

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

CLARISSIANE SERAFIM CARDOSO

Síntese, Caracterização e Avaliação do potencial anticariogênico *in vitro* de Hidróxidos Duplos Lamelares Fluoretados (Mg, AI - F HDL)

Maceió

2018

CLARISSIANE SERAFIM CARDOSO

Síntese, Caracterização e Avaliação do potencial anticariogênico *in vitro* de Hidróxidos Duplos Lamelares Fluoretados (Mg, AI - F HDL)

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas, como um dos requisitos para obtenção do grau de mestre em Ciências da Saúde.

Orientador(a): Profa. Dra. Camila Braga Dornelas Coorientador(a): Prof. Dr. Fábio Correia Sampaio

Maceió 2018

Catalogação na fonte Universidade Federal de Alagoas Biblioteca Central

Bibliotecária Responsável: Janis Christine Angelina Cavalcante

C268s	Cardoso, Clarissiane Serafím. Síntese, caracterização e avaliação do potencial anticariogênico <i>in vitro</i> de hidróxidos duplos lamelares fluoretados (Mg, A1 – F HDL) / Clarissiane Serafím Cardoso 2018. 105 f.: il., grafs., tabs.
	Orientadora: Camila Braga Dornelas. Coorientador: Fábio Correia Sampaio. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Programa de Pós- Graduação em Ciências da Saúde, Maceió, 2018.
	Bibliografia: f. 88-100. Anexos: f. 101-105.
	1. Nanotecnologia. 2. Flúor. 3. Cárie dentária. I. Título.
	CDU: 616.314-002



Universidade Federal de Alagoas Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde ICBS - UTAL - Compus A. C. Sindes Av. Lourival Melo Mota, S/N Cidade Universitária - Maceló AL CEP: 57072-800 E-mail: ppgc590bgmail.com Fore: 82 3214 1850

Folha de Aprovação

Clarissiane Serafim Cardoso

Sintese, caracterização e avaliação microbiológica in vitro, de Hidróxidos Duplo Lamelares Fluoretados (Mg, AI-F HDL) visando a prevenção da cárie dentária

> Dissertação submetida ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas e aprovada em 23 de fevereiro de 2018.

Banca Examinadora

rof.* Dr.* Camila Braga Dornelas (Orientador)

10 102 /Prof. D4: Lucas Meili - [UFAL]

cooui Prof.[#] Dr.[#] Isabel Cristina Celerino de Moraes Porto - (UFAL)

Prof.* Dr.* Ana Lídia Soares Cota - (UNIT)

Dedico este trabalho aos meus pais Antonio Cardoso e Ana Serafim e ao meu esposo Luis Marinho, pelo incentivo, amor e companheirismo de sempre.

AGRADECIMENTOS

A DEUS e a Nossa Senhora, pelas constantes bênçãos; Aos meus pais, Ana e Antonio, pelo amor, incentivo e dedicação; A toda minha família, pela amizade, companheirismo e amor;

Ao meu esposo, Luis Marinho, pelo seu amor, carinho e respeito sempre dedicados a mim. Por me incentivar nos estudos, ensinando-me que as conquistas na vida são reflexos de bastante dedicação e esforços e por me proporcionar momentos inigualáveis e sempre muito felizes;

A minha orientadora Camila Braga Dornelas, por ter me oferecido a oportunidade de crescer cientificamente e por ter acreditado na minha vontade de fazer ciência. Agradeço pela confiança, atenção e dedicação na efetivação deste trabalho;

Ao meu coorientador Fábio Correia Sampaio do Laboratório de Biologia Bucal (LABIAL/UFPB), por toda ajuda e dedicação para a construção deste estudo;

A todos os colegas dos Laboratórios da UFAL e da UFPB que contribuíram de alguma maneira para meu crescimento pessoal e profissional;

Aos professores que sempre me acolheram e foram bem solícitos para esclarecer dúvidas e\ou ajudar no desenvolvimento do experimento: Irinaldo Diniz do Laboratório de Tecnologia e Controle de Medicamentos (ESENFAR/UFAL); Ticiano Gomes do Laboratório de Análises Farmacêuticas e Alimentícias (ESENFAR/UFAL); Josué Carinhanha do Laboratório de Desenvolvimento e Instrumentação em Química Analítica (IQB/UFAL); Rusiene Monteiro do Grupo de Catálise e Reatividade Química (IQB/UFAL); Cantídio Lima (técnico) do Laboratório de Controle de Qualidade de Alimentos (FANUT/UFAL); Johnnatan Duarte do Instituto Federal de Alagoas (IFAL) e ao Alexandre Almeida Júnior (técnico) do Laboratório de Biologia Bucal (LABIAL/UFPB).

Ao CNPq, FAPEAL, FINEP e CAPES pelo apoio financeiro.

RESUMO

A cárie dentária é uma doença multifatorial que apresenta como principal agente etiológico a bactéria Streptococcus mutans. O flúor (F⁻), por sua vez, destaca-se na prevenção desta doença como remineralizante e antimicrobiano. Assim, a síntese de hidróxidos duplos lamelares fluoretados - Mg, Al – F HDL visa à possibilidade de reunir esses elementos, dispostos em lamelas de dimensões nanométricas, para avaliação do seu potencial anticariogênico. Objetivou-se, portanto, a síntese, caracterização e avaliação do potencial anticariogênico in vitro de hidróxidos duplos lamelares (HDLs) fluoretados (Mg, AI - F HDL) sobre S. mutans. A síntese dos produtos seguiu o método de troca iônica a partir de um HDL precursor contendo cloreto como ânion interlamelar (Mg, AI – CI HDL) em três variações: 1) micrométrico – grupo 1, 2) nanométrico suspensão coloidal – grupo 2 e 3) nanométrico pó resultante – grupo 3. Foram ainda analisados: tempo de agitação (2 e 24h) e temperatura (25 e 40°C), com obtenção dos seguintes produtos: Mg, AI – F HDL-F 2h25°C; Mg, AI – F HDL-F 24h25°C; Mg, AI – F HDL-F 2h40°C e Mg, AI – F HDL-F 24h40°C para cada grupo, totalizando 12 produtos. Precursores e produtos foram caracterizados de forma estrutural, térmica e morfológica. Para tanto, foram utilizadas as técnicas de espectrometria de fluorescência de raios X por energia dispersiva (EDX), difração de raios X (DRX), espectrometria de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), potenciometria com eletro íon-específico de flúor para quantificação do flúor total (HMDS), análise termogravimétrica (TGA) e microscopia eletrônica de varredura (MEV). Foi realizada a análise de cinética de liberação do fluoreto dos produtos tanto em pH 5,5 e 7,0 ao longo de 21 dias. A avaliação microbiológica seguiu-se através dos métodos de difusão em ágar e microdiluição em caldo e em ágar BHI utilizando cepas de S. mutans (ATCC 25175) em concentrações de 1000 e 200 µg/mL das soluções testadas. A avaliação estrutural confirmou a obtenção de produtos fluoretados com razão molar 3:1, cristalinos, com predominância de água e íons carbonato. As curvas de análise térmica revelaram produtos fluoretados mais estáveis em comparação aos HDLs precursores. As micrografias revelaram imagens de aglomerados irregulares, disformes e de aspecto foliar. Com relação à liberação de flúor, de modo geral, o meio ácido implicou em maiores valores de liberação desse íon e as curvas predominantes compreenderam perfis logarítmicos e dentre os produtos, destacou-se Mg, AI – F HDL-F 24h25°C do grupo 3, com 46,6 (pH 5,5) e 45,7% (pH 7,0) ao final do ensaio. Por fim, a avaliação microbiológica revelou ineficácia dos produtos frente ao S. mutans nas concentrações testadas. Tendo em vista o exposto, concluiu-se que houve êxito na obtenção dos HDLs fluoretados e que estes podem ser promissores como um novo agente em nanoescala a ser utilizado no controle da cárie dentária. Para isso, são necessárias avaliações acerca do potencial remineralizante e da atividade antimicrobiana em outras concentrações, com vistas em elucidar melhor sua ação.

Palavras-chave: nanotecnologia; argila; flúor; cárie dentária.

ABSTRACT

Dental caries is a multifactorial disease with S. mutans as the main etiological agent. Fluoride (F⁻), in turn, stands out in the prevention of this disease in a remineralizing and antimicrobial way. Thus, the synthesis of lavered double hydroxides fluoride - Mg. AI - F HDL aims at the possibility of combining these elements, arranged in nanoscale lamellae, to evaluate their anticariogenic potential. The aim of the present study was the synthesis, characterization, in vitro, and microbiological evaluation of layered double hydroxides (HDLs) fluoride (Mg, AI-F HDL), aiming the prevention of dental caries. The synthesis of these products followed the ion exchange method from a precursor HDL containing chloride as interlamellar anion (Mg, AI - CI HDL) in three variations: 1) micrometric – group 1, 2) nanometric colloidal suspension – group 2 and 3) nanometric resulting powder – group 3. The following parameters were analyzed: agitation time (2 and 24h) and temperature (25 and 40 ° C), obtaining the following products: Mg, AI - F HDL - F 2h25 ° C; Mg, AI-F HDL-F 24h25 ° C; Mg, AI - F HDL - F 2h40 °C and Mg, Al - F HDL - F 24h40 °C for each group, totaling 12 products. Precursors and products were characterized in structural, thermal and morphological form. The X-ray fluorescence spectrometry (EDX), X-ray diffraction (XRD), Fourier Transform Infrared Spectrometry (FTIR), fluorimetric electrophoresis potentiometry for quantification (HMDS), thermogravimetric analysis (TGA) and scanning electron microscopy. (SEM). The fluoride release kinetics of the products were performed at pH 5.5 and 7.0 over 21 days. The microbiological evaluation was followed by disc-diffusion methods in agar and microdilution in broth and agar using strains of S. mutans (ATCC 25175) at concentrations of 1000 and 200 µg/mL of the solutions tested. The structural evaluation confirmed the obtaining of fluoride products with a 3:1 molar ratio, crystalline, predominantly water and carbonate ions. Thermal analysis curves revealed more stable fluoride products compared to precursor HDLs. The micrographs revealed images of irregular, distorted and leafy clusters. In relation to the fluoride release, the acid medium generally implied higher ion release values and the predominant curves comprised logarithmic profiles and among the products, Mg, AI-F HDL-F 24h25 ° C of the group 3, with 46.6 (pH 5.5) and 45.7% (pH 7.0) at the end of the assay. Finally, the microbiological evaluation revealed inefficacy of the products against S. mutans at the concentrations tested. In view of the above, it was concluded that fluoridated HDLs were successful and they can be promising as a new nanoscale agent to be used in the control of dental caries. For this, assessments are required regarding the remineralizing potential and antimicrobial activity in other concentrations in order to better elucidate its action.

Keywords: nanotechnology; clay; fluorine; dental caries.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Tipos de nanosistemas lipídicos: (A) – lipossomas; (B) – nanopartículas lipídicas sólidas e (C) – micelas fosfolipídicas
Figura 2 - Tipos de nanosistemas poliméricos: (A) – nanopartículas poliméricas; (B) – micelas poliméricas e (C) – dendrímeros
Figura 3 - Alguns tipos de nanosistemas inorgânicos: (A) - nanopartícula de ouro; (B) -nanopartículas magnéticas; (C) nanotubo de carbono e (D) argila aniônica – HDL.19
Figura 4 - Ilustração esquemática dos fatores que determinam o desenvolvimento do processo carioso
Figura 5 - Cárie dentária22
Figura 6 - Estrutura esquemática da progressão da cárie sob influência do fluoreto.
Figura 7 - Estrutura esquemática da brucita e da hidrotalcita
Figura 8 - Organograma dos experimentos executados
Figura 9 – Fluxograma da formação dos produtos
Figura 10 - Difratograma dos HDLs precursores: A) Mg, AI - CI HDL micrométrico e B) Mg, AI – CI HDL nanométrico pó resultante
Figura 11 - Esquema do Mg, AI - CI HDL51
Figura 12 - Grupo 1: Difratogramas obtidos do HDL precursor micrométrico e dos produtos fluoretados: A) Em 2 horas de agitação; B) Em 24 horas de agitação; C) Em 25°C de temperatura e D) Em 40°C de temperatura
Figura 13 - Grupo 2: Difratogramas obtidos do HDL precursor nanométrico suspensão e dos produtos fluoretados: A) Em 2 horas de agitação; B) Em 24 horas de agitação; C) Em 25°C de temperatura e D) Em 40°C de temperatura
Figura 14 - Grupo 3: Difratogramas obtidos do HDL precursor nanométrico pó e dos produtos fluoretados: A) Em 2h de agitação; B) Em 24 horas de agitação; C) Em 25°C de temperatura e D) Em 40°C de temperatura
Figura 15 - Espectro de FTIR dos precursores: A) Mg, AI - CI HDL micrométrico e B) Mg, AI - CI HDL nanométrico pó resultante

Figura 17 - Grupo 2: Espectros de FTIR/KBr obtidos do HDL precursor nanométrico suspensão e dos produtos fluoretados: A) Em 2h de agitação; B) Em 24 horas de agitação; C) Em 25°C de temperatura e D) Em 40°C de temperatura......58

Figura 21 - Grupo 2: Curvas térmicas (TG/DTG) obtidas dos produtos fluoretados à partir do HDL precursor nanométrico suspensão. A) Produto 2h25°C; B) Produto 24h25°C; C) Produto 2h40°C e D) Produto 24h40°C......65

Figura 24 - Grupo 2: Curvas térmicas obtidas do HDL precursor nanométrico suspensão e dos produtos fluoretados: A) Em 2h de agitação; B) Em 24 horas de agitação; C) Em 25°C de temperatura e D) Em 40°C de temperatura......68

Figura 29 - Imagens de MEV para o grupo 2, em todas as condições. Em ampliação de 300x e 2000x74
Figura 30 - Imagens de MEV para o grupo 3, em todas as condições. Em ampliação de 300x e 2000x75
Figura 31 - Gráficos da cinética de liberação de flúor (F ⁻⁾ para o grupo 1, em todas as condições de síntese
Figura 32 - Gráficos da cinética de liberação de flúor (F ⁻) para o grupo 2, em todas as condições de síntese
Figura 33 - Gráficos da cinética de liberação de flúor (F ⁻) para o grupo 3, em todas as condições de síntese
Figura 34 - Microplaca de 96 poços com as amostras do experimento103

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estudos envolvendo nanotecnologia com foco na prevenção da cárie23
Tabela 2 - Recomendações de uso de fluoretos na odontologia. 24
Tabela 3 - Combinações de cátions bivalente e trivalente que podem compor aslamelas dos HDLs.29
Tabela 4 - Alguns ânions interlamelares que podem estar entre as lamelas de HDLs.
Tabela 5 - Ânions interlamelares e seus valores de espaçamento basal. 31
Tabela 6 - Tamanho médio, índice de polidispersão e potencial zeta dos HDLsprecursores nanométricos
Tabela 7 - Quantificação dos elementos presentes nos HDLs. 49
Tabela 8 - Concentração de F ⁻ dos HDLs fluoretados
Tabela 9 - Valores referentes a perda de massa dos HDLs a partir do TGA69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ATCC do inglês, American Type Culture Collection
- AUC do inglês, Area Under the Curve
- BHI do inglês, Brain Heart Infunsion
- CIM Concentração Inibitória Mínima
- DCL Dose certamente letal
- DRX Difração de Raios X
- DPT Dose Provavelmente Tóxica
- EDX do inglês, *Energy Dispersive X-ray Detector*
- EDL Espalhamento Dinâmico da Luz
- EGM Estreptococos do grupo *mutans*
- FTIR do inglês, Fourier Transform Infrared Spectroscopy
- HDL Hidróxido Duplo Lamelar
- HMDS Hexametildisiloxano
- MEV Microscopia Eletrônica de Varredura
- OMS Organização Mundial da Saúde
- TGA do inglês, Thermogravimetric Analysis
- TSAB do inglês, Total Ionic Strenght Adjustment Buffer
- UFC Unidade Formadora de Colônia

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	.16
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	.17
2.1	Nanotecnologia na saúde	.17
2.2	Cárie dentária	.20
2.2.1	A cárie dentária e a relação com o Streptococcus mutans	.20
2.2.2	O flúor e sua ação anticariogênica	.23
2.3	Argilas lamelares	.26
2.3.1	Hidróxidos duplos lamelares (HDL)	.27
3	OBJETIVOS	.32
3.1	Objetivo geral	.32
3.2	Objetivos específicos	.32
4	MATERIAL E MÉTODOS	.33
4.1	Delineamento do estudo	.33
4.2	Material	.34
4.3	Procedimentos da pesquisa	.35
4.3.1	Síntese dos HDLs	.35
4.3.1.1	Síntese do precursor: Mg, AI - CI HDL micrométrico	.37
4.3.1.2	Síntese do precursor: Mg, AI - CI HDL nanométrico	.37
4.3.1.3	Síntese dos produtos: Mg, AI - F HDL a partir de Mg, AI – CI HDL micrométr	rico .38
4.3.1.4	Síntese dos produtos: Mg, AI - F HDL a partir de Mg, AI – CI HDL nanométr	ico .38
4.3.2	Caracterização	.39
4.3.2.1	Caracterização estrutural	.39
4.3.2.2	Caracterização térmica	.42
4.3.2.3	Caracterização morfológica	.42
4.3.3	Cinética de liberação de F ⁻	.43
4.3.4	Avaliação microbiológica	.44

5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
5.1	Caracterização estrutural dos HDLs	48
5.2	Caracterização térmica dos HDLs	61
5.3	Caracterização morfológica dos HDLs	71
5.4	Cinética de liberação de F ⁻ dos HDLs fluoretados	76
5.5	Avaliação microbiológica	84
6	CONCLUSÃO	
	REFERÊNCIAS	89
	APÊNDICES	

1 INTRODUÇÃO

Ao longo dos anos, a nanotecnologia tem atraído o interesse da comunidade científica na busca por inovações tecnológicas através do desenvolvimento de materiais cada vez mais complexos e bem mais definidos. Para tal, os pesquisadores fazem uso de materiais em escala nanométrica, em que o prefixo "nano" significa em grego "anão" e um nanômetro significa a bilionésima parte do metro, ou ainda um milionésimo de um milímetro (BISPO, 2010; HUANG et al., 2008; LEDO; HOSSNE; PEDROSO, 2007).

Assim, esse ramo de estudo, de modo multidisciplinar permite através de uma grande quantidade de nanomateriais a utilização destes para diversos fins, como na indústria automobilística, na indústria têxtil, na área de cosméticos, na construção civil, na área da medicina, entre outros (LEDO; HOSSNE; PEDROSO, 2007). E dentre tantos materiais em nanoescala, a aplicabilidade na saúde ganha destaque com o uso de nanosistemas ou nanocarreadores, os quais se apresentam de diferentes formas e complexidades (HORTA, 2015). Logo, diante da vasta possibilidade de uso de nanocarreadores, como escolher o mais apropriado para alguma aplicação específica?

Na área odontológica, a aplicação da nanotecnologia abrange a prevenção, o diagnóstico e a terapêutica de doenças (MIRSASAANI et al., 2013; ALKAHTANI, 2018; PRIYADARSINI; MUKHERJEE; MISHRA, 2017; SCHMALZ et al., 2017). A cárie dentária, portanto, cujo principal agente etiológico é a bactéria *Streptococcus mutans,* é um problema de saúde pública que ainda afeta grande parte da população mundial e por esse motivo estudos que envolvem novas tecnologias e/ou novos materiais com propriedades antimicrobianas e remineralizantes visando à redução desta doença, ganham destaque na literatura (CASAGRANDE, 2010).

Nesse contexto, efeitos antibacterianos de metais, como a prata (Ag), o cálcio (Ca), o níquel (Ni), o zinco (Zn) e o alumínio (Al), já vêm sendo estudados contra o *S. mutans* (CASAGRANDE, 2010; SEVINÇ e HANLEY, 2010; WEIR; CHOW; XU, 2012). E, dentre os referidos elementos, a prata (Ag) e o níquel (Ni) já mostram resultados positivos contra esse microrganismo (CASAGRANDE, 2010).

Cabe ressaltar ainda que o íon fluoreto (F⁻) é reconhecido por ser o principal responsável pelo declínio da cárie dentária em países desenvolvidos e também no

Brasil atuando principalmente no processo de remineralização dentária (CARDOSO; REIS; SERRATINE, 2004; CASCAES et al., 2012; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011). O fluoreto é incorporado em diversas preparações farmacêuticas e cosméticas, a exemplo de dentifrício, gel, verniz e solução para bochecho (THEISS et al., 2014). Além disso, o flúor¹ também tem sido recomendado nas águas de abastecimento público desde a década de 70, por meio da Lei Federal nº 6.050 de 1974 e da Portaria do Ministério da Saúde nº 635 do ano seguinte, que estabeleceram os padrões para a operacionalização da medida, incluindo os limites recomendados para a concentração do fluoreto em razão da média das temperaturas diárias.

Porém, apesar de todo o esforço para reduzir a cárie dentária, ainda não há na literatura informação disponível a respeito do potencial antimicrobiano e remineralizante de cátions di e trivalentes associados ao ânion fluoreto frente ao principal microrganismo responsável por essa doença.

Com base no exposto e, diante da possibilidade de reunir em um mesmo composto cátions metálicos e o ânion de interesse, este trabalho propõe a preparação e caracterização de nanoestruturas de hidróxidos duplos lamelares (HDLs) fluoretados, visando à prevenção dessa patologia bucal.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Nanotecnologia na saúde

Atualmente, a nanotecnologia é uma das áreas mais promissoras de pesquisa, que vem sendo aplicada em diversos campos do conhecimento e, por conseguinte, tem trazido muita expectativa para ciência como um todo (BORSCHIVER et al., 2005; KHURSHID et al., 2015). Na saúde, grandes avanços já têm sido observados e prometem ser potencialmente fortes para revolucionar a saúde individual e coletiva no século XXI (ANTUNES et al., 2012).

Nesse contexto, as novas tecnologias têm acelerado demasiadamente a descoberta de compostos inovadores, com novas estratégias de processamento, estudo de rápido rastreio, além de possibilidade de baixo custo de produção, criando

¹ Forma genérica de denominação de íon fluoreto.

novas estruturas que permitem aos cientistas controlar as interações entre materiais e sistemas biológicos utilizando, para tanto, partículas de dimensões nanométricas (ALEXANDRIDOU e KIPARISSIDES, 2002).

Em geral, os nanomateriais podem ser classificados de acordo com o tipo de estrutura em: unidimensional (1-D), bidimensional (2-D) e tridimensional (3-D). Os do tipo 1-D possuem uma dimensão nanométrica: nanofibras e nanotubos, por exemplo; os do tipo 2-D têm duas dimensões em nanoescala: argilas e já os 3-D com três dimensões em nanoescala, compreendem as nanopartículas e os lipossomas (BENÍCIO, 2015; SAIFULLAH e HUSSEIN, 2015).

Certos nanomateriais são conhecidos por nanosistemas ou nanocarreadores, os quais apresentam variedade de formas, tamanhos e composição (FIGUEIRAS; COIMBRA; VEIGA, 2014; THORLEY e TETLEY, 2013). Ademais, conforme a natureza da sua composição, os nanosistemas podem ser classificados em: lipídicos, poliméricos ou inorgânicos (THORLEY e TETLEY, 2013).

Os nanosistemas lipídicos (Figura 1) são sistemas biocompatíveis, biodegradáveis e atóxicos, portanto, com enorme potencial para carrear fármacos citotóxicos (OLIVEIRA et al., 2012). Compreendem os lipossomas, as nanoemulsões, as nanopartículas lipídicas sólidas, assim como outros nanolipocomplexos e sistemas lipídicos nanoestruturados. Os lipossomas foram os primeiros nanosistemas a serem desenvolvidos (CONNIOT et al., 2014).



Figura 1 - Tipos de nanosistemas lipídicos: (A) – lipossomas; (B) – nanopartículas lipídicas sólidas e (C) – micelas fosfolipídicas.

Fonte: Conniot et al., 2014.

Os poliméricos incluem as nanopartículas poliméricas, as micelas e os dendrímeros (Figura 2). Estes nanomateriais tem em comum o fato de serem

compostos por polímeros, de origem natural ou sintética, com dimensões entre 10-100 nm, apresentando formas e estruturas bem variadas (HORTA, 2015).

Figura 2 - Tipos de nanosistemas poliméricos: (A) – nanopartículas poliméricas; (B) – micelas poliméricas e (C) – dendrímeros.



Fonte: Conniot et al., 2014.

Os nanosistemas inorgânicos (Figura 3) compreendem materiais mais rígidos variando o tamanho entre 5 - 40 nm. Os que apresentam propriedades magnéticas podem ser utilizados na imagiologia e para diagnóstico de tumores, por serem visíveis através da ressonância magnética. Incluem-se nesse grupo, as nanopartículas de ouro, de prata e de outros metais, as nanopartículas magnéticas, os nanotubos de carbono e as argilas lamelares - HDL (HORTA, 2015).

Figura 3 - Alguns tipos de nanosistemas inorgânicos: (A) - nanopartícula de ouro; (B) -nanopartículas magnéticas; (C) nanotubo de carbono e (D) argila aniônica –





Fonte: Conniot et al., 2014; Cunha et al., 2010.

No campo da saúde, a aplicação da nanotecnologia relaciona-se a prevenção, ao diagnóstico, tratamento e controle de sistemas biológicos, tendo como objetivo melhorar a qualidade de vida das pessoas (FREITAS, 2005). Logo, diversos estudos reportados na literatura, exploram a aplicação do uso de nanocarreadores no tratamento de doenças, visto que esse método proporciona o transporte mais direcionado de agentes terapêuticos para o local de ação, apresentando vantagens frente às terapias convencionais (HORTA, 2015; KAMALY, 2012; OLIVEIRA et al., 2012).

Especificamente, na área odontológica, a nanotecnologia tem avançado rapidamente e trazido novas perspectivas terapêuticas, de diagnóstico e de ação preventiva. E, dentre as aplicações neste campo da saúde, pode-se incluir, por exemplo, a criação de placas e implantes dentários com superfície nanoestruturada com aumento da longevidade, biocompatibilidade e osseointegração; melhoramento das resinas para fins estéticos e melhorias nas suas propriedades; nanobiosensores; cimentos endodônticos incorporados com nanopartículas, entre outras finalidades (BISPO, 2010; MITRA; WU; HOLMES, 2003; LUNA e ANDRADE, 2011; ALKAHTANI, 2018).

Além disso, a prática medicamentosa na odontologia, também se beneficia de nanosistemas, em que o fármaco é carreado para o tecido-alvo, promovendo o aumento da biodisponibilidade e uma liberação bem controlada, podendo ser usados no melhoramento de anestésicos locais, no tratamento de periodontopatias, na endodontia com o uso da medicação intracanal e no tratamento de fibrosarcoma, por exemplo (LUNA e ANDRADE, 2011; DEMIRBOLATA et al., 2018; RIBEIRO et al., 2016).

Já com relação ao uso de materiais nanoparticulados com foco na prevenção da cárie dentária, a literatura reporta diversos estudos (CHENG et al., 2012; BEYTH; PILO; WEISS, 2012; SEVINC e HANLEY, 2010; KHAN et al., 2013; NGUYEN et al., 2017), porém os resultados ainda apontam baixa ação cariostática destes, o que sugere a busca por um material mais promissor e que apresente boas propriedades anticariogênicas (MELO, 2012).

2.2 Cárie dentária

2.2.1 A cárie dentária e a relação com o Streptococcus mutans

A cárie dentária se apresenta como um problema de saúde pública e de prevalência elevada, que afeta os seres humanos, mesmo apesar do grande declínio ocorrido em todo o mundo nos últimos anos (DZIEDZIC et al., 2013).

Considerando-se a etiologia multifatorial desta doença de forma complexa e dinâmica, observa-se que para seu desenvolvimento há a necessidade da colonização na cavidade bucal por bactérias e da interação de fatores intrínsecos e extrínsecos relacionados ao hospedeiro, como a capacidade tampão da saliva, o pH do meio, composição e morfologia dental, hábitos dietéticos, higienização e a estrutura sociocultural na qual o indivíduo está inserido. Fatores estes que, em conjunto, regulam o estabelecimento e o desenvolvimento da doença (Figura 4) (MOREIRA; POLETO; VICENTE, 2007; LIMA, 2007; PITTS et al., 2017).

Figura 4 - Ilustração esquemática dos fatores que determinam o desenvolvimento do



Fonte: adaptado de Fejerskov, Nyvad e Kidd (2015).

É sabido, portanto, que a sua progressão está diretamente relacionada à presença de microrganismos na superfície dentária, porém apenas a presença destes não é suficiente para o seu desenvolvimento (LEITES; PINTO; SOUSA, 2006).

Assim, a cárie dentária (Figura 5) ocorre pela ação de bactérias acidogênicas e acidúricas que interagem numa comunidade formando o biofilme dental e alguns estudos referem-se a bactéria *S. mutans* como o principal agente etiológico da cárie (LEITES; PINTO; SOUSA, 2006; FEJERSKOV, 2004; BJARNASON et al., 1994;

SULLIVAN et al., 1996). Porém mais recentemente, a literatura aponta que a presença desse microrganismo não determina o desenvolvimento da doença, mas participa no processo considerado crônico, junto com os outros fatores já mencionados, o que descaracteriza a cárie dentária como uma patologia infecciosa, mas a confirma como multifatorial e dinâmica, impulsionada pela mudança no estilo de vida do hospedeiro e no desequilíbrio da microbiota bucal (LIMA, 2007; PITTS et al., 2017; MARSH e ZAURA, 2017).



Figura 5 - Cárie dentária.

Fonte: própria autoria, 2014.

Tomando como foco *S. mutans*, este é um potencial constituinte na formação do biofilme dental e quando em desequilíbrio na microbiota oral, causa a desmineralização do esmalte do dente através da dissolução da hidroxiapatita, em especial quando o pH se torna ácido, devido a multiplicação de agentes microbianos (ASPIRAS et al., 2010; FEJERSKOV et al., 2015). Com relação a taxonomia, essa bactéria é uma das sete espécies pertencentes ao "Streptococcus do Grupo Mutans" (EGM) e à Família Streptococaceae. Morfologicamente é uma espécie coco grampositiva, anaeróbios facultativos e microaerófilos, ou seja, podem respirar na ausência ou na presença de pouca quantidade de oxigênio (LEITES; PINTO; SOUSA, 2006).

Atualmente, estudos envolvendo nanotecnologia têm sido bastante utilizados, incorporando-se nanopartículas metálicas em materiais dentários como estratégias para prevenir o acúmulo de biofilme dental além de promover ação remineralizante na estrutura dentária, e consequentemente, prevenir a cárie dentária. A tabela 1 resume alguns desses estudos.

Agente nanotecnológico	Avaliação	Material odontológico beneficiado	Referência		
Nanopartículas de Prata		Resina composta,	Cheng et al., 2012		
$(NAg) \circ do ouro (Au)$	Antimicrobiana	primer, adesivo e cerdas	Zhang et al., 2012		
(INAG) e de ouro (Ad)		de escova dentária	Raval et al., 2016		
Nanopartículas de Oxido de		Desire energy	Sevinc e Hanley,		
Zinco (ZnO)	Antimicropiana	Resina composta	2010		
Nanopartículas de		Resina composta,			
polietilenoimina de amônio	Antimicrobiana	ionômero de vidro e	Beyth et al., 2012		
quaternário (QA - PEI)		cimento			
Nanopartículas de Fluoreto			Xu et al., 2008		
de cálcio (CaF2)	Remineralizante	Resina composta	Xu et al., 2010		
		Resina composta,			
Nanopartículas de Fosfato	Remineralizante	adesivo e cimento de	Weir et al, 2012		
de Cálcio (Ca-PO ₄)		ionômero de vidro			
Nanohidroxiapatita (nano-					
HA) ou	Remineralizante	Resina modificada por	Lee et al., 2010		
nanofluorhidroxiapatita	Remineralizante	cimento de ionômero de	Lin et al., 2011		
(nano-FHA)		vidro	Ebadifar et al., 2017		
Nanopartículas de óxido de	Antimicrobiana	Material protético			
titânio (TiO2)			l otu et al., 2017		

 Tabela 1 - Estudos envolvendo nanotecnologia com foco no controle da cárie.

Fonte: adaptado de Melo (2012) e Alkahtani (2017).

Nesse contexto, a medida de maior impacto para o controle do desenvolvimento da cárie tem sido o uso de meios contendo fluoretos e o declínio dessa doença tem sido atribuído ao uso abrangente de uma ou mais formas de utilização do flúor (CURY, 2015).

2.2.2 O flúor e sua ação anticariogênica

O flúor é um elemento essencial e necessário para a saúde do homem em pequenas quantidades e pode ser encontrado em fontes geológicas, industriais, nos alimentos e na água de abastecimento (THEISS et al., 2014, VAISS et al., 2009).

Para a Organização Mundial da Saúde (2009), valores limites de até 1,5 mg/L (ppm) do íon fluoreto (F⁻) são permitidos nas águas de abastecimento, e exposições prolongadas a níveis elevados de fluoreto pode levar a fluorose dentária (THEISS et al., 2014; LV et al., 2006).

Na odontologia, este ânion é bastante utilizado contra a cárie dentária, com foco em sua prevenção e controle (CARDOSO; REIS; SERRATINE, 2004; FEJERSKOV, 2004; CURY et al., 2016). Diversas ações preventivas a base de fluoretos tem sido amplamente empregadas em programas de saúde bucal coletiva, e também em consultórios, porém a adequação do conhecimento científico acerca da real necessidade de uso e do melhor método de aplicabilidade ainda não é totalmente esclarecido (CASCAES et al., 2012; FUKUSHIMA et al., 2000).

A tabela 2 representa meios de uso de fluoretos aplicados na odontologia.

Meios	Uso coletivo	Uso individual	Uso profissional	F⁻ (ppm)	Recomendações
Água fluoretada	х			0,7	Sem restrições
Dentifrício fluoretado		Х		1000 – 1500	Diariamente para todo indivíduo
Soluções para bochecho	NaF 0,2%	NaF 0,05%		225 / 900	De acordo com o risco ou atividade de cárie
Gel			х	12.300	De acordo com o risco ou atividade de cárie
Verniz			Х	22.000	De acordo com o risco ou atividade de cárie

Tabela 2 - Recomendações de uso de fluoretos na odontologia.

Fonte: Ministério da Saúde, 2009.

Ao se eleger o tipo de fluorterapia indicado para cada paciente, é necessário compreender o mecanismo de ação dos fluoretos e analisar as vantagens e desvantagens do uso de cada tipo de produto. Também é necessário conhecer e seguir a técnica de aplicação correta de cada tipo de material para se obter o máximo de eficácia com o mínimo de risco de toxicidade (MURACAMI e BONECKER, 2010).

Com base nesse contexto, a dose mínima de F⁻ capaz de provocar sinais e sintomas de intoxicação aguda é chamada de "dose provavelmente tóxica" (DPT), que corresponde a aproximadamente 5,0 mgF/Kg de peso corporal, enquanto a "dose certamente letal" (DCL) é de 32 a 64 mgF/Kg peso corporal (OMS, 2009; BUZALAF et al., 2002).

O mecanismo de ação do flúor independentemente do veículo usado é baseado na disponibilidade desse íon nos fluidos orais (saliva e fluido do biofilme) para interferir no processo carioso (FEJERSKOV et al., 2015). Dessa forma, sua função anticariogênica está relacionada a inibição do biofilme dental; inibição do processo de desmineralização e potencialização do processo de remineralização (FEATHERSTONE,1999; FEATHERSTONE, 2000; WHITFORD et al., 2002).

Com relação ao efeito antimicrobiano, o flúor age alterando o metabolismo da bactéria, inibindo principalmente a enzima enolase, que é responsável pelo transporte de energia no seu interior, assim, na ausência dessa enzima a bactéria perde sua homeostase, desequilibrando seu pH interno e impedindo a expulsão de prótons H⁺ para o meio externo. Dessa forma, a característica acidúrica da bactéria deixa de existir, havendo, então, a morte bacteriana quando o meio interno torna-se ácido (TSENG; WOLFF; AEPPLI, 1992; JENKINS, 1999).

No processo de des-remineralização dentária, o fluoreto presente na cavidade bucal possibilita a formação do mineral fluorapatita (Ca₅(PO₄)₃F), que se forma por interação dos íons cálcio e fosfato presentes na saliva. O flúor é o mais eletronegativo dos elementos e tem uma forte afinidade pela troca iônica, sendo a atração eletrostática entre o Ca²⁺ e F⁻ maior do que o Ca²⁺ e OH⁻, formando um novo mineral, a fluorapatita, menos solúvel que a hidroxiapatita (Ca₅(PO₄)₃OH), mineral natural do dente, que foi dissolvido quando o pH decai. A fluorapatita, por sua vez, fortalece o esmalte dentário e promove a sua remineralização (FEATHERSTONE, 1999; FEJERSKOV, 2004; PITTS et al., 2017).

O fenômeno da reação reversível de desmineralização e remineralização dentária, ilustra-se a seguir:

$$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2 \rightleftharpoons 10Ca^{2+} + 6PO_4^{3-} + 2OH^{-}$$
 (1)

$$Ca_{10}(PO_4)_6(F)_2 \rightleftharpoons 10Ca^{2+} + 6PO_4^{3-} + 2F^-$$
 (2)

Nesse contexto, materiais com liberação de fluoreto tem sido extensivamente estudados assim como o seu modo de liberação (GLASSPOOLE; ERICKSON; DAVIDSON, 2001; KIELBASSA et al., 2003; TYAS, 2006; TEN CATE et al., 2008; LING et al., 2009; FEJERSKOV et al., 2015) pelo fato deste íon enriquecer a estrutura dentária, agindo na etapa de remineralização, assim como atuando como agente antimicrobiano contra a principal bactéria causadora da cárie (CARDOSO; REIS; SERRATINE, 2004; XU et al., 2010).

A figura 6 representa a influência do fluoreto no desenvolvimento do processo carioso e o consequente resultado clínico.



Figura 6 - Estrutura esquemática da progressão da cárie sob influência do fluoreto.

Fonte: adaptado de Cury, 2015.

Logo, sabendo-se da importância do uso do flúor na prevenção e controle da cárie dentária, além de outros elementos com efeito antimicrobiano descritos anteriormente, cresce o interesse dos pesquisadores por inovações tecnológicas cada vez mais complexas e eficazes (MELO, 2012). E com base nisso, o uso de nanosistemas inorgânicos, a exemplo das argilas aniônicas lamelares, conhecidas por Hidróxidos Duplos Lamelares (HDLs), ganham destaque no foco preventivo dessa doença, já que esse nanocarreador pode ter na sua composição os próprios elementos que já se mostraram eficazes contra a cárie dentária.

2.3 Argilas lamelares

As argilas são bem definidas como sendo um material natural, de granulação fina e de boa plasticidade, tendo em sua constituição um grupo de minerais

conhecidos por argilominerais (NEUMANN et al., 2000; COELHO; SANTOS; SANTOS, 2007a). Algumas argilas, portanto, se apresentam na forma de lamelas, compreendendo as argilas lamelares que são estruturadas por lamelas empilhadas formadas pela conformação de dois tipos de folhas cristalinas, com estrutura octaédrica e/ou tetraédrica e apresentam pouco menos que 1 nm de espessura e poucas centenas de nanômetro de diâmetro médio (TEIXEIRA-NETO e TEIXEIRA-NETO, 2009).

A nomenclatura para os tipos de camadas ou lamelas da argila é uma simples expressão da razão entre as folhas tetraédricas e as folhas octaédricas. Assim, um argilomineral como camada 1:1 tem uma folha tetraédrica e uma folha octaédrica, enquanto que do tipo 2:1 existem duas folhas tetraédricas e uma folha octaédrica interna (NEUMANN et al., 2000).

Os átomos que formam as lamelas estão unidos por ligações químicas do tipo covalente. Em contrapartida, as ligações entre as lamelas adjacentes são relativamente fracas (TEIXEIRA-NETO e TEIXEIRA-NETO, 2009).

Ainda com relação a sua estrutura, podem sofrer substituições isomórficas de íons e possuírem, por conseguinte, variação de potencial elétrico (negativo ou positivo). Esse potencial elétrico que ocorre pode ser compensado através de cátions e ânions e, com base nisso, as argilas podem ser catiônicas ou aniônicas (LUCKHAM e ROSSI, 1999; NEUMANN et al., 2000).

As do tipo catiônicas caracterizam-se por possuírem cátions entre uma lamela e outra (região interlamelar), para promover a estabilização estrutural de suas lamelas carregadas negativamente. No grupo das argilas aniônicas, ocorre o inverso. E com base nisso, ambas apresentam capacidade de trocas iônicas (COELHO, SANTOS; SANTOS, 2007b).

2.3.1 Hidróxidos duplos lamelares (HDL)

Os Hidróxidos Duplos Lamelares são compostos conhecidos como argilas aniônicas ou compostos do tipo hidrotalcita. São materiais tanto sintéticos como naturais e que contêm em seu domínio interlamelar ânions capazes de neutralizar os cátions presentes em suas lamelas (CRESPALDI e VALIM, 1998; TEIXEIRA-NETO e TEIXEIRA-NETO, 2009; CUNHA et al., 2010).

Apesar desses compostos não serem abundantes na natureza, são de fácil obtenção em laboratório e de baixo custo (MISHRA; DASH, PANDEY, 2018) e são representados pela seguinte fórmula geral:

$$[M^{+2}_{1-x}M^{+3}_{x} (OH)_{2}]^{x+} A^{-m}_{x/m} \cdot nH_{2}O$$
(3)

Onde, M²⁺ e M³⁺ correspondem aos cátions metálicos bi e trivalente, respectivamente e A^{-m} representa um ânion interlamelar. Além disso, apresentam uma estrutura derivada da brucita (mineral de fórmula Mg(OH)₂), em que os cátions estão localizados no centro de octaedros, possuindo ânions hidroxila em seus vértices (Figura 7) (CRESPALDI e VALIM, 1998).

Figura 7 - Estrutura esquemática da brucita e da hidrotalcita.



Fonte: adaptado de Cardoso, 2002.

A primeira vez que esses materiais foram sintetizados foi em 1933 por Feitknetcht, através da precipitação controlada de soluções aquosas contendo cátions metálicos com uma solução alcalina (FEITKNECHT, 1933). E nos dias atuais, esses compostos podem ser sintetizados de forma simples e sob baixo custo em laboratórios, sendo, por conseguinte, de fácil obtenção. Segundo Crepaldi e Valim (1998), o HDL pode ser sintetizado por meio de diferentes métodos: coprecipitação ou método sal-base (o pH da amostra pode variar ou ser constante); método sal-óxido; síntese hidrotérmica e substituição do ânion interlamelar (que parte de um precursor previamente preparado) (PRASAD; KAMATH; VIJAYAMOHANAN, 2011). Com base nisso, diversos íons podem compor as lamelas (Tabela 3).

Cátions Divalente/Trivalente	AI	Fe	Cr	Co	Mn	Ni	Sc	Ga	Ti
Mg	Х	Х	Х				Х		
Ni	Х	Х	Х	Х		Х			
Zn	Х		Х						
Cu	Х		Х						
Со	Х			Х					Х
Mn	Х				Х			Х	
Fe	Х	Х							
Ca	Х								
Li	Х								

Tabela 3 - Combinações de cátions bivalente e trivalente que podem compor as lamelas dosHDLs.

Fonte: adaptado de Crespaldi e Valim, 1998.

Quando os cátions bivalentes são substituídos isomorficamente por cátions trivalentes, a estrutura lamelar passa a apresentar uma carga residual positiva, necessitando, portanto, da presença de ânions entre as lamelas, além da água, o que proporciona a eletroneutralidade e permite a interação das lamelas por ligações de hidrogênio, além de forças eletrostáticas (CUNHA et al., 2010; BENÍCIO et al., 2015).

Um grande número de ânions orgânicos e inorgânicos de diferentes tamanhos (3–50 Å) pode ocupar o espaço interlamelar da hidrotalcita, como mostra a tabela 4. A estrutura composta pelo empilhamento de camadas carregadas positivamente, com ânions ocupando o domínio interlamelar é comum a todos os hidróxidos duplos lamelares (CARDOSO, 2002; CRESPALDI e VALIM, 1998).

Espécies aniônicas	Exemplos
Haletos	F ⁻ , Cl ⁻ , Br-, l ⁻
Oxoânions não- metálicos	CO ⁻² 3, NO ⁻ 3, SO ⁻² 4, CrO ⁻² 4, HPO ⁻² 4
Ânions complexos	[Fe(CN) ₆] ⁻⁴ , [NiCl ₄] ⁻²
Polioxo-metalatos	V ₁₀ O ⁻⁶ 28, M07O ⁻⁶ 24
Ânions orgânicos	alquilsulfatos, carboxilatos
Biomoléculas	DNA, RNA, vitaminas

Tabela 4 - Alguns ânions interlamelares que podem estar entre as lamelas de HDLs.

Fonte: adaptado de Crespaldi e Valim, 1998; Mishra; Dash; Pandey, 2018.

A estabilização da estrutura lamelar é bastante importante na preparação de HDLs e está diretamente associada ao ânion a ser intercalado. Quanto maior a capacidade de estabilização do ânion, mais facilmente o HDL se formará (CARDOSO, 2002).

Este fato relaciona-se à capacidade de troca iônica dos HDLs, na qual é possível produzir novos compostos a partir de HDLs pré-formados. No método da troca iônica é comum utilizar uma solução concentrada do ânion a ser intercalado e geralmente o HDL precursor mais utilizado é o que contém o íon cloreto (CRESPALDI e VALIM, 1998).

Quanto mais fraca a interação do ânion com a lamela do HDL, maior será a facilidade de troca iônica. A sequência de interação dos ânions inorgânicos pode ser assim representada em ordem crescente de estabilização da estrutura lamelar: CO₃-² / OH⁻ / F⁻ / Cl⁻ / SO⁻²₄ / Br⁻ / NO⁻₃ / l⁻ (REIS, 2004; MYATA, 1983).

Ademais, a partir do tamanho, orientação e força de ligação entre os ânions e os grupos hidroxilas da camada lamelar, uma distância conhecida como espaçamento basal é formada, podendo variar os valores a depender do ânion interlamelar (VIEIRA, 2009). A tabela 5 representa os valores de espaçamento basal referente a cada ânion.

Ânions	Espaçamento Basal (Å)
OH-	7,55
CO ₃ -2	7,65
F-	7,66
Cl	7,83
Br	7,95
ŀ	8,16
NO ₃ -	8,79
SO 4 ⁻²	8,58
CIO4 ⁻	9,20

 Tabela 5 - Ânions interlamelares e seus valores de espaçamento basal.

Fonte: adaptado de Vieira, 2009.

A literatura reporta diversos estudos em que utiliza-se o fluoreto como ânion interlamelar na composição de HDLs para diversas finalidades. Isso ocorre em virtude da capacidade de troca iônica que as hidrotalcitas apresentam (MA et al., 2014).

Estudos que avaliam a capacidade de adsorção de íons fluoreto no tratamento de águas residuais utilizando HDLs são bem reportados na literatura (THEISS et al., 2014, CHANG et al., 2011).

Kameda; Oba; Yoshioka (2015a) realizaram um estudo de remoção de íons flúor de uma solução de NaF utilizando HDLs (NO₃.Mg-Al HDL e Cl.Mg-Al HDL), com objetivo de utilizarem esses nanomaterias como método de remoção do excesso de F⁻ das águas. Para tanto, foi feita uma troca iônica do F⁻ pelo NO₃⁻ ou Cl⁻ intercalados no meio interlamelar. Quando do uso do HDL, a concentração de F⁻ na solução diminuiu de 100 pra 5,2 mg/L em 60 minutos quando foi utilizado o NO₃.Mg – Al HDL, enquanto que, para o Cl.Mg-Al HDL, houve uma redução de F⁻ de 100 para 3,3 mg/L em 120 minutos. Observou-se, então, que ambos HDLs adsorveram íons fluoreto via troca iônica, sendo o HDL um bom aliado na remoção de íons fluoreto das águas.

Outros estudos utilizando um HDL calcinado (Mg, AI-CO₃ HDL), também para fins de remoção de íons flúor de uma solução aquosa, são descritos na literatura (FAN; XU; ZHENG, 2007; LV et al., 2006). Lv et al. (2006) verificaram a capacidade de adsorção de um HDL calcinado com razão molar de 1,68 em que foi encontrado

aproximadamente 200 mg/g em uma concentração de fluoreto de 275 mg/L, sugerindo que o mecanismo de adsorção de flúor é possível a partir de um precursor calcinado.

Já Tammaro e colaboradores (2014) realizaram um estudo de preparação e caracterização de um compósito de resina (Bis-GMA/TEGDMA), contendo um composto de hidrotalcita intercalado com íons fluoreto e obtiveram uma resina dentária com propriedades físicas e biológicas melhoradas, além de uma lenta e constante liberação de flúor na cavidade bucal, o que é de interesse na odontologia, para manutenção da saúde oral.

Finalmente com relação ao uso de HDLs na área odontológica visando o controle da cárie dentaria, a partir da liberação de íons fluoreto e de seu potencial efeito remineralizante e antimicrobiano contra *S. mutans*, a literatura ainda é escassa, necessitando, portanto, novos estudos que elucidem essa questão.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Sintetizar, caracterizar e avaliar o potencial anticariogênico *in vitro* de Hidróxidos Duplos Lamelares Fluoretados (Mg, AI - F HDL) sobre *Streptococcus mutans*.

3.2 Objetivos específicos

- Sintetizar Mg, AI F HDLs a partir dos Mg, AI CI HDLs precursores micrométrico e nanométrico (suspensão coloidal e pó resultante) em diferentes condições laboratoriais;
- Caracterizar de forma estrutural, térmica e morfológica os produtos sintetizados;
- Avaliar o perfil de liberação de F⁻ dos HDLs fluoretados por 21 dias;
- Avaliar a viabilidade celular dos produtos fluoretados frente a bactéria S. mutans.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Delineamento do estudo

Trata-se de um estudo experimental, laboratorial e descritivo o qual consistiu nas etapas de síntese, caracterização e avaliação microbiológica *in vitro* de hidróxidos duplos lamelares fluoretados (Mg, AI - F HDL) frente ao *Streptococcus mutans.* O organograma referente aos experimentos desenvolvidos no presente trabalho, podem ser observados na figura 8 e em seguida, são descritos os locais em que foram executados.



Figura 8 - Organograma dos experimentos executados.

1. Laboratório de Tecnologia de Nanosistemas Carreadores de Substâncias Ativas da Universidade Federal de Alagoas (TecNano/UFAL), localizado na Escola de Enfermagem e Farmácia (ESENFAR), da Universidade Federal de Alagoas (UFAL), Campus A.A. Simões, Maceió/AL.

 Laboratório de Biologia Bucal da Universidade Federal da Paraíba (LABIAL/UFPB), localizado no Centro de Ciências da Saúde (CCS), da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), Campus I – Castelo Branco III, João Pessoa/PB.

3. Laboratório de Tecnologia e Nanotecnologia Farmacêutica da Universidade Federal de Alagoas (LABTCOM/UFAL), localizado na Escola de Enfermagem e Farmácia (ESENFAR), da Universidade Federal de Alagoas (UFAL), Campus A.A. Simões, Maceió/AL.

4. Laboratório de Microscopia do Instituto Federal de Alagoas (IFAL), localizado no Instituto Federal de Alagoas (IFAL), Campus Maceió/AL.

4.2 Material

Os reagentes utilizados para a síntese dos HDLs foram: cloreto de magnésio -MgCl₂.6H₂O (Sigma-Aldrich[®] - Steinheim, Alemanha) e cloreto de alumínio -AlCl₃.6H₂O (Sigma-Aldrich[®] - Steinheim, Alemanha), hidróxido de sódio -NaOH (VETEC – Rio de Janeiro, Brasil) e fluoreto de sódio - NaF (Merck[®], Darmstadt, Alemanha) além de água Milli-Q (Direct-Q[®] Water Purification System, São Paulo, Brasil). Todos os reagentes apresentaram grau de pureza analítico.

Para quantificação de flúor (F⁻) os reagentes utilizados foram: ácido acético -CH₃COOH (Merck[®], São Paulo, Brasil), ácido sulfúrico - H₂SO₄ - (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha), hexametildisiloxano - HMDS (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha), cloreto de sódio – NaCl (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha) e ácido trans-1,2- diaminociclohexano-N, N, N, N' - tetraacético monohidratado – CDTA (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha). Padrões de fluoreto utilizando fluoreto de sódio - NaF (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha) também foram utilizados.

Para a avaliação microbiológica foram utilizadas cepas da *American Type Culture Collection* de bactéria *S. mutans* (ATCC[®] 25175[™]), os meios de cultura sólido ágar Infusão Cérebro Coração (*Brain Heart Infusion Agar* – BHI – HiMedia[™] Laboratories Pvt Ltd, Mumbai, Índia) e o meio líquido caldo (*Brain Heart Infusion Broth* – BHI – HiMedia[™] Laboratories Pvt Ltd, Mumbai, Índia) e a solução salina - 0,9% de NaCI (Sigma-Aldrich[®] - Steinheim, Alemanha). Os meios de cultura foram solubilizados com água deionizada e esterilizados em autoclave.

4.3 Procedimentos da pesquisa

4.3.1 Síntese dos HDLs

Foram feitas duas sínteses de HDLs precursores, utilizando os mesmos reagentes (MgCl₂.6H₂O e AlCl₃.6H₂O) em uma mesma proporção Mg/Al 3:1 (BENÍCIO et al., 2015; CASTRO, 2009), a fim de se obterem: Mg, Al - Cl HDL micrométrico (síntese convencional) e Mg, Al - Cl HDL nanométrico (síntese em reator/autoclave). O pó resultante da secagem da síntese convencional, a suspensão coloidal obtida da síntese em reator/autoclave, e o pó resultante da secagem da suspensão coloidal obtida da síntese em reator/autoclave, e o pó resultante da secagem da suspensão coloidal foram utilizados para preparação dos HDLs fluoretados, com a obtenção dos produtos dos grupos 1, 2 e 3, respectivamente. Ainda, dois parâmetros de síntese foram analisados: tempo de agitação (2 e 24h) e temperatura (25 e 40°C), totalizando, então, 12 produtos, 4 de cada grupo. A figura 9 ilustra este protocolo experimental, no qual a padronização de cores utilizadas para os produtos seguirá na apresentação de todos os resultados de caracterização para melhor compreensão do trabalho. A preparação detalhada dos precursores e dos produtos está descrita nas próximas sessões.




4.3.1.1 Síntese do precursor: Mg, AI - CI HDL micrométrico

O pó deste HDL precursor foi obtido por síntese direta pelo método de coprecipitação a pH constante (BENÍCIO et al., 2015; CASTRO, 2009; MIYATA, 1983). Uma solução de MgCl₂.6H₂O e AlCl₃.6H₂O, em proporção de Mg/Al 3:1, foi levada para agitação por 30 minutos em água deionizada (20 mL) à temperatura ambiente. Em seguida, gotejou-se em torno de 50 mL de NaOH (3M) de forma lenta, até a solução atingir o pH 10, permanecendo em agitação por 4 horas sob uma concentração de 139,57 mg/mL, obtendo-se, por conseguinte, um precipitado branco. O produto em seguida foi lavado seis vezes através do processo de centrifugação (Sigma 6-15, Rio de Janeiro, Brasil), 3.500 rpm/5 minutos, cada lavagem, e levado para estufa (NOVA instruments, São Paulo, Brasil) por 12 horas a 60°C. O pó oriundo desta síntese foi triturado, tamisado e reservado para caracterização.

4.3.1.2 Síntese do precursor: Mg, AI - CI HDL nanométrico

O Mg, AI - CI HDL nanométrico precursor foi sintetizado com os mesmos reagentes utilizados para a síntese de Mg, AI - CI HDL micro, descrita acima, na mesma proporção Mg/Al de 3:1, conforme relatado na literatura por Chen et al. (2012). Para tanto, a solução dos reagentes foi preparada diluindo-se o pó em água Mili-Q (concentração dos reagentes: MgCl₂.6H₂O: 121 mg/mL e AlCl₃.6H₂O: 48,28 mg/mL) em seguida a mistura da solução dos reagentes foi adicionada a uma solução de NaOH (0,2M) em uma proporção de 1:4 respectivamente, preparada previamente. Esta mistura ficou sob forte agitação por 10 min em temperatura ambiente sob pH 10. Em seguida, o produto foi levado para centrifugação (Sigma 6-15, Rio de Janeiro, Brasil) 4500 rpm/5 min e lavado 7 vezes com água Mili-Q. O precipitado obtido, então, foi resuspenso em água Mili-Q e em seguida a suspensão foi transferida para reator/autoclave (MAITEC - Fornos INTI, São Paulo, Brasil) com cápsula de teflon para tratamento hidrotérmico por 16 horas à 100°C na estufa com circulação forçada de ar (NOVA instruments, São Paulo, Brasil). A concentração da suspensão coloidal de HDL foi de 4 mg/mL. Parte da suspensão coloidal foi reservada para caracterização, e outra parte foi previamente congelada a -20°C durante 48 horas e em seguida levada pra o liofilizador da marca TERRONI[®] - LD1500 (São Paulo, Brasil) seguindo as condições de 1 mm/h da amostra, com um vácuo de 250 mm de mercúrio no Laboratório de Controle de Qualidade de Alimentos da Universidade Federal de Alagoas (LCQA/UFAL) e reservada para caracterização.

Somente após confirmação do sucesso das sínteses, estes precursores (pó resultante da secagem da síntese convencional, a suspensão coloidal obtida da síntese em reator/autoclave, e o pó resultante da secagem da suspensão coloidal) foram utilizados para preparação dos HDLs fluoretados.

4.3.1.3 Síntese dos produtos: Mg, AI - F HDL a partir de Mg, AI – CI HDL micrométrico

Os HDLs fluoretados do grupo 1 foram sintetizados utilizando o Mg, AI - CI HDL precursor micrométrico através da síntese indireta pela técnica de troca iônica, segundo Tammaro et al. (2014). Assim, certa quantidade de pó do precursor foi adicionada a uma solução de fluoreto de sódio (NaF) 500 mg/L (preparada previamente em água deionizada) e mantida sob forte agitação a uma concentração de 3,5 mg/mL (FAN; XU; ZHENG, 2007). Durante o tempo de agitação, 2 ou 24h sob 25 ou 40°C foi adicionado lentamente NaOH (3M), para ajustar o pH para 11. Os produtos do grupo 1 obtidos: Mg, AI - F HDL 2h, 25°C; Mg, AI - F HDL 2h, 40°C; Mg, AI - F HDL 24h, 25°C; Mg, AI - F HDL 24h, 40°C, foram centrifugados (Sigma 6-15, Rio de Janeiro, Brasil) a 3.500 rpm/5 min e lavados 6 (seis) vezes com água deionizada. Em seguida, foram secos em estufa (NOVA instruments, São Paulo, Brasil) por 3 horas à 60°C e, por fim, os produtos foram triturados, tamisados e reservados para caracterização.

4.3.1.4 Síntese dos produtos: Mg, AI - F HDL a partir de Mg, AI – CI HDL nanométrico

Os HDLs fluoretados dos grupos 2 e 3 foram sintetizados utilizando o Mg, Al -Cl HDL precursor nanométrico através da síntese indireta pela técnica de troca iônica, segundo Tammaro et al. (2014). Para tanto, certa quantidade do precursor (coloide ou pó) foi adicionado a uma solução de fluoreto de sódio (NaF) 500 mg/L (preparada previamente em água deionizada) e mantido sob forte agitação a uma concentração de 3,5 mg/mL (FAN; XU; ZHENG, 2007). Durante o tempo de agitação, 2 ou 24h sob 25 ou 40°C foi adicionado lentamente NaOH (3M), para ajustar o pH para 11. Assim, as mesmas variáveis de síntese foram analisadas, de forma que foram obtidos: Mg, AI - F HDL 2h, 25°C; Mg, AI - F HDL 2h, 40°C; Mg, AI - F HDL 24h, 25°C; Mg, AI - F HDL 24h, 40°C, do grupo 2 e do grupo 3. Todos os produtos foram centrifugados (Sigma 6-15, Rio de Janeiro, Brasil) a 4.500 rpm/15 min e lavados 6 (seis) vezes com água deionizada. Em seguida, foram secos em estufa (NOVA instruments, São Paulo, Brasil) por 3 h à 60°C e, por fim, os produtos foram triturados, tamisados e reservados para caracterização.

4.3.2 Caracterização

Precursores e produtos foram caracterizados de forma estrutural, térmica e morfológica. No entanto, a fim de confirmar o tamanho dos HDLs, foi realizada a técnica de espalhamento dinâmico da luz (EDL). Para tal, foi utilizado o equipamento Malvern Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments, UK). Esta técnica permite obter informações a respeito do tamanho e homogeneidade da distribuição do tamanho das partículas, além do potencial de superfície (potencial zeta). Para a análise de EDL foi utilizada uma cubeta de poliestireno (*Square polystyrene cuvettes* - DTS0012 - Malvern Instruments, UK) e para determinar o potencial zeta as amostras foram colocadas em célula eletroforética (*Folded Capillary Zeta Cell* - DTS1070 - Malvern Instruments, UK). Estas análises foram feitas em triplicata e os valores médios foram obtidos.

4.3.2.1 Caracterização estrutural

A caracterização estrutural foi obtida pelas técnicas de espectrometria de fluorescência de raios X por energia dispersiva, difração de raios X, espectrometria de

infravermelho com transformada de Fourier e potenciometria por eletrodo específico de íons fluoreto (microdifusão facilitada por hexametildisiloxano) descritas a seguir.

Espectrometria de fluorescência de raios X por energia dispersiva (Energy Dispersive X-ray Detector – EDX):

Esta análise foi realizada em um Espectrômetro de fluorescência de raios X por Energia Dispersiva – EDX 7000 (Shimadzu, Kyoto, Japão), sob vácuo, com colimador 10 mm. O emprego desta técnica objetivou caracterizar de modo qualitativo e quantitativo os elementos: magnésio, alumínio e cloro, presentes no material, dentro do valor de detecção baseado na medida das intensidades dos raios X característicos emitidos pelos elementos que constituem a amostra.

• Difração de raios X (DRX):

Os difratogramas foram obtidos à partir de um Difratômetro de raios X (Shimadzu DRX 7000, Kyoto, Japão). Para tanto, utilizou-se 0,1g da amostra na forma de pó, a qual foi colocada no porta-amostra e analisada nas seguintes condições: 30 kV, 30 mA CuKa (λ = 0,15406 nm), em intervalos de 0,02° (20) na faixa de 3 a 90°. Através da equação de Bragg (n. λ =2.d.sen θ) (BLEICHER e SASAKI, 2000) o espaçamento basal d(003) foi calculado. Esta técnica permite obter informações sobre a cristalinidade e a estrutura lamelar do HDL formado, pela observação de seus planos basais.

• Espectrometria de infravermelho com transformada de Fourier (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy* - FTIR):

Os espectros de infravermelho foram obtidos em Espectrômetro Thermo Scientific (Nicolet[™] iS[™] 10 FT-IR Spectrometer, Madison, USA), na faixa de 4.000-500 cm⁻¹, utilizando pastilhas de brometo de potássio (KBr) – 2 mg da amostra - 200mg de KBr seco. Através dessa análise é possível a identificação dos principais grupos funcionais presentes no material.

Potenciometria por eletrodo específico de íons fluoreto (F⁻):

Inicialmente, a quantificação de íons fluoreto (flúor total) foi realizada segundo o método de Taves (1968) através da técnica indireta de microdifusão facilitada por hexametildisiloxano (HMDS). As amostras de Mg, AI - F HDL numa concentração de 12,5 mg/mL foram colocadas em placa de Petri plásticas. Na tampa de cada placa foi colocado 50 µL de 0,05 M de NaOH, distribuídos em 5 gotas. As placas foram então seladas com vaselina e por um orifício feito previamente na tampa, foi colocado 2 mL de hexametildisiloxano, preparado previamente. O orifício foi logo selado com vaselina e parafilme. Em seguida as placas foram colocadas em mesa agitadora orbital plana por 24h. Após esse período, as tampas foram removidas, invertidas e as gotas de NaOH foram combinadas em uma única gota. Foi adicionado 20 µL de 0,2 M de ácido acético com a finalidade de tamponar o NaOH. O volume final foi ajustado para 75 µL com água deionizada, utilizando-se uma pipeta. A solução final contendo todo o fluoreto da amostra foi analisada com o eletrodo íon específico da Orion 9409 acoplado ao potenciômetro (Orion, 720 A). A leitura foi feita colocando o eletrodo em contato com a solução na parte interna da tampa da placa.

O resultado da leitura foi obtido em milivolts (mV), os quais foram transferidos para uma planilha eletrônica (Microsoft Excel Office) e convertidos em partes por milhão (ppm).

O hexametildisiloxano (HMDS), seguiu um protocolo de preparo feito previamente a análise, em que consistiu em três fases:

 Primeira fase: adicionou-se 600 mL de água deionizada em 167 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) e completou-se para 1 L com água deionizada = 6H₂SO₄;

- Segunda fase: adicionou-se 84 mL do 6H₂SO₄ em 300 mL de água deionizada e completou-se para 500 mL com água deionizada;

O ácido foi adicionado a água sob agitação, e em seguida colocado na geladeira durante 45 minutos.

- Terceira fase: adicionou-se 12 mL de HMDS (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha), na solução anterior.

A solução em um balão, foi então levada para dentro da capela e agitou-se por 5 min. Em seguida, foi deixada em repouso por 2 h para sofrer processo de formação de duas fases. Após esse período, a solução foi colocada em um recipiente, de forma que a "fase" do líquido que ficou na parte superior do balão não foi despejada do mesmo. Por fim, foi utilizado 200 mL dessa solução feita com mais 200 mL de água deionizada a fim de obter 3H₂SO₄.

Esta técnica permite a determinação quantitativa do flúor total presente nas amostras, que foi todo exposto por difusão ácida, sendo considerada uma técnica "padrão ouro" de quantificação de flúor com vantagens de separar todo o flúor da amostra, eliminando interferentes, e ao mesmo tempo, concentrando-os, o que reforça a detecção de F⁻ pelo eletrodo sensível (MEIRA, 2015).

4.3.2.2 Caracterização térmica

A caracterização térmica foi realizada por meio da análise termogravimétrica e termogravimetria derivada, descritas a seguir.

Análise termogravimétrica (*Thermogravimetric Analysis* – TGA) e Termogravimetria Derivada (Derivative thermogravimetry – DTG):

Análises obtidas em aparelho de termoanálise (Shimadzu, Kyoto, Japão), modelo TGA-50, com uma taxa de aquecimento de 10°C/min, onde cada amostra correu em um fluxo de gás nitrogênio de 50 mL/min de 25 a 800°C. O objetivo destas técnicas é avaliar a estabilidade térmica do material. Foi realizada no Laboratório de Tecnologia e Controle de Medicamentos da Universidade Federal de Alagoas (LABTCOM/UFAL).

4.3.2.3 Caracterização morfológica

A caracterização morfológica foi realizada por meio da técnica de microscopia eletrônica de varredura, descrita a seguir.

• Microscopia eletrônica de varredura (MEV):

As micrografias foram adquiridas em um microscópio eletrônico de varredura (TESCAN, São Paulo, Brasil) modelo VEGA3. As amostras foram previamente revestidas com ouro em metalizadora (QUORUM Technologies Ltd, Laughton, Inglaterra) modelo Q150R ES, a uma corrente de 10 mA durante 10 (dez) minutos. Esta análise foi realizada no Laboratório de Microscopia do Instituto Federal de Alagoas (IFAL) com objetivo de analisar morfologicamente os HDLs sintetizados.

4.3.3 Cinética de liberação de F-

O ensaio de cinética de liberação de flúor dos produtos foi realizado durante 21 dias, segundo Silva, Duarte e Sampaio (2010). Para tanto, foram padronizadas ponteiras com 20 mm de altura e 6 mm de diâmetro e envolvidas com o pó do produto fluoretado (Mg, AI - F HDL), pesado previamente em balança analítica (60 mg). Os espécimes então, foram distribuídos individualmente em recipientes plásticos e armazenadas com 5 mL de água deionizada (etapa 1) e uma solução de ácido sulfúrico – H_2SO_4 (etapa 2).

Os ensaios realizados em ambos meios tiveram como objetivo simular e quantificar através do método direto de quantificação de flúor a liberação desse ânion iônico das amostras fluoretadas, sem a interferência da saliva, ou seja, livre da força iônica de diversos outros elementos existentes no fluido salivar. Assim, para simular o meio básico da saliva e o meio ácido de desenvolvimento da cárie, foram realizados os ensaios em uma solução de água deionizada de pH 7 e ácido sulfúrico de pH 5,5, respectivamente (SILVA; DUARTE; SAMPAIO, 2010).

As amostras foram trocadas dos tubos nos intervalos pré-determinados para aferição da liberação de flúor: 1, 2, 3, 5, 7, 14 e 21 dias. O ensaio foi feito em duplicata (para cada etapa), totalizando vinte e quatro (24) amostras.

A quantidade de flúor nas soluções foi medida usando um eletrodo sensível de íons flúor (Orion, modelo 96-09) acoplado a um aparelho analisador digital de pH/F⁻ (Procyon AS-720), previamente calibrados com uma série de soluções padrão com as seguintes concentrações de flúor (0,4; 0,8; 1,6; 3,2 e 6,4 ppm de flúor – Apêndice 1). Para análise do flúor liberado, 1 mL da amostra (Mg, AI- F HDL) foi utilizada com 1 mL do *Total Ionic Strenght Adjustment Buffer* II (TSAB II). O TSAB II é composto por: 57 mL de ácido acético (glacial) - CH₃COOH (Merck, São Paulo, Brasil), 58 g de cloreto de sódio – NaCl (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha), 4 g de ácido trans-1,2-diaminociclohexano-N, N, N, N'- tetraacético monohidratado – CDTA (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha) e 20 g de NaOH (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha) e tem como objetivo manter um meio constante de resistência iônica e decompor o flúor que possa ter formado complexos com outros íons (FRANT e ROSS JR, 1966).

Os valores obtidos em milivolts (mV) das análises feitas foram digitados em uma planilha de cálculos (Microsoft Excel Office) contendo os dados padrões com concentrações conhecidas de F⁻, obtendo-se, por conseguinte, a quantidade de flúor liberada, em ppm. Em seguida, os dados de cinética foram convertidos em porcentagem à partir da quantificação do flúor total (HMDS). A leitura das amostras foi feita em duplicata. Estas análises foram realizadas no Laboratório de Biologia Bucal da Universidade Federal da Paraíba (LABIAL/UFPB).

Em adição, a fim de avaliar a magnitude de liberação de fluoreto (F^-) de cada produto, foram obtidos valores referentes ao parâmetro cinético da área sob a curva – ASC (µg/ml x h) (*area under the curve* – AUC), proposto por Khan e Rhodes (1975) em que utilizou-se o programa computacional Graphpad Prism 7 para obtenção dos gráficos e valores de AUC.

4.3.4 Avaliação microbiológica

Para a avaliação microbiológica, cepas de *S. mutans* (ATCC 25175) foram utilizadas para ensaios *in vitro* e semeadas em meio caldo Infusão Cérebro Coração enriquecido com sacarose (*Brain Heart Infusion Broth* – BHI – HiMediaTM Laboratories Pvt Ltd, Mumbai, Índia). Uma alíquota de 300 µL das cepas bacterianas do estoque foi transferida para tubos de ensaio contendo 3 mL de BHI-caldo e incubadas por 24h a 37°C em estufa bacteriológica (ELETROlab[®], São Paulo, Brasil). Após esse período, o inóculo bacteriano foi centrifugado e suspenso em solução salina 0,9% estéril e padronizado por espectrofotômetro (FLUOstar OPTIMA, BMG LABTECH) utilizandose comprimento de onda de 640 nm. O valor 0,5 da escala de McFarland equivale a \approx 1,5 x 10⁸ UFC/mL e foi determinado por valor de absorbância de 0,135 em espectrofotometria de absorção no ultravioleta visível (UV-Vis). Todas as análises de

microbiologia, descritas a seguir, foram realizadas no Laboratório de Biologia Bucal da Universidade Federal da Paraíba (LABIAL/UFPB).

• Teste de difusão em ágar:

Para avaliar inicialmente a sensibilidade microbiológica da bactéria S. mutans frente os produtos fluoretados, foi realizada in vitro a técnica de difusão em ágar (CLSI, 2012). Para tanto, placas de petri de plástico estéreis foram preparadas com 20 mL do meio de cultura Brain Heart Infunsion Ágar (BHI-Ágar) e 400 µL do inóculo de Streptococcus mutans (ATCC 25175) espalhado com alça de inoculação estéril, após solidificação completa do meio. Em seguida, realizou-se a perfuração dos poços distribuindo-se três em cada placa. Os poços então formados foram preenchidos com 30 µL de uma solução de HDL-F em dimetilsulfóxido (DMSO) a 20% em uma concentração de 1 mg/ml (Moaty, Farghali e Khaled, 2016). Para o controle positivo foram utilizados 30 µL do digluconato de clorexidina a 0,12% (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha), e para o controle negativo utilizou-se solução salina - 0,9% de NaCl (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha), seguindo a mesma quantidade. As placas foram armazenadas em estufa bacteriológica (ELETROlab[®], São Paulo, Brasil) à 37°C por 24 horas para crescimento do microrganismo. Após a incubação, foram observados a formação ou não de halos de inibição ao redor dos espécimes e feita a medição utilizando um paquímetro.

• Teste de microdiluição em caldo:

A atividade antimicrobiana *in vitro* também foi avaliada por meio da técnica de microdiluição em meio caldo (CLSI, 2012). Para tanto, uma microplaca de 96 poços em "U" foi utilizada, onde, 60 μ L do meio BHI-caldo + 20 μ L do HDL-F (1mg/mL) + 20 μ L da bactéria foram depositados em cada poço, referente a cada amostra estudada, compreendendo uma concentração no poço de 200 μ g/mL de HDL-F. A análise foi feita em duplicata. A microplaca foi colocada em estufa por 24h a 37°C.

Após esse período, pipetou-se 35 µL do corante resazurina em cada poço e colocou-se a microplaca novamente na estufa por 1 hora e em seguida foi feita a análise visual da mudança de coloração dos poços.

O corante resazurina é um produto químico que serve para determinar a viabilidade das células bacterianas da amostra analisada, o qual permite a leitura de uma forma rápida da solução onde a mudança de cor azul para rosa, se correlaciona diretamente com a concentração de microorganismos da amostra, indicando uma reação química de óxido-redução da resazurina em resofurina. Essa mudança de coloração é interpretada como presença de células viáveis e nos poços onde não há a mudança de coloração, representa a eficácia do agente antimicrobiano, inibindo o crescimento bacteriano (MONTEJANO; GERVALDO; BERTOLOTTI, 2005).

Técnica de microdiluição em ágar (plaqueamento):

Por fim, para confirmação da ausência ou presença de bactérias presente nos poços da microplaca referida acima, foi feito o repique através do plaqueamento dos poços, em que 40 µL foi coletado do poço e pingado em uma placa de Petri com meio BHI-Ágar preparada previamente. Cada placa recebeu 3 amostras e foram então incubadas por 24h a 37°C. Após esse tempo, foi analisada em cada placa a existência de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) e quantificadas caso possível.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A tabela 6 apresenta as características de tamanho e índice de polidispersão (PDI), e potencial zeta para os HDLs. Pode ser observado então, que o diâmetro hidrodinâmico médio das partículas para a suspensão coloidal foi bem menor quando comparado ao HDL pó resultante que foi ressuspenso, provavelmente devido à aglomeração ocorrida no pó e com relação à polidispersão, segundo Souza et al. (2011), valores menores que 0,2 sugerem que a distribuição do diâmetro das partículas se encontra em uma estreita faixa, ou seja, com característica homogênea o que foi obtido para o HDL suspensão coloidal. Já, valores altos de PDI indicam heterogeneidade do diâmetro de partículas em suspensão como foi obtido para o HDL pó resultante como o micrométrico e para todos os produtos.

Nanomaterial	Grupo	Condição de síntese	Diâmetro médio hidrodinâmico de partícula (nm)	Índice de polidispersão (PDI)	Potencial zeta (mV)
Mg, AI - CI HDL micrométrico	-	-	1711	0,224	+35,6
Mg, AI – F HDL	1	2h 25⁰C	695	0,742	+27,3
Mg, AI – F HDL	1	2h 40ºC	381	0,627	+29,8
Mg, AI – F HDL	1	24h 25⁰C	363	0,550	+21,4
Mg, AI – F HDL	1	24h 40ºC	204	0,421	+28,1
Mg, AI – CI HDL suspensão coloidal	-	-	112	0,137	+39,6
Mg, AI – F HDL	2	2h 25⁰C	289	0,331	+15,5
Mg, AI – F HDL	2	2h 40ºC	289	0,555	+28,6
Mg, AI – F HDL	2	24h 25⁰C	270	0,342	+32,7
Mg, AI – F HDL	2	24h 40ºC	345	0,490	+32,6
Mg, AI – CI HDL pó resultante ressuspenso	-	-	1997	0,486	+29,8
Mg, AI – F HDL	3	2h 25⁰C	310	0,286	+29,6
Mg, AI – F HDL	3	2h 40ºC	315	0,311	+29,3
Mg, Al – F HDL	3	24h 25⁰C	300	0,289	+23,7
Mg, Al – F HDL	3	24h 40ºC	241	0,254	+24,2

 Tabela 6 - Tamanho médio, índice de polidispersão e potencial zeta dos HDLs.

Em um estudo realizado por Xu et al. (2006a) os autores avaliaram o tamanho de partícula de um HDL também cloretado (Mg, AI - CI) sob tratamento hidrotérmico de 100°C a variados tempos (4, 8,16 ou 48h) e mostraram que o tamanho da partícula foi dependente do tempo do tratamento hidrotérmico, e que, com o aumento do tempo houve também aumento do tamanho de partícula. E quando feito a 100°C e à 16h, assim como a síntese dos HDLs deste trabalho, o valor obtido de tamanho de partícula foi de 114 nm, assemelhando-se, portanto, ao resultado acima descrito para o HDL suspensão coloidal.

Com relação ao potencial zeta, as análises indicaram a obtenção de partículas de carga positiva para ambos HDLs e segundo Cunha (2012) o valor positivo de HDLs está relacionado à carga positiva da estrutura lamelar. A literatura reporta, ainda, que valores de potencial zeta para HDL cloretado variam entre +20 e +40 mV (Xu et al., 2007), corroborando os achados do presente trabalho (+39,6 mV e +26,4 mV, para o HDL suspensão coloidal e o HDL pó resultante ressuspenso, respectivamente).

5.1 Caracterização estrutural dos HDLs

A tabela 7 apresenta a quantificação em porcentagem dos elementos presentes nos HDLs.

Amostra	Grupo	Condição de	Elementos		
	e. ape	síntese	Mg %	AI %	CI %
Mg, AI - CI HDL micrométrico	1	-	$6,9 \pm 0.06$	2,5 ± 0,02	9,6 ± 0,01
Mg, AI – F HDL	1	2h 25⁰C	13 ± 0.05	$5,2 \pm 0,02$	$1,5 \pm 0,005$
Mg, AI – F HDL	1	2h 40ºC	$13,3 \pm 0,06$	$5,5 \pm 0,02$	$1,7\pm 0,007$
Mg, AI – F HDL	1	24h 25⁰C	$12,8 \pm 0,05$	$5,3 \pm 0,02$	$1,3 \pm 0,006$
Mg, AI – F HDL	1	24h 40⁰C	13 ± 0.05	$5 \pm 0,02$	1,3 ± 0,006
Mg, AI - CI HDL suspensão coloidal	2	-	14 ± 0,05	5 ± 0,02	$5,7 \pm 0,005$
Mg, AI – F HDL	2	2h 25⁰C	$14 \pm 0,05$	5 ± 0,019	$1 \pm 0,004$
Mg, AI – F HDL	2	2h 40ºC	$14 \pm 0,058$	4 ± 0,021	$1 \pm 0,005$
Mg, AI – F HDL	2	24h 25⁰C	13 ± 0,049	4 ± 0,018	$0,9 \pm 0,003$
Mg, AI – F HDL	2	24h 40⁰C	13 ± 0,048	$4 \pm 0,017$	-
Mg, AI - CI HDL pó resultante	3		14 ± 0,05	5 ± 0,02	$5,7 \pm 0,005$
Mg, AI – F HDL	3	2h 25⁰C	12 ± 0.04	$4 \pm 0,016$	-
Mg, AI – F HDL	3	2h 40ºC	12 ± 0.04	5 ± 0,019	-
Mg, AI – F HDL	3	24h 25ºC	11 ± 0.04	4 ± 0,015	-
Mg, AI – F HDL	3	24h 40ºC	$13 \pm 0,05$	5 ± 0,021	-

 Tabela 7 - Quantificação dos elementos presentes nos HDLs.

Os resultados da análise de proporção dos elementos presentes nas amostras confirmaram a razão entre os cátions nos HDLs precursores de aproximadamente 3:1 (Mg/Al), além da presença do elemento Cl, confirmando, assim, que houve a formação do HDL através da presença dos dois cátions metálicos: magnésio (Mg) e alumínio (Al) e do ânion cloreto (Tabela 7). A literatura, porém, reporta que a técnica de EDX não é tão precisa porque os cátions Mg²⁺ ou Al³⁺ apresentam picos de emissão muito próximos e podem, por isso interferir no resultado da análise (CUNHA e CORREIA, 2011).

Assim como para os HDLs precursores, valores proporcionais dos elementos presentes nos produtos fluoretados foram encontrados, assemelhando-se a razão 3:1 dos cátions em que foi possível observar coerência de valores aproximados entre os cátions Mg e Al para os três grupos.

Ainda com base nos resultados obtidos, foi perceptível que, para os produtos do grupo 1, referente ao HDL precursor micrométrico, para todas as condições de síntese o íon cloreto (CI⁻) foi quantificado, porém em menores proporções quando comparado ao precursor, sugerindo uma troca aniônica parcial do CI⁻ pelo F⁻.

Para o grupo 2, proveniente da síntese com o precursor Mg, AI – CI HDL suspensão coloidal, o íon cloreto também ainda pôde ser quantificado (≈1%), sugerindo também uma troca aniônica parcial. Apenas o produto de 24h 40°C reproduziu o resultado do grupo 3, em que o íon cloreto não foi quantificado em nenhum dos produtos, sugerindo assim, que houve uma troca aniônica total do Cl⁻ pelo F⁻.

Xu et al. (2006a) também utilizando a técnica de espectrometria de fluorescência de raios X por energia dispersiva (EDX), objetivando a troca iônica do Cl⁻ pelo SO²⁻₄ em compostos do tipo HDL revelaram a presença dos cátions magnésio (Mg) e alumínio (AI), além da presença desses ânions no espectro.

Com relação ao DRX, os difratogramas dos HDLs precursores (Figura 10) se mostraram característicos se comparados com o padrão cristalográfico da argila vistos nos trabalhos de Cardoso (2002) e Cunha e Correia (2011) com a observação dos planos basais: d(003), d(006), d(009/012), d(015), d(018), d(110) e d(113).

O valor do espaçamento basal d(003) para todos os HDLs cloretados foi de 7,9 Å, o que se assemelha com os valores descritos na literatura quando da presença do ânion cloreto (VIEIRA, 2009; BOTAN; NOGUEIRA; LONA, 2011). Este valor corresponde à soma do diâmetro do íon cloreto (3,1 Å) com a espessura da lamela do HDL (4,8 Å), como ilustrado na figura 11. Picos decorrentes de impurezas também foram observados nos difratogramas e a ocorrência destes é bem descrita na literatura por Bauduino (2016).

Figura 10 - Difratograma dos HDLs precursores: A) Mg, AI - CI HDL micrométrico e B) Mg, AI – CI HDL nanométrico pó resultante.



Figura 11 - Esquema do Mg, Al - Cl HDL.



Fonte: adaptado de Choudary et al., 2002.

Os difratogramas dos produtos (HDLs fluoretados) dos três grupos estudados, com as variações de parâmetros de síntese, são apresentados nas figuras 12, 13 e 14, respectivamente.

B) A) 1000 · 1000 Mg, AI – F HDL 2h25°C Mg, AI – F HDL 24h25°C 11,52 / 494 Mg, AI – F HDL 24h40°C 11,3 / 503 Mg, AI – F HDL 2h40°C d (003) = 7,6A d(003) = 7,8A Mg, AI – CI HDL Mg, AI – CI HDL 800 800 11,54 / 418 11,54 / 418 d (003) = 7,6A d(003) = 7,6A 11,26 / 178 11,26 / 178 Intensidade (a.u.) 600 600 d (003) = 7,9A d(003) = 7,9A Intensidade (a.u.) 400 400 200 200 0 30 50 60 70 80 10 20 40 60 70 80 90 10 20 30 40 50 90 2 theta (graus) 2 theta (graus) 1000 11,52 / 494 Mg, AI – F HDL 2h40°C 1000 Mg, AI – F HDL 2h25°C Mg, AI – F HDL 24h40°C Mg, AI – CI HDL d (003) = 7,6A C) D) Mg, AI – F HDL 24h25°C 11,3 / 503 800 -11,54 / 418 – Mg, AI – CI HDL d(003) = 7,8A d(003) = 7,6A 800 11,54 / 418 11,26 / 178 d (003) = 7,6A Intensidade (a.u.) 600 · d(003) = 7,9A 11,26 / 178 d (003) = 7,9A 600 Intensidade (a.u.) 400 400 200 200 0 o – 60 10 20 30 40 50 70 80 90 20 30 50 60 80 10 40 70 90 2 theta (graus) 2 theta (graus)

Figura 12 - Grupo 1: Difratogramas obtidos do HDL precursor micrométrico e dos produtos fluoretados: A) Em 2 horas de agitação; B) Em 24 horas de agitação; C) Em 25°C de temperatura e D) Em 40°C de temperatura.

Fonte: própria autoria, 2018.



Figura 13 - Grupo 2: Difratogramas obtidos do HDL precursor nanométrico suspensão e dos produtos fluoretados: A) Em 2 horas de agitação; B) Em 24 horas de agitação; C) Em 25°C de temperatura e D) Em 40°C de temperatura.

Figura 14 - Grupo 3: Difratogramas obtidos do HDL precursor nanométrico pó e dos produtos fluoretados: A) Em 2h de agitação; B) Em 24 horas de agitação; C) Em 25°C de temperatura e D) Em 40°C de temperatura.



A literatura reporta que quando ocorre a intercalação do íon F⁻ no HDL, ocorre um pequeno deslocamento do plano d(003) para maiores valores de ângulo de difração (2 theta) e, por conseguinte, uma diminuição do espaçamento basal relativo ao Mg, Al – Cl HDL precursor (d003 = 7,9 Å) (LIMA et al. 2012; IGUCHI et al., 2016; KAMEDA et al., 2015a; KAMEDA et al., 2015b; TAMMARO et al., 2014). Isto se deve à elevada eletronegatividade do fluoreto, bem como um menor raio atômico em relação ao cloreto. Esse ânion, então, é capaz de tornar as ligações de hidrogênio entre as lamelas mais atrativas, o que influencia no crescimento dos cristais e acarreta uma menor distância interlamelar (LIMA et al., 2012; WU et al., 2007; IGUCHI et al., 2016). Este achado confirmou a presença do fluoreto em todos os produtos, independente da condição de síntese utilizada, corroborando com os resultados de EDX. Mas, apesar do EDX ter indicado troca aniônica total nos produtos do grupo 3, a redução do espaçamento basal apresentada pelos difratogramas foi menos relevante que as demais (0,1 Å *versus* 0,3 Å).

Ainda, os demais planos de difração da estrutura dos HDLs precursores estão também presentes em todos os produtos e, de modo geral, foi notado aumento da cristalinidade nos HDLs fluoretados em comparação aos HDLs cloretados o que indica a acomodação ordenada do F⁻ dentro da região interlamelar (TAMMARO et al., 2014). Esta maior cristalinidade é mais pronunciada nos produtos dos grupos 2 e 3, ou seja, cujo precursor passou por tratamento hidrotérmico, o que se justifica, pois, segundo Reis (2009), o tratamento hidrotérmico impacta em melhor organização estrutural, cristalinidade e pureza de fase de um HDL. Entre os dois grupos, os produtos que utilizaram como precursor Mg, AI – CI HDL suspensão coloidal se mostrou mais cristalino, sugerindo que o processo de liofilização tenha interferido nessa propriedade. Moriyama, Sasaki e Hirajima (2016), em um estudo em que compararam a utilização da liofilização de um HDL (Mg, AI – CI) com a secagem normal em estufa, objetivando a melhor adsorção de flúor, observaram o mesmo, ou seja, a liofilização deixou as partículas do HDL menos cristalinas.

Os espectros de infravermelho dos HDLs precursores são representados na figura 15.



Figura 15 - Espectro de FTIR dos precursores: A) Mg, AI - CI HDL micrométrico e B) Mg, AI - CI HDL nanométrico pó resultante.

Fonte: própria autoria, 2018.

É possível observar a formação dos seguintes sinais: banda larga centrada em 3445 cm⁻¹ característica de um modo de deformação axial assimétrica dos grupos hidroxilas (vOH) das lamelas e das moléculas de água interlamelares. Em 2056 cm⁻¹ aparece uma banda característica do CO₂ do meio. Em 1638 cm⁻¹ ocorre um sinal de deformação angular (δ H₂O) correspondente ao grupo OH de moléculas de água adsorvida ou da água interlamelar (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 1962; CHOUDARY et al., 2002; ISLAM e PATEL, 2009). Além disso, ocorre uma fraca absorção no espectro em 1355 cm⁻¹ que é atribuída ao modo de estiramento ou deformação axial assimétrica do ânion carbonato [v(CO₃²⁻)] que pode ter se formado devido à absorção de gás CO₂ atmosférico durante a lavagem (ISLAM e PATEL, 2009; XU et al., 2006b), assim como também em 1097 cm⁻¹ (ELHALIL et al., 2016). Na região em torno de 800 cm⁻¹ são observadas bandas relativas à presença de metal, neste caso, Mg e Al, ligados a grupos hidroxila (CHOUDARY et al., 2002; ISLAM e PATEL, 2009; KLOPROGGE e FROST, 1999).

Os espectros de infravermelho dos HDLs fluoretados dos três grupos estudados, com as variações de parâmetros de síntese, podem ser conferidos nas figuras 16, 17 e 18, respectivamente.



Figura 16 - Grupo 1: Espectros de FTIR/KBr obtidos do HDL precursor micrométrico e dos produtos fluoretados: A) Em 2h de agitação; B) Em 24 horas de agitação; C) Em 25°C de temperatura e D) Em 40°C de temperatura.

Fonte: própria autoria, 2018.



Figura 17 - Grupo 2: Espectros de FTIR/KBr obtidos do HDL precursor nanométrico suspensão e dos produtos fluoretados: A) Em 2h de agitação; B) Em 24 horas de agitação; C) Em 25°C de temperatura e D) Em 40°C de temperatura.



Figura 18 - Grupo 3: Espectros de FTIR/KBr obtidos do HDL precursor nanométrico pó e dos produtos fluoretados: A) Em 2h de agitação; B) Em 24 horas de agitação; C) Em 25°C de temperatura e D) Em 40°C de temperatura.

59

Para todos os três grupos estudados, verifica-se a semelhança das bandas dos HDLs fluoretados quando comparados ao espectro dos HDLs precursores. Como já descrito para os últimos, são observados modos vibracionais relativos aos grupos ν OH, CO₂, δ H₂O e ν (CO₃²⁻) em todos os produtos, confirmando a presença destes mesmos grupos funcionais, corroborando com o estudo de Batistela et al. (2011).

Segundo Benício et al. (2015), as bandas principais relacionadas aos ânions intercalados e/ou adsorvidos são observadas entre 1800 - 1000 cm⁻¹. Quando existe a presença do fluoreto, a banda relativa ao CO_3^{2-} (1355 cm⁻¹) muda para uma maior frequência, compreendendo valores centrados em 1385 cm⁻¹ (LV et al., 2006; TAMMARO et al., 2014). Tal fato pôde ser observado nos resultados do presente trabalho em que a banda correspondente ao CO_3^{2-} variou de 1383 a 1385 cm⁻¹, corroborando com a literatura.

A fim de concluir a caracterização estrutural dos produtos apresenta-se na tabela 8 a quantificação do flúor total dos HDLs fluoretados, obtida pelo método de HMDS. Os HDLs precursores foram utilizados como controles da análise e, como esperado, não apresentaram valores quantificáveis de flúor.

Amostra	Grupo	Condições de Síntese	Média (DP) da concentração de F⁻total (ppm)
Mg, AI – CI HDL micrométrico	1	-	-
Mg, AI – F HDL	1	2h, 25°C	979,20 ± 67
Mg, AI – F HDL	1	2h, 40°C	985,52 ± 111
Mg, AI – F HDL	1	24h, 25°C	561,60 ± 86
Mg, AI – F HDL	1	24h, 40°C	1097,52 ± 223
Mg, AI – CI HDL nanométrico	2	-	-
1Mg, AI – F HDL	2	2h, 25°C	594,10 ± 34
Mg, AI – F HDL	2	2h, 40°C	739,20 ± 146
Mg, AI – F HDL	2	24h, 25°C	510,14 ± 25
Mg, AI – F HDL	2	24h, 40°C	610,88 ± 68
Mg, AI – CI HDL nanométrico	3	-	-
Mg, AI – F HDL	3	2h, 25°C	732,20 ± 36
Mg, AI – F HDL	3	2h, 40°C	851,28 ± 17
Mg, AI – F HDL	3	24h, 25°C	123,10 ± 13
Mg, AI – F HDL	3	24h, 40°C	$635,00 \pm 40$

Tabela 8 - Concentração de F⁻ dos HDLs fluoretados.

Inicialmente à partir da técnica de quantificação do flúor total por HMDS, é possível observar que todos os produtos dos três grupos analisados apresentaram flúor em sua composição, o que, em conjunto com as demais técnicas já descritas, caracterizam os produtos como HDLs fluoretados. Ademais, esta técnica permitiu, também, avaliar a influência das condições de síntese (Tabela 8).

Assim, para todos os produtos, quando houve aumento da temperatura, independente do tempos de agitação, obteve-se maior concentração de flúor. Este resultado corrobora com os estudos de Batistela et al. (2011), Lv et al. (2006), Lv et al. (2007) e Kameda et al. (2015a), que também avaliaram a adsorção de fluoretos em HDLs e obtiveram melhores resultados de flúor quando a temperatura foi aumentada.

Com relação ao tempo de agitação, ou seja, ao tempo de contato do HDL com a solução fluoretada (NaF), verifica-se que, para os 3 grupos (Tabela 8), quando o tempo foi aumentado de 2 para 24 h, houve redução na quantidade de flúor, apenas com exceção do produto submetido a 40°C do grupo 1, em que ocorreu o inverso.

O que difere do estudo de Koilraj e Kannan (2013) que avaliaram a captação de fluoreto em diferentes tempos de contato usando 1 g/L do HDL precursor (ZnCr₃-NO₃-HDL) em 50 mg/L de uma solução fluoretada. Os autores encontraram um equilíbrio de adsorção do ânion (F⁻) em 1 h, mas com o aumento do tempo de contato para 3 h, maiores quantidades de fluoreto no material foram alcançadas (31 mgF/g).

Kameda et al. (2015b), utilizando um HDL precursor do tipo Mg, AI – NO₃, também em um estudo de adsorção via troca iônica do nitrato pelo fluoreto, verificaram que com o aumento do tempo de agitação de 8 pra 25 h houve melhores resultados para a concentração de flúor no material.

Em resumo, sugere-se que nos produtos dos grupos 2 e 3, a melhor condição foi a de menor tempo de agitação a uma maior temperatura (739,20 e 851,28 ppm de flúor, respectivamente); já no grupo 1, a melhor condição foi a de maior tempo de agitação, também em maior temperatura (1197,52 ppm de flúor). Logo, diante dos produtos obtidos, o produto Mg, AI – F HDL na condição 24h, 40°C do grupo 1, ganha destaque pela maior quantidade de flúor encontrada (1097,52 ppm).

5.2 Caracterização térmica dos HDLs

A figura 19 mostra as curvas térmicas dos HDLs precursores com as suas derivadas. Os comportamentos térmicos foram característicos do padrão termogravimétrico da argila, com a observação de duas etapas de perdas de massa (CHOUDARY et al., 2002; ISLAM e PATEL, 2009; BENÍCIO et al., 2015).

Na figura 19A, correspondente ao Mg, AI – CI HDL micrométrico, a primeira perda de massa foi de 14,5% e ocorreu desde 33°C até aproximadamente 98,25°C. Esta degradação térmica corresponde à perda de água superficial adsorvida e à água interlamelar, estágio este reversível, sem perda da estrutura lamelar (BENÍCIO et al., 2015). A segunda perda de massa foi de 19,73% e ocorreu entre 360,42°C até 441,95°C. Nesta etapa ocorre a desidroxilação estrutural e a consequente perda da estrutura lamelar, assim como a perda do ânion, acompanhada da formação de HCI. Logo, houve uma perda de massa total em torno dos 34,2%, permanecendo o material com 65,8% em massa ao término dos 800°C.

Na figura 19B, na curva térmica referente ao pó resultante do Mg, AI – CI HDL suspensão coloidal, são observados os mesmos eventos, mas com alteração tanto das faixas de temperatura, como do percentual de perda de massa. A primeira perda (12,3%) ocorreu entre 95,1 a 211,6°C e a segunda perda foi de 26,9% entre 334,9 a 390,9°C. Houve então, 39,2% de perda de massa total, com 60,8% em massa do material ao término dos 800°C.



Figura 19 - Curvas térmicas dos HDLs precursores: A) Mg, AI - CI HDL micrométrico; B) Mg, AI - CI HDL nanométrico pó resultante.

Fonte: própria autoria, 2018.

As figuras 20, 21 e 22 apresentam as curvas térmicas dos três grupos de produtos fluoretados estudados, com as suas derivadas (DTG). Já as figuras 23, 24 e 25 mostram as curvas térmicas dos três grupos de produtos fluoretados estudados com as variações de parâmetros de síntese.





Fonte: própria autoria, 2018.



Figura 21 - Grupo 2: Curvas térmicas (TG/DTG) obtidas dos produtos fluoretados à partir do HDL precursor nanométrico suspensão. A) Produto 2h25°C; B) Produto 24h25°C; C) Produto 2h40°C e D) Produto 24h40°C.

Fonte: própria autoria, 2018.

65



Figura 22 - Grupo 3: Curvas térmicas (TG/DTG) obtidas dos produtos fluoretados à partir do HDL precursor nanométrico pó. A) Produto 2h25°C; B) Produto 24h25°C; C) Produto 2h40°C e D) Produto 24h40°C.

Fonte: própria autoria, 2018.



Figura 23 - Grupo 1: Curvas térmicas obtidas do HDL precursor micrométrico e dos produtos fluoretados: A) Em 2h de agitação; B) Em 24 horas de agitação; C) Em 25°C de temperatura e D) Em 40°C de temperatura.



Figura 24 - Grupo 2: Curvas térmicas obtidas do HDL precursor nanométrico suspensão e dos produtos fluoretados: A) Em 2h de agitação; B) Em 24 horas de agitação; C) Em 25°C de temperatura e D) Em 40°C de temperatura.

Mg, AI – F HDL nano 24h25°C Mg, AI – F HDL nano 2h25°C Mg, AI – F HDL nano 2h40°C Mg, AI – CI HDL nano pó Mg, Al – F HDL nano 24h40°C Mg, Al – Cl HDL nano pó A) B) 85 -% massa % massa 70 -60 · Temperatura ([°]C) Temperatura (⁰C) Mg, AI – F HDL nano 2h25°C Mg, AI – F HDL nano 24h25°C Mg, AI – F HDL nano 2h40°C Mg, AI – F HDL nano 24h40°C C) D) Mg, AI – CI HDL nano pó Mg, AI – CI HDL nano pó 80 -% massa % massa 70 -60 -Temperatura ([°]C) Temperatura (⁰C)

Figura 25 - Grupo 3: Curvas térmicas obtidas do HDL precursor nanométrico pó e dos produtos fluoretados: A) Em 2h de agitação; B) Em 24 horas de agitação; C) Em 25°C de temperatura e D) Em 40°C de temperatura.

Fonte: própria autoria, 2018.

Os resultados mostraram que todos os produtos apresentaram também duas perdas de massa assim como os precursores cloretados, configurando perfis térmicos semelhantes. Desta forma, no geral, a primeira perda de massa dos HDLs fluoretados é em torno de 13 a 17% e ocorre em temperaturas de 74,85 a 219,7°C, correspondendo também a perda de água adsorvida na superfície e interlamelar. Em seguida, ocorre a segunda perda de massa em torno dos 25% em temperaturas que variam de 220 e 468°C o que corresponde a desidroxilação e perda de estrutura lamelar, com consequente formação de HF. O mesmo pode ser visto nos estudos de Lima et al. (2012), Wu et al. (2007), Iguchi et al. (2016), e Lv et al. (2006). Na tabela 9 é possível conferir os valores de perda de massa dos HDLs em função da temperatura.

HDLs Gr	•	Grupo Condição de síntese	Perda de Massa (%) / Temperatura (°C)		
	Grupo		1 ^a	2 ^a	de massa
Mg, AI – CI HDL micrométrico	1	-	14,5 % / 33,01 – 98,25 °C	19,73 % / 360,42 – 441,95°C	34,2 %
Mg, AI – F HDL	1	2h 25⁰C	16,97 % / 74,85 - 199,39°C	23,4% / 336,73 - 428,23°C	40,3%
Mg, AI – F HDL	1	2h 40ºC	16,79 % / 96,21 - 203,38°C	22,87% / 330,09 - 423,7°C	39,6%
Mg, AI – F HDL	1	24h 25⁰C	17,46 % / 92,51 - 205,65°C	23,77 % / 327,52 - 429,04°C	41,2%
Mg, AI – F HDL	1	24h 40ºC	16 % / 113,97 - 211,76°C	23,12 % / 331,20 - 432,01°C	39,1%
Mg, AI – CI HDL nanométrico	2	-	12,3 % / 95,1 – 211,6 °C	26,9% / 334,9 – 390,9 °C	39,2%
Mg, AI – F HDL	2	2h 25⁰C	14,5 % / 139,7 – 212,8°C	25,2 % / 327,6 - 442°C	39,7%
Mg, AI – F HDL	2	2h 40ºC	14,6 % / 133,8 – 212,7°	25,1 % / 342,9 – 439,7°C	39,7%
Mg, AI – F HDL	2	24h 25⁰C	14,4 % / 144,3 – 213,9°C	25,1 % / 333,2 – 451,6°C	39,5%
Mg, AI – F HDL	2	24h 40⁰C	14,9 % / 150,9 – 214,5°C	26,3 % / 349 – 446,5°C	41,2%
Mg, AI – CI HDL nanométrico	3	-	12,3 % / 95,1 – 211,6 °C	26,9% / 334,9 – 390,9 °C	39,2%
Mg, AI – F HDL	3	2h 25⁰C	13,4 % / 166,1 – 219,6°C	26,6 % / 220 – 353,1°C	40%
Mg, AI – F HDL	3	2h 40ºC	14, 1 % / 162,1 - 217°C	24,7 % / 319,9 - 468°C	38,8%
Mg, AI – F HDL	3	24h 25⁰C	14,9 % / 164,3 – 216,6°C	26,7 % / 403,3 – 447,2°C	41,6%
Mg, AI – F HDL	3	24h 40⁰C	13,7 % / 166,3- 219,7°C	26,7% / 220 – 341,3°C	40,4%

Tabela 9 - Valores referentes a perda de massa dos HDLs a partir do TGA.

Fonte: própria autoria, 2018.

No grupo 1 (Figura 23), é visto que inicialmente todos os HDLs fluoretados apresentaram maior perda de massa do que o HDL precursor micrométrico, em torno

de 3%, para todas as condições de síntese. Na segunda perda, valores em torno dos
4% a mais foram observados. Também é possível verificar que maiores temperaturas
de decomposição foram necessárias para primeira etapa de perda de massa quando
comparados ao HDL precursor.

Para os grupos 2 e 3 (Figuras 24 e 25), observa-se que para o primeiro estágio de decomposição, todos os HDLs fluoretados apresentaram 2% a mais de perda de massa que o HDL cloretado. E com relação a outra etapa, o percentual de perda de massa foi quase igual para todos os produtos assim como para o precursor (≈1%). Temperaturas mais elevadas também foram observadas durante as fases de decomposição para todos os produtos destes grupos, quando comparados ao HDL nanométrico.

De forma geral, foi observado que a estabilidade térmica dos produtos fluoretados foi melhor que a dos precursores, fato que pode ser explicado pela presença do fluoreto na estrutura do HDL, pois este íon forma fortes ligações de hidrogênio, aumentando a interação entre as moléculas e dificultando sua perda de estrutura, necessitando, portanto, de valores mais elevados de temperatura quando comparado com o HDL precursor para que seja decomposto (LIMA et al, 2012; WU et al., 2007; Lv et al., 2006). Este fato também corrobora com a escala de estabilidade do HDL quando da presença do ânion fluoreto em comparação ao ânion cloreto como já descrito por REIS (2009) e MYATA (1983).

5.3 Caracterização morfológica dos HDLs

As micrografias obtidas por MEV dos Mg, AI – CI HDLs precursores são apresentadas pelas figuras 26 e 27.

As imagens foram analisadas em ampliações de 300x e 2000x e revelaram para o HDL micrométrico um aglomerado de partículas, semelhantes as descritas por Islam e Patel (2009) e por Donato et al. (2012). Já para o HDL nanométrico, são observadas partículas mais dispersas em formato de folhas finas como descritas por Xu et al. (2006). **Figura 26 -** Estrutura e morfologia do HDL precursor: Mg, AI - CI HDL micrométrico obtido do MEV. Em A) aumento de 300x; B) aumento de 2000x.



Fonte: própria autoria, 2018.

Figura 27 - Estrutura e morfologia do HDL precursor: Mg, AI - CI HDL nanométrico obtido do MEV. Em A) aumento de 300x; B) aumento de 2000x.



Fonte: própria autoria, 2018.

As micrografias dos HDLs fluoretados, com as variações de parâmetros de síntese, podem ser observadas nas figuras 28 (grupo 1), 29 (grupo 2) e 30 (grupo 3).

Segundo Benício et al. (2015), o tamanho e a forma dos HDLs variam de acordo com o método de preparação e composição química dos materiais. Dessa forma é possível observar que as micrografias para todos os produtos fluoretados revelaram maiores partículas quando comparadas aos HDLs precursores, variados tamanhos e superfícies irregulares.
Condição de síntese	Ampliação de 300x	Ampliação de 2000x
Mg, AI – F HDL 2h25°C		EBHR 500W WD MA1mm Here 1000 Year hads 600 pm Det 51 X0 pm
Mg, AI – F HDL 2h40°C	END 5.001 WC M4.0011 11111111 VEGAS ESCAIL Marchisol 401 Del 201 100 del 100 d	Maximum (Marka) Marka (Marka) Marka (Marka) SEMIND 5.0 AV W15.45.45 mm Marka Vew Mode 00-3 mm Determine(5: 04.777) Marka SEMIND 5.0 AV W15.45.45 mm Marka Vew Mode 00-3 mm Marka Marka
Mg, AI – F HDL 24h25°C	SEM HV2.50 kV WD: 34.97 mm IIII. VEX.3000CA SEM HV2.50 kV WD: 34.97 mm III. III.	SEMIN2.50 kV VD2:14.95 mm Puter Model Puter Model VECA3 TESCAM View Model.67.8 Junit Determinity; 04/2777 Puter Puter Model Puter Model Puter Model COLAMUS MACCIOLAB COLIMICA
Mg, AI – F HDL 24h40°C	Mithle 50.0W Mithle 50.2000 Mithle 50	View Mode 26 Jun We 142 min Marce 14 Jun 24

Figura 28 - Imagens de MEV para o grupo 1, em todas as condições. Em ampliação de 300x e 2000x.

Fonte: própria autoria, 2018.

Condição de síntese	Ampliação de 300x	Ampliação de 2000x
Mg, AI – F HDL 2h25°C	VEMUE 5.01W VE7.41.09 mm VEAL115CAL	SEN HV. S. S.W WC: 43.6 mm
Mg, AI – F HDL 2h40°C	SLII MAG:301 x Det: SI 100 µm View Hold: 460 µm guest BALCABIUS MACIDI ABLOUMACA View Hold: 460 µm Guest BALCABIUS MACIDI ABLOUMACA	Staff Mod. 201 SX UPL'SX UPL'SX UPL'SX Work Hold: 68.7 JW General UPL'SX UPL'SX Staff Mod. 201 SX UPL'SX UPL'SX UPL'SX
Mg, AI – F HDL 24h25℃	Vew Rede: 401 µm Guest FALCAMPUS MACEOR AB QUINECA SEM HV7.50 kV WD:15.25 mm IIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIII	View Rold: 692 µm guest IFALCAMPUS MACEDITAB.OUNMCA SEM MP: 5.0 kV WD: 14.00 mm
Mg, AI – F HDL 24h40°C	EkHrs 58 kV VO: 15.24 min VO: 15	SEM H/2 5.0 k/ WD: 13.12 mm SEM H/2 5.0 k/ WD: 13.12 mm June 100 June 100 SEE MAG: 20.3 bx Dec 50 June 100 June 100 SEE MAG: 20.3 bx Dec 50 June 100 June 100

Figura 29 - Imagens de MEV para o grupo 2, em todas as condições. Em ampliação de 300x e 2000x.

Fonte: própria autoria, 2018.

Condição de síntese	Ampliação de 300x	Ampliação de 2000x
Mg, AI – F HDL 2h25°C		
Mg, Al – F HDL 2h40°C	Stali Mo 25.0 kV WO: 15.66 mm	Stat MAC 1994 AT 1012 1992 1997 1997 1997 1997 1997 1997 19
Mg, AI – F HDL 24h25°C	SEM MAC 300 2 (Determining CH2/11/) BALCARDOS MACEDOLAS COMPCA SEM MAC 504 VI OP 1511 mm	SEM MAG: 1.9 bx Date(m3/)? 04/27/1 III.0.CAMPUS MACEDULAIL.GUILINCA VEGA3 TESCAM VECA3 TESCAM VECA3 TESCAM SEM MAG: 1.99 bx Date(m3/)? 04/27/1 VECA3 TESCAM
Mg, AI – F HDL 24h40°C		

Figura 30 - Imagens de MEV para o grupo 3, em todas as condições. Em ampliação de 300x e 2000x.

Fonte: própria autoria, 2018.

5.4 Cinética de liberação de F⁻ dos HDLs fluoretados

A análise de liberação de F⁻ realizada durante os 21 dias, para cada condição de síntese em ambos meios (neutro e ácido) nos três grupos estudados, revelou curvas cinéticas que podem ser observadas nas figuras 31, 32 e 33, respectivamente. Ademais, os valores de AUC em μ g/ml x h, podem ser observados nos gráficos (Figura 31, 32 e 33).



Figura 31 - Gráficos da cinética de liberação de flúor (F⁻⁾ para o grupo 1, em todas as condições de síntese.

Fonte: própria autoria, 2018.



Figura 32 - Gráficos da cinética de liberação de flúor (F⁻) para o grupo 2, em todas as condições de síntese.

Fonte: própria autoria, 2018.



Figura 33 - Gráficos da cinética de liberação de flúor (F⁻) para o grupo 3, em todas as condições de síntese.

Fonte: própria autoria, 2018.

Com relação aos resultados obtidos à partir da quantificação do flúor iônico através da cinética realizada em ambos os meios (neutro e ácido) representados nas figuras 31, 32 e 33, verifica-se perfis de liberação de F⁻, que relacionam a porcentagem desse íon liberada do produto versus o tempo decorrido durante o experimento, totalizando os 21 dias. Assim, é possível realizar uma análise comparativa com relação ao comportamento *in vitro* dos HDLs fluoretados, envolvendo parâmetros relacionados a (i) quantidade máxima de F⁻ liberada durante o tempo pré-estabelecido; (ii) velocidade de liberação do F⁻ e (iii) a magnitude de liberação desse íon (AUC).

É visto, portanto, que de modo geral, apesar da diferença na porcentagem de liberação registrada entre os produtos no meio neutro e ácido, a característica comportamental ou o padrão de liberação de flúor predominante compreendeu perfis logarítmicos de liberação, em que o meio ácido implicou em maiores valores quantificáveis desse íon para todos os produtos analisados, com exceção apenas para o produto Mg, AI – F HDL 2h25°C do grupo 3, com 6% de liberação em ambos os meios. Ademais, com relação ao percentual de liberação total de F⁻, destacou-se o produto Mg, AI – F HDL 24h25°C em todos os 3 grupos. E dentre os produtos desta condição, destaca-se o Mg, AI – F HDL-F 24h25°C do grupo 3 (Figura 33), com 45,7% (pH 7,0) e 46,6% (pH 5,5) de F⁻ e AUC = 781,4 e 782,1 µg/mL x h, respectivamente, ao final do ensaio. Inobstante, foi o produto que apresentou um menor valor quantificável de flúor total quando comparado aos outros produtos.

A dispersão inicial de íons de flúor durante os primeiros dias pode ser importante clinicamente devido a formação de fluoreto de cálcio na superfície do esmalte, além disso alguns efeitos biológicos podem ser observados, como ação bactericida e/ou bacteriostática do material, porém uma liberação mais lenta e controlada tem um efeito mais significativo pois mais flúor na cavidade bucal proporcionará mais ação remineralizante da estrutura dentária (AHN et al., 2011; CURY et al., 2016).

O processo de des-remineralização dentária está intimamente relacionado com a presença constante de íons flúor na cavidade bucal. Tal fato, deve-se a formação da fluorapatita que se forma quando a hidroxila (OH⁻) presente da hidroxiapatita que constitui o esmalte dentário é substituída pelos fluoretos. A fluorapatita, por sua vez, apresenta maior capacidade de precipitar em baixo pH, contrabalanceando a perda mineral sofrida pelo esmalte e dentina durante a desmineralização, retardando assim o desenvolvimento da cárie dentária (MEIRA, 2015). É sabido, portanto, que o fluoreto (F⁻) liberado no meio bucal interfere na dinâmica da cárie e atua como um fator de proteção da doença exercendo um papel preventivo mesmo em baixas concentrações. Logo, seu principal efeito anticárie ocorre quando ele está presente no meio bucal na sua forma livre (iônica), solúvel e sua elevada concentração contínua no meio bucal é uma ótima vantagem no processo de desmineralização e remineralização dentária (CURY e TENUTA, 2009; CURY et al., 2016; TENUTA e CURY, 2010; FUKUSHIMA et al., 2000; HELLWIG e LENNON, 2004; BUSALAF et al., 2011).

Nesse contexto, métodos melhorados de entrega de flúor assim como materiais com potencial liberação desse íon tem sido bastante estudados e avaliados, visando uma liberação lenta e prolongada desse ânion (FUKUSHIMA et al., 2000; XU et al., 2006b; NGUYEN et al. (2017). Segundo Khan et al. (2013), os materiais restauradores com alta capacidade de liberação de flúor são clinicamente importantes e desejáveis porque podem manter sua ação anticariogênica por mais tempo. Porém, segundo Al-Dehailan et al. (2017), a literatura ainda é escassa em estudos sobre a cinética do flúor no meio intra-oral, mais especificamente na saliva e no biofilme. Dois estudos já reportados com o uso de verniz fluoretado analisou a quantidade de flúor na saliva e verificou aumentos consideráveis desse íon persistindo por até 6h e 24h (TWETMAN; SHOLD-LARSSON; MODEER, 1999; EAKLE et al., 2004). Já avaliando a presença de flúor no biofilme, utilizando verniz fluoretado, os autores obtiveram níveis elevados de fluoreto por um período de até uma semana (SKOLD-LARSSON; MODEER; TWETMAN, 2000).

Vê-se, então, que os resultados do presente trabalho em ambos meios sugerem um eficácia na ação anticárie, visto que são materiais que liberam flúor e permitem uma crescente liberação desse íon com o passar dos dias (21), o que é esperado clinicamente já que mais flúor estará disponível no meio bucal promovendo a remineralização da estrutura dentária, assim como relatado por Cury et al. (2016).

Tammaro et al. (2014), avaliaram o efeito de um hidróxido duplo lamelar também fluoretado micrométrico incorporado em uma resina composta e a sua propriedade de liberação de F⁻ por 160 dias objetivando uma liberação lenta e controlável desse íon na cavidade bucal. Obtiveram, portanto, um comportamento semelhante com os resultados do presente estudo, em que com o passar dos dias mais flúor foi sendo liberado. Segundo os autores, este fenômeno deve-se à estrutura lamelar da argila inorgânica que permite uma boa ancoragem dos íons assim como

uma boa acomodação do fluoreto, corroborando a boa estabilidade do material como visto nas caracterizações já descritas.

Este comportamento cinético porém não foi visto por Agnol (2016) o qual conduziu um estudo em que aplicou um verniz fluoretado Verniz-F Duraphat 4h e 24h (aplicação do verniz e remoção após 4h e 24h, respectivamente) e logo após esse período, assim como no 7 e 28 dias foram feitas biópsias ácidas no esmalte para determinação da concentração de F⁻ com o passar do tempo e observou-se-se que os valores de fluoreto liberado retornaram a níveis basais após sete dias do uso, não sendo observado mais efeito anticárie dessa formulação por longos períodos de tempo. O flúor foi então rapidamente perdido e sua ação preventiva que está intimamente relacionada com sua presença constante na cavidade bucal, foi interrompida interferindo no curso da doença após uma semana de aplicação do verniz, mesmo mantido de forma prolongada sobre os dentes por 24h.

Fernandes (1996), avaliou o perfil de liberação de flúor de oito marcas comerciais de ionômero de vidro nos seguintes períodos: 6, 12, 18, 24h, 7 e 28 dias e obteve o mesmo comportamento de liberação de F⁻ para todas as amostras apesar de obter diferença de valores quantificáveis de flúor, assim como o presente estudo. Obteve, portanto, um "burst effect" (efeito explosão), com registros de grande liberação de flúor nos primeiros intervalos de leitura, seguindo-se de queda acentuada e/ou gradual com o passar do tempo.

No estudo realizado por Fukushima et al. (2000) com intuito de avaliar a concentração de F⁻ solúvel presente na saliva de adultos e crianças após os períodos de 0, 3, 6, 9, 15, 30, 45 e 60 minutos depois da escovação com dentifrícios fluoretados mostrou que logo após a escovação obteve-se uma alta concentração de F⁻, que vai diminuindo com o tempo conforme vai havendo a lavagem da cavidade bucal pela saliva tanto nos adultos como nas crianças.

Garcez (2001), realizou um estudo em que avaliou a liberação de flúor em 6 materiais restauradores também em dois meios de imersão, água deionizada e em meio ácido, por 15 dias. Os materiais utilizados foram Vitremer (VIT), Dyract (DYR), Ariston (A), Tetric Ceram (TET), Definite (DEF) e Z100. As soluções contendo o corpode-prova de cada material foram trocadas diariamente e os espécimes armazenados durante o período pré-estabelecido. Foi utilizado também o TSAB II para retirada dos interferentes da análise. Os resultados obtidos mostraram maior quantidade de liberação no meio ácido para todos os materiais com exceção apenas para o Ariston. E, maiores valores de liberação de flúor inicial também foram observados, declinando com o tempo com o mesmo padrão de liberação para todos as amostras.

Moreau e Xu (2010), avaliaram a interferência do pH do meio na liberação de flúor e nas propriedade mecânicas de cinco materiais dentários restauradores durante 84 dias e obtiveram maiores resultados de flúor quando o meio foi ácido (pH 4,4), porém as propriedade mecânicas dos matérias foram reduzidas quando comparadas ao meio de pH 7.

Vê-se, também, que pesquisas mais recentes já mostram o interesse de pesquisadores em avaliar a liberação de flúor utilizando nanomateriais pelo fato de apresentarem uma alta área de superfície e melhor capacidade de penetrar no biofilme (WANG; GUPTA; ROTELLO, 2015; HANNIG e HANNIG, 2012). Nesse contexto, Nguyen et al. (2017) avaliaram nanopartículas de biopolímeros de alginato, pectina e quitosana fluoretadas e verificaram um forte potencial de aplicação clínica odontológica destes materiais como agentes específicos para pacientes com risco a desenvolver cárie, sendo o flúor liberado em baixas concentrações e de forma sustentada, com maior destaque para a nanopartícula de quitosana, com 33 -113 ppm e 6,2 % de liberação, por um período de 24h. A liberação de F⁻ também foi maior no meio ácido simulando um ataque cariogênico. Porém, apesar de resultados promissores uma preocupação dos pesquisadores é com relação a adesão dessas nanopartículas, pois influências intra-orais podem interferir na sua ação, já que a biodisponibilidade do fluoreto depende de vários fatores como a composição salivar e a taxa de secreção e a própria mucosa que podem servir como adesão para as nanopartículas, limitando a ação do flúor.

Khan et al. (2013), na busca por desenvolver um material nanométrico restaurador com liberação de flúor, sintetizaram a nanofluorapatita com o compósito de poliuterano. Para tanto, avaliaram a liberação de flúor do material em que as amostras foram armazenadas em saliva artificial e água deionizada por 180 dias. Obtiveram, portanto, diferença insignificante entre o padrão de liberação da saliva e da água deionizada e o composto proporcionou uma liberação sustentada de flúor durante um longo período de tempo totalizando um acumulativo de 0,0026 mg/L.

Dessa forma, estudos que visem a utilização de materiais com liberação de flúor direcionada, com retenção e substantividade se faz importante estudar e com base nisso, os hidróxidos duplos lamelares apresentam-se como nanomateriais que sugerem ser potenciais pra liberar flúor no local de ação desejado (desenvolvimento

da cárie), já que se degradam em meio ácido (MARANGONI, 2005) e diante da cinética de liberação de fluoreto realizada no presente estudo, em que se pôde representar, *in vitro*, o comportamento da concentração de liberação do flúor iônico presente nos produtos fluoretados, com forte potencial remineralizante e protetor para cárie dentária, sugere-se materiais promissores com efeito anticárie a serem utilizados na clínica odontológica.

5.5 Avaliação microbiológica

Os resultados visuais dos testes de difusão em ágar e microdiluição em caldo atestaram a não eficácia antimicrobiana das amostras de HDLs estudados, tanto para os precursores como para os produtos fluoretados. As placas dos referidos ensaios encontram-se ilustradas no apêndice 1 e 2.

Dessa forma, inicialmente para o teste de difusão em ágar em que não foram observados halos de inibição, compreende-se a descaracterização das amostras testadas em uma concentração de 1 mg/mL como sensível ao *S. mutans.* Já o controle positivo (digluconato de clorexidina 0,12%) mostrou-se eficaz com consequente formação de halo (12 mm) e o controle negativo (salina), não apresentou formação de halo, como já era esperado.

Ainda com vistas na obtenção da eficácia antimicrobiana dos produtos fluoretados do presente estudo contra *S. mutans*, a microdiluição em caldo realizada a uma concentração de 200 µg/mL também não mostrou ação antimicrobiana dos produtos testados contra o microrganismo em questão (Apêndice 2), exceto para o controle positivo (clorexidina) e o controle do meio caldo BHI.

Ademais, o plaqueamento dos poços evidenciou o crescimento bacteriano, mais uma vez confirmando a ineficácia das soluções testadas (Apêndice 3).

Com relação a ação microbiológica de hidróxidos duplos lamelares com ânion fluoreto intercalado, a literatura ainda é escassa nessa abordagem, mas relata alguns estudos utilizando outros tipos desse nanomaterial sobre a aplicação destes no campo antimicrobiano (CHEN et al., 2012; CARJA et al., 2009; MISHRA et al., 2013; Zhang et al., 2013; NOCCHETTI et al., 2013; RYU et al., 2010). E, segundo Mishra; Dash; Pandey (2018) e Saifullah e Hussein (2015), o efeito microbiológico de HDLs está relacionado a incorporação ou intercalação de algum agente antimicrobiano a sua estrutura.

Chen et al. (2012) e Carja et al. (2009), avaliaram a incorporação de nanopartículas de prata (AgNPbio) em Mg-Al-NO₃/HDL e Zn-Al-NO₃/HDL, objetivando a ação antimicrobiana desse material contra bactérias tanto Gram-negativas (*Escherichia coli e Pseudomonas aeruginosa*) como Gram-positivas (*Staphylococcus aureus e Bacillus substilis*). Obtiveram, portanto, que o HDL sem a incorporação das AgNPbio, não mostrou atividade antimicrobiana, já o complexo Ag-HDL exibiu excelentes atividades contra as bactérias testadas.

Marcato et al. (2013), também avaliando a ação antimicrobiana de HDLs, nesse caso do tipo Mg-AI-SO₄/HDL (250 µg/ml) estruturado também com a incorporação de nanopartícula de prata (HDL- AgNPbio) contra bactéria Gram-positiva (*S. aureus*) e Gram-negativa (*E. coli*) não obtiveram ação antimicrobiana contra as referidas bactérias quando o HDL foi testado sozinho. Já, o complexo HDL- AgNPbio, mostrou eficácia microbiológica com uma concentração inibitória mínima de 6.6 e 12 µg/ml contra *S.aureus* e *E.coli*, respectivamente.

Um outro estudo de Mishra et al. (2017), avaliou o Zn-Al-SO₄/HDL também contra as bactérias *E. coli* e *S. aureus* além de uma cepa fúngica de *Fusarium oxysporum* e obtiveram formação de halo de inibição de 25 mm para a *E. coli*, tendo insignificante ação antimicrobiana para as outras cepas testadas.

Moaty, Farghali e Khaled (2016) avaliaram o efeito antimicrobiano utilizando um HDL do tipo Zn-Fe-NO₃, também utilizando o teste de difusão em poços além da obtenção da concentração inibitória mínima (CIM) contra as bactérias: *Proteous vulgaris, Klebsiella pneumonia, Pseudomonas aeruginosa, E. coli, S. aureus, Staphylococcus epidermidis, Streptococcus pyogenes,* além de fungos do tipo *Aspergillus fumigatus, Candida albicans, Geotricum candidum* e *Trichophyton mentagrophytes.* Para tanto, também utilizaram o HDL em DMSO a 1 mg/mL e os resultados *in vitro* revelaram atividade antimicrobiana do HDL contra todos os microorganismos testados com consequentes formação de halos, variando de 17.6 a 25.6 mm. Valores de concentração inibitória mínima foram obtidos entre 0.98 a 15.6 µg/mL para bactérias tanto Gram-negativas como positivas e para os fungos, o HDL foi mais eficaz em concentrações mais baixas de 0.49 a 3,9 µg/mL. Os autores então concluíram excelentes atividades antimicrobianas desse tipo de HDL frente aos referidos microorganismos testados.

Diante do exposto, vê-se que a ação antimicrobiana de HDLs ainda é pouco estabelecida e não se tem estudos na literatura quanto a atividade antibacteriana de HDLs contra o *S. mutans*, sendo necessários mais estudos com foco no principal microrganismo causador da cárie.

E, tomando como base a ação antimicrobiana do flúor que está presente no material, a literatura reporta segundo alguns autores que o flúor interage com o processo metabólico da bactéria, não havendo dúvidas do seu efeito antibacteriano, porém isso acontece em níveis de flúor muito superiores aos que prevalecem na cavidade oral (TEN CATE, 1999). Para Loveren (2001), existe uma discussão acerca do efeito antimicrobiano do flúor, se este contribui para a prevenção da cárie com ação antimicrobiana, já que as concentrações de F⁻ para ação contra bactérias do biofilme superam muito a concentração necessária que reduz a dissolução da hidroxiapatita. Koo (2008) relata que o F⁻ pode afetar a fisiologia das células microbianas, incluindo *Streptococcus* cariogênicos, a exemplo do *S. mutans*, no entanto, as implicações *in vivo* ainda não estão esclarecidas. Diante disso, é perceptível que a dinâmica antimicrobiana do fluoreto também ainda é desconhecida.

E, com relação a concentração inibitória mínima de fluoretos contra microorganismos orais, a faixa de valores é bem ampla, onde segundo Ochoa-Herrera et al. (2009), bactérias orais são inibidas por concentrações de fluoretos entre 10 – 1600 mg/L. Dong et al. (2012), relata valores de CIM de uma solução de NaF de 625 mg/L contra *S. mutans*. Já Xu et al. (2015) reporta uma CIM de NaF também contra *S.mutans* de 1170 mg/L. Logo, é perceptível uma variância de valores de concentrações para inibição de bactérias orais, em especial a referida bactéria grampositiva. Relacionando tais valores com os do presente estudo, indica-se que a ineficácia antimicrobiana dos produtos testados pode estar relacionado as baixas concentrações de flúor presentes nos HDLs fluoretados, os quais compreenderam valores entre 1,6 – 14,6 mg/L.

Cury et al. (2016) e Fejerskov et al. (2015) relatam com relação ao efeito antimicrobiano do fluoreto que este íon não é capaz de prevenir o desenvolvimento da lesão de cárie porque não evita a formação do biofilme dentário em níveis disponíveis na saliva. Segundo Buzalaf et al. (2011), o flúor interfere na dinâmica da cárie, porém sua principal ação envolve os processos de desmineralização e remineralização dentária. Em um experimento de quimioterapia com uma comunidade de nove bactérias orais, acreditou-se que 19 ppm de flúor poderia prevenir o *S. mutans* de crescer, no entanto, só em altas concentrações o flúor reduziu o número de organismos específicos no biofilme (BRADSHAW; MCKEE; MARSH, 1990). Já utilizando um gel fluoretado de 12.300 ppm por 10 dias consecutivos a proporção de *S. mutans* reduziu no biofilme dentário no estudo realizado por Loesche et al. (1975) diferente do estudo feito por Lynch; Navada; Walia (2004) em que avaliaram a ação anticárie de dentifrícios fluoretados e concluíram que baixos níveis em torno de 1500 ppm de F⁻ presentes no biofilme dentário foram insuficientes para ter um efeito antimicrobiano significativo.

Com base no exposto, independente dos estudos *in vitro* sobre o efeito do fluoreto em bactérias como no biofilme como um todo, os efeitos de desmineralização e remineralização dentária que ocorrem mesmo em baixos níveis de F⁻ são mais importantes do ponto de vista clínico visando o controle da cárie dentária (GUEDES e BOWEN, 1990). E estudos que aprimorem a ação antimicrobiana de HDLs estruturados com fluoreto interlamelar se faz importante estudar para melhor elucidar essa questão.

6 CONCLUSÃO

Com este estudo, foi possível a preparação e o desenvolvimento de 12 produtos fluoretados do tipo hidróxidos duplos lamelares, contendo em sua composição o ânion fluoreto, na forma de pó, em diferentes condições laboratoriais, variando o tempo de agitação e a temperatura durante o processo de síntese.

Através da caracterização estrutural foi possível conhecer a carga e o tamanho dos HDLs precursores nanométricos; quantificar o magnésio, alumínio e cloro nos HDLs (EDX), conhecer o comportamento cristalino deste tipo de material, com sugestiva indicação da presença do fluoreto no espaço interlamelar (DRX), verificar os grupos funcionais existentes (FT-IR) e quantificar o fluoreto presente nos produtos (HMDS). Além disso, a análise térmica comprovou melhor estabilidade térmica aos HDLs fluoretados e a análise morfológica revelou partículas aglomeradas e/ou dispersas, de tamanhos variados.

Dentre os produtos analisados, a amostra que se destacou com uma maior taxa de liberação de F⁻ ao final do ensaio foi o Mg, AI – F HDL 24h25°C do grupo 3,

apresentando uma troca aniônica total, espaçamento basal (d003) de 7,8 Å, banda relativa ao ânion carbonato (CO_3^{2-}) de 1383 cm⁻¹, 123,1 ppm de F⁻ com 45,7 e 46,7% de liberação de fluoreto em meio neutro e ácido, respectivamente e com uma perda de massa total de 41,6%.

Os HDLs fluoretados em concentrações de 1000 e 200 µg/mL mostraram-se ineficazes frente a cepa de *S.mutans*, sendo válido realizar mais estudos que visem a ação microbiológica desses materiais.

Assim, com base nos resultados compilados neste estudo, sugere-se que hidróxidos duplos lamelares fluoretados representam um novo e promissor método de liberação de F⁻, de forma simples e fácil obtenção fazendo-se ainda necessárias avaliações acerca do potencial remineralizante e antimicrobiano. E como perspectivas, pretende-se obter formulações de materiais odontológicos fluoretados a base desses nanomateriais, sendo um novo caminho para o estabelecimento de mais uma categoria de material fluoretado na clínica odontológica, de uma maneira eficaz e relevante a ser utilizando contra a cárie dentária.

REFERÊNCIAS

AGNOL, M. A. D. **Concentração de fluoreto no esmalte e no biofilme dental em função do tempo de manutenção do verniz-F sobre os dentes: estudo clínico.** Tese (Doutorado em Odontologia), Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Federal de Campinas, Piracicaba, 2016.

AHN, S.J.; LEE, S.J.; LEE, D.Y.; LIM, B.S. Effects of different fluoride recharging protocols on fluoride ion release from various orthodontic adhesives. **Journal of Dentistry.** v. 39, 2011, p. 196 – 201.

AL-DEHAILAN, L.; LIPPERT, F.; GONZÁLEZ-CABEZASC, C.; ECKERTD, G.J.; MARTINEZ-MIERA, E.A. Fluoride concentration in saliva and biofilm fluid following the application of three fluoride varnishes. **Journal of Dentistry**. v. 60, 2017, p. 87– 93.

ALEXANDRIDOU, S.; KIPARISSIDES C. **Nanotechnology in Medicine and Health.** Nanotechnology: Revolutionary Opportunities and Societal Implications. Luxembourg, 2002, 205p.

ALKAHTANI, R. N. The implications and applications of nanotechnology in dentistry: A review. **Saudi Dental Journal**. 2018, p. 1 - 10.

ANTUNES, A.M.; ALENCAR, M.S.; da SILVA, C.H.; NUNES, J.; MENDES, F.M. Trends in nanotechnology patents applied to the health sector. **Recent Patents on Nanotechnology**. v.6, n. 1, 2012, p. 29-43.

ASPIRAS, M.; STOODLEY, P.; NISTICO, L.; LONGWELL, M.; JAGER, M. Clinical implications of power toothbrushing on fluoride delivery: effects on biofilm plaque metabolism and physiology. **International Journal of Dentistry.** v. 1, 2010, p. 1-7.

BALDUINO, A.P.Z. **Estudo da Caracterização e composição de argilas de uso cosmético.** Dissertação (Mestrado em Ciências Aplicadas à Saúde), Universidade Federal de Goiás, Jataí, 2016.

BATISTELLA, L.; VENQUIARUTO, L.D.; LUCCIO, M.D.; OLIVEIRA, J.V.; PERGHER, S.B.C.; MAZUTTI, M.A.; OLIVEIRA, D.; MOSSI, A.J.; TREICHEL, H.; DALLAGO, R. Evaluation of Acid Activation under the Adsorption Capacity of Double Layered Hydroxides of MgAICO3 Type for Fluoride Removal from Aqueous Medium. **Industrial e Engineering Chemistry Research.** v. 50, 2011, p. 6871–6876.

BENÍCIO, L.P.F.; SILVA, R.A.; LOPES J.A.; EULÁLIO, D.; SANTOS, R.M.M.; AQUINO, L.A.; VERGÜTZ, L.; NOVAIS, R.F.; COSTA, L.M.; PINTO, F.G.; TRONTO, J. Layered Double Hydroxides: nanomaterials for applications in agriculture. **Revista Brasileira de Ciência do Solo.** v. 39, n.1, 2015. BEYTH, N.; PILO, R.; WEISS, E.I. Antibacterial activity of dental cements containing quaternary ammonium polyethylenimine nanoparticles. **Journal of Nanomaterials**. v. 1, 2012, p.1 – 6.

BISPO, L.B. Resina composta nanoparticulada: há superioridade no seu emprego? **Revista Dentística.** v. 9, n. 19, 2010, p. 21-24.

BJARNASON, S.S.; FINNBOGASON, S.Y.; HOLBROOK, P.; KÖHLER, B. Caries experience in Icelandic 12-yearold urban children 1984 and 1991. **Community Dentistry and Oral Epidemiology.** v. 21, 1994, p. 194–197.

BORSCHIVER, S; GUIMARÃES, M.J.O.C.; SANTOS, T.N.; SILVA, F.C.; BRUM, R.C. Patenteamento em nanotecnologia: estudo do setor de materiais poliméricos nanoestruturados. **Polímeros: Ciência e Tecnologia.** v.15, n.4, 2005, p. 245-248.

BOTAN, R.; NOGUEIRA, T. R.; LONA, L. M. F. Síntese e caracterização de nanocompósitos esfoliados de poliestireno – Hidróxido Duplo Lamelar via polimerização *in situ*. **Polímeros.** v. 21, n.1, 2011, p. 34 – 38.

Brasil. Ministério da Saúde. 2011. Guia de recomendações para o uso de fluoretos no Brasil. Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica. Brasília. **Editora do Ministério da Saúde**, 2009. 56p. Disponível em: <http://cfo.org.br/wp-content/uploads/2010/02/livro_guia_fluoretos.pdf> Acesso em: 15 de fevereiro de 2017.

Brasil. Lei Federal n. 6.050, de 24 de maio de 1974. Dispõe sobre a obrigatoriedade da fluoretação das águas em sistemas de abastecimento. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 27 jul. 1974. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/L6050.htm Acesso em: 05 de maio de 2017.

Brasil. Decreto n. 76.872, de 22 de dezembro de 1975. Regulamenta a Lei n. 6.050, de 24 de maio de 1974. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, seção 1, p. 16997, 1975. Disponível em:

http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/antigos/D76872.htm Acesso em: 05 de maio de 2017.

Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 79, de 28 de agosto de 2000. **Diário Oficial União**. 30 ago. 2000; p. 1415-1537. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/cosmeticos/guia/html/79_2000.pdf Acesso em: 05 de maio de 2017.

BRADSHAW, D. J.; MCKEE, A. S.; MARSH, P.D. Prevention of population shifts in oral microbial communities in vitro by low fluoride concentrations. **Journal of Dental Research**. v. 69, n. 2, 1990, p. 436 – 441.

BUZALAF, M.A.R.; BASTOS, J.R.M.; LAURIS, J.R.P.; ALMEIDA, B.S.; AQUILANTE, A.G. Association between the early use of toothpaste and other variables with dental fluorosis: a transversal retrospective study. **Revista da Faculdade de Odontologia de Bauru.** v. 10, n. 3, 2002, p. 196 – 200.

BUZALAF, M.A.R.; PESSAN, J. P.; HONÓRIO, H. M.; TEN CATE, J. M. Mechanisms of action of fluoride for caries control. **Monographs in Oral Science**. v. 22, 2011, p. 97 – 114.

CARDOSO, L.P. Estudo da remoção de compostos orgânicos derivados da produção de poliéster presentes em efluentes industriais, por meio de sorção em hidróxidos duplos lamelares do sistema Mg-Al-CO₃. Dissertação (Mestrado em Química) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP, 2002.

CARDOSO, M.; REIS, C.; SERRATINE, A.C. O poder antimicrobiano do flúor. **Revista Odontológica do Brasil Central**. v. 13, n. 36, 2004, p. 65-68.

CARJA, G.; KAMESHIMA, Y.; NAKAJIMA, A.; DRANCA, C.; OKADA, K. Nanosized silver–anionic clay matrix as nanostructured ensembles with antimicrobial activity. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v. 34, 2009, p. 534 – 539.

CASAGRANDE, J.J.C. Efeito antimicrobiano de nanopartículas de prata, cobre, ouro e níquel contra streptococcus mutans. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação de Farmácia). Universidade do Extremo Sul Catarinense, UNESC, 2010.

CASCAES, A.M.; KAMIMURA, L.C.B.; PERES, K.G.; PERES, M.A. Conhecimento sobre uso de fluoretos em saúde bucal coletiva entre coordenadores municipais de saúde bucal do Estado de Santa Catarina, Brasil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde.** v. 21, n. 1, 2012, p. 89-98.

CASTRO, K.A.D.F. **Imobilização de metaloporfirinas em hidróxidos duplos Iamelares esfoliados e funcionalizados.** Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

CHANG, Q.; ZHU, L.; LUO, Z.; LEI, M.; ZHANG, S.; TANG, H. Sono-assisted preparation of magnetic magnesium–aluminum layered double hydroxides and their application for removing fluoride. **Ultrasonics Sonochemistry**. v.18, 2011, p. 553 - 561.

CHEN, C.; GUNAWAN, P.; LOU, X. W.; Xu, R. Silver Nanoparticles Deposited Layered Double Hydroxide Nanoporous Coatings with Excellent Antimicrobial Activities. **Advanced Functional Materials**. v. 22, 2012, p. 780 – 787.

CHENG, L.; WEIR, M.D.; XU, H.H.K.; KRAIGSLEY, A.M.; LIN, N.J.; GIBSON, S.L.; ZHOU, X. Antibacterial and physical properties of calcium-phosphate and calcium-fluoride nanocomposites with chlorhexidine. **Dental Materials**. v. 28, 2012, p. 573 – 583.

CHOUDARY, B.M.; BHARATHY, B.; REDDY, Ch. V.; KANTAM, M. L. The first example of heterogeneous oxidation of secondary amines by tungstate-exchanged

Mg-Al layered double hydroxides: a green protocol. **Green Chemistry**. v. 4, 2002, p.279–284.

COELHO, A.C.V.; SANTOS, P.S.; SANTOS, H.S. Argilas especiais: argilas quimicamente modificadas - uma revisão. **Química Nova**. v. 30, n.5, 2007a, p. 1282 – 1294.

COELHO, A.C.V.; SANTOS, P.S.; SANTOS, H.S. Argilas especiais: o que são, caracterização e propriedades. **Química Nova**. v. 30, n.1, 2007b, p. 146 – 152.

CONNIOT, J.; SILVA, J.M.; FERNANDES, J.G.; SILVA, L.C.; GASPAR, R.; BROCCHINI, S.; FLORINDO, H.F.; BARATA, T.S. Cancer immunotherapy: nanodelivery approaches for immune cell targeting and tracking. **Frontiers in Chemistry**. v. 2, 2014, p. 1–27.

CREPALDI, E. L.; VALIM, J.B. Hidróxidos Duplos Lamelares: síntese, estrutura, propriedades e aplicações. **Química Nova**. v. 21, n. 3, 1998, p. 300-311.

CUNHA, V.R.R.; FERREIRA, A. M.C.; CONSTANTINO, V, R, L.; TRONTO, J.; VALIM, J.B. Hidróxidos Duplos Lamelares: nanopartículas inorgânicas para armazenamento e liberação de espécies de interesse biológico e terapêutico. **Química Nova**. v. 33, n.1, 2010, p. 159-171.

CUNHA, V.R.R. Materiais híbridos orgânicos-inorgânicos: espécies de interesse farmacológico imobilizadas em hidróxidos duplos lamelares. Tese (Doutorado em Química) – Universidade de São Paulo, 2012.

CUNHA, M.V.P.O.; CORREA, J.A.M. Síntese e caracterização de hidróxidos duplos a partir da lama vermelha. **Cerâmica**. v. 57, 2011, p. 85 – 93.

CURY, J.A. **Uso do flúor e controle da cárie como doença**. In. BARATIERI, L.N.; MONTEIRO, S. Odontologia restauradora – Fundamentos e Possibilidades – 2ed. Editora Santos, 2015.

CURY, J.A.; OLIVEIRA, B.H.; SANTOS, A.P.P.; TENUTA, L.M.A. Are fluoride releasing dental materials clinically effective on caries control? **Dental materials**. v. 32, 2016, p. 323–333.

CURY, J.A.; TENUTA, L.M.A. Enamel remineralization: controlling the caries disease or treating early caries lesions? **Brazilian Oral Research**. v. 23, n. 1, 2009, p. 23-30.

DEMIRBOLAT, G.M.; ALTINTAS, L.; YILMAZ, S.; DEGIM, I.T. Development of orally applicable, combinatorial drug loaded nanoparticles for the treatment of fibrosarcoma. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. 2018.

DONG, L.; TONG, Z.; LINGHU, D.; LIN, Y.; TAO, R.; LIU, J.; TIAN, Y.; NI, L. Effects of sub-minimum inhibitory concentrations of antimicrobial agents on *Streptococcus mutans* biofilm formation. **International Journal of Antimicrobial Agents.** v. 39, 2012, p. 390 – 395.

DZIEDZIC, A.; KUBINA, R.; WOJTYCZKA, R. D.; DZIK, A. K.; TANASIEWICZ, M.; MORAWIEC, T. The antibacterial effect of etanol extract of polish própolis on Mutans Streptococci and Lactobacilli isolated from saliva. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. v. 2013, 2013, p. 1 – 11.

EAKLE, W.S.; FEATHERSTONE, J.D.; WEINTRAUB, J.A.; SHAIN, S.G.; GANSKY, S.A. Salivary fluoride levels following application of fluoride varnish or fluoride rinse. **Community Dentistry and Oral Epidemiology**. v. 32, n. 6, 2004, p. 462–469.

ELHALIL, A.; QOURZAL, S.; MAHJOUBI, F.Z.; ELMOUBARKI, R.; FARNANE, M.; TOUNSADI, H.; SADIQ, M.; ABDENNOURI, M.; BARKA, N. Defluoridation of groundwater by calcined Mg/AI layered double hydroxide. **Emerging Contaminants**. v. 2, 2016, p. 42 – 48.

FAN, J.; XU, Z.; ZHENG, S. Comment on "Factors influencing the removal of fluoride from aqueous solution by calcined Mg-Al-CO₃ layered double hydroxides." **Journal of Hazardous Materials.** v. 139, 2007, p. 175 – 177.

FEATHERSTONE, J.D.B. Prevention and reversal of dental caries: role of low level fluoride. **Community Dentistry and Oral Epidemiology.** v. 27, 1999, p. 31-40.

FEATHERSTONE, J.D.B. The science and practice of caries prevention. **Journal of the American Dental Association.** v. 131, 2000.

FEITKNECHT, W. Zur kenntnis der doppelhydroxyde und basischen Doppelsalze III. Über magnesium-aluminiumdoppelhydroxyd, **Helvetica Chimica Acta.** v. 25, 1933, p.131.

FEJERSKOV, O; CURY, J. A.; TENUTA, L. M.; MARINHO, V. C. Fluorides in caries control. In: **Dental caries: the disease and its clinical management**. 3 edição. Oxford, Wiley Blackwell, 2015, cap. 14, p. 245 – 276.

FEJERSKOV, O. Changing paradigms in concepts on dental caries: consequences for oral health care. **Caries Research**. v. 38, 2004, p. 182 – 191.

FERNANDES, R. B. D. H. **Avaliação** *in vitro* da liberação de flúor de cimentos de ionômero de vidro forradores e cimentantes. Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, 1996.

FIGUEIRAS, A. R. R.; COIMBRA, A.B.; VEIGA, F.J.B. Nanotecnologia na saúde: aplicações e perspectivas. **Boletim Informativo GEUM**. v. 5, n.2, 2014, p. 14-26.

FRANT, M. S.; ROSS JR, J. W. Electrode for Sensing Fluoride Ion Activity in Solution. **Science**, v. 154, n. 3756, 1966, p. 1553-1555.

FREITAS, R. A. Nanotechnology, nanomedicine and nanosurgery. **International Journal of Surgery**. v. 3, n.4, 2005, p. 243-246.

FUKUSHIMA, R.; GRANJEIRO, J. M.; TAGA, E. M.; BUZALAF, M. A. R. Cinética do flúor na saliva de adultos e crianças após o uso de dentifrícios fluoretados. **Revista FOB**. v. 8, n. 1/2, 2000, p. 45 – 50.

GARCEZ, R. M. V. B. Avaliação da liberação de flúor de resinas compostas em água e em ciclagem de pH. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, 2001.

GEDDES, D. A. M.; BOWEN, W. H. Summary of Session III: Fluoride III Saliva and Dental Plaque, 1990, p. 637.

GLASSPOOLE, E. A.; ERICKSON, R. L.; DAVIDSON, C. L. A fluoride – releasing composite for dental applications. **Dental Materials.** v. 17, 2001, p. 127-133.

HAMILTON, I. R.; BOWDEN, G. H. Response of freshly isolated strains of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus mitior* to change in pH in the presence and absence of fluoride during growth in continuous culture. **Infection and Immunity**. v. 36, n. 1, 1982, p. 255 – 262.

HANNIG, M.; HANNIG, C. Nanotechnology and its role in caries therapy. **Advances** in **Dental Research**. v. 24, n. 2, 2012, p. 53 – 57.

HELLWIG, E.; LENNON, A. M. Systemic versus Topical Fluoride. **Caries Research**. v. 38, 2004, p. 258 – 262.

HORTA, H.I.V. **Aplicação de nanossistemas na terapêutica do cancro do pulmão**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade do Algarve, Faculdade de Ciência e Tecnologia, Portugal, 2015.

HUANG, Z.; ZHENG, X.; YAN, D.; YIN, G.; LIAO, X.; KANG, Y.; YAO, Y.; HUANG, D.; HAO, B. Toxicological effect of ZnO Nanoparticles based on bacteria. **Langmuir**. v. 24, n. 8, 2008, p. 4140 – 4144.

IGUCHI, S.; TERAMURA, K.; HOSOKAWA, S.; TANAKA, T. Photocatalytic conversion of CO₂ in water using fluorinated layereddouble hydroxides as photocatalysts. **Applied Catalysis A: General.** v. 521, 2016, p. 160–167.

ISLAM. M.; PATEL, R. Nitrate sorption by thermally activated Mg/Al chloride hydrotalcitelike compound. **Journal of Hazardous Materials**. v.169, 2009, p. 524–531.

JENKINS, G.N. Review of fluoride research since 1959. Archives of Oral Biology. v. 44, 1999, p. 985 – 992.

KAMALY, N. Targeted polymeric therapeutic nanoparticles: design, development and clinical translation. **Chemical Society Reviews.** v. 41, 2012, p. 2971–3010.

KAMEDA, T.; OBA, J.; YOSHIOKA, T. Recyclable Mg–Al layered double hydroxides for fluoride removal: kinetic and equilibrium studies. **Journal of Hazardous Materials.** v. 300, 2015a, p. 475 – 482.

KAMEDA, T.; OBA, J.; YOSHIOKA, T. Continuous treatment of boron and fluoride in aqueous solutions using a column loaded with granulated Mg–Al layered double hydroxides intercalated with nitrates. **Journal of Water Process Engineering.** v. 8, 2015b, p. 195–201.

KHAN, A. S.; AAMER, S.; CHAUDHRY, A. A.; WONG, F. S. L.; REHMAN, I. U. Synthesis and characterizations of a fluoride-releasing dental restorative material. **Materials Science and Engineering.** v. 33, 2013, p. 3458 – 3464.

KHAN, K. A.; RHODES, C. T. The concept of dissolution efficiency. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**. v. 47, 1974, p. 594 – 607.

KHURSHID, Z.; ZAFAR, M.; QASIM, S.; SHAHAB, S.; NASEEM, M.; ABUREQAIBA, A. Advances in nanotechnology for restorative dentistry. **Materials.** v. 8, 2015, p. 717-731.

KIELBASSA, A.M.; MONTING, J.S.; GODOY, F.G.; LUECKEL, H.M. Initial *in situ* secondary caries formation: effect of various fluoride-containing restorative materials. **Operative Dentistry.** v. 28, n. 6, 2003, p. 765-772.

KILIAN, M.; THYLSTRUP, A.; FEJERSKOV, O. Predominant plaque flora of Tanzanian children exposed to high and low water fluoride concentrations. **Caries Research**. v. 13, 1979, p. 330 – 343.

KLOPROGGE, J.T., FROST, R.L. Fourier Transform Infrared and Raman spectroscopy study of the local structure of Mg, Ni and Co-hydrotalcites. **Journal Solid State Chemistry.** v.146, 1999, p.506-515.

KOILRAJ, P.; KANNAN, S. Aqueous fluoride removal using ZnCr layered double hydroxides and their polymeric composites: batch and column studies. **Chemical Engineering Journal.** v. 234, 2013, p. 406-415.

KOO, H. Strategies to enhance the biological effects of fluoride on dental biofilms. **Advances in Dental Research**. v. 20, 2008, p. 17 – 21.

LEDO, J.C.S.; HOSSNE, W.S.; PEDROSO, M.Z. Introdução às questões bioéticas suscitadas pela nanotecnologia. **Bioethikos.** v. 1, n.1, 2007, p. 61-67.

LEE, J.J.; LEE, Y.K.; CHOI, B.J.; LEE, J.H.; CHOI, H.J.; SON, H.K.; HWANG, J.W.; KIM, S.O. Physical properties of resin-reinforced glass ionomer cement modified with micro and nano-hydroxyapatite. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology.** v. 10, 2010, p. 5270–5276.

LEITES, A.C.B.R.; PINTO, M.B.; SOUSA, E.R. Aspectos microbiológicos da cárie dental. **Salusvita**. v. 25, n. 2, 2006, p. 239 – 252.

LIMA, E.; ORTIZ, M.J.M.; REYES, G.R.; VERA, M. Fluorinated hydrotalcites: the addition of highly electronegative species in layered double hydroxides to tune basicity. **Inorganic Chemistry.** v. 51, 2012, p. 7774-7781.

LIMA, J.E.O. Cárie dentária: um novo conceito. **Revista Dental Press de Ortodontia e Ortopedia Facial**. v. 12, n. 6, 2007, p. 119 – 130.

LIN, J.; ZHU, J.; GU, X.; WEN, W.; LI, Q.; BRANDIES, H.F.; WANG, H.; MEHL, C. Effects of incorporation of nano-fluorapatite or nano-fluorohydroxyapatite on a resinmodified glass ionomer cement. **Acta Biomaterialia.** v. 7, 2011, p. 1346 – 1353.

LING. L.; XU, X.; CHOI, G.Y.; BILLODEAUX, D.; GUO, G.; DIWAN, R.M. Novel Freleasing Composite with Improved Mechanical Properties. **Journal of Dental Research**. v. 88, n. 1, 2009, p: 83-88.

LYNCH, R. J. M.; NAVADA, R; WALIA, R. Low-levels of fluoride in plaque and saliva and their effects on the demineralisation and remineralisation of enamel; role of fluoride toothpastes. **Internacional Dental Journal**. v. 54, 2004, p. 304 – 309.

LOESCHE, W. J.; SYED, S. A.; MURRAY, R. J.; Mellberg, J. R. Effect of Topical Acidulated Phosphate Fluoride on Percentage of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguis* in Plaque. **Caries Research.** v. 9, 1975, p. 139-155.

LOVEREN, C. V. Antimicrobial Activity of Fluoride and Its in vivo Importance: Identification of Research Questions. **Caries Research**. v. 35, n. 1, 2001, p. 65 – 70.

LUCKHAM, P.F.; ROSSI, S. The colloidal and rheological properties of bentonite suspensions. **Advances in Colloid and Interface Science**. v. 82, 1999, p.43-92.

LUNA, D.M.N.; ANDRADE, C.A.S. Nanotecnologia aplicada à odontologia. **International Journal of Dentistry**. v. 10, n. 3, 2011, p. 161-168.

LV, L.; HE, J.; WEI, M.; EVANS, D.G.; DUAN, X. Factors influencing the removal of fluoride from aqueous solution by calcined Mg-AI-CO₃ layered double hydroxides. **Journal of Hazardous Materials.** v. 133, 2006, p. 119 - 128.

LV, L.; HE, J.; WEI, M.; EVAINS, D.G.; ZHOU, Z. Treatment of high fluoride concentration water by MgAI-CO₃ layered double hydroxides: kinetic and equilibrium studies. **Water Research**. v. 41, 2007, p. 1534 – 1542.

MA, W.; LV, T.; SONG, X.; CHENG, Z.; DUAN, S.; XIN, G. Characteristics of selective fluoride adsorption by biocarbon-Mg/Al layered double hydroxides composites from protein solutions: Kinetics and equilibrium isotherms study. **Journal of Hazardous Materials.** v. 268, 2014, p. 166-176.

MARANGONI, R. **Imobilização de nanopartículas de ferro em óxidos isolantes e semicondutores**. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

MARCATO, P. D.; PARIZOTTO, N. V.; MARTINEZ, D. S. T.; PAULA, A. J.; FERREIRA, I. R.; MELO, P. S.; DURÁN, N.; O. L. ALVES. New Hybrid Material Based on Layered Double Hydroxides and Biogenic Silver Nanoparticles: Antimicrobial Activity and Cytotoxic Effect. **Journal of Brazilian Chemical Society**. v. 24, n. 2, 2013, p. 266 – 272. MARSH, P. D.; ZAURA, E. Dental biofilm: ecological interactions in health and disease. **Journal of Clinical Periodontology**. v. 44, n. 1, 2017, p. 12 – 22.

MEIRA, K.M.S. **Dentifrícios fluoretados: estudos de interferentes na concentração e análise de flúor por potenciometria.** Dissertação (Mestrado em Odontologia). Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2015.

MELO, M.A.S. Estudos do efeito anticárie de materiais odontológicos beneficiados por nanotecnologia. Tese (Doutorado em Odontologia). Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem do Ceará, Fortaleza, 2012.

MIRSASAANI, S. S.; HEMATIA, M.; TAVASOLID, T.; DEHKORDA, E. S.; YAZDIA, G. T.; POSHTIRIB, D. A. Nanotechnology and Nanobiomaterials in Dentistry. In: **Nanobiomaterials in Clinical Dentistry.** Elsevier, 2013, cap. 2, p. 17 – 33.

MISHRA, G.; DASH, B.; PANDEY, S.; MOHANTY, P. P. Antibacterial actions of silver nanoparticles incorporated Zn–Al layered double hydroxide and its spinel. **Journal of Environmental Chemical Engineering**. v. 1, 2013, p. 1124 – 1130.

MISHRA, G.; DASH, B.; PANDEY, S. Layered double hydroxides: A brief review from fundamentals to application as evolving biomaterials. **Applied Clay Science**. v. 153, 2018, p. 172 – 186.

MISHRA, G.; DASH, B.; SETHI, D.; PANDEY, S.; MISHRA, B.K. Orientation of Organic Anions in Zn-Al Layered Double Hydroxides with Enhanced Antibacterial Property. **Environmental engineering science**. v. 34, n. 7, 2017, p. 516 – 527.

MITRA, S.B.; WU, D.; HOLMES, B.N. Na application of nanotechnology in advanced dental materials. **Journal of the American Dental Association**. v.134, 2003, p. 1382 – 1390.

MOATY, S. A. A.; FARGHALI, A. A.; KHALED, R. Preparation, characterization and antimicrobial applications of Zn-Fe LDH against MRSA. **Materials Science and Engineering.** v. 68, 2016, p. 184 – 193.

MONTEJANO, H. A.; GERVALDO, M.; BERTOLOTTI, S. G. The excited-states quenching of resazurin and resofurin by p-benzoquinones in polar solvents. **Dyes and Pigments.** v. 64, 2005, p. 117 – 124.

MOREIRA, M.; POLETO, M. M.; VICENTE, V. A. Fatores determinantes na epidemiologia e transmissibilidade da doença cárie**. Revista Odonto Ciência**. v. 22, n. 56, 2007, p. 181-185.

MOREAU, J. L.; XU, H. H. K. Fluoride releasing restorative materials: Effects of pH on mechanical properties and ion release. **Dental Materials**. v. 26, 2010, p. 227 – 235.

MORIYAMA, S.; SASAKI, K.; HIRAJIMA, T. Effect of freeze drying on characteristics of Mg-Al layered double hydroxides and bimetallic oxide synthesis and implications for fluoride sorption. **Applied Clay Science**. v.132-133, 2016, p. 460 – 467.

MURAKAMI, C.; BONECKER, M. Utilização de Fluoretos na Clínica Odontopediátrica Contemporânea. **Revista FGM News.** v.12, 2010, p. 33 – 36.

MYATA, S. Anion-exchange properties of hidrotalcite-like compounds. **Clays and Clay Minerals**. v. 31, n. 4; 1983, p. 305 – 311.

NCCLS. National Committe for Clinical Laboratory Standards. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically, Approved Standards-M2-A8, 8. ed., v. 23, n.1, 2003. Disponível em: https://www.clsi.org, acessado em: 05 de jun. 2017.

NEUMANN, M.G.; GESSNER, F.; CIONE, A.P.P.; SARTORI, R.A.; CAVALHEIRO, S. Interações entre corantes e argilas em suspensão aquosa. **Química Nova**. v. 23, n. 6, 2000, p. 818 – 824.

NOCCHETTI, M.; DONNADIO, A.; AMBROGI, V.; ANDREANI, P.; BASTIANINI, M.; PIETRELLAC, D.; LATTERINIA, L. Ag/AgCI nanoparticle decorated layered double hydroxides: synthesis, characterization and antimicrobial properties. **Journal of Materials Chemistry B**. v. 1, 2013, p. 2383 – 2393.

NGUYENA, S.; ESCUDEROB, C.; SEDIQIA, N.; SMISTADA, G.; HIORTHA, M. Fluoride loaded polymeric nanoparticles for dental delivery. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 104, 2017, p. 326 – 334.

OCHOA-HERRERA, V.; BANIHANI, Q.; LÉON, G.; KHATRI, C.; FIELD, A.; SIERRA-ALVAREZ R. Toxicity of fluoride to microorganisms in biological wastewater treatment systems. Water Research. v. 43, 2009, 3177 – 3186.

OLIVEIRA, L.C.; TAVEIRA, E.J.F.; SOUZA, L.G.; MARRETO, R.N.; LIMA, E.M.; TAVEIRA, S.F. Aplicações das nanopartículas lipídicas no tratamento de tumores sólidos: revisão de literatura. **Revista Brasileira de Cancerologia**. v. 58, n. 4, 2012, p. 695-701.

PITTS, N. B.; ZERO, D.T.; MARSH, P. D.; EKSTRAND, Kim; WEINTRAUB, J. A.; RAMOS-GOMEZ, F.; TAGAMI, J.; TWETMAN, S.; TSAKOS, G.; ISMAIL, A. Dental caries. **Disease Primers**. v. 3, 2017, 1 – 16.

PRASAD, B. E.; KAMATH, P. V.; VIJAYAMOHANAN, K. Anion Exchange Reaction Potentials as Approximate Estimates of the Relative Thermodynamic Stabilities of Mg/AI Layered Double Hydroxides Containing Different Anions. **Langmuir.** v.27, 2011, p.13539–13543.

PRIYADARSINI, S.; MUKHERJEE, S.; MISHRA, M. Nanoparticles used in dentistry: A review. **Journal of Oral Biology and Craniofacial Research**. v. 324, 2017, p. 1 – 10.

REIS, M.J. Estudo da adsorção de tensoativos aniônicos sulfonados em hidróxidos duplos lamelares. Dissertação (Mestrado em Ciências). Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, 2004.

REIS, M.J. Síntese e caracterização de hidróxidos duplos lamelares preparados na presença de polímeros orgânicos ou com macromoléculas intercaladas. Tese (Doutorado em Ciências). Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, 2009.

RIBEIRO, L.N.M.; FRANZ-MONTAN, M.; BREITKREITZ, M.C.; ALCÂNTARA, A.C.S.; CASTRO, S.R.; GUILHERME, V.A.; BARBOSA, R.M.; DE PAULA, E. Nanostructured lipid carriers as robust systems for topical lidocaine-prilocaine release in dentistry. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 93, 2016, p. 192–202.

RYU, S.; JUNG, H.; OH, J.; LEE, J.; CHOY, J. Layered double hydroxide as novel antibacterial drug delivery system. **Journal of Physics and Chemistry of Solids**. v. 71, 2010, p. 685 – 688.

SAIFULLAH, B.; HUSSEIN, M. Z. B. Inorganic nanolayers: structure, preparation, and biomedical applications. **International Journal of Nanomedicine**. v. 10, 2015, p. 5609 – 5633.

SCHMALZ, G.; HICKEL, R.; LANDUYT, K.L.V.; REICHL, F.X. Nanoparticles in dentistry. **Dental Materials**. v. 33, 2017, p. 1298 – 1314.

SEVINÇ, B.A.; HANLEY, L. Antibacterial Activity of Dental Composites Containing Zinc Oxide Nanoparticles. **Jounal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials.** v. 94, n. 1, 2010, p. 22–31.

SKÖLD-LARSSON, K.; MODEER, T.; TWETMAN, S. Fluoride concentration in plaque in adolescents after topical application of different fluoride varnishes. **Clinical Oral Investigations**. v. 4, n. 1, 2000, p. 31–34.

SILVA, F. D. S. C. M.; DUARTE, R. M.; SAMPAIO, F. C. Liberação e recarga de flúor por cimentos de ionômero de vidro. **Revista Gaúcha de Odontologia**. v. 58, n. 4, 2010, p. 437 – 443.

SILVERSTEIN, R., M.; WEBSTER, F. X. KIEMLE, D. J. **Spectrometric** identification of organic compounds. 7 ed. New York, USA, 1962, 502p.

SULLIVAN, A.; BORGSTRÖM, M.K.; GRANATH, L.; NILSSON, G. Number of mutans streptococci or lactobacilli in a total dental plaque sample does not explain the variation in caries better than the numbers in stimulated whole saliva. **Community Dentistry and Oral Epidemiology.** v. 24, 1996, p. 1559–163.

STOPPELAAR, J. D.; VAN HOUTE, J.; DIRKS, B. The relationship between extracellullar polysaccharide producing Streptococci and smooth surface caries in 13-years-old children. **Caries Research**. v. 3, 1969, p. 190 – 199.

TAMMARO, L.; VITTORIA, V.; CALARCO, A.; PETILLO, O.; RICCITIELLO, F.; PELUSO, G. Effect of layered double hydroxide intercalated with fluoride ions on the physical, biological and release properties of a dental composite. **Journal of Dentistry.** v. 42, 2014, p. 60-67.

TAVES, D.R. Separation of fluoride by rapid diffusion using hexamethyldisiloxane. **Talanta.** v. 15, n.9, 1968, p. 969 – 974.

TEIXEIRA-NETO, E.; TEIXEIRA-NETO, A.A. Modificação química de argilas: desafios científicos e tecnológicos para obtenção de novos produtos com maior valor agregado. **Química Nova.** v. 32, n. 3, 2009, p. 809–817.

TEN CATE, J.M.; BUIJS, M.J.; MILLER, C.C.; EXTERKATE, R.A.M. Elevated Fluoride Products Enhance Remineralization of Advanced Enamel Lesions. **Journal** of **Dental Reseach**. v. 87, n. 10, 2008, p. 943 – 947.

TEN CATE, J.M. Current concepts on the theories of the mechanism of action of fluoride. Current concepts on the theories of the mechanism of action of fluoride. **Acta Odontologica Scandinavica**. v. 57, 1999, p. 325 – 329.

TENUTA, L.M.; CURY, J.A. Fluoride: its role in dentistry. **Brazilian Oral Research**. v. 24, n. 1, 2010, p. 9 – 17.

THEISS, F.L.; COUPERTHWAITE, S.J.; AYOKO, G.A.; FROST, R.L. A review of the removal of anions and oxyanions of the halogen elements from aqueous solution by layered double hydroxides. **Journal of Colloid and Interface Science**. v. 417, 2014, p. 356 – 368.

THORLEY, A.; TETLEY, T.D. New perspectives in nanomedicine. **Pharmacology & Therapeutics**. V. 140, 2013, p. 176–185.

TSENG, C.C.; WOLFF, L.F.; AEPPLI, D.M. Effect of gels containing stannous fluoride on oral bacteria - an *in vitro* study. **Australian Dental Journal.** v. 37, n. 5, 1992, p. 368-373.

TYAS, M.J. Clinical Evaluation of glass-ionomer cement restorations. Journal of Applied Oral Science. v.14, 2006, p. 10 - 13.

TWETMAN, S.; SKOLD-LARSSON, K.; MODEER, T. Fluoride concentration in whole saliva and separate gland secretions after topical treatment with three different fluoride varnishes. **Acta Odontologica Scandinavica**. v. 57, n. 5, 1999, p. 263–266.

VAISS, V.S.; BERG, R.A.; FERREIRA, A.R.; BORGES, I; LEITÃO, A.A. Theoretical Study of the Reaction between HF Molecules and Hydroxyl Layers of Mg (OH)₂. **Journal of Physical Chemistry**. v. 113, 2009, p. 6494–6499.

VIEIRA, A.C. Síntese, caracterização e aplicação de Hidróxidos Duplos Lamelares. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental). Universidade Federal de Ouro Preto, Minas Gerais, 2009.

WANG, L. S.; GUPTA, A.; ROTELLO, V. M. Nanomaterials for the treatment of bacterial biofilms. **ACS Infectious Diseases**. v. 2, n. 1, 2015, p. 3 – 4.

WEIR, M.D.; CHOW, L.C.; XU, H.H.K. Remineralization of Demineralized Enamel via calcium Phosphate nanocomposite. **Journal of Dental Research**. v. 91, n. 10, 2012, p. 979-984.

WHITFORD, G.M.; WASDIN, J.L.; SCHAFER, T.; ADAIR, S.M. Plaque Fluoride Concentrations are Dependent on Plaque Calcium Concentrations. **Caries Research**. v. 36, 2002, p. 256–265.

WU, G.; WANG, X.; CHEN, B.; LI, J.; ZHAO, N.; WEI, W.; SUN, Y. Fluorine-modified mesoporous Mg–AI mixed oxides: Mild and stable base catalysts for O-methylation of phenol with dimethyl carbonate. **Applied Catalysis A: General**. v. 329, 2007, p. 106–111.

XU, H.H.K.; MOREAU, J.L.; SUN, L.; CHOW, L.C. Novel CaF₂ Nanocomposite with High Strength and Fluoride Ion Release. **Journal of Dental Research.** v. 89, n.7, 2010, p.739-745.

XU, Z.P., STEVENSON, G., LU, C.-Q., LU, G.Q. Dispersion and Size Control of Layered Double Hydroxide Nanoparticles in Aqueous Solutions. **The Journal of Physical Chemistry B**. v.110, n.34, 2006a, p.16923-16929.

XU, X.; LING, L.; WANG, R.; BURGESS, J. O. Formulation and characterization of a novel fluoride-releasing dental composite. **Dental Materials**. v. 22, 2006b, p. 1014 – 1023.

XU, H.H.K.; MOREAU, J.L.; SUN, L.; CHOW, L.C. Strength and fluoride release characteristics of a calcium fluoride based dental nanocomposite. **Biomaterials.** v. 29, 2008, p. 4261–4267.

XU, Z.P.; WALKER, T.L.; LIU, K.L.; COOPER, H.M.; LU, G.M. BARTLETT, P.F. Layered double hydroxide nanoparticles as cellular delivery vectors of supercoiled plasmid DNA. International Journal of Nanomedicine. v.2, n. 2, 2007, p. 163–174.

XU, Y.; WU, Q.; CHEN, Y.; SMALES, R. J. SHI, S. WANGA, M. Antimicrobial effects of a bioactive glass combined with fluoride or triclosan on Streptococcus mutans biofilm. **Archives of oral biology.** v. 60, 2015, p. 1059 – 1065.

ZHANG, K.; MELO, M.A.S.; CHENG, L.; WEIR, M.D.; BAI, Y.; XU, H.H.K. Effect of quaternary ammonium and silver nanoparticle containing adhesives on dentin bond strength and dental plaque microcosm biofilms. **Dental Materials.** v. 28, n. 8, 2012, p. 842–852.

ZHANG, W.; ZHENG, Y.; XU, Y.; YU, Y.; SHI, Q.; LIU, L.; PENG, H.; OUYANG, Y. Preparation and Antibacterial Property of Waterborne Polyurethane/Zn–Al Layered Double Hydroxides/ZnO Nanocomposites. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**. v. 13, n. 1, 2013, p. 409 – 416.

APÊNDICES

APÊNDICE 1 – Difusão em ágar para todas as amostras: precursores, produtos e controles positivo e negativo do experimento.

HDLs precursores	2		Controles do				
	Grupos	Mg, AI – F HDL 2h25°C	Mg, AI – F HDL 2h40°C	Mg, AI – F HDL 24h25°C	Mg, Al – F HDL 24h40°C	experimento	
Micrométrico	1	High: p milled Bh/ERTE	Net market Difference	State	RELES miles 21 Marc	Cit State	
Nanométrico	2			HELS OF	HEL-S ANY 211/400		
	3		Holes		HILLSEM		

Fonte: própria autoria, 2018.

APÊNDICE 2 – Microplaca com teste de microdiluição em caldo, feito em duplicata para todos os grupos e a legenda dos poços em tabela.

Figura 34 - Microplaca de 96 poços com as amostras do experimento.



Condição de Poço Amostra Grupo síntese Mg, AI - CI HDL micrométrico A1 e B1 Precursor A3 e B3 Mg, AI - CI HDL nanométrico Precursor A5 e B5 Mg, AI – F HDL 2h 25°C 1 A7 e B7 Mg, AI – F HDL 24h 25°C 1 A9 e B9 Mg, AI – F HDL 2h 40ºC 1 A11 e B11 Mg, AI – F HDL 24h 40°C 1 D1 e E1 Mg, AI – F HDL 24h 25°C 2 D3 e E3 Mg, AI – F HDL 2h 25°C 2 D5 e E5 Mg, AI – F HDL 2h 40°C 2 Mg, AI – F HDL 2 D7 e E7 24h 40°C G1 e H1 Mg, AI – F HDL 24h 25°C 3 G3 e H3 Mg, AI – F HDL 24h 40°C 3 Mg, AI – F HDL 3 G5 e H5 2h 25°C G7 e H7 Mg, AI – F HDL 2h 40°C 3 controle positivo (clorexidina G10 e H10 0,12%) G11 e H11 controle negativo (salina) controle meio BHI-caldo G12 e H12 -

Fonte: própria autoria, 2018.

Tabela 10 - Legenda dos poços referente a microplaca de 96 poços.

APÊNDICE 3 – Plaqueamento para todas as amostras.



Fonte: própria autoria, 2018.

	Condiçã o de Síntese	Caracterização estrutural					Caracterização térmica	Caracterização morfológica	
Grupos		EDX	DRX (Å)	FTIR (cm ⁻¹)	HMDS (ppm)	% Liberação de F⁻ (neutro/ácido)		TGA	MEV
HDL micrométrico	-	-	d(003) = 7,9	υ(CO ₃ ²⁻) = 1355	-	-	-	34,2%; 33,01 − 98,25°C + 360,42 − 441,95°C	Aglomerados
Grupo 1	2h25°C	Troca aniônica parcial	d(003) = 7,8	υ(CO ₃ ²⁻) = 1385	979,20	4,6%	8,4%	40,3%; 74,85 - 199,39°C + 336,73 - 428,23°C	Aglomerados
	2h40°C	Troca aniônica parcial	d(003) = 7,6	υ(CO ₃ ²⁻) = 1385	985,52	4,1%	7,8%	39,6%; 96,21 - 203,38°C + 330,09 - 423,7°C	Aglomerados
	24h25°C	Troca aniônica parcial	d(003) = 7,6	υ(CO ₃ ²⁻) =1385	561,60	5,4%	9,9%	41,2%; 92,51 - 205,65°C + 327,52 - 429,04°C	Aglomerados
	24h 40°C	Troca aniônica parcial	d(003) = 7,6	υ(CO ₃ ²⁻) =1383	1097,52	5,6%	8,9%	39,1%; 113,97 - 211,76°C + 331,20 - 432,01°C	Aglomerados
HDL nanométrico suspensão coloidal	-	-	d(003) = 7,9	υ(CO ₃ ²⁻) = 1355	-	-	-	39,2%; 95,1 − 211,6°C + 334,9 − 390,9°C	Estrutura foliar
Grupo 2	2h25°C	Troca aniônica parcial	d(003) = 7,8	υ(CO ₃ ²⁻) =1385	594,10	2,1%	5,2%	39,7%; 139,7 – 212,8°C + 327,6 - 442°C	Estrutura foliar
	2h40°C	Troca aniônica parcial	d(003) = 7,8	υ(CO ₃ ²⁻) =1384	739,20	3,8%	8,8%	39,7%; 133,8 – 212,7° C + 342,9 – 439,7°C	Estrutura foliar
	24h25°C	Troca aniônica parcial	d(003) = 7,8	υ(CO ₃ ²⁻)=1385	510,14	11,2%	20,8%	39,5%; 144,3 – 213,9°C + 333,2 – 451,6°C	Estrutura foliar
	24h 40°C	Troca aniônica total	d(003) = 7,8	υ(CO ₃ ²⁻) =1385	610,88	8,2%	10,3%	41,2%; 150,9 – 214,5°C + 349 – 446,5°C	Estrutura foliar
							-	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	
HDL nanométrico pó resultante da suspensão	-	-	d(003) = 7,9	υ(CO₃²-) = 1355	-	-	-	39,2%; 95,1 − 211,6°C + 334,9 − 390,9°C	Aglomerados
	2h25°C	Troca aniônica total	d(003) = 7,8	υ(CO ₃ ²⁻) =1383	732,20	6,0%	6,0%	40%; 166,1 – 219,6°C + 220 – 353,1°C	Aglomerados
Grupo 3	2h40°C	Troca aniônica total	d(003) = 7,8	υ(CO ₃ ²⁻) =1383	851,28	8,3%	11,8%	38,8%; 162,1 - 217°C + 319,9 - 468°C	Aglomerados
	24h25°C	Troca aniônica total	d(003) = 7,8	υ(CO ₃ ²⁻) =1383	123,10	45,7%	46,7%	41,6%; 164,3 – 216,6°C + 403,3 – 447,2°C	Aglomerados
	24h 40°C	Troca aniônica total	d(003) = 7,8	υ(CO ₃ ²⁻) =1383	635,00	0,6%	8,0%	40,4%; 166,3- 219,7°C + 220 - 341,3°C	Aglomerados

APÊNDICE 4 – Resumo dos resultados de caracterização expostos no presente trabalho.

Fonte: própria autoria, 2018

105