



UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE ESTOMATOLOGÍA
PROGRAMA DE DOCTORADO EN
MEDICINA CLÍNICA Y SALUD PÚBLICA

*Efectos Químicos y Mecánicos del Fluoruro Diamínico
de Plata en la Dentina*

Tesis Doctoral

Carolina Cecilia Cifuentes Jiménez

Directores

Profa. María Victoria Bolaños Carmona

Prof. Pedro Álvarez Lloret

Granada, 2023

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Carolina Cecilia Cifuentes Jiménez
ISBN: 978-84-1195-171-5
URI: <https://hdl.handle.net/10481/89408>

Tesis dirigida por:

Profa. María Victoria Bolaños Carmona
Universidad de Granada

Prof. Pedro Álvarez Lloret
Universidad de Oviedo

歯科医術たるは愛の御業なり

“Dentistry is a work of love”

-Kanzō Uchimura

Índice |

Lista de abreviaturas	1
Lista de tablas.....	3
Lista de figuras	5
Resumen / <i>Abstract</i>	7
Capítulo 1: Marco teórico	
1.1 Estructuras mineralizadas del diente.....	16
1.1.1 Esmalte.....	16
1.1.2 Dentina.....	17
1.2 Caries dental.....	18
1.2.1 Lesión de caries en esmalte.....	18
1.2.2 Lesión de caries en dentina.....	19
1.2.3 Tratamiento de las lesiones cariosas.....	20
1.3 Método de ciclaje de pH para simulación de lesiones cariosas.....	21
1.4 Remineralización de la dentina.....	21
1.5 Compuestos remineralizadores.....	22
1.5.1 Fluoruro diamino de plata	23
1.5.1.1 Plata.....	24
Efecto antibacteriano.....	24
Efecto en la remineralización de la dentina	25
Efecto sobre el colágeno dentinario.....	27
1.5.1.2 Fluoruro.....	27
Efecto antibacteriano.....	27
Efecto en la remineralización de la dentina	27
Efecto sobre el colágeno dentinario.....	28
1.5.1.3 Efectos secundarios del SDF y toxicidad asociada...29	

1.5.1.4	Aplicaciones clínicas.....	29
1.5.2.	Uso de fluoruros en odontología.....	30
1.6	Nanotecnología y odontología.....	31
1.6.1	Nanopartículas de plata.....	32
1.6.2	Síntesis de nanopartículas de plata.....	34
1.6.3	Toxicidad	35

Capítulo 2: Justificación y Objetivos

2.1	Justificación.....	39
2.2	Objetivos.....	43

Capítulo 3: Efectos fisicoquímicos y mecánicos de los agentes comerciales de fluoruro diamino de plata (SDF) en la dentina desmineralizada

3.1	Introducción	49
3.2	Materiales y Métodos.....	51
3.3	Resultados.....	59
3.4	Discusión.....	66
3.5	Conclusiones.....	72

Capítulo 4: Evaluación de la capacidad remineralizadora del fluoruro diamino de plata sobre dentina desmineralizada en condiciones de ciclado

4.1	Introducción.....	76
4.2	Materiales y Métodos.....	78
4.3	Resultados.....	84
4.4	Discusión.....	91
4.4	Conclusiones.....	98

Capítulo 5: Efecto de nanopartículas de plata funcionalizadas sintetizadas a partir extracto de plantas (Camellia sinensis) sobre las propiedades fisicoquímicas y mecánicas de la dentina desmineralizada

5.1	Introducción	103
5.2	Materiales y Métodos.....	106
5.3	Resultados.....	111
5.4	Discusión.....	118
5.4	Conclusiones.....	123
	Capítulo 6: Conclusiones / Conclusions.....	127
	Referencias Bibliográficas.....	131
	Financiación	151
	Producción Científica	153
	Anexo 1	157
	Anexo 2.....	159

Lista de Abreviaturas |

- **SDF:** Fluoruro diamino de plata
- **FWHM, inglés:** Anchura a media altura
- **HAp:** Hidroxiapatito
- ***d*:** Tamaño de cristalito
- **DE:** Desviación estándar
- **ATR-FTIR, en inglés:** Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier-Reflectancia total atenuada
- **DRX:** Difracción de Rayos X
- **2D-XRD, en inglés:** Difracción de Rayos X bidimensional
- **EDX:** Energía dispersiva de Rayos X
- **SEM, en inglés:** Microscopía electrónica de barrido
- **FDA:** Administración de Alimentos y Medicamentos
- **ADN:** Ácido desoxirribonucleico
- **FPT:** Fallos prematuros de ensayo
- **c-pH:** Ciclaje de pH
- **DS:** Dentina sana
- **DD:** Dentina desmineralizada
- **TEM:** Microscopía electrónica de transmisión
- **TGA:** Termogravimetría
- **NPs:** Nanopartículas
- **AgNPs:** Nanopartículas de plata

- **TB:** Té blanco
- **CHS:** chitosan
- **MO:** Materia orgánica
- **IC:** Índice de cristalinidad

Lista de Tablas |

- **Tabla. 1** Material y nombre del fabricante, composición química y procedimientos de aplicación para los diferentes productos de SDF y adhesivos.
- **Tabla. 2** Media (Desviación estándar) de los parámetros de composición analizados por ATR-FTIR.
- **Tabla. 3** Valores de anchura a media altura (en inglés, FWHM) y el tamaño de cristalito (d) del hidroxiapatito (HAp) en dentina sana y desmineralizada (incluyendo los tratamientos de SDF, excepto RivaStar2), cloruro de plata (ClAg) y yoduro de plata (IAg) en los tratamientos de SDF. N.d. = no detectado.
- **Tabla. 4** Resultados de la prueba de ensayo mecánicos mediante Microtensión.
- **Tabla 5.** Material y fabricante, composición química y procedimientos de aplicación para los diferentes productos de fluoruro diamino de plata (SDF) y fluoruro de sodio (NaF)
- **Tabla 6.** Media (DE) de los ratios de composición inorgánica/orgánica obtenidos mediante análisis ATR-FTIR para cada periodo experimental.
- **Tabla 7.** Valores de Anchura a media altura (FWHM) y tamaño del cristalito (d) para los cristales de hidroxiapatito (HAp) considerando la reflexión 002 (dirección del eje c) para los controles negativo y positivo, y los tratamientos con los productos remineralizantes SDF/NaF.
- **Tabla 8.** Valores de resistencia a la flexión (media \pm DE) determinados por la prueba de flexión en tres puntos para los controles negativos y positivos y los tratamientos con los productos remineralizantes de SDF/NaF.
- **Tabla 9.** Contenido de materia orgánica (M.O.%) obtenido mediante análisis TGA para las diferentes TB_AgNPs

Lista de Figuras |

- **Fig. 1** Imagen de SEM de los prismas del esmalte.
- **Fig. 2** Imagen obtenida mediante SEM de los túbulos dentinarios.
- **Fig. 3** Imagen obtenida mediante SEM de una lesión de caries radicular.
- **Fig. 4** Diferentes presentaciones comerciales del producto SDF.
- **Fig. 5** Mecanismos del acción del SDF.
- **Fig. 6** Mecanismo antibacteriano de las nanopartículas de plata.
- **Fig. 7** Espectrómetro FTIR Jasco 6600 con accesorio ATR empleado para el análisis de las muestras.
- **Fig. 8** Difractómetro de Rayos X Bruker D8 DISCOVER con detector 2 D (Dectris Pilatus 3 100K-A).
- **Fig. 9** Microscopio Electrónico de Barrido S-510, Hitachi.
- **Fig. 10** Patrones 2D-XRD mostrando los anillos de Debye-Scherrer (columna izquierda) y el barrido 2Theta integrado (columna derecha) para (a) dentina sana; (b) dentina desmineralizada y tratamientos de SDF; (c) Cariestop; (d) RivaStar2; (e) RivaStar1; (f) Saforide. Las líneas verticales representan las posiciones de los picos de referencia para los patrones de difracción de hidroxiapatito (a,b), AgCl (c,e,f) y AgI (d).
- **Fig.11** Imágenes de SEM de la superficie de la dentina tratada con los diferentes agentes de SDF (C-F), agentes de SDF y ácido fosfórico al 37,5% (I-F), agentes SDF y Primer Clearfil SE Bond (O-R)
- **Fig. 12** Distribución de los modos de fallo según el tratamiento de SDF y los tipos de adhesivos (Clearfil SE Bond 2, abreviado como Clearfil SE).
- **Fig. 13** Diagrama del diseño experimental.
- **Fig. 14** Espectros representativos de ATR-FTIR para el control negativo (Periodo 1), control positivo (Periodo 2) y productos remineralizantes (Periodo 3): (A) Saforide, (B) Cariestop, (C) RivaStar, y (D) NaF.
- **Fig. 15** Patrones de difracción de rayos X (barrido 2Theta) para los controles negativo y positivo y los grupos experimentales SDF/NaF. El tamaño de los

cristalitos de HAp se determinó midiendo los valores de FWHM para la reflexión (002) (es decir, correspondiente a los ejes c).

- **Fig. 16** Imágenes representativas de SEM de dentina sana; control negativo (A-B) y dentina desmineralizada; control positivo (C- D). Grupos experimentales tras la aplicación de productos remineralizantes Periodo 3: Saforide (E-F), Cariestop (G-H), RivaStar (I-J) y NaF (M-N).
- **Fig. 17** Distribución elemental de P, Ca, C, O, Ag, I y Na en la superficie de la dentina mediante análisis semicuantitativo de EDX para controles negativos y positivos, y tratamientos con los productos remineralizantes de SDF/NaF
- **Fig. 18** Espectros representativos de ATR-FTIR de las diferentes AgNPs reducidas con té blanco y funcionalizadas con chitosan y NaF.
- **Fig. 19** Patrones representativos de difracción de rayos X (DRX) de las diferentes AgNPs reducidas con té blanco (TB) funcionalizadas con chitosan (CHS) y NaF. Entre paréntesis se indican los índices de Miller correspondientes a cada línea de difracción (estructura cúbica).
- **Fig. 20** Imágenes representativas de TEM de las NPs a diferente resolución: TB_AgNPs, (A-B), TB_CHS_AgNPs, (D-E) y TB_NaF_AgNPs (G-H). Los espectros representan los análisis elementales EDS para cada TB_AgNPs sintetizada (C-F-I), indicando la composición de Ag (posición del pico 3 keV).
- **Fig. 21** Imágenes representativas de SEM que muestran la distribución de las AgNPs en la dentina desmineralizada: (A) TB_AgNPs, (B) TB_CHS_AgNPs, (C) TB_NaF_AgNPs.
- **Fig. 22** Resistencia a la flexión de las muestras de dentina de los grupos de control (SD y DD) y de los grupos TB_AgNPs determinado mediante un ensayo mecánico de flexión en tres puntos.

Resumen |

La caries dental es la enfermedad crónica con mayor prevalencia en todo el mundo. Esta enfermedad se caracteriza por presentar una etiología multifactorial y una evolución lenta que conduce a la destrucción de los tejidos duros dentales. El conocimiento actual de la fisiopatología de la caries dental y la disponibilidad de nuevos recursos terapéuticos ha contribuido a la aceptación general de la odontología de mínima invasividad en el abordaje operatorio de la lesión de caries, e incluso la no invasividad en sus estadios iniciales y moderados. Desde este punto de vista, la evolución de la lesión de caries puede detenerse o ser revertida mediante procedimientos de remineralización de los tejidos afectados.

El fluoruro diamino de plata (SDF) es una opción económica, segura y de fácil acceso para el tratamiento de las lesiones de caries. Además, el tratamiento con SDF requiere de una instrumentación mínima y no necesita de instalaciones complejas para su aplicación. Particularmente, la característica más llamativa de este material es su capacidad para detener las lesiones de caries de forma no invasiva. En concreto, cuando el SDF se aplica sobre el tejido dental cariado, se producen una serie de reacciones químicas que favorecen la detención de la caries, así como la desensibilización del diente por el bloqueo de los túbulos dentinarios. Además, este producto tiene la capacidad de tener una acción antimicrobiana y remineralizadora e inhibe de la degradación colágeno dentinario. Sin embargo, a pesar de las múltiples investigaciones sobre el mecanismo de acción del SDF, no existe un protocolo establecido para la aplicación de este material en el tejido dentinario.

Por otra parte, teniendo en cuenta las características del SDF, también es interesante evaluar las propiedades de este material en distintos ambientes orales. El ciclaje de pH constituye un procedimiento idóneo para evaluar distintos materiales dentales bajo diferentes periodos de desmineralización y remineralización, simulando *in vitro* un proceso de caries. En este contexto, esta metodología permite determinar varios aspectos fundamentales del SDF bajo determinados condicionantes, como su

capacidad remineralizadora la cual resulta esencial para la práctica odontológica mínimamente invasiva.

Junto a sus múltiples ventajas, el SDF presenta un importante inconveniente de carácter estético. Este material produce una tinción negra en la superficie dental debido a la oxidación de los iones de plata libres en su formulación, siendo esta indeseada coloración la razón principal del rechazo al tratamiento del SDF por parte del paciente. Para solucionar este problema estético diferentes marcas comerciales han añadido el uso del yoduro de potasio (KI) durante su aplicación. No obstante, la utilización de este compuesto ha demostrado comprometer la actividad antimicrobiana del SDF. En este contexto, el uso y la implementación de la nanotecnología ha surgido como alternativa durante las últimas décadas para intentar solventar este problema. Este método consiste en el desarrollo de AgNPs para evitar la coloración de las superficies, sin poner en compromiso las propiedades del SDF para estos tratamientos. Sin embargo, aún no se conocen las propiedades de estas AgNPs en su aplicación, ni las posibles interacciones de estas AgNPs con las estructuras dentarias.

Teniendo en cuenta las anteriores consideraciones, es evidente que no existe un consenso sobre la rehabilitación de las cavidades tratadas con SDF, ni está claro cómo abordar el problema estético que conlleva el uso de este material. Por lo tanto, el objetivo principal de la presente Tesis Doctoral es evaluar los efectos fisicoquímicos, morfológicos y mecánicos de compuestos plata en la dentina desmineralizada.

Esta tesis doctoral se encuentra estructurada en seis Capítulos. En primer lugar, el Capítulo 1, presenta un marco teórico a partir de una amplia revisión bibliográfica sobre diferentes temas y cuestiones relacionadas con esta investigación doctoral. Para ello, se introducen algunos conceptos básicos describiendo las estructuras mineralizadas del diente para después exponer diferentes técnicas para el tratamiento de las lesiones de la caries dental y su proceso de remineralización. A continuación, se analiza el uso del SDF, sus mecanismos de acción y sus implicaciones clínicas. Por

último, este capítulo introduce algunos conceptos fundamentales en el ámbito de la nanotecnología en odontología. En el Capítulo 2, se plantean los objetivos principales y específicos de esta Tesis Doctoral.

El Capítulo 3 evalúa los efectos fisicoquímicos inmediatos del uso de diferentes marcas comerciales de SDF y su relación con la respuesta adhesiva inmediata de los sistemas adhesivos de grabado-lavado y autograbantes. Mientras que el Capítulo 4 analiza la capacidad remineralizadora del SDF y NaF en condiciones de ciclaje de pH. A continuación, el Capítulo 5 plantea la síntesis de nanopartículas de plata mediante química verde, empleando extracto de plantas (*Camellia sinensis*), y funcionalizadas con quitosán y NaF, como un material alternativo al SDF. Además, este capítulo evalúa la aplicación de estas AgNPs sobre las propiedades fisicoquímicas y mecánicas de la dentina desmineralizada. El Capítulo 6 plantea las conclusiones finales derivadas de la investigación desarrollada en cada uno de los estudios descritos anteriormente.

Abstract |

Dental caries is the most prevalent chronic disease worldwide. This disease is characterized by a multifactorial etiology and a slow progression leading to the destruction of dental hard tissues. The current understanding of the pathophysiology of dental caries and the development of new therapeutic resources has contributed to the acceptance of minimally invasive dentistry in the operative approach for caries lesions and even non-invasive dentistry in early and moderate stages. From this point of view, the evolution of the caries lesion can be arrested or reversed by remineralization procedures of the affected tissues.

Silver diamine fluoride (SDF) is an inexpensive, safe and easily accessible option for the treatment of caries lesions. Moreover, SDF treatment requires minimal instrumentation and does not require complex facilities for its application. In particular, the most remarkable characteristic of this material is its ability to arrested caries lesions with a non-invasive approach. Specifically, when SDF is applied to carious tooth tissue, a series of chemical reactions occur that promote caries arrest, as well as the desensitization of the tooth by occluding the dentinal tubules. Additionally, this product has antimicrobial and remineralising action and inhibits dentin collagen degradation. However, despite multiples investigations on the mechanism of action of SDF, there is no established protocol for the application of this material in dentine tissue.

On the other hand, considering the characteristics of SDF, it is also essential to evaluate the properties of this material in different oral environments. pH cycling is an appropriate procedure to evaluate several dental materials under different periods of demineralization and remineralization that simulated a caries process *in vitro*. In this context, this methodology allows us to determine certain fundamental aspects of SDF under particular conditions, such as its remineralizing capacity, which is essential for a minimally invasive dental practice.

Besides its many advantages, SDF has a major aesthetic inconvenience. This material produces black staining on the tooth surface due to the oxidation of the free silver ions in its formulation, and this black staining is the main reason for the patients rejection of SDF treatment. To overcome this aesthetic problem, different commercial brands have added potassium iodide (KI) during application. However, using this compound has been shown to compromise the antimicrobial activity of SDF. In this context, the use and implementation of nanotechnology have emerged as an alternative during the last decades to try to solve this problem. This method consists of developing AgNPs to avoid surface staining without compromising the properties of the SDF for these treatments. However, the properties of these AgNPs in their application and the possible interactions of these AgNPs with tooth structures are still unknown.

Based on the above considerations, it is evident that there is no consensus on the rehabilitation of cavities treated with SDF, nor is it unclear how to address the aesthetic problem associated with the use of this material. Therefore, the main objective of this Ph.D. thesis is to evaluate the physicochemical, morphological, and mechanical effects of silver composites on demineralized dentin.

This doctoral thesis is structured in six chapters. Firstly, Chapter 1 presents a theoretical background based on an extensive literature review on different topics and issues related to this doctoral research. For this purpose, some basic concepts are introduced by describing the mineralized structures of the tooth. Then, different techniques for treating dental caries lesions and their remineralization process are presented. Subsequently, the use of SDF, its mechanisms of action, and its clinical implications are discussed. Finally, this chapter introduces some fundamental concepts in the field of nanotechnology in dentistry. In Chapter 2, the principal and specific objectives of this Doctoral Thesis are presented.

Chapter 3 evaluates the immediate physicochemical effects of the use of different commercial brands of SDF and their relationship with the immediate

adhesive response of etch and rise and self-etch adhesive systems. Chapter 4 analyses the remineralizing capacity of SDF and NaF under pH cycling conditions. Furthermore, Chapter 5 discusses the synthesis of silver nanoparticles by green chemistry, using plant extract (*Camellia sinensis*), and functionalized with chitosan and NaF as an alternative material to SDF. In addition, this chapter evaluates the application of these AgNPs on the physicochemical and mechanical properties of demineralised dentin. Chapter 6 presents the conclusions from the research carried out in each of the studies described above.

Capítulo 1 |

Marco Teórico

1.1 Estructuras mineralizadas del diente

1.1.1 Esmalte dental

El esmalte es un tejido acelular de naturaleza cristalina, cuyo contenido es un 96% de hidroxiapatito, 3% de agua y 1% de materia orgánica, incluidas proteínas y lípidos [1]. Su unidad estructural básica son los prismas del esmalte, haces de cristales de hidroxiapatito ordenados y densamente empaquetados por una red de material orgánico que los envuelve, extendiéndose desde la unión esmalte-dentinaria hasta la superficie exterior del esmalte (Fig. 1) [2]. Estos prismas presentan un tamaño promedio de 50 × 25 nm (ancho × espesor), pudiendo variar su dimensión en profundidad del esmalte [3].

La distribución de estos prismas cristalinos no es homogénea, estando relacionada con la morfología dental. El esmalte de mayor espesor se encuentra sobre las superficies de trabajo del diente mientras que el de menor espesor localiza en las regiones de baja exposición al desgaste [3]. De esta manera, el esmalte puede alcanzar un espesor de 2.5 mm en las cúspides y estrecharse progresivamente hasta convertirse en un filo de cuchillo en el margen cervical [4]. Este tejido constituye la capa externa de los dientes presentando unas características que le permiten resistir a una variedad de desafíos mecánicos y físico-químicos [2]. Estos factores incluyen fuerzas de compresión (que pueden alcanzar cargas de hasta 700 N), abrasión, desgaste y, especialmente, ambientes ácidos provenientes de la placa bacteriana y la dieta [3].

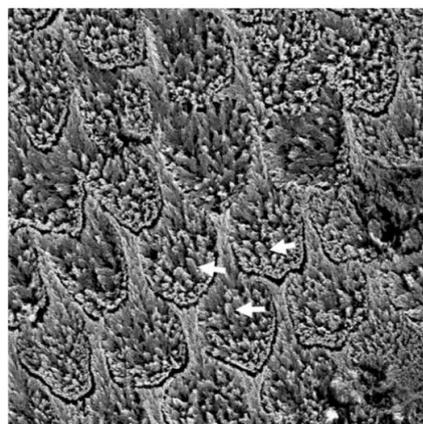


Fig. 1 Imagen de SEM de los prismas del esmalte. Tomado de Fu-Zhai Cui et.al.[5]

1.1.2 Dentina

La dentina es un tejido conectivo mineralizado altamente complejo que se encuentra inmediatamente debajo del esmalte. Este tejido mineralizado está constituido por una fase inorgánica compuesta por hidroxiapatito (70%), agua (10%) y una matriz orgánica formada por colágeno fibrilar de tipo I y proteínas no colágenas (NCP) (20%) [6]. La dentina forma la mayor parte del diente humano; por lo que todos los procesos que afecten a su biomecánica y bioquímica influirán en el rendimiento mecánico de toda la estructura, siendo esto de gran importancia para la función general de los dientes [7].

A nivel macroestructural, este tejido se encuentra formado por túbulos dentinarios con forma de cono invertido, con su vértice ubicado cerca a la pulpa y extendiéndose hasta la unión amelodentinal [8]. Estos túbulos desempeñan distintas funciones, incluida el mantenimiento de la hidratación del diente, constituir un conducto para la transducción de señales físicas a respuestas sensoriales y un anclaje en la unión adhesiva para los tratamientos restauradores (Fig. 2) [6]. Específicamente, la dentina se encuentra conformada por dentina peritubular (tejido altamente mineralizado, 95% en volumen del tejido) e intertubular (se encuentra la mayor parte del contenido orgánico 30% en volumen del tejido) [9]. Como consecuencia de su composición química y estructura histológica, este tejido posee tres propiedades mecánicas esenciales; dureza, resistencia y elasticidad [10]. Además, la dentina puede sufrir distintas modificaciones físico-químicas debido al propio envejecimiento fisiológico y a diversos procesos patológicos, produciendo diferentes morfologías de dentina [7].

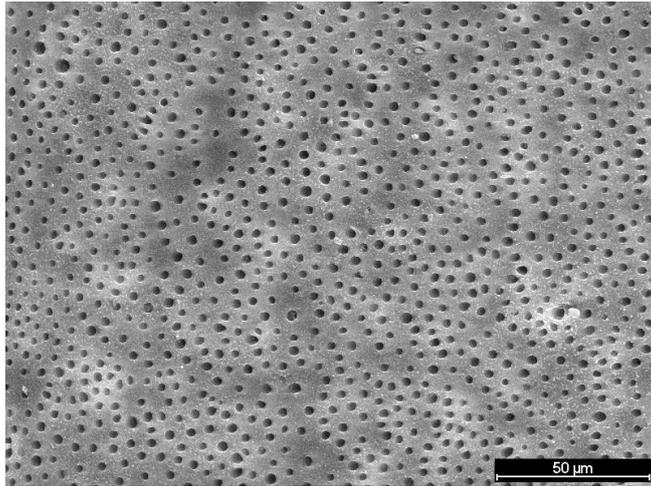


Fig. 2 Imagen obtenida mediante SEM de los túbulos dentinarios. Centro de Instrumentación Científica (UGR).

1.2 Caries dental

La caries dental es una enfermedad crónica, dinámica, multifactorial, no transmisible; producida por biopelículas y modulada por la dieta, tiene como consecuencia la pérdida mineral de los tejidos duros dentales [11]. La caries está determinada por factores biológicos, conductuales, psicosociales y ambientales [1]. Esta enfermedad es actualmente la patología más prevalente en los dientes permanentes, y forma parte del conjunto de enfermedades que afectan a las personas durante toda la vida [12].

1.2.1 Lesión de caries en esmalte

La lesión de caries es la etapa terminal de una pérdida progresiva de mineral generada en el esmalte [11]. En este tejido la enfermedad progresa imperceptiblemente hasta que los cambios provocados son clínicamente visibles, presentándose en este caso una lesión de mancha blanca en la superficie del esmalte [1]. Esta situación resulta clínicamente relevante ya que es únicamente hasta esta etapa cuando la lesión puede ser detenida o revertida [13]. Sin embargo, en el caso en que la pérdida de mineral progrese, la porosidad del esmalte se incrementará, permitiendo con ello que los ácidos se difundan a mayor profundidad y continúen desmineralizando la

subsuperficie, generando en último término una alteración estructural y la formación de una cavidad [14].

1.2.2 Lesión de caries en dentina

El desarrollo de la lesión de caries en dentina consta de dos capas: una externa o dentina infectada, y una interna o dentina afectada [15]. La capa externa se caracteriza por estar altamente desmineralizada y fisiológicamente sin capacidad de remineralización (Fig. 3) [9]. Los túbulos dentinarios se encuentran desorganizados y su interior está ocupado por bacterias. Debido al proceso de desmineralización la dentina peritubular desaparece y el diámetro de los túbulos aumenta. De esta manera, las bacterias consiguen invadir la dentina peritubular, y los túbulos van coalesciendo dando lugar a zonas necróticas [16].

Por otro lado, la capa interna o dentina afectada se caracteriza por encontrarse parcialmente desmineralizada y, en consecuencia, ser fisiológicamente remineralizable [9]. Esta capa se subdivide en tres áreas: capa turbida, zona transparente o translúcida y zona subtransparente. La capa turbida se caracteriza por la presencia de fibras de colágeno no desnaturalizadas y con la existencia de sus bandas características. Por otra parte, la zona transparente se caracteriza por presentar los túbulos dentinarios rellenos de cristales de gran tamaño, siendo estos más resistentes a los ácidos producidos por las bacterias. Esta esclerosis tubular es responsable de su aspecto transparente o translúcido, dando lugar al nombre de esta área. Por último, en la zona subtransparente encontramos menos descalcificaciones tubulares y áreas de dentina no afectada al encontrarse más próxima a la dentina sana subyacente [16].

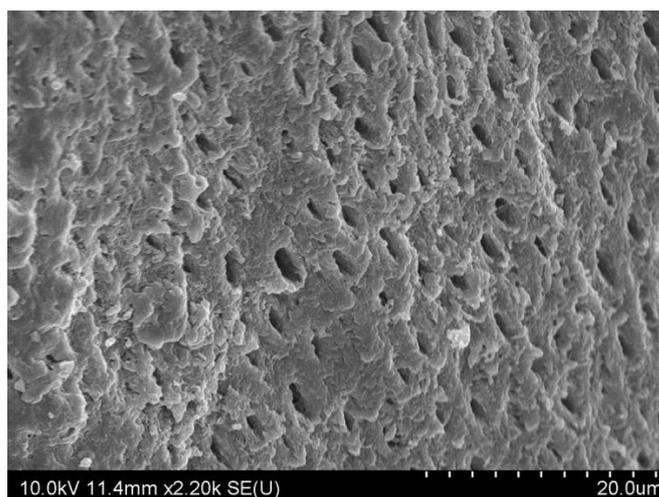


Fig. 3 Imagen obtenida mediante SEM de una lesión de caries radicular. Facultad de Odontología de la Universidad de Hokkaido (Japón)

1.3 Tratamiento de las lesiones de caries

Son aquellas acciones tomadas para interferir con la pérdida mineral durante todas las etapas de la enfermedad de la caries.

1.3.1 Tratamiento convencional (quirúrgico): este tratamiento consiste en remover mecánicamente el tejido afectado por la caries y reemplazarlo por un material de restauración (composites, ionómeros de vidrio), con la finalidad de contribuir en el control del biofilm y restaurar la forma y función del diente [17].

1.3.2 Tratamiento mínimamente invasivo: su concepto se centra en la preservación de la estructura dental [1]. Este tratamiento se basa principalmente en diagnosticar, interceptar y tratar la caries dental a nivel microscópico [18]. Bajo esta premisa, la atención máxima en estos tratamientos está puesta en la conservación del esmalte y la dentina desmineralizada no cavitados. De esta manera, los principales objetivos para estos tratamientos mínimamente invasivos son los siguientes: prevención de caries, reducción de las bacterias cariogénicas, remineralización de lesiones tempranas, mínima intervención quirúrgica de la lesión cavitada y reparación en lugar de sustitución completa de restauraciones defectuosas [19].

1.3 Método de ciclaje de pH para simulación de lesiones cariosas

Un método es un proceso que simula algún fenómeno de interés, lo que permite al investigador obtener información sobre dicho hecho [20]. Entre ellos, los métodos *in vitro* son los más utilizados en la investigación cariológica. La inducción de lesiones de caries en el sustrato dentinario permite investigar varios aspectos fundamentales para la práctica odontológica, por ejemplo: evaluar los efectos preventivos de los agentes fluorados, métodos de remoción de caries, evaluación de la adhesión de la dentina cariada, etc. [21].

Los métodos basados en ciclaje de pH implican la exposición de los sustratos dentales (esmalte o dentina) a periodos de desmineralización y remineralización. Los ciclos de desmineralización corresponden al periodo en el que los dientes están expuestos a los ácidos producidos por las bacterias, mientras que los ciclos de remineralización corresponden a la acción remineralizadora de la saliva [21]. Este método experimental está diseñado para simular la dinámica de la pérdida y ganancia de mineral que intervienen en la formación de las lesiones de caries [22].

Estos procedimientos se caracterizan por presentar un alto control experimental y sensibilidad técnica lo genera una menor variabilidad intrínseca, así como requerir un reducido tamaño de muestra [20]. Otras ventajas de este método son su rentabilidad y fácil reproducción. Sin embargo, una importante desventaja de este método es la incapacidad de simular completamente las condiciones orales que conducen al desarrollo de la caries (i.e. biopelículas bacterias, placa bacteriana y saliva) [23]. Estas limitaciones deben tenerse en cuenta cuando se pretende extrapolar los datos de los estudios de ciclaje de pH a las situaciones clínicas.

1.4 Remineralización de la dentina

La remineralización se refiere a la ganancia neta de componente mineral de un tejido previamente desmineralizado, teniendo como objetivo el restablecimiento de su

funcionalidad [24]. El término remineralización puede inducir a cierta confusión, ya que no implica que la lesión haya recuperado su contenido o características del mineral original sino que, aunque se detecta un balance positivo, conlleva únicamente una ganancia mineral [1]. Este proceso puede ocurrir mediante: (1) la incorporación espontánea de iones implicados en la formación de mineral (i.e., calcio, fosfato y fluoruro) provenientes de la saliva sobre los cristales de hidroxiapatito en el tejido desmineralizado, o (2) por medio de tratamientos que incorporan los mismos iones de fuentes externas, a través de agentes remineralizadores [9] .

- **Vía clásica de nucleación:** se basa en la cristalización mediada por iones. Este proceso comienza a partir de los denominados bloques de construcción primarios (i.e., átomos, iones o moléculas), que con el transcurso del tiempo van formando aglomerados hasta llegar a alcanzar el tamaño adecuado de un núcleo cristalino, para posteriormente desarrollar crecimiento cristalino. Sin embargo, estos núcleos pueden disgregarse dependiendo de la energía de superficie y de la red cristalina dentro del sistema considerado [25]
- **Vía no clásica:** se encuentra mediada por precursores sólidos amorfos (como fosfatos de calcio amorfo) que mediante mecanismos de agregación forman cristales asociados a proteínas colágenas o no colágenas (análogos biomiméticos) producen la mineralización intrafibrilar del tejido [26].

1.5 Compuestos remineralizadores de la dentina

Un agente remineralizador se puede definir de forma sencilla como una sustancia capaz de promover la remineralización del tejido dental [27].

Las características generales que deben presentar estos compuestos son [28]:

- Deben ser capaces de liberar controladamente calcio y fosfato al sustrato dental.
- No deben aportar un exceso de calcio que favorezca la formación de cálculos.

- Deben actuar sobre un pH ácido para detener la desmineralización durante un proceso de caries.
- Deben ser capaces de potenciar las propiedades remineralizadoras de la saliva.

1.5.1 Fluoruro diamino de plata

En odontología el primer manejo de un compuesto con plata se registró en 1840, donde se identificó el uso del nitrato de plata (AgNO_3) para el tratamiento de la caries. Este compuesto fue utilizado por dentistas estadounidenses para cauterizar instantáneamente las lesiones cariosas, con la finalidad de generar un efecto similar a la de una costra dura y oscura [29]. Sin embargo, no fue hasta el año 1917 cuando Howe describió el uso de una solución amoniacal de nitrato de plata, llamada “Solución de Howe” para uso odontológico. Esta solución se aplicaba directamente después de la preparación cavitaria de las lesiones e incluso fue recomendado como desinfectante en la terapia de conductos radiculares [30]. Por otra parte, en 1970 el Servicio Dental Escolar de Australia utilizó fluoruro de plata (AgF) como un tratamiento mínimamente invasivo en niños desfavorecidos en Nueva Gales del Sur [31].

El fluoruro diamino de plata fue investigado por primera vez en 1969 como parte de la tesis doctoral de la Dra. Mizuho Nishino de la Universidad de Osaka (Japón). Esta investigación se centró en el desarrollo de un material que buscaba combinar las propiedades antimicrobianas de la plata con la capacidad remineralizadora del fluoruro [30]. Este producto contiene en su formulación un alto contenido en fluoruro (equivalente a una concentración relativa de 5%; 44.8000 ppm), plata (25%; 253.900 ppm), 8% amoniacal y 62% agua [32]. La solución está compuesta de un ion fluoruro y un ion diamina-plata $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$, este último complejo producido de la unión de dos moléculas de amoniacal a un ion de plata [33]. Esta primera composición de SDF generaba un compuesto capaz de funcionar como agente cariostático que a su vez obliteraba los túbulos dentinarios y reducía la hipersensibilidad dentinaria [34]. Al tiempo, el Consejo Farmacéutico Central del Ministerio de Salud y Bienestar de Japón aprobó el uso de SDF como agente

cariostático en odontología y fue comercializado por los Laboratorios J.Morita con el nombre Saforide [30]. Posteriormente, se empezaron a realizar los primeros estudios *in vivo* de este material en varios países: Argentina, Brasil, China, Cuba, Japón y Nepal [35,36], entre otros, siendo todavía empleado en muchos de estos países en la actualidad.

En 2014 el SDF fue reconocido por la Administración de Alimentos y Medicamentos de EE. UU (FDA), como un producto sanitario de clase II, concediendo su aprobación para el tratamiento de la hipersensibilidad dentinaria. Con posterioridad, en 2016 la FDA otorgó al SDF la designación de “terapia innovadora” por su capacidad de detención de la caries dental en niños y adultos [30]. Desde entonces, se han comercializado diferentes productos comerciales en distintas regiones, como por ejemplo (Fig. 4): Cariestop (SDF 30%, 12%-Brasil), Advantage Arrest (SDF 38%- México), FA gamin (SDF 38%- Argentina), RivaStar (SDF 38% +KI - Australia).



Fig.4 Diferentes presentaciones comerciales del producto SDF. Imágenes promocionales (COA Dental, Tedequim, SDI, Biodinâmica, J.Morita)

En la siguiente sección abarcaremos las distintas propiedades y funciones de la plata y del fluoruro separadamente para un mejor entendimiento de los mecanismos de acción del SDF sobre el sustrato dentario.

1.5.1.1 Plata

Efecto antibacteriano

La solución de SDF es capaz de liberar iones de plata al medio, presentando tres estados de oxidación: ion plata (I), ion plata divalente (II), e ion plata trivalente (III). Entre estos, solo el ion plata trivalente es lo suficientemente estable para desempeñar una actividad antibacteriana [37]. Este ion interactúa mediante diferentes mecanismos con los microorganismos para generar su destrucción:

- Bloquea el sistema de transporte de electrones de las paredes bacterianas [38].
- Interactúa con el grupo tiol de las enzimas que contienen el aminoácido cisteína, desactivándolas y generando la muerte celular bacteriana [38].
- Provoca la ruptura de la pared bacteriana a través de uniones electrostáticas entre la Ag a las porciones aniónicas de la membrana [39].
- Interactúa con el ácido desoxirribonucleico (ADN), provocando la destrucción bacteriana [38].

En consecuencia, que un microorganismo sea capaz de crear una total resistencia bacteriana contra la plata es poco probable debido a sus múltiples mecanismos antimicrobianos. De esta manera, el SDF ha demostrado una potente acción antimicrobiana contra las biopelículas cariogénicas [40]. Este efecto antimicrobiano ha sido comprobado en múltiples estudios sobre diferentes microorganismos (i.e. especies: *Streptococcus mutans*, *Actinomyces naeslundii*, *Lactobacillus sp.*) [41–43]. Además, un estudio reveló que la mínima concentración inhibitoria (MCI); es decir, la concentración más baja del SDF para inhibir la actividad de *Streptococcus mutans*, fue de 0,06 $\mu\text{mol/ml}$ [44].

Efecto en la mineralización de la dentina

El SDF reacciona con el hidroxiapatito para formar fluoruro de calcio (CaF_2), fosfato de plata (Ag_3PO_4) y óxido de plata (Ag_2O) [45]. La capacidad de penetración en su aplicación varía dependiendo de la estructura dental. El SDF ha mostrado penetrar cerca de 20 μm en el esmalte sano [46,47]. Por otro lado, en dentina desmineralizada se observa que la penetración de SDF es de 50 a 200 μm , llegando a alcanzar al tejido pulpar dental [48].

La formación de fosfato de plata (Ag_3PO_4) podría ser la razón del aumento de la microdureza de la caries tras la aplicación del SDF [49]. Varios estudios afirman que el endurecimiento de la caries detenida por SDF se debe a la reacción de la plata, más que a la remineralización por parte de los fluoruros [47]. Sin embargo, afirmar por completo que los compuestos de la plata contribuyen al endurecimiento de la lesión de caries puede ser cuestionable debido a las siguientes razones:

- La profundidad de penetración de la plata en la dentina debería coincidir con la profundidad del aumento de la microdureza del tejido tratado con SDF [50]. Sin embargo, estudios *ex vivo* muestran un aumento de la microdureza en los 150 μm externos de la lesión de caries en dentina observando solo un aumento de calcio y fosfato en la región, sin la presencia de plata [51].
- Si los compuestos de plata pueden aumentar la dureza de la lesión de caries, entonces los productos de nitrato de plata también deberían de endurecer dicha lesión. Sin embargo, no hay pruebas en la literatura que apoyen esta mención [52].
- La densidad de los compuestos de plata en las lesiones de caries dentinaria es desconocida. Este punto es muy importante ya que el material debe de ser lo suficientemente denso para provocar un cambio en la microdureza del tejido dentario [53].

Por las razones expuestas previamente es aún incierto si los compuestos de plata del SDF contribuyen o no al aumento de la dureza de las lesiones de caries en la dentina.

Por otra parte, varios estudios sugieren la incorporación de la plata a la estructura cristalina del hidroxiapatito en sustitución con iones de calcio, presentando la fórmula $\text{Ca}_{10-x}\text{Ag}_x(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ con $0.0 < x < 0.5$ [54,55]. Este hidroxiapatito conteniendo plata en su composición ha demostrado reducir la adhesión bacteriana y minimizar la citotoxicidad tisular [54].

Efecto sobre el colágeno de la dentina

La plata tiene un efecto indirecto sobre el colágeno ya que es capaz de inhibir la colagenasa (i.e., metaloproteinasas de matriz -MMP- y catepsinas) relacionada con el desarrollo del proceso de la caries dental [56,57]. Particularmente, se ha sugerido que la plata es un potente inhibidor de la catepsina B y K y un moderado inhibidor de las MMP-9 y 8 [52].

1.5.1.2 Fluoruro

Efecto antibacteriano

El flúor ejerce su efecto sobre las bacterias orales mediante la inhibición directa de las enzimas celulares o aumentando la permeabilidad de los protones de las membranas celulares en forma de fluoruro de hidrógeno [58]. Sin embargo, estudios previos tienden a descartar el papel del flúor en la actividad metabólica de las bacterias, alegando que este efecto es solo efectivo cuando se cuenta con grandes concentraciones de flúor. De hecho, se han realizado muy pocos estudios *in vivo* que cuantifiquen el efecto antimicrobiano del flúor ya que el efecto dominante de este compuesto está relacionado con las interacciones con el tejido duro del diente [59].

Efecto en la mineralización de la dentina

Como se ha mencionado anteriormente, tras la aplicación del SDF se forman precipitados de fluoruro de calcio (CaF_2) y fosfato de plata (Ag_3PO_4), siendo estos compuestos responsables de la prevención y del aumento de la microdureza de las lesiones de caries [60]. Por otra parte, la elevada solubilidad del fluoruro de calcio hace que este compuesto no sea estable en un medio acuoso como la saliva [61].

El fluoruro puede interactuar con los cristales de hidroxiapatito de diferentes formas: (1) intercambio iónico de iones fluoruro por iones hidroxilo en la estructura del cristal, o (2) crecimiento cristalino de fluorapatito a partir de soluciones sobresaturadas en este elemento [62]. Cabe destacar que el fluorapatito presenta una menor solubilidad en ambientes ácidos, resultando ser químicamente más estable bajo condiciones cariogénicas [63]. Específicamente, se ha encontrado la presencia de fluorapatito en la dentina tratada previamente con SDF, pudiéndose suponer así, que el SDF puede reaccionar con el calcio y fosfato de la dentina siendo capaz de producir fluorhidroxiapatito, y por consiguiente inducir la remineralización del tejido [60].

Efecto en el colágeno dentinario

El fluoruro es capaz de proteger al colágeno mediante dos vías: (1) promoviendo la remineralización, y en consecuencia, permitiendo que los cristales de hidroxiapatito recubran y protejan el colágeno, e (2) inhibiendo la actividad de las colagenasas, implicadas en el proceso de la lesión cariosa [56,64,65]. En este sentido, se ha demostrado que la alta electronegatividad de los iones de flúor puede unirse a los iones de zinc y calcio, que son parte fundamental para la función catalítica de las MMP [66].

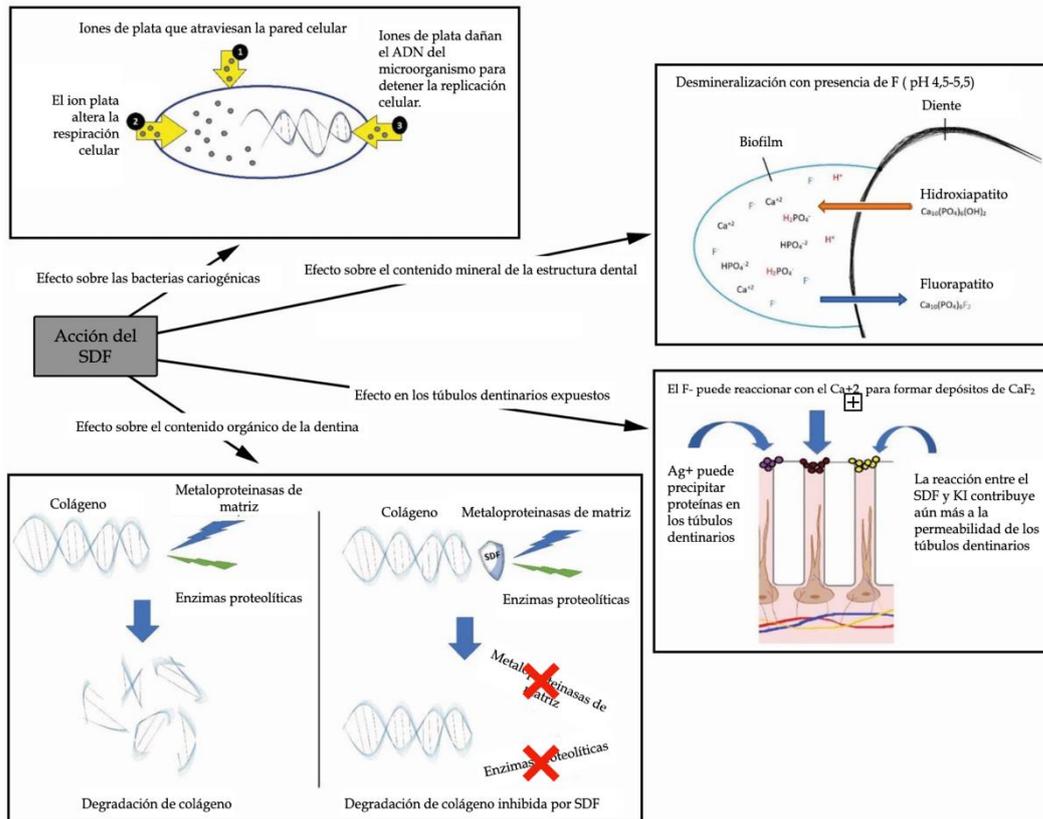


Fig. 5 Mecanismos del acción del SDF. Imagen modificada de Nassar et. al. [34]

1.5.1.3 Efectos secundarios y toxicidad

El principal efecto secundario del uso del SDF es la tinción oscura del tejido dental cariado [67]. Asimismo, durante su aplicación también puede mancharse temporalmente la piel y la encía, circunstancia que debe ser considerada por parte del odontólogo al momento de su manipulación [34]. Con la intención de evitar este efecto secundario se ha sugerido la adición de yoduro potásico (KI) tras la aplicación del SDF [68]. Algunos productos comerciales (RivaStar y Riva Star Aqua) han incorporado este compuesto aunque la actividad antimicrobiana del SDF puede verse comprometida con dicha adición [69]. Por otra parte, el efecto de la reducción de la tinción oscura (mancha negra característica del SDF) con KI no es efectiva a largo plazo [70]. Otra posible alternativa para intentar solucionar este problema es el uso de nanopartículas de plata [71]. Un estudio reportó que el uso de nanofluoruro de plata no presentó tinción negra en la lesión de caries tratada [72]. Adicionalmente, se han

descrito otros efectos secundarios como irritación gingival transitoria y sabor metálico [73].

En cualquier caso, no se ha notificado ninguna toxicidad asociada al uso SDF cuando se utiliza según lo recomendado por los distribuidores de estos productos [74,75]. Sin embargo, la alta concentración de fluoruro y plata en su composición ha despertado cierta preocupación, especialmente cuando se realizan varias aplicaciones en niños pequeños. Por esta razón, se hace particular hincapié en que la cantidad de SDF aplicada debe de ser mínima, tomando especial precaución durante su utilización y evitando la realización de aplicaciones múltiples en tratamientos clínicos [34,76].

1.5.1.4 Aplicaciones clínicas

En base a las revisiones sistemáticas sobre los efectos anticaries del SDF, las recomendaciones de aplicación son las siguientes [73]:

- El SDF al 38% es más efectivo que las presentaciones con menos concentración.
- La aplicación bianual del SDF es más efectiva que la anual.
- Las aplicaciones anuales de SDF son más eficaces que las 3 aplicaciones semanales.
- Las aplicaciones deben ser entre 10 segundos a 3 minutos.
- Los dientes anteriores presentan mejores tasas de detención con la aplicación de SDF que los dientes posteriores.
- Lesiones oclusales de gran tamaño y con placa bacteriana visible tienen menos posibilidades de detención.
- Evitar el uso de SDF en dientes con sospecha de afección pulpar.
- En adultos la aplicación anual de SDF es eficaz para la detención y prevención de caries.

1.5.2. Uso de flúor en odontología

El flúor es el halógeno más abundante en la corteza terrestre, encontrándose en la naturaleza combinado, es decir, formando otros compuestos. Particularmente, es el elemento de mayor electronegatividad y reactividad [77]. El efecto del flúor en la salud bucodental se ha estudiado durante muchas décadas, y sigue considerándose la mejor estrategia para controlar la caries, tanto a nivel comunitario como individual [78].

Este elemento interfiere en la progresión de la caries a través de múltiples mecanismos, entre ellos se distinguen los siguientes [78]:

- Transformación del hidroxiapatito en fluorapatito.
- Inhibición de la desmineralización y catálisis de la remineralización.
- Inhibición de las reacciones de glucólisis de las bacterias de la placa bacteriana, con lo que disminuye la formación de ácidos.
- Reducción de la producción de polisacáridos de la matriz extracelular en la placa bacteriana.

La administración del flúor puede ser tópica o sistémica, realizándose a su vez de modo colectivo (fluorización del agua potable) o individual [79]. La aplicación tópica puede realizarse mediante preparados concentrados (geles o barnices) aplicados por el odontólogo o a través de productos disponibles [80]

1.6 Nanopartículas y odontología

La definición de un nanomaterial es “un material insoluble o biopersistente, fabricado intencionalmente con una o más dimensiones externas, o una estructura interna, en la escala de 1 nm a 100 nm” [81]. La nanotecnología y los nanomateriales se han usado ampliamente en la industria y su potencial crecimiento dentro de la nanomedicina ha sido significativo en las últimas décadas. Su aplicación en biomedicina se centra básicamente en: diagnóstico, administración de fármacos y medicina regenerativa [81].

En odontología se han realizado múltiples investigaciones sobre el uso de nanomateriales, muchos de ellos se utilizan actualmente en la clínica diaria [82]. Existe una gama de aplicaciones de nanomateriales en las diferentes subespecialidades de la odontología, las cuales se explican a continuación. Las nanopartículas también pueden encontrarse en productos mucho más sencillos, como dentífricos y colutorios para desempeñar funciones remineralizadoras y anticaries, combatir la hipersensibilidad de la dentina y prevenir la erosión del esmalte [83].

1.6.1 Nanomateriales para odontología restauradora

- **Nanocomposites:** los materiales que han tenido mayor avance debido a la nanotecnología son probablemente los composites dentales. El desarrollo de las nanopartículas de relleno han permitido lograr considerables progresos en las propiedades físicas y abordar problemas como la contracción por polimerización, resistencia al desgaste, la microdureza, así como lograr la satisfacción del paciente en términos estéticos (mejora de las propiedades ópticas de los composites) [84].
- **Nano-Ionómeros:** se ha aplicado la nanotecnología en los ionómeros de vidrio modificados con resina, a través de la incorporación de diferentes nanopartículas dentro su composición. La adición de estas nanopartículas ha dado como resultado una mejora estética de la restauración final y un aumento de la capacidad de pulido de las superficies tratadas. Es importante mencionar que la propiedad de liberación de flúor de los ionómeros no se ve afectada por la adición de estas nanopartículas. Otro avance significativo fue la introducción de un nuevo nanomaterial denominado Equia® System. Este material se encuentra compuesto por nanorrellenos de sílice inorgánica (40 nm de tamaño) que se dispersan en el líquido y refuerzan la matriz polimérica resultante. La adición de este componente resulta en una mejora de la resistencia al desgaste y una reducción del tiempo de fraguado inicial. Además, también han sido añadidas nanopartículas de hidroxiapatito, fluorapatito, alúmina, circonio para mejorar las propiedades de los ionómeros convencionales [85].

- **Selladores endodónticos:** recientemente se ha desarrollado un nanomaterial a base de biocerámica (sellador EndoSequence BC) compuesto por silicato cálcico, fosfato cálcico, hidróxido cálcico, circonio y un agente espesante. Las nanopartículas han mejorado la manipulación y las propiedades físicas de los selladores convencionales. Además, este material es bioactivo y biocompatible, presentando también propiedades antimicrobianas [86].

1.6.3 Nanopartículas de plata (AgNPs)

Tal y como se ha descrito anteriormente, la biopelícula de la placa bacteriana está compuesta por bacterias resistentes a antibióticos que podrían promover el desarrollo de enfermedades sistémicas crónicas [19]. Para combatir estas infecciones se sugiere el uso odontológico de metales debido a sus diferentes propiedades antimicrobianas, antiinflamatorias y antioxidantes [87].

Los diferentes mecanismos de acción antimicrobiana de las AgNPs se muestran en la Fig. 6. Cada uno de estos mecanismos puede describirse de la siguiente manera: 1) inicialmente, los iones de Ag^+ liberados por las AgNPs se adhieren a la pared celular y a la membrana citoplasmática debido a fuerzas de atracción electrostática. Estos iones tienen la capacidad de aumentar la permeabilidad de la membrana citoplasmática y provocar la ruptura de la envoltura bacteriana; 2) tras la absorción estos iones por las células se produce la desnaturalización de los ribosomas generando inhibición de la síntesis de proteínas; 3) seguidamente, se interrumpe la producción del adenosín trifosfato (ATP) debido a la desactivación de las proteínas respiratorias de la membrana citoplasmática de la célula; 4) además, se produce una alteración de la estructura de la membrana celular debido a la ruptura de la cadena de transporte de electrones; 5) los iones de Ag se unen al ADN e impiden su replicación y multiplicación celular; 6) además, se produce una desnaturalización de la membrana ya que las AgNPs se acumulan en las cavidades de la pared celular; 7) finalmente se puede llegar a producir una perforación de la membrana causando la lisis celular [88,89].

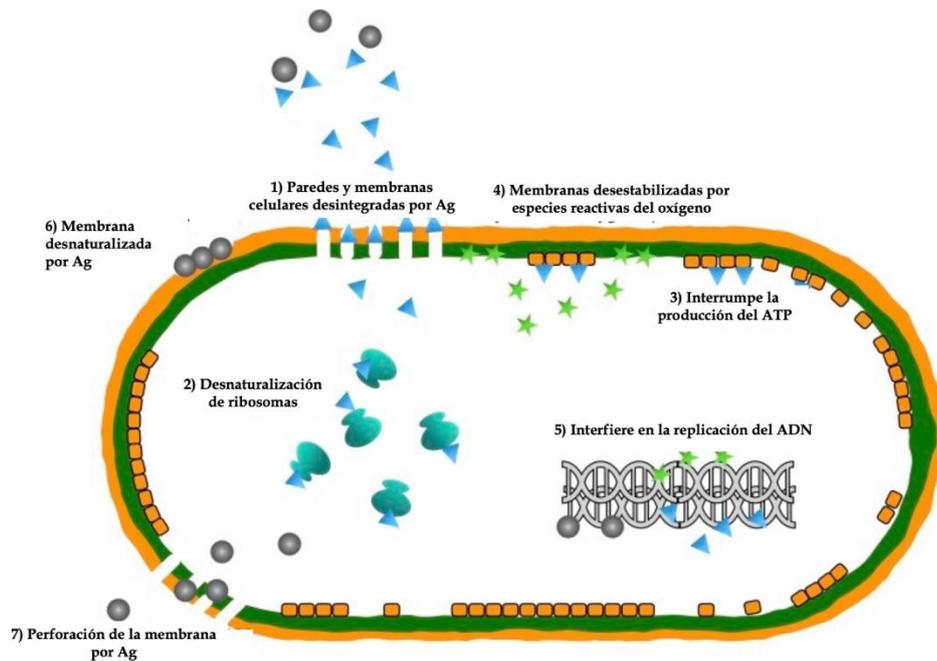


Fig.6 Mecanismo antibacteriano de las nanopartículas de plata. Imagen modificada de Yin et.al. [88]

1.6.3.1 Aplicación de las AgNPs en odontología

Como se ha mencionado anteriormente las AgNPs tienen una alta capacidad antibacteriana, la cual ha sido comprobada por múltiples investigaciones [90]. Particularmente, existen estudios que demuestran que estas nanopartículas son eficaces contra bacterias Gram positivo (entre ellas, los géneros: *Bacillus*, *Enterococcus*, *Listeria*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*) y Gram negativos (géneros: *Acinetobacter*, *Escherichia*, *Pseudomonas* y *Salmonella*), así como contra virus (*HIV-1*, *Herpes Simple* e *Influenza*) [71,91]. Por lo tanto, debido a su capacidad antimicrobiana estas nanopartículas han sido incorporadas a diferentes materiales odontológicos, como a resinas acrílicas para la fabricación de prótesis removibles en tratamientos protésicos, resinas compuestas para restauraciones directas, soluciones de irrigación y materiales de obturación en tratamientos endodónticos, materiales adhesivos en tratamientos ortodónticos, membranas para la regeneración tisular guiada en tratamientos periodontales y revestimientos de titanio en tratamientos con implantes dentales [92].

1.6.3.1 Síntesis de nanopartículas de plata (AgNPs)

Para la síntesis de AgNPs se han introducido diferentes métodos, que pueden clasificarse de la siguiente manera:

- **Métodos Físicos:** La característica principal de este método es que no implica el uso de agentes químicos tóxicos y suelen tener un tiempo de procesamiento rápido. Además, a través de este procedimiento se pueden obtener AgNPs de una distribución homogénea de tamaño. Existen diferentes técnicas para su desarrollo, entre ellas se incluyen: condensación física de vapor, descarga eléctrica de arco, métodos de ultramolida y pulverización de corriente continua. Sin embargo, un inconveniente importante del uso de estas técnicas es el elevado consumo de energía que requieren [93].
- **Métodos químicos:** Estos métodos suelen subdividirse en reducción química, técnicas electroquímicas, métodos químicos asistidos por irradiación y pirólisis [87]. Siendo el método de reducción química el más utilizado para la síntesis de AgNPs ya que constituye un procedimiento relativamente sencillo. Este proceso contiene tres componentes principales: precursores metálicos, agentes reductores y agentes estabilizadores (alcohol vinílico, pirrolidina vinílica o polietilenglicol) [93]. Particularmente, dentro los agentes reductores más utilizados se encuentran el borohidruro, el citrato sódico, el ácido ascórbico, el alcohol y los compuestos de hidracina. El objetivo de este método es reducir el ion Ag^+ a su forma metálica Ag^0 , incorporando agentes estabilizadores para evitar la aglomeración de las NPs. Sin embargo, estos procedimientos suelen ser altamente contaminantes y peligrosos para los seres vivos y el medio ambiente [87].
- **Química verde (Métodos biológicos):** la preocupación por el medio ambiente y por la salud pública ha dado lugar a la nanotecnología verde [94]. Este novedoso enfoque para la fabricación de NPs utiliza métodos respetuosos del medio ambiente y más seguros para los seres vivos, con viabilidad comercial sostenible [95]. Este procedimiento tiene como característica la reducción de la

sal metálica de plata mediante el uso o adición de un material o compuesto natural [96]. Según la metodología utilizada se pueden dividir en métodos *in vivo* e *in vitro*. Los métodos *in vivo* se caracterizan por utilizar a la célula completa (intra o extracelularmente) para la biosíntesis de las AgNPs. Por otro lado, en los métodos *in vitro* la reducción de Ag^+ se logra mediante extractos de plantas, algas, hongos, aceites esenciales, microorganismos y biomoléculas simples (glucosa, almidón, dextrina, pectina, o celulosa) [94,97]. Particularmente, los métodos biológicos que utilizan extractos de plantas han ido ganando mayor interés debido a que no necesitan ningún aditivo químico o agente protector que evite la aglomeración de las NPs. Además, estas NPs pueden ser producidas en grandes cantidades sin contaminación y con una morfología y tamaño definido [98-100].

1.6.3 Toxicidad

No cabe duda que el uso de las AgNPs en odontología puede aportar numerosos beneficios para diversos tratamientos clínicos [101]. Sin embargo, el empleo de estos materiales implica un potencial riesgo de exposición durante su manejo, tanto del paciente como del dentista. En particular, los efectos tóxicos de las AgNPs están directamente relacionados a la actividad de los iones Ag^+ liberados en el medio [71].

Sin embargo, estudios realizados sobre los efectos secundarios de las nanopartículas de plata en diferentes sistemas biológicos muestran distintos resultados [99]. Tal y como se ha descrito previamente, las NPs-Ag son eficaces en la destrucción de microorganismos. No obstante, esta misma capacidad podría causar un daño semejante en las células sanas y al ecosistema [88]. Lamentablemente hasta la fecha, las pruebas clínicas son contradictorias y es necesario seguir investigando para llegar a un consenso sobre su uso [102].

Capítulo 2 |

Justificación y Objetivos

Justificación |

La caries dental es la enfermedad crónica más frecuente en todo el mundo. Aunque su prevalencia ha disminuido en la última década, debido a significativos avances tecnológicos y numerosos esfuerzos preventivos, esta enfermedad continúa siendo un importante problema en nuestra sociedad. En consecuencia, la caries dental tiene un gran impacto en la carga clínica y economía mundial, por lo que resulta de vital importancia mejorar el enfoque para su prevención y abordaje clínico. El tratamiento tradicional de las lesiones cariosas consiste en la remoción quirúrgica del tejido infectado para su posterior restauración mediante la aplicación de un composite o ionómero de vidrio. No obstante, existe el enfoque odontológico de mínima invasividad el cual tiene como prioridad la conservación de la estructura dental sana.

En los últimos años ha aumentado el uso del fluoruro diamino de plata (SDF) como tratamiento para controlar las lesiones cariosas. Este material es un líquido transparente, inoloro y de aplicación tópica. El SDF presenta propiedades cariostáticas, antibacterianas, remineralizadoras y desensibilizantes. Particularmente, la capacidad de poder detener las lesiones de caries de forma no invasiva y su fácil modo de aplicación hacen que este material sea único. Estas características han permitido emplear al SDF en poblaciones vulnerables, niños aprensivos y en adultos mayores, obteniendo tasas de éxito mayores al 85%. Actualmente, el SDF es utilizado en numerosos países de Asia, África y Latinoamérica por ser un material económico y eficaz para la detención y control de la caries.

Estudios previos *in vitro*, así como revisiones sistemáticas y ensayos clínicos, han probado y comprobado la efectividad del SDF sobre las lesiones cariosas. Sin embargo, aún existen ciertas dudas sobre el mecanismo de acción del SDF, así como en sus protocolos de uso (por ejemplo: tiempo y frecuencia de aplicación del SDF). Particularmente, no existe un protocolo de restauración establecido para el tratamiento las cavidades tratadas con SDF. El éxito de una restauración está estrechamente relacionado con la calidad de adhesión alcanzada entre los sustratos

dentarios y los materiales restauradores. Los procedimientos adhesivos son muy sensibles a la técnica de aplicación, así como a cualquier interferencia o alteración del sustrato dentario o de los propios compuestos del adhesivo. Por lo tanto, establecer un protocolo de restauración de estas cavidades tratadas con SDF resulta de gran importancia clínica, teniendo en cuenta que el objetivo no es sólo detener la progresión de la caries, sino también rehabilitar el diente para devolverle su función.

Por otro lado, la cavidad oral está normalmente expuesta a diversos ácidos (provenientes de bacterias, dieta, etc.) los cuales generan una continua variación del pH oral, estas alteraciones del pH pueden interferir con el rendimiento de los materiales dentales. Por consiguiente, resulta importante determinar si las propiedades antes mencionadas del SDF se mantienen a pesar de estas variaciones en el ambiente oral. Particularmente, la evaluación de la capacidad remineralizadora del SDF sobre la dentina desmineralizada en condiciones de ciclaje de pH resulta de vital importancia ya que los resultados permiten obtener información valiosa sobre de la necesidad de reaplicaciones del SDF sobre las lesiones cariosas.

El SDF se caracteriza por detener la progresión de la caries mediante la formación de una capa dura, ennegrecida e impermeable en la superficie del diente. Precisamente, la principal desventaja inherente al uso del SDF es la tinción negra de la caries tras su aplicación, causando la disconformidad estética por parte de los pacientes. Para tratar estas tinciones muchos investigadores han propuesto el uso del yoduro de potasio (KI), este compuesto reacciona con los iones de plata residual evitando la indeseable coloración negra en el diente. Sin embargo, está comprobado que la capacidad antimicrobiana del SDF se ve comprometida con la adición de este compuesto. Además, ha podido demostrarse que a largo el plazo el KI se elimina de la superficie del diente quedando la tinción negra expuesta nuevamente.

Recientemente, se ha propuesto resolver el problema antiestético del SDF mediante la nanotecnología. Específicamente, el uso de fluoruro de nanopartículas de plata evita que la lesión de caries se torne de color negro. Además, estas NPs debido

a su menor tamaño y superficie de contacto con la estructura dentinaria es capaz de penetrar más fácilmente los tejidos, aumentando así su capacidad antimicrobiana. Normalmente las AgNPs son sintetizadas mediante métodos químicos, no obstante, estos procedimientos requieren de reactivos tóxicos que pueden ser perjudiciales para la salud humana y el medio ambiente. En este contexto, ha surgido un nuevo enfoque denominado *tecnología verde* que pretende evitar el uso de compuestos tóxicos sustituyéndolos por compuestos biológicos y reducir el gasto energético durante el procedimiento de síntesis de NPs. Particularmente, en el área de odontología se han logrado sintetizar diferentes NPs metálicas (i.e. cobre, oro, aluminio) mediante tecnología verde con el objetivo de evaluar sus propiedades antimicrobianas. No obstante, estas NPs tienen propiedades químicas, físicas y biológicas distintas. Por lo tanto, son necesarios más estudios *in vitro* y ensayos experimentales para explorar con mayor profundidad los diferentes beneficios de estas AgNPs antes de poder recomendar su uso clínico.

Objetivos |

2.2 Objetivo Principal

- Evaluar los efectos fisicoquímicos, morfológicos y mecánicos de compuestos de plata en la dentina desmineralizada.

Objetivos Específicos

- Investigar los efectos de los productos comerciales de SDF sobre la composición química y las propiedades microestructurales de la dentina desmineralizada, así como su relación con la fuerza de adhesión de sistemas adhesivos.
- Evaluar la capacidad remineralizadora del SDF sobre dentina desmineralizada en condiciones de ciclaje de pH (desafío ácido).
- Sintetizar y caracterizar fisicoquímicamente nanopartículas de plata obtenidas mediante química verde, empleando extracto de té blanco (*Camellia sinensis*), y funcionalizadas con quitosan/NaF.
- Evaluar los efectos de la aplicación de nanopartículas de plata sintetizadas mediante química verde y funcionalizadas con quitosan/NaF sobre las propiedades composicionales, microestructurales y mecánicas en dentina desmineralizada.

Capítulo 3 |

Efectos Fisicoquímicos y Mecánicos de Agentes Comerciales de Fluoruro Diamino de Plata (SDF) en Dentina Desmineralizada

Resumen

Objetivo: *Evaluar los efectos de cuatro agentes comerciales de fluoruro diamino de plata (SDF) sobre la composición química y las propiedades microestructurales de la dentina, y su relación con la fuerza de adhesión de dos sistemas adhesivos.*

Materiales y Métodos: *Noventa molares humanos se dividieron aleatoriamente en dos grupos control: dentina sana (control negativo) y dentina desmineralizada (control positivo) y cuatro grupos experimentales (n=15) según los tratamientos de SDF (Cariestop [Biodinámica Química y Farmacéutica], RivaStar 1 [SDI], RivaStar 2 [SDI] y Saforide [Tokyo Seiyaku Kasei]). Para la caracterización de las propiedades composicionales, cristalinas y microestructurales de las muestras se emplearon diferentes técnicas analíticas: ATR-FTIR, Difracción X y SEM. La prueba de resistencia a la adhesión por microtensión evaluó el rendimiento de adhesión de los adhesivos en dentina desmineralizada tratada con agentes SDF.*

Resultados: *En cuanto a la composición química, todos los grupos tratados con SDF mostraron una relación fosfato:matriz orgánica significativamente mayor que el grupo de dentina desmineralizada ($p < 0,05$). Los análisis DRX revelaron un aumento en el tamaño del cristalito para los cristales de hidroxapatito en todas sus áreas (dentina profunda, media y superficial) en todos los grupos experimentales en comparación con la dentina desmineralizada ($p < 0,05$). Las imágenes de SEM mostraron diferencias en las superficies tratadas con los diferentes agentes de SDF. Por otro lado, los valores de resistencia de adhesión se vieron afectados negativamente con ambos sistemas adhesivos para los cuatro grupos experimentales ($p < 0,05$).*

Conclusiones: *La aplicación de agentes de SDF dio lugar a la formación de diferentes fases cristalinas de sales de plata y al aumento de la mineralización de la dentina desmineralizada pretratada. Sin embargo, la aplicación de SDF mostró un efecto negativo sobre la fuerza de adhesión de los adhesivos de grabado-lavado y autograbantes.*

Los resultados de este estudio se encuentran publicados en la siguiente referencia:

Cifuentes-Jiménez, C., Álvarez-Lloret, P., Benavides-Reyes, C., González-López, S., Rodríguez-Navarro, A.B., & Bolaños-Carmona, M.V. (2021). Physicochemical and Mechanical Effects of Commercial Silver Diamine Fluoride (SDF) Agents on Demineralized Dentin. *Journal of Adhesive Dentistry*, 23(6)*.

* *este trabajo fue destacado en portada (cover page) del Volumen de la revista.*

3.1 Introducción

La caries dental es la destrucción localizada de tejidos duros dentales por medio de los subproductos ácidos producto de la fermentación bacteriana de los carbohidratos de la dieta [80]. A pesar de las medidas preventivas disponibles, la caries sigue siendo una de las enfermedades crónicas más prevalentes en todo el mundo. El tratamiento tradicional de la caries consiste en la eliminación mecánica del tejido infectado para su posterior restauración. Sin embargo, el desarrollo de nuevos materiales dentales y la mayor comprensión del proceso de la caries han llevado a la práctica de la odontología mínimamente invasiva [19]. Desde esta perspectiva, los principios que guían la eliminación del tejido cariado incluyen retrasar y minimizar el tratamiento quirúrgico de las lesiones, así como reducir el dolor y las molestias para los pacientes [18].

Morfológicamente la dentina esta formada por túbulos dentinarios dentro de la matriz intertubular de la dentina. La densidad y diámetro de los túbulos disminuyen desde la pulpa hasta el borde externo del cemento o esmalte, de tal manera que las áreas de los túbulos dentinarios varían dramáticamente entre sus áreas profundas, medias y externas [103]. Desde el punto de vista composicional, la dentina consta de una fase mineral principal, compuesta por cristales de hidroxiapatito ricos en carbonatos, y una fase orgánica, que contiene diferentes proteínas extracelulares, como colágeno de tipo I, proteoglicanos, fosfoproteínas y sioloproteínas [103]. La lesión de caries provoca una serie de modificaciones en la dentina que incluyen: menor

densidad mineral, menor relación Ca:P, disminución de las concentraciones de elementos como magnesio y grupos carbonatos, y una disolución parcial de los cristales de apatito [104]. Por otro lado, los cambios en la matriz orgánica se asocian a una alteración de la estructura secundaria del colágeno y su distribución asociada al tejido [103].

El fluoruro diamino de plata (SDF) es un agente tópico indicado para tratar y prevenir la caries dental. El SDF es una solución alcalina sin color que contiene plata y fluoruro, los cuales forman un compuesto con el amoníaco [105]. Los tratamientos con SDF se han utilizado para detener la caries en niños desde principios de la década de 1960 en Japón [106]. La principal desventaja de la aplicación del SDF es la tinción de la superficie debido a la oxidación de los iones libres de plata. El uso de yoduro potásico (KI) produce yoduro de plata, un compuesto de reacción blanco que mejora la mancha negra de la superficie de la dentina [67]. Múltiples investigaciones han demostrado los usos clínicos y las ventajas del SDF, incluida su acción preventiva y cariostática en niños [107] y ancianos [108,109], como agente desensibilizante [67] y su efecto antimicrobiano como irrigante en endodoncia [106]. Adicionalmente, estudios *in vitro* también han demostrado los efectos inhibidores sobre las metaloproteinasas [57] las catepsinas [56] y la acción preventiva de la degradación del colágeno [64].

La adhesión en dentina sigue siendo un desafío, ya que no se consigue por completo debido a la heterogeneidad de los sustratos dentales. La fuerza adhesiva en la dentina afectada ha demostrado ser menor que en la dentina sana, independientemente del tipo de adhesivo utilizado [103]. Sin embargo, estudios *in vitro* muestran que los adhesivos grabado-lavado funcionan mejor que los adhesivos de autograbado en la dentina afectada [110]. El uso de SDF ha aumentado en las últimas décadas debido su bajo costo, técnica sencilla y creciente número de agentes disponibles comercialmente [47]. Sin embargo, el protocolo restaurativo para estas superficies de dentina tratadas con SDF no está aún del todo claro. Estudios previos sugieren que la dentina pretratada con SDF y KI (yoduro de potasio) no interfiere con la fuerza adhesiva del cemento de ionómero de vidrio en la dentina [111,112]. Sin

embargo, la fuerza adhesiva no parece ser tan satisfactoria cuando dichas cavidades se restauran con composites. Estudios preliminares han proporcionado evidencia de cómo dentina pretratada con SDF/KI afecta negativamente la fuerza adhesiva de las restauraciones inmediatas con composite [67,113,114]. No obstante, otras investigaciones sugieren que el pretratamiento con SDF no afecta la fuerza adhesiva del composite a la dentina [115,116]. En general, no existe consenso sobre el efecto inmediato del SDF con los sistemas adhesivos [117,118].

Cabe señalar que los adhesivos son muy sensibles a la técnica; afectando cualquier modificación en la superficie de la dentina o variación en los protocolos a la calidad de la adhesión. En este sentido, este capítulo tiene como objetivo investigar los efectos de diferentes marcas comerciales de SDF sobre la composición química y las propiedades microestructurales de la dentina desmineralizada, y su relación con la fuerza adhesiva de los sistemas adhesivos. Las siguientes hipótesis de investigación fueron evaluadas en este estudio: (1) la aplicación de cuatro agentes comerciales de SDF afecta a las propiedades químicas y microestructurales de las superficies de dentina desmineralizada; (2) la aplicación de estos agentes de SDF sobre dentina desmineralizada afecta a los sistemas adhesivos de grabado-lavado y autograbado.

3.2 Materiales y Métodos

Esta investigación recibió la aprobación del Comité de Ética en Investigación con Humanos y Animales (#1020-2019) de la Universidad de Granada. Para este estudio se utilizaron noventa molares permanentes humanos no cariados almacenados en una solución de timol al 0,1% a 4 °C.

3.2.1 Preparación de las muestras

Las raíces de los dientes se separaron de las coronas 2 mm por debajo de la unión amelocementaria y el esmalte oclusal se eliminó utilizando un microtomo Isomet 11/1180 (Buehler; Lake Bluff, IL, EE.UU.) con un disco de diamante XL 12205

(Benetec; Londres, Reino Unido). La superficie de dentina expuesta se pulió con papel de carburo de silicio (SiC) de grano 500 (Lunn Major, Struers; Ballerup, Dinamarca) para crear una superficie plana y continua. Las cámaras pulpares se limpiaron y rellenaron con un composite de resina adhesiva (Coltene-Whaledent; Altstätten, Suiza) como soporte. A continuación, los dientes se enjuagaron con agua destilada para eliminar los restos de la preparación.

3.2.2 Inducción de la caries artificial (ciclaje de pH)

Las lesiones de dentina afectada por caries se crearon mediante un procedimiento de ciclaje de pH modificado del propuesto por Marquezan *et. al.* [21]. Las muestras se sumergieron en 10 ml de una solución desmineralizante que contenía 2 mM CaCl₂, 2,2 mM NaH₂PO₄ y 50 mM de ácido acético (CH₃-COOH), ajustado a un pH de 4,8 durante 8 h. Posteriormente, las muestras se sumergieron en 10 ml de una solución remineralizante que contenía 1,5 mM CaCl₂, 0,9 mM NaH₂PO₄ y 0,15 M NaH₂PO₄, ajustada a un pH de 7,0 durante 16 h. Cada espécimen se sometió a ciclos durante 14 días reemplazándose las anteriores soluciones diariamente. La determinación del pH de las soluciones durante la experimentación se realizó a temperatura ambiente sin agitación. Todos los grupos experimentales fueron sometidos al mismo procedimiento; excepto las muestras correspondientes al grupo de dentina sana.

3.2.3 Diseño Experimental

Las muestras se dividieron aleatoriamente en dentina sana (n = 15, control negativo), dentina desmineralizada (n = 15, control positivo) y cuatro grupos experimentales (n = 15 por grupo) según los distintos compuestos de fluoruro diamino de plata (SDF) aplicados: Cariestop (Biodinâmica Química y Farmacêutica; Ibiçara, Brasil); RivaStar 1 (cápsula 1) y RivaStar 2 (cápsula 1+2) (ambas de SDI; Bayswater, Victoria, Australia); y Saforide (Tokyo Seiyaku Kasei; Osaka, Japón). De esta manera, las superficies dentinarias se trataron con los diferentes productos comerciales de SDF

que se muestran en la Tabla 1, incluyendo el nombre comercial, el fabricante, la composición química y los diferentes procedimientos de aplicación. Para los análisis químicos, microestructurales y morfológicos se utilizaron 5 muestras de cada grupo, y las 10 muestras restantes se emplearon para las pruebas mecánicas.

Tabla. 1 Material y nombre del fabricante, composición química y procedimientos de aplicación para los diferentes productos de SDF y adhesivos.

Material	Composición	Aplicación
Cariestop 30% (Biodinâmica Química y Farmacêutica Ltda. Brasil)	Hidróxido de amonio, nitrato de plata, ácido fluorhídrico y agua desionizada	Aplicar durante 2-3 min. Lavar.
Riva Star (SDIL td., Victoria, Australia)	Cápsula1: Fluoruro de plata y solución de amoniaco Cápsula2: Yoduro de potasio.	Cápsula1: Aplicar la solución únicamente en la zona de tratamiento. Cápsula2: Aplicar una cantidad generosa de la solución hasta que se vuelva transparente.
Saforide (Tokyo Seiyaku Kasei Co.Ltd., Osaka, Japón)	Hidróxido de amonio, nitrato de plata, ácido fluorhídrico y agua	Aplicar durante 3 min. Lavar.
Clearfil™ SE Bond 2 (Kuraray Noritake Dental Inc. Tokyo, Japón)	Primer: MDP, HEMA, dimetacrilato hidrófilo, dl-canforquinona, aceleradores, y agua. Bond: MDP, bis GMA, HEMA, dl-canforquinona, aceleradores y sílice coloidal silanada.	Primer: Aplicar por 20 s. Secar 5 s. Bond: Aplicar y fotopolimerizar 10 s.
Gel grabador (Kerr.Corp.)	37,5% ácido fosfórico	Aplicar por 15 s. Lavar por 25 s. Secar.
Optibond™ FL (Kerr Corp., Orange, CA, EE.UU.)	Primer: HEMA, GPDM, PAMM, etanol, agua, fotoiniciador. Bond: TEGDMA, UDMA, GPDM, HEMA, bis-GMA, relleno, fotoiniciador.	Primer: Aplicar por 15 s. Secar por 5 s. Bond: Aplicar por 15 s. Secar por 3 s. Fotopolimerizar 20 s.

MDP: 10-metracriloxilodecilo de dihidrogenofosfato; Bis-GMA: diglicidilmetacrilato de bisfenol A; GDMA: dimetacrilato de glicerol; HEMA: metacrilato de 2-hidroxietilo; UDMA: dimetacrilato de uretano; PAMM: monometacrilato de ácido ftálico; TEGDMA: dimetacrilato de trietilenglicol.

3.2.4 Análisis mediante espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier-Reflectancia total atenuada (ATR-FTIR)

Para evaluar los posibles cambios en la composición química de la dentina tras el tratamiento con SDF se estudiaron tres dientes por grupo mediante ATR-FTIR. Las muestras se analizaron utilizando un espectrómetro FTIR JASCO 6200 equipado con un accesorio ATR con punta de diamante (ATR Pro ONE, Jasco; Easton, MD, EE.UU.). Este equipo se encuentra en los laboratorios del Departamento de Mineralogía y Petrología de la Universidad de Granada (Fig. 6). Los espectros se registraron en modo de absorbancia con una resolución de 2 cm^{-1} en 32 acumulaciones de barrido empleando un rango espectral de $600\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$. El solapamiento de picos se resolvió mediante software de ajuste de curvas (Peakfit v4.12, Systat Software; San Jose, CA, EE.UU.) obteniéndose el cálculo de las áreas integradas de cada pico. La resolución del cálculo del área de los picos dentro de la región de cada espectro se obtuvo mediante el método de la segunda derivada. El grado de suavizado se ajustó al 10% (algoritmo Savitzky-Golay) utilizándose una función mixta Gaussiana-Lorentziana para adaptar los contornos de los picos dentro de cada región. El ajuste de la curva se aceptó cuando r^2 alcanzó valores superiores a 0,95. Las cantidades relativas relacionadas con los grupos moleculares amidas (principalmente correspondientes a colágeno, amida tipo I), fosfato y carbonato mineral en las muestras de dentina se determinaron a partir del área del pico de las bandas de absorción asociadas con cada componente [119-121]. Los siguientes parámetros se calcularon para describir las propiedades de composición de la dentina [23,120,122]:

1. Cantidad relativa de matriz mineral respecto a la matriz orgánica ($\text{PO}_4/\text{Amida I}$): relación entre el fosfato principal ($\nu_1, \nu_3\text{ PO}_4^{3-}$; $900\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$) y el área Amida I (colágeno tipo I; 1690 cm^{-1}).

2. Contenido de carbonato sustituido respecto al contenido mineral (CO_3/PO_4): relación entre el carbonato sustituido ($\nu_3 \text{CO}_3$; $1390\text{-}1440 \text{ cm}^{-1}$, sustitución de tipo B) respecto al área de la banda principal de fosfato ($900\text{-}1200 \text{ cm}^{-1}$).
3. Índice de cristalinidad (IC): relación entre las áreas correspondientes a las sub-bandas de fosfato a 1030 cm^{-1} (fosfatos asociados a apatito altamente cristalinos) y 1020 cm^{-1} (fosfatos asociados a apatito pobremente cristalinos).

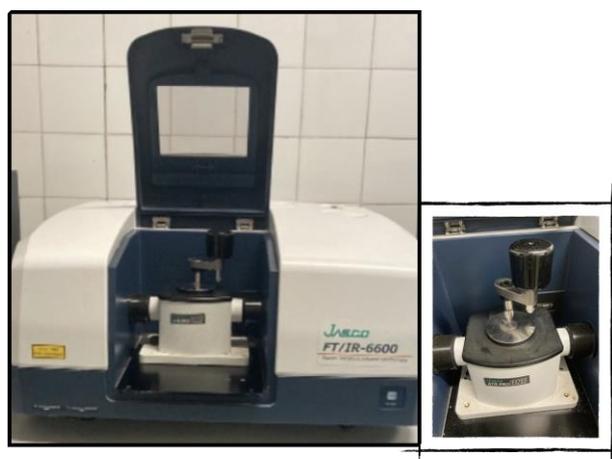


Fig. 7 Espectrómetro FTIR Jasco 6600 con accesorio ATR empleado para el análisis de las muestras

3.2.5 Análisis mediante difracción de Rayos X bidimensional

Las características cristalinas de las fases formadas durante los tratamientos se estudiaron empleando una muestra por grupo. Los patrones de difracción bidimensional de rayos X (2D-XRD) se obtuvieron utilizando un difractómetro de rayos X (Bruker D8 Discover, Bruker; Billerica, MA, EE.UU.) equipado con un detector 2D (Dectris Pilatus 3 100K-A; Baden-Dättwil, Suiza). Este equipo analítico se encuentra disponible en el Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada (Fig. 8). Las condiciones de trabajo para los experimentos de difracción de rayos X, fueron: $\text{Cu K}\alpha$ ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$), 50 kV y 30 mA, haz de emisión con sistema de colimación de 0,5 mm de diámetro. Los puntos analizados (es decir, las localizaciones en la superficie de la muestra) se determinaron empleando un microscopio óptico

equipado con un láser de referencia. Mediante este procedimiento se obtuvieron patrones de difracción de tres lugares diferentes de la superficie de la dentina según su profundidad: superficial, media y profunda. Los patrones 2D-XRD se registraron en un rango de ángulo de barrido de 20° a 60° grados, considerando 19 pasos y 40 s/paso. Las intensidades de difracción concentradas dentro de los arcos de los anillos de Debye (correspondientes a líneas de difracción específicas) se integraron para obtener un barrido unidimensional 2θ. Los patrones de DRX se identificaron comparándolos con las tarjetas de datos JCPDS mediante el software X Powder (www.xpowder.com, España) [123].

El tamaño de cristalito para el hidroxiapatito presente en la componente mineral de la dentina y otras fases cristalinas (es decir, compuestos de reacción SDF) se determinó midiendo la anchura a media altura (en inglés, FWHM) de los picos de difracción mostrados en el patrón 2θ. Para para estimar el tamaño de los cristalitos se utilizó la ecuación de Debye-Scherrer [124]:

$$d = K\lambda / \beta \cos \theta$$

donde d es el tamaño medio de los cristalitos (expresado en nm), λ es la longitud de onda de la fuente de rayos X, K es la constante de Scherrer (asumida como factor K = 0,89), y β es el FWHM del ensanchamiento de la línea para reflexiones de difracción específicas. Debe tenerse en cuenta que la determinación del tamaño del cristal mediante técnicas de DRX corresponde a la medición promediada en volumen de los dominios cristalinos.

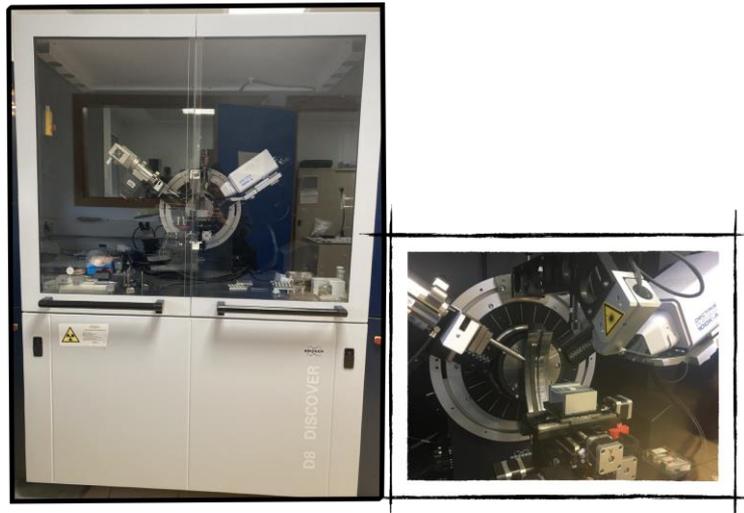


Fig. 8 Difractómetro de Rayos X Bruker D8 DISCOVER con detector 2 D (Dectris Pilatus 3 100K-A)

3.2.6 Análisis mediante microscopía electrónica de barrido / energía dispersiva de Rayos X (SEM/EDX)

Esta técnica se utilizó para estudiar los cambios morfológicos en la superficie dentinaria y la oclusión tubular para cada uno de los tratamientos SDF, empleándose para ello una muestra por grupo. Cada muestra se seccionó en tres especímenes: la superficie dentinaria, el tratamiento de SDF con ácido fosfórico al 37,5% y el tratamiento de SDF con Clearfil SE Bond 2 (Kuraray Noritake; Tokio, Japón). Todas las muestras se fijaron en glutaraldehído al 2,5% y se enjuagaron con PBS. Posteriormente, se deshidrataron en grados ascendentes de etanol (50%, 70%, 90%, 96%). Por último, las muestras se recubrieron con oro por pulverización catódica utilizando un Nanotech Polaron-Semprep2 (Polaron Equipment; Watford, Reino Unido) y se observaron a 15.000x bajo un SEM con un voltaje de 20kV (S-510, Hitachi; Tokio, Japón) y adicionalmente equipado con un detector EDX. Este equipo se encuentra en el Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada (Fig. 9).



Fig. 9 Microscopio Electrónico de Barrido S-510, Hitachi.

3.2.7 Ensayos mecánicos mediante Microtensión

Las muestras de los grupos experimentales y control ($n=10$) se subdividieron según el tipo de tratamiento adhesivo: adhesivo de grabado-lavado (OptiBond FL, Kerr; Orange, CA, EE.UU.) y adhesivo de autograbado de 2 pasos (Clearfil SE Bond 2, Kuraray Noritake). Ambos adhesivos se aplicaron ($n=5$, respectivamente) de acuerdo con la información del fabricante. Finalmente, se construyó un bloque de composite hasta una altura de 8 mm aplicando sucesivamente capas de 2 mm de composite de resina Synergy D6 (Coltene-Whale- dent). Cada una de estas capas se fotopolimerizó durante 20 s con un LED (Blue-phase, Ivoclar Vivadent; Schaan, Liechtenstein). Las muestras se conservaron en agua destilada durante 24 h.

Posteriormente, las muestras se seccionaron en serie en direcciones "x" e "y" para obtener barras de 1 x 1 mm. Seguidamente, se inspeccionaron para confirmar la ausencia de posibles microfisuras y se midieron sus dimensiones. Durante la preparación de las muestras se registró el número de fallos prematuros (FPT) por diente. Las barras se fijaron a un soporte de pruebas Bencor Multi-T modificado utilizando cianoacrilato (Super Glue 3, Loctite Ibérica; Barcelona, España). Los análisis de microtracción se realizaron con una máquina Instron 3345 (Instron; Norwood, MA, EE.UU.) con una célula de carga de 500 N a una velocidad de cruceta de 0,1 mm/min.

El modo de fallo se examinó con un microscopio óptico (Olympus; aumento 50x), clasificándose como: cohesivo (desprendimiento dentro de la dentina), adhesivo (desprendimiento entre la dentina y la capa adhesiva) y mixto (combinación de líneas de fractura). Este equipo para la realización de ensayos mecánicos se encuentra en el Laboratorio de Investigación de la Facultad de Odontología de la Universidad de Granada (Fig. 10).

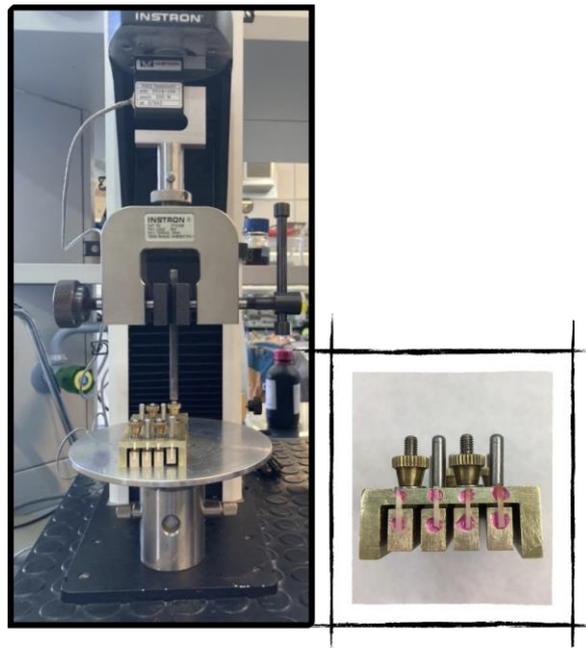


Fig. 11 Máquina Instron 3345 y pasos del protocolo de preparación de las muestras para la realización de los ensayos mecánicos.

3.2.8 Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron con el programa informático SPSS 24.0 (IBM; Chicago, EE.UU.). La distribución normal de las variables se comprobó mediante la prueba de Shapiro-Wilk. Dado que los datos no seguían una distribución normal, se emplearon pruebas estadísticas no paramétricas. Para las variables composicionales analizadas en ATR-FTIR y los valores de microtensión, se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, seguida de un análisis intergrupo mediante la prueba U de Mann-Whitney. La prueba estadística de chi-cuadrado se utilizó para comparar los modos de fallo. El nivel de significancia se estableció en $p < 0,05$.

3.3 Resultados

3.3.1 Análisis mediante espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier-Reflectancia total atenuada (ATR-FTIR)

La tabla 2 muestra las medias y desviación estándar de los parámetros determinados mediante ATR-FTIR. Tras el procedimiento de ciclaje de pH, la relación fosfato/matriz orgánica disminuyó significativamente en comparación con el grupo de dentina sana ($p < 0.05$). En los grupos tratados con los diferentes productos de SDF, la relación fosfato/matriz orgánica fue significativamente mayor que en el grupo de dentina desmineralizada ($p < 0.05$). Por otra parte, la relación carbonato/fosfato disminuyó significativamente en tres grupos de SDF (RivaStar2, RivaStar1 y Saforide) en comparación con los grupos de dentina sana y desmineraliza. El índice de cristalinidad (IC) fue significativamente mayor en la dentina desmineralizada y en el grupo Cariestop en relación con todos los grupos experimentales ($p < 0.05$). Sin embargo, RivaStar1 y Saforide mostraron valores de IC similares a los de dentina sana, mientras que RivaStar2 presentó los valores menores.

Tabla. 2 Media (Desviación estándar) de los parámetros de composición analizados mediante ATR-FTIR

Grupo	Relación Fosfato/Matriz	Relación Carbonato/Fosfato	Índice de Cristalinidad (IC)
Dentina Sana	3,085(0,889) ^a	0,164 (0,037) ^a	1,262(0,207) ^a
Dentina Desmineralizada	0,809(0,247) ^b	0,171(0,027) ^a	1,641(0,202) ^b
Cariestop	1,102(0,338) ^c	0,137(0,041) ^b	1,654(0,255) ^b
RivaStar2	2,508(1,561) ^{ad}	0,109(0,072) ^{ad}	0,918(0,296) ^e
RivaStar1	1,470(0,426) ^d	0,107(0,032) ^{cd}	1,387(0,193) ^d
Saforide	1,863(0,924) ^{cd}	0,120(0,051) ^d	1,294(0,232) ^{ad}

Letras distintas indican diferencias significativas en las columnas.

3.3.2 Análisis mediante difracción de Rayos X bidimensionales 2D-XRD)

Las propiedades relacionadas con la cristalinidad del mineral dentinario y los compuestos de SDF se estudiaron mediante 2D-XRD. La Fig. 10 muestra los patrones 2D-XRD y el barrido integrado 2theta (patrón unidimensional) de la dentina sana y desmineralizada (Fig.10 a y b). Los picos de XRD observados en la dentina sana, asociados al patrón de difracción de cristales de hidroxiapatito (líneas verticales de referencia), eran más agudos que los sometidos al ciclaje de pH (dentina desmineralizada). La Fig.10 también muestra los patrones 2D-XRD y los integrados 2theta de los diferentes tratamientos de SDF (Fig.10 c a f). Estos patrones de difracción muestran fases altamente cristalinas, con picos de difracción más intensos y definidos, formados como resultado de los diferentes tratamientos en la superficie de dentina desmineralizada. Mediante la identificación de las líneas de difracción, las fases cristalinas formadas por los tratamientos de SDF, corresponden a cloruro de plata (clorargirita, AgCl; estructura cúbica $a=5.554 \text{ \AA}$) para los agentes RivaStar1, Cariestop y Saforide, y yoduro de plata (yodoargirita, AgI; estructura hexagonal, $a=4,580 \text{ \AA}$, $c=7.510 \text{ \AA}$) para RivaStar2. Estos patrones de difracción también muestran picos de intensidad menores y de mayor amplitud correspondientes a las líneas de difracción del hidroxiapatito (por ejemplo, el pico de difracción 002 en la posición 2Theta de $25,92^\circ$) relacionados con el mineral de la dentina.

Las medidas del tamaño de los cristalitos (estimación del tamaño de los dominios de dispersión coherente de los cristales) para la dentina mineral y los tratamientos de SDF se indican en la Tabla 3. El tamaño de los cristalitos del mineral de la dentina se determinó midiendo la anchura a media altura de la línea de difracción 002 (es decir, la correspondiente al eje-c del cristal de hidroxiapatito). El tamaño de cristalito (d) se determinó en tres áreas distintas distinguibles por su morfología, como dentina superficial, media y profunda. Los resultados indicaron como el tamaño de los cristalitos de hidroxiapatito en la dentina desmineralizada disminuyó en comparación con la dentina sana en las tres zonas consideradas. Los valores d de las fases cristalinas sintéticas de los tratamientos de SDF correspondientes al cloruro de plata (ClAg; RivaStar1, Cariestop y Saforide) y al yoduro de plata (IAg;

RivaStar 2) se determinaron a partir de los picos de difracción 111 y 100, respectivamente. Tras la aplicación de los agentes de SDF, el tamaño del cristalito de hidroxiapatito aumentó en todos los grupos experimentales y áreas estudiadas (excepto para RivaStar2, no detectado), en comparación con la dentina desmineralizada. El área correspondiente a la dentina profunda mostró el mayor aumento en el tamaño de cristalito tanto para los cristales de hidroxiapatito como para las fases cristalinas sintéticas de ClAg e IAg de los grupos tratados con SDF.

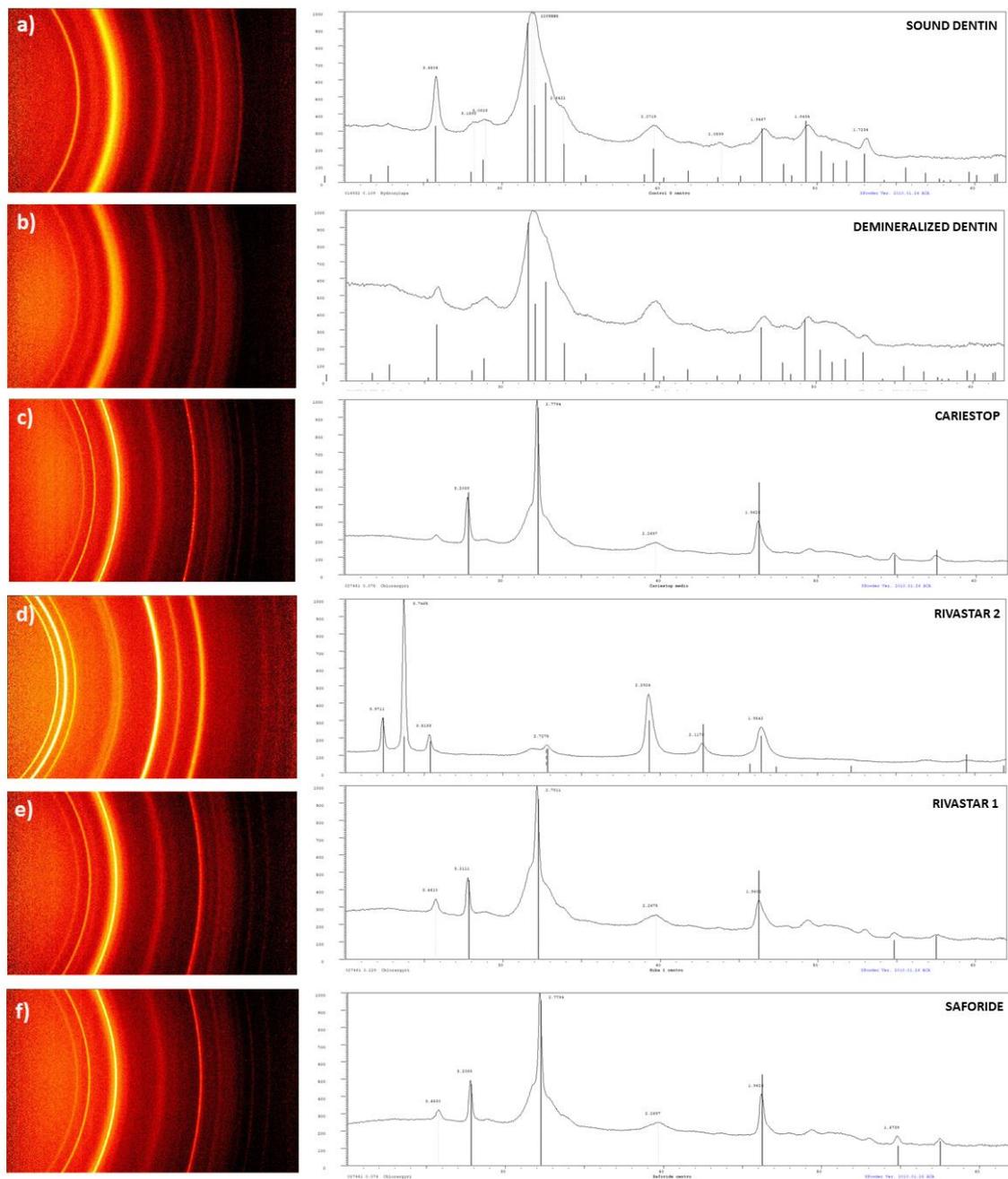


Fig. 10 Patrones 2D-XRD mostrando los anillos de Debye-Scherrer (columna izquierda) y el barrido 2θ integrado (columna derecha) para (a) dentina sana; (b) dentina desmineralizada y tratamientos de SDF; (c) Cariestop; (d) RivaStar2; (e) RivaStar1; (f) Saforide. Las líneas verticales representan las posiciones de los picos de referencia para los patrones de difracción de hidroxiapatito (a,b), AgCl (c,e,f) y AgI (d)

Tabla. 3 Valores de anchura a media altura (en inglés, FWHM) y el tamaño de cristalito (*d*) del hidroxiapatito (HAp) en dentina sana y desmineralizada (incluyendo los tratamientos de SDF, excepto RivaStar2), cloruro de plata (ClAg) y yoduro de plata (IAg) en los tratamientos de SDF. N.d. = no detectado

		FWHM	<i>d</i> (nm)	FWHM	<i>d</i> (nm)
		HAp -(002)		ClAg - (111)	
Dentina Sana	Profunda	0,387	20,85		
	Media	0,415	19,44		
	Superficial	0,401	20,12		
Dentina Desmineralizada	Profunda	0,585	13,79		
	Media	0,663	12,17		
	Superficial	0,633	12,74		
Cariestop	Profunda	0,345	23,38	0,223	36,32
	Media	0,522	15,46	0,289	28,02
	Superficial	0,483	16,70	0,302	26,82
				IAg - (100)	
RivaStar2	Profunda	N.d.	N.d.	0,23	34,85
	Media	N.d.	N.d.	0,281	28,52
	Superficial	N.d.	N.d.	0,328	24,44
RivaStar1	Profunda	0,391	20,63	0,264	30,68
	Media	0,525	15,37	0,329	24,62
	Superficial	0,428	18,85	0,314	25,79
Saforide	Profunda	0,413	19,53	0,243	33,33
	Media	0,55	14,67	0,332	24,39
	Superficial	0,549	14,69	0,375	21,60

3.3.3 Análisis mediante microscopía electrónica de barrido / energía dispersiva de Rayos X (MEB/EDX)

La Fig. 11 a muestra una superficie típica de dentina sana, mientras que la Fig.11-b presenta una superficie de dentina desmineralizada. Todos los tratamientos de SDF/KI produjeron un precipitado en las superficies dentinarias (Figs.11 C a F). Tras la aplicación de ácido fosfórico al 37,5%, se observó que la capa de barrillo dentinario se había eliminado, dejando al descubierto los túbulos dentinarios de la superficie de la dentina desmineralizada (Fig.11 H). Por otra parte, en los grupos tratados con SDF/KI, el precipitado parece haberse reubicado parcialmente (Fig.11 I a L). Tras la aplicación de la solución del primer Clearfil SE Bond 2 en los grupos tratados con SDF/KI se reveló una película superficial y partículas dentro de los tubulos dentinarios (Fig. 11 O a R). Las partículas de las superficies tratadas con SDF/KI se analizaron mediante espectroscopía EDX. El análisis de EDX de estos pequeños cristales indicó la presencia de Ca, P, Mg, Ag, y Cl en todas las superficies tratadas, detectándose la presencia de I únicamente en el grupo RivaStar2.

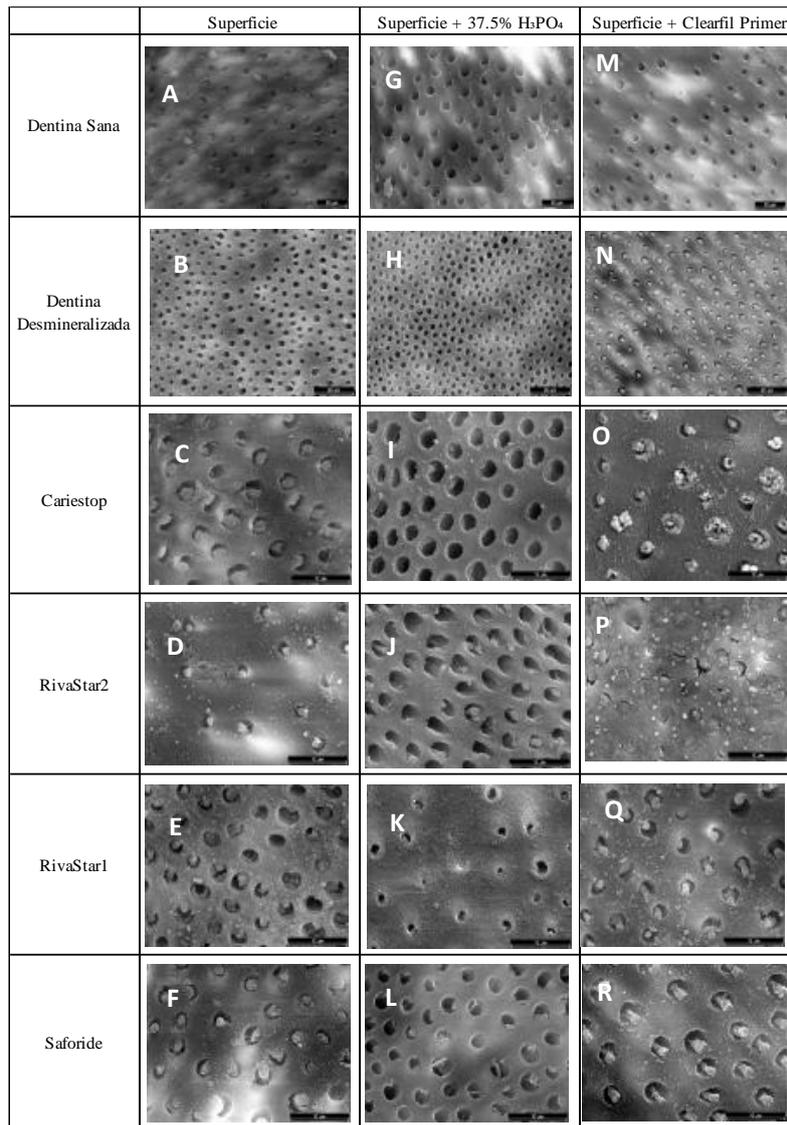


Fig.11 Imágenes de SEM de la superficie de la dentina tratada con los diferentes agentes de SDF (C-F), agentes de SDF y ácido fosfórico al 37.5% (I-F), agentes SDF y Primer Clearfil SE Bond (O-R)

3.2.9 Ensayos mecánicos mediante Microtensión

Los resultados de los ensayos de microtensión realizados para los diferentes grupos se resumen en la tabla . Los fallos prematuros (FPT) se sustituyeron por un valor aleatorio determinado por ordenador entre 0 MPa y el valor más bajo medido dentro del grupo experimental. De esta manera, todos los especímenes de los grupos RivaStar1 y RivaStar2 tratados con Clearfil SE Bond 2 registraron un valor medio de 0 MPa debido a los FPT. Los valores más altos se observaron en el grupo correspondiente a dentina sana con ambos sistemas adhesivos. Tras la aplicación de los diferentes agentes de SDF, se observó un descenso significativo ($p < 0.05$) en la

fuerza adhesiva respecto a los grupos de dentina sana y dentina desmineralizada. Además, se observaron fuerzas de adhesión significativamente inferiores ($p < 0.05$) en todos los grupos que utilizaron el adhesivo de autograbado Clearfil SE Bond 2 en comparación con los grupos que utilizaron el adhesivo OptiBond FL. Con respecto a los grupos con el tratamiento con SDF, Saforide mostró la mayor fuerza adhesiva y la menor con OptiBond FL (23,2 MPa) y Clearfil SE Bond (8,1 MPa), respectivamente. Los grupos RivaStar1 y RivaStar2 mostraron las menores fuerzas adhesivas con OptiBond FL (10.1 y 7.5 MPa, respectivamente). En la Fig. se resumen los modos de fallo: adhesivo y mixto. En todos los grupos tratados con SDF los fallos fueron adhesivos. Se identificaron fallos mixtos en los grupos de dentina sana, desmineralizada y Cariestop con el adhesivo OptiBond. No se observaron fallos cohesivos en ningún grupo. Por otra parte, los cuatro grupos de tratamiento de SDF mostraron una alta incidencia de FPT. Todas las muestras de los grupos RivaStar1 y RivaStar2 con el adhesivo de autograbado Clearfil SE Bond 2 fracasaron prematuramente y fueron excluidas del análisis estadístico.

Tabla. 4 Resultados de la prueba de ensayo mecánicos mediante Microtensión

Grupo	N	Optibond™ FL	Clearfil™ SE Bond 2
Dentina Sana	49	37,64(10,37) ^{a*}	29,88(10,38) ^{a*}
Dentina Desmineralizada	48	31,42(6,63) ^{b*}	20,67(11,09) ^{b*}
Cariestop	66	15,05(9,24) ^{d*}	9,58(6,85) ^{c*}
RivaStar2	62	7,51(4,40) ^e	PTF
RivaRiva1	65	10,07(5,54) ^e	PTF
Saforide	52	23,15(8,22) ^{c*}	8,03 (4,30) ^{c*}

Mediana(desviación estándar). N; número de muestras. FPT; fallo previo al ensayo. Valores expresados en MegaPascal (MPa). Distintas letras indican diferencias significativas en las filas. Los asteriscos indican diferencias significativas en las columnas

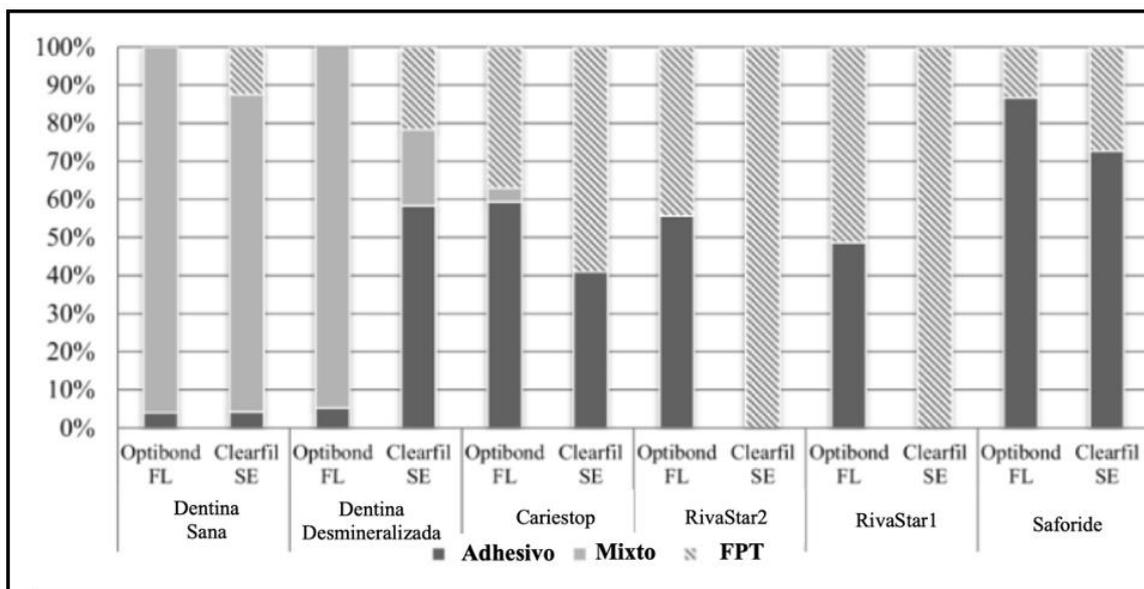


Fig.12 Distribución de los modos de fallo según el tratamiento de SDF y los tipos de adhesivos (Clearfil SE Bond 2, abreviado como Clearfil SE)

3.4 Discusión

Los resultados del presente estudio mostraron como el tratamiento con SDF genera diferentes alteraciones fisicoquímicas en la superficie de la dentina desmineralizada y comprometen la fuerza adhesiva inmediata. Con respecto a la primera hipótesis, el ciclaje de pH y la posterior aplicación de los diferentes agentes comerciales de SDF alteraron la composición mineral y las características cristalinas de la dentina. Por otro lado, en relación a la segunda hipótesis, la aplicación de los tratamientos de SDF en la superficie de dentina desmineralizada con adhesivos de grabado-lavado y autograbantes tuvo un efecto negativo sobre las fuerzas de adhesión. Considerando estos resultados suponemos que la restauración inmediata de estas superficies con los agentes comerciales probados de SDF puede conducir al fracaso de la restauración debido a la falta de adhesión, lo que puede dar lugar a nuevas lesiones cariosas.

La composición química de la dentina tratada con SDF se evaluó mediante espectroscopia ATR-FTIR. Las muestras de dentina se desmineralizaron inicialmente mediante ciclaje de pH para simular la lesión de caries, lo que provocó una

disminución de la relación fosfato:matriz orgánica (relacionada con el grado de mineralización de la dentina) y un aumento del índice de cristalinidad. El ciclaje de pH disolvió los componentes minerales de la dentina eliminando los grupos de fosfato de menor cristalinidad (asociados a una mayor solubilidad), mientras que el componente orgánico (principalmente colágeno tipo I) permaneció intacto [23]. Tras el tratamiento con los diferentes SDF, los componentes minerales se recuperaron, aunque no lograron alcanzar los valores de dentina sana. Además, se demostró previamente que la degradación del colágeno en la dentina era parcialmente inhibida por las soluciones de los productos SDF [105]. El mantenimiento y la estabilidad del colágeno de la dentina durante la remineralización es esencial, ya que actúa como un andamio para la precipitación mineral [125]. Las soluciones de SDF proporcionan un entorno alcalino que promueve las interacciones fisicoquímicas entre los grupos fosfato y el colágeno de la dentina [56]. De esta manera, una vez que los grupos fosfato se unen al colágeno, contribuyen a la formación de sitios de unión de iones de Ca, facilitando así la nucleación de apatito [126]. Este mecanismo también puede combinarse con la reacción de los iones PO_4^{3-} de la dentina desmineralizada y los iones de Ag^{2+} presentes en los agentes de SDF, formando una fase de fosfato de plata (Ag_3PO_4). Sin embargo, esta fase cristalina Ag_3PO_4 es inestable y se reduce rápidamente para formar otros compuestos metálicos,[61] que pueden identificarse por sus estructuras cristalinas (que se analizan más adelante). En definitiva, los tratamientos estudiados de SDF promovieron la remineralización del contenido inorgánico (principalmente grupos fosfatos), aumentando la deposición mineral en la dentina [57].

En la remineralización por SDF intervienen varios factores que promueven la cristalización del apatito. Durante este proceso, el residuo mineral tras el ciclaje de pH puede favorecer la nucleación heterogénea de fases posteriores, y también actuar como reservorio de iones de calcio y fósforo disponibles, que a su vez promueven la precipitación de otras fases cristalinas en la superficie de la dentina [105,127]. Por otro lado, como se ha mencionado anteriormente, la estructura del colágeno sirve como andamio para la deposición mineral en la dentina. La reacción de los compuestos de

SDF con la parte mineral de la dentina conduce a la formación de fases de fosfato de plata (Ag_3PO_4) y fluoruro de calcio (CaF) [105]. El fluoruro de calcio es muy soluble y se elimina fácilmente de la superficie de la dentina durante el lavado [61]. Además, los óxidos de plata pueden reaccionar con soluciones de cloruros alcalinos para formar cristales de cloruro de plata (AgCl) [64], como se detectó mediante DRX en este estudio.

Adicionalmente, uno de los agentes SDF utilizados (RivaSta2) contiene yoduro potásico (KI), cuya presencia favorece la precipitación cristalina de yoduro de plata (AgI). La formación de esta fase cristalina de yoduro de plata (visible como un sólido amarillo brillante) reduce el exceso de iones de plata que da lugar a la típica tinción negra de los agentes de SDF [128]. Estas partículas de plata presentan una elevada toxicidad y propiedades antimicrobianas, proporcionando una protección duradera frente a la formación de nuevas lesiones de caries [129]. Además, las fases cristalinas de plata (AgCl , AgI) distribuidas en las superficies de la dentina mostraron tamaños de cristalito que oscilaban entre 21-36 nm. Por otra parte, los cristales de apatito redujeron su tamaño en la dentina desmineralizada en comparación con la dentina sana. Posteriormente, la remineralización por los diferentes agentes de SDF dio lugar a la formación de cristales de HAp con tamaños de cristalito cercanos a la dentina sana. Además, se observó una correlación entre el tamaño del cristalito y la profundidad de la dentina tanto para la fase de apatito como para las fases relacionadas con sales de plata, mostrando valores más altos en la dentina profunda que en las zonas de dentina superficial y media. Esta relación podría atribuirse al aumento del diámetro de los túbulos dentinarios y a la menor mineralización de la zona profunda de la dentina [103], alterando los procesos de disolución y precipitación de las fases cristalinas. En consecuencia, se puede afirmar que la absorción del SDF en la dentina desmineralizada no se produce de forma homogénea. Estos factores composicionales y microestructurales que controlan los mecanismos de reacción de los agentes de SDF en las superficies dentinarias son clave para la calidad de la adhesión, afectando directamente a las propiedades mecánicas durante la restauración.

En el presente estudio, las imágenes de SEM confirmaron la presencia de depósitos de plata tras la aplicación de los distintos agentes de SDF. Otros estudios mostraron hallazgos similares, observándose depósitos de plata dentro de los túbulos dentinarios [67,130]. Sin embargo, el comportamiento de los agentes utilizados difiere para cada superficie tratada. Este fenómeno puede observarse en los grupos RivaStar1 y RivaStar2, mostrando mayor cantidad de depósitos de SDF en sus superficies con relación a los otros grupos tratados. Posteriormente, las muestras de dentina se grabaron con ácido, infiltrándose en los túbulos dentinarios y eliminando parcialmente los depósitos de SDF. Por otro lado, tras la aplicación del Primer de Clearfil SE Bond, se observó una superficie irregular, mostrando una oclusión de los túbulos dentinarios especialmente en los grupos Cariestop y RivaStar1. Estos resultados apoyan la idea de que el tratamiento con SDF interfiere con las propiedades microestructurales de la dentina desmineralizada y en el rendimiento de los adhesivos. El análisis elemental (EDX) indicó la presencia de Ca, P, C, y Cl en todas las muestras. Sin embargo, el contenido de Ag sólo se detectó en los grupos tratados con SDF y el contenido de I (yodo) sólo se observó en el grupo RivaStar2. La presencia de Cl está relacionada con las sales de alta solubilidad de las soluciones desmineralizantes y remineralizantes utilizadas para crear la lesión de caries artificial.

Las propiedades mecánicas de la dentina se ven influidas por sus características químicas y microestructurales [131]. La aplicación del SDF provocó una disminución de la fuerza adhesiva en ambos adhesivos, lo que concuerda con los resultados de Soeno *et.al.*[114] y Kucukyilmaz *et. al.* [130], quienes descubrieron que la reacción del SDF con el hidroxiapatito y las proteínas de la superficie de la dentina desmineralizada impide la infiltración de monómeros adhesivos. Por otra parte, la aplicación de SDF/KI sobre la dentina sana no afectó negativamente a la fuerza adhesiva de las restauraciones del composite [115,116]. Esta diferencia en el comportamiento de adhesión puede explicarse por las diferencias morfológicas entre los sustratos de dentina desmineralizada y sana. Los resultados obtenidos en nuestro estudio se debieron probablemente a la mayor penetración de iones libres de plata

procedentes de los tratamientos de SDF en dentina desmineralizada [48]. En ese sentido, se han observado que los iones libres de plata interfieren con la adhesión al impedir la penetración del composite en los túbulos dentinarios desmineralizados [113,130]. Entre los agentes de SDF empleados en el presente estudio, RivaStar1 y RivaStar2 mostraron las fuerzas adhesivas menores, con un alto porcentaje de FPT. Esta alteración puede atribuirse al protocolo de aplicación, que no incluye el paso de lavado antes de los procedimientos de adhesión, tal y como describe el fabricante. Esta suposición puede estar en concordancia con un estudio de Lutgen *et.al.* [113] , en el que se demostró una correlación entre el efecto negativo de la adhesión y el protocolo de aplicación del SDF; el lavado tras la aplicación del SDF mejoró la fuerza adhesiva en comparación con los grupos sin lavado. Además, Koizumi *et .al.* [67], mostraron como las superficies de dentina desmineralizada tratadas con SDF/KI y posteriormente restauradas mostraban una disminución significativa de la fuerza adhesiva, siendo más significativa con los adhesivos de autograbado que con los de grabado-lavado.

Por otra parte, el grupo de dentina desmineralizada mostró una fuerza adhesiva significativamente menor, especialmente al utilizar un adhesivo autograbante (Clearfil SE Bond 2). Estos resultados concuerdan con Ceballos *et. al.* [110], en los que observaron una mayor fuerza adhesiva con adhesivos de grabado - lavado que con adhesivos de autograbado en dentina sana y desmineralizada. Nuestros resultados mostraron que Optibond FL tenía mayor fuerza de adhesión en comparación con Clearfil SE Bond 2 en los cuatro grupos de tratamiento de SDF. El pH altamente alcalino [132] y temporalmente estable de los agentes de SDF puede crear un problema de estabilización con los adhesivos autograbantes, ya que los monómeros ácidos del adhesivo pueden no ser lo suficientemente ácidos para infiltrarse en la superficie de la dentina. Como se ha descrito anteriormente, la ligera diferencia en el tamaño de los cristales de HAp observada en todos los grupos experimentales influye de forma crítica en las propiedades fisicoquímicas (índices de solubilidad) del mineral en la superficie de la dentina. La modificación de estas características cristalinas de HAp puede comprometer la interacción del adhesivo en

la dentina al alterar la formación de la capa híbrida. Por lo tanto, las diferentes respuestas mecánicas, en relación a la fuerza adhesiva, pueden estar relacionadas con la alteración de las características estructurales de la superficie dentinaria provocada por el tratamiento del SDF y adhesivos. En este sentido, las imágenes de SEM corroboraron la ausencia de impregnación de los túbulos dentinarios y mayores cantidades depositadas de SDF al utilizar adhesivos autograbantes. La marcada reducción en la capacidad de adhesión del adhesivo autograbante ClearFil SE Bond 2 podría atribuirse al hecho de contener en su composición el monómero 10-MDP, considerado como uno de los monómeros funcionales para la adhesión dentinaria [133]. Este monómero reacciona con los iones Ca para formar sales de calcio, cruciales para el correcto funcionamiento de este adhesivo [134]. En consecuencia, se puede suponer que los iones de plata de los agentes de SDF interfieren con el calcio disponible de la dentina desmineralizada, afectando a los mecanismos de unión de los adhesivos autograbantes y generando una capa híbrida débil. El mayor rendimiento del adhesivo Optibond FL puede estar relacionado con la aplicación del ácido fosfórico, eliminándose parcialmente parte de la capa de SDF/KI precipitando sobre la superficie de la dentina, como se aprecia en la imágenes de SEM.

A pesar de existir algunas limitaciones en las pruebas mecánicas, este estudio *in vitro* muestra que la aplicación de agentes de SDF aumenta el grado de mineralización y las propiedades cristalinas de la dentina previamente desmineralizada. Por otro lado, el uso de estos agentes conduce a una reducción de la fuerza de adhesión, especialmente si se utiliza un adhesivo autograbado. Las implicaciones clínicas son relevantes, ya que la restauración inmediata de estas cavidades podría provocar el fracaso prematuro de la restauración. De esta manera, resulta necesario seguir investigando sobre la aplicación de SDF a fin de determinar el protocolo más adecuado para combinar la aplicación del SDF con restauraciones adhesivas, de forma que se mantengan las ventajas de cada uno de los materiales.

3.5 Conclusiones

La presente investigación mostró diferencias entre las propiedades químicas, microestructurales y mecánicas de la dentina desmineralizada tratada con los diferentes agentes de SDF. La aplicación del SDF dio lugar a la formación de diferentes fases cristalinas de sales de plata, un aumento de la relación mineral:matriz orgánica y mayores tamaños de cristalito de la dentina desmineralizada. Sin embargo, el uso de SDF demostró un efecto negativo sobre la fuerza adhesiva de los sistemas adhesivos de grabado-lavado y de autograbado. La restauración inmediata de cavidades tratadas con agentes de SDF no se recomienda.

Capítulo 4 |

Evaluación de la Capacidad Remineralizadora
del Fluoruro Diamino de Plata sobre Dentina
Desmineralizada en Condiciones de Ciclaje de pH

Resumen

Objetivos: (1) determinar los efectos del fluoruro diamino de plata (SDF) y el fluoruro de sodio (NaF) en la dentina desmineralizada expuesta a un desafío ácido mediante ciclaje de pH, (2) evaluar la capacidad remineralizadora de los productos de SDF/NaF en función de las propiedades fisicoquímicas y mecánicas de las superficies dentinarias tratadas.

Metodología: Se evaluaron 57 molares humanos en diferentes periodos experimentales: dentina sana - control negativo (Periodo 1), dentina desmineralizada - control positivo (Periodo 2), y dentina tratada con productos de SDF/NaF + c-pH (Periodo 3). La composición mineral y las características cristalinas y morfológicas de las muestras de dentina de cada periodo experimental se evaluaron mediante diferentes técnicas analíticas: espectroscopia infrarroja (ATR-FTIR), difracción de rayos X y microscopia electrónica (SEM-EDX). Además, se evaluó la respuesta mecánica de las muestras mediante el ensayo de flexión en tres puntos. Las diferencias estadísticas se estimaron para las variables ATR-FTIR mediante la prueba de Wilcoxon, mientras que los análisis de los datos mecánicos se realizaron mediante las pruebas de Kruskal-Wallis y U de Mann Whitney.

Resultados: En cuanto a la composición química, observamos un mayor contenido mineral/orgánico en los grupos de dentina tratada con SDF/NaF + c-pH (Periodo 3) con respecto al control positivo. Los resultados obtenidos mediante DRX mostraron que el tamaño de cristalito del hidroxiapatito aumentó en los grupos de dentina tratada con SDF/NaF + c-pH (alcanzando incrementos entre +63% en RivaStar y +108% en Saforide), con respecto al control positivo. Las imágenes SEM mostraron como la aplicación de los productos de SDF/NaF formó un precipitado cristalino en la superficie de la dentina relleno parcialmente los túbulos dentinarios. Los valores de resistencia a la flexión (MPa) fueron superiores en la dentina tratada con SDF/NaF + c-pH (Periodo 3) en comparación con el grupo control positivo.

Conclusiones: La aplicación de SDF/NaF afectó a las propiedades fisicoquímicas y mecánicas de la dentina desmineralizada. De acuerdo con los resultados, el uso de SDF/NaF tuvo un efecto remineralizante en la superficie de la dentina incluso bajo desafío ácido (c-pH).

Los resultados de este estudio se encuentran publicados en la siguiente referencia:

Cifuentes-Jiménez, C.C., Bolaños-Carmona, M.V., Enrich-Essvein, T., González-López, S., & Álvarez-Lloret, P. (2023). Evaluation of the remineralizing capacity of silver diamine fluoride on demineralized dentin under pH-cycling conditions. *Journal of Applied Oral Science*, 31, e20220306.

4.1 Introducción

La caries dental es un importante problema de salud en la mayoría de los países, llegando a afectar entre el 60% al 90% de los niños y a la mayoría de la población adulta [135]. Aunque la prevalencia de la caries dental ha disminuido en la última década, actualmente sigue siendo una de las enfermedades más comunes en todo el mundo [136]. De hecho, esta enfermedad tiene un gran impacto en la carga clínica y económica mundial, por lo que resulta esencial mejorar el enfoque de su prevención y tratamiento [137]. La caries dental es una enfermedad multifactorial, dinámica y crónica que se caracteriza por la desmineralización y la cavitación de los tejidos duros dentales [13]. El proceso que interviene en el desarrollo de la caries está mediado por una biopelícula e impulsado por el contenido en azúcar de la dieta, lo que da lugar a la desmineralización y remineralización fásica de las estructuras dentales [19]. A nivel inorgánico, el proceso de desmineralización durante la caries dental comienza con la disolución ácida de los cristales de hidroxiapatito, conduciendo a la formación de cavidades.

La lesión de la caries dental en esmalte y dentina puede remineralizarse y detenerse en una fase temprana de la enfermedad mediante el uso de productos químicos. El enfoque mínimamente invasivo del tratamiento de la caries consiste en respetar los tejidos dentales, evitando la acción quirúrgica y, centrándose en la conservación de la estructura dental [19,138]. Los tratamientos preventivos no restaurativos, como los agentes fluorados, se emplean ampliamente en el tratamiento de la caries dental [139,140].

La aplicación de estos fluoruros tiene protocolos bien establecidos, en los que cada fluoruro tiene su propia concentración recomendada, frecuencia de uso y esquema de dosificación [140]. Además, el uso de productos fluorados, en dentífricos y colutorios, se está convirtiendo en un complemento común del cuidado bucal. Actualmente, el uso de enjuagues bucales conteniendo un 0,2% de NaF en su composición ha demostrado ser capaz de prevenir la caries [141,142]. Por otro lado, el fluoruro diamino de plata (SDF) es un material tóxico, incoloro y alcalino [139]. En el mercado se encuentran disponibles diferentes concentraciones (SDF: 12%, 30% y 38%) de este producto [140]. Sin embargo, la concentración de SDF más común es al 38%, conteniendo una alta concentración de fluoruro (equivalente a una concentración relativa del 5%; 44.800 ppm), iones de plata (25%; 253.900 ppm), 8% de amoníaco y 62% de agua [32,33]. Este producto se utiliza para la hipersensibilidad dentinaria, la prevención de caries en fosas y fisuras de niños y adultos, y para la detención de la caries radicular [47]. Además, estudios previos han demostrado que el SDF puede prevenir y detener nuevas lesiones de caries en niños, así como en adultos mayores [143,144]. Diferentes revisiones sistemáticas concluyeron que el tratamiento con SDF puede llegar a alcanzar una tasa de éxito del 70% al 85% [107]. El protocolo de aplicación del SDF tiene un riesgo mínimo y es indoloro, lo que permite tratar a niños pequeños aprensivos, poblaciones desfavorecidas y ancianos [139].

El mecanismo mediante el cual el SDF previene y remineraliza las lesiones de caries solo se conoce parcialmente [57]. La hipótesis más aceptada es que los iones de flúor contenidos en el SDF ayudan a remineralizar la dentina cariada, mientras que los iones de plata proporcionan propiedades antimicrobianas y reducen la degradación del colágeno al inhibir las colagenasas dentinarias [52]. Además, la elevada concentración de iones de flúor reacciona con la dentina para formar fluoruro cálcico, al igual que la plata reacciona con los compuestos de cloro o fosfatos de la dentina, dando lugar a la formación de sales de plata [145]. Esta reacción se describió previamente en el estudio sobre los efectos inmediatos del SDF sobre la dentina desmineralizada, dando lugar a la precipitación de diferentes fases cristalinas y al

aumento de la mineralización de la superficie de la dentina tras la aplicación de dichos productos [146]. Además, el uso del SDF inhibe la actividad proteolítica de las metaloproteinasas (MMP) y previene la degradación del colágeno dentinario por la acción de la colagenasa bacteriana [47,56,147]. Aunque estudios previos *in vitro* demostraron algunas propiedades de los compuestos de SDF en el tratamiento de las lesiones de caries, los efectos de estos productos fluorados sobre la dentina desmineralizada bajo desafío ácido (es decir, mediante un proceso de ciclaje de pH) han sido escasamente analizados [148,149].

El ciclaje de pH (c-pH) estandarizado por Marquezan *et al.*[21], constituye uno de los mejores métodos para simular la capa de dentina afectada. Este procedimiento es eficiente y fácil de reproducir, mostrando un alto control experimental y sensibilidad al comportamiento variable del tratamiento [22,23]. De esta manera, el c-pH se considera apropiado para evaluar los efectos de desmineralización en la simulación de lesiones de caries *in vitro* y la respuesta de los materiales dentales (por ejemplo, productos SDF). Por lo tanto, el presente estudio tuvo como objetivos: (1) determinar los efectos del SDF/NaF en la dentina desmineralizada expuesta a un desafío ácido mediante el c-pH y, (2) evaluar la capacidad remineralizadora de estos productos basándose en las propiedades fisicoquímicas y mecánicas de las superficies de dentina tratadas. Para ello, empleamos varias técnicas analíticas con el fin de caracterizar las propiedades composicionales, cristalinas y morfológicas de las superficies de la dentina en los diferentes periodos experimentales. Además, la resistencia mecánica de la dentina tratada fue igualmente evaluada para determinar su posible rendimiento clínico. Las hipótesis consideradas fueron: (1) el uso del SDF/NaF no afectará a las propiedades fisicoquímicas de la dentina desmineralizada después del c-pH y (2) el uso del SDF/NaF no afectará a la estructura morfológica de la dentina desmineralizada después del c-pH.

4.2 Materiales y Métodos

4.2.1 Preparación de muestras y diseño experimental

El presente estudio fue aprobado por el Comité local de Ética en investigación Humana y Animal (número de referencia #1020-2019) de la Universidad de Granada. Para esta investigación se utilizaron un total de 57 molares permanentes (no cariados y sin defectos morfológicos) almacenados en una solución de timol al 0.1%.

Las raíces de los dientes se separaron de las coronas 2 mm por debajo de la unión cemento-esmalte utilizando una sierra de baja velocidad Isomet 11/1180 (Buehler, Lake Bluff, IL, EE.UU.) con un disco de diamante 456CA (Struers, Copenhagen, Dinamarca). A continuación, se realizó secciones transversales de la parte media de la corona para obtener discos dentales (9 mm de diámetro x 1 mm de espesor). Posteriormente, se obtuvieron 4 barras de dentina ($6 \times 1 \times 1 \text{ mm}^3$) de cada uno de los discos, resultando en 228 especímenes. Todos estos especímenes fueron enjuagados y limpiados mediante ultrasonido durante 30 min con objeto de eliminar posibles restos. Las muestras se examinaron minuciosamente al microscopio óptico para confirmar la ausencia de microfisuras e imperfecciones dentales. Finalmente, las muestras correspondientes al control negativo (Etapa 1) se almacenaron a temperatura ambiente y 90% de humedad relativa.

Las lesiones de dentina afectada se crearon mediante un ciclaje de pH modificado del propuesto por Marquezan *et. al.* [21]. Todos los especímenes se sumergieron durante 8 horas, en 1 ml de solución desmineralizante con composición 2,2 mM CaCl_2 , 2,2 mM NaH_2PO_4 , y 50 mM de ácido acético ajustado a un pH=4,8. Posteriormente, las muestras se introdujeron, durante 16 horas, en 1 ml de una solución remineralizante con composición 1,5 mM CaCl_2 , 0,9 mM NaH_2PO_4 y 0,15 M KCl ajustada a un pH=7,0. Los reactivos químicos para la preparación de la solución fueron suministrados por Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EE.UU. (pureza $\geq 99,0\%$). Cada espécimen fue sometido a ciclaje durante 14 días renovándose las soluciones diariamente. Todo el procedimiento de c-pH se realizó a temperatura ambiente sin agitación en las soluciones.

Finalmente, las muestras de dentina desmineralizada se dividieron aleatoriamente en cuatro grupos experimentales, según los productos de remineralización aplicados: Saforide, Cariestop, RivaStar y NaF. La tabla muestra la composición química de los productos y los procedimientos de aplicación realizados para cada uno de estos grupos experimentales. Tras el tratamiento con los diferentes productos, las muestras se volvieron a someter a un c-pH durante 14 días para evaluar la capacidad remineralizadora de los productos bajo un desafío ácido (es decir, simulación de proceso de caries in vitro). En este estudio, las muestras se analizaron durante diferentes etapas experimentales: dentina sana-control negativo (Etapa 1), dentina desmineralizada-control positivo (Etapa 2) y dentina tratada con SDF/NaF +c-pH (Etapa 3). La Fig. 13 resume el diseño y metodología realizada en cada etapa experimental, mostrando las técnicas empleadas para la caracterización composicional, microestructural, morfológica y mecánica.

Tabla 5. Material y fabricante, composición química y procedimientos de aplicación para los diferentes productos de fluoruro diamino de plata (SDF) y fluoruro de sodio (NaF)

Material	Composición	Aplicación
Saforide (Tokyo Seiyaku Kasei; Osaka, Japón)	Hidróxido de amonio, nitrato de plata, ácido fluorhídrico y agua	Aplicar durante 3 min. Lavar.
Cariestop 30% (Biodinâmica Química y Farmacêutica; Ibipora, Brazil)	Hidróxido de amonio, nitrato de plata, ácido fluorhídrico y agua desionizada	Aplicar durante 2-3 min. Lavar.
Riva Star (SDI; Bayswater, Victoria, Australia)	Cápsula1: Fluoruro de plata y solución de amoniaco Cápsula2: Yoduro de potasio	Cápsula1: Aplicar la solución únicamente en la zona de tratamiento. Cápsula2: Aplicar una cantidad generosa de la solución hasta que se vuelva transparente.
Fluoruro de Sodio 0.2% (Farmacia Santamaría, Granada, España)	Fluoruro de sodio y agua desionizada	Aplicar durante 3 min. Lavar.

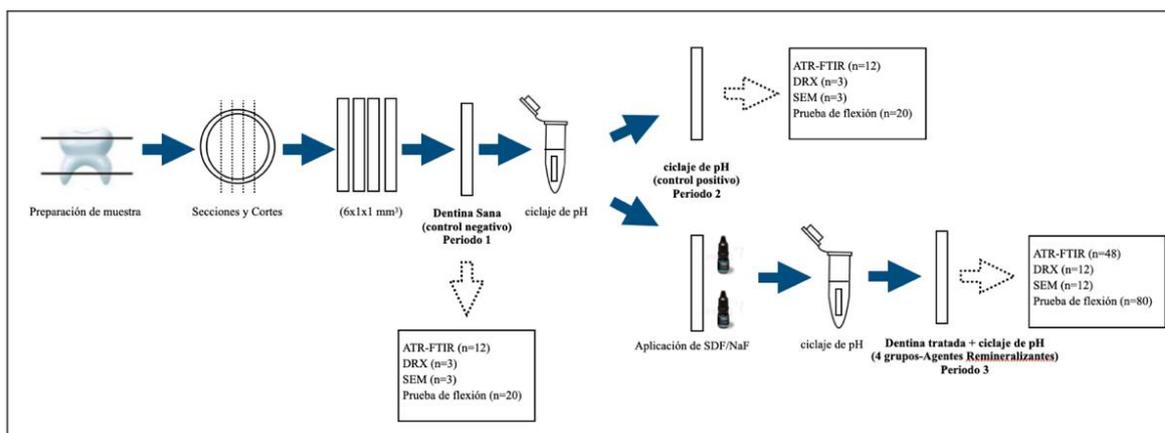


Fig. 13 Diagrama del diseño experimental

4.2.2 Análisis mediante espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier-Reflectancia total atenuada (ATR-FTIR)

Para la caracterización química de la dentina durante las diferentes etapas experimentales se emplearon un total de 96 muestras (n=24 espectros por grupo). Las muestras de dentina se analizaron con un espectrómetro FTIR JASCO 6200 (Jasco, Easton, MD, EE.UU.) equipado con un accesorio ATR Pro ONE con punta de diamante. Los espectros se registraron en modo absorbancia con una resolución de 2 cm^{-1} en 124 acumulaciones de barrido con un rango espectral de $600\text{ a }4000\text{ cm}^{-1}$. Las bandas de absorción del ATR-FTIR se asociaron a los diferentes grupos moleculares relacionados con la composición química del mineral de la dentina ($\nu_1, \nu_3\text{ PO}_3^{4-}$: banda de fosfato) y componentes orgánicos de la matriz (amidas I, II, III). La superposición de los picos se resolvió mediante un software de ajuste de curvas (Peakfit v4.12, Systat Software, San José, CA, EE.UU.). Para determinación de la posición de cada pico dentro de cada región del espectro se utilizó el método de la segunda derivada. El grado de suavizado se ajustó al 10% (algoritmo Savitzky- Golay) empleándose una función mixta Gaussiana-Lorentziana para adaptar el perfil de los picos. Finalmente, se calcularon los siguientes parámetros para describir las propiedades de la composición de la dentina: (1) cantidad relativa de mineral respecto a la matriz orgánica ($\text{PO}_4/\text{amida I}$):ratio entre el fosfato principal (PO_4 : 1030 cm^{-1}) y el área de la

amida I (colágeno tipo I: 1640 cm^{-1}); (2) índice de cristalinidad (IC): relación entre las áreas de las subbandas de fosfato 1030 cm^{-1} (fosfatos de apatito muy cristalinos) y 1020 cm^{-1} (fosfatos de apatito poco cristalinos) [120].

4.2.3 Análisis mediante difracción de rayos X (DRX)

Para el estudio de las propiedades cristalinas se seleccionaron tres barras al azar de cada grupo y se obtuvieron patrones bidimensionales de difracción de rayos X (2D-DRX) mediante un difractómetro de rayos X (Bruker D8 DISCOVER, Billerica, MA, EE.UU.), equipado con un detector de área (DECTRIS PILATUS 3 100K-A). Las condiciones experimentales para los análisis de DRX fueron: radiación de la fuente $\text{Cu K}\alpha$ ($\lambda=1,5418\text{ \AA}$) a 50 kV y 30 mA, con un haz de emisión con sistema de colimación de 0,5 mm de diámetro. Los puntos analizados en las superficies de la dentina se determinaron mediante un microscopio óptico equipado con un láser. De esta manera, se obtuvieron patrones de difracción de tres puntos diferentes de la superficie de la dentina en cada barra. Los patrones 2D-XRD se registraron en un rango angular de barrido 2θ entre 20° a 60° , considerando 19 pasos y 40 s/paso. Las intensidades concentradas en cada uno de los arcos dentro los anillos de difracción de Debye (correspondientes a líneas de difracción/espacios d específicos) se integraron para obtener un barrido unidimensional (es decir, un patrón 2θ).

El tamaño del cristalito de los cristales de hidroxiapatito de la dentina se determinó midiendo la anchura a media altura (en inglés, FWHM) de los picos de difracción (reflexión 002) que aparecen en el patrón 2θ . Para ello, se utilizó la ecuación de Debye-Scherrer: $d=K\lambda/\beta\cos\theta$; donde d es el tamaño medio de los cristalitos (expresado en nm), λ es la longitud de onda de la fuente de rayos X, K es la constante de Scherrer ($K=0,89$), y β es la FWHM del ensanchamiento de la línea para reflexiones de difracción específicas. La determinación del tamaño de los cristalitos mediante esta técnica corresponde a la medida media del volumen de los dominios cristalinos en la dirección específica de los ejes c .

4.2.4 Análisis mediante microscopía electrónica de barrido (MEB)

Para analizar la morfología y la estructura de la dentina en los distintos periodos experimentales, se seleccionaron al azar de tres barritas de dentina por grupo. Todos los especímenes se fijaron en una solución de glutaraldehído después de enjuagarlas con PBS. A continuación, las muestras se deshidrataron en series ascendentes de etanol (50%, 70%, 90% y 96%). Por último, las muestras se montaron en soportes de aluminio y se recubrieron con una capa de aproximadamente 20 nm de grosor de oro utilizando un equipo de pulverización iónica. Las superficies de las muestras se observaron utilizando un microscopio electrónico de barrido (JSM-6610LV, JEOL, Japón) con una aceleración de 20 kV y 10 mA, se utilizó un aumento de 10.000x-30.000x. Igualmente, para cada muestra se realizó un análisis (tres mediciones por muestra) mediante espectroscopia de rayos X por dispersión de energía, (EDX: Quanta 400, FEI, Hillsboro, OR, EE.UU.) con objeto de determinar la composición elemental (Ca, P, Ag, I, C, O y Na) en la superficie de la dentina.

4.2.5. Ensayos mecánicos - Resistencia a la flexión

Las propiedades de flexión de 120 barritas (n=20 por grupo) se midieron utilizando una máquina-universal (modelo 3345, Instron, Canton, MA, EE.UU.) mediante un ensayo de flexión de tres puntos sobre un soporte de dos puntos con una distancia de separación de 4,0 mm de longitud entre puntos. El ensayo se realizó a una velocidad de carga de 0,5 mm/min hasta la fractura de las muestras de dentina.

4.2.6 Análisis Estadístico

Para el análisis de las diferenciadas observadas en los datos de ATR-FTIR y la prueba de resistencia a la flexión (pruebas mecánicas) se calcularon las estadísticas descriptivas. La distribución normal de las variables se verificó mediante las pruebas de Kolmogorov-Smirnov o Shapiro-Wilk, según el tamaño de la muestra. Dado que los datos no seguían una distribución normal, las pruebas no paramétricas

permitieron realizar las comparaciones entre los grupos. Las comparaciones entre los grupos de datos ATR-FTIR de los distintos periodos experimentales se realizaron mediante la prueba de Wilcoxon, mientras que el análisis estadístico de los resultados de los ensayos mecánicos se llevó a cabo mediante las pruebas de Kruskal-Wallis y U de Mann Whitney. El nivel de significancia se estableció en $p < 0,05$. Los resultados se procesaron con el programa estadístico SPSS (versión 22, IBM0, Chicago, EE.UU.). La estimación del tamaño de la muestra y el análisis de potencia se realizaron con el programa informático G*Power (ver. 3.1.9.7; Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Düsseldorf, Alemania). Los parámetros de partida considerados para estos cálculos fueron: prueba estadística de una cola, tamaño del efecto d de 0,5 (medio), nivel de error α de 0,05 y potencia de 0,6 (error $1-\beta$). Estos resultados sugirieron un tamaño mínimo de muestra de 17 especímenes.

4.3 Resultados

4.3.1 Análisis mediante espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier-Reflectancia total atenuada (ATR-FTIR)

La Fig. 14 muestra una comparación entre los espectros de ATR-FTIR de los controles negativo y positivo, y de los grupos tratados con los agentes remineralizadores de SDF/NaF. En todos los grupos se observa una pérdida del componente mineral ($\nu_1, \nu_3 \text{ PO}_3^{4-}$; banda de fosfato) tras el proceso de c-pH (grupos de control positivo y dentina tratada con SDF/NaF). Por otra parte, los grupos control positivo y tratados con SDF (es decir, Saforide, Cariestop y RivaStar) mostraron una mayor intensidad relativa en los picos de absorción correspondientes a los componentes orgánicos. Asimismo, se identificó una disminución de la intensidad de la amida I (1640 cm^{-1}) y de la amida II (1550 cm^{-1}), así como un mayor ensanchamiento y la disminución de la intensidad a 1400 cm^{-1} de la amida III (1240 cm^{-1}), en los grupos tratados con SDF en comparación al control negativo. Las muestras tratadas con el producto de NaF mostraron espectros similares a los del control positivo.

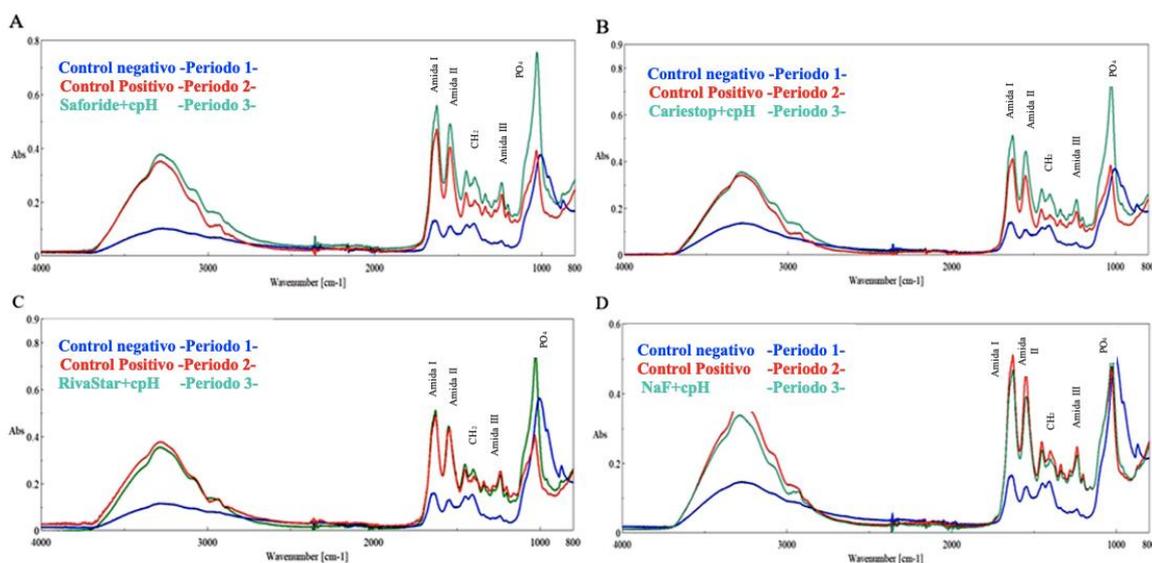


Fig. 14 Espectros representativos de ATR-FTIR para el control negativo (Periodo 1), control positivo (Periodo 2) y productos remineralizantes (Periodo 3): (A) Saforide, (B) Cariestop, (C) RivaStar, y (D) NaF.

La tabla 6 muestra los parámetros composicionales relacionados con los principales componentes inorgánicos/orgánicos, asociados al área de absorción 1030/1640 (es decir, relación PO_4 /Amida I) e IC. Para estos parámetros se observó una disminución significativa de la relación PO_4 /Amida I en el control positivo (Periodo 2). Por otra parte, tras la aplicación de los productos de remineralización + c-pH (Periodo 3), se identifica un aumento significativo de la relación PO_4 /Amida I, siendo relativamente menor en el grupo RivaStar. Además, el IC aumentó en todos los grupos tratados con los agentes remineralizadores (Periodo 3), respecto al grupo control negativo. Por otra parte, Saforide y Cariestop aumentaron significativamente sus valores del parámetro IC en relación al grupo control positivo (Periodo 2), mientras que los demás productos (RivaStar y NaF) mostraron valores similares a los de la Etapa 2.

Tabla 6. Media (DE) de las relaciones de composición inorgánica/orgánica obtenidos mediante análisis ATR-FTIR para cada periodo experimental.

Grupos Experimentales	Periodo 1	Periodo 2	Periodo 3
	1030/1640	1030/1640	1030/1640
Saforide	0,69(0,19) ^a	0,41(0,14) ^b	1,43(0,48) ^{c1}
Cariestop	0,68(0,23) ^a	0,45(0,17) ^b	1,74(0,63) ^{c1}
RivaStar	0,63(0,24) ^a	0,36(0,16) ^b	1,18(0,46) ^{c2}
NaF	0,58(0,17) ^a	0,39(0,15) ^b	1,64(0,44) ^{c1}
	CI	CI	CI
Saforide	0,95 (0,21) ^{a1,2}	1,17(0,20) ^b	1,66(0,76) ^{c1}
Cariestop	1,06(0,15) ^{a1}	1,17(0,15) ^a	1,42(0,16) ^{b1}
RivaStar	0,94(0,26) ^{a2}	1,64(1,02) ^b	1,48(0,25) ^{b1,2}
NaF	1,12(0,17) ^{a3}	1,26(0,13) ^b	1,40(0,37) ^{b2}

Letras distintas indican diferencias significativas en las filas de cada parámetro.

Los números distintos indican diferencias significativas en las columnas de cada parámetro.

4.3.2. Análisis mediante difracción de rayos X (DRX)

Las fases cristalinas precipitadas durante los tratamientos remineralizadores y las propiedades de cristalinidad del mineral dentario se identificaron a través del análisis DRX. La Fig. 15 muestra los patrones 2Theta integrados (barrido unidimensional) para cada uno de los tratamientos y grupos control. Los patrones de difracción muestran fases altamente cristalinas formadas como resultado de los tratamientos remineralizadores aplicados en las superficies dentinarias, correspondiendo a cloruro de plata (clorargirita, AgCl) en los productos Cariestop, Saforide, yoduro de plata (yodoargirita) para la fase cristalina de RivaStar.

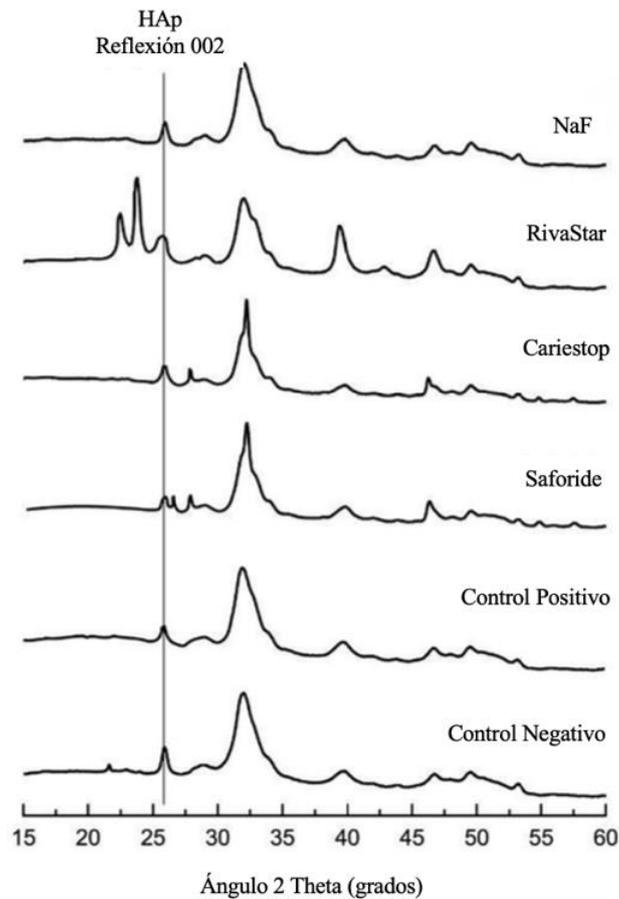


Fig. 15 Patrones de difracción de rayos X (barrido 2Theta) para los controles negativo y positivo y los grupos experimentales SDF/NaF. El tamaño de los cristalitas de HAp se determinó midiendo los valores de FWHM para la reflexión (002) (es decir, correspondiente a los ejes c).

Por otra parte, se determinó el tamaño de los cristalitas del mineral de la dentina midiendo la anchura a media altura (FWHM) para la línea de difracción 002 (es decir, correspondiente al eje c) para los cristales de hidroxiapatito (HAp) (Tabla 7). Los resultados indican una disminución en el tamaño del cristalito (asociado a un mayor ensanchamiento del pico) de los cristales de HAp en el control negativo (Periodo 1) en comparación con el control positivo (Periodo 2). Tras la aplicación de los productos de remineralización (Periodo 3), se observa un aumento del tamaño de cristalito de los cristales de HAp hasta valores similares correspondientes al control negativo en todos los grupos experimentales, siendo este incremento mayor para el producto Saforide.

Tabla 7. Valores de Anchura a media altura (FWHM) y tamaño del cristalito (d) para los cristales de hidroxiapatito (HAp) considerando la reflexión 002 (dirección del eje c) para los controles negativo y positivo, y los tratamientos con los productos remineralizadores SDF/NaF.

Grupos Experimentales	FWHM	d (nm)
	HAp-002	
Control Negativo -Periodo 1-	0,44	21
Control Positivo -Periodo 2-	0,71	12,6
Productos SDF/NaF -Periodo 3-		
Saforide	0,36	26,33
Cariestop	0,41	23,32
Rivastar	0,59	20,61
NaF	0,45	20,64

4.3.3 Análisis mediante microscopía electrónica de barrido (MEB)

La Fig. 16 muestra imágenes SEM representativas a diferentes aumentos (10.000x-30.000x) de cada periodo experimental. Las imágenes correspondientes al control negativo (Periodo 1) (Fig. 16 A-B) muestran el aspecto morfológico característico de los túbulos dentinarios, con una superficie rugosa y regular. Por otro lado, el control positivo (Periodo 2) (Fig. 16 C-D) muestra una superficie más lisa con una importante apertura de algunos túbulos dentinarios. La superficie de dentina tratada con los diferentes agentes remineralizadores SDF/NaF (Periodo 3) (Fig. 16 E-N) muestra precipitados cristalinos (descritos previamente en el análisis de DRX) que cubren la superficie y rellenan parcialmente los túbulos dentinarios. Entre ellos, el grupo experimental RivaStar (Fig. 16 I- J) presentó una mayor formación de precipitados en la dentina intertubular y peritubular en comparación con los otros grupos experimentales de SDF. La superficie de dentina tratada con NaF no mostró precipitación aparente en la superficie (Fig. 16 M-N).

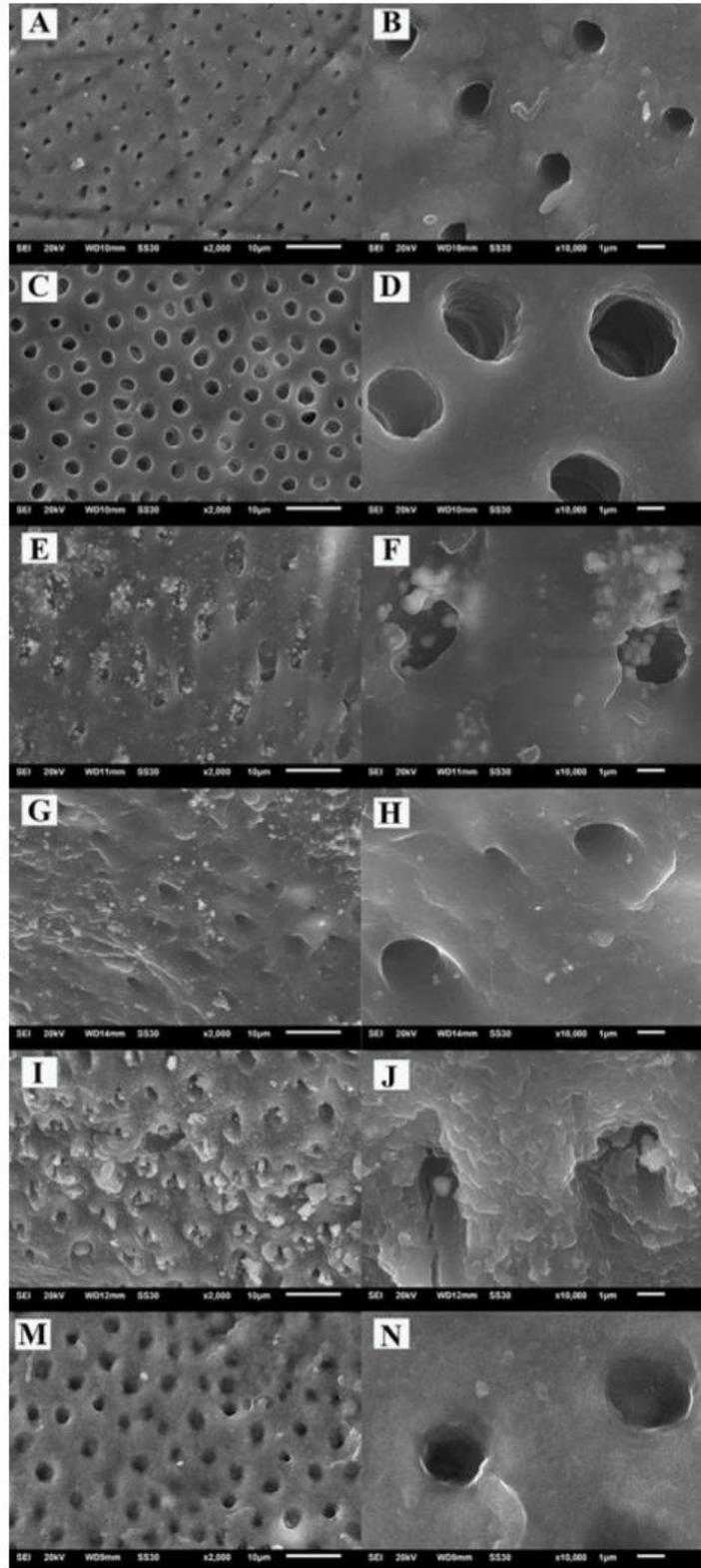


Fig. 16 Imágenes representativas de SEM de dentina sana; control negativo (A-B) y dentina desmineralizada; control positivo (C- D). Grupos experimentales tras la aplicación de productos remineralizantes Periodo 3: Saforide (E-F), Cariestop (G-H), RivaStar (I-J) y NaF (M-N).

La Fig.17 muestra los análisis químicos obtenidos a través de EDX para cada uno de los grupos considerados en este estudio. Estos datos analíticos semicuantitativos mostraron una pérdida relativa de los elementos asociados al componente mineral de la HAp (es decir, porcentajes de Ca y P) en el control positivo (Periodo 2), aunque la relación Ca/P fue similar a la observada en el control negativo (Periodo 1) (aprox.~2,57). Las concentraciones relativas de estos elementos aumentaron en los grupos tratados con los productos remineralizadores (Periodo 3) (es decir, Ca>23,50% y P>8,67%, respectivamente), mostrando relaciones Ca/P más elevadas en los grupos de tratamiento con SDF (por encima de 2,63). Además, todos los grupos tratados con productos SDF presentaban plata (Ag), aunque la distribución de los productos era heterogénea en las superficies dentinarias. Por último, los análisis mediante EDX detectaron yodo (I) en RivaStar, así como Na en el grupo de tratamiento con NaF.

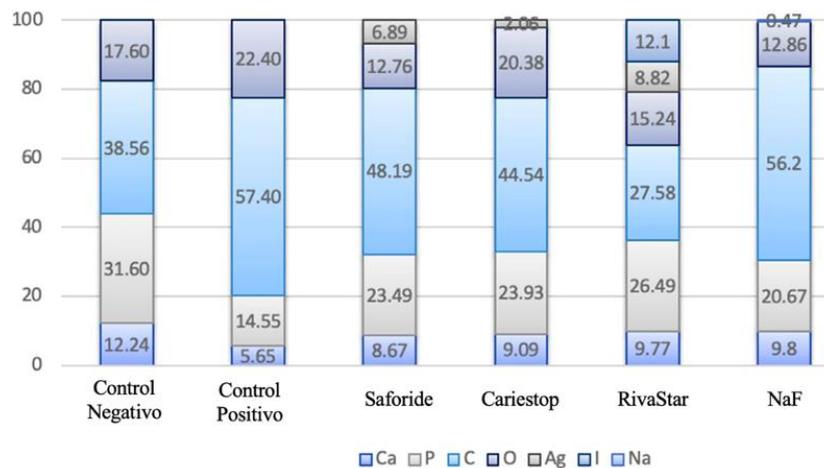


Fig.17 Distribución elemental de P, Ca, C, O, Ag, I y Na en la superficie de la dentina mediante análisis semicuantitativo de EDX para controles negativos y positivos, y tratamientos con los productos remineralizantes de SDF/NaF

4.3.4 Resistencia a la flexión – Ensayo Mecánico

La Tabla 8 muestra los valores medios de resistencia a la flexión para cada periodo experimental. Las barras tratadas con los diferentes productos de SDF/NaF

(Periodo 3) aumentaron la resistencia a la flexión en comparación con los grupos control (Periodo 1 y Periodo 2). En cuanto a la respuesta mecánica entre los productos remineralizadores, Saforide presentó los mayores valores, aunque no significativamente diferentes de Cariestop y NaF. Por otro lado, RivaStar presentó los valores menores, aunque tampoco significativamente diferentes a Cariestop y NaF.

Tabla 8. Valores de resistencia a la flexión (media \pm DS) determinados por la prueba de flexión en tres puntos para los controles negativos y positivos y los tratamientos con los productos remineralizantes de SDF/NaF.

Grupos Experimentales	MPa
Control Negativo -Periodo 1-	50,71(3,40) ^a
Control Positivo -Periodo 2-	47,30(3,53) ^a
Productos SDF/NaF -Periodo 3-	
Saforide	63,17(4,36) ^{bcd}
Cariestop	55,86(3,32) ^{ac}
Rivastar	49,18(2,87) ^a
NaF	55,26(3,90) ^{ad}

Letras distintas indican diferencias significativas entre los grupos

4.4 Discusión

El presente estudio investigó la capacidad remineralizadora de los productos comerciales de SDF/NaF en dentina desmineralizada sometida a un desafío ácido. Nuestros resultados muestran como la aplicación de estos productos aumentó el contenido mineral/orgánico y el tamaño de cristalito de los cristales de hidroxiapatito en la superficie de dentina. Estas alteraciones composicionales y microestructurales, así como la formación de diferentes fases cristalinas en las superficies de la dentina, estuvieron asociadas con una mejora parcial de las propiedades mecánicas de la dentina remineralizada. En consecuencia, estos productos evitan la desmineralización de la estructura dentaria. Por otra parte, estos productos promueven diversos efectos en las propiedades de la dentina ante un desafío ácido (ciclaje de pH) preservando su capacidad remineralizadora y previniendo la desmineralización de la estructura dentinaria. En este sentido, las dos hipótesis propuestas fueron rechazadas, ya que los

resultados mostraron diferencias entre los grupos control (dentina sana y desmineralizada) y de tratamiento con SDF/NaF teniendo en cuenta los distintos periodos considerados en el presente estudio.

Una de las principales desventajas de la aplicación de modelos *in vitro* en Cariología es su limitada capacidad para reproducir algunos factores del entorno intraoral (por ejemplo, el pH de la placa bacteriana, la saliva y la composición microbiana). Sin embargo, estos modelos presentan ventajas importantes en cuanto al alto nivel de control experimental y, por consiguiente, la menor variabilidad intrínseca y, por lo tanto, el menor tamaño de muestra requerido. La simulación *in vitro* de la caries dental mediante un modelo estandarizado, como el c-pH, es un método aceptado en investigación odontológica debido a su facilidad técnica y reproducibilidad [23,52,150]. Este método se utiliza habitualmente en muchos estudios sobre caries dentinaria, con ligeras modificaciones en función de los objetivos de la investigación [22,23]. Por ejemplo, modelos de ciclaje de pH se emplearon para detectar las respuestas a la dosis y al pH de los dentífricos fluorados y su asociación con otros tratamientos anticaries [20]. Estudios anteriores también han descrito como los modelos de ciclaje de pH pueden simular alteraciones minerales a nivel composicional, microestructural y morfológico, asemejándose a las características de la lesión de caries natural [151]. En nuestro trabajo, las muestras fueron tratadas con diferentes productos remineralizadores en dentina previamente desmineralizada y sometidas a un posterior proceso de ciclaje de pH para evaluar su potencial de remineralización en condiciones ácidas. No obstante, este estudio experimental no tuvo en cuenta todos los posibles factores orales; concretamente, no se simuló la interfase diente-placa-saliva [152,153], lo que puede presentar algunas limitaciones para su extrapolación a diversas situaciones clínicas.

Asimismo, comprender las características de las estructuras mineralizadas de los tejidos dentales es esencial para evaluar los posibles tratamientos clínicos y su posible respuesta *in vivo*. La microrradiografía transversal (TMR) es la técnica de referencia para evaluar la profundidad de desmineralización de muestras de dentina

y esmalte [152,153]. Sin embargo, el procedimiento metodológico para la preparación de las muestras (p. ej., corte/pulido) resulta difícil en técnicas de diseños experimentales que requieren un análisis secuencial de las mismas muestras, como en nuestro estudio. Además, en esta investigación debido a la radiodensidad/radiopacidad asociadas a la presencia de las fases cristalinas de los tratamientos de SDF (como la clorargirita y la yodargirita) [154], pueden aparecer artefactos que induzcan a la incorrecta interpretación de los efectos de remineralización asociados a la precipitación de la fase HAp en la dentina. El presente estudio propone utilizar técnicas no destructivas complementarias, como ATR-FTIR y DRX, con el fin de analizar las propiedades fisicoquímicas de las superficies de dentina remineralizada.

La remineralización de la dentina desmineralizada puede verse favorecida por varias condiciones a: (1) presencia de precipitados minerales residuales que actúen como centros de crecimiento de cristales, (2) fuentes que contengan calcio y fósforo para la promoción de precipitación mineral, y (3) conservación de la estructura de colágeno como andamio para el crecimiento de cristales [150]. Los resultados ATR-FTIR demostraron cómo los tratamientos de remineralización basados en productos de SDF/NaF afectaron a las características químicas de la dentina desmineralizada. Los espectros infrarrojos obtenidos para cada uno de estos tratamientos mostraron variaciones en la absorción de grupos moleculares asociados a bandas relacionadas con diversos componentes orgánicos e inorgánicos de la dentina (Fig. 14). Particularmente, el análisis detallado de los espectros de ATR-FTIR de las zonas comprendidas entre 900 cm^{-1} y 1200 cm^{-1} ($\nu_{1,\nu_3}\text{ PO}_3^{4-}$; grupo fosfato) mostró una disminución de la absorción relativa y una variación del perfil de bandas desplazadas a números de onda superiores, asociados a diferentes entornos cristalinos del mineral dentinario como respuesta a los procesos de desmineralización y remineralización [34]. Por otra parte, el efecto de las soluciones de amoníaco de los productos de SDF disminuyó la intensidad relativa relacionada con $\sim 1633\text{ cm}^{-1}$ (banda amida I, proteína de colágeno más abundante), posiblemente debido a un aumento de los enlaces covalentes dentro de la estructura del colágeno [112]. Sin embargo, este fenómeno está ausente en el grupo RivaStar, probablemente por la adición de KI en su composición

y a la ausencia de amoníaco en el producto NaF. Adicionalmente, se observaron efectos similares para 1544 cm^{-1} (amida II - vibraciones de estiramiento C-N y flexión NH del péptido) y 1235 cm^{-1} (bandas de amida III - vibraciones de estiramiento CN y flexión NH, estiramiento CC y flexión CH) [155,156]. Estos cambios en los grupos amidas observados en los productos de SDF sugieren una posible alteración en la organización de la red del colágeno (es decir, la posible deshidratación de las fibras de colágeno) [157,158]. Por tanto, el tratamiento de SDF genera un efecto de entrecruzamiento (*cross-linking*) del colágeno que influye en los mecanismos de precipitación mineral de estos productos y, en última instancia, afecta a las propiedades mecánicas de la estructura de la dentina. Por otra parte, los componentes inorgánicos/orgánicos (expresados como relación 1030/1640) indicaron que tras la aplicación de los productos de SDF/NaF (Etapa 3) el contenido de fosfato aumentó relativamente incluso bajo el c-pH. El SDF reacciona con el hidroxiapatito de la dentina para formar fluoruro de calcio y sales de fosfato de plata insolubles, lo que aumenta la resistencia a la disolución ácida [47,146]. La capacidad remineralizadora del SDF puede atribuirse a su pH alcalino, así como a la gran cantidad de contenido en flúor (44.800 ppm), lo que da lugar a la formación de fluorapatito, actuando en un proceso sinérgico para promover la remineralización [60]. Asimismo, durante las diferentes etapas experimentales, se detectó una alteración en el IC del hidroxiapatito probablemente por la disolución y precipitación selectiva de grupos fosfato (entornos vibracionales relacionados con fosfatos de menor y mayor cristalinidad). En el Periodo 2, el IC aumentó en comparación con el control negativo (Periodo 1), como resultado de la disolución preferente de los componentes de fosfato de menor cristalinidad, debido al efecto del ciclaje de pH [150]. Por otra parte, tras la aplicación de los productos remineralizantes, los entornos de fosfato de la dentina mineral aumentaron selectivamente en compuestos de fosfato de mayor cristalinidad y se produjo una posible mayor disolución de fosfato de menor cristalinidad debido al procedimiento de c-pH posterior (Etapa 3). Estas variaciones composicionales pueden influir en las características microestructurales de los cristales de hidroxiapatito de la dentina durante las diferentes etapas experimentales.

Las propiedades cristalinas producidas durante el proceso de remineralización al aplicar los productos SDF/NaF pueden influir en las propiedades morfológicas y mecánicas de la dentina. Estudios previos han demostrado que el c-pH puede simular las características minerales del proceso natural de la lesión de caries [22], como se observó en el control positivo (Etapa 2) del presente estudio. Por otra parte, en nuestro estudio anterior *in vitro* se demostró que la aplicación inmediata de productos de SDF daba lugar a la formación de diferentes fases cristalinas de sales de plata (es decir, compuestos de AgCl y AgI) [146]. Adicionalmente, obtuvimos el tamaño de cristalito del mineral de la dentina a partir de la línea de difracción (002) del patrón de DRX, correspondiente a la dirección del eje c de los cristales de HAp. En los grupos tratados con SDF se detectaron otras reflexiones asociadas a las fases cristalinas de clorargirita (Saforide y Cariestop) y yodargirita (RivaStar), lo que sugiere que estos compuestos precipitaron como una fase diferenciada en los grupos tratados con SDF [146,159]. Además, estudios previos mostraron que los compuestos de SDF reaccionan con iones de calcio y fosfato para producir cristales de fluorohidroxiapatito [160]. De esta manera, las condiciones alcalinas producidas por los tratamientos de SDF son favorables para sintetizar fluorohidroxiapatito, lo que puede acelerar el proceso de reacción al promover la precipitación [161]. Asimismo, los tamaños de cristalito de apatito y/o la perfección de la red cristalina estuvieron asociados a la absorción de los fluoruros presentes en una solución fisiológica [162]. Hemos observado los tamaños de cristalitos en los productos de SDF/NaF, especialmente en Saforide, relacionados con el eje c específico de los cristales de apatito. Estas propiedades anisotrópicas en el desarrollo cristalino del apatito también pueden influir en la estabilidad química de los precipitados formados durante los tratamientos SDF/NaF. Después de la aplicación de los agentes remineralizadores (Etapa 3), se observa como las características cristalinas de los precipitados permanecen prácticamente inalteradas en comparación con la aplicación inmediata de SDF [140]. Sin embargo, las características composicionales de estas fases de fosfato de cálcico (es decir, hidroxiapatito cristalino) se asocian con entornos de fosfatos de mayor cristalinidad (CI, obtenidos mediante análisis ATR-FTIR descritos previamente). En general, estos mecanismos físico-químicos durante el proceso de remineralización favorecen

diferentes factores de estabilidad mineral, como la solubilidad y las características cristalinas, que en última instancia determinan sus propiedades biomecánicas.

En las imágenes de SEM, observamos una superficie rugosa, de morfología regular compatible con la dentina sana (Periodo 1) (Fig. 16 A-B) [163]. Tras el c-pH, se observó una mayor apertura de los túbulos dentinarios y una superficie más lisa, que coincidía con las características de la dentina desmineralizada (Periodo 2) (Fig.16 C-D) [21]. La aplicación de los productos de SDF (es decir, Saforide, Cariestop y RivaStar) dio lugar a la formación de diferentes fases cristalinas, distribuidas heterogéneamente en la superficie de la dentina y ocluyendo parcialmente los túbulos dentinarios (Fig.16 E-N). Particularmente, la precipitación de partículas de plata en el grupo RivaStar generó la oclusión de los túbulos dentinarios. Estas observaciones se han descrito previamente en aplicaciones de tratamiento del SDF asociadas a zonas de mayor desmineralización de la dentina [47]. El análisis EDX (Fig. 17) corrobora la presencia de estos precipitados en forma de partículas de plata, correspondientes a fases cristalinas de clorargirita (Saforide y Cariestop) y yodargirita (RivaStar), tal y como se observó previamente mediante análisis DRX. Por otro lado, la dentina tratada con NaF presentaba una superficie rugosa (Fig. 16 M-N), en la que no se aprecia la formación de precipitación cristalina, al igual que en observaciones previas utilizando tratamientos similares [17,164]. Además, el aumento de la relación Ca/P tras la aplicación de los productos de SDF sugiere que se produjo una remineralización de la dentina previamente desmineralizada. Procesos similares de remineralización se han descrito mediante aplicaciones de SDF [149,165], las concentraciones de fluoruro del SDF/KI inhibieron la desmineralización y/o potenciaron la remineralización de las lesiones caries de dentina artificial. Estas alteraciones en las propiedades morfológicas, composicionales y estructurales de la dentina debido al efecto de los productos remineralizadores pueden conducir a cambios en su respuesta mecánica.

Un criterio para evaluar la remineralización de los tejidos dentales es la evaluación de sus propiedades mecánicas [161]. La desmineralización en una lesión de caries reduce el contenido mineral/orgánico de los tejidos dentales y, en consecuencia, la respuesta mecánica del diente puede verse alterada [15,23]. La fase

inorgánica proporciona dureza, mientras que la fase orgánica es responsable de la flexibilidad de la estructura de la dentina [23]. Los resultados del presente estudio demostraron que los grupos experimentales tratados con los productos de SDF/NaF (Periodo 3) mejoraron las propiedades mecánicas de la dentina desmineralizada, incluso después de la simulación de caries por c-pH. Asimismo, una mayor concentración de SDF generó un mayor efecto inhibitor sobre las MMP [147], lo que puede contribuir a evitar la degradación del colágeno, reforzando las propiedades mecánicas. Además, la mejora de las propiedades mecánicas también podría atribuirse a la alteración del contenido mineral/orgánico y sus características cristalinas, confirmadas mediante los análisis de ATR-FTIR y DRX. Por otro lado, el grupo RivaStar mostró el menor incremento en los valores de resistencia a la flexión, lo que sugiere que la combinación de SDF con yoduro de potasio (KI) puede afectar a las propiedades del SDF. De hecho, la presencia de KI disminuye la cantidad de compuestos de plata en la superficie de la dentina, lo que afecta negativamente a su respuesta mecánica [165,166]. Estas propiedades mecánicas pueden influir de forma crítica en el éxito de la futura restauración al utilizar estos productos remineralizadores.

La aplicación de productos de SDF es un tratamiento sencillo, no invasivo y económico para el tratamiento de las lesiones de caries dental. Asimismo, el SDF es un potencial agente para el control no restaurativo de la caries dental [106,143]. Este estudio demuestra cómo la alteración de las propiedades fisicoquímicas de la dentina tratada con SDF/NaF mejora las propiedades mecánicas de las superficies dentinarias en condiciones de ciclaje de pH, simulando un proceso de caries dental. Por tanto, la capacidad remineralizadora de estos tratamientos, debido a la potencial reacción de sus compuestos químicos con el hidroxiapatito del mineral dentinario [140], parece mostrar un efecto sobre la respuesta mecánica en la dentina desmineralizada que favorece la estabilidad del tratamiento en condiciones ácidas (i.e., c-pH). Considerando estos resultados, observamos que el Saforide reacciona mejor que el Cariestop y el RivaStar, presentando ambos una concentración similar de flúor entre los productos de SDF. Por otro lado, utilizamos el producto NaF a una concentración

de flúor muy baja en comparación con las otras fuentes de flúor. Por lo tanto, el efecto de la solución de fluoruro de sodio al 0,2% (~850 ppm de fluoruro) no debe contrastarse directamente con los productos SDF (~40.000 ppm de fluoruro). En el presente estudio, incluso utilizando una concentración muy baja de flúor, se observó que este producto fue capaz de modificar significativamente la estructura cristalina del hidroxiapatito. Estos hallazgos son corroborados por otros estudios, que concluyeron que el uso de NaF al 0,2% puede disminuir la caries [65,141].

Estas diferencias proporcionan información importante para los clínicos sobre el uso del material adecuado para cada paciente. Sin embargo, este estudio experimental fue insuficiente para determinar el impacto de la actividad antimicrobiana *in vivo* atribuida a estos productos. En futuras investigaciones, resultaría interesante determinar la evaluación a largo plazo de estos productos en los procesos de caries (es decir, la progresión en condiciones de ciclaje de pH a tiempos más largo), así como la importante cuestión estética relacionada con la aplicación del SDF.

4.5 Conclusiones

El uso de fluoruro diamino de plata y la solución de fluoruro de sodio al 0,2% tiene un efecto remineralizante sobre la superficie de la dentina incluso bajo ataque ácido. Independientemente de la concentración de flúor, la aplicación de estos productos provoca la precipitación de diferentes sales cristalinas, lo que se asocia a un aumento del contenido mineral/orgánico y a una alteración de las características cristalinas de la dentina, resultando en una mejora las propiedades mecánicas de la dentina desmineralizada. Dentro de los productos de fluoruro diamino de plata, las propiedades cristalinas (mayor IC y mayor tamaño de los cristallitos) en el tratamiento con Saforide parecen estar relacionadas con una mejor respuesta mecánica tras el ataque ácido. Considerando las limitaciones de este estudio, es esencial seguir investigando en ambientes que contengan todos los posibles factores orales para evaluar su aplicación clínica.

Capítulo 5 |

Efectos de la Aplicación de Nanopartículas de Plata Funcionalizadas y Sintetizadas mediante Extracto de Planta (*Camellia sinensis*) sobre las Propiedades Fisicoquímicas y Mecánicas de la Dentina Desmineralizada

Resumen

Objetivos: El objetivo de esta investigación fue sintetizar y caracterizar nanopartículas de plata (AgNPs) funcionalizadas con quitosán y fluoruro sódico reducidas con té blanco (*Camellia Sinensis*, TB) y evaluar los efectos de la aplicación de las AgNPs en la composición química y las propiedades microestructurales y mecánicas de la dentina desmineralizada.

Métodos: Las TB_AgNPs se produjeron mediante la síntesis verde mediada por plantas y se caracterizaron mediante técnicas de espectroscopia infrarroja (ATR-FTIR), termogravimetría (TGA), difracción de rayos X (DRX) y microscopía electrónica (TEM/EDS) para determinar su composición molecular, contenido de materia orgánica, morfología cristalina, tamaño del cristalito y grado de agregación. Para ello, se utilizaron 40 molares asignados de manera aleatoria a dos grupos control: dentina sana (DS) y dentina desmineralizada (DD), y a tres grupos experimentales: TB_AgNPs, TB_NaF_AgNPs y TB_CHS_AgNPs. Las nanopartículas obtenidas se aplicaron respectivamente a los grupos experimentales, y se analizaron mediante ATR-FTIR, DRX, microscopía electrónica de barrido (MEB/EDS) para evaluar las características químicas, cristalográficas y microestructurales de la dentina. Además, se empleó una prueba de flexión en tres puntos para evaluar la respuesta mecánica de la dentina.

Resultados: Las TB_AgNPs mostraron grupos moleculares relacionados con diversos compuestos orgánicos, que actuaron potencialmente como agentes reductores y recubrimiento. Todas las AgNPs presentaron formas esféricas con tamaños de cristal de aproximadamente 20 nm. El efecto de la aplicación de las AgNPs sobre la dentina mostró un mayor grado de mineralización y tamaño de cristalito de hidroxipatito respecto al grupo de DD. Las imágenes de SEM revelaron diferentes grados de agregación y patrones de distribución de las TB_AgNPs en la superficie de dentina desmineralizada. La resistencia a la flexión de la dentina aumentó significativamente en todos los grupos de TB_AgNPs en comparación con los grupos control.

Conclusiones: La síntesis verde de nanopartículas de plata mediada por plantas funcionalizadas con quitosán y NaF se pudo realizar con éxito, caracterizándose sus

propiedades fisicoquímicas. La aplicación de TB_AgNPs mostró una capacidad remineralizadora y potencial fortalecimiento de la dentina desmineralizada.

5.1 Introducción

La caries dental es una enfermedad dinámica y multifactorial generada por biopelículas que provocan la desmineralización de los tejidos duros del diente (es decir, esmalte y dentina) debido a los ácidos producidos por las bacterias orales. Recientemente, el tratamiento de la caries se ha centrado en una filosofía mínimamente invasiva, integrando los conceptos de control de caries y una mínima intervención quirúrgica [11]. El tratamiento no quirúrgico implica el uso de estrategias que incluyen la remineralización quimioterapéutica de los tejidos (ganancia mineral neta en tejidos previamente desmineralizados). Sin embargo, a pesar de la continua evolución de los materiales dentales y de la implementación de métodos preventivos, la caries dental sigue siendo una enfermedad crónica prevalente en nuestra sociedad, provocando en última instancia la pérdida de dientes [1]. La caries es también una de las principales causas de fracaso de las restauraciones directas de resina compuesta [11]. El desarrollo de nuevos nanomateriales biocompatibles que puedan aplicarse para prevenir o tratar las lesiones de caries constituye un campo esencial para la innovación en la práctica odontológica.

Las excelentes propiedades antimicrobianas de las sales de plata han posibilitado su uso generalizado en diferentes aplicaciones médicas [1]. En el campo de la odontología, la plata es reconocida por sus propiedades de prevención y detención de la caries, tanto en dentición primaria como permanente, mediante la inhibición del crecimiento bacteriano [71,167], así como su utilización como limpiador de cavidades y desensibilizante de la dentina [87,93]. Debido a sus características y potenciales usos, varios materiales dentales, como aleaciones de amalgama, soluciones anticaries, cementos ionómero de vidrio modificados, han sido formulados para incorporar plata dentro de su composición [87,167].

La nanotecnología ha permitido la síntesis de nanopartículas de plata (AgNPs) con diferentes propiedades terapéuticas. Particularmente, las AgNPs son especialmente conocidas por su capacidad antimicrobiana [167]. Los iones de plata

actúan sobre la pared celular del peptidoglicano, lo que provoca cambios estructurales, un aumento de la permeabilidad de la membrana y finalmente, en consecuencia, la muerte de las células bacterianas. La incorporación de AgNPs tiene como objetivo reducir la colonización microbiana en materiales y superficies dentales, mejorando las condiciones de la salud bucodental. Las AgNPs se han aplicado en diferentes áreas de la Odontología, como en la endodoncia, prótesis dental, implantes y odontología restauradora [71,167]. Existen varios métodos para la síntesis de AgNPs que implican la reducción de los iones de plata (Ag^+) a plata metálica (Ag^0), este proceso se puede realizar empleando mecanismos físicos, químicos o biológicos [93]. La reducción química es el método más empleado, utilizando en este procedimiento varios reactivos para la reducción y estabilización de las nanopartículas [87]. Sin embargo, este proceso suele ser costoso, laborioso y utiliza reactivos tóxicos (por ejemplo, dodecil sódico y citrato sódico) lo que genera riesgos potenciales para la salud [94]. Para solucionar este problema, el método basado en química verde utiliza plantas, algas, bacterias y hongos para la síntesis de AgNPs, ajustándose perfectamente a los requisitos de las aplicaciones biomédicas [93,101]. Entre estos procedimientos, el uso de extractos de planta ha surgido como una estrategia prometedora debido a su simplicidad, seguridad, bajo coste, rápida reproducción y eficiencia [94].

Para sintetizar nanopartículas de plata se han empleado diferentes extractos vegetales de diversas especies (*Azadirachta indica*, *Thymus kotschyanus*, *Cyanthillium cinereum*) [101]. El té blanco (*Camellia sinensis*, TB) ha ganado popularidad y protagonismo debido a su mínimo procesamiento y sus numerosos beneficios para la salud [168]. Obtenido a partir de brotes y hojas jóvenes, el TB contiene altas concentraciones de catequinas, incluida la epigallocatequina-3-galato (EGCG), esta última conocida por sus propiedades antioxidantes, antimicrobianas, antidiabéticas, antiinflamatorias y preventivas contra el cáncer [169]. El EGCG es particularmente eficaz contra las bacterias orales, como *Streptococcus mutans* [170]. Por otra parte, el EGCG del TB también muestra una actividad inhibidora sobre las colagenasas que degradan la matriz orgánica, promoviendo la estabilidad del colágeno y mejorando

las propiedades mecánicas del diente [171]. Además, los hidroxilos fenólicos del EGCG aumentan el potencial del TB para reducir Ag^+ a Ag^0 [172].

El quitosán (CHS) es un biopolímero natural que ha despertado un gran interés en la última década por sus implicaciones biomédicas. Este compuesto, obtenido a partir de la desacetilación de la quitina, es biodegradable y biocompatible, y muestra una baja toxicidad en modelos *in vitro* e *in vivo* [173], por lo que resulta muy útil en diversas aplicaciones médicas debido a sus propiedades antibacterianas, antioxidantes, quelantes y biofarmacéuticas [164,173]. En odontología, el quitosán se ha investigado ampliamente para desarrollar biomateriales en las áreas de restauración, implantología, endodoncia y periodoncia [164]. Los materiales a base de quitosán pueden ser capaces de remineralizar y prevenir la desmineralización del esmalte, haciendo su uso prometedor para varios procedimientos clínicos dentales [174].

Por otro lado, los materiales dentales que contienen flúor son considerados como la terapia estándar para la remineralización de lesiones cariosas, siendo el principal componente en la formulación de diferentes productos utilizados para el tratamiento de lesiones de caries. El flúor puede incorporarse en la estructura cristalina del hidroxiapatito formando fluorapatito, adquiriendo una menor solubilidad y promoviendo así la remineralización de las estructuras dentales. Entre estos materiales dentales, el fluoruro sódico (NaF) es un componente activo altamente biodisponible, empleado ampliamente en dentífricos, colutorios y fluoración de agua.

Estas TB_AgNPs constituyen un material potencial para el tratamiento de las lesiones de caries dental, y la evaluación de su aplicación en dentina desmineralizada se considera necesaria para determinar su eficacia. En consecuencia, la presente investigación tuvo como objetivos (1) sintetizar y caracterizar fisicoquímicamente nanopartículas de plata funcionalizadas con quitosán/NaF reducidas con té blanco (*Camellia sinensis*) y (2) evaluar los efectos de la aplicación de las TB_AgNPs en dentina desmineralizada sobre su composición química, propiedades microestructurales y

mecánicas. La hipótesis nula fue que no sería posible funcionalizar las AgNPs con quitosan/NaF y que la aplicación de estas nanopartículas no afectaría a la dentina desmineralizada.

5.2 Materiales y Métodos

5.2.1 Síntesis de las nanopartículas de plata (AgNPs)

Las AgNPs se sintetizaron siguiendo el protocolo propuesto por Zargar *et. al.* [175]; para lo cual, 1 g de té blanco (*Camellia sinensis*) suministrado por Granadiet (lote N.º 224; Ogíjares, España) se añadió a 200 ml de agua *MilliQ* ultrapura desionizada (resistividad 18.2 M. Ω .cm, Millipore, Merck, Burlington, MA, EE.UU.), esta solución se calentó a 75 °C durante 1 h bajo una velocidad de agitación de 350 rpm. Posteriormente, el sobrenadante se filtró mediante vacío (WP6111560; Merck Millipore, Billerica, MA, EE.UU.) utilizando un papel de filtro N°3 (Ahlstrom, Estocolmo, Suecia). A continuación, se mezclaron 200 ml de nitrato de plata (AgNO_3) 0,1 M con 200 ml del extracto de té. La solución se mantuvo bajo una velocidad de agitación de 350 rpm durante 48 h. La formación de AgNPs con el té blanco (TB_AgNPs) se monitorizó y determinó mediante un cambio de color de amarillo a negro (relacionado con una precipitación cristalina). Finalmente, la solución obtenida se centrifugó y las NPs se lavaron con agua *MilliQ* mediante tres repeticiones antes de secarse en estufa durante 24 h a 37 °C. Los siguientes protocolos de funcionalización se realizaron con las TB_AgNPs sintetizadas:

- TB_AgNPs funcionalizadas con quitosan (TB_CHS_AgNPs): 50 mg de quitosan se diluyeron en una solución de 20 ml de ácido acético 0,1 M (CH_3COOH). Posteriormente, la preparación de quitosan se dejó gotear en 100 ml de solución de TB_AgNPs a temperatura ambiente bajo agitación durante 1 h [176].

- TB_AgNPs funcionalizadas con NaF (TB_NaF_AgNPs): se añadieron 0.0571 g de fluoruro sódico (NaF) a 100 ml de solución de TB_AgNPs a temperatura ambiente bajo agitación durante 24 h [177].

Una vez funcionalizadas las TB_AgNPs, ambas soluciones se centrifugaron y los precipitados se lavaron con agua *MilliQ* mediante tres repeticiones antes de secarse durante 24 h a 37 °C. Todos los reactivos químicos ($\geq 99,0\%$ de pureza) fueron suministrados por Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, EE.UU.).

5.2.2 Caracterización de las AgNPs

La caracterización química se realizó mediante espectroscopia infrarroja (ATR-FTIR: Jasco 6200 Inc., Easton, MD, EE.UU.) y análisis termogravimétrico (sistema TGA/DSC1; Schwarzenbach, Suiza) para determinar la composición molecular y el contenido de la materia orgánica (%MO) de las TB_AgNPs. Las propiedades cristalinas se determinaron mediante difracción de rayos X (DRX) utilizando un difractómetro X'Pert Pro (PANalytical, Países Bajos) y equipos de microscopía electrónica de transmisión (TEM: Carl Zeiss LIBRA 120 PLUS TEM, Alemania) y JEOL JEM-2100F (HRTEM: Tokio, Japón), para obtener el tamaño del cristalito, las dimensiones del cristal y el grado de agregación de las TB_AgNPs sintetizadas.

5.2.3 Preparación de las muestras de dentina

El presente estudio fue aprobado por el Comité de Investigación Humana y Animal (número de referencia #1896-2020) de la Universidad de Granada. Para esta investigación se utilizaron un total de 40 molares permanentes sin lesiones cariosas ni defectos estructurales en una solución de timol al 0,1%. Las raíces de los dientes se separaron de las coronas 2 mm por debajo de la unión cemento-esmalte utilizando una sierra de baja velocidad Isomet 11/1180 (Buehler, Lake Bluff, IL, EE.UU.) con un disco de diamante 456CA (Struers, Copenhague, Dinamarca) bajo abundante irrigación. A continuación, se realizó secciones transversales de la parte media de

la corona para obtener discos dentales (9 mm de diámetro x 1 mm de grosor). Posteriormente, se obtuvieron 4 barras de cada disco, dando lugar a 160 especímenes. El esmalte correspondiente a los extremos de las barras fue eliminado mediante pulido con papeles de carburo de silicio de 600 granos. Los especímenes (barras de dentina) se enjuagaron y limpiaron con ultrasonido durante 30 min para eliminar los posibles residuos. Seguidamente, todas las muestras fueron examinadas cuidadosamente al microscopio óptico para confirmar la ausencia de esmalte, microfisuras dentinarias u otras imperfecciones.

Los especímenes se dividieron aleatoriamente en dos grupos control: dentina sana (DS; n=32) y dentina desmineralizada (DD; n=32). Los especímenes correspondientes a la DS se almacenaron en agua destilada a temperatura ambiente. Los grupos experimentales se dividieron aleatoriamente según las diferentes aplicaciones de AgNPs: TB_AgNPs, TB_CHS_AgNPs y TB_NaF_AgNPs (n=32; por grupo). La dentina desmineralizada se simuló mediante el ciclaje de pH a partir del protocolo modificado propuesto por Marquezan *et. al.*[21]. Todos los especímenes se sumergieron en 1 ml de una solución desmineralizante con composición: 2,2 mM CaCl₂, 2,2 mM NaH₂PO₄ y 50 mM de ácido acético, ajustado a un pH=4,8 durante 8 h. Posteriormente, los especímenes se introdujeron en 1 ml de una solución remineralizante con composición: 1. 5 mM CaCl₂, 0,9 mM NaH₂PO₄, y 0,15 M KCl, ajustada a un pH=7,0 durante 16 h. Los reactivos químicos para la preparación de la solución fueron suministrados por Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EE.UU. (pureza ≥99,0%). Cada espécimen fue sometido a ciclaje durante 14 días, renovándose las soluciones diariamente. Todo el procedimiento de ciclaje de pH se realizó a temperatura ambiente sin agitación de las soluciones. Tras el proceso de ciclaje de pH, los especímenes correspondientes al grupo de DD se almacenaron en agua destilada. Finalmente, las barras de dentina correspondientes a los grupos experimentales se trataron con las diferentes TB_AgNPs durante 5 min con un 0,5% v/p en agua de desionizada ultrapura bajo agitación continua y después se lavaron con agua destilada durante 1 min. Los especímenes se almacenaron en agua destilada hasta su posterior análisis.

5.2.4 Caracterización de las muestras de dentina tratadas con AgNPs

5.2.4.1 Análisis mediante espectroscopía infrarroja mediante transformada de Fourier-Reflectancia total atenuada (ATR-FTIR)

Los especímenes (n=15 por grupo) se analizaron utilizando un espectrómetro FTIR JASCO 6200 (Jasco Inc., Easton, MD, EE.UU.) equipado con un accesorio ATR de punta de diamante (ATR Pro ONE, JASCO Inc., Easton, MD, EE.UU.). Los espectros se registraron en modo absorbancia con una resolución de 2 cm^{-1} en 64 acumulaciones de barrido utilizando un rango espectral de $400\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$. La superposición de los picos se resolvió mediante el método de la segunda derivada dentro de cada banda considerada utilizando el software de ajuste de curvas PeakFit v4.12 (Systat, San José, CA, EE.UU.). El grado de suavizado se fijó en 25%, y se empleó la función mixta Gaussiana-Lorentziana para el ajuste del área del pico. El ajuste de la curva se aceptó cuando r^2 alcanzó valores superiores a 0,95. A partir de las medidas del área de los picos, se calcularon los siguientes parámetros: (1) Grado de mineralización (relación área de banda: $\nu_1, \nu_3\text{ PO}_4^{3-}$ /Amida I): cantidad relativa de mineral de fosfato respecto a la matriz orgánica (banda 1640 cm^{-1}) [120] y (2) índice de cristalinidad (IC): relación entre las áreas de las subbandas a 1030 cm^{-1} (fosfatos relacionados con apatito altamente cristalino) y 1020 cm^{-1} (fosfatos relacionados con apatito pobremente cristalino) dentro de la región de las bandas $\nu_1, \nu_3\text{ PO}_4^{3-}$ [121].

5.2.4.2 Análisis mediante Difracción de Rayos X (DRX)

Para estos análisis se empleó una muestra de conveniencia por grupo obteniéndose patrones de difracción bidimensional de rayos X (2D-XRD) mediante un difractómetro de rayos X (Bruker D8 DISCOVER, Billerica, MA, EE.UU.) equipado con un detector de área (DECTRIS PILATUS 3 100K-A). Las condiciones para los análisis de DRX fueron: radiación de la fuente $\text{Cu K}\alpha$ ($\lambda=1,5418\text{ \AA}$) a 50 kV y 30 mA, con haz de emisión con sistema de colimación de 0,5 mm de diámetro. Los patrones 2D-XRD se registraron en un rango angular de barrido 2Theta entre 20° a 60° , considerando 19

pasos y 40 s/paso. Las intensidades concentradas en cada uno de los arcos dentro de los anillos de difracción de Debye (correspondientes a líneas de difracción/espacios d específicos) se integraron para obtener un barrido unidimensional (patrón 2Theta). El tamaño del cristalito (t) de los cristales de hidroxiapatito (HAp) se determinó midiendo la anchura a media altura (FWHM) del pico de difracción en la posición 2theta 25, 9° (línea de reflexión 002, correspondiente a la dirección del eje c). Para el cálculo de t se empleó la ecuación de Debye-Scherrer:

$$t_{(002)} = \frac{K\lambda}{\beta \cos\theta}$$

Donde t es el tamaño medio del cristalito (expresado en nm), λ corresponde a la longitud de onda de la fuente de rayos X, K es la constante de Scherrer (considerada $K=0,89$), y β está relacionada con la FWHM del ensanchamiento de la línea para la línea de difracción (002).

5.2.4.3 Análisis mediante microscopía electrónica de barrido (SEM)

Para estudiar la distribución de las TB_AgNPs en la superficie de la dentina se seleccionó un espécimen aleatorio por grupo. Estos se fijaron en glutaraldehído al 2,5% durante 12 h a 4 °C. A continuación, se sumergieron en una solución de PBS durante 1 h (ciclos de 20 min) y se enjuagaron repetidamente. Posteriormente, los especímenes se deshidrataron en series ascendentes de etanol (50%, 70%, 90% y 96%). Por último, las muestras se montaron en soportes de aluminio y se recubrieron con carbono utilizando un equipo de pulverización iónica (evaporador Hitachi UHS). Para examinar todos los especímenes se utilizó un microscopio electrónico de barrido (JSM-12 6610LV, JEOL, Japón) con una tensión de aceleración de 10 kV y 10 mA.

5.2.4.4 Ensayo Mecánico – Resistencia a la flexión

Para evaluar las propiedades de flexión de la dentina 15 barritas de cada grupo se sometieron a un ensayo mecánico. Para ello, se empleó una máquina-universal (modelo Instron 3345, Instron, Canton, MA, EE.UU.) mediante un ensayo de flexión de tres de puntos utilizando una célula de carga de 500 N sobre un soporte de dos puntos, con una distancia de separación de 4,0 mm de longitud entre puntos. El ensayo se realizó a una velocidad de carga de 0,5 mm/min hasta la fractura de las muestras de dentina.

5.2.3 Análisis Estadístico

La estimación del tamaño de la muestra y el análisis de potencia se realizaron con el programa informático G*Power (ver. 3.1.9.7; Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Düsseldorf, Alemania). La homogeneidad de las varianzas y la normalidad de la distribución de los parámetros analizados se comprobaron mediante las pruebas de Levene y Shapiro-Wilk, respectivamente. Los parámetros de ATR-FTIR y de resistencia a la flexión no seguían una distribución normal; para estos análisis se emplearon pruebas estadísticas no paramétricas. Para ello, se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis, seguida de un análisis intergrupos con la prueba U de Mann-Whitney. Se estableció un nivel de significancia de $p < 0,05$. Los datos se procesaron con el programa estadístico SPSS (ver. 22, IBM, Armonk, NY, EE.UU.).

5.3 Resultados

5.3.1 Caracterización físico-química de las AgNPs

La composición química de las muestras se evaluó mediante ATR-FTIR para determinar los componentes moleculares presentes en las TB_AgNPs, y se realizó un análisis de termogravimetría para obtener el contenido de materia orgánica. Los espectros de ATR-FTIR de las diferentes AgNPs se muestran en la Fig.18. Los

espectros de TB_AgNPs (línea verde) y TB_NaF_AgNPs (línea azul) mostraron dos bandas estrechas en 3666-2984 cm^{-1} (asociada a la vibración de estrechamiento O-H, asignada al grupo -OH de polioles como las catequinas) y 2387-2189 cm^{-1} (debido al estiramiento C-H, hidrocarburos alifáticos) [175]. Además, todas las muestras de TB_AgNPs mostraron varios picos en las posiciones en 1694 cm^{-1} y 1279 cm^{-1} (estiramiento C=C, grupos alqueno), 1527 cm^{-1} y 907 cm^{-1} (vibraciones de estiramiento C-N, polifenoles y aminas alifáticas), 1027 cm^{-1} (estiramiento C=O, cetonas y quinonas), y 809 cm^{-1} (estiramiento C-O-C, ácidos carboxílicos y ésteres) [93]. Estas asignaciones están relacionadas con los grupos moleculares presentes en los componentes orgánicos del té blanco utilizado durante la síntesis de las AgNPs. Por otro lado, el espectro de TB_CHS_AgNPs (línea roja) mostró un pico a 680 cm^{-1} , revelando la presencia de chitosan en la funcionalización de las AgNPs [178].

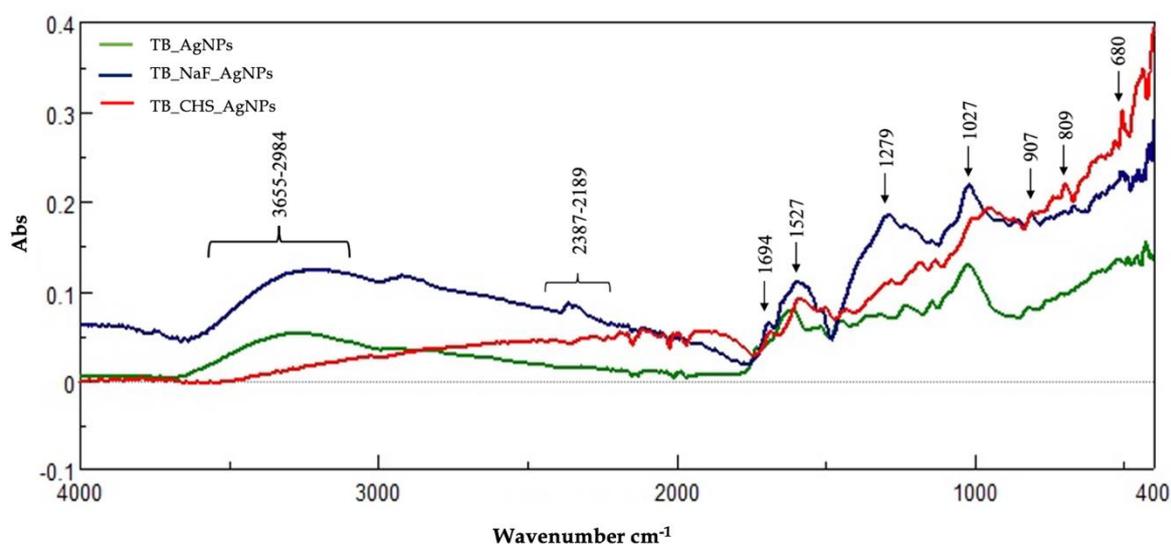


Fig.18 Espectros representativos de ATR-FTIR de las diferentes AgNPs reducidas con té blanco y funcionalizadas con chitosan y NaF.

Los principales resultados obtenidos mediante los análisis de termogravimetría (TGA) de las diferentes TB_AgNPs, calentadas desde 25 °C hasta 600 °C utilizando una velocidad de calentamiento de 10 °C/min bajo atmósfera de nitrógeno, se muestran en la tabla 9. Todas las TB_AgNPs mostraron porcentajes de pérdida de peso similares entre 25 °C - 130 °C debido a la absorción de agua, entre 130 °C - 150 °C asignado a la degradación de los polifenoles de los compuestos fitoquímicos de las

TB_AgNPs y la pérdida hasta 600 °C debido a la degradación térmica de los componentes aromáticos más resistentes del TB. Los datos de las mediciones TGA revelaron que TB_AgNPs y TB_NaF_AgNPs mostraban un contenido orgánico similar (considerando la pérdida de masa hasta 600°C) con aproximadamente un 18%, mientras que TB_CHS_AgNPs alcanzaban el 24%.

Tabla 9. Contenido de materia orgánica (M.O.%) obtenido del análisis TGA para las diferentes TB_AgNPs

AgNPs	M.O. (%)
TB_AgNPs	18,91 ± 1,21
TB_NaF_AgNPs	18,98 ± 0,62
TB_CHS_AgNPs	24,63 ± 0,12

La identificación de las fases (nanopartículas de plata) y sus propiedades cristalinas se determinaron mediante el análisis de DRX. Las diferentes TB_AgNPs mostraron picos de DRX a 38,2°, 44,3°, 64,5°, 77,5° y 81,6° (valores 2 θ) que corresponden a planos cúbicos centrados en las caras de Ag⁰ relacionados con valores específicos (hkl) - planos (111), (200), (220), (311) y (222), respectivamente (señalados en la Fig. 19). Estos resultados indicaron la formación de cristales coloidales de plata con una estructura cúbica en todos los grupos de NPs. El patrón de DRX también reveló un pico de menor intensidad con un perfil ancho a 32,3° correspondiente a compuestos de AgNO₃ no completamente reducidos, aunque en cantidades insignificantes. El refinamiento de Rietveld de los patrones de DRX mostraron los siguientes parámetros de celda (considerando el grupo espacial Fm $\bar{3}$ m: archivo JCPDS n° 04-0783): a = 4,0845(1) Å para las TB_AgNPs; a = 4,0841(1) Å para las TB_CHS_AgNPs; y a = 4,0842(3) Å para las TB_NaF_AgNPs. Además, se empleó la ecuación de Debye-Scherrer para obtener los tamaños de cristalito (dominios cristalinos coherentes) de todas las nanopartículas: 19,10 nm, 20,57 nm y 18,49 nm, respectivamente.

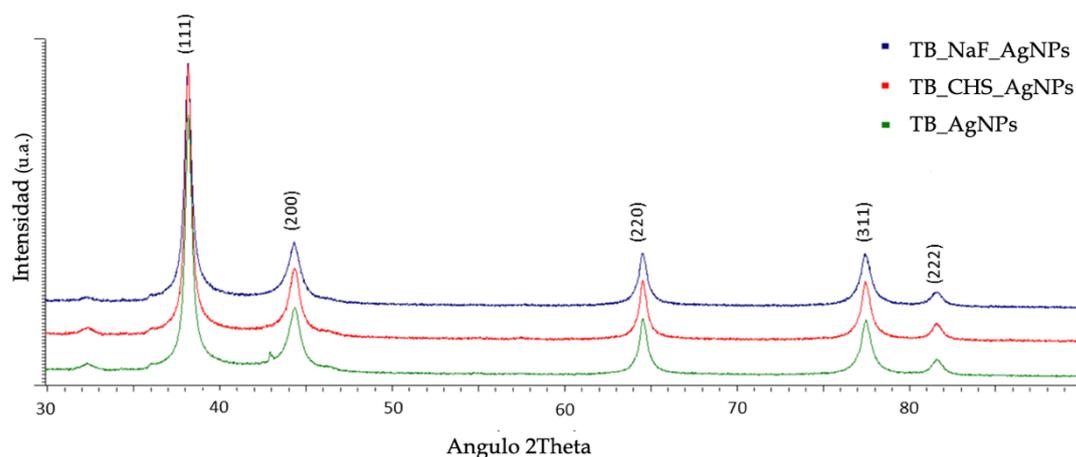


Fig. 19 Patrones representativos de difracción de rayos X (DRX) de las diferentes AgNPs reducidas con té blanco (TB) funcionalizadas con chitosan (CHS) y NaF. Entre paréntesis se indican los índices de Miller correspondientes a cada línea de difracción (estructura cúbica).

Diferentes observaciones obtenidas mediante TEM permitieron determinar el tamaño y la morfología de las distintas AgNPs, así como su estado de agregación y posible presencia de recubrimientos orgánicos. La Fig. 20 muestra imágenes de TEM en diferente resolución de las AgNPs sintetizadas. Las nanopartículas presentaron morfologías cristalinas esféricas en todos los grupos, mostrando un bajo porcentaje de agregación principalmente en las TB_AgNPs y en TB_CHS_AgNPs comparadas con las TB_NaF_AgNPs (Fig. 20. A-D vs G). Además, todas las AgNPs estaban envueltas en un recubrimiento (aspecto de color gris) debido a la presencia de compuestos fitoquímicos como carbohidratos, flavonoides, glucósidos, compuestos fenólicos, proteínas, saponinas y taninos presentes en el té blanco. Distintas imágenes de TEM de mayor resolución se utilizaron (Fig. 20 B-E-H) para obtener los promedios del tamaño de los cristales de las NPs: ~21 nm (TB_AgNPs), ~20 nm (TB_CHS_AgNPs), and ~19 nm (TB_NaF_AgNPs), que concuerdan con los tamaños de cristalito obtenidos mediante DRX. Los análisis elementales EDS de las anteriores imágenes se muestran en la Fig. 20 C-F-I, indicando la composición representativa de Ag (posición del pico de 3 keV en el espectro).

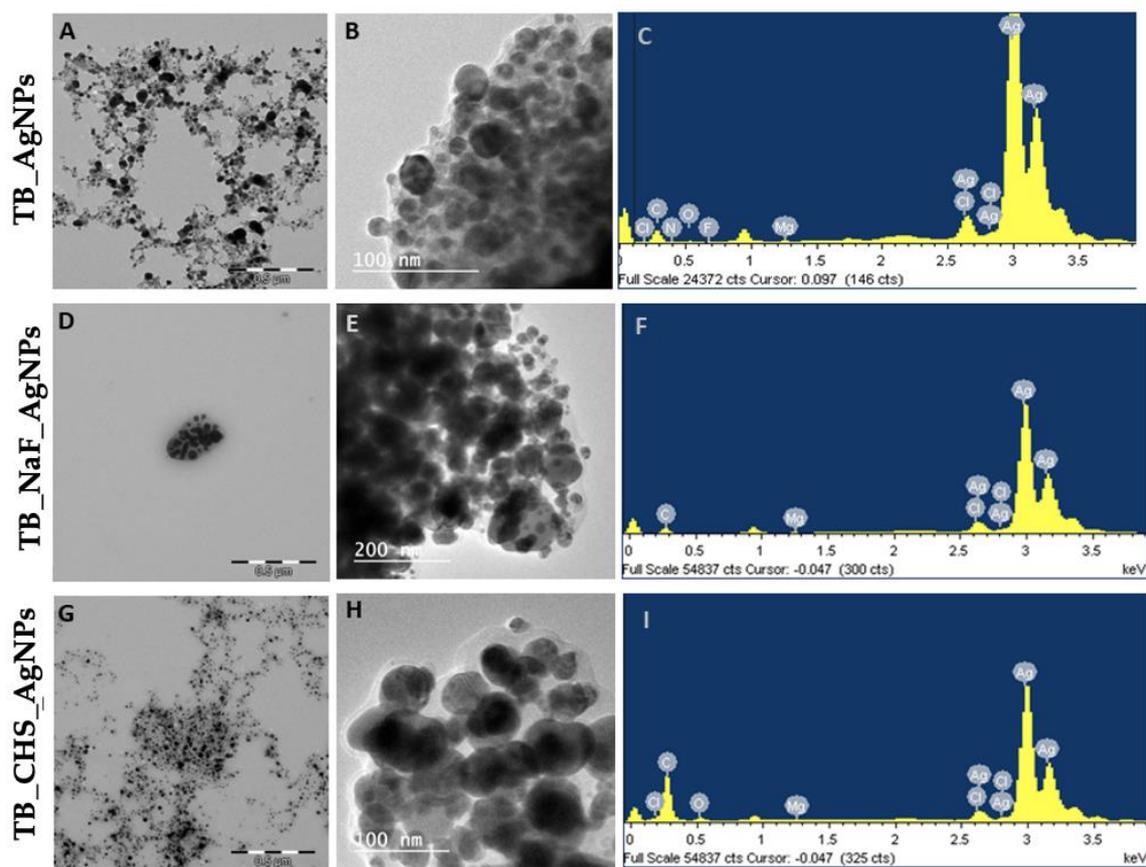


Fig. 20 Imágenes representativas de TEM de las NPs a diferente resolución: TB_AgNPs, (A-B), TB_CHS_AgNPs, (D-E) y TB_NaF_AgNPs (G-H). Los espectros representan los análisis elementales EDS para cada TB_AgNPs sintetizada (C-F-I), indicando la composición de Ag (posición del pico 3 keV).

5.3.2 Caracterización de la aplicación de las TB_AgNPs

5.3.2.1 Análisis físico-químico de la dentina tratada con las TB_AgNPs

La tabla 10 presenta la composición química de las AgNPs determinada mediante el análisis espectrométrico de ATR-FTIR: Grado de mineralización e Índice de Cristalinidad (IC). Con respecto a los grupos control, el grado de mineralización disminuyó en la dentina desmineralizada (DD) en comparación con la dentina sana (DS). En los grupos experimentales de las diferentes TB_AgNPs el grado de mineralización aumentó en la dentina alcanzando valores comparables con la DS. Entre todos los grupos experimentales, las TB_NaF_AgNPs obtuvieron los mayores

valores de grado de mineralización. Por otro lado, el parámetro de IC aumentó para DD con respecto a la DS. Además, tras la aplicación de las TB_AgNPs se observó que el IC mostró valores similares entre los grupos, aunque estos fueron significativamente superiores en comparación con el grupo de DS e inferiores en relación con la DD. Los valores del tamaño de cristalito (d) del hidroxiapatito (HAp) tras el tratamiento con las diferentes AgNPs sintetizadas se resumen en la Tabla 10. Estos resultados indicaron una disminución en el tamaño de cristalito (es decir, dominios cristalinos del HAp) después del proceso de ciclaje de pH (dentina desmineralizada) debido a su disolución durante el mismo. Sin embargo, tras la aplicación de las diferentes TB_AgNPs sobre la dentina desmineralizada, se observó un aumento de los valores del tamaño de cristalito en todos los grupos, alcanzando valores similares a los de la DS.

Tabla 10. Parámetros de composición y cristalinidad de los grupos control y experimentales obtenidos mediante análisis de ATR-FTIR: Grado de mineralización e Índice de Cristalinidad (IC). Valores del tamaño de cristalito (t) de los cristales de hidroxiapatito (HAp) de las muestras de dentina obtenidos mediante DRX.

Grupos Experimentales	Grado de mineralización	IC	t (nm)
Dentina Sana (DS)	7,32(0,66) ^a	0,48(0,05) ^a	21,00
Dentina Desmineralizada (DD)	3,85(0,56) ^b	1,84(0,35) ^b	12,60
TB_AgNPs	6,43(0,46) ^a	0,75(0,03) ^c	22,33
TB_NaF_AgNPs	8,83(0,73) ^c	0,79(0,03) ^c	21,66
TB_CHS_AgNPs	6,42(0,63) ^a	0,85(0,07) ^c	22,66

Los valores se expresan en media (desviación estándar). Diferentes letras indican diferencias entre los grupos.

5.3.2.2 Distribución de las AgNPs en la superficie de la dentina

Imágenes representativas de SEM de la dentina desmineralizada tratada con las diferentes AgNPs se muestran en la Fig. 21-A partir de estas imágenes, se observaron AgNPs esféricas (puntos brillantes) cubriendo las superficies de la dentina

y rellenando parcialmente los túbulos dentinarios. Los grupos de TB_AgNPs y TB_NaF_AgNPs (Fig. 21 A y C, respectivamente) mostraron cierto grado de agregación y una distribución heterogénea en las superficies, tapando las aberturas de los túbulos dentinarios. Por otro lado, las TB_CHS_AgNPs (Fig. 21 B) mostraron una distribución más homogénea con un menor grado de agregación en la superficie de la dentina desmineralizada.

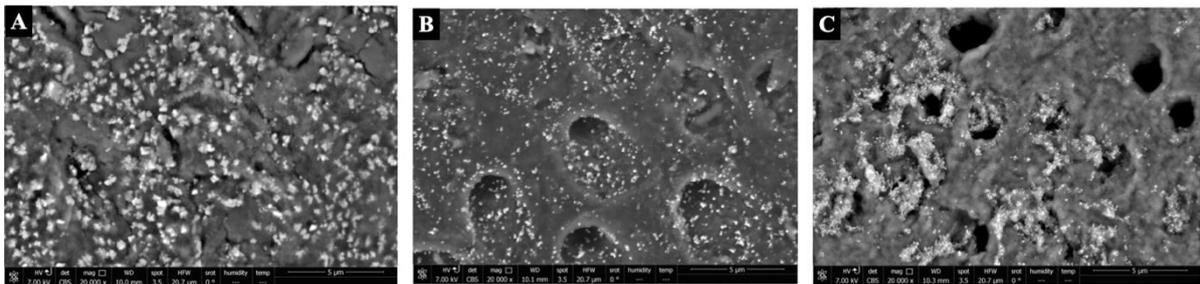


Fig. 21 Imágenes representativas de SEM que muestran la distribución de las AgNPs en la dentina desmineralizada: (A) TB_AgNPs, (B) TB_CHS_AgNPs, (C) TB_NaF_AgNPs.

5.3.2.3 Respuesta mecánica de la dentina tras la aplicación de las diferentes TB_AgNPs

La resistencia a la flexión de la dentina se obtuvo mediante el ensayo de flexión en tres puntos mostrando diferencias significativas en las propiedades mecánicas de los diferentes grupos experimentales (Fig. 22). El grupo de DD presentó los valores de resistencia mecánica menores en comparación con el grupo de DS. Los grupos TB_AgNPs mostraron valores significativamente mayores que los grupos de DD y DS. Sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de TB_AgNPs.

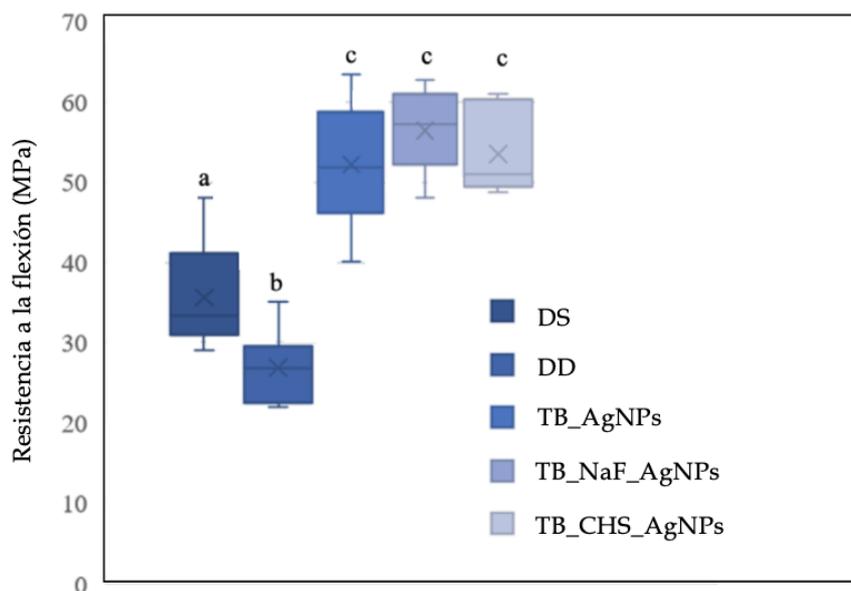


Fig. 22 Resistencia a la flexión de las muestras de dentina de los grupos de control (SD y DD) y de los grupos TB_AgNPs determinado mediante ensayo mecánico de flexión en tres puntos. Letras distintas indican diferencias significativas entre grupos ($p < 0,05$)

5.4 Discusión

La síntesis de AgNPs mediante química verde posee un gran potencial para su uso en aplicaciones dentales, ya que cumple los requisitos de toxicidad y biocompatibilidad en comparación con otros materiales utilizados en tratamientos clínicos. En este estudio, se sintetizaron con éxito AgNPs reducidas con extracto de té blanco (*Camellia sinensis*) y funcionalizadas con chitosan y NaF, aplicándose a dentina desmineralizada para evaluar sus efectos reparativos sobre el sustrato. La caracterización de las propiedades fisicoquímicas de las TB_AgNPs mostró diversas propiedades cristalinas, grado de agregación y contenido de MO relacionados con los diferentes componentes orgánicos presentes durante los procedimientos de síntesis verde y funcionalización. Los resultados demostraron que la aplicación de las diferentes TB_AgNPs en dentina desmineralizada aumentó significativamente el grado de mineralización y el tamaño de cristalito del HAp, mejorando sus propiedades mecánicas. Por lo tanto, nuestra hipótesis debe de ser rechazada. Estas TB_AgNPs obtenidas a través de extractos vegetales pueden ser una alternativa para

desarrollar innovadores productos como agentes antimicrobianos, antifúngicos y remineralizantes que podrían ser incorporados en diferentes materiales (por ejemplo, irrigantes de conductos radiculares, colutorios, dentífricos, composites, adhesivos o materiales a base de resinas), mejorando así la práctica odontológica convencional.

La química verde es una alternativa a los métodos químicos y físicos para sintetizar nanopartículas de plata empleando compuestos orgánicos como agentes estabilizadores y reductores [101]. El uso de extractos vegetales para sintetizar nanopartículas metálicas ha mostrado diversas ventajas, como la sencillez del procedimiento, el bajo coste y la ausencia del uso de sustancias tóxicas [95]. Para producir AgNPs con características específicas se han empleado diferentes partes de plantas (hojas, flores, raíces, etc.) [87]. En nuestra investigación, se eligió el té blanco (*Camellia sinensis*) por su alto contenido en polifenoles, que pueden actuar como agentes reductores y de recubrimiento [93]. Durante la precipitación, la reducción de Ag^+ a Ag^0 se produjo inmediatamente después de la disolución de AgNO_3 en el extracto de té blanco. El posible mecanismo de reducción de Ag^+ implica la ionización de los polifenoles, lo que resulta en la reducción de los iones de Ag a medida que estos polifenoles del té se oxidan a quinona [93]. A nivel experimental, el proceso de reducción que conduce a la formación de las TB_AgNPs se reflejó en el cambio de color de la suspensión de amarillo a marrón [175]. Nuestros resultados demostraron que el extracto de té blanco actuó eficazmente como agente reductor y estabilizador de las diferentes TB_AgNPs sintetizadas, mostrando un tamaño esférico medio de aproximadamente 20 nm. Investigaciones previas han empleado diferentes extractos de plantas (*v.gr.*, *Aloe vera*, *Drosera itataee*, *Ephedra procera*) produciendo partículas de tamaños y morfologías similares a las obtenidas en el presente estudio [101]. Además, las tres TB_AgNPs presentaban un característico recubrimiento gris del núcleo (Fig. 20), atribuido a la presencia del contenido orgánico derivado de los procesos de síntesis mediante el té blanco [175]. La presencia de estos compuestos orgánicos (es decir, taninos, polifenoles y flavonoides) en todas las nanopartículas de plata también se confirmó mediante la identificación de sus grupos moleculares específicos (observados en los resultados ATR-FTIR) [93,168]. Por otro lado, las TB_CHS_AgNPs

mostraron un pico de absorción característico en el espectro IR (posición a 616 cm^{-1}), evidenciando la interacción del CHS con las nanopartículas durante su funcionalización [178,179]. El contenido orgánico determinado por análisis termogravimétrico corroboró la presencia de estos componentes en las soluciones TB [180], siendo ligeramente superior con la incorporación del CHS. Asimismo, la identificación cristalina de todas las TB_AgNPs (Fig. 19) corresponden a una estructura cúbica centrada en las caras (FCC) de Ag^0 [98], presentando valores de tamaño cristalino similares (aproximadamente $\sim 22\text{ nm}$, relacionados con los dominios cristalinos medios). En general, estos resultados demostraron la formación de una cristalización homogénea monofásica de Ag con características composicionales y cristalinas controladas por la capacidad reductora del extracto de té blanco durante la síntesis de nanopartículas.

La fase inicial de la caries se manifiesta por una desmineralización subsuperficial del esmalte, caracterizada por una alteración del contenido mineral (es decir, disolución de cristales de hidroxiapatito). Posteriormente, a medida que la lesión progresa hacia la dentina, las fibras de colágeno quedan expuestas y progresa su degradación. El proceso de alteración mineral causado por la caries provoca una modificación de la composición estructural y química del tejido dental, con la consecuente alteración de sus propiedades mecánicas. El proceso de caries es el resultado de múltiples y continuos ciclos de desmineralización y remineralización [181]. En nuestro estudio se observó una diferencia significativa en la cantidad relativa de fosfato mineral respecto a la matriz orgánica (grado de mineralización, análisis ATR-FTIR) en el grupo DD, lo que indica que la desmineralización se produjo con éxito mediante el método ciclaje de pH [22,151]. La aplicación de las TB_AgNPs provocó un aumento significativo del grado de mineralización en comparación con el grupo DD. Estos efectos pueden atribuirse parcialmente a la capacidad remineralizadora de los iones fluoruro presentes en la composición del extracto de té blanco ($3,2\text{ mg/ kg}$ a 400 mg/kg por peso en muestras secas) [182]. Además, la presencia de complejos de Ca procedentes de los derivados carboxílicos/grupos reactivos de los polifenoles vegetales con un potencial efecto quelante pueden

reaccionar con grupos fosfato para iniciar la formación de HAp [183]. Asimismo, la acción estabilizadora sobre la red de colágeno combinada con la incorporación de biomoléculas procedentes de los compuestos orgánicos del TB puede promover igualmente la remineralización de la dentina [184]. Por otro lado, se ha demostrado que el quitosan induce una deposición significativa de CaP en dentina desmineralizada al promover la nucleación cristalina [177]. En nuestros resultados, la funcionalización con NaF de las nanopartículas mostró los valores más altos de grado de mineralización, incluso superiores a los de DS. El flúor es el tratamiento *gold standard* para la remineralización en odontología; se ha demostrado que inhibe la desmineralización de los cristales de hidroxiapatito [185]. El IC obtenido mediante ATR_FTIR, refleja la relación de la disolución en los dominios no apatíticos, menos cristalinos, respecto a los dominios apatíticos, de mayor cristalinidad, tal y como se ha descrito previamente al evaluar los cambios ocurridos durante el ciclaje de pH [183]. En los grupos de aplicación de TB_AgNPs, se observó una incorporación relativa de fosfatos con diferentes grados de cristalinidad a nivel molecular, aumentando los valores del IC en comparación con la DS. Por otra parte, los resultados de DRX mostraron un aumento en el tamaño de cristalito de HAp de los grupos experimentales de TB_AgNPs, alcanzando valores similares a los observados para DS. Este efecto sobre la perfección cristalina puede deberse a la capacidad de los iones Ag^+ para modificar el entorno cristalino del HAp, ocupando una posición dentro de la red o bien una posición intersticial dependiendo de la cantidad de Ag^+ incorporada [186]. Igualmente, la alteración del tamaño de cristalito puede deberse a procesos mediados por la acción iónica de las sustancias orgánicas del té blanco, tal y como se ha comentado anteriormente.

La aplicación de las TB_AgNPs sobre la dentina desmineralizada evidenció diferentes patrones de distribución y relleno dentro de los túbulos dentinarios relacionados con el grado de agregación de las nanopartículas en la superficie de la dentina. En este sentido, los extractos de plantas han demostrado controlar la morfología y superar el problema de la aglomeración durante la síntesis de una gran variedad de partículas [183,187]. El efecto de la aplicación de las TB_AgNPs sobre las

propiedades fisicoquímicas y microestructurales de la superficie de dentina dio lugar a una modificación de la respuesta mecánica de la dentina desmineralizada. Estos cambios produjeron propiedades mecánicas comparables a las de la dentina sana e indicaron una remineralización funcional de la estructura dental. En concreto, nuestros resultados mecánicos revelaron un aumento significativo de la resistencia a la flexión de la dentina tratada con las diferentes TB_AgNPs en comparación con la DD e incluso superando los valores de DS. Este efecto sobre la resistencia de la dentina está relacionado con el aumento del grado de mineralización y de las características cristalinas del HAp combinado con una posible modificación en las propiedades de la matriz de colágeno de la estructura dental. La matriz de colágeno influyó en las características estructurales del apatito a escala atómica, controlando el tamaño y la distribución dimensional a mayor escala en los tejidos mineralizados [156]. Estudios anteriores han sugerido que la combinación del colágeno con las AgNPs conduce a la formación de un agregado compacto, produciendo principalmente modificaciones en los diferentes tipos de proteína secundaria (por ejemplo, la α -hélice y la β -hoja) [185]. Por otra parte, los compuestos fenólicos presentes en el té verde (es decir, EGG, EGC, ECG, EG) son agentes naturales de reticulación del colágeno capaces de mejorar las propiedades mecánicas de la dentina, así como de reducir su biodegradabilidad por las metaloproteinasas derivadas del hospedador [168]. Por otra parte, la capacidad del NaF para remineralizar los tejidos duros del diente está ampliamente demostrada [170,188]. También se ha probado que el quitosán puede aumentar el número de enlaces cruzados entre las fibras de colágeno y neutralizar los MTTs de la dentina [189]. En general, la respuesta mecánica de las muestras de dentina sometidas a la aplicación de las diferentes TB_AgNPs se vio potenciada por los efectos sobre la matriz orgánica por parte de los diferentes compuestos naturales presentes tanto en el té blanco como en la funcionalización con quitosán, así como el aumento de la mineralización de la dentina por los diferentes procesos de formación y alteración cristalina descritos anteriormente.

El presente estudio proporciona un material alternativo para la remineralización de la dentina utilizando compuestos ecológicos, biodegradables, no

tóxicos y naturales obtenidos del té blanco para la precipitación de AgNPs. La aplicación de estas TB_AgNPs impide la formación de capas negras de cloruro de plata en la superficie de la dentina, evitando así el efecto antiestético de los productos dentales que contienen nitrato de plata (por ejemplo, fluoruro diamino de plata) [172,189,190]. Estudios detallados para la evaluación de la integración e interacción de las TB_AgNPs con otros materiales se plantean necesarios con objeto de determinar su uso habitual en la práctica odontológica. Por último, estas TB_AgNPs y su funcionalización podrían utilizarse no sólo en odontología, sino también en diferentes campos de la biomedicina o como componente de diferentes tipos de medicamentos.

5.5 Conclusiones

La síntesis verde de AgNPs mediada por extractos de plantas ha surgido como una estrategia prometedora debido a su simplicidad, seguridad, bajo coste, rápida reacción y eficiencia. Las AgNPs obtenidas utilizando té blanco y funcionalizadas con quitosan y NaF produjeron nanopartículas esféricas con un tamaño de cristal medio de ~20 nm y diferentes grados de agregación. La aplicación de las TB_AgNPs sobre dentina desmineralizada produjo un aumento del grado de mineralización y un incremento del tamaño cristalino. La respuesta mecánica de la dentina con la aplicación de TB_AgNPs aumentó con respecto a los grupos sanos y desmineralizados.

Capítulo 6 |
Conclusiones

Conclusiones

- 1.** La aplicación de los productos comerciales de SDF empleados en esta investigación produjo la formación de diferentes fases cristalinas de sales de plata así como diversos efectos físico-químicos en la dentina desmineralizada. La relación mineral:matriz orgánica y el tamaño de cristalito de los cristales de apatito de la dentina desmineralizada incrementó significativamente en todos los grupos experimentales. Por otra parte, la aplicación del SDF generó un efecto negativo sobre la fuerza adhesiva (evaluada mediante ensayos de microtensión) de los sistemas adhesivos de grabado-lavado y autograbado. La restauración inmediata de cavidades tratadas con agentes de SDF no es recomendable.
- 2.** El fluoruro diamino de plata y el fluoruro sódico mantienen su capacidad remineralizadora en la superficie de la dentina bajo ataque ácido (i.e. ciclaje de pH). En estas condiciones, estos materiales son capaces de precipitar diferentes sales cristalinas, cuya formación se asocia a un aumento del contenido mineral/orgánico de la dentina. Estos efectos produjeron una mejora de las propiedades mecánicas (respuesta a resistencia a la flexión) de la dentina desmineralizada.
- 3.** La síntesis de AgNPs mediante química verde mediada por extractos de planta (*en particular, Camellia sinensis*) y funcionalizadas con quitosan y NaF produjo nanopartículas con morfología esférica con un tamaño de cristal medio de ~20 nm y diferentes grados de agregación en función del proceso de síntesis.
- 4.** La aplicación de las TB_AgNPs sintetizadas sobre dentina desmineralizada resultó en un aumento del grado de mineralización e incremento del tamaño de cristalito del apatito. La respuesta mecánica (resistencia a la flexión) de la dentina tras la aplicación de TB_AgNPs aumentó significativamente con respecto a los grupos sanos y desmineralizados.

Conclusions

- 1.** The application of the commercial SDF products used in this investigation resulted in the formation of different crystalline phases of silver salts as well as various physicochemical effects in the demineralized dentine. The mineral:organic matrix ratio and the crystallite size of the apatite crystals in the demineralized dentine increased significantly in all experimental groups. On the other hand, the application of SDF negatively affected the adhesive bond strength (assessed by microtensile tests) of etchant and self-etch adhesive systems. Immediate restoration of cavities treated with SDF agents is not recommended.
- 2.** Silver diamine fluoride and sodium fluoride maintain their remineralizing capacity on the dentine surface under acid attack (i.e., pH cycling). In these conditions, the materials can precipitate different crystalline salts, the formation of which is associated with an increase in the mineral/organic content of the dentine. These effects improved the demineralized dentine mechanical properties (flexural strength response).
- 3.** The synthesis of AgNPs employing green chemistry mediated by plant extracts (in particular, *Camellia sinensis*) and functionalized with chitosan and NaF produced nanoparticles with spherical morphology with an average crystal size of ~20 nm and different degrees of aggregation depending on the synthesis process.
- 4.** The application of the synthesized TB_AgNPs on demineralized dentin resulted in an increase in the degree of mineralization and the apatite crystallite size. The mechanical performance (flexural strength) of dentine after applying TB_AgNPs was significantly increased compared to the sound and demineralized groups.

Referencias Bibliográficas |

- [1] MacHiulskiene V, Campus G, Carvalho JC, Dige I, Ekstrand KR, Jablonski-Momeni A, et al. Terminology of Dental Caries and Dental Caries Management: Consensus Report of a Workshop Organized by ORCA and Cariology Research Group of IADR. *Caries Res* 2020;54:7-14. <https://doi.org/10.1159/000503309>.
- [2] West NX, Joiner A. Enamel mineral loss. *J Dent* 2014;42:S2-11. [https://doi.org/10.1016/S0300-5712\(14\)50002-4](https://doi.org/10.1016/S0300-5712(14)50002-4).
- [3] Castellanos Odontólogo Magíster en Farmacología en Química JE, María Marín Gallón L, Alejandra Castiblanco Rubio G, Bosque E. La remineralización del esmalte bajo el entendimiento actual de la caries dental. *Jul-Dic* 2013;32:49-59.
- [4] Cury, JA; Tenuta L. Enamel remineralization : controlling the caries disease or treating early caries lesions ? *Dental caries : the disease and its signals Enamel remineralization. Braz Oral Res* 2009;23:23-30.
- [5] Fomby P, Cherlin AJ, Hadjizadeh A, Doillon CJ, Sueblinvong V, Weiss DJ, et al. Stem cells and cell therapies in lung biology and diseases: Conference report. *Ann Am Thorac Soc* 2010;12:181-204. <https://doi.org/10.1002/term>.
- [6] Mjör IA. Human coronal dentine: Structure and reactions. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol* 1972;33:810-23. [https://doi.org/10.1016/0030-4220\(72\)90451-3](https://doi.org/10.1016/0030-4220(72)90451-3).
- [7] Nakajima M, Kunawarote S, Prasansuttiporn T, Tagami J. Bonding to caries-affected dentin. *Jpn Dent Sci Rev* 2011;47:102-14. <https://doi.org/10.1016/j.jdsr.2011.03.002>.
- [8] Niu LN, Zhang W, Pashley DH, Breschi L, Mao J, Chen JH, et al. Biomimetic remineralization of dentin. *Dent Mater* 2014;30:77-96. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2013.07.013>.
- [9] Bertassoni LE, Habelitz S, Kinney JH, Marshall SJ, Marshall. Jr. GW. Biomechanical perspective on the remineralization of dentin. *Caries Res* 2009;43:70-7. <https://doi.org/10.1159/000201593>.
- [10] Kinney, J. H., Marshall, S. J., & Marshall GW. THE MECHANICAL

PROPERTIES OF HUMAN DENTIN: A CRITICAL REVIEW AND RE-EVALUATION OF THE DENTAL LITERATURE. *Crit Rev Oral Biol Med* 2003;1:13-29.

- [11] Young DA, Nový BB, Zeller GG, Hale R, Hart TC, Truelove EL, et al. The american dental association caries classification system for clinical practice: A report of the american dental association council on scientific affairs. *J Am Dent Assoc* 2015;146:79-86. <https://doi.org/10.1016/j.adaj.2014.11.018>.
- [12] Cheng L, Zhang L, Yue L, Ling J, Fan M, Yang D, et al. Expert consensus on dental caries management. *Int J Oral Sci* 2022;14:17. <https://doi.org/10.1038/s41368-022-00167-3>.
- [13] COCKER R. Dental caries. *Med Press* 1950;224:59-62.
- [14] Hummel R, Akveld NAE, Bruers JJM, van der Sanden WJM, Su N, van der Heijden GJMG. Caries Progression Rates Revisited: A Systematic Review. *J Dent Res* 2019;98:746-54. <https://doi.org/10.1177/0022034519847953>.
- [15] Pinna R, Maioli M, Eramo S, Mura I, Milia E. Carious affected dentine: its behaviour in adhesive bonding. *Aust Dent J* 2015;60:276-93. <https://doi.org/10.1111/adj.12309>.
- [16] Ceballos García L. Adhesión a dentina afectada por caries y dentina esclerótica. *Av Odontoestomatol* 2004;20:71-8. <https://doi.org/10.4321/S0213-12852004000200002>.
- [17] Senthilkumar V, Ramesh S. Systematic review on alternative methods for caries removal in permanent teeth. *J Conserv Dent* 2020;23:2. https://doi.org/10.4103/JCD.JCD_263_19.
- [18] Oliveira DC, Warren JJ, Levy SM, Kolker J, Qian F, Carey C. Acceptance of minimally invasive dentistry among US dentists in public health practices. *Oral Heal Prev Dent* 2016;14:501-8. <https://doi.org/10.3290/j.ohpd.a36464>.
- [19] Murdoch-Kinch CA, McLean ME. Minimally invasive dentistry. *J Am Dent Assoc* 2003;134:87-95. <https://doi.org/10.14219/jada.archive.2003.0021>.
- [20] Buzalaf MAR, Hannas AR, Magalhães AC, Rios D, Honório HM, Delbem ACB. pH-cycling models for in vitro evaluation of the efficacy of fluoridated dentifrices for caries control: strengths and limitations. *J Appl Oral Sci*

- 2010;18:316–34. <https://doi.org/10.1590/S1678-77572010000400002>.
- [21] Marquezan M, Corrêa FNP, Sanabe ME, Rodrigues Filho LE, Hebling J, Guedes-Pinto AC, et al. Artificial methods of dentine caries induction: A hardness and morphological comparative study. *Arch Oral Biol* 2009;54:1111–7. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2009.09.007>.
- [22] Zuluaga-Morales JS, Bolaños-Carmona MV, Cifuentes-Jiménez CC, Álvarez-Lloret P. Chemical, Microstructural and Morphological Characterisation of Dentine Caries Simulation by pH-Cycling. *Minerals* 2021;12:5. <https://doi.org/10.3390/min12010005>.
- [23] Enrich-Essvein T, Benavides-Reyes C, Álvarez-Lloret P, Bolaños-Carmona MV, Rodríguez-Navarro AB, González-López S. Influence of de-remineralization process on chemical, microstructural, and mechanical properties of human and bovine dentin. *Clin Oral Investig* 2021;25:841–9. <https://doi.org/10.1007/s00784-020-03371-9>.
- [24] Ehrlich H, Koutsoukos PG, Demadis KD, Pokrovsky OS. Principles of demineralization: Modern strategies for the isolation of organic frameworks. Part II. Decalcification. *Micron* 2009;40:169–93. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2008.06.004>.
- [25] Gebauer D, Cölfen H. Prenucleation clusters and non-classical nucleation. *Nano Today* 2011;6:564–84. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2011.10.005>.
- [26] Bächli K, Schmidlin PR, Wegehaupt F, Paqué F, Ramenzoni L, Botter S. Remineralization of artificial dentin caries using dentin and enamel matrix proteins. *Materials (Basel)* 2019;12:1–10. <https://doi.org/10.3390/ma12132116>.
- [27] Preethi P N. Remineralizing Agent -Then and Now -An Update. *Dentistry* 2014;04:2–6. <https://doi.org/10.4172/2161-1122.1000256>.
- [28] Walsh LJ, Clark KD, Alamoudi SA, Pani SC, Alomari M, 2. Cervical cancer screening manual, Reproductive Health Program, DoPH, MoH RG of B (2nd edition 2014)., et al. Contemporary technologies for remineralization therapies. *Nathional Mag Dent Hyg Prof* 2014;2013:5–8.
- [29] Peng JJY, Botelho MG, Matinlinna JP. Silver compounds used in dentistry for caries management: A review. *J Dent* 2012;40:531–41.

- <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2012.03.009>.
- [30] Sarvas E. The History and Use of Silver Diamine Fluoride in Dentistry: A Review. *J Calif Dent Assoc* 2018;46:19–22. <https://doi.org/10.1080/19424396.2018.12221978>.
- [31] Craig GG, Powell KR, Cooper MH. Caries progression in primary molars: 24-month results from a minimal treatment programme. *Community Dent Oral Epidemiol* 1981;9:260–5. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0528.1981.tb00342.x>.
- [32] Evans RW, Pakdaman A, Dennison PJ, Howe ELC. The Caries Management System: an evidence-based preventive strategy for dental practitioners. Application for adults. *Aust Dent J* 2008;53:83–92. <https://doi.org/10.1111/j.1834-7819.2007.00004.x>.
- [33] Yan IG, Zheng FM, Gao SS, Duangthip D, Lo ECM, Chu CH. Ion Concentration of Silver Diamine Fluoride Solutions. *Int Dent J* 2022. <https://doi.org/10.1016/j.identj.2022.04.005>.
- [34] Seifo N, Robertson M, MacLean J, Blain K, Grosse S, Milne R, et al. The use of silver diamine fluoride (SDF) in dental practice. *Br Dent J* 2020;228:75–81. <https://doi.org/10.1038/s41415-020-1203-9>.
- [35] Llodra JC, Rodriguez A, Ferrer B, Menardia V, Ramos T, Morato M. Efficacy of Silver Diamine Fluoride for Caries Reduction in Primary Teeth and First Permanent Molars of Schoolchildren: 36-month Clinical Trial. *J Dent Res* 2005;84:721–4. <https://doi.org/10.1177/154405910508400807>.
- [36] Gao SS, Zhang S, Mei ML, Lo ECM, Chu CH. Caries remineralisation and arresting effect in children by professionally applied fluoride treatment - a systematic review. *BMC Oral Health* 2016;16:1–9. <https://doi.org/10.1186/s12903-016-0171-6>.
- [37] Lansdown ABG. Silver in health care: Antimicrobial effects and safety in use. *Curr Probl Dermatol* 2006;33:17–34. <https://doi.org/10.1159/000093928>.
- [38] Russell AD, Hugo WB. 7 Antimicrobial Activity and Action of Silver. *Prog. Med. Chem.*, vol. 31, 1994, p. 351–70. [https://doi.org/10.1016/S0079-6468\(08\)70024-9](https://doi.org/10.1016/S0079-6468(08)70024-9).
- [39] Slawson RM, Lee H, Trevors JT. Bacterial interactions with silver. *Biol Met*

- 1990;3:151-4. <https://doi.org/10.1007/BF01140573>.
- [40] Mei ML, Li QL, Chu CH, Lo ECM, Samaranayake LP. Antibacterial effects of silver diamine fluoride on multi-species cariogenic biofilm on caries. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2013;12:1-7. <https://doi.org/10.1186/1476-0711-12-4>.
- [41] Chu CH, Mei L, Seneviratne CJ, Lo ECM. Effects of silver diamine fluoride on dentine carious lesions induced by *Streptococcus mutans* and *Actinomyces naeslundii* biofilms. *Int J Paediatr Dent* 2012;22:2-10. <https://doi.org/10.1111/j.1365-263X.2011.01149.x>.
- [42] Mei ML, Chu CH, Low KH, Che CM, Lo ECM. Caries arresting effect of silver diamine fluoride on dentine carious lesion with *S. mutans* and *L. acidophilus* dual-species cariogenic biofilm. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2013;18:2-9. <https://doi.org/10.4317/medoral.18831>.
- [43] Knight GM, McIntyre JM, Craig GG, Mulyani, Zilm PS, Gully NJ. An in vitro model to measure the effect of a silver fluoride and potassium iodide treatment on the permeability of demineralized dentine to *Streptococcus mutans*. *Aust Dent J* 2005;50:242-5. <https://doi.org/10.1111/j.1834-7819.2005.tb00367.x>.
- [44] Lansdown AB. Silver. I: Its antibacterial properties and mechanism of action. *J Wound Care* 2002;11:125-30. <https://doi.org/10.12968/jowc.2002.11.4.26389>.
- [45] Zhao IS, Mei ML, Li QL, Lo ECM, Chu CH. Arresting simulated dentine caries with adjunctive application of silver nitrate solution and sodium fluoride varnish: an in vitro study. *Int Dent J* 2017;67:206-14. <https://doi.org/10.1111/idj.12291>.
- [46] Willershausen I, Schulte D, Azaripour A, Weyer V, Briseno B, Willershausen B. Penetration potential of a silver diamine fluoride solution on dentin surfaces. An ex vivo study. *Clin Lab* 2015;61:1695-701. <https://doi.org/10.7754/Clin.Lab.2015.150401>.
- [47] Mei ML, Lo ECM, Chu CH. Arresting Dentine Caries with Silver Diamine Fluoride: What's Behind It? *J Dent Res* 2018;97:751-8. <https://doi.org/10.1177/0022034518774783>.
- [48] Sayed M, Matsui N, Uo M, Nikaido T, Oikawa M, Burrow MF, et al. Morphological and elemental analysis of silver penetration into

- sound/demineralized dentin after SDF application. *Dent Mater* 2019;35:1718–27. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2019.08.111>.
- [49] Seto J, Horst JA, Parkinson DY, Frachella JC, DeRisi JL, Dds JAH, et al. Silver microwires from treating tooth decay with silver diamine fluoride. *BioRxiv* 2017. <https://doi.org/10.1101/152199>.
- [50] Chu CH, Lo ECM. Microhardness of dentine in primary teeth after topical fluoride applications. *J Dent* 2008;36:387–91. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2008.02.013>.
- [51] Mei ML, Ito L, Cao Y, Lo ECM, Li QL, Chu CH. An ex vivo study of arrested primary teeth caries with silver diamine fluoride therapy. *J Dent* 2014;42:395–402. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2013.12.007>.
- [52] Mei ML, Ito L, Cao Y, Li QL, Lo ECM, Chu CH. Inhibitory effect of silver diamine fluoride on dentine demineralisation and collagen degradation. *J Dent* 2013;41:809–17. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2013.06.009>.
- [53] Buchalla W, Imfeld T, Attin T, Swain M V., Schmidlin PR. Relationship between nanohardness and mineral content of artificial carious enamel lesions. *Caries Res* 2008;42:157–63. <https://doi.org/10.1159/000128559>.
- [54] Chen W, Liu Y, Courtney HS, Bettenga M, Agrawal CM, Bumgardner JD, et al. In vitro anti-bacterial and biological properties of magnetron co-sputtered silver-containing hydroxyapatite coating. *Biomaterials* 2006;27:5512–7. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.07.003>.
- [55] Dos Santos IMG, Barbosa LSNS, Resende CX, De Almeida Soares G, Dos Santos EA. Crystallographic aspects regarding the insertion of ag⁺ ions into a hydroxyapatite structure. *Mater Res* 2015;18:881–90. <https://doi.org/10.1590/1516-1439.012515>.
- [56] Mei ML, Ito L, Cao Y, Li QL, Chu CH, Lo ECM. The inhibitory effects of silver diamine fluorides on cysteine cathepsins. *J Dent* 2014;42:329–35. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2013.11.018>.
- [57] Mei ML, Li QL, Chu CH, Yiu CKY, Lo ECM. The inhibitory effects of silver diamine fluoride at different concentrations on matrix metalloproteinases. *Dent Mater* 2012;28:903–8. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2012.04.011>.

- [58] Koo H. Strategies to enhance the biological effects of fluoride on dental biofilms. *Adv Dent Res* 2008;20:17–21. <https://doi.org/10.1177/154407370802000105>.
- [59] Wiegand A, Buchalla W, Attin T. Review on fluoride-releasing restorative materials-Fluoride release and uptake characteristics, antibacterial activity and influence on caries formation. *Dent Mater* 2007;23:343–62. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2006.01.022>.
- [60] Mei ML, Nudelman F, Marzec B, Walker JM, Lo ECM, Walls AW, et al. Formation of Fluorohydroxyapatite with Silver Diamine Fluoride. *J Dent Res* 2017;96:1122–8. <https://doi.org/10.1177/0022034517709738>.
- [61] Lou YL, Botelho MG, Darvell BW. Reaction of silver diamine fluoride with hydroxyapatite and protein. *J Dent* 2011;39:612–8. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2011.06.008>.
- [62] Greenwall-Cohen J, Greenwall L, Barry S. Silver diamine fluoride - an overview of the literature and current clinical techniques. *Br Dent J* 2020;228:831–8. <https://doi.org/10.1038/s41415-020-1641-4>.
- [63] Ten Cate JM. Contemporary perspective on the use of fluoride products in caries prevention. *Br Dent J* 2013;214:161–7. <https://doi.org/10.1038/sj.bdj.2013.162>.
- [64] Mei ML, Ito L, Cao Y, Li QL, Lo ECM, Chu CH. Inhibitory effect of silver diamine fluoride on dentine demineralisation and collagen degradation. *J Dent* 2013;41:809–17. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2013.06.009>.
- [65] Pitts NB, Zero DT, Marsh PD, Ekstrand K, Weintraub JA, Ramos-Gomez F, et al. Dental caries. *Nat Rev Dis Prim* 2017;3. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.30>.
- [66] Altinci P, Mutluay M, Seseogullari-Dirihan R, Pashley D, Tjäderhane L, Tezvergil-Mutluay A. NaF Inhibits Matrix-Bound Cathepsin-Mediated Dentin Matrix Degradation. *Caries Res* 2016;50:124–32. <https://doi.org/10.1159/000444222>.
- [67] Koizumi H, Hamama HH, Burrow MF. Effect of a silver diamine fluoride and potassium iodide-based desensitizing and cavity cleaning agent on bond strength to dentine. *Int J Adhes Adhes* 2016;68:54–61. <https://doi.org/10.1016/j.ijadhadh.2016.02.008>.
- [68] Roberts A, Bradley J, Merkley S, Pachal T, Gopal J V., Sharma D. Does potassium

- iodide application following silver diamine fluoride reduce staining of tooth? A systematic review. *Aust Dent J* 2020;65:109–17. <https://doi.org/10.1111/adj.12743>.
- [69] Takahashi M, Matin K, Matsui N, Shimizu M, Tsuda Y, Uchinuma S, et al. Effects of silver diamine fluoride preparations on biofilm formation of streptococcus mutans. *Dent Mater J* 2021;40:911–7. <https://doi.org/10.4012/dmj.2020-341>.
- [70] Li R, Lo ECM, Liu BY, Wong MCM, Chu CH. Randomized clinical trial on arresting dental root caries through silver diammine fluoride applications in community-dwelling elders. *J Dent* 2016;51:15–20. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2016.05.005>.
- [71] Noronha VT, Paula AJ, Durán G, Galembeck A, Cogo-Müller K, Franz-Montan M, et al. Silver nanoparticles in dentistry. *Dent Mater* 2017;33:1110–26. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2017.07.002>.
- [72] Dos Santos VE, Filho AV, Ribeiro Targino AG, Pelagio Flores MA, Galembeck A, Caldas AF, et al. A new “silver-Bullet” to treat caries in children - Nano Silver Fluoride: A randomised clinical trial. *J Dent* 2014;42:945–51. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2014.05.017>.
- [73] Crystal YO, Niederman R. Evidence-Based Dentistry Update on Silver Diamine Fluoride. *Dent Clin North Am* 2019;63:45–68. <https://doi.org/10.1016/j.cden.2018.08.011>.
- [74] Rosenblatt A, Stamford TCM, Niederman R. Silver diamine fluoride: A caries “silver-fluoride bullet.” *J Dent Res* 2009;88:116–25. <https://doi.org/10.1177/0022034508329406>.
- [75] Gao SS, Zhao IS, Hiraishi N, Duangthip D, Mei ML, Lo ECM, et al. Clinical trials of silver diamine fluoride in arresting caries among children: A systematic review. *JDR Clin Transl Res* 2016;1:201–10. <https://doi.org/10.1177/2380084416661474>.
- [76] Rajendra A, Veitz-Keenan A, Oliveira BH, Ruff RR, Wong MCM, Innes NPT, et al. Topical silver diamine fluoride for managing dental caries in children and adults. *Cochrane Database Syst Rev* 2017;2017. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD012718>.

- [77] Professionally Applied Topical Fluoride: Evidence-Based Clinical Recommendations. *J Dent Educ* 2007;71:393–402. <https://doi.org/10.1002/j.0022-0337.2007.71.3.tb04289.x>.
- [78] Tenuta LMA, Cury JA. Fluoride: Its role in dentistry. *Braz Oral Res* 2010;24:9–17. <https://doi.org/10.1590/S1806-83242010000500003>.
- [79] Pessan JP, Toumba KJ, Buzalaf MAR. Topical use of fluorides for caries control. *Monogr Oral Sci* 2011;22:115–32. <https://doi.org/10.1159/000325154>.
- [80] Featherstone JDB. Prevention and reversal of dental caries: Role of low level fluoride. *Community Dent Oral Epidemiol* 1999;27:31–40. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0528.1999.tb01989.x>.
- [81] Abiodun-Solanke IMF, Ajayi DM, Arigbede AO. Nanotechnology and its Application in Dentistry. *Ann Med Health Sci Res* 2014;4:171–7.
- [82] Foong LK, Foroughi MM, Mirhosseini AF, Safaei M, Jahani S, Mostafavi M, et al. Applications of nano-materials in diverse dentistry regimes. *RSC Adv* 2020;10:15430–60. <https://doi.org/10.1039/d0ra00762e>.
- [83] Jandt KD, Watts DC. Nanotechnology in dentistry: Present and future perspectives on dental nanomaterials. *Dent Mater* 2020;36:1365–78. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2020.08.006>.
- [84] Mitra SB, Wu D, Holmes BN. An application of nanotechnology in advanced dental materials. *J Am Dent Assoc* 2003;134:1382–90. <https://doi.org/10.14219/jada.archive.2003.0054>.
- [85] Khurshid Z, Zafar M, Qasim S, Shahab S, Naseem M, AbuReqaiba A. Advances in nanotechnology for restorative dentistry. *Materials (Basel)* 2015;8:717–31. <https://doi.org/10.3390/ma8020717>.
- [86] Glowacka-Sobotta A, Ziental D, Czarczynska-Goslinska B, Michalak M, Wysocki M, Güzel E, et al. Nanotechnology for Dentistry: Prospects and Applications. *Nanomaterials* 2023;13. <https://doi.org/10.3390/nano13142130>.
- [87] Jain S, Saxena N, Sharma MK, Chatterjee S. Metal nanoparticles and medicinal plants: Present status and future prospects in cancer therapy. *Mater Today Proc* 2019;31:662–73. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.06.602>.
- [88] Yin IX, Zhang J, Zhao IS, Mei ML, Li Q, Chu CH. The antibacterial mechanism

- of silver nanoparticles and its application in dentistry. *Int J Nanomedicine* 2020;15:2555–62. <https://doi.org/10.2147/IJN.S246764>.
- [89] Medici S, Peana M, Nurchi VM, Zoroddu MA. Medical Uses of Silver: History, Myths, and Scientific Evidence. *J Med Chem* 2019;62:5923–43. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b01439>.
- [90] Carrouel F, Viennot S, Ottolenghi L, Gaillard C, Bourgeois D. Nanoparticles as anti-microbial, anti-inflammatory, and remineralizing agents in oral care cosmetics: A review of the current situation. vol. 10. 2020. <https://doi.org/10.3390/nano10010140>.
- [91] Rai M, Ingle AP, Birla S, Yadav A, Santos CA Dos. Strategic role of selected noble metal nanoparticles in medicine. *Crit Rev Microbiol* 2016;42:696–719. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2015.1018131>.
- [92] Hamouda IM. Current perspectives of nanoparticles in medical and dental biomaterials. *J Biomed Res* 2012;26:143–51. <https://doi.org/10.7555/JBR.26.20120027>.
- [93] Rolim WR, Pelegrino MT, de Araújo Lima B, Ferraz LS, Costa FN, Bernardes JS, et al. Green tea extract mediated biogenic synthesis of silver nanoparticles: Characterization, cytotoxicity evaluation and antibacterial activity. *Appl Surf Sci* 2019;463:66–74. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2018.08.203>.
- [94] Chandra H, Kumari P, Bontempi E, Yadav S. Medicinal plants: Treasure trove for green synthesis of metallic nanoparticles and their biomedical applications. *Biocatal Agric Biotechnol* 2020;24:101518. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101518>.
- [95] Nath D, Banerjee P. Green nanotechnology - A new hope for medical biology. *Environ Toxicol Pharmacol* 2013;36:997–1014. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2013.09.002>.
- [96] Alorku K, Manoj M, Yuan A. A plant-mediated synthesis of nanostructured hydroxyapatite for biomedical applications: A review. *RSC Adv* 2020;10:40923–39. <https://doi.org/10.1039/d0ra08529d>.
- [97] Mashwani Z ur R, Khan T, Khan MA, Nadhman A. Synthesis in plants and plant extracts of silver nanoparticles with potent antimicrobial properties: current

- status and future prospects. *Appl Microbiol Biotechnol* 2015;99:9923–34. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6987-1>.
- [98] Ahluwalia V, Elumalai S, Kumar V, Kumar S, Sangwan RS. Nano silver particle synthesis using *Swertia paniculata* herbal extract and its antimicrobial activity. *Microb Pathog* 2018;114:402–8. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.11.052>.
- [99] Moghadam ET, Yazdani M, Tahmasebi E, Tebyanian H, Ranjbar R, Yazdani A, et al. Current herbal medicine as an alternative treatment in dentistry: In vitro, in vivo and clinical studies. *Eur J Pharmacol* 2020;889:173665. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173665>.
- [100] Shameli K, Ahmad M Bin, Jaffar Al-Mulla EA, Ibrahim NA, Shabanzadeh P, Rustaiyan A, et al. Green biosynthesis of silver nanoparticles using *callicarpa maingayi* stem bark extraction. *Molecules* 2012;17:8506–17. <https://doi.org/10.3390/molecules17078506>.
- [101] Goel M, Sharma A, Sharma B. Recent Advances in Biogenic Silver Nanoparticles for Their Biomedical Applications. *Sustain Chem* 2023;4:61–94. <https://doi.org/10.3390/suschem4010007>.
- [102] Fernandez CC, Sokolonski AR, Fonseca MS, Stanisic D, Araújo DB, Azevedo V, et al. Applications of silver nanoparticles in dentistry: Advances and technological innovation. *Int J Mol Sci* 2021;22:1–21. <https://doi.org/10.3390/ijms22052485>.
- [103] Nakajima M, Kunawarote S, Prasansuttiorn T, Tagami J. Bonding to caries-affected dentin. *Jpn Dent Sci Rev* 2011;47:102–14. <https://doi.org/10.1016/j.jdsr.2011.03.002>.
- [104] LeGeros RZ. Chemical and crystallographic events in the caries process. *J Dent Res* 1990;69:567–74. <https://doi.org/10.1177/00220345900690s113>.
- [105] Zhao IS, Yin IX, Mei ML, Lo ECM, Tang J, Li Q, et al. Remineralising Dentine Caries Using Sodium Fluoride with Silver Nanoparticles: An In Vitro Study. *Int J Nanomedicine* 2020;15:2829–39. <https://doi.org/10.2147/IJN.S247550>.
- [106] Shah S, Bhaskar V, Venkatraghavan K, Choudhary P, M. G, Trivedi K. Silver Diamine Fluoride: A Review and Current Applications. *J Adv Oral Res* 2014;5:25–35. <https://doi.org/10.1177/2229411220140106>.

- [107] Chibinski AC, Wambier LM, Feltrin J, Loguercio AD, Wambier DS, Reis A. Silver Diamine Fluoride Has Efficacy in Controlling Caries Progression in Primary Teeth: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Caries Res* 2017;51:527-41. <https://doi.org/10.1159/000478668>.
- [108] Hendre AD, Taylor GW, Chávez EM, Hyde S. A systematic review of silver diamine fluoride: Effectiveness and application in older adults. *Gerodontology* 2017. <https://doi.org/10.1111/ger.12294>.
- [109] Oliveira BH, Cunha-Cruz J, Rajendra A, Niederman R. Controlling caries in exposed root surfaces with silver diamine fluoride: A systematic review with meta-analysis. *J Am Dent Assoc* 2018;149:671-679.e1. <https://doi.org/10.1016/j.adaj.2018.03.028>.
- [110] Ceballos L, Camejo DG, Fuentes MV, Osorio R, Toledano M, Carvalho RM, et al. Microtensile bond strength of total-etch and self-etching adhesives to caries-affected dentine. *J Dent* 2003;31:469-77. [https://doi.org/10.1016/S0300-5712\(03\)00088-5](https://doi.org/10.1016/S0300-5712(03)00088-5).
- [111] Wang AS, Botelho MG, Tsoi JKH, Matinlinna JP. Effects of silver diammine fluoride on microtensile bond strength of GIC to dentine. *Int J Adhes Adhes* 2016;70:196-203. <https://doi.org/10.1016/j.ijadhadh.2016.06.011>.
- [112] Zhao IS, Mei ML, Burrow MF, Lo ECM, Chu CH. Effect of silver diamine fluoride and potassium iodide treatment on secondary caries prevention and tooth discolouration in cervical glass ionomer cement restoration. *Int J Mol Sci* 2017;18. <https://doi.org/10.3390/ijms18020340>.
- [113] Lutgen P, Chan D, Sadr A. Effects of silver diammine fluoride on bond strength of adhesives to sound dentin. *Dent Mater J* 2018;37:1003-9. <https://doi.org/10.4012/dmj.2017-401>.
- [114] Soeno K, Taira Y, Matsumura H, Atsuta M. Effect of desensitizers on bond strength of adhesive luting agents to dentin. *J Oral Rehabil* 2001;28:1122-8. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2842.2001.00756.x>.
- [115] Quock R, Barros J, Yang S, Patel S. Effect of Silver Diamine Fluoride on Microtensile Bond Strength to Dentin. *Oper Dent* 2012;37:610-6. <https://doi.org/10.2341/11-344-L>.

- [116] Selvaraj K, Sampath V, Sujatha V, Mahalaxmi S. Evaluation of microshear bond strength and nanoleakage of etch-and-rinse and self-etch adhesives to dentin pretreated with silver diamine fluoride/potassium iodide: An in vitro study. *Indian J Dent Res* 2016;27:421–5. <https://doi.org/10.4103/0970-9290.191893>.
- [117] Fröhlich TT, Rocha R de O, Botton G. Does previous application of silver diammine fluoride influence the bond strength of glass ionomer cement and adhesive systems to dentin? Systematic review and meta-analysis. *Int J Paediatr Dent* 2019;1–11. <https://doi.org/10.1111/ipd.12571>.
- [118] Jiang M, Mei ML, Wong MCM, Chu CH, Lo ECM. Effect of silver diamine fluoride solution application on the bond strength of dentine to adhesives and to glass ionomer cements: A systematic review. *BMC Oral Health* 2020;20:1–10. <https://doi.org/10.1186/s12903-020-1030-z>.
- [119] Boskey AL, Mendelsohn R. Infrared spectroscopic characterization of mineralized tissues. *Vib Spectrosc* 2005;38:107–14. <https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2005.02.015>.
- [120] Lopes C de CA, Limirio PHJO, Novais VR, Dechichi P. Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) application chemical characterization of enamel, dentin and bone. *Appl Spectrosc Rev* 2018;53:747–69. <https://doi.org/10.1080/05704928.2018.1431923>.
- [121] Rodriguez-Navarro AB, Romanek CS, Alvarez-Lloret P, Gaines KF. Effect of in ovo exposure to PCBs and Hg on clapper rail bone mineral chemistry from a contaminated salt marsh in coastal Georgia. *Environ Sci Technol* 2006;40:4936–42. <https://doi.org/10.1021/es060769x>.
- [122] Miller LM, Vairavamurthy V, Chance MR, Mendelsohn R, Paschalis EP, Betts F, et al. In situ analysis of mineral content and crystallinity in bone using infrared micro-spectroscopy of the ν_4 PO₄³⁻ vibration. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* 2001;1527:11–9. [https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(01\)00093-9](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(01)00093-9).
- [123] Martin-Ramos JD. X Powder: A software package for powder XRay diffraction analysis 2004.
- [124] Cullity B.D., Stock S.R. *Elements of X-ray Diffraction* (3rd ed.), Upper Saddle River, NJ, Prentice Hall (2001). 3rd.ed. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ: 2001.

<https://doi.org/117.239.25.194>.

- [125] Hara AT, Ando M, Cury JA, Serra MC, González-Cabezas C, Zero DT. Influence of the organic matrix on root dentine erosion by citric acid. *Caries Res* 2005;39:134–8. <https://doi.org/10.1159/000083159>.
- [126] Neel EAA, Aljabo A, Strange A, Ibrahim S, Coathup M, Young AM, et al. Demineralization–remineralization dynamics in teeth and bone. *Int J Nanomedicine* 2016;11:4743–63. <https://doi.org/10.2147/IJN.S107624>.
- [127] Zhao IS, Gao SS, Hiraishi N, Burrow MF, Duangthip D, Mei ML, et al. Mechanisms of silver diamine fluoride on arresting caries: a literature review. *Int Dent J* 2018;68:67–76. <https://doi.org/10.1111/idj.12320>.
- [128] Knight GM, McIntyre JM, Craig GG, Mulyani, Zilm PS, Gully NJ. An in vitro model to measure the effect of a silver fluoride and potassium iodide treatment on the permeability of demineralized dentine to *Streptococcus mutans*. *Aust Dent J* 2005;50:242–5. <https://doi.org/10.1111/j.1834-7819.2005.tb00367.x>.
- [129] Saravanan M, Barik SK, MubarakAli D, Prakash P, Pugazhendhi A. Synthesis of silver nanoparticles from *Bacillus brevis* (NCIM 2533) and their antibacterial activity against pathogenic bacteria. *Microb Pathog* 2018;116:221–6. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.01.038>.
- [130] Kucukyilmaz E, Savas S, Akcay M, Bolukbasi B. Effect of silver diamine fluoride and ammonium hexafluorosilicate applications with and without Er:YAG laser irradiation on the microtensile bond strength in sound and caries-affected dentin. *Lasers Surg Med* 2016;48:62–9. <https://doi.org/10.1002/lsm.22439>.
- [131] Ryou H, Amin N, Ross A, Eidelman N, Wang DH, Romberg E, et al. Contributions of microstructure and chemical composition to the mechanical properties of dentin. *J Mater Sci Mater Med* 2011;22:1127–35. <https://doi.org/10.1007/s10856-011-4293-8>.
- [132] Crystal YO, Rabieh S, Janal MN, Rasamimari S, Bromage TG. Silver and fluoride content and short-term stability of 38% silver diamine fluoride. *J Am Dent Assoc* 2019;150:140–6. <https://doi.org/10.1016/j.adaj.2018.10.016>.
- [133] Perdigão J. New Developments in Dental Adhesion. *Dent Clin North Am* 2007;51:333–57. <https://doi.org/10.1016/j.cden.2007.01.001>.

- [134] Feitosa VP, Sauro S, Ogliari FA, Ogliari AO, Yoshihara K, Zanchi CH, et al. Impact of hydrophilicity and length of spacer chains on the bonding of functional monomers. *Dent Mater* 2014;30:e317-23. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2014.06.006>.
- [135] Featherstone JDB, Crystal YO, Alston P, Chaffee BW, Doméjean S, Rechmann P, et al. Evidence-Based Caries Management for All Ages-Practical Guidelines. *Front Oral Heal* 2021;2. <https://doi.org/10.3389/froh.2021.657518>.
- [136] Pitts NB, Twetman S, Fisher J, Marsh PD. Understanding dental caries as a non-communicable disease. *Br Dent J* 2021;231:749-53. <https://doi.org/10.1038/s41415-021-3775-4>.
- [137] Featherstone JD. The science and practice of caries prevention. *J Am Dent Assoc* 2000;131:887-99. <https://doi.org/10.14219/jada.archive.2000.0307>.
- [138] Featherstone JDB. The Continuum of Dental Caries – Evidence for a Dynamic Disease Process. *J Dent Res* 2004;83:39-42. <https://doi.org/10.1177/154405910408301s08>.
- [139] Contractor IA, M.S. G, M.D. I. Silver Diamine Fluoride: Extending the spectrum of Preventive Dentistry, a literature review. *Pediatr Dent J* 2021;31:17-24. <https://doi.org/10.1016/j.pdj.2020.12.005>.
- [140] Alhothali M, Exterkate R, Lagerweij M, Buijs M, van Loveren C, van Strijp G. The effect of equal fluoride concentrations in silver diamine fluoride and potassium fluoride on demineralized dentin during pH-cycling: chemical data. *Eur J Oral Sci* 2021;129:e12789. <https://doi.org/10.1111/eos.12789>.
- [141] Larsson K, Stime A, Hansen L, Birkhed D, Ericson D. Salivary fluoride concentration and retention after rinsing with 0.05 and 0.2% sodium fluoride (NaF) compared with a new high F rinse containing 0.32% NaF. *Acta Odontol Scand* 2020;78:609-13. <https://doi.org/10.1080/00016357.2020.1800085>.
- [142] Pitts N, Duckworth RM, Marsh P, Mutti B, Parnell C, Zero D. Post-brushing rinsing for the control of dental caries: exploration of the available evidence to establish what advice we should give our patients. *Br Dent J* 2012;212:315-20. <https://doi.org/10.1038/sj.bdj.2012.260>.
- [143] Hendre AD, Taylor GW, Chávez EM, Hyde S. A systematic review of silver

- diamine fluoride: Effectiveness and application in older adults. *Gerodontology* 2017;34:411–9. <https://doi.org/10.1111/ger.12294>.
- [144] Romero MJRH, Lippert F. Indirect caries-preventive effect of silver diamine fluoride on adjacent dental substrate: A single-section demineralization study. *Eur J Oral Sci* 2021;129:1–10. <https://doi.org/10.1111/eos.12751>.
- [145] Sulyanto RM, Kang M, Srirangapatanam S, Berger M, Candamo F, Wang Y, et al. Biomineralization of Dental Tissues Treated with Silver Diamine Fluoride. *J Dent Res* 2021;100:1099–108. <https://doi.org/10.1177/00220345211026838>.
- [146] Cifuentes-jimenez C, Alvarez-lloret P, Benavides-reyes C. Physicochemical and Mechanical Effects of Commercial Silver Diamine Fluoride (SDF) Agents on Demineralized Dentin 2021;23:557–67. <https://doi.org/10.3290/j.jad.b2288097>.
- [147] Mei ML, Li QL, Chu CH, Yiu CKY, Lo ECM. The inhibitory effects of silver diamine fluoride at different concentrations on matrix metalloproteinases. *Dent Mater* 2012;28:903–8. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2012.04.011>.
- [148] Delbem ACB, Bergamaschi M, Sasaki KT, Cunha RF. Effect of fluoridated varnish and silver diamine fluoride solution on enamel demineralization: pH-cycling study. *J Appl Oral Sci* 2006;14:88–92. <https://doi.org/10.1590/S1678-77572006000200005>.
- [149] Sorkhdini P, Crystal YO, Tang Q, Lippert F. The effect of silver diamine fluoride in preventing in vitro primary coronal caries under pH-cycling conditions. *Arch Oral Biol* 2021;121:104950. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2020.104950>.
- [150] Firouzmandi M, Shafiei F, Jowkar Z, Nazemi F. Effect of Silver Diamine Fluoride and Proanthocyanidin on Mechanical Properties of Caries-Affected Dentin. *Eur J Dent* 2019;13:255–60. <https://doi.org/10.1055/s-0039-1693237>.
- [151] Zuluaga-Morales JS, Bolaños-Carmona MV, Álvarez-Lloret P. pH-cycling, dynamic chemical model in dentine caries creation. A systematic review and meta-analysis. *Int J Med Dent* 2022;26:585–608.
- [152] Kielbassa AM. In situ induced demineralization in irradiated and non-irradiated human dentin. *Eur J Oral Sci* 2000;108:214–21. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0722.2000.108003214.x>.
- [153] Tschoppe P, Zandim DL, Martus P, Kielbassa AM. Enamel and dentine

- remineralization by nano-hydroxyapatite toothpastes. *J Dent* 2011;39:430-7. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2011.03.008>.
- [154] Thanatvarakorn O, Islam MS, Nakashima S, Sadr A, Nikaido T, Tagami J. Effects of zinc fluoride on inhibiting dentin demineralization and collagen degradation in vitro: A comparison of various topical fluoride agents. *Dent Mater J* 2016;35:769-75. <https://doi.org/10.4012/dmj.2015-388>.
- [155] Stani C, Vaccari L, Mitri E, Birarda G. FTIR investigation of the secondary structure of type I collagen: New insight into the amide III band. *Spectrochim Acta - Part A Mol Biomol Spectrosc* 2020;229:118006. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2019.118006>.
- [156] Wang Y, Azais T, Robin M, Vallée A, Catania C, Legriel P, et al. The predominant role of collagen in the nucleation, growth, structure and orientation of bone apatite. *Nat Mater* 2012;11:724-33. <https://doi.org/10.1038/nmat3362>.
- [157] Miles CA, Avery NC, Rodin V V., Bailey AJ. The increase in denaturation temperature following cross-linking of collagen is caused by dehydration of the fibres. *J Mol Biol* 2005;346:551-6. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.12.001>.
- [158] Belbachir K, Noreen R, Gouspillou G, Petibois C. Collagen types analysis and differentiation by FTIR spectroscopy. *Anal Bioanal Chem* 2009;395:829-37. <https://doi.org/10.1007/s00216-009-3019-y>.
- [159] Srisomboon S, Kettratad M, Pakawanit P, Rojviriyaya C, Phantumvanit P, Panpisut P. Effects of Different Application Times of Silver Diamine Fluoride on Mineral Precipitation in Demineralized Dentin. *Dent J* 2021;9:70. <https://doi.org/10.3390/dj9060070>.
- [160] Yu OY, Mei ML, Zhao IS, Li QL, Lo ECM, Chu CH. Remineralisation of enamel with silver diamine fluoride and sodium fluoride. *Dent Mater* 2018;34:e344-52. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2018.10.007>.
- [161] Chen Y, Miao X. Thermal and chemical stability of fluorohydroxyapatite ceramics with different fluorine contents. *Biomaterials* 2005;26:1205-10. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.04.027>.
- [162] Eanes ED, Hailer AW. The effect of fluoride on the size and morphology of

- apatite crystals grown from physiologic solutions. *Calcif Tissue Int* 1998;63:250–7. <https://doi.org/10.1007/s002239900522>.
- [163] Senawongse P, Otsuki M, Tagami J, Mjör IA. Morphological characterization and permeability of attrited human dentine. *Arch Oral Biol* 2008;53:14–9. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2007.07.010>.
- [164] Gao Y, Wu Y. Recent advances of chitosan-based nanoparticles for biomedical and biotechnological applications. *Int J Biol Macromol* 2022;203:379–88. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.01.162>.
- [165] Craig G, Knight G, McIntyre J. Clinical evaluation of diamine silver fluoride/potassium iodide as a dentine desensitizing agent. A pilot study. *Aust Dent J* 2012;57:308–11. <https://doi.org/10.1111/j.1834-7819.2012.01700.x>.
- [166] Yu OY, Zhao IS, Mei ML, Lo ECM, Chu CH. Caries-arresting effects of silver diamine fluoride and sodium fluoride on dentine caries lesions. *J Dent* 2018;78:65–71. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2018.08.007>.
- [167] Corrêa JM, Mori M, Sanches HL, Cruz AD Da, Poiate E, Poiate IAVP. Silver nanoparticles in dental biomaterials. *Int J Biomater* 2015;2015. <https://doi.org/10.1155/2015/485275>.
- [168] Liao S, Tang Y, Chu C, Lu W, Baligen B, Man Y, et al. Application of green tea extracts epigallocatechin-3-gallate in dental materials: Recent progress and perspectives. *J Biomed Mater Res - Part A* 2020;108:2395–408. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36991>.
- [169] Jose P, Sanjeev K, Sekar M. Effect of green and white tea pretreatment on remineralization of demineralized dentin by CPP-ACFP-an invitro microhardness analysis. *J Clin Diagnostic Res* 2016;10:ZC85–9. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2016/16038.7674>.
- [170] Zhao IS, Gao SS, Hiraishi N, Burrow MF, Duangthip D, Mei ML, et al. Mechanisms of silver diamine fluoride on arresting caries: a literature review. *Int Dent J* 2018;68:67–76. <https://doi.org/10.1111/idj.12320>.
- [171] Curylofo-Zotti FA, Tedesco AC, Lizarelli GTC, Takahashi LAU, Corona SAM. Effect of green tea-loaded chitosan nanoparticles on leathery dentin microhardness. *Odontology* 2021;109:860–7. <https://doi.org/10.1007/s10266->

021-00611-6.

- [172] Yin IX, Yu OY, Zhao IS, Mei ML, Li QL, Tang J, et al. Developing biocompatible silver nanoparticles using epigallocatechin gallate for dental use. *Arch Oral Biol* 2019;102:106–12. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2019.03.022>.
- [173] Mohammed MA, Syeda JTM, Wasan KM, Wasan EK. An Overview of Chitosan Nanoparticles and Its Application in Non-Parenteral Drug Delivery. *Pharmaceutics* 2017;9:53. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics9040053>.
- [174] Fakhri E, Eslami H, Maroufi P, Pakdel F, Taghizadeh S, Ganbarov K, et al. Chitosan biomaterials application in dentistry. *Int J Biol Macromol* 2020;162:956–74. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.06.211>.
- [175] Zargar M, Shameli K, Najafi GR, Farahani F. Plant mediated green biosynthesis of silver nanoparticles using *Vitex negundo* L. extract. *J Ind Eng Chem* 2014;20:4169–75. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2014.01.016>.
- [176] Senthilkumar P, Yaswant G, Kavitha S, Chandramohan E, Kowsalya G, Vijay R, et al. Preparation and characterization of hybrid chitosan-silver nanoparticles (Chi-Ag NPs); A potential antibacterial agent. *Int J Biol Macromol* 2019;141:290–7. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.08.234>.
- [177] Freire PLL, Albuquerque AJR, Farias IAP, da Silva TG, Aguiar JS, Galembeck A, et al. Antimicrobial and cytotoxicity evaluation of colloidal chitosan – silver nanoparticles – fluoride nanocomposites. *Int J Biol Macromol* 2016;93:896–903. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.09.052>.
- [178] Anusuya S, Banu KN. Silver-chitosan nanoparticles induced biochemical variations of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Biocatal Agric Biotechnol* 2016;8:39–44. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2016.08.005>.
- [179] Gupta P, Bajpai M, Bajpai SK. Textile technology: Investigation of antibacterial properties of silver nanoparticle-loaded poly (acrylamide-co-itaconic acid)-grafted cotton fabric. *J Cotton Sci* 2008;12:280–6.
- [180] Elfersi S, Grégoire G, Sharrock P. Characterization of sound human dentin particles of sub-millimeter size. *Dent Mater* 2002;18:529–34. [https://doi.org/10.1016/S0109-5641\(01\)00085-9](https://doi.org/10.1016/S0109-5641(01)00085-9).
- [181] Epasinghe DJ, Yiu CKY, Burrow MF. Effect of flavonoids on remineralization of

- artificial root caries. *Aust Dent J* 2016;61:196–202. <https://doi.org/10.1111/adj.12367>.
- [182] Rohym S. Effect of Green Tea, Stevia Extract Solutions, and Fluoride-Based Mouthwash on Remineralization of Incipient Enamel Lesion: An In Vitro Study. *Ahram Can Dent J* 2023;2:13–25. <https://doi.org/10.21608/acdj.2023.281310>.
- [183] Alves MM, Andrade SM, Grenho L, Fernandes MH, Santos C, Montemor MF. Influence of apple phytochemicals in ZnO nanoparticles formation, photoluminescence and biocompatibility for biomedical applications. *Mater Sci Eng C* 2019;101:76–87. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.03.084>.
- [184] Farouk H, Mosallam R, Aidaros N. Effect of Green Tea, Black Tea and Moringa Oleifera on Remineralization of Artificially Demineralized Enamel and Dentin: An In-vitro Microhardness Analysis. *Adv Dent J* 2021;3:24–34. <https://doi.org/10.21608/adjc.2020.34873.1072>.
- [185] Drobota M, Grierosu I, Radu I, Vasilescu DS. The Effect of Silver Nanoparticles on the Collagen Secondary Structure. *Key Eng Mater* 2015;638:8–13. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/KEM.638.8>.
- [186] Riaz M, Zia R, Ijaz A, Hussain T, Mohsin M, Malik A. Synthesis of monophasic Ag doped hydroxyapatite and evaluation of antibacterial activity. *Mater Sci Eng C* 2018;90:308–13. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.04.076>.
- [187] Xiao Z, Yuan M, Yang B, Liu Z, Huang J, Sun D. Plant-mediated synthesis of highly active iron nanoparticles for Cr (VI) removal: Investigation of the leading biomolecules. *Chemosphere* 2016;150:357–64. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.02.056>.
- [188] Yin IX, Yu OY, Zhao IS, Mei ML, Li QL, Tang J, et al. Inhibition of dentine caries using fluoride solution with silver nanoparticles: An in vitro study. *J Dent* 2020;103:103512. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2020.103512>.
- [189] Nimbeni SB, Nimbeni BS, Divakar DD. Role of chitosan in remineralization of enamel and dentin: A systematic review. *Int J Clin Pediatr Dent* 2021;14:562–8. <https://doi.org/10.5005/jp-journals-10005-1971>.
- [190] Zhao IS, Mei ML, Burrow MF, Lo ECM, Chu CH. Prevention of secondary caries using silver diamine fluoride treatment and casein phosphopeptide-amorphous

calcium phosphate modified glass-ionomer cement. J Dent 2017;57:38-44.
<https://doi.org/10.1016/j.jdent.2016.12.001>.

Financiación |

Este estudio ha sido financiado por el proyecto PID2020-116660GB-I00 del Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) del Gobierno de España y FEDER A-RNM-408-UGR20. Parte de la investigación se ha realizado con *Fondos Europeos Next Generation*. La financiación doctoral durante parte del desarrollo de la investigación fue obtenida mediante Beca “Presidente de la República” del Programa Nacional de Becas y Crédito Educativo- Pronabec-Perú.

Producción Científica |

Artículos de revistas que forman parte de esta tesis doctoral

- **Cifuentes-Jiménez, C. C.,** Bolaños-Carmona, M. V., Enrich-Essvein, T., González-López, S., & Álvarez-Lloret, P. (2023). Evaluation of the remineralizing capacity of silver diamine fluoride on demineralized dentin under pH-cycling conditions. *Journal of Applied Oral Science*, 31, e20220306.
- **Cifuentes-Jimenez, C.,** Alvarez-Lloret, P., Benavides-Reyes, C., Gonzalez-Lopez, S., Rodriguez-Navarro, A. B., & Bolaños-Carmona, M. V. (2021). Physicochemical and Mechanical Effects of Commercial Silver Diamine Fluoride (SDF) Agents on Demineralized Dentin. *Journal of Adhesive Dentistry*, 23(6).
- En revisión *Dental Materials* (14/10/2023): **Cifuentes-Jimenez, C.,** Bolaños-Carmona, M. V., Enrich-Essvein, T., González-López S., Rodriguez-Navarro, A. B., Yamauti M., & Álvarez-Lloret, P. (2023) Effects of functionalised silver nanoparticles synthesised using plant extract (*Camellia sinensis*) on the physicochemical and mechanical properties of demineralised dentine.

Otras publicaciones

- Hernández-Ruiz, R. E., Rosel-Gallardo, E. M., **Cifuentes-Jiménez, C.,** González-López, S., & Bolaños-Carmona, M. V. (2022). Gender and Leadership Positions in Spanish Dentistry. *INQUIRY: The Journal of Health Care Organization, Provision, and Financing*, 59, 00469580221109970.

- Zuluaga-Morales, J. S., Bolaños-Carmona, M. V., **Cifuentes-Jiménez, C. C.**, & Álvarez-Lloret, P. (2021). Chemical, microstructural and morphological characterisation of dentine caries simulation by pH-Cycling. *Minerals*, 12(1), 5.
- Enrich-Essvein, T., Rodríguez-Navarro, A. B., Álvarez-Lloret, P., **Cifuentes-Jiménez, C.**, Bolaños-Carmona, M. V., & González-López, S. (2021). Proanthocyanidin-functionalized hydroxyapatite nanoparticles as dentin biomodifier. *Dental Materials*, 37(9), 1437-1445.

Comunicaciones en congresos

- **Póster:** Chemical and Mechanical Effects of Silver Diamine Fluoride in Dentine. CED-IADR 2019-Madrid, España.
- **Póster:** Preparación sostenible de nanopartículas de plata mediante química verde para aplicaciones odontológicas. SEOc-2022-Salamanca, España.
- **Póster:** Silver diamine fluoride affects the bonding of a self-etch adhesives to carious-dentin. IAD 2023-Konya, Turquía

Estancia de investigación

- Universidad de Hokkaido (Japón. 3) meses /Octubre2022-Enero2023. Supervisor Prof. Hidehiko Sano. Director del Departamento de Odontología Restauradora.

Becas y Premios

- 2017- 2021: Beca “Presidente de la República” del Programa Nacional de Becas y Crédito Educativo- ronabec-Perú.

- 2022: Premio al mejor artículo: Proanthocyanidin-functionalized hydroxyapatite nanoparticles as dentin biomodifier. Congreso SEOC.
- 2022: Ayudas de Movilidad Internacional de Estudiantes de Doctorado (Universidad de Hokkaido, Japón). Universidad de Granada, España.

Proyectos

- Eficacia antimicrobiana y de remineralización de nanopartículas metálicas obtenidas mediante la tecnología verde. Plan de investigación de la Universidad de Granada 2021.

