptura de amostra S1/03-C. (a) AgNPs fixadas na parede vertical da secção tubular côncava; (b) AgNPs depositadas sobre fibra de colágeno; (c) Acúmulo de AgNPs nas bordas de um poro



FONTE: A autora (2021)

Os resultados apresentados na Figura 36 (a,b) sugere interações entre as superfícies das AgNPs e da matriz colagenosa da dentina intratubular. Tais interações podem levar ao âncoramento das NPs durante o escoamento do coloide pelos túbulos. A Figura 36(c) sugere que a porosidade da dentina intratubular também pode ser um fator de retenção das NPs na região.

A análise de secções transversais das amostras de dentina fraturadas possibilitou detectar as AgNPs no interior dos túbulos dentinários, confirmando e caracterizando alguns aspectos de sua penetração. No entanto, o objetivo de comparar efeitos do tamanho das NPs e do tempo de tratamento na profundidade de penetração não foi alcançado através desse método.

A geração de defeitos morfológicos e fragmentos residuais durante o processo de ruptura não permitiu uma boa observação dos túbulos para todas as amostras estudadas. Além disso, a falta de controle da região superficial onde a ruptura é induzida reduz a probabilidade de acessar o interior de túbulos que estavam abertos na superfície onde o coloide foi aplicado. Para aumentar essa probabilidade, faz-se necessário dispor de um alto quantitativo de amostras, o que é difícil no caso de dentes humanos, ou aumentar o nível de exposição dos túbulos na superfície exposta.

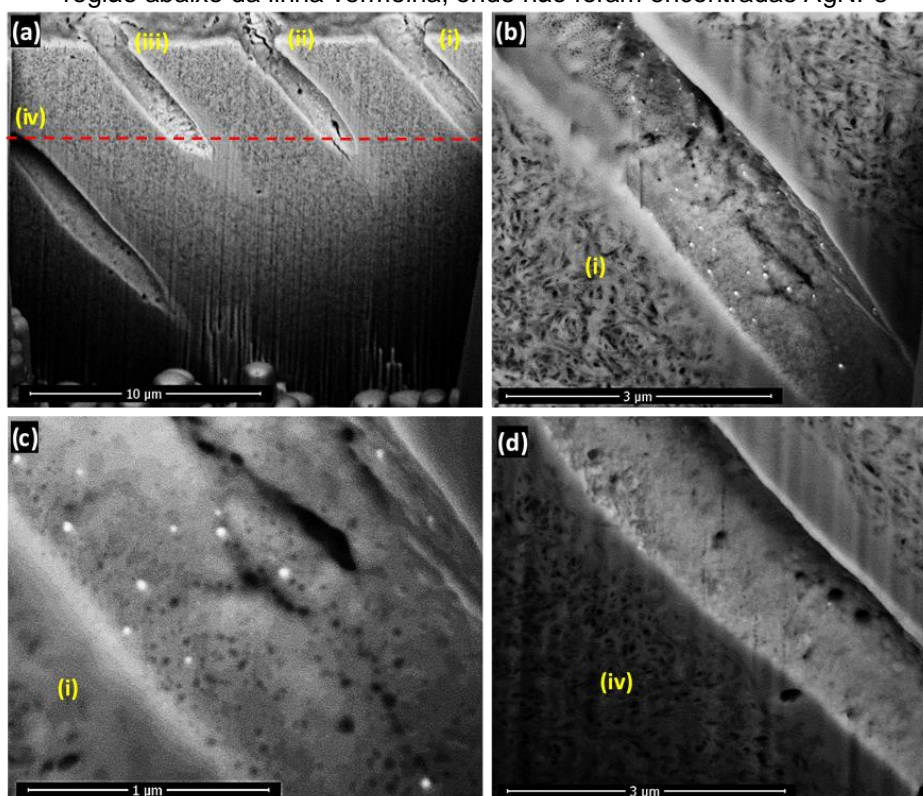
A metodologia de preparo de amostra que levou aos melhores resultados em relação à análise da secção transversal envolveu a desmineralização da superfície dentinária com ácido cítrico, antes do tratamento com AgNPs. Porém, esse procedimento também provoca a desmineralização da dentina intratubular (SAYED et al., 2019), que pode interferir na profundidade de penetração das AgNPs. Para aproximar o experimento da simulação de um tratamento clínico de caries dentinárias superficiais, para o qual a formulação de AgNPs foi desenvolvida (DOS SANTOS et al., 2014), o ideal seria evitar procedimentos de desmineralização agressiva.

Nesse contexto, utilizou-se FIB-MEV como método alternativo para acessar a região interna da dentina após o tratamento das superfícies com AgNPs. Por esse método, foram analisadas amostras dos grupos S1/03, S1/30 e S2/30 (nomenclatura seguindo o padrão: coloide aplicado / tempo de tratamento em minutos). A preparação das superfícies das amostras antes do

tratamento com os coloides seguiu a metodologia A descrita na seção 3.3.1, sem a indução de desmineralização.

A Figura 37 mostra os resultados de FIB-MEV para uma amostra do grupo S1/03. As imagens de MEV do interior da cavidade criada pelo FIB são formadas apenas por sinais de BSE, para identificação das AgNPs e também para evitar efeitos de carregamento, uma vez que apenas as superfícies das amostras foram revestidas por carbono. Quatro túbulos diferentes foram expostos na secção transversal obtida (Figura 37a). Foram detectadas AgNPs distribuídas uniformemente pelas paredes dos túbulos (Figura 37b), em concordância com o padrão observado para a amostra S1/03-C, na análise de MEV da secção transversal obtida por ruptura. Os tamanhos e formas das partículas identificadas condizem com às do coloide S1 (Figura 37b). A presença das AgNPs nos túbulos foi rastreada até a região limitada pela linha vermelha na Figura 37a. A profundidade de penetração das AgNPs calculada para essa amostra foi de 4,9 μm .

Figura 37 - Resultados de FIB-MEV para amostra S1/03. (a) Secção transversal da dentina obtida pela ação do FIB, revelando o interior de quatro túbulos dentinários; (b,c) AgNPs detectadas nas paredes dos túbulos; (d) região abaixo da linha vermelha, onde não foram encontradas AgNPs

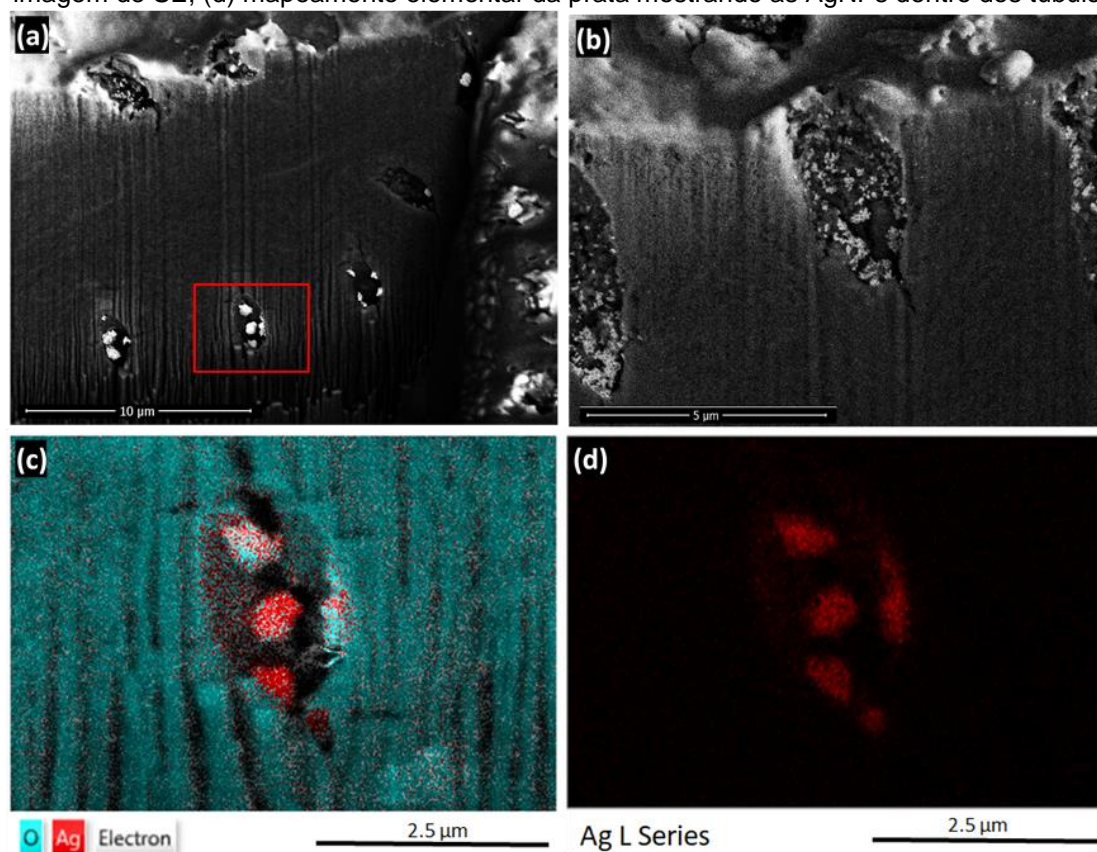


FONTE: A autora (2021)

Na Figura 38 estão apresentados os resultados de FIB-MEV para uma amostra do grupo S1/30. Os três túbulos expostos no início do processo de desbastamento apresentaram uma grande quantidade de AgNPs próxima à superfície, com nanopartículas agregadas (Figura 38b). Como pode ser observado na Figura 38a, a secção transversal obtida no final do processo de desbastamento não expôs extensões contínuas dos túbulos dentinários, como nas outras amostras. Não foi possível rastrear a presença das AgNPs observadas na superfície até a definição de um limite. Ainda assim, aglomerados de AgNPs foram detectados em secções tubulares a uma profundidade de 17 μm , indicando que o alcance das partículas nessa amostra foi maior do que na amostra S1/03.

A secção transversal obtida para essa amostra também foi analisada por EDS. Os mapas elementares apresentados na Figura 38(c,d) mostram a distribuição de Oxigênio (azul) e Prata (vermelho) na região correspondente ao retângulo vermelho da Figura 38a. Esse resultado confirma que as partículas aglomeradas detectadas 17 μm abaixo da superfície dentinária correspondem às AgNPs que penetraram nos túbulos.

Figura 38 – Resultados de FIB-MEV e EDS para amostra S1/30. (a) Secção transversal da dentina, obtida por FIB, mostrando aglomerados de AgNPs no interior dos túbulos; (b) Região interna dos túbulos próxima à superfície, mostrando a penetração de AgNPs com formação de aglomerados; (c) mapeamento elemental do oxigênio (azul) e prata (vermelho) sobrepostos à imagem de SE; (d) mapeamento elemental da prata mostrando as AgNPs dentro dos túbulos



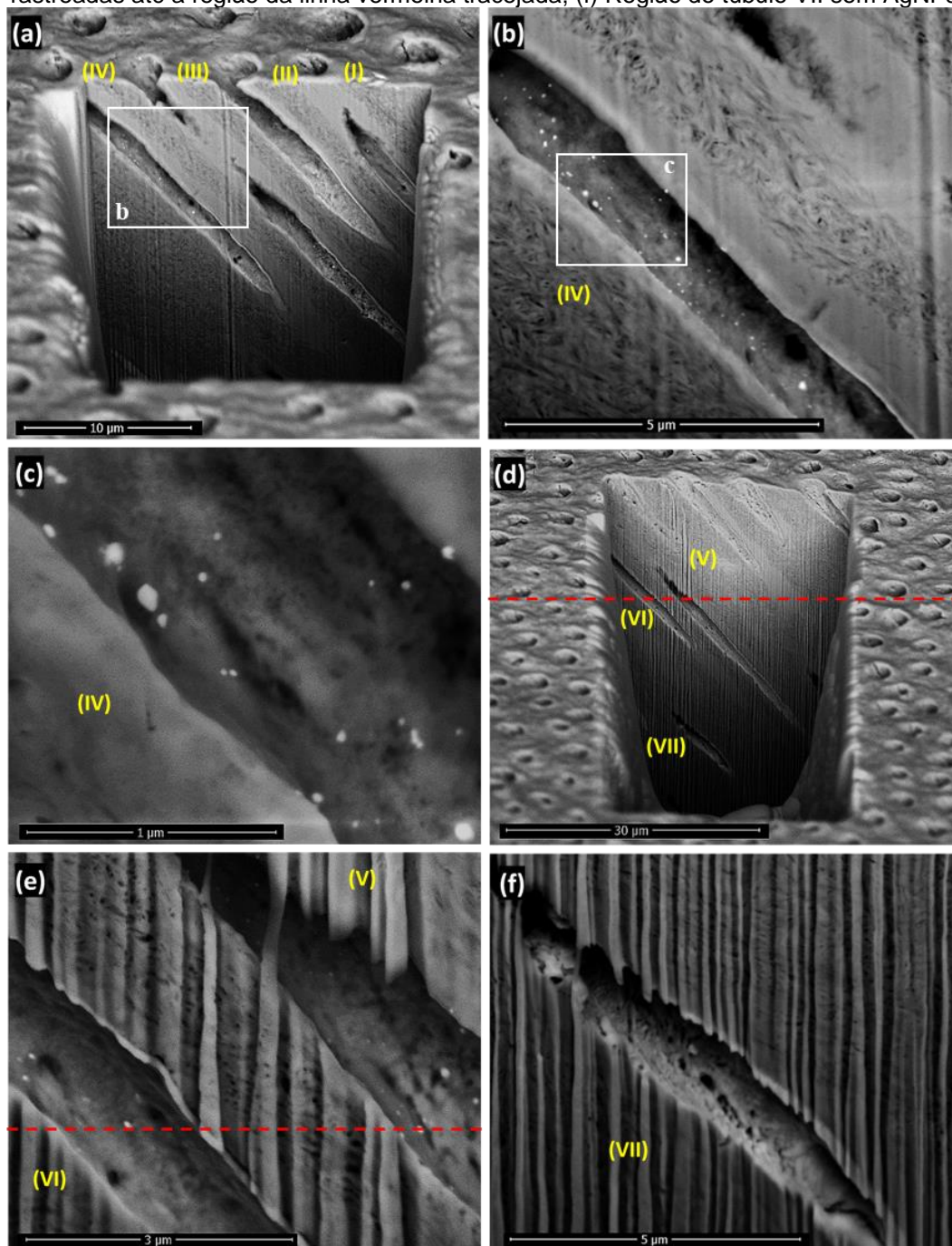
FONTE: A autora (2021)

Na Figura 39 estão apresentados os resultados obtidos para uma amostra do grupo S2/30. A Figura 39a ilustra o desbastamento do tipo trincheira criado pelo FIB a partir da superfície da amostra. Inicialmente, quatro túbulos dentinários foram expostos pela secção transversal, revelando AgNPs distribuídas uniformemente ao longo de suas paredes internas (Figura 39b). As partículas detectadas no interior dos túbulos desta amostra apresentam morfologias e tamanhos condizentes com às AgNPs do coloide S2 (Figura 39c).

Um segundo processo de desbastamento foi realizado na mesma cavidade para acessar áreas mais profundas dos túbulos. AgNPs também foram identificadas na nova região revelada, porém em menor quantidade. A presença das AgNPs nos túbulos identificados como (V) e (VI) foi rastreada até a região limitada pela linha vermelha tracejada na Figura 39(d,e). Também não foram

detectadas AgNPs na região (VII) (Figura 39f), que pertence a outro túbulo e está localizada abaixo da linha tracejada vermelha, reforçando a inferência de que as AgNPs não penetraram além desse limite. A profundidade de penetração calculada para a amostra S2/30 a partir desses resultados foi de 8,3 μm .

Figura 39 - Resultados de FIB-MEV para amostra S2/30. (a) Secção transversal da dentina obtida pelo desbastamento por íons Ga^+ , em forma de trincheira; (b, c) AgNPs distribuídas na dentina intratubular; (d, e) As NPs detectadas no interior dos túbulos V e VI foram rastreadas até a região da linha vermelha tracejada; (f) Região do túbulo VII sem AgNPs



FONTE: A autora (2021)

As medidas de FIB-MEV permitiram a identificação e o rastreamento das AgNPs no interior dos túbulos a partir da superfície da dentina, em amostras dos três grupos experimentais. Apesar de apresentar limitações em relação à amplitude da área observada, a obtenção de secções transversais por FIB foi vantajosa devido ao alto nível de controle alcançado pelo método. O baixo volume de interação entre a superfície da amostra e o feixe de íons garante grande precisão de corte, pois permite a remoção de volumes muito pequenos de material a uma taxa relativamente elevada (PHANEUF, 1999; VOLKERT et al., 2007). Dessa forma, regiões internas dos túbulos dentinários foram acessadas sem geração de detritos ou defeitos morfológicos prejudiciais à visualização da região de interesse.

Além disso, as ações simultâneas dos feixes de íons e de elétrons permitem visualizar o processo de desbastamento em tempo real e alta resolução de imagem. Assim, foi possível escolher a região da superfície a ser seccionada, a partir da identificação prévia de túbulos expostos, evitando observar áreas em que as AgNPs não teriam possibilidade de penetração. Além disso, foram escolhidas regiões cujos diâmetros médios de abertura dos túbulos eram semelhantes entre os grupos experimentais, para eliminar a possível influência desse fator nas profundidades de penetração investigadas.

A identificação das AgNPs simultânea à obtenção das secções transversais verticais também pode indicar uma boa adesão das NPs à superfície das paredes tubulares, onde elas foram detectadas. Caso contrário, as partículas poderiam ter se desprendido dos túbulos enquanto parte de suas paredes eram removidas pela ação do feixe iônico, considerando as condições de baixa pressão da câmara do microscópio.

A Tabela 12 resume os principais resultados das medidas de FIB-MEV. Também são reapresentados os parâmetros do tratamento aplicado às amostras, a fim de analisar sua influência na profundidade de penetração das partículas.

Tabela 12 - Resultados das medidas de FIB-MEV referentes à penetração de AgNPs nos túbulos dentinários e outras informações pertinentes

Grupo	S1/03	S1/30	S2/30
Tamanho das NPs (nm) *	7,5 ± 3.4	7,5 ± 3.4	24,3 ± 11,3 (e)* 33,8 ± 13,0 (t) 40,1 ± 12,5 (b)
Tempo de tratamento (min)	3	30	30
Ângulo de contato coloide/dentina (°)	54,15 ± 8,97	54,15 ± 8,97	51,74 ± 9,04
Diâmetro médio dos túbulos (µm)	2,2 ± 0,4	2,3 ± 0,3	2,2 ± 0,4
Condição das NPs no interior dos túbulos	Dispersas	Agregadas	Dispersas
Profundidade de penetração (µm)	4,9	> 17,1	8,3

* (e) = esferas; (t) = triângulos; (r) = bastonetes (axial)

FONTE: A autora (2021)

A partir do exposto na Tabela 12, pode-se fazer as seguintes observações:

- (i) A profundidade de penetração das AgNPs nos túbulos dentinários foi maior para tempos de tratamentos mais longos (S1/03 vs. S1/30);
- (ii) Quanto menores as NPs, mais profunda é a sua penetração (S1/30 vs. S2/30);
- (iii) Ocorreu agregação quando AgNPs menores foram aplicadas por 30 min.

A penetração e fixação das AgNPs nos túbulos dentinários, que foi demonstrada neste trabalho, pode ser de grande importância para justificar a eficácia de longo prazo das AgNPs na paralisação de caries. A ação bactericida das AgNPs se deve principalmente aos íons Ag^+ liberados a partir da oxidação dos átomos superficiais. Esse processo geralmente ocorre de forma controlada, a uma taxa lenta e constante (MISRA et al., 2012) Portanto, ao penetrar e

impregnar a região sub-superficial da dentina intratubular, as AgNPs podem promover proteção antibacteriana duradoura ao tecido.

A taxa de dissolução das AgNPs depende de características da nanopartícula e do meio. (MISRA et al., 2012) Uma taxa de dissolução de $0,15 \mu\text{mol.h}^{-1}$ foi relatada para AgNPs esféricas estabilizados com PVP com diâmetros médios de 7,6 nm, em um meio contendo cisteína e NaNO_3 (GONDIKAS et al., 2012) Isso pode ser considerado uma aproximação razoável para as AgNPs na amostra de coloide S1 descrita neste trabalho, uma vez que os tamanhos das partículas, que é um fator determinante para as taxas de dissolução de AgNP, são comparáveis (MISRA et al., 2012). Além disso, a presença de cisteína pode, de forma bastante simplificada, representar as proteínas presentes no fluido e nas paredes dos túbulos dentinários (LOVE; JENKINSON, 2002; NASCIMENTO et al., 2011)

Estudos *in vitro* e *in situ* reportam que, quando a cárie atinge o nível da dentina e expõe os túbulos dentinários, diversas espécies bacterianas são capazes de invadir os túbulos, alcançando centenas de microns. Esse processo leva rapidamente ao agravamento das lesões. Profundidades de penetração de $382,3 \pm 156,9 \mu\text{m}$ foram relatadas para *Streptococcus sanguis* e $25,9 \pm 21 \mu\text{m}$ para *Prevotella intermedia* após incubação por 20 dias (BERKITTEN; OKAR; BERKITTEN, 2000) Estudos semelhantes com *S. mutans*, *Lactobacillus acidophilus* e *Enterococcus faecalis* incubados por 30 dias, reportaram penetrações de até $500 \mu\text{m}$ (TASANARONG et al., 2016)

O mecanismo de invasão bacteriana relatado para algumas bactérias, especialmente estreptococos orais, se inicia através do reconhecimento de fibras de colágeno nas paredes dos túbulos pelas células da bactéria. Os polipeptídeos do antígeno I / II produzidos pelas espécies bacterianas promovem sua adesão inicial às fibras de colágeno. Então, o crescimento e o metabolismo bacteriano auxiliam na desmineralização localizada com liberação simultânea de peptídeos de colágeno. A presença desses peptídeos estimula a produção adicional de polipeptídeos do antígeno I / II, o que aumenta a adesão das células bacterianas às paredes dos túbulos, permitindo a formação de biofilmes (LOVE; JENKINSON, 2002) O mecanismo de invasão bacteriana descrito por Love e Jenkinson (2002) é altamente dependente de interações superficiais entre as

células bacterianas e a matriz colagenosa da dentina. Portanto, se as fibras de colágeno da dentina intratubular sub-superficial, onde o ataque bacteriano se inicia, estiver impregnada com AgNPs liberando íons Ag^+ a uma taxa constante, pode-se esperar que esse processo seja restringido.

Os parâmetros do tratamento aplicado ao grupo S1/03 (coloide de AgNP e tempo de exposição) foram semelhantes aos procedimentos clínicos utilizados por Dos Santos et al. (2014). A quantidade de AgNPs por área de túbulo na amostra S1/03 foi estimada a partir das imagens de MEV de 4,75 a 6,62 partículas· μm^{-2} . Se a densidade da prata volumar ($10,49 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$) for considerada para as AgNPs, a concentração de prata total em um túbulo pode ser calculada como 24,8 a 29,0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. A concentração de prata na concentração inibitória mínima (CIM) determinada por TARGINO et al., 2014) para o coloide S1 contra o *S. mutans* é de 0,01 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. Assim, é razoável supor que as doses de AgNP administradas aos túbulos no presente estudo seriam suficientes para inibir o crescimento bacteriano nessa região, ao menos para esta espécie.

Os resultados qualitativos deste trabalho referentes à penetração das AgNPs nos túbulos são suficientes para confirmar a hipótese investigada e discutir a possível associação desse fenômeno com a eficácia de longo prazo das AgNPs na paralisação de caries. Porém, a profundidade de penetração também é um aspecto importante a ser discutido, por se tratar de um fator de preocupação para a aplicação clínica. Os resultados do presente trabalho sugerem que a penetração das AgNPs se limita a regiões próximas à superfície onde o coloide foi aplicado, considerando o tempo de tratamento de 3 minutos. Uma baixa profundidade de penetração é desejável, pois diminui a probabilidade de contato com o tecido pulpar. Diferentemente da dentina e do esmalte, a polpa é um tecido sensível, suscetível a irritações ou infecções por contato com agentes externos, além de ser a região do dente que está ligada à corrente sanguínea e terminações nervosas. (MADEIRA, 2007)

WILLERSHAUSEN et al. (2015) relatou que o diamino fluoreto de prata (DFP) 38% pode penetrar os túbulos dentinários atingindo profundidades de 40 μm na dentina saudável (não desmineralizada). Esse resultado não é diretamente comparável com aqueles relatados no presente trabalho, visto que

metodologias diferentes foram empregadas. No entanto, uma penetração mais profunda do DFP pode ser esperada e justificada qualitativamente com base nos seguintes argumentos:

- (i) A estrutura moléculas do complexo de DFP é muito menor do que as AgNPs;
- (ii) O coloide de AgNP é mais viscoso do que o SDF 38%, que se trata de uma solução aquosa ($\eta=4,306$ cP e $0,8903$ cP, respectivamente, a 25°C). Portanto, seu escoamento pelos túbulos tende a ser mais lento;
- (iii) As moléculas de quitosana adsorvidas nas superfícies das AgNP podem desenvolver interações com as fibras de colágeno (HAJJ et al., 2019; RATH et al., 2016; SIONKOWSKA et al., 2004); Ou, ainda, as AgNPs podem ficar presas pela rugosidade na superfície das paredes dos túbulos, evitando uma penetração mais profunda.

Além de presumivelmente atingir menores profundidades do que o SDF, sendo, portanto, menos provável de atingir a polpa, a concentração total de prata no DFP 38% é de $255000\text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ (LEAL; TAKESHITA, 2018) pelo menos 425 vezes maior do que nos coloides de AgNP utilizados no presente estudo. Dessa concentração, grande parte da prata nas moléculas de DFP em solução é instantaneamente liberada na forma de íons Ag^+ (LEAL; TAKESHITA, 2018), em contraste com a lenta liberação de íons reportada para as AgNPs. A citotoxicidade dos íons Ag^+ para células humanas é significativamente maior do que a das AgNPs (CHI et al., 2018; VRCEK et al., 2014). Sendo assim, as doses de AgNPs administradas aos túbulos que foram estimadas para a amostra S1/03, combinada à taxa dissolução reportada por Gondikas et al (2012), indicam que a penetração das AgNPs nos túbulos seja inofensiva à saúde da polpa, em relação à penetração do DFP, mesmo que os íons liberados pelas NPs se difundam no fluido dentinário em direção ao tecido pulpar. É válido ressaltar que o uso do DFP para tratamento de hipersensibilidade dentinária é aprovado pela agência reguladora de alimentos e farmacêuticos dos Estados Unidos (FDA), desde 2014 (YU et al., 2018)

5 PERSPECTIVAS

- Investigar o mecanismo da ação inibitória das AgNPs na formação de biofilmes sobre o esmalte e a dentina, por Bio-AFM;
- Investigar os efeitos da formulação de AgNPs na remineralização da dentina seguindo um modelo microbiológico para a formação de caries artificiais;
- Investigar se as AgNPs ou íons Ag^+ podem chegar até a cavidade pulpar a partir da penetração de AgNPs nos túbulos dentinários;
- Investigar se a penetração de AgNPs na dentina, demonstrada neste trabalho, é capaz de inibir a invasão bacteriana nos túbulos dentinários.

6 CONCLUSÕES

Os resultados referentes à investigação da ação remineralizadora das AgNPs mostraram que a formulação foi eficaz em reduzir a lesão de cárie artificial, provavelmente devido à ação do NaF. Além disso, foi identificada a formação de cloreto de prata na dentina remineralizada, que pode ser importante como uma reserva de íons Ag^+ com ação bactericida para a região da dentina.

Em relação à investigação da penetração das AgNPs na dentina, sua presença foi detectada no interior dos túbulos dentinários pela análise de MEV. Além disso, a quantidade de AgNP observada permitiu estimar uma concentração de prata que seria suficiente para inibir a formação de biofilme de *s. mutans* na região subsuperficial da dentina. Esse resultado confirma uma premissa importante na justificativa proposta pelo nosso grupo para a eficácia duradoura das AgNPs na paralisação de lesões de caries.

Os resultados também indicaram uma dependência da profundidade de penetração com o tempo de tratamento e o tamanho de partícula e apontam para um risco reduzido de as AgNPs atingirem a parte vascularizada do dente, o que é bastante relevante do ponto de vista da aplicação clínica.

REFERÊNCIAS

ABUBACKER, M. N.; SATHYA, C. Synthesis of silver nanoparticles from plant chewing sticks and their antibacterial activity on dental pathogen. **British Biomedical Bulletin**, v. 3, n. 1, p. 81–93, 2015.

BERKITEN, M.; OKAR, I.; BERKITEN, R. In Vitro study of the penetration of *Streptococcus sanguis* and *Prevotella intermedia* strains into human dentinal tubules. **Journal of Endodontics**, v. 26, n. 4, p. 236–239, 2000.

BESINIS, A.; DE PERALTA, T.; HANDY, R. D. The antibacterial effects of silver, titanium dioxide and silica dioxide nanoparticles compared to the dental disinfectant chlorhexidine on *Streptococcus mutans* using a suite of bioassays. **Nanotoxicology**, v. 8, n. 1, p. 1–16, 2014.

BESINIS, A.; VAN NOORT, R.; MARTIN, N. The use of acetone to enhance the infiltration of HA nanoparticles into a demineralized dentin collagen matrix. **Dental Materials**, v. 32, n. 3, p. 385–393, 2016.

BEYENE, H. D. et al. Synthesis paradigm and applications of silver nanoparticles (AgNPs), a review. **Sustainable Materials and Technologies**, v. 13, n. January, p. 18–23, 2017.

CASTELLANO, J. J. et al. Comparative evaluation of silver-containing antimicrobial dressings and drugs. **International Wound Journal**, v. 4, n. 2, p. 114–122, 2007.

CESAR, A.; ROSA, B. Aspectos microbiológicos da cárie dental. p. 239–252, 2005.

CHALLA KUMAR (ED.). **Metallic Nanomaterials**. [s.l: s.n.].

CHI, Z. et al. In vitro assessment of the toxicity of small silver nanoparticles and silver ions to the red blood cells. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 32, p. 32373–32380, 2018.

DELGADO, J. M. F. Preparação e caracterização de nanotransportadores (nanocápsulas, nanoesferas, lipossomas e transportadores lipídicos nanoestruturados) sem substância ativa. **Instituto Politécnico de Bragança**, p. 1–117, 2013.

DOS SANTOS JUNIOR, V. E. et al. Antimicrobial activity of silver nanoparticle colloids of different sizes and shapes against *Streptococcus mutans*. **Research on Chemical Intermediates**, v. 43, n. 10, p. 5889–5899, 2017.

DOS SANTOS, V. E. et al. A new “silver-Bullet” to treat caries in children - Nano Silver Fluoride: A randomised clinical trial. **Journal of Dentistry**, v. 42, n. 8, p. 945–951, 2014.

DUNCAN SHAW. **Introduction to Colloid and Surface Chemistry**. 4th ed. Oxford; Boston: Butterworth-Heinemann, 1992.

DUPAS, C.; HOUDY, P.; LAHMANI, M. **Nanoscience: Nanotechnologies and nanophysics**. [s.l.] Springer, 2007.

EBRAHIMINEZHAD, A. et al. Chemical and Biological Approaches for the Synthesis of Silver Nanoparticles; A mini Review. **Trends in Pharmacheutical Science**, v. 3, n. 2, p. 55–62, 2017.

EMMANUEL, R. et al. Antimicrobial efficacy of green synthesized drug blended silver nanoparticles against dental caries and periodontal disease causing microorganisms. **Materials Science and Engineering C**, v. 56, n. 1, p. 374–379, 2015.

FEHRENBACH, M. J. .; POPOWICS, T. **Illustrated Dental Embryology, Histology, and Anatomy**. 4th. ed. [s.l.] Elsevier, 2016.

FLORES, M. A. P. **Síntese e Caracterização de Nanopartículas de Prata para Tratamento de Lesões de Cáries Síntese e Caracterização de Nanopartículas de Prata para Tratamento de Lesões de Cáries**. [s.l.: s.n.].

FREIRE, P. L. L. et al. Action of silver nanoparticles towards biological systems: Cytotoxicity evaluation using hen's egg test and inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm formation. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 45, n. 2, p. 183–187, 2015.

GAKIYA-TERUYA, M.; PALOMINO-MARCELO, L.; RODRIGUEZ-REYES, J. Synthesis of Highly Concentrated Suspensions of Silver Nanoparticles by Two Versions of the Chemical Reduction Method. **Methods and Protocols**, v. 2, n. 1, p. 3, 2018.

GONDIKAS, A. P. et al. Cysteine-induced modifications of zero-valent silver nanomaterials: Implications for particle surface chemistry, aggregation, dissolution, and silver speciation. **Environmental Science and Technology**, v. 46, n. 13, p. 7037–7045, 2012.

HAJJI, S. et al. Biomedical potential of chitosan-silver nanoparticles with special reference to antioxidant, antibacterial, hemolytic and in vivo cutaneous wound healing effects. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1863, n. 1, p. 241–254, 2019.

HYNING, D. L. VAN; ZUKOSKI, C. F. Formation Mechanisms and Aggregation Behavior of Borohydride Reduced Silver Particles. n. 20, p. 7034–7046, 1998.

INBAKANDAN, D. et al. Ultrasonic-assisted green synthesis of flower like silver nanocolloids using marine sponge extract and its effect on oral biofilm bacteria and oral cancer cell lines. **Microbial Pathogenesis**, v. 99, p. 135–141, 2016.

ION, F.; SYSTEMS, B. An Introduction to Electron Microscopy. 2000.

KUMAR, C. S. S. R. (ED.). **Metallic Nanomaterials**. [s.l.] WILEY-VCH, 2009.

LE OUAY, B.; STELLACCI, F. Antibacterial activity of silver nanoparticles: A surface science insight. **Nano Today**, v. 10, n. 3, p. 339–354, 2015.

LEAL, S. C.; TAKESHITA, E. M. (EDS.). **Pediatric restorative dentistry**. Brasilia: Springer International Publishing AG, 2018.

LISTL, S. et al. Global economic impact of dental diseases. **Journal of Dental Research**, v. 94, n. 10, p. 1355–1361, 2015.

Livro de microscopia dos materiais.pdf. , [s.d.].

LOVE, R. M. et al. Coinvasion of dentinal tubules by *Porphyromonas gingivalis* and *Streptococcus gordonii* depends upon binding specificity of streptococcal antigen I/II adhesin. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 3, p. 1359–1365, 2000.

LOVE, R. M.; JENKINSON, H. F. **Invasion of dentinal tubules by oral bacteria** *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*, 2002.

MADEIRA, M. C. **Anatomia do dente**. 5th. ed. São Paulo: Sarvier, 2007.

MARQUEZAN, M. et al. Artificial methods of dentine caries induction: A hardness and morphological comparative study. **Archives of Oral Biology**, v. 54, n. 12, p. 1111–1117, 2009.

MEHR, F. P.; KHANJANI, M.; VATANI, P. Synthesis of nano-Ag particles using sodium borohydride. **Oriental Journal of Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 1831–1833, 2015.

MEI, M. L. et al. Inhibitory effect of silver diamine fluoride on dentine demineralisation and collagen degradation. **Journal of Dentistry**, v. 41, n. 9, p. 809–817, 2013.

MEI, M. L. et al. Formation of Fluorohydroxyapatite with Silver Diamine Fluoride. **Journal of Dental Research**, v. 96, n. 10, p. 1122–1128, 2017.

MEI, M. L.; LO, E. C. M.; CHU, C. H. Arresting Dentine Caries with Silver Diamine Fluoride: What's Behind It? **Journal of Dental Research**, v. 97, n. 7, p. 751–758, 2018.

MERCHANT, G. J.; KELLER, J. B. Contact angles. **Physics of Fluids A**, v. 4, n. 3, p. 477–485, 1992.

MISRA, S. K. et al. The complexity of nanoparticle dissolution and its importance in nanotoxicological studies. **Science of the Total Environment**, v. 438, p. 225–232, 2012.

MORONES, J. R. et al. The bactericidal effect of silver nanoparticles. **Nanotechnology**, v. 16, n. 10, p. 2346–2353, 2005.

NASCIMENTO, F. D. et al. Cysteine cathepsins in human carious dentin. **Journal of Dental Research**, v. 90, n. 4, p. 506–511, 2011.

NEEL, E. A. A. et al. Demineralization–remineralization dynamics in teeth and bone. **International Journal of Nanomedicine**, v. 11, p. 4743–4763, 2016.

NORONHA, V. T. et al. Silver nanoparticles in dentistry. **Dental Materials**, v. 33, n. 10, p. 1110–1126, 2017.

NUNES, M. C. P. et al. Contribuição do estudo do biofilme dentário para o tratamento das doenças periodontais. **J. Health Sci. Inst**, v. 25, n. 1, p. 55–61, 2007.

NUR, S. U. et al. Critical Parameters of Silver Nanoparticles (AgNPs) synthesized by sodium borohydride reduction. **Research Journal of Chemistry and Environment**, v. 22, n. Special issue II, p. 179–183, 2018.

PACIONI, N. L. et al. Synthetic Routes for the Preparation of Silver Nanoparticles - A Mechanistic Perspective. In: **Engineering Materials**. [s.l.] Springer International Publishing Switzerland, 2015. p. 13–46.

PANPALIYA, N. P. et al. In vitro evaluation of antimicrobial property of silver nanoparticles and chlorhexidine against five different oral pathogenic bacteria. **Saudi Dental Journal**, v. 31, n. 1, p. 76–83, 2019.

PAREEK, V.; GUPTA, R.; PANWAR, J. Do physico-chemical properties of silver nanoparticles decide their interaction with biological media and bactericidal action? A review. **Materials Science and Engineering C**, v. 90, p. 739–749, 2018.

PHANEUF, M. W. Applications of focused ion beam microscopy to materials science specimens. v. 30, p. 277–288, 1999.

PLOMP, M. et al. In vitro high-resolution structural dynamics of single germinating bacterial spores. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 23, p. 9644–9649, 2007.

POLTE, J. et al. Formation mechanism of colloidal silver nanoparticles: Analogies and differences to the growth of gold nanoparticles. **ACS Nano**, v. 6, n. 7, p. 5791–5802, 2012.

RAMANATHAN, S.; GOPINATH, S. C. B. Potentials in synthesizing nanostructured silver particles. **Microsystem Technologies**, v. 23, n. 10, p. 4345–4357, 2017.

RATH, G. et al. Collagen nanofiber containing silver nanoparticles for improved wound-healing applications. **Journal of Drug Targeting**, v. 24, n. 6, p. 520–529, 2016.

SAYED, M. et al. Morphological and elemental analysis of silver penetration into sound/demineralized dentin after SDF application. **Dental Materials**, v. 35, n. 12, p. 1718–1727, 2019.

SEZEN, M. et al. Micro and nanostructural analysis of a human tooth using correlated focused ion beam (FIB) and transmission Electron microscopy (TEM) investigations. **Micron**, v. 115, n. August, p. 17–24, 2018.

SIONKOWSKA, A. et al. Molecular interactions in collagen and chitosan blends. **Biomaterials**, v. 25, n. 5, p. 795–801, 2004.

SONDI, I.; SALOPEK-SONDI, B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: A case study on E. coli as a model for Gram-negative bacteria. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 275, n. 1, p. 177–182, 2004.

STAUFFACHER, S. et al. Bacterial invasion into radicular dentine—an in vitro study. **Clinical Oral Investigations**, v. 21, n. 5, p. 1743–1752, 2017.

SURESH, A. K. et al. Silver nanocrystallites: Biofabrication using shewanella oneidensis, and an evaluation of their comparative toxicity on gram-negative and gram-positive bacteria. **Environmental Science and Technology**, v. 44, n. 13, p. 5210–5215, 2010.

TARANNUM, N.; GAUTAM, Y. K. Facile green synthesis and application of silver nanoparticles : a state-of-the-art review. p. 34926–34948, 2019.

TARGINO, A. G. R. et al. An innovative approach to treating dental decay in children. A new anti-caries agent. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 25, n. 8, p. 2041–2047, 2014.

TASANARONG, P. et al. Reduction of viable bacteria in dentinal tubules treated with a novel medicament (Z-Mix). **Journal of Dental Sciences**, v. 11, n. 4, p. 419–426, 2016.

TERSARIOL, I. L. et al. Cysteine Cathepsins in Human Dentin-Pulp Complex. **Journal of Endodontics**, v. 36, n. 3, p. 475–481, 2010.

THANH, N. T. K.; MACLEAN, N.; MAHIDDINE, S. Mechanisms of nucleation and growth of nanoparticles in solution. **Chemical Reviews**, v. 114, n. 15, p. 7610–7630, 2014.

VIEIRA COSTA E SILVA, A. et al. In Vitro morphological, optical and microbiological evaluation of nanosilver fluoride in the remineralization of deciduous teeth enamel. **Nanotechnology Reviews**, v. 7, n. 6, p. 509–520, 2018.

VOLKERT, C. A. et al. Focused Ion Beam Micromachining. v. 32, n. May, p. 389–399, 2007.

VRCEK, I. V. et al. Comparison of In Vitro Toxicity of Silver Ions and Silver Nanoparticles on Human Hepatoma Cells. **Environmental Toxicology**, 2014.

VYAS, N. et al. Penetration of sub-micron particles into dentinal tubules using ultrasonic cavitation. **Journal of Dentistry**, v. 56, p. 112–120, 2017.

WILLERSHAUSEN, I. et al. Penetration potential of a silver diamine fluoride solution on dentin surfaces. An ex vivo study. **Clinical Laboratory**, v. 61, n. 11, p. 1695–1701, 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Oral health**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/oral-health>>. Acesso em: 23 abr. 2020.

YIN, I. X. et al. Inhibition of dentine caries using fluoride solution with silver nanoparticles: An in vitro study. **Journal of Dentistry**, v. 103, 2020.

YU, O. Y. et al. Remineralisation of enamel with silver diamine fluoride and sodium fluoride. **Dental Materials**, v. 34, n. 12, p. e344–e352, 2018.

ZHAO, I. S. et al. Mechanisms of silver diamine fluoride on arresting caries: a literature review. **International Dental Journal**, v. 68, n. 2, p. 67–76, 2018.

ZHENG, K. et al. Antimicrobial silver nanomaterials. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 357, p. 1–17, 2018.