

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC

Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia

Dissertação de Mestrado

Adrienne Marlise Mendes Brito

Efeitos químico-estruturais promovidos pelo laser de Nd:YAG,  
associado ou não ao fluoreto, quando empregado para prevenção  
da progressão de lesões de cárie radicular

Santo André

2014



Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia

Dissertação de Mestrado

Adrienne Marlise Mendes Brito

Efeitos químico-estruturais promovidos pelo laser de Nd:YAG, associado ou não ao fluoreto, quando empregado para prevenção da progressão de lesões de cárie radicular

Trabalho apresentado como requisito parcial

para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia

sob orientação da Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Patricia Aparecida da Ana e

Co-orientação do Prof. Dr. Emery C. C. C. Lins.

Santo André

2014

Adrienne Marlise Mendes Brito

**Efeitos químico-estruturais promovidos pelo laser de Nd:YAG, associado ou não ao fluoreto, quando empregado para prevenção da progressão de lesões de cárie radicular**

Essa dissertação foi julgada e aprovada para obtenção do grau de mestre em Biotecnologia no Curso de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do ABC.

Santo André, 30 de maio de 2014.

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Marcella Peccora Milazzotto

Coordenadora do Curso de Pós-graduação em Biotecnologia

BANCA EXAMINADORA

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Patrícia Aparecida da Ana  
UFABC

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Juliana K.M.F. Daguano  
UFABC

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Denise Maria Zzell  
IPEN-CNEN/SP

**Este exemplar foi revisado e alterado em relação à versão original, de acordo com as observações levantadas pela banca no dia da defesa, sob responsabilidade única do autor e com a anuência de seu orientador.**

**Santo André, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_.**

**Assinatura do autor: \_\_\_\_\_**

**Assinatura do orientador: \_\_\_\_\_**

## DEDICATÓRIA

Aos meus amados pais, Milton e Eunice, pela educação que me proporcionaram, pelo exemplo de dedicação e responsabilidade e pelo apoio e carinho que sempre me deram. E de maneira especial dedico essa conquista à minha mãe, pelos seus 50 anos de exemplar exercício do magistério!

À meus filhos João Lucas e Ana Luísa , com amor e gratidão por entenderem minha ausência e me apoiarem.

Ao Jeverson, por cuidar dos nossos filhos para que eu me dedicasse a esse projeto. Sou muito grata, eu não teria conseguido sem sua ajuda e apoio!

## AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À minha orientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Patrícia Aparecida da Ana por me ensinar sempre com generosidade e paciência. Sua dedicação, competência, entusiasmo, organização e carinho nos motivam a nos superar a cada dia. Muito obrigada pela oportunidade e confiança.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Emery C.C.C. Lins pelas explicações e auxílio sempre que precisei. Seu entusiasmo pela pesquisa científica é contagiante e seu jeito extrovertido de ensinar facilitou meu processo de aprendizagem. Obrigada!

## AGRADECIMENTOS

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Prof.Dr.Luciano S. da Cruz, Prof. Dr.Felipe Chen Abrengo e Prof. Dr.Wanius J.Garcia da Silva por ensinarem os complexos conceitos da Física de uma maneira tão competente que mesmo quem não tinha formação na área de exatas conseguia entender! À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Marcella P. Milazzotto e ao Prof. Dr. Fernando C. Giacomelli pelo cuidado em proporcionar contato com pesquisadores de diversas áreas do conhecimento de maneira que contemplasse os diversos interesses de um grupo tão heterogêneo quanto essa primeira turma de mestrado em Biotecnologia.

A Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Márcia Tsuyama Escote pela gentileza de permitir o uso de equipamento de seu laboratório no início desse trabalho.

À colega Daísa , pela agradável convivência, auxílios e discussões.

À colega Aline, pela paciência e carinho nos ensinamentos no início do curso.

Aos técnicos do Laboratório de Biomateriais (L501-1) Jonny, Robson e Fábio pelo auxílio e agradável convivência. À todos os técnicos do Laboratório de Materiais (L505-1) pela disponibilidade e orientações.

Aos técnicos do Laboratório Didático VII (L702-B), por permitirem o uso dos equipamentos e pela generosidade em compartilharem comigo seu conhecimento, tempo e espaço. Ao Sr. Osmando, pelas preciosas dicas. Ao Guilherme, pelo competente auxílio quanto ao uso do microdurômetro e das medidas de microdureza

À Central Experimental Multiusuário da UFABC, pelo uso dos equipamentos de espectroscopia.

Ao Laboratório Especial de *Laser* em odontologia (L.E.L.O.), por permitir a utilização do equipamento *laser* empregado nesse trabalho.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Denise Maria Zezell , do IPEN-CNEN/SP, pelo empréstimo do medidor de potência e da pasta de carvão utilizados nesse trabalho.

À UFABC pela bolsa de mestrado concedida.

À todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desse trabalho.



## RESUMO

Nos últimos anos, tem sido reportado o aumento na incidência de lesões de cárie radicular, o que sugere a necessidade de estratégias preventivas que atuem de forma duradoura neste tecido, tais como o uso de *laser* de alta intensidade. Desta maneira, o presente trabalho avaliou os efeitos composicionais promovidos pelo laser de Nd:YAG ( $\lambda = 1064 \text{ nm}$ ) quando empregado para prevenção da progressão de lesões de cárie em dentina radicular, quando associado ou não à aplicação tópica de fluoreto. Para tal, foi conduzido um estudo *in vitro* empregando-se 60 blocos de dentina radicular bovina, os quais foram inicialmente desmineralizados por 32 horas buscando-se simular a instalação de uma lesão incipiente de cárie. Em seguida, os blocos foram aleatoriamente distribuídos em 6 grupos experimentais (n=10): G1 – sem tratamento, não submetido à ciclagem de pH (grupo cárie inicial); G2 - sem tratamento e submetido à ciclagem de pH (controle negativo); G3 – tratado com flúor fosfato acidulado - FFA (controle positivo); Grupo 4 – irradiado com laser de Nd:YAG ( $84,9 \text{ J/cm}^2$ , 60 mJ/pulso); G5 – laser de Nd:YAG+FFA; G6 – FFA+laser de Nd:YAG. Na sequência, foi simulada a progressão das lesões de cárie por meio de ciclagem de pH com duração de 4 dias nos grupos G2 a G6, sendo o grupo G1 usado para comparação. Mudanças composicionais e de fluorescência foram monitoradas antes e depois da desmineralização inicial e após os tratamentos. Após a ciclagem de pH, foi avaliada a resistência à desmineralização de todas as amostras por meio da microdureza seccional. Foram observadas mudanças químicas oriundas do processo de desmineralização da dentina, tais como a redução no conteúdo de fosfato e carbonato, expondo a matriz orgânica. A irradiação laser promoveu mudanças químicas e na fluorescência na dentina principalmente quando associado à aplicação tópica de FFA; sendo que a associação de tratamentos promoveu significativa redução da perda de microdureza. Foi possível concluir que a irradiação da dentina com laser de Nd:YAG previamente à aplicação tópica de FFA promove mudanças composicionais na dentina desmineralizada que alteram a fluorescência e reduzem a perda de microdureza deste tecido, apresentando-se como a melhor estratégia de tratamento para a progressão de lesões de cárie radicular. Palavras-chave: laser de Nd:YAG, dentina radicular, prevenção da cárie, mudanças químicas, fluorescência.

## ABSTRACT

In the last years, the incidence of root caries lesions has increased, which suggests the necessity of preventive methods that effectively act in root dentin as, for example, the use of high intensity lasers. This study evaluated the compositional effects of Nd:YAG laser when applied for prevention of progression of root dentin associating or not laser irradiation with topical application of acidulated phosphate fluoride (APF). For that a blind in vitro study was performed in which sixty bovine dentin slabs were prepared and demineralized by 32h in order to create early caries lesions. After that, the slabs were divided into six groups: G1) untreated and were not submitted to a pH-cycling model(early caries lesions group); G2) untreated and were submitted to a pH-cycling model (negative control); G3) acidulated phosphate fluoride application –APF(positive control); G4) Nd:YAG irradiation (84.9 J/cm<sup>2</sup>, 60 mJ/pulse); G5) Nd:YAG + APF; G6) APF + Nd:YAG. After that, the progression of caries lesions were simulated by a 4-day pH-cycling model in G2 to G6 group and G1 group was used for comparison. The compositions changes and fluorescence changes were determined on the slabs before and after early demineralization and also after treatments. The microhardness measurements were recorded in all slabs after pH-cycling model in order to assessed an acid-resistant of the dentin. Demineralization promoted reduction in carbonate and phosphate contents, exposing the organic matter. Nd:YAG laser irradiation promoted chemical changes and fluorescence changes mainly when associated with APF application. The treatment association has resulted in significant reduction in dentin microhardness values and the best results were obtained when laser irradiation was performed before APF. In conclusion, the Nd:YAG laser association promotes compositional changes on dentin, mainly when performed before APF application ,which modified the fluorescence and decreased the reduction in microhardness of dentin. The laser and APF association report like the best treatment device for prevention of root dentin caries.

Key-words: Nd:YAG laser, root dentin, caries prevention, chemical changes, fluorescence.

## Sumário

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>13</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>18</b>
<b>3 . REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>19</b>
<b>3.1. Considerações sobre os tecidos duros dentários humanos .....</b>	<b>19</b>
3.1.1. Estrutura anatômica e histológica dentária.....	19
3.1.2. Composição química dentária .....	21
3.1.3. Esmalte dental.....	31
3.1.4. Dentina .....	34
<b>3.2. Etiologia e mecanismo da doença cárie.....</b>	<b>40</b>
3.2.1. Cárie radicular .....	45
3.2.2. Incidência da cárie radicular .....	47
<b>3.3. O papel do flúor.....</b>	<b>50</b>
<b>3.4. A irradiação laser como técnica preventiva da cárie .....</b>	<b>59</b>
3.4.2 A irradiação com laser para prevenção da cárie na dentina.....	65
<b>3.5. Técnicas espectroscópicas.....</b>	<b>68</b>
3.5.1- Espectroscopia de absorção .....	68
3.5.2. Fluorescência .....	72
<b>4. MATERIAL E MÉTODO.....</b>	<b>78</b>
<b>4.1. Delineamento experimental.....</b>	<b>78</b>
<b>4.2. Preparo das amostras.....</b>	<b>80</b>
<b>4.3. Análises efetuadas nas amostras hígidas .....</b>	<b>82</b>
4.3.1. Análise composicional .....	82
4.3.2. Análise de fluorescência da dentina sadia – Sistema de Imagem da Fluorescência (SIF).....	86

4.4. Simulação do processo de cárie inicial <i>in vitro</i> .....	88
4.5. Tratamentos para prevenção da progressão do processo de cárie radicular .....	89
4.6. Simulação do desenvolvimento do processo de cárie <i>in vitro</i> : Ciclagem de pH .....	92
4.7. Análise da perda de microdureza seccional .....	94
4.8. Forma de análise dos resultados.....	97
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>100</b>
5.1. Análise composicional.....	100
5.2. Análise da imagem de fluorescência.....	108
5.2.1. Escolha da amostra para referência.....	108
5.2.2. Padronização do grau de hidratação da amostra referência .....	109
5.2.3. Análise das imagens de fluorescência das amostras com cárie inicial .....	112
5.2.4. Análise das imagens de fluorescência das amostras após tratamentos e após ciclagem de pH .....	113
5.3. Análise por Microdureza Seccional .....	121
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>124</b>
<b>7. CONCLUSÃO .....</b>	<b>144</b>
<b>8. PERSPECTIVAS .....</b>	<b>145</b>
<b>9. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>146</b>
<b>10. APÊNDICE 1 .....</b>	<b>159</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A irradiação *laser* tem se tornado uma ferramenta de grande contribuição para a realização de diversos procedimentos odontológicos, o que lhe garantiu um aumento de popularidade no decorrer dos anos. É sabido que o *laser* apresenta-se como um excelente coadjuvante nas reparações teciduais e no tratamento de importantes lesões da cavidade oral, além de proporcionar excelentes tratamentos quando aplicado em cirurgias de tecidos moles e duros, detecção e remoção de tecido cariado, preparo cavitário e adesão terapias de clareamento dental, preparo do canal radicular tratamento da hipersensibilidade dentinária e também na prevenção da cárie (1; 2).

Nas últimas décadas, com o maior conhecimento do processo etiológico da cárie, houve a adoção de medidas preventivas com conseqüente diminuição na incidência e prevalência da cárie no Brasil (3; 4), resultando em índices na faixa recomendada pela OMS (Organização Mundial da Saúde), o que equivale ao indicador CPO (sigla para dentes cariados, perdidos e obturados) entre 1,2 e 2,6. Em 2003, o país tinha índice de 2,8, passando em 2010, para 2,1 (3). No aspecto preventivo, as práticas de higiene bucal, controle da dieta e principalmente o uso do flúor, por meio de métodos de fluoretação da água (obrigatório no Brasil desde a década de 1980), dentifrícios, enxaguatórios bucais e aplicação tópica profissional, tem resultado em um declínio importante no surgimento de lesões de cárie (4; 5; 6). Assim, métodos de diagnóstico precoce, associados a tratamentos que impeçam a instalação ou a progressão de lesões incipientes de cárie têm uma importância fundamental para manutenção desses baixos índices. Atualmente há um relativo controle dessa doença, entretanto, em algumas faixas etárias, os índices ainda apresentam-se elevados (3).

De acordo com os dados do último levantamento feito pelo Ministério da Saúde em 2010 - Pesquisa Nacional de Saúde Bucal - SB Brasil 2010 - (7), observa-se que ainda mais de 50% das crianças brasileiras com 5 anos de idade apresentam ou já apresentaram um episódio de cárie. Entretanto, conforme pode ser observado

na Figura 1, o número de crianças livres de cárie até os 12 anos, cresceu na proporção de 31% para 44% desde o levantamento anterior em 2003, significando 30% a mais de crianças que nunca apresentaram essa patologia. Na população adulta e idosa, apesar da incidência ser decrescente, a cárie continua sendo o principal problema de saúde bucal levando à perda dentária. Nessas faixas etárias pode-se observar a prevalência da cárie de raiz, sendo que essa condição não tratada é a mais frequente nas regiões Norte e Centro Oeste (3). Dados norte-americanos também confirmam essa tendência de acordo com dois levantamentos nacionais, um de 1988-1994 e outro de 1999-2002, nos quais foram observadas diminuição da porcentagem de casos de cárie, porém essa ainda se mantém acima dos 30% na população com mais de 60 anos (8; 9; 10; 11). Nos países europeus com renda elevada também é muito prevalente a cárie radicular nos idosos, embora essa tenha declinado na última década, assim como a cárie coronária em outras faixas etárias, devido a cuidados pessoal e profissional (12; 13; 14; 15; 16).

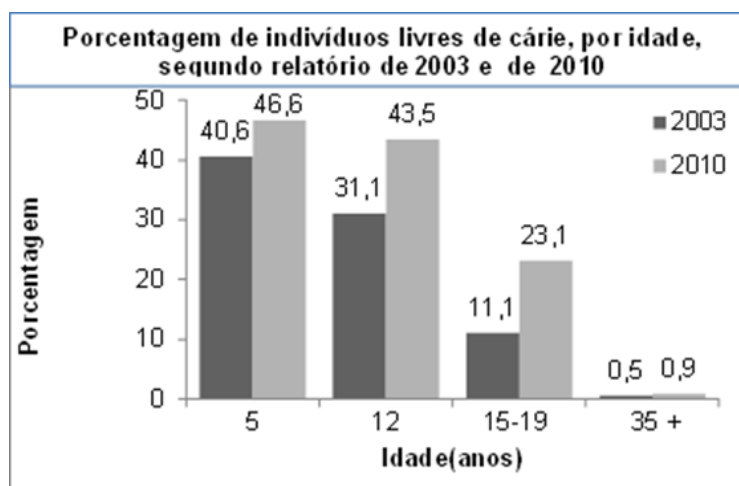


Figura 1 - Dados dos Relatórios Nacionais de Saúde Bucal Brasil 2010 e Brasil 2003 divulgados pelo Ministério da Saúde onde se observa que a porcentagem de indivíduos livres de cárie tem crescido a cada levantamento (7).

A cárie radicular é definida como aquela que ocorre nas superfícies radiculares que ficaram expostas ao ambiente bucal devido à recessão da margem gengival (17). Esse tipo de lesão está fortemente associado ao predomínio de uma colonização bacteriana específica, à perda de inserção periodontal ao longo dos anos, associada ou não à higiene oral inadequada (18), e representa uma

característica importante da relação entre cárie e envelhecimento (17). Entretanto, a conscientização de sua importância só ocorreu no início dos anos 1980 nos países de alta renda, com a percepção de que adultos velhos estavam mantendo mais dentes do que costumavam ter (6). Essa tendência vem se mantendo devido à gradativa melhoria das condições de saúde bucal nas últimas décadas, o que indica que as futuras gerações de idosos manterão seus elementos dentários e, como a recessão gengival é característica dessa idade, haverá um maior número de superfícies radiculares expostas à cárie (19). Ao considerar a redução da mortalidade infantil e o aumento da expectativa de vida da população, esse problema ainda se torna maior (6; 20; 21; 22). Ressalta-se que a prevenção é preferível ao tratamento restaurador, pois as dificuldades técnicas para restauração dessas superfícies, como o difícil acesso e isolamento adequados, comprometem a eficácia e durabilidade do tratamento (17; 21).

A medida de maior impacto preventivo tem sido o uso de flúor, que por possuir efeito local (24), mesmo em pequenas concentrações como a obtida pela ingestão de água fluoretada, são eficazes na redução da progressão dessa patologia. O flúor de uso tópico atua diminuindo a solubilidade dos tecidos bucais ao ser incorporado à hidroxiapatita formando apatita fluoretada e promove a remineralização por estar presente nos fluidos bucais. Essa presença altera o pH crítico no desafio cariogênico, possibilitando a ação biológica da saliva numa faixa de pH que na sua ausência provocaria dissolução de minerais dentários. Assim, ele sozinho não previne o aparecimento da lesão, pois não é capaz de interferir na formação do biofilme oral e na transformação de açúcares em ácidos, e sim paralisa a lesão inicial. No entanto, seu efeito é parcial, pois não impede completamente o desenvolvimento de lesões de cárie além de ser necessária sua presença constante no ambiente bucal (4; 25).

Desse modo, considerando a eficácia dos métodos de prevenção atuais – desorganização periódica do biofilme dental bacteriano, disciplina no consumo de carboidratos fermentáveis e uso do flúor (4), os quais necessitam da cooperação do indivíduo e de manutenção constante no ambiente oral, a cárie não será extinta, ainda que continue a diminuir na população (17). Desse fato decorre a necessidade da busca por novos métodos preventivos ou aperfeiçoamento dos já existentes, com

a utilização de técnicas que possam potencializar ou complementar as já adotadas para prevenção e controle da cárie dentária, nos segmentos onde a cárie tem se apresentado polarizada devido ao fato desses procedimentos estarem se mostrando insuficientes (26; 27).

A importância da busca por métodos que previnam a progressão das lesões de cárie radicular está relacionada às características específicas de uma população em crescimento a cada geração, representado por indivíduos que já possuem hábitos preventivos consolidados e, com o envelhecimento, passam a apresentar recessão gengival. E adicionalmente a esse fator, por situações adversas, tornam-se impossibilitados de praticar uma adequada higiene oral, como por exemplo, indivíduos doentes e funcionalmente dependentes física ou neurologicamente. Tais indivíduos correspondem, principalmente, aos que sofreram acidente vascular-cerebral ou doenças neurológicas como demências, Mal de Parkinson, Mal de Alzheimer, e têm os cuidados básicos diários de higiene oral comprometidos, passando a depender de ajuda. Essa população geralmente também possui alguma outra enfermidade ou faz uso de medicamentos que causam xerostomia (diminuição do fluxo salivar), a qual leva à perda da ação tampão da saliva resultando em maior propensão à desmineralização dentária. Essa é uma condição também apresentada por pacientes submetidos ao tratamento do câncer (17). Essas situações acometem a cada dia mais indivíduos (20) e são caracterizadas por rotinas extenuantes para os familiares em relação aos cuidados básicos de higiene. Vale ressaltar que, devido às suas características estruturais, a dentina é um tecido com alta e rápida solubilidade quando exposta ao desafio cariogênico, além de necessitar de flúor em maior quantidade, em relação ao esmalte, para uma ação remineralizadora (4; 17).

Novas possibilidades têm sido estudadas e o uso do *laser* de alta intensidade (28) com o objetivo de aumentar a resistência do tecido à desmineralização e de aumentar a incorporação de flúor tem se tornado uma alternativa promissora que independe da cooperação diária do usuário. Esse método caracterizaria uma intervenção profissional com duração de efeito maior que a aplicação tópica de flúor fosfato acidulado (FFA) isoladamente (28) e com



necessidade de atendimento odontológico menos frequente, o que poderia representar uma maior aceitabilidade clínica.

Dentro deste contexto, estudos têm sido realizados com a irradiação laser com finalidade preventiva, considerando sua importante interação com os tecidos duros dentais, assim como sua provável sinergia com o fluoreto (27; 28; 29; 30; 31; 32; 33; 34; 35; 36). Os lasers de alta intensidade, por seu efeito térmico localizado, podem promover modificações químico-estruturais nos tecidos duros irradiados, as quais são dependentes tanto da temperatura superficial atingida quanto do tempo de exposição dos tecidos à irradiação (30; 37; 38; 39).

Assim, observa-se que o laser de CO<sub>2</sub> e o laser de Nd:YAG são os mais populares e bastante estudados (2). Ambos têm sido indicados para prevenção de cárie de esmalte, onde resultados promissores foram encontrados. Entretanto, para uso preventivo em dentina, o laser de CO<sub>2</sub> tem apresentado resultados conflitantes, associado ou não ao flúor (40; 41) sendo que os resultados mais promissores foram obtidos com um comprimento de onda não disponível comercialmente (32). Em relação ao laser de Nd:YAG foram realizados estudos *in vitro*, *in situ* e clínicos, associados ou não ao uso do fluoreto, onde foram observados resultados favoráveis ao seu uso para prevenção de cárie em esmalte (42) e para tratamento de hipersensibilidade dentinária devido à sua capacidade de provocar a obliteração dos túbulos dentinários da região cervical dentária (43). Vale ressaltar que em relação à prevenção da cárie radicular os estudos são escassos (26; 44); entretanto, essa é uma questão que será relevante para as futuras gerações de idosos.

Considerando-se a alta prevalência de cáries radiculares, a importância de se prevenir ou paralisar a progressão dessas lesões e a ausência de relatos na literatura sobre o uso do laser de Nd:YAG para tal finalidade, o presente trabalho buscou verificar os efeitos desse laser em superfícies desmineralizadas *in vitro*, quando associada ou não à aplicação tópica de fluoreto. Para tal foram utilizadas duas técnicas ópticas que permitem a monitoração da composição química da dentina, sem serem destrutivas para as amostras, possibilitando análises nos vários tempos experimentais propostos.

## 2. OBJETIVOS

Tendo em vista a constante necessidade de aperfeiçoamento dos métodos existentes para prevenção da progressão de lesões de cárie radicular, o objetivo principal do presente estudo foi avaliar os efeitos químicos-estruturais promovidos pela irradiação com o laser de Nd:YAG frente ao processo carioso da dentina, associado ou não à aplicação tópica de fluoreto.

Como objetivos secundários, tem-se:

1 – avaliar as modificações composicionais promovidas pelo processo de cárie e pelos diferentes tratamentos na dentina radicular;

2 – avaliar as mudanças promovidas pelo processo carioso e pelos tratamentos propostos na fluorescência da dentina;

3 – avaliar os efeitos dos diferentes tratamentos na resistência da dentina radicular à desmineralização.

### **3 . REVISÃO DA LITERATURA**

Nesse capítulo, procurou-se ressaltar considerações a respeito dos tecidos duros dentais - principalmente a dentina; do mecanismo etiológico da cárie radicular, seus grupos de risco e suas formas de prevenção. A literatura foi revisada com relação aos efeitos do laser na prevenção da cárie em esmalte e dentina e sobre o estado da arte do laser de Nd:YAG. Considerações também foram feitas sobre a radiação eletromagnética e suas interações com a matéria visando a melhor compreensão das técnicas de análise usadas nesse estudo.

#### **3.1. Considerações sobre os tecidos duros dentários humanos**

A interação laser-tecido é dependente das características da radiação laser - comprimento de onda, características temporais de emissão, intensidade e densidade de energia do feixe - e do conhecimento das propriedades ópticas e térmicas do tecido biológico alvo o que permite encontrar os comprimentos de onda que possam provocar o efeito desejado (1; 28; 29). O conhecimento detalhado da estrutura anatômica, histológica, composição química e estrutura cristalográfica associadas às funções dentárias são importantes para o entendimento das alterações químico-estruturais no mecanismo da doença cárie, da ação do flúor e dos mecanismos envolvidos no efeito de *lasers* que resultam na prevenção da cárie assim como na desejada interação com a radiação eletromagnética com finalidade de diagnóstico .

##### **3.1.1. Estrutura anatômica e histológica dentária**

Os tecidos duros ou mineralizados do corpo humano – tecido ósseo, cimento, dentina e esmalte – estão associados ao dente em função, conforme

mostrado na Figura 2 (23). Anatomicamente o dente é dividido em coroa, que é a parte mais externa e visível, e raiz, a extensão oculta que o fixa a um conjunto especializado de estruturas de suporte, as quais consistem em osso alveolar, ligamento periodontal e cemento e se encontram protegidos pela gengiva (45).

Histologicamente o órgão dental é constituído de tecidos altamente especializados: esmalte, dentina, cemento e polpa. O esmalte se desenvolve como uma cobertura de proteção para a coroa dentária, sendo altamente mineralizado e por isso duro e friável, além de inerte, acelular e avascular. A dentina é a fase mineralizada do complexo dentina-polpa que constitui a maior parte do dente, e delimita uma câmara pulpar central e um canal radicular onde estão um tecido conjuntivo frouxo (denominado polpa) além da irrigação e a inervação dentárias. A dentina está coberta pelo esmalte na coroa e pelo cemento na raiz e, devido seu alto conteúdo de colágeno, sustenta o esmalte e compensa sua friabilidade (23).

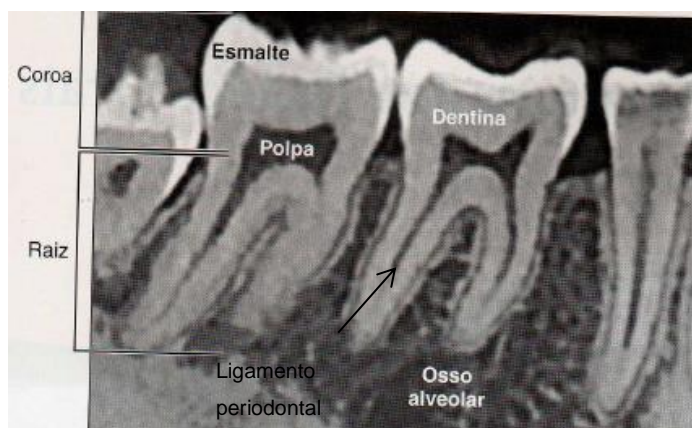


Figura 2 - Estrutura do dente: corte de tomografia computadorizada em feixe cônico vertical dos molares e pré-molares mandibulares.

Fonte : Adaptada de ten Cate: Histologia oral / Antônio Nanci [tradução Marcelo Sampaio Narciso]. Rio de Janeiro : Elsevier, 2013 (23)

Assim, os tecidos duros dentais apresentam características composicionais e estruturais que possibilitam ao dente desempenhar suas funções e solicitações do meio bucal, como resistência química aos ácidos presentes na dieta ou produzidos por microorganismos cariogênicos; resistência mecânica durante a mastigação ou hábitos parafuncionais (força de escovação excessiva, bruxismo, etc) e resistência a choques térmicos gerados pela ingestão de alimentos quentes ou

frios. Alterações das características desses tecidos ou sua exposição a condições orais adversas podem torná-los frágeis e inadequados, comprometendo a sua funcionalidade (23).

### 3.1.2. Composição química dentária

Quimicamente os tecidos dentários são constituídos de matriz orgânica, matriz inorgânica e água, diferindo em quantidade e disposição de tal forma que proporcionam as características químicas e mecânicas necessárias ao desempenho das funções dentárias. Na Tabela 1 são apresentados os valores percentuais de conteúdo orgânico, inorgânico e água do esmalte e da dentina (46).

Tabela 1 - Composição química do esmalte e da dentina com o percentual em volume e em peso do tecido (17; 46)

	Dentina		Esmalte	
	% em volume	% em peso	% em volume	% em peso
Inorgânico	48	69	92	97
Orgânico	29	20	2	1
Água	23	11	6	2

O componente mineral ou matriz inorgânica dos tecidos duros dentários consiste principalmente de um fosfato de cálcio semelhante à hidroxiapatita. A família dos fosfatos de cálcio (Tabela 2) corresponde a mineral de especial interesse para a odontologia e medicina, pois ocorrem normalmente no esmalte, dentina, cimento e osso e patologicamente, como em cálculo dental e calcificações. Também apresentam associações com a formação, progressão e controle da cárie em esmalte e dentina. Essa é uma família de minerais que contém íons de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) em conjunto com ortofosfatos ( $\text{PO}_4^{3-}$ ), metafosfatos ou pirofosfatos ( $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$ ) e ocasionalmente hidrogênio ( $\text{H}^+$ ) e íons hidroxila ( $\text{OH}^-$ ). Os sais de ortofosfatos são sais de ácido fosfórico tribásico ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) e podem formar compostos que contem

íons  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  (não encontrado em sistemas biológicos),  $\text{HPO}_4^{2-}$  ou  $\text{PO}_4^{3-}$  (ocorrem na parte mineral de ossos e dentes e várias calcificações patológicas) (47; 48).

Tabela 2 - Fosfatos de cálcio organizados por relação Ca/P (47).

Nome	Abreviação	Fórmula	Ca/P
Tetracálcio fosfato	TTCP	$\text{Ca}_4\text{O}(\text{PO}_4)_2$	2.0
Hidroxiapatita	HAP	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	1.67
Cálcio fosfato amorfo	ACP	$\text{Ca}_{10x}\text{H}_{2x}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	-
Tricálcio fosfato ( $\alpha, \beta, \gamma$ )	TCP	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1.50
Fosfato de octacálcio	OCP	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1.33
Dicálcio fosfato dihidratado	DCPD	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1.0
Tricálcio fosfato (monetite)	DCP	$\text{CaHPO}_4$	1.0
Fosfato de cálcio ( $\alpha, \beta, \gamma$ )	CPP	$\text{CaP}_2\text{O}_7$	1.0
Pirofosfato de cálcio dihidratado	CPPD	$\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1.0
Fosfato de heptacálcio	HCP	$\text{Ca}_7(\text{P}_5\text{O}_{16})_2$	0.7
Tetracálcio fosfato diácido	TDHP	$\text{Ca}_4\text{H}_2\text{P}_6\text{O}_{22}$	0.67
Fosfato de cálcio mono-hidratado	MCPM	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.5
Metafosfato de cálcio	CMP	$\text{Ca}(\text{PO}_3)_2$	0,5

No pH 7,4 dos fluidos tissulares a hidroxiapatita (HAP) é o mineral mais estável, por isso é essa a forma depositada durante o desenvolvimento dos tecidos. Entretanto, depois da erupção dentária, a apatita da porção mais externa do esmalte e da dentina pode ser exposta a uma ampla variação do pH em função da dieta e biofilme oral (17). Assim, de acordo com a variação do pH as outras três formas de fosfatos de cálcio (Tabela 3) podem se tornar estáveis e precipitar como cristais separados ou cobrir os cristais existentes no esmalte. Acima do pH 4,3 a HAP é a forma mais estável, porém a presença de íons adicionais, flúor ou magnésio, pode resultar em outras formas estáveis, como o fosfato tricálcio e fluorapatita. Isso explica a presença de outros fosfatos de cálcio no cálculo dental e no tecido cariado, conforme descrito na Tabela 3 (17; 47).

Tabela 3: Fosfatos de cálcio encontrados em sistemas biológicos humanos (47).

Fosfato de cálcio	Fórmula química	Ocorrência
Apatita	$(Ca,Z)_{10}(PO_4,Y)_6(OH,X)_2$	Esmalte, dentina, cimento, osso, cálculo urinário, pedras, calcificações de tecidos moles.
Fosfato de octacálcio	$Ca_8H_2(PO_4)_6 \cdot 5H_2O$	Cálculos dental e urinário.
Dicálcio fosfato dihidratado DCPD (Bruxita)	$CaHPO_4 \cdot 2H_2O$	Cálculo dental, condrocalcinose, cristalúria e deposição nos ossos.
Tricálcio fosfato, FTC- $\beta$ (Whitlockite)	$(Ca,Mg)_9(PO_4)_6$	Cálculos dental e urinário, pedras salivares, cárie dental, artrite cartilaginosa, calcificação de tecidos moles.
Fosfato de cálcio amorfo (ACP)	$(Ca,Mg)_7(PO_4)_7$	Calcificação de tecidos moles.
Pirofosfato de cálcio Dihidratado (CPPD)	$Ca_2P_5O_7 \cdot 2H_2O$	Depósito em fluido sinovial

Z=Na, Mg, K, etc ; Y=CO<sub>3</sub>, HPO<sub>4</sub>; X= Cl, F ; Y'= P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, CO<sub>3</sub>

Assim, durante o processo cariioso, ocorre a formação de outros fosfatos de cálcio cujo processo de formação depende de um grande número de variáveis. Os subprodutos desse processo e as estruturas finais estão descritas de maneira resumida na Figura 3 (46).

A família mineral das apatitas  $[A_{10}(BO_4)_6X_2]$  é cristalizada em prismas hexagonais, onde A é usualmente Ca<sup>2+</sup> ou Pb<sup>2+</sup>, B é P<sup>5+</sup> ou As<sup>5+</sup> e X é F<sup>-</sup>, Cl<sup>-</sup> ou (OH)<sup>-</sup>. A hidroxiapatita de cálcio (HAP) é representada na sua forma mineral pura como Ca<sub>10</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub>(OH)<sub>2</sub>. Essa fórmula indica apenas o conteúdo atômico de uma *célula unitária*, ou seja, corresponde ao menor número de íons cálcio, fosfato e hidroxila capaz de estabelecer relações estáveis, sendo a menor parte do cristal que contém suas características, e que, repetido tridimensionalmente, forma um mineral (17; 47)

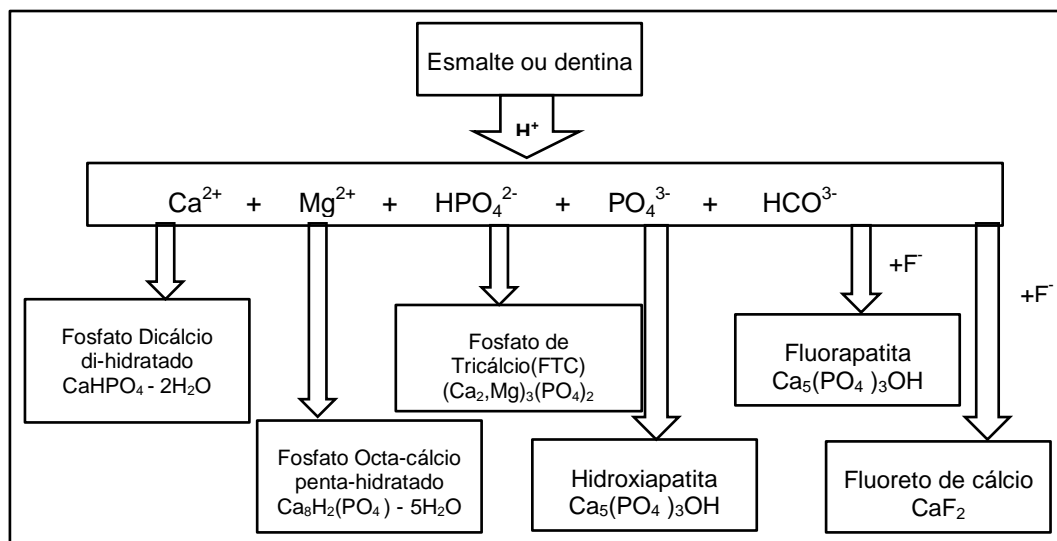


Figura 3 - Representação esquemática da dissolução dos tecidos duros dentais e formação de novas fases cristalográficas. Com os subprodutos da dissolução podem ser formados o fosfato de dicálcio di-hidratado, fosfato de octacálcio penta-hidratado, fosfato de tri-cálcio com magnésio, fluorapatita, fluoreto de cálcio e a própria hidroxiapatita (Adaptado) (46).

A célula unitária de apatita biológica é também hexagonal (Figura 4) e quando empilhadas em conjunto, essas células formam a trama estrutural de um cristal, sendo que o número de repetições desse arranjo produz cristais de vários tamanhos. Esses cristais formados geologicamente podem ser macroscópicos; entretanto, os formados sob condições biológicas geralmente são muito pequenos e, em geral, tem formato de agulha ou de placa, e, no caso do esmalte, formam fitas longas e delgadas (17; 47).

Cada cristal de apatita possui três compartimentos: o interior do cristal, a superfície do cristal e a capa de hidratação, todos os quais se encontram disponíveis para trocas iônicas. Nessas estruturas da apatita biológica podem ser observados diferentes íons substituintes, que podem ser adsorvidos à superfície dos cristais por atração eletrostática ou associados à capa de hidratação, alterando a rede cristalina e mudando suas propriedades cristalográficas (17; 23; 46; 47; 49).

Os cristais de apatita encontrados no esmalte e na dentina assemelham-se à hidroxiapatita mineral, porém do ponto de vista composicional as apatitas biológicas são sempre deficitárias de cálcio, tendo inclusões de carbonato, sódio,



flúor, magnésio, potássio, cobre, cloro, ferro, manganês, enxofre, chumbo e outros íons o que faz dessa apatita uma forma impura do mineral. Devido ao fato do carbonato ser seu maior substituinte - em torno de 3,5%-, nesses tecidos é então denominada de hidroxiapatita carbonatada (HAPcarb) podendo ser representada pela fórmula química  $(Ca,Mg,Na,X)_{10}(PO_4,HPO_4,CO_3)_6(OH,Cl)_2^-$ , onde X representa inclusões de outros íons (50).

Desse modo, o magnésio e o sódio podem ser substitutos na posição do cálcio; o flúor e o cloreto na posição da hidroxila, e o carbonato nas posições da hidroxila e do fosfato. Clinicamente, esse padrão de variabilidade iônica é usado para modificar a estrutura dos cristais através de sua exposição a um ambiente rico em fluoreto. Diferentes processos químicos também podem alterar a estrutura cristalográfica desses tecidos ou formar estruturas adicionais sobre o tecido. A estrutura cristalográfica da hidroxiapatita carbonatada é mostrada na Figura 3C e 3D (17; 23; 46; 47).

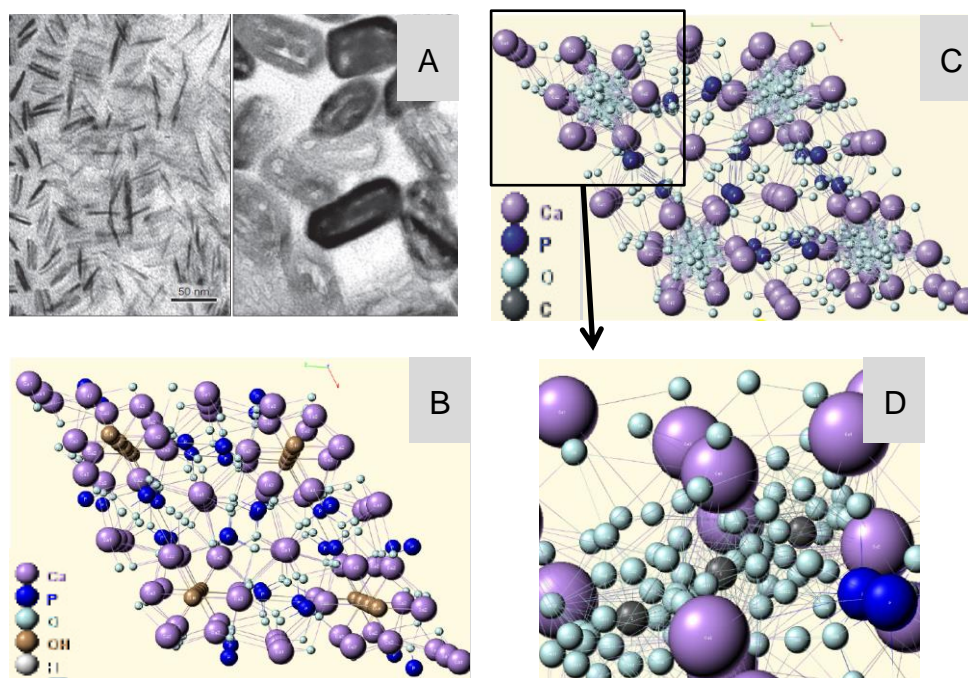


Figura 4 - Estrutura cristalina de tecido duro dental. **A** - cortes transversais de esmalte recém-formado no estágio de secreção e em estágios mais antigos de maturação (cristais maiores) onde se observa o contorno hexagonal dos cristais (49); **B** - estrutura cristalina da HAP pura de esmalte dental; **C** - estrutura da hidroxiapatita carbonatada; **D** - destaque para a incorporação de carbonatos ( $CO_3^{2-}$ ) (47).

(Fonte: Adaptado de Ten Cate's Oral Histology –Development, Structure, and Function/Antonio Nanci- 8th ed. Elsevier.2013 (49) e de Rabelo Neto (47).

As diversas substituições de íons na hidroxiapatita provocam efeito em sua solubilidade, dependente principalmente do pH, pois alteram a cristalinidade e as dimensões dos cristais. Em estudos de solubilidade comparativa de esmalte, dentina e osso observou-se que a dissolução ocorreu na seguinte ordem: dentina > osso > esmalte. Essa diferença de solubilidade foi atribuída às diferenças de tamanho de cristalitos, pois em difratogramas de raios-X do esmalte foi observada a forma mais estreita dos picos comparado com a dentina e o osso, sugerindo que os cristais de esmalte são maiores do que os dos outros dois tecidos (47). Em estudos *in vitro* de esmalte humano e hidroxiapatita pura, foi observado que a incorporação de íons carbonato e/ou magnésio causa a formação de cristais menores. Assim, a alta concentração de  $\text{CO}_3^{2-}$  na dentina e osso pode fazer com que sejam mais solúveis que o esmalte (47; 50).

Tem sido reportado na literatura que a presença de  $\text{CO}_3^{2-}$  na estrutura é a principal fonte de distorção da rede cristalina, pois cria microestresses e defeitos nas suas proximidades, influenciando muito a solubilidade (47). São citados dois tipos de incorporação do carbonato nas apatitas. A primeira delas, a substituição do tipo A, ocorre quando o carbonato substitui a hidroxila e a tipo B, quando o carbonato substitui o fosfato, sendo essa segunda a mais evidente na hidroxiapatita biológica. A substituição do fosfato pelo carbonato, com a quase simultânea substituição do cálcio pelo sódio provoca uma redução no tamanho dos cristais e mudanças em sua morfologia, com conseqüente aumento da área superficial, como também possível efeito na tensão do cristal. Além disso, a ligação  $\text{Ca-CO}_3$  é mais fraca que a ligação  $\text{Ca-PO}_4$ , fazendo com que a HAP mais carbonatada seja mais solúvel que a menos carbonatada. É importante observar que o carbonato é preferencialmente perdido durante o processo de desmineralização, sendo também excluído durante a remineralização (47; 50).

Entretanto, a incorporação de flúor promove um aumento no tamanho e na espessura dos cristais, além da diminuição da deficiência de cálcio e numa diminuição de solubilidade. Mesmo traços de flúor na solução quando a HAP se dissolve geram uma solução altamente supersaturada para HAP e especialmente fluorapatita, que então tende a precipitar ou crescer sobre a hidroxiapatita existente (17; 47; 50).

Também a ação térmica como a da irradiação laser altera as características cristalográficas da matriz mineral dos tecidos, tais como os parâmetros da rede cristalina, o tamanho dos cristais, elimina impurezas presentes nos sítios do fosfato e da hidroxila e possibilita ainda a formação de novos compostos cristalinos. Os dois últimos efeitos citados podem resultar em tecidos mais resistentes quimicamente (51). Na região entre 100-650 °C a HAP é estável e apresenta apenas uma expansão do parâmetro de rede  $\alpha$ . Entre 650-1000 °C ocorre o crescimento de cristais de HAP, a expansão do parâmetro de rede  $\alpha$  e a formação do fosfato de tricálcio na fase  $\beta$ . Na temperatura > 1100 °C a fase TCF- $\beta$  é convertida em FTC na fase  $\alpha$  e ocorre a fusão da HAP (1280 °C e a presença do FTeC (46).

As propriedades cristalográficas do esmalte e da dentina podem ser observadas na Tabela 4. A diferença entre os parâmetros de rede cristalina [Eixo- $\alpha$ (nm)] do esmalte e da dentina é pequena, apenas 0,002 nm. A relação Ca/P da HAP (Tabela 2) é importante para se avaliar a distribuição de cálcio e fósforo na estrutura, onde a relação ideal é ~1,67. Havendo alterações nesta relação tem-se um material deficiente em cálcio ou em excesso, o que pode levar a diferentes comportamentos nas propriedades do material (17; 46; 47).

Tabela 4 - Propriedades cristalográficas do esmalte e da dentina humana. (46)

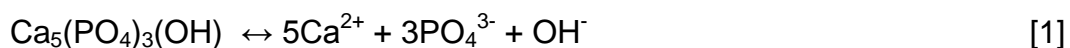
	Esmalte	Dentina
Eixo – $\alpha$ (nm)	0,944	0,942
Eixo – c (nm)	0,688	0,688
Cristalinidade	70-75	33-37
Cristais ( nm x nm ) <sup>(a)</sup>	130 x 30	20 x 4
Razão molar de Ca/P	1,63	1,61

Em relação à dissolução e crescimento de cristais tem-se que a solubilidade é convencionalmente descrita como a quantidade de sólido que pode dissolver em unidade de volume da solução. Todos os minerais possuem uma

<sup>a</sup> O tamanho dos cristais foi determinado a partir de valores médios correspondentes a suas seções transversais.

solubilidade característica na água em função da temperatura, por exemplo, a HAP tem  $KSP^b = 7,41 \times 10^{-60} \text{ mol}^9/\text{L}^9$  a  $37^\circ \text{C}$  e  $KSP = 3,72 \times 10^{-58}$  a  $25^\circ \text{C}$ , sendo esse valor uma constante para uma dada temperatura. Os cristais inorgânicos são dissolvidos pela água de maneira singular. As moléculas de água se movimentam na superfície do cristal e deslocam íons do cristal em função de sua capacidade de reduzir as forças de atração entre íons de cargas opostas, uma função da alta constante dielétrica da água. Além disso, as moléculas de água circundam os íons recém-liberados, e esta energia de hidratação supera a energia do cristal, garantindo a manutenção desses íons. A dissolução em água pura é relativamente rápida, mas diminui à medida que os íons constituintes dos cristais se acumulam na solução até que a dissolução total cessa e a solução é dita saturada para o mineral, embora ainda permaneça uma troca lenta de íons entre o cristal e a solução (17).

Entretanto, em relação à mudança de pH e concentrações de ácidos e bases, a solubilidade para os fosfatos de cálcio pode mudar em várias ordens de grandeza. O princípio do produto de solubilidade pode determinar se uma solução está saturada ou não com a HAP. Essa teoria deriva da ação da lei das massas, que afirma que a velocidade da reação é proporcional ao produto das massas dos reagentes, cada uma elevada à potência igual aos números de moléculas existentes. Foi determinado por convenção que para a HAP quando uma unidade de massa do sólido se dissolve, cinco íons cálcio, três íons fosfato trivalentes e um íon hidroxila serão liberados da solução, conforme reação abaixo (17):



Desse modo, o  $IAP^c$  da HAP é determinado pela multiplicação da concentração de íons cálcio (ou melhor, pela atividade química<sup>d</sup>) elevado à quinta potência pela concentração de fosfato trivalente elevada à terceira potência pela concentração de hidroxila, em mol/l (17):

---

<sup>b</sup> KSP significa produto de solubilidade de um sólido e possui valor constante em uma dada temperatura.

<sup>c</sup> IAP é o produto da atividade iônica

<sup>d</sup> Numa solução muito diluída, a atividade iônica é similar à sua concentração, no entanto, à medida que a concentração do sal solúvel aumenta, a atividade se torna significativamente menor que sua concentração em função das interações iônicas. A atividade está relacionada à concentração pelo coeficiente de atividade, podendo ser calculado com o conhecimento da força iônica, a salinidade da solução (17).

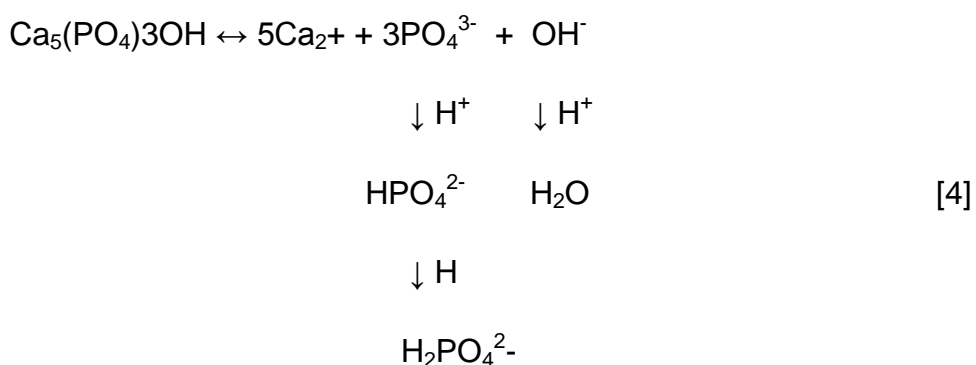
$$IAP_{HAP} = (Ca^{2+})^5 \times (PO_4^{3-})^3 \times (OH)^- \quad [2]$$

Quando uma solução contendo hidroxiapatita está saturada (isto é, não há mais dissolução da HAP) e o mineral em equilíbrio com os íons na solução, o  $IAP_{HAP}$  é igual ao produto de solubilidade da HAP ( $KSP_{HAP}$ ), uma constante com valor  $7,41 \times 10^{-60} \text{ mol}^9/\text{L}^9$  a  $37^\circ \text{C}$  (17).

Desse modo, no equilíbrio:

$$KSP_{HAP} = (Ca^{2+})^5 \times (PO_4^{3-})^3 \times (OH)^- = 7,41 \times 10^{-60} \text{ mol}^9/\text{L}^9 \quad [3]$$

Como já mencionado, a solubilidade da HAP e outros fosfatos de cálcio são muito afetados pelo pH da água em que são dissolvidos. Pelo que foi exposto, observa-se que quando o  $PO_4^{3-}$  e o  $OH^-$  se acumulam na solução, em conjunto com os íons cálcio, a dissolução da HAP diminui e é interrompida à medida que a solução se torna saturada. No entanto, se um ácido for adicionado, os íons  $PO_4^{3-}$  e  $OH^-$  combinam-se ao  $H^+$  (liberado pelo ácido) para formar  $HPO_4^{2-}$  e  $H_2O$ , respectivamente, removendo assim uma proporção dos íons  $PO_4^{3-}$  e  $OH^-$  (17).



Como exemplificado na Tabela 5, caso 1, onde o pH da solução diminuiu em uma unidade com a adição do ácido, o  $IAP_{HAP}$  também diminuiu e a solução é considerada insaturada (menos íons na solução) e mais HAP deverá ser dissolvido até a saturação ser restabelecida. No entanto, no caso 3 onde o pH da solução foi aumentado em uma unidade, o  $IAP_{HAP}$  é maior que o  $KSP_{HAP}$  e a solução é considerada supersaturada para a hidroxiapatita (mais íons na solução). Quando o pH de uma solução supersaturada é diminuído gradualmente, o ponto no qual a solução se torna saturada em relação ao mineral em questão é conhecido como “pH crítico”. No exemplo da tabela 5, o pH crítico é 6 (17).

Tabela 5 - Concentrações de cálcio e fosfato, atividades e produto de atividade para a HAP na mesma solução com pH 5, 6 e 7, a 37°C (Adaptada de Cárie dentária: a doença e seu tratamento clínico, 2011) (17).

	<b>Caso 1</b>	<b>Caso 2</b>	<b>Caso 3</b>
pH	5,0	6,0	7,0
Concentração total de cálcio(mol/L)	$2,2925 \times 10^{-4}$	$2,925 \times 10^{-4}$	$2,925 \times 10^{-4}$
Atividade de $\text{Ca}^{2+}$ (mol/L)	$2,553 \times 10^{-4}$	$2,539 \times 10^{-4}$	$2,452 \times 10^{-4}$
Concentração total de fosfato(mol/L)	$2,925 \times 10^{-4}$	$2,925 \times 10^{-4}$	$2,925 \times 10^{-4}$
Concentração total de $\text{PO}_4^{3-}$ (mol/L)	$1,652 \times 10^{-13}$	$1,546 \times 10^{-11}$	$9,395 \times 10^{-10}$
Atividade de $\text{PO}_4^{3-}$ (mol/L)	$1,215 \times 10^{-13}$	$1,136 \times 10^{-11}$	$6,822 \times 10^{-10}$
Atividade de $\text{OH}^-$	$4,787 \times 10^{-10}$	$4,787 \times 10^{-9}$	$4,787 \times 10^{-8}$
Produto de atividade total(mol/L) ( $\text{Ca}^{2+}$ ) <sup>5</sup> x ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) <sup>3</sup> x ( $\text{OH}^-$ )	$9,31 \times 10^{-67}$	$7,41 \times 10^{-60}$	$1,35 \times 10^{-53}$
	IAP < KSP Insaturada	IAP=KSP Saturada	IAP>KSP Supersaturada

Em cada caso as concentrações totais de cálcio e fosfato são as mesmas, 0,2925 mmol/L.  
No caso 2,  $\text{IPA}_{\text{HAP}} = \text{KSP}_{\text{HAP}}$  ( $7,41 \times 10^{-60}$ ), assim esta solução está saturada para HPA.

Ao observar a equação do produto de solubilidade numa solução saturada [1] e [3] pode-se observar que, se existe um excesso de um íon na solução, então menos dos outros íons será necessário para atingir o  $\text{KSP}_{\text{HAP}}$  pois, como já foi mencionado, o produto de solubilidade é uma constante a uma dada temperatura. Esse fato explica por que a adição de cálcio ou fosfato à solução onde a hidroxiapatita está se dissolvendo reduz a quantidade que será dissolvida, pois o aumento da concentração de um dos íons diminui a concentração necessária do outro para atingir a saturação. O princípio do produto de solubilidade também explica por que a remoção do cálcio da solução em equilíbrio usando um agente de ligação ao cálcio (por exemplo o ácido etilenodiaminotetracético-EDTA), causará maior dissolução da hidroxiapatita (17).

Sob condições adequadas novos cristais de HAP podem se precipitar da solução e pequenos cristais podem crescer em tamanho. Para que isso ocorra, a solução deve estar supersaturada para HAP, isto é, o  $\text{IAP}_{\text{HAP}}$  deve exceder o  $\text{KSP}_{\text{HAP}}$ , sendo necessário adicionar os íons constituintes à solução até que essa condição seja obtida, tanto pela adição isolada de cálcio e/ou fosfato como sais

solúveis, ou pelo aumento do pH (que aumenta as concentrações de  $\text{PO}_4^{3-}$  e  $\text{OH}^-$ ) ou ambos. Entretanto as soluções supersaturadas são instáveis e a formação de um cristal vai levar a precipitação de novos cristais se o nível de supersaturação estiver alto o suficiente, até a solução voltar a estar saturada. É devido a esse princípio que ocorre a remineralização na camada superficial da lesão cariiosa (17).

Assim, considerando-se o ambiente oral, os cristais de hidroxiapatita (esmalte e dentina) são dissolvidos em ácido provenientes da dieta, gástricos ou medicinais, porque a solução circundante (saliva e fluidos orais) torna-se insaturada em função da remoção de um ou mais componentes da mesma (pela ligação com íons provenientes da dissociação do ácido). A força motriz para a dissolução é o grau de subsaturação. A saliva contém quantidades consideráveis de cálcio e fosfato e está quase sempre supersaturada em relação à HAP e, portanto também para os cristais nativos do esmalte, visto que esses são mais solúveis. Desse modo, os tecidos duros dentais não se dissolverão sob condições normais, somente quando o ambiente estiver acidificado, o que ocorre na superfície dentária coberta pelo biofilme bacteriano (17).

### **3.1.3. Esmalte dental**

Vários estudos (27-36) têm investigado a interação da irradiação laser com o esmalte, associada ao não uso do fluoreto, entretanto em relação à dentina os dados são escassos. Apesar de esses dois tecidos dentários apresentarem constituição semelhante, possuem diferenças significativas na proporção dos constituintes e na maneira como estão organizado, o que parece interferir na referida interação. Assim, o conhecimento dessas diferenças estruturais torna-se importante na interpretação dos resultados do presente estudo.

O esmalte tem a função de fornecer aos dentes uma camada superficial mecanicamente forte e quimicamente resistente e para isso possui um alto grau de mineralização com complexa organização e uma matriz orgânica reduzida. Tem cerca de 92% em volume mineral, 2% em matriz orgânica e 6% em água (23). Os

cristais de hidroxiapatita carbonatada estão firmemente unidos, separados de seus vizinhos por finos espaços intercristalinos que são preenchidos por água e material orgânico, composto basicamente por proteínas não colagênicas de conformação globular, as amelogeninas, e lipídeos. Esses finos espaços assim preenchidos formam poros que permitem a passagem de pequenas moléculas tais como ácido láctico e íons como hidrogênio e cálcio. Assim, o alto conteúdo e o modo como a hidroxiapatita carbonatada está agrupada torna o esmalte um sólido microporoso e, portanto, permeável às trocas iônicas com a saliva quando há variação do pH na cavidade bucal e particularmente vulnerável à desmineralização pelo meio ácido proveniente de bactérias cariogênicas (17; 23; 50).

No esmalte, os cristais de hidroxiapatita carbonatada têm em média 50 nm de largura em corte transversal e mais de 100  $\mu\text{m}$  de comprimento no eixo C (longo eixo) (23). Cristalitos maduros podem ter milímetros de comprimento, formando fitas de cristais longas e delgadas, as quais se apresentam densamente compactadas e reunidas repetidamente numa organização de aproximadamente 1000 cristais, que formam os prismas ou bastões de esmalte. Os diversos prismas (Figura 5) apresentam-se separados pela substância interprismática, também composta de cristalitos de apatita alinhados numa direção diferente daquela dos prismas. Cada cristal é circundado por uma camada aquosa firmemente ligada que somente ao ser aquecido a 600 ° C pode ser totalmente removida (17; 23; 50).

Os cristais nesse tecido são muito mais extensos que os que se encontram na dentina ou no cimento, e, assim, apresentam uma área superficial menos reativa (23). Entretanto, do ponto de vista da química orgânica, a HAP reage às mudanças químicas de maneira similar nos três tecidos. Os pequenos cristais no cimento e dentina estão embebidos na matriz colágena, enquanto os cristais no esmalte estão circundados por proteínas de origem do desenvolvimento, abandonadas pelo tecido à medida que ocorre a maturação do esmalte. Apesar de corresponder a apenas 1% em peso, essas proteínas cobrem os cristais numa rede delicada e juntamente com as proteínas de origem salivar influenciam o comportamento químico do esmalte, agindo como inibidoras do crescimento da HAP (17) (23).



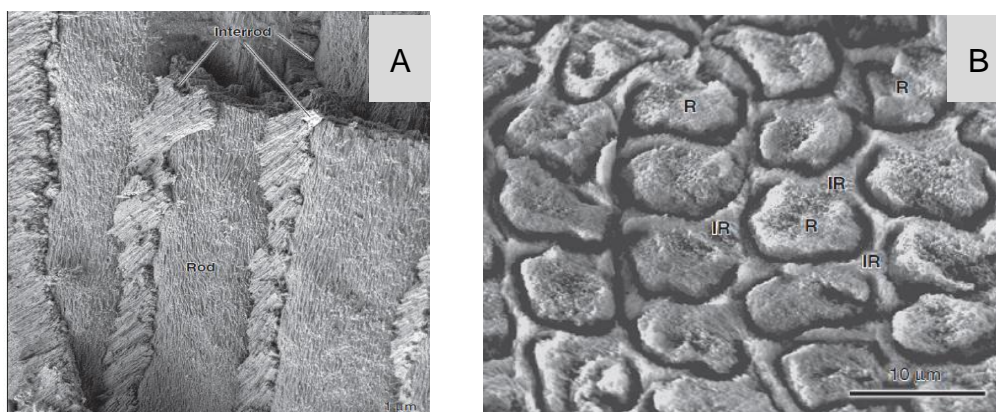


Figura 5 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura de alta resolução. A - observa-se que os cristais no esmalte prismático e no esmalte interprismático são semelhantes em estrutura, mas divergem em orientação; B, em corte transversal, observa-se que o esmalte interprismático circunda cada prisma. *IR*, esmalte interprismático; *R*, prisma.

Fonte: Adaptado de Ten Cate's Oral Histology – Development Structure, and Function/Antonio Nanci- 8th ed. Elsevier, 2013 (49)

Devido seu alto conteúdo mineral e matriz acelular mínima, a cor, dureza e outras propriedades físicas do esmalte como tecido são similares às do mineral hidroxiapatita (23). Ambos são incolores; a coloração levemente amarelada da coroa dentária é devida à dentina. Embora os cristais de HAP sejam transparentes, o fato de terem um índice de refração (IR) de 1,62 e estarem circundados pela água com um IR de 1,33 faz com que o esmalte apresente uma translucidez. Assim, se a água é substituída pelo ar, o esmalte passa a apresentar uma aparência opaca de giz. A HAP apresenta dureza média de 430 KHN (número de dureza Knoop) e o esmalte de 370 KHN; entretanto isso não reflete apenas a dureza desses cristais, mais também está relacionado à adesão dos cristais entre si. A solubilidade da apatita do esmalte corresponde à solubilidade do esmalte como tecido (17) (23)

### 3.1.4. *Dentina*

Enquanto o esmalte é um tecido avascular e acelular, e não pode responder às injúrias, a dentina e suas células, os odontoblastos, são partes do complexo dentino-pulpar e, portanto tecidos vivos que possuem reações defensivas específicas às agressões externas (52). A dentina é um tecido denso, duro, elástico, avascular, mas sensível, pois apresenta túbulos densamente agrupados que contém os prolongamentos dos odontoblastos que inicialmente a produziram e depois a mantêm. Os corpos dessas células se encontram alinhados ao longo da superfície interna da dentina, onde formam os limites periféricos da polpa dentária e dão à dentina a capacidade de sofrer reparos (23) .

Quando vista ao microscópio eletrônico de varredura, diversos aspectos estruturais (Figura 6) podem ser identificados: túbulos dentinários, dentina peritubular, intertubular e interglobular. Os túbulos dentinários são canalículos preenchidos pelos prolongamentos dos odontoblastos e por fluídos, que atravessam a camada de dentina da polpa até a junção com o esmalte, formando uma rede para a difusão de nutrientes por toda a dentina. Possuem um diâmetro maior na extremidade pulpar e na dentina radicular seguem um trajeto retilíneo, com pouco ou nenhum apinhamento e estão muito ramificados, diferentemente da dentina coronal onde apresentam formato de S e estão aglomerados. Sua configuração indica o trajeto seguido pelos odontoblastos durante a dentinogênese (23).

Os túbulos são delimitados por uma área de dentina mais intensamente calcificada e com pouco colágeno, denominada dentina peritubular. A dentina localizada entre os túbulos é a dentina intertubular formada por uma rede firmemente entrelaçada de fibrilas de colágeno (medindo entre 50 e 200 nm de diâmetro) nas quais os cristais de apatita estão depositados. As fibrilas estão dispostas aleatoriamente em um plano quase perpendicular em relação aos túbulos. A dentina interglobular representa uma área de calcificação deficiente presente principalmente na coroa de indivíduos que tiveram deficiência de vitamina D ou foram expostos a elevados níveis de fluoreto durante a formação da dentina (23).

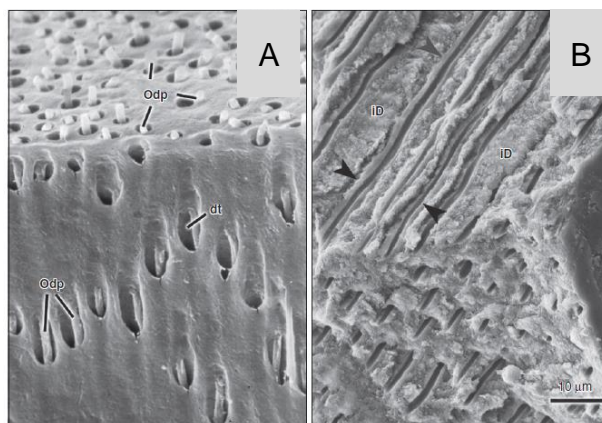


Figura 6: Preparações de microscopia eletrônica de varredura em dentina sadia. A - observa-se que cada túbulo é ocupado por um prolongamento odontoblástico (Odp) ou suas ramificações; B - observa-se que o túbulo dentinário é delimitado por uma camada de dentina peritubular (cabeças de seta) que é pobre em colágeno e é mais mineralizada do que o restante da dentina. Entre os túbulos há a dentina intertubular (iD).

Fonte : Adaptado de Ten Cate's Oral Histology –Development, Structure, and Function/ Antonio Nanci- 8th ed. Elsevier,2013 (49).

A natureza tubular da dentina possibilita um elevado grau de permeabilidade a esse tecido mineralizado o que pode intensificar um processo cariioso mais rapidamente, pois os túbulos podem ser preenchidos por bactérias. Entretanto a dentina terciária ou de reparação tem a capacidade de vedar esses túbulos na extremidade pulpar, quando há retração ou desintegração dos prolongamentos dos odontoblastos, o que conseqüentemente protege a polpa de infecções (23).

A dentina madura é composta, em volume, de aproximadamente 50% de matriz inorgânica, 30% de matriz orgânica e 20% de água (53) . O componente mineral também consiste em cristalitos de hidroxiapatita , porém na forma de pequenas placas uniformes localizadas dentro, na periferia e por entre as fibrilas de colágeno (Figura 7). Os cristalitos dentinários hexagonais possuem 3-30 nm em corte transversal e cerca de 50 nm de comprimento. Isso resulta numa proporção maior da área superficial/ volume do cristalito, e assim numa fase mineral mais reativa; diferentemente da organização do esmalte, no qual os cristalitos são mais extensos e com área superficial menor e, portanto menos reativa (17). Conseqüentemente a porcentagem de íons diferentes, que não sejam cálcio, fosfato

e hidroxila, é maior na dentina que no esmalte o que torna a hidroxiapatita carbonatada da dentina com maior solubilidade se exposto ao meio bucal (17; 23).

A fase orgânica da dentina tem cerca de 90% de colágeno (principalmente o do tipo I com pequenas quantidades dos tipos III e V) com inclusões fracionais de proteínas não colagênicas e lipídeos da matriz (23). O colágeno do tipo I atua como um arcabouço que acomoda uma grande proporção (aproximadamente 56%) do mineral nos orifícios e poros das fibrilas. As proteínas não colagênicas da matriz ocupam o espaço entre as fibrilas colágenas e acumulam-se ao longo da periferia dos túbulos dentinários, estas proteínas regulam a deposição de minerais e podem atuar como inibidoras, promotoras e/ou estabilizadoras, dependendo de sua localização (17; 23; 49).

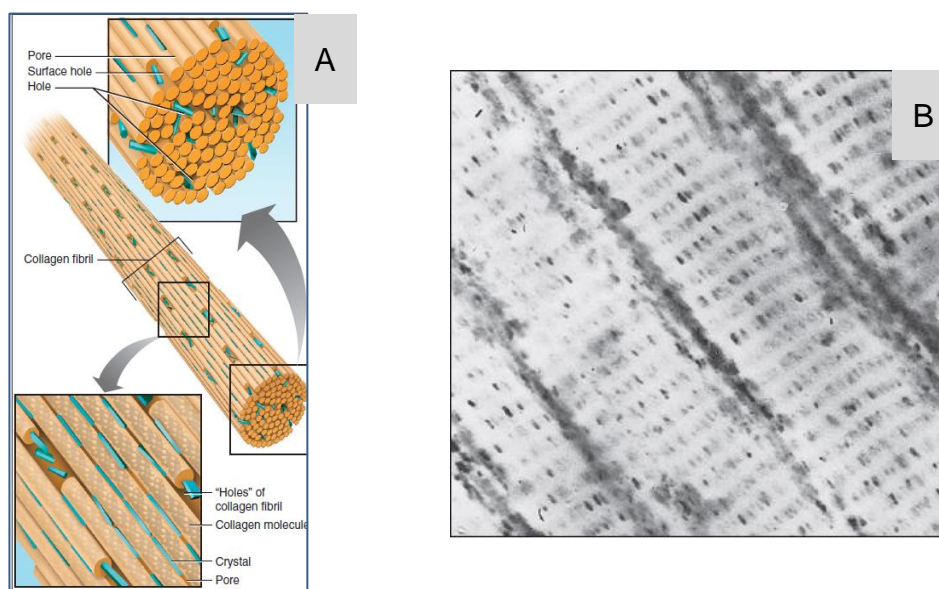


Figura 7 – Microestrutura da dentina. A - ilustração esquemática da localização do componente mineral na fibrila colágena; B - eletromicrografia mostrando a disposição dos cristais nos feixes de fibras colágenas. Os espaços nas fibrilas colágenas são os locais onde os minerais se depositam.

Fonte : Adaptado de Ten Cate's Oral Histology –Development, Structure, and Function /Antonio Nanci- 8th ed. Elsevier,2013 (49).

A matriz de colágeno está presente como uma hélice tripla, com tamanho de 300 nm de comprimento e diâmetro de 1,5 nm (23). Apresenta-se muito estruturada com três cadeias polipeptídicas entrelaçadas, que une os cristalitos de apatita, alguns dos quais são precipitados dentro da estrutura fina dessa hélice. Há

ainda muitos componentes não colágenos que determinam as propriedades dessa matriz, como as fosforoproteínas, fosfolípidos e proteoglicanas, que desempenham um papel na nucleação e controle da formação mineral durante a dentinogênese. Por um modo de ação similar esses componentes não colágenos podem interferir com o processo de desmineralização e remineralização na dentina. (23).

Devido à forma da cadeia estrutural de colágeno e sua relação com os cristalitos de apatita parece haver um sinergismo, ou mútua proteção, entre esses dois componentes uma vez que a fase mineral só pode ser parcialmente dissolvida durante o ataque ácido, enquanto a matriz não pode ser digerida pela ação enzimática das proteinases da matriz, visto que esta superfície é protegida pelos cristalitos de apatita (23). Essa composição estrutural geral da dentina e do cimento resulta em diferenças importantes na forma como os microorganismos interagem com a dentina e as superfícies radiculares no desenvolvimento da lesão cariosa em relação ao processo no esmalte. Além dos eventos químicos no mineral, haverá também a necessidade de uma atividade proteolítica grande por parte dos microorganismos para remover a matriz colagenosa durante o progresso do processo carioso (17; 23).

Durante todo o tempo de vida do dente há a formação de dentina pelos odontoblastos, inicialmente como uma camada de matriz não mineralizada constituída de colágeno e chamada pré-dentina, que varia de espessura e reveste a porção mais interna da dentina (pulpar) (53). Gradualmente essa camada se mineraliza em dentina à medida que várias proteínas não colagênicas da matriz são incorporadas na frente de mineralização. Ao longo de toda a margem dentina-polpa os mesmos odontoblastos formam a dentina primária ou a secundária (Figura 8). Esses dois tipos de dentina possuem a mesma proporção entre o componente mineral e o material orgânico, entretanto a secundária só se desenvolve após a completa formação da dentina radicular, sendo formada num ritmo mais lento e depositada principalmente no teto e assoalho da câmara pulpar. Além disso, possui estrutura tubular menos regular que é em sua maior parte contínua com a da dentina primária (23). Evidências indicam que os túbulos da dentina secundária tem mais facilidade de sofrer esclerose (preenchimento com material calcificado). Essas características parecem indicar que a dentina secundária faz parte de um processo,

correlacionado com a idade, que tende a reduzir a permeabilidade global da dentina, conseqüentemente protegendo a polpa e resultando em uma redução gradual, porém progressiva, no tamanho da cavidade pulpar (52). Esse processo parece ocasionar também a redução do número de células no tecido pulpar com conseqüente diminuição da capacidade de reparo da dentina com o decorrer da idade (17; 23).

Na área onde há injúrias, tais como atrito, desgaste, cárie ou um procedimento de restauração, a dentina terciária é produzida na extremidade pulpar dos túbulos dentinários, cuja quantidade e arquitetura estão relacionadas à resposta desencadeada pelas células diretamente afetadas pelo estímulo e dependem da intensidade e da duração desse (23). Quanto mais grave for a injúria, mais rápido é o ritmo de deposição da dentina. Seus túbulos podem ser contínuos com os da dentina secundária, esparsos em número e irregularmente organizados, ou ausência absoluta de túbulos. A dentina terciária é subclassificada em dentina reacional, depositada por odontoblastos pré-existentes, e dentina de reparação, produzida por células recém-diferenciadas semelhantes a odontoblastos (17; 23).

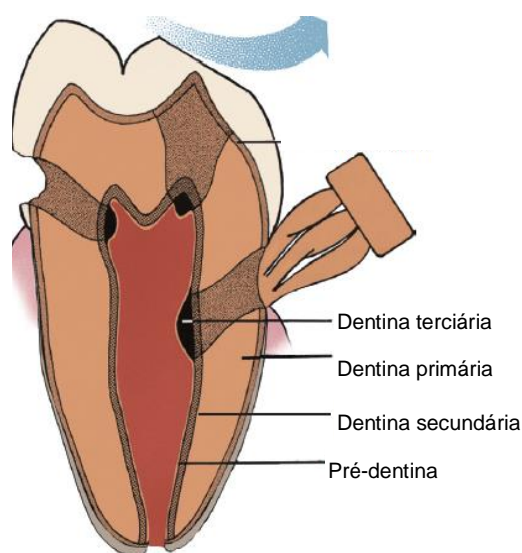


Figura 8 - Tipos de dentina e sua distribuição.

Fonte : Adaptado de Ten Cate's Oral Histology –Development, Structure, and Function/Antonio Nanci- 8th ed. Elsevier,2013 (49).

Outra modificação na estrutura da dentina que parece estar relacionada com a idade é a formação de uma dentina esclerótica, ou seja, dentina cujos túbulos dentinários se tornaram obliterados com material calcificado (53). Quando isso acontece em vários túbulos de uma mesma área a dentina assume uma aparência vítrea e torna-se translúcida. A quantidade de dentina esclerótica aumenta com a idade, sendo mais comum no terço apical da raiz e na coroa, a meio caminho entre a junção amelodentinária e a superfície da polpa. Esse processo começa na dentina radicular de pré-molares aos 18 anos de idade, sem qualquer influência externa identificável; por isso acredita-se que essa seja uma resposta fisiológica, e que a obliteração seja alcançada através de uma contínua deposição de dentina peritubular ou por outros processos de deposição de mineral dentro dos túbulos. Acredita-se que a esclerose pode ajudar a manter a vitalidade pulpar, pois ela reduz a permeabilidade da dentina (23).

Como na região da raiz não há esmalte, a dentina está coberta pelo cemento, que é um tecido conjuntivo mineralizado semelhante ao tecido ósseo - exceto por ser avascular - constituído por matriz de colágeno e por aproximadamente 50 % de hidroxapatita (23). Esse tecido se encontra firmemente preso à dentina. No terço cervical da raiz tem espessura muito fina, em torno de 80 a 120  $\mu\text{m}$  e baixa resistência ao desgaste. As raízes dentárias são cobertas e protegidas por ligamento periodontal e fibras, entretanto depois da retração gengival ou cirurgia periodontal, a raiz fica exposta. Se a proteção é perdida, o cemento e/ou a dentina radicular ficam expostos ao meio bucal e, portanto susceptíveis aos processos de desmineralização/remineralização e conseqüentemente à cárie. Sendo o cemento de baixa resistência, é então rapidamente removido pela escovação deixando a dentina exposta. E, nesse tecido, a progressão da cárie é mais rápida devido às suas características de menor mineralização, cristalitos menores e mais reativos, além de necessitar de maior quantidade de flúor para remineralizá-la. A cárie nessa localização é denominada de cárie radicular (17; 23).

É importante ressaltar que embora os modelos *in vitro* e *in situ* possam mimetizar os eventos físico-químicos que ocorrem durante a formação da lesão de cárie *in vivo*, sempre é necessário analisar os resultados considerando que os dentes no ambiente oral e com vitalidade pulpar responderão à maioria dos

estímulos provenientes desse processo através da produção dos vários tipos de dentina com aposição de minerais ao longo e dentro dos túbulos dentinários. Assim, esse fenômeno pode reduzir significativamente, *in vivo*, a taxa de progressão da lesão na dentina observada nos referidos modelos (17).

Entretanto, apesar dessa proteção apresentar-se eficaz para a polpa, pode não ser rápida o necessário e nem proteger a dentina exposta às variações frequentes do pH oral nem as consequências da diminuição da ação salivar decorrente de medicamentos ou patologias característicos da sociedade contemporânea, principalmente quando acometem a população idosa. Essa é uma questão nova a ser investigada em benefício das futuras gerações de idosos.

### **3.2. Etiologia e mecanismo da doença cárie**

O termo cárie dentária é usado para descrever os resultados – sinais e sintomas – de uma dissolução química da estrutura dentária causada por eventos metabólicos ocorrendo no biofilme (placa dentária) que cobre a área afetada e onde se estabeleceu um desequilíbrio entre o mineral dentário e o mesmo (54). A produção de ácidos pela microbiota cariogênica ocasiona a perda de cálcio e fosfato dos tecidos mineralizados, o que leva à destruição desses. A destruição pode afetar esmalte, dentina e cemento (17).

A doença cárie é de natureza infecciosa, multifatorial e dinâmica. Sabe-se que são quatro seus principais fatores determinantes: 1) existência de microorganismo específico (bactérias acidogênicas); 2) presença do biofilme dental acrescido de um substrato onde as bactérias encontram seus nutrientes (açúcares de baixo peso molecular proveniente da dieta); 3) um hospedeiro susceptível (características da estrutura dental e saliva) e o tempo de interação desses fatores. Todos eles precisam coexistir para que o processo se desenvolva. Além desses fatores determinantes, há os modificadores, tais como as atitudes e comportamento do indivíduo, bem como sua resposta imunológica e influência do ambiente que o envolve. Assim, a educação, a renda e o stress do indivíduo são também fatores



importantes que contribuem para a incidência e prevalência da doença, pois influenciam a atitude do indivíduo em relação aos fatores que podem ser mais facilmente alterados: higienização e dieta. Além disso, tais fatores também influenciam na motivação para o uso constante do flúor, o que representa uma medida de controle dessa patologia. A cárie dentária acomete indivíduos em qualquer faixa etária, mas devido principalmente a fatores comportamentais, está polarizada em crianças e adolescentes (26) e atualmente tem apresentado uma tendência de incidência ascendente na população idosa (17; 54; 55; 25).

Na saliva humana coexistem milhões de bactérias e alguns tipos se aderem à superfície dos dentes tomando parte do biofilme e formando uma estrutura tridimensional inclusa em uma matriz de material extracelular derivado das próprias células e do ambiente. A formação do biofilme inicia-se com a adsorção de proteínas salivares, lipídeos e alguns componentes do fluido gengival sobre o tecido duro dental, formando uma película proteínica de 1 a 10  $\mu\text{m}$  de espessura. Essa película adquirida facilita a colonização inicial por bactérias do tipo *Streptococos*, *Actinomyces* e bactérias gram-negativas. A medida que esses depósitos bacterianos se tornam mais espessos e que a concentração de oxigênio é diminuída, o meio formado torna-se atrativo para a adesão e multiplicação de outras espécies bacterianas, que são altamente capazes de sobreviver em meios ácidos, principalmente *S.mutans*, *S.sobrinus* e *Lactobacillus* (56). O biofilme se forma preferencialmente em áreas que não são frequentemente submetidas aos desgastes mecânicos, como nas superfícies próximas à gengiva e nos sulcos e fissuras da superfície oclusal dos dentes, que se apresentam como as áreas mais susceptíveis à formação de lesões de cárie (17).

As bactérias do grupo *S.mutans* possuem enzimas chamadas genericamente de glicosiltransferases, as quais estão presentes na superfície bacteriana e na película adquirida do esmalte. A partir da sacarose, exclusivamente, essas enzimas produzem polissacarídeos insolúveis que facilitam a aderência dessas bactérias mesmo às superfícies lisas. Ao mesmo tempo, a sacarose fornece energia para a multiplicação bacteriana e as mantém unidas (4). Assim, esse açúcar facilita a formação do biofilme, este se apresenta poroso devido aos polissacarídeos insolúveis, o que facilita a difusão de açúcares por ele, levando a quedas mais

acentuadas de pH na interface dente-biofilme. Adicionalmente, nesse tipo de biofilme há menores concentrações de cálcio, fosfato e flúor, dificultando a remineralização da superfície dentária nessa região (4).

Assim, a sacarose apresenta a capacidade de tornar alimentos anticariogênicos em cariogênicos, como é o caso do leite, que perde suas propriedades anticariogênicas quando é açucarado, devido a mudanças na estrutura do biofilme. Outra implicação clínica diz respeito a produtos amiláceos que podem ser considerados de baixa cariogenicidade para a dentina e não cariogênicos para o esmalte. Todavia, quando a sacarose é usada ao mesmo tempo em que o amido, o potencial cariogênico desse aumenta. Esses aspectos são relevantes quando se considera que esses alimentos fazem parte da rotina alimentar de muitos idosos doentes ou que vivem em instituições (4; 17) .

O controle da cárie usando agentes químicos tem sido pesquisado há muito tempo, desde que foi sugerido que os antissépticos que destroem as bactérias, ou limitam seu número e atividade, poderiam intervir na formação ou metabolismo do biofilme dentário, presumindo que o desenvolvimento da cárie dentária seria reduzido por eles (17). Entretanto, até o momento o agente químico ideal não está disponível e não há comprovação científica, em humanos, dos efeitos profiláticos contra cárie dos agentes disponíveis comercialmente. Apesar disso, alguns produtos têm sido indicados para uso intermitente ou contínuo para pacientes com alto risco de atividade e incidência de cárie, ou que sofrem de hipossalivação em função de doenças sistêmicas ou medicação (57). Assim tem sido sugerido o uso do digluconato de clorexidina por esse reduzir a formação de placa mesmo na presença da sacarose e ausência de escovação (4), bem como o uso desse agente associado ao fluoreto (58) para o controle da cárie. O mecanismo de ação seria, de maneira simplificada, que enquanto o flúor diminui o pH crítico, o antimicrobiano diminuiria a queda do pH pela inibição bacteriana (58). Entretanto, o uso da clorexidina como agente anti-cárie é controverso, apresentando efeitos questionáveis e apenas transitórios (59). Um grande risco de desequilíbrio desfavorável pelo extermínio de organismos benignos e benéficos também está presente. Além disso, produtos do metabolismo bacteriano e outros compostos presentes na cavidade bucal, bem como a organização espacial dos

microorganismos no biofilme, facilitam a retenção e a diversidade microbiana e possibilitam que as bactérias do biofilme tornem-se menos sensíveis aos produtos antimicrobianos (17; 50).

Apesar do potencial patológico das bactérias acidófilas, um estudo de 2013 (60; 61) feito com 399 pacientes diagnosticadas com câncer de cabeça e pescoço e 221 no grupo controle, observou que pessoas com mais cáries aparentavam ter menos chance de desenvolver essa patologia. A possível resposta para essa relação é que a presença dessas bactérias leva a uma resposta do sistema imunológico que também tem efeito protetor contra doenças inflamatórias e cânceres nessas regiões, correlação que estudos anteriores (62; 63) já haviam indicado. Se essa correlação estiver correta, a busca pelo agente antimicrobiano ideal e o procedimento ainda usado de indicação desses produtos em pacientes com alto risco de cárie deverão ser ainda mais questionados. E assim, o uso de laser como preventivo de cáries será uma boa opção.

Nos processos bioquímicos relacionados à cárie observa-se que, de maneira resumida, os açúcares de baixo peso molecular (sacarose, frutose, maltose, lactose) e os álcoois de açúcar, como sorbitol e manitol, são transportados e metabolizados no biofilme pelas bactérias que os convertem em ácidos orgânicos. Os ácidos formados difundem-se para o interior do tecido dentário adjacente, quando se dissociam em íons hidrogênio ( $H^+$ ), os quais podem interagir com as bases presentes na saliva e bicarbonato. O excesso desses íons de hidrogênio promove uma queda instantânea do pH do meio. Alguns mecanismos tendem a neutralizar esse pH, como os sistemas tampão da saliva, por meio dos íons fosfato, carbonato e por proteínas, o material orgânico do biofilme e também do cálculo, se presente. Quando o pH diminui para valores inferiores ao pH crítico, o meio fica insaturado para a HAP o que faz com que haja a liberação de íons cálcio e fosfato da superfície do esmalte para o meio oral (50; 4).

O pH crítico é o pH no qual a saliva apresenta-se saturada em relação à apatita do tecido. Enquanto o pH crítico é de 5,5 para o esmalte, para a dentina é de 6,5 (17). Assim, abaixo desse valor, a saliva está subsaturada em relação à apatita da dentina, os íons fosfato ( $PO_4^{3-}$ ) juntam-se aos íons hidrogênios disponíveis,

havendo a formação de  $\text{HPO}_4^{2-}$  e posteriormente, de  $\text{H}_2\text{PO}_4^{2-}$  que voltará a dissociar. À medida que diminui o pH, a solubilidade dos fosfatos de cálcio aumenta. Isso faz com que os íons fosfatos continuem deixando a superfície do dente para manter o equilíbrio (solução saturada) e a solubilidade da HAP torna-se mais pronunciada (4; 17; 50).

O pH do meio permanece crítico por um tempo de 20 minutos a horas e então voltará ao normal (4). Esse tempo dependerá da forma em que o açúcar é ingerido, em que período do dia, sendo também de grande importância a ação da saliva através de sua ação mecânica e química. Açúcar na forma líquida permite que o pH volte ao normal mais rapidamente que em alimentos pastosos e sólidos. Do mesmo modo, a ingestão após as refeições é melhor que à noite, antes de dormir, quando diminui o fluxo salivar. Entretanto, parece que as exposições frequentes ao açúcar, diminuindo e aumentando o pH rapidamente, pode esgotar os estoques de cálcio e fosfato do biofilme (que busca neutralizar os ácidos nesse rapidamente) e assim promover uma redução no grau de saturação induzida pelo pH, e isso aumenta o potencial cariogênico do fluido da placa. Esse fato explica por que a frequência de ingestão de açúcar é considerada mais danosa que o açúcar total ingerido nos indivíduos com cárie ativa (4; 17).

A saliva e os fluidos orais contêm quantidades consideráveis de cálcio e fosfato e em condições fisiológicas estão supersaturados para hidroxiapatita e fluorapatita, sendo essa a pré-condição para a existência da apatita dentária na boca (17). Se os fluidos orais estivessem insaturados para a apatita, os tecidos duros dentais se dissolveriam sem qualquer motivo. Em geral, quanto maior a supersaturação em relação ao sal, maior a tendência para sua formação. Assim, após o retorno do pH a valores acima dos valores críticos devido a ação do tampão salivar sobre os ácidos produzidos, essa supersaturação propiciará a reposição dos minerais perdidos durante o processo de desmineralização. Entretanto, a capacidade tampão salivar não é 100 % eficiente, sendo que alguns íons podem se distanciar da superfície do tecido e não ficarem disponíveis para redeposição. Em consequência, episódios frequentes de desmineralização e remineralização vão causando perdas progressivas de mineral até que o fenômeno atinja um estágio

clínico visível, que no esmalte é observado como formação de manchas brancas e cavitações e na dentina como uma lesão amarelada e amolecida (4; 17).

Quando o pH bucal diminui pela presença de ácidos, a solubilidade da HAP dentária aumenta consideravelmente, geralmente 10 vezes com a queda de uma unidade do pH, considerando-se a faixa de pH relevante para o ataque cariioso – entre 4 e 7. Adicionalmente, a dentina e o cemento são formados por cristais de HAP com maior incorporação de carbonatos em sua estrutura (o que causa distorções na rede cristalina tornando-a mais reativa) além dos cristais serem de menor tamanho (e portanto com uma área superficial mais ampla que o do esmalte, dando mais chance as reações) o que o torna esse mineral nesses tecidos mais solúvel que o do esmalte. Assim, a dentina e o cemento apresentam uma dissolução maior ainda ao ocorrer a diminuição do pH e portanto um processo cariioso com evolução mais rápida, devido à sua composição e ao fato de que esses tecidos naturalmente deveriam estar em contato com o fluido tecidual (que em condições fisiológicas sofre pouca influência das mudanças no pH e está altamente saturado para a HAP e os outros fosfatos biológicos) e não com a saliva que sofre grande influência das alterações do pH. Esses fatos justificam a grande necessidade de prevenção da cárie nesses tecidos (17).

### **3.2.1. Cárie radicular**

A cárie radicular engloba um conjunto de manifestações clínicas que variam desde áreas pequenas, amolecidas e descoloridas até áreas moles extensas, amarelo-acastanhadas, que podem envolver toda a superfície radicular, podendo estar ou não cavitadas. Mesmo nas lesões muito extensas, a cavitação não necessariamente envolve a polpa devido à propriedade dessa de produzir dentina terciária (17; 21).

As lesões de cárie radicular podem ser classificadas em ativas ou inativas (interrompida) (Figura 9). Quando ativa, a lesão apresenta uma área amolecida, bem definida, com coloração amarelada ou marrom-clara e provavelmente estará coberta

por biofilme dental. A lesão inativa ou interrompida tem aspecto brilhante, é relativamente uniforme e resistente à sondagem com pressão moderada. A cor varia entre amarelo, marrom e preto. Caso haja cavitação essa possui margens uniformes e nenhum depósito bacteriano visível é observado cobrindo essas lesões. Clinicamente permanecerá inalterada, a menos que a higienização não seja adequada nesse local. Lesões ativas podem ser inativadas em resposta a processos metabólicos do biofilme na presença do flúor, apresentando mudanças na textura e cor. Para diagnóstico diferencial de outras descolorações, observa-se que no aspecto físico a cárie radicular é geralmente bem ampla e mal definida (17; 18; 64).

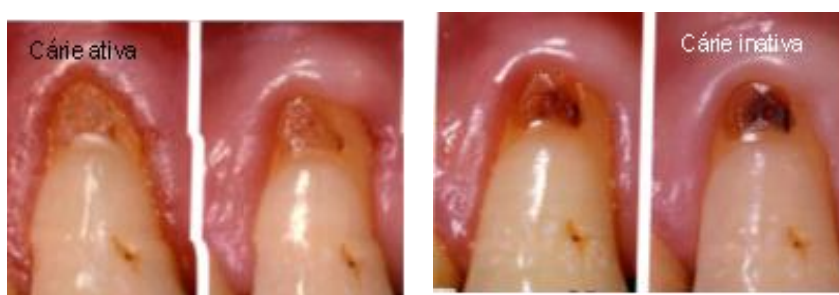


Figura 9 - Lesões de cárie radicular.

Fonte : Cárie dentária – a doença e seu tratamento clínico. Ole Fejerskov e Ewina Kidd– São Paulo:Santos, 2011 (4).

Microrradiograficamente, a perda mineral ocorre abaixo da zona superficial que geralmente apresenta-se mais mineralizada, principalmente na presença do flúor (17). Essa zona superficial varia em espessura e conteúdo mineral dependendo do desafio cariogênico do biofilme bacteriano presente, e se forma em um período relativamente curto (65). Em um estudo *in situ* foi observado que se a superfície radicular é coberta por biofilme intacto por 1-6 meses e apenas exposta aos fluidos orais, até os 3 meses ocorre perda progressiva de mineral na superfície e na subsuperfície da dentina, porém há também a formação de uma fina camada superficial com certo grau de remineralização. Mantendo as mesmas condições, após os 3 meses, observou-se aumento da profundidade da lesão e o conteúdo mineral na camada superficial diminui ao longo do tempo. Entretanto, quando nos 3 meses seguintes houve a remoção diária do biofilme e tratamento com flúor tópico

(2 tratamentos com solução de fluoreto de sódio a 2% por 2 minutos, um no início da remoção da placa e o outro 1,5 meses após), como resultado houve um ganho mineral total devido ao aumento do conteúdo mineral na camada superficial e à formação de zona mineral no corpo da lesão 125 µm abaixo da superfície (66).

Entretanto, diferentemente do que acontece com o esmalte (onde há inicialmente formação de uma lesão de mancha branca para apenas posteriormente ocorrer cavitação), na cárie radicular, em seu estágio inicial do desenvolvimento da lesão a superfície apresenta-se amolecida, pois os microrganismos penetram na zona superficial entre as fibras de colágeno parcialmente desmineralizadas (65). Nos estágios mais avançados da destruição, a desmineralização espalha-se por centenas de micrometros abaixo da superfície. A mudança na condição ambiental do biofilme (variação do pH para acima do valor crítico) que recobre essa cárie pode resultar na deposição de cálculo dental obliterando os defeitos radiculares correspondentes às lesões de cáries interrompidas (17; 23; 67).

### **3.2.2. Incidência da cárie radicular**

Com o avanço da idade há uma tendência dos indivíduos em sofrer recessão gengival devido fatores fisiológicos, hábitos incorretos de escovação, problemas inflamatórios, cirurgias periodontais, problemas oclusais e tabagismo (18; 19; 21). Quando há recessão gengival, a junção cimento-esmalte se torna o local com maior propensão de acúmulo de biofilme - por ser uma região altamente irregular - e, portanto, para o desenvolvimento de cárie radicular bem como de problemas gengivais, o que resulta em maior recessão. Em acréscimo, o consumo de dieta cariogênica, controle de biofilme deficiente, colonização por um biofilme específico além de problemas crônicos de saúde que se refletem na diminuição do fluxo salivar e em alterações na composição salivar contribuem para a instalação desse processo carioso específico (68; 69). Lesão de cárie radicular é um dos principais motivos de perdas dentárias em adultos, sendo essa a lesão mais prevalente na população idosa (17; 64; 70; 71; 72). Na Tabela 6 temos um resumo

das principais causas de secura bucal e em consequência do aumento da incidência de cárie radicular. (17; 10; 13; 73).

Tabela 6 - Principais causas da xerostomia (17)

	<b>A n t i d e p r e s s i v o s</b>	<b>D i u r é t i c o s</b>
<b>Medicamentos</b>	Drogas antipsicóticas Tranquilizantes Hipnóticos Anti-histamínicos Anticolinérgicos Anti-hipertensivos	Drogas antiparksonianas Supressores do apetite Antinauseantes Antieméticos Relaxantes musculares Expectorantes
<b>Doenças ou condições sistêmicas</b>	Síndrome de Sjogren Artrite reumatóide Diabetes HIV / AIDS Escleroderma Sarcoidose Mal de Parkinson Mal de Alzheimer Fibrose cística Asma	Derrame Desidratação Mudanças hormonais Gravidez Pós-menopausa Doença neurológica Distúrbios pancreáticos Distúrbios hepáticos Deficiências nutricionais Anorexia nervosa Desnutrição Tabagismo

#### **Radioterapia de cabeça e pescoço**

#### **Quimioterapia**

Nesses grupos de alto risco, o tratamento preventivo recomendado é o acompanhamento odontológico profissional frequente com aplicação tópica de flúor e/ou controle químico do biofilme, além do uso de saliva artificial quando necessário (21). Entretanto, sendo a cárie uma doença de etiologia multifatorial, sabe-se que até agora nenhuma técnica tem sido eficaz em preveni-la sem a desorganização periódica do biofilme e controle da ingestão de carboidratos fermentáveis.

Na Figura 10 observa-se uma situação extrema de cárie radicular. Há lesões extensas e ativas de cáries nas superfícies radiculares, com grande quantidade de depósitos bacterianos amolecidos, especialmente no canino superior. Esses dentes são muito difíceis ou impossíveis de restaurar. A figura à direita mostra o paciente 4 meses depois sendo que houve apenas o controle do biofilme durante esse período. As lesões estão agora predominantemente inativas. A superfície previamente amolecida está com aspecto que varia da consistência de couro à consistência rígida, e do ponto de vista biológico, a Odontologia Restauradora não



tem nenhum papel a exercer. Entretanto, se o paciente solicitar melhora estética, as restaurações poderiam ser realizadas, mas elas ainda seriam de difícil execução, mesmo usando materiais adesivos contemporâneos, além de não proporcionar a aparência estética desejada. (17).

Assim, a existência desses grupos específicos que ainda apresentam alto risco de cárie radicular enfatiza a necessidade de se aperfeiçoar os métodos preventivos já existentes, pois apesar dessa lesão cariosa ser caracterizada pela perda mineral muito similar à observada na cárie de esmalte, seu início e progressão são bem mais rápidos (17; 64). E quando se pensa em soluções para o problema, o tratamento restaurador por melhor executado que seja raramente devolve a aparência ou a saúde periodontal perdidas (Figura 10-B). Além disso, em relação a saúde oral, a prevenção sempre é mais eficaz e mais barata que o tratamento curativo ou restaurador (17; 21).

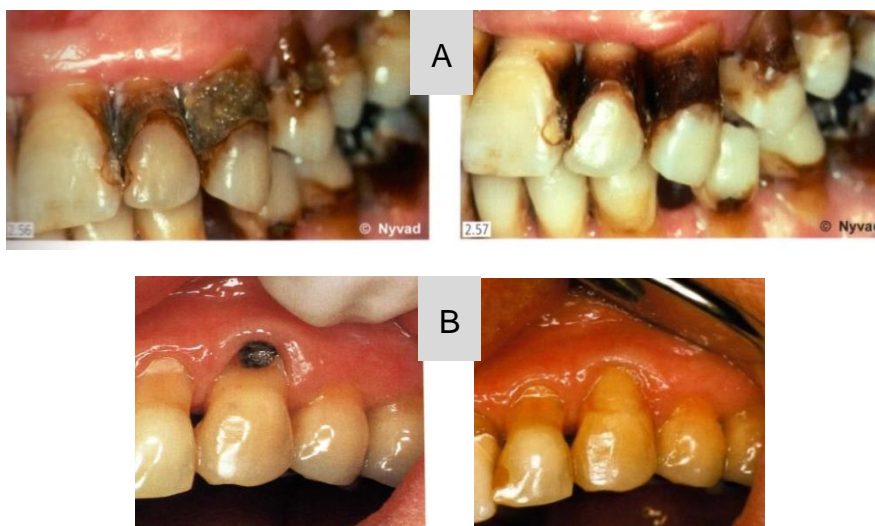


Figura 10 - Fotografias de lesão de cárie radicular. **A** – à esquerda, antes e à direita, após o tratamento periodontal; **B** - à esquerda, lesão de cárie radicular não tratada e à direita após o tratamento restaurador. Observe que o resultado não devolve a aparência e a saúde periodontal perdidas.

Fonte : Cárie dentária – a doença e seu tratamento clínico /Ole Fejerskov e Ewina Kidd; São Paulo:Santos, 2011.

### 3.3. O papel do flúor

A odontologia passou por grandes mudanças conceituais no século XX, sendo uma das mais significativas o entendimento da cárie dental como doença, seu tratamento e prevenção. Dentre as medidas adotadas, a de maior impacto para o controle do desenvolvimento da cárie tem sido o uso do elemento flúor - na água fluoretada, em dentifrícios, enxaguatórios bucais e em aplicações clínicas - embora seu uso isolado não impeça a instalação da cárie, apenas reduza a sua progressão (4). Estudos demonstram que as aplicações tópicas de flúor devam ser frequentemente repetidas para se modificar as propriedades do esmalte e dentina e garantir a manutenção do efeito anti-cárie (74; 24). Entretanto, o uso do laser de alta intensidade no esmalte com o objetivo de aumentar a resistência do tecido à desmineralização e de aumentar a incorporação do flúor tem se mostrado uma alternativa promissora que independe da cooperação diária do usuário. Assim, um profundo entendimento da ação do flúor torna-se importante para a análise dos resultados obtidos no presente trabalho assim como oferece respaldo para a indicação clínica da combinação dos tratamentos.

O termo flúor é o termo genérico para definir as formas: química iônica (fluoreto ou íon flúor), ionizável (mineralizada, na forma de monofluorofosfato de sódio-MFP) e não ionizável (ligado covalentemente) do elemento flúor. Esse tem sido usado de modo tópico sob forma de géis, espumas, bochechos, dentifrícios e vernizes fluoretados. O flúor de uso tópico atua diminuindo a solubilidade dos tecidos bucais ao ser incorporado à hidroxiapatita formando apatita fluoretada e promove a remineralização por estar presente nos fluidos bucais alterando o pH crítico no desafio cariogênico (4). Assim, ele não impede o aparecimento da lesão e sim paralisa a lesão inicial. Seu efeito é parcial, pois em alguns casos não impede completamente o desenvolvimento de lesões de cárie além de ser necessária sua presença constante no ambiente bucal (24).

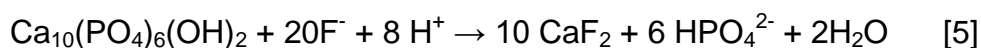
Os mecanismos de atuação do flúor são três principais: 1) inibição da desmineralização, por meio da formação de cristais do tipo fluoreto de cálcio ( $\text{CaF}_2$ ) que se depositam sobre a superfície dental e disponibilizam o íon fluoreto durante o processo de desmineralização e remineralização o que muda o pH crítico; 2)

potencialização da remineralização, com a formação de apatita fluoretada ou fluorapatita sobre as superfícies remineralizadas; 3) inibição do metabolismo bacteriano após sua difusão para o interior da bactéria, como moléculas de ácido fluorídrico que depois de dissociado inibe a atividade de enzimas essenciais para a bactéria (enalose/metabolismo de carboidratos) (4; 24; 50).

Quando os tecidos duros dentais são expostos ao flúor iônico, esse pode ser adsorvido sob duas formas: cristais do tipo fluoreto de cálcio ( $\text{CaF}_2$ ) ou sob a forma de fluorapatita –  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$  e fluoridroxapatita (FHA ou apatita fluoretada ou fluorapatita carbonada -  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})\text{F}$ ) (4; 17).

O cristal tipo fluoreto de cálcio é o responsável pelo potencial cariostático dos produtos de aplicação tópica. Por meio de sua lenta dissolução e prolongada retenção, atua como um reservatório de flúor mantendo-o constante no meio para interferir com a posterior progressão da cárie. É importante ressaltar que o  $\text{CaF}_2$  não é formado apenas em superfícies sadias do esmalte. O fluoreto de cálcio mais importante é aquele que se precipita no biofilme, película, nas porosidades do tecido duro dentário e em outras áreas inacessíveis à ação mecânica da saliva e sujeitas à estagnação, pois em tais áreas a concentração de cálcio iônico livre é alta e uma formação considerável de glóbulos pode ser obtida (4; 17; 23; 50).

Sua reação de precipitação é a seguinte (17; 50):



O fluoreto de cálcio é produzido na forma de glóbulos esféricos, compostos por cristais misturados ao fosfato e proteínas salivares, espalhados sobre a superfície dental. Sua formação acontece quando a concentração de flúor banhando o esmalte está acima de 100 ppm, situação que ocorre quando os dentes recebem tratamento tópico ou são expostos ao dentifrício fluoretado contendo fluoreto de sódio (NaF). Uma maior concentração e um pH ácido<sup>e</sup> (3,5) potencializam

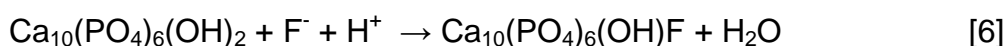
---

<sup>e</sup> Com um pH baixo a solubilidade do esmalte ( a solubilidade do esmalte como tecido é equivalente à da hidroxiapatita) aumenta consideravelmente e sua dissolução fornece quantidades de cálcio para uma formação substancial do fluoreto de cálcio.

sua formação pois o flúor fosfato acidulado (FFA) é mais reativo que o neutro, entretanto há limite para uma alta concentração e um baixo pH. Há uma tendência de formar mais fluoreto de cálcio em função do tempo de aplicação e da frequência, mas dentro do intervalo de aplicação de 1-4 minutos não há diferença de efeito (4). Esses fatores explicam a eficiência do uso diário de dentifício fluoretado, pois apesar da menor concentração de flúor nesse (1000-1100 ppm) e portanto, pouco  $\text{CaF}_2$  formado, várias escovações diárias tendem a compensar a maior quantidade formada através da aplicação tópica profissional (12.300 ppm com pouca frequência) (4). Ainda, forma-se mais fluoreto quando da reação de qualquer tipo tópico no tecido dental com lesão do que no íntegro, o que tem uma importante implicação clínica pois o fluoreto de cálcio formado dentro da lesão reduz a sua posterior progressão (4; 17).

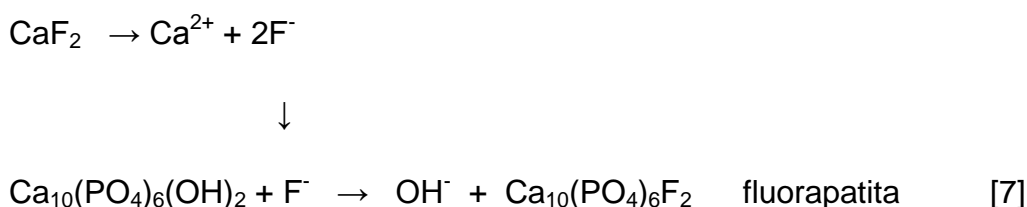
Após sua formação através da aplicação tópica, o fluoreto de cálcio age como fonte temporária de flúor a partir da qual esse íon é gradualmente liberado na saliva. Esse efeito preventivo dura tanto quanto o flúor liberado for capaz de manter sua concentração aumentada nas redondezas, ou seja, por um tempo de 30 a 40 minutos e depois volta ao normal (24). Através da própria ação dos fluidos bucais que estão insaturados para esse sal, o fluoreto de cálcio é dissolvido, tendo seu efeito perdido com o decorrer do tempo, em taxas variadas. Para saturar a saliva com fluoreto de cálcio, a concentração de flúor teria que ser aumentada 100 vezes, do fisiológico 0,02-0,05 ppm para 3-7 ppm, o que seria tóxico. O fluoreto de cálcio situado nas superfícies abertas e expostas desaparece em um dia, enquanto que nos sítios protegidos, na placa e nas superfícies rugosas, como nas lesões cariosas ativas, o sal sobrevive por dias e semanas. Após a dissolução do fluoreto de cálcio, todos os traços químicos do tratamento tópico terão desaparecido; no entanto, seus efeitos têm sido observados nos meses seguintes: incidência reduzida de cáries. Desse modo, as aplicações tópicas devem ser constantes e frequentes para se garantir a manutenção do efeito de controle da cárie (4; 17).

A apatita fluoretada (FHA) é formada quando a concentração de flúor é baixa, menor que 50 ppm, e em um ambiente ácido (4) :



A FHA formada ficará nas camadas mais externas do esmalte e se torna parte desse tecido, somente sendo perdida se todo o mineral for desgastado ou dissolvido completamente. Sob condições neutras a formação da FHA é lenta e incapaz de acompanhar o desgaste normal da superfície dentária através da escovação diária. Por outro lado, sob a película adquirida, as condições são mais favoráveis e o conteúdo de flúor da superfície do esmalte geralmente aumenta ao longo da vida (4) .

Entretanto, um maior efeito preventivo é obtido quando da incorporação do fluoreto na estrutura do esmalte, através da formação da fluorapatita [ $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$ ], a qual se apresenta como cristais maiores e mais estáveis quimicamente que a hidroxiapatita e, portanto menos solúvel. Assim, durante a remineralização, os íons flúor presentes em solução, em concentrações menores que 50 ppm, são adsorvidos nos cristais de hidroxiapatita carbonatada parcialmente dissolvidas, atraindo íons cálcio e propiciando a formação de um composto , cuja reação é mostrada a seguir (4; 50):



A condição bucal necessária para formação da fluorapatita é que os fluidos orais, saliva e fluido da placa estejam supersaturados para fluorapatita. Isso ocorre quando o pH está acima de 4,5. Abaixo do pH 4,5 os fluidos orais se tornam cada vez menos insaturados para a fluorapatita e também para a fluoridroxapatita que se dissolve proporcionalmente com um pH menor (4; 17; 50).

As fluorapatitas (FA) originam-se quando há 100% de substituição de hidroxilas por flúor, o que não acontece naturalmente na maioria dos tecidos biológicos, exceto no esmalte do dente do tubarão. No entanto, se os íons flúor substituem 50% dos íons hidroxila durante o processo de remineralização, originam as fluoridroxapatitas ou apatita fluoretada (17). Em relação à solubilidade, a

fluorapatita é menos solúvel que a apatita fluoretada, que é menos solúvel que a hidroxiapatita carbonatada (47) .

A presença do fluoreto no ambiente oral promove, além da formação de apatitas menos solúveis, a inibição da formação de fosfatos de cálcio mais ácidos e mais solúveis, tais como fosfato de octacálcio e de fosfato tricálcico tipo beta. A apatita é o único fosfato de cálcio que pode incorporar flúor em seu cristal, entretanto, a presença do flúor promove a conversão da bruxita e fosfato octacálcico para apatita e permite a formação da FHA em condições acídicas quando a bruxita poderia se formar ou quando o Mg está presente e o  $\beta$ -tricálcio pode ser formado. Isso decorre do fato de que a FHA é mais estável que os outros fosfatos de cálcio (17).

Durante o desafio cariogênico, mesmo baixos níveis fisiológicos de flúor (menores que 0,1 ppm) podem propiciar a formação de fluorapatita na camada superficial da lesão de cárie. O efeito geral desse flúor em solução é reduzir drasticamente a quantidade de cálcio que seria liberada do esmalte na solução ácida, sendo então a perda mineral muito reduzida. Assim, quando um cristal de fluorapatita carbonada dissolve e ocorre a reprecipitação, o flúor tende a ser incorporado, enquanto o carbonato é descartado. A apatita livre de carbonato ou com baixo conteúdo do mesmo é menos solúvel (50).

Além disso, quando sob a influência da atividade cariogênica da placa, uma pequena quantidade de apatita altamente carbonada e com baixo conteúdo de flúor se dissolve, traços de flúor nessa solução geram uma solução altamente supersaturada para HAP e especialmente fluorapatita, que então tendem a se precipitar ou crescer sobre a hidroxiapatita da superfície. A seção reparada vai conter menos carbonato e será menos solúvel e, assim, mais resistente aos futuros eventos de dissolução. Os íons flúor em solução provavelmente serão incorporados, de tal forma que a área reparada não será apenas reduzida em carbonato, mas também aumentada em flúor, dado que o flúor está disponível na solução. Assim o flúor potencializa a remineralização. E ainda somente pequenas quantidades de flúor são removidas da solução durante o crescimento do cristal de apatita. Essa é a base científica para a visão atual de que baixas concentrações de flúor na solução

do ambiente bucal são mais benéficas para redução de cárie que concentrações elevadas incorporadas ao esmalte (17)

Considerando-se que nos dias atuais a população está exposta ao flúor, seja pela ingestão de água e/ou pelo uso de dentifrícios fluoretados, a presença constante do flúor na saliva muda suas propriedades físico-químicas com relação ao pH crítico de dissolução do dente como já foi mencionado. Um aspecto relevante é que o pH crítico para o esmalte é diferente do da dentina. Enquanto a saliva consegue proteger de desmineralização o esmalte até que o pH não seja inferior a 5,5 a dentina tem uma maior solubilidade e não resiste a um pH inferior a 6,5 , conforme mostrado na Tabela 7. Esse fator tem importância quanto à cariogenicidade de alimentos que podem não ser considerados cariogênicos para o esmalte mas podem ser cariogênicos para a dentina por provocarem um pH crítico para essa (4) . Além disso, o pH crítico também não é o mesmo na presença de flúor, só sendo crítico para o esmalte um pH inferior a 4,5. Assim, há uma faixa de pH onde o flúor exerce um de seus efeitos, isto é, embora a dissolução da hidroxiapatita ou da fluorapatita não seja evitada, uma certa quantidade de cálcio e fósforo é simultaneamente reposta para o tecido na forma de fluorapatita. Desse modo, o resultado da simples presença do flúor no meio oral será uma redução de perda de minerais, interferindo diretamente com a desmineralização do esmalte, mantendo uma lesão em estágio subclínico ou como lesão de mancha branca de cárie paralizada. Outro aspecto está relacionado com a ação remineralizante da saliva que é ativada e aumentada de 2 a 4 vezes pela presença do flúor quando o pH está acima do pH crítico, além de ser melhorada pelo aumento do fluxo salivar. Nessa reestruturação de mineral com troca de HAP por FA, a deposição ocorre basicamente na superfície dental o que possibilita a posterior resistência à progressão da cárie (4; 17).

As ações do flúor tornam-se mais potencializadas na dentina, pois essa é mais reativa que o esmalte devido à fonte disponível de cálcio , na forma de apatita carbonatada, e fosfato de cálcio amorfo, os quais, ao serem solubilizados, reagem com o flúor e reprecipitam como fluoreto de cálcio (17). Isso é importante clinicamente tanto através de uma ação mecânica dos cristais de fluoreto, reduzindo

a sensibilidade dentinária (4), como para a redução da progressão da cárie na dentina que talvez seja maior e mais rápida do que a observada no esmalte.

Tabela 7 - Efeitos físico-químicos e conseqüências para a estrutura dental devido a mudanças no pH do meio e à presença ou ausência de flúor. (Adaptada de Uso do flúor e controle da cárie como doença. In : Odontologia Restauradora – Fundamentos e possibilidades. L.N.Barrieri.São Paulo:Santos;2001.) (4)

Efeito Físico-Químico							
pH	Flúor no meio	Dissolução de minerais mais solúveis *	Dissolução de HAP e AF	Formação de FA	Dissolução de FA	Conseqüências para	
						Esmalte	Dentina
7,0	Não	Não	Não	Não	Não	Re	Re
7,0	Sim	Não	Não	Sim	Não	Re+	Re+
<6,6>5,5	Não	Sim	Não	Não	Não	Re	Des
<6,6>5,5	Sim	Sim	Não	Sim	Não	Re+	Des <sup>-</sup>
5,5>4,5	Não	Sim	Sim	Não	Não	Des	Des+
<5,5>4,5	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Des <sup>-</sup>	Des
<4,5	Indiferente	Sim	Sim	Não	Sim	Cárie aguda/Erosão	

\*Apatita Carbonatada e fosfato amorfo, Re = Remineralização; Re+ = Remineralização ativada; Des = Desmineralização; Des<sup>-</sup> = Desmineralização reduzida; Des+ = Desmineralização aumentada.

Embora com base nos experimentos *in vitro* e *in situ* sobre lesões de cárie radicular consultados na literatura não seja possível tirar conclusões sobre a participação individual do dentífrico fluoretado, do tratamento com flúor tópico e da remoção de biofilme no resultado do desenvolvimento da lesão, pois esses estudos não distinguem o efeito da remoção da placa separado do flúor (17); observa-se que os fluoretos tópicos inibem a progressão da cárie, especialmente quando a limpeza dentária é insuficiente (44). Porém, em termos práticos, considerando a importância da educação em higiene oral, é fundamental não valorizar a necessidade da existência de biofilme dental para que o flúor tenha ação (4), exceto em situações onde realmente o indivíduo esteja impossibilitado de realizar essa higiene.

Assim, considerando um indivíduo adulto ou idoso impossibilitado de realizar uma escovação satisfatória, a obtenção de um reservatório grande e mais



duradouro de fluoreto de cálcio decorrente da aplicação tópica de FFA possibilitando a liberação de íons flúor de maneira constante e em pequenas concentrações, por um tempo maior, parece ser uma boa alternativa de tratamento preventivo.

Além disso, os aspectos histopatológicos das lesões de cárie radicular, mostram que a perda mineral ocorre numa zona superficial, relativamente bem mineralizada, que exhibe com frequência um conteúdo mineral maior que o da dentina não afetada. Semelhante às lesões no esmalte, essa zona varia em espessura e conteúdo mineral dependendo do desafio cariogênico do biofilme microbiano existente (17; 64; 75). O alto conteúdo mineral observado na zona superficial de uma lesão radicular pode refletir uma redeposição seletiva de minerais nessa região, pois tem sido mostrado que o tamanho dos cristais de apatita na zona superficial é significativamente maior que no cimento normal (17). Além disso, tem sido mostrado que mesmo as superfícies radiculares não irrompidas, que se tornam expostas ao ambiente oral por recessão gengival ou cirurgia periodontal podem sofrer modificações minerais substanciais em função da atividade metabólica nos biofilmes, apresentando aumento de tamanho e empacotamento dos cristais (maior área superficial, menor área reativa, menor solubilidade) que as superfícies de cimento normal quando esse não foi exposto à cavidade oral. Isso reflete uma captação e redeposição substancial dos minerais nos cristais que estão parcialmente dissolvidos (76). Assim, a permeabilidade e a reatividade das superfícies radiculares podem mudar tornando-se menos suscetíveis aos futuros desafios cariogênicos (17).

Tem sido demonstrado que o princípio físico-químico para explicação da desmineralização e remineralização descrito para o esmalte também se aplica à dentina. Entretanto os níveis de flúor necessários para inibir a desmineralização são 10 vezes maiores para a dentina que para o esmalte (17; 77). Em um estudo com idosos com baixo risco de cárie e que apresentavam cárie radicular foi observada a necessidade da manutenção de maiores concentrações de flúor para que ocorresse remineralização do que as ofertadas pelos dentifrícios fluoretados comerciais, conforme pode ser observado na Figura 11 (26).

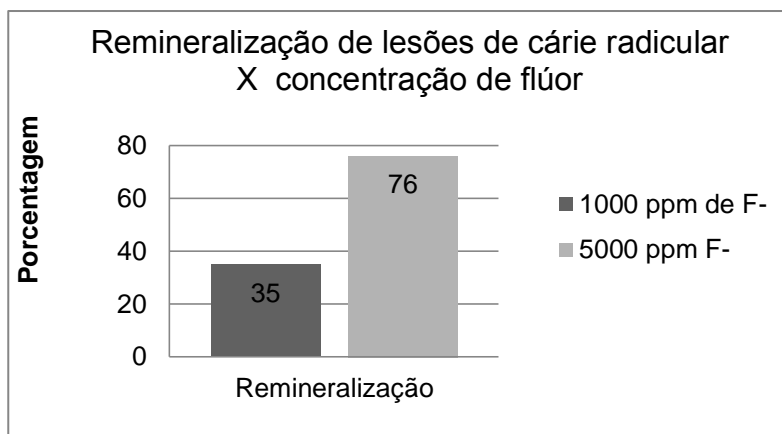


Figura 11 - Comparação entre a porcentagem de remineralização de cárie radicular não cavitada em idosos com risco de cárie, entre uma concentração de flúor de 1000 ppm ofertada por dentifrício fluoretado comercial e uma concentração de 5000 ppm proporcionada pelo produto com alta concentração (26).

Além disso, em indivíduos com alto risco de cárie, os métodos de aplicação tópica de flúor usuais não tem sido suficientes para a remineralização, sendo necessária a disponibilização constante de concentrações mais elevadas de flúor ou de técnicas que proporcionem tecidos duros dentais menos solúveis. Para isso, é necessário o conhecimento das particularidades do processo cariioso e da ação do flúor na superfície radicular que se torna exposta ao ambiente bucal assim como das implicações clínicas e dificuldades no trato com o indivíduo alvo do método preventivo que se pretende praticar para que esse possa ser eficaz, com efeito mais duradouro e custo acessível para que tenha aceitabilidade clínica .

Contudo, nas lesões iniciais de cárie radicular, diferentemente do que acontece nas lesões de cárie de esmalte, verifica-se já no estágio inicial do desenvolvimento da lesão que a superfície parece amolecida em função da penetração de microrganismos na zona superficial entre as fibras colágenas parcialmente desmineralizadas (17). Assim, uma aplicação tópica de flúor fosfato acidulado disponibilizando 12300 ppm F<sup>-</sup> (4) sobre uma superfície nessas condições parece apresentar-se bastante vantajosa por essa ter presumidamente uma grande oferta de íon cálcio (proveniente da desmineralização da HAP carbonatada) e já apresentar uma superfície rugosa com pH baixo onde o fluoreto de cálcio pode precipitar e ficar protegido enquanto libera o íon flúor para a formação de fluorapatita, além de evitar nova desmineralização (17). Além desse fato, considera-

se a da possibilidade do flúor agir como bactericida ao inibir atividades enzimáticas no interior da bactéria (78).

### **3.4. A irradiação laser como técnica preventiva da cárie**

Nas últimas décadas, vários estudos têm sido feitos (30; 36; 42; 79), os quais apontam a irradiação *laser* como um método alternativo e eficaz para prevenção da cárie. Os primeiros estudos que demonstraram o aumento da resistência à desmineralização do esmalte dental irradiado foi com o laser de rubi (de comprimento de onda de 693 nm), na década de 60 (80). Entretanto em estudos posteriores, os mesmos autores relataram um aumento da permeabilidade do esmalte, além de superaquecimento da superfície e do tecido pulpar, contraindicando o uso desse *laser* (81). Desde então, muitos trabalhos têm sido realizados com *lasers* que emitem em diferentes comprimentos de onda visando à prevenção da cárie, quando se demonstrou a redução da solubilidade do esmalte dental (1; 2; 30), assim como efeitos de obliteração de túbulos dentinários o que é favorável em casos de hipersensibilidade dentinária (40; 41; 43; 82).

O efeito preventivo do *laser* de alta intensidade ocorre quando o tecido absorve a energia irradiada e promove um efeito térmico localizado, o que geralmente é conseguido quando há emissão na região espectral no Infravermelho (IR). Esse efeito provoca modificações químico-estruturais nos tecidos duros dentais que dependem da temperatura superficial atingida (46). A matriz orgânica do esmalte e da dentina é eliminada com temperaturas inferiores a 350 °C, entretanto a desnaturação de proteína é observada após a temperatura atingir os 45°C. Os constituintes da matriz mineral são mais estáveis termicamente. No entanto, a eliminação de carbonato começa a ser observada após aquecimento a 100°C, sendo quase totalmente eliminado após aquecimento a 1100°C. Entre 100°C e 650°C ocorre oxidação de fosfato e formação de pirofosfatos, entretanto o fosfato não apresenta grandes variações na sua concentração, condição observada somente

após a fusão da HAP, em aproximadamente 1280°C. A formação de novas estruturas cristalográficas, tais como fosfato de tricálcico na fase  $\alpha$  e  $\beta$  e fosfato tetracálcico ocorre a temperaturas acima de 1100°C. Entretanto somente essa última fase é mais resistente à desmineralização que a HAP (46).

Esse aumento de temperatura vai depender de fatores do *laser* tais como comprimento de onda, potência, modo de emissão (contínuo ou pulsado), duração do pulso, energia por pulso, taxa de repetição, densidade de energia (ou fluência), diâmetro do feixe e características do feixe e da propriedades ópticas e térmicas do tecido, com destaque para o índice de refração, o coeficiente de absorção ( $\mu_a$ ) e o coeficiente de espalhamento ( $\mu_s$ ) (83).

Assim, dependendo dessas características citadas, a irradiação *laser* poderá ser absorvida, espalhada, refletida ou transmitida para o interior do tecido irradiado. Para que os efeitos promovidos pelos *lasers* de alta intensidade não causem danos térmicos no próprio tecido irradiado, assim como no tecido pulpar e periodontal adjacentes, é necessário que sejam empregados comprimentos de onda absorvidos pela estrutura do tecido duro dental, composta principalmente por cristais de hidroxiapatita, proteínas e água. Quanto maior o coeficiente de absorção de um comprimento de onda, maior é seu potencial para causar o aquecimento do tecido. Além disso, o coeficiente de absorção é inversamente proporcional à penetração da luz *laser* no tecido (Lei de Beer-Lambert), sendo que quanto mais a radiação é absorvida, menor é a sua profundidade de penetração. Sendo assim, *lasers* que emitem em comprimentos de onda na região do infravermelho na região espectral de 3 micrometros (*lasers* de érbio) ou aqueles que emitem em comprimento de onda próximo a 9 micrometros (*lasers* de dióxido de carbono – CO<sub>2</sub>) são os mais favoráveis para este fim, conforme pode ser observado na Figura 12 (41; 84).

Dentre os *lasers* mais estudados, destacam-se os *lasers* de CO<sub>2</sub>, Nd:YAG, Argônio, Ho:YLF, Er:YAG e, mais recentemente, o *laser* Er,Cr:YSGG e de diodo. (50). Estudos com *laser* de CO<sub>2</sub> já demonstraram que efeitos distintos são observados quando o *laser* é empregado antes ou após a aplicação tópica de flúor. Entretanto, os reais mecanismos pelo qual isso ocorre ainda não estão bem elucidados. (84).

Um dos mecanismos propostos para explicar a ação da irradiação *laser* na paralização da cárie seria que ocorre a formação de microespaços devido à remoção de componentes orgânicos, água e carbonato do esmalte pela irradiação, o que torna esses espaços sítios para deposição de íons liberados pela desmineralização, como por exemplo, cálcio. Quando associado ao fluoreto, em acréscimo e através da fusão e solidificação das camadas de cristais de hidroxiapatita combinadas com a camada de fluoreto de cálcio incorporado pelo tratamento tópico haveria a conversão de hidroxiapatita em fluorapatita. Entretanto, trabalhos efetuados com *lasers* que não promovem fusão da superfície irradiada também demonstraram uma maior formação e retenção de cristais de fluoreto de cálcio decorrentes da associação da irradiação *laser* com a aplicação de flúor fosfato acidulado (FFA), o que aumentaria o efeito cariostático deste tratamento. Os reais mecanismos ainda precisam ser bem elucidados (30; 50).

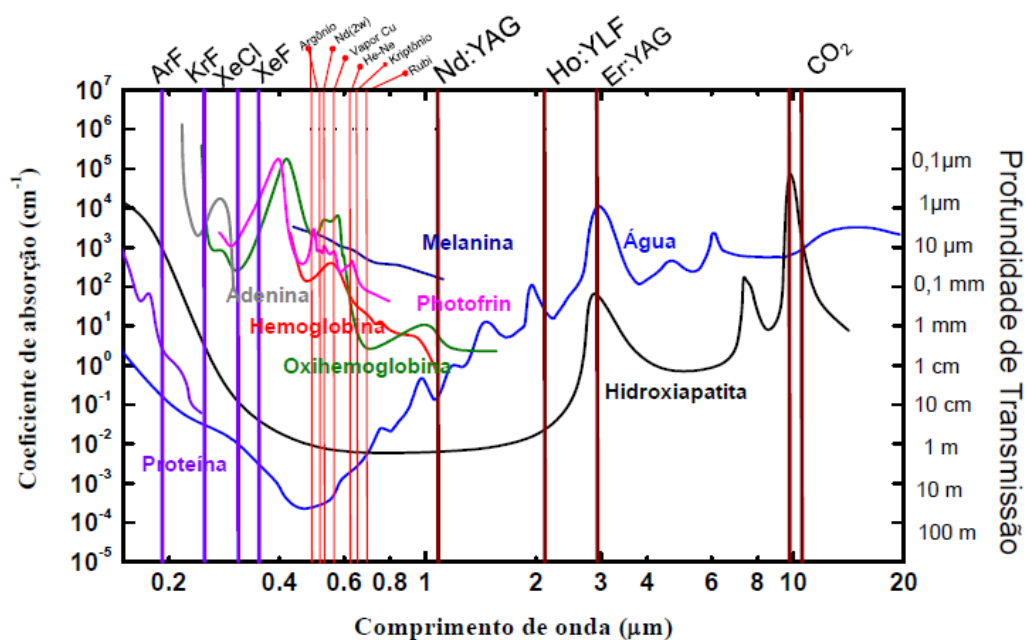


Figura 12 - Principais *lasers* utilizados na Odontologia e sua interação com os principais componentes dos tecidos biológicos. Destaque para a hidroxiapatita e água (50).

Entretanto, mesmo *lasers* com comprimento de onda muito pouco absorvido pela estrutura dental (Figura 12) têm sido usados com resultados positivos no aumento da resistência do tecido dentário à desmineralização. Para tal, é necessário o uso de substâncias fotoabsorvedoras que propiciam o aquecimento

térmico da superfície além de impedir a transmissão do calor para o tecido dental adjacente, diminuindo as chances de danos pulpares (34; 41; 42).

Sendo assim, o laser de Nd:YAG tem sido estudado como potencial equipamento para prevenção de cárie no esmalte desde a década de 1980, quando foi demonstrado seu potencial para provocar a fusão do esmalte dental e torná-lo mais resistente à dissolução ácida (85; 86; 87). Entretanto, nos primeiros estudos foram usadas altas densidades de energia causando danos aos tecidos.

Esse é um laser de corpo sólido formado por um cristal de Itrio-alumínio-granada dopado com o metal raro neodímio, de onde vem seu nome Nd:YAG. No comprimento de onda de emissão em 1,064  $\mu\text{m}$  o feixe de radiação emitido não é visível, sendo então usado como luz guia um laser visível, como, por exemplo os lasers de He-Ne ou diodo. Devido ao fato desse comprimento de onda não ser bem absorvido pela água, não age na superfície dos tecidos biológicos, mas sendo bem absorvido pela melanina e hemoglobina tornou-se bastante usado para hemostasia e coagulação de vasos profundos (1). Estudos tem indicado esse laser para prevenção da cárie no esmalte se associado ao flúor, pois tem sido reportado que possibilita a criação de espaços microscópicos pela perda de substâncias orgânicas, os quais serviriam como depósito de íons flúor liberados pelo flúor fosfato acidulado (88).

Nos anos 90 diversos estudos foram feitos associando a irradiação com o laser de Nd:YAG à aplicação tópica de gel de flúor em lesões artificiais de cáries de esmalte, para promover sua remineralização. Em um desses, os autores usaram densidade de energia de 40  $\text{J}/\text{cm}^2$  e observaram que a remineralização se processou desde o fundo da área da lesão artificial de cárie até sua superfície, fatos medidos por técnicas de microrradiografias, teste de microdureza e microscópio eletrônico de varredura (MEV) (89). Em um estudo clínico os mesmos autores avaliaram o resultado da irradiação com o laser de Nd:YAG sobre superfícies de cárie incipientes, cobertas com pigmentos fotoabsorvedores, associado ao flúor fosfato acidulado (FFA) e relataram que não foi observado nenhum aumento visível da lesão após 24 meses do tratamento (90).

Desde então vários estudos tem sido realizados procurando determinar parâmetros seguros de utilização, apresentando resultados promissores para uso clínico em superfícies lisas e oclusais (91). No final da década de 2010, dois estudos da mesma equipe, um *in vitro* (42) e outro clínico (91), reportaram como parâmetros seguros para a prevenção de cárie de esmalte, a irradiação com o laser de Nd:YAG com potência média de 60mJ/pulso e taxa de repetição de 10 Hz (densidade de energia de 84,9 J/cm<sup>2</sup>) após a aplicação de uma pasta de carvão vegetal como substância absorvedora. O procedimento de aplicação da pasta seguido da irradiação com laser foi repetido por três vezes, garantindo o aumento de temperatura para derretimento e recristalização da superfície do esmalte. Essa pasta aplicada sob a forma de uma camada homogênea sobre a superfície do esmalte absorve a irradiação laser, o que causa microexplosões que correspondem à ejeção da pasta de carvão, sendo então o calor produzido transmitido ao esmalte adjacente. Assim, somente uma parte da energia do pulso laser é depositada num pequeno volume de tecido, evitando a penetração do feixe laser na profundidade do esmalte e consequentes riscos à polpa dental. A pasta de carvão mineral apresentou-se biocompatível, com baixa tensão superficial, fácil de ser removida e capaz de auxiliar na promoção do derretimento da superfície do esmalte.

Como o esmalte apresenta coeficiente de espalhamento não negligenciável nesse comprimento de onda, conforme pode ser observado pelos valores de coeficiente de espalhamento apresentado na Tabela 8, poderia ocorrer esse fenômeno com transmissão para o tecido periodontal e em profundidade para o tecido pulpar, provocando necrose desses. No estudo *in vitro* acima mencionado (42), foi verificado através da utilização de câmara termográfica e de termopares que, com os parâmetros citados, houve um efeito mínimo no aumento de temperatura pulpar de aproximadamente 1°C, ficando portanto abaixo do limite classicamente estabelecido como potencialmente agressivo para a vitalidade pulpar e dos tecidos periodontais adjacentes. Esse valor limite corresponde a um aumento de 5,6°C, sendo que um aumento de 16 °C resulta em completa necrose pulpar (50; 92). É importante ressaltar que a espessura da dentina abaixo do esmalte tem considerável efeito na geração de calor para a polpa, quanto maior a espessura da dentina, menor o aumento de temperatura observado nesse tecido e na polpa.

No estudo clínico (91) foi feita a associação irradiação laser + aplicação tópica de flúor nos dentes posteriores do lado direito de 33 voluntários e no lado esquerdo foi aplicado somente flúor. Depois de 1 ano, foi observada uma redução de 39,2% na incidência de cáries no grupo irradiado em comparação com o grupo controle (somente flúor). Esses resultados atestam que essa associação pode ser um tratamento eficaz para prevenção de cáries de cicatrículas e fissuras em dentes permanentes. Entretanto ainda não é possível determinar a durabilidade desse efeito preventivo .

Em outro estudo clínico (93) realizado com 10 adolescentes em tratamento ortodôntico e apresentando lesões de mancha branca foi demonstrado que a associação da irradiação com o laser de Nd:YAG seguida da aplicação de flúor tópico foi capaz de prevenir a progressão das lesões quando comparadas à lesões não irradiadas , no mesmo paciente. A comparação foi feita através da medição, por fotografias, do tamanho das lesões no intervalo de 1 ano.

Já foi demonstrado que o derretimento da superfície do esmalte requer aquecimento a aproximadamente 1200°C (46) , quando então ocorrem várias mudanças químicas na microestrutura do esmalte. Buscando entender esse processo, em um estudo recente (51) foram investigadas as mudanças composicionais e cristalográficas no esmalte irradiado por laser de Nd:YAG ( $\lambda=1064\text{nm}$ ,  $84,9\text{J}/\text{cm}^2$  usado com foto absorvedor), na resistência à desmineralização quando associado a aplicação tópica de flúor, assim como investigada a formação e retenção de fluoreto de cálcio. As mudanças químicas foram analisadas por ATR-FTIR, sendo observada uma significativa diminuição da água, carbonato e amidas I e II após a irradiação com o laser de Nd:YAG. A difração de raio X mostrou que ambos os lasers irradiados promoveram formação de FTC- $\alpha$  e FTeC e significativo aumento no crescimento do cristal de HAP do esmalte. Essas mudanças foram correlacionadas com o aumento da resistência do esmalte a desmineralização. Além disso foi observado que a associação laser Nd:YAG + APF causou um significativo aumento na retenção de flúor após a ciclagem de pH quando comparado ao grupo com apenas uso do fluoreto tópico. Os resultados desse estudo sugerem que o aumento na formação e retenção do fluoreto de cálcio são decorrentes das mudanças morfológicas promovidas pela irradiação, ou seja , do



derretimento superficial do esmalte, expondo um alto número de cristalitos de HAP que reagem com o fluoreto .

### **3.4.2 A irradiação com laser para prevenção da cárie na dentina**

Na década de 1970 foi demonstrado que a irradiação *laser* poderia ser usada para aumentar o conteúdo mineral relativo da dentina pela remoção de proteínas e da água intrínseca desse tecido (94). Desde então pesquisadores têm avaliado o aumento da resistência à desmineralização da dentina irradiada com diversos equipamentos de *lasers*. Os resultados tem mostrado a ocorrência de fusão e derretimento desse tecido com zonas de recristalização que levaria a inibição do processo de desmineralização e à obliteração dos túbulos dentinários (95; 96; 97; 98).

As exatas razões para a inibição de lesões de cárie na dentina irradiada também são ainda desconhecidas. Várias hipóteses têm sido formuladas. Uma delas sugere que há mudanças cristalográficas na dentina irradiada com crescimento no tamanho dos cristalitos e formação de um tecido com maior grau de cristalinidade, com cristais estruturalmente modificados e semelhantes à estrutura cristalina da HAP do esmalte normal (94). Além disso, a formação de uma camada de selamento superficial dos túbulos dentinários reduziria a difusão dos ácidos para a dentina sadia, o que diminuiria a extensão da lesão de cárie (95). O emprego da irradiação laser associada ao fluoreto também tem sido investigada, sugerindo que pode haver um efeito sinérgico de inibição da desmineralização, proporcionada pela incorporação do flúor dentro da estrutura cristalina (99).

São escassos os estudos (97) que avaliam o efeito da irradiação laser sobre a prevenção de lesões de cárie radicular associado ou não à aplicação de fluoreto tópico. Em um estudo recente (100; 99) utilizando o laser de Nd:YAG na dentina foi observada a redução dos valores de microdureza da dentina hígida e

significantes danos térmicos ao tecido. Entretanto esse laser tem sido utilizado com resultados promissores para tratamento da hipersensibilidade dentinária (98).

Em uma tese de doutorado recente (97) foi avaliada, *in vitro*, a influência da irradiação dos lasers de CO<sub>2</sub>, Nd:YAG ( $\lambda = 1064$  nm, potência média de 0,6W e taxa de repetição de 10Hz) e Er:YAG sobre a dentina radicular após prévia aplicação tópica de fluoreto, para prevenção da cárie. Para tal foi utilizada uma ciclagem de pH em solução desmineralizante por 6 horas e em solução remineralizante por 18 horas por um período experimental de 14 dias. A avaliação dos tratamentos foi feita através dos seguintes testes: mensuração da porcentagem de desmineralização utilizando microscopia óptica; avaliação da morfologia da superfície irradiada por microscopia eletrônica de varredura; análise da microdureza da dentina correlacionada com a perda mineral através do teste de microdureza knoop e a quantificação da porcentagem dos elementos cálcio, fósforo e flúor através de microanálise dispersiva de raios X (EDS). Foi observado que os três tipos de lasers promoveram algumas alterações favoráveis após desafio cariogênico. A irradiação com os lasers de Nd:YAG e CO<sub>2</sub> proporcionou menor porcentagem de desmineralização com menores valores de microdureza em relação a dentina irradiada com Er:YAG, mas não em relação ao grupo controle (cariado) entretanto causaram trincas na superfície dentinária. Entretanto, nesse estudo, não foi observado sinergia entre a irradiação laser e o fluoreto, sendo que somente a associação do flúor gel aplicada previamente à irradiação foi testada.

É relevante considerar que na dentina o conteúdo orgânico e de água é muito maior que no esmalte e, portanto, parece haver uma menor contribuição da matriz mineral na absorção da irradiação. Sendo assim, essa absorção pela água e proteínas deve também ter uma importante relação com os efeitos observados e deve se considerada na definição de parâmetros seguros para uso da irradiação laser na dentina. Como o esmalte, a dentina apresenta baixa absorção da irradiação na região espectral do visível, mas apresenta maior espalhamento que ele (Tabela 8) o que resulta em maiores consequências negativas como a vaporização da subsuperfície, trincas do tecido e necrose pulpar (87). Além disso, já foi demonstrado que a espessura de dentina influencia no aumento da temperatura nesse tecido e também na polpa (42). Assim, parece ser necessário o uso de

densidades de energia menores que as usadas para o esmalte para efeitos preventivos .

Tabela 8 - Coeficientes de absorção e espalhamento do esmalte e da dentina de comprimentos de onda próximos aos usados nesse estudo para a irradiação laser e indução da fluorescência **(101)** .

Comprimento de onda	Coeficiente de absorção (cm <sup>-1</sup> )		Coeficiente de espalhamento (cm <sup>-1</sup> )	
	Esmalte	Dentina	Esmalte	Dentina
543 nm	< 1	3-4	105 ± 30	280 ± 84
<b>1053 nm</b>	< 1	3-4	15 ± 5	280 ± 78

Somando a esses fatores, a irradiação laser nessa região, mesmo que possibilitando a modificação de uma estreita camada de tecido dentinário, de cerca de 1 a 5 µm de espessura com o uso do laser de Nd:YAG (102) poderia representar a possibilidade de obliteração dos túbulos dentinários conferindo proteção à penetração bacteriana para um complexo dentino pulpar que possivelmente apresenta sua capacidade regenerativa já diminuída devido à idade. Além disso, essa camada representaria uma superfície com microrugosidades que serviriam como maior reservatório de fluoreto de cálcio decorrentes da associação do FFA com a irradiação laser. Esses fatos sugeririam a indicação dessa associação. Entretanto são necessários mais estudos para verificarem esses efeitos e indicação.

### 3.5. Técnicas espectroscópicas

A espectroscopia estuda a interação da radiação eletromagnética com a matéria, sendo um dos seus principais objetivos o estudo dos níveis de energia de átomos ou moléculas, obtendo informações físicas e químicas sobre o material analisado. Há dois tipos de técnicas espectroscópicas : espectroscopia de emissão e espectroscopia de absorção. Na espectroscopia de emissão, ocorre a excitação dos átomos do material estudado por meios térmicos e eletrônicos. Quando os átomos decaem de volta ao estado estável, a energia que haviam absorvido é emitida em forma de ondas eletromagnéticas, sendo essa energia detectada e utilizada para a análise do material. Na espectroscopia de absorção, a substância a ser analisada é posicionada entre o detector e uma fonte de energia que emite a radiação eletromagnética com o comprimento de onda desejado, sendo a análise feita comparando-se a radiação transmitida ou refletida pela amostra, com a radiação da fonte. A escolha da técnica depende do material ou substância a ser analisado, da informação desejada e da radiação eletromagnética utilizada (103).

#### 3.5.1- Espectroscopia de absorção

O processo de absorção ocorre quando a frequência da radiação incidente é a mesma que a frequência de vibração molecular. Sabe-se que as moléculas e átomos de um material não são estáticos; eles possuem um frequência natural de vibração. Assim, quando a vibração molecular ou rotacional origina um momento dipolo<sup>f</sup> da molécula, surge um campo elétrico. Se a radiação eletromagnética tiver a mesma frequência da vibração molecular, o campo elétrico alternante da radiação incidente interage com o campo elétrico originado pela mudança de momento dipolo, e ocorre uma transferência de energia da radiação para a molécula (absorção),

---

<sup>f</sup> O momento dipolo é determinado pela magnitude da diferença de carga e a distância entre dois centros de carga (105).

originando um espectro. Essa frequência pode ser calculada através de uma expressão que relaciona a frequência vibracional com a constante de ligação química (uma medida de rigidez) e a massa reduzida em relação às massas dos átomos que formam a molécula (47; 104).

A vibração dos átomos no interior de uma molécula apresenta energia correspondente com a região do espectro eletromagnético do infravermelho (IR). Além disso, a radiação infravermelha não possui energia suficiente para que sua absorção possa alterar o nível energético da molécula (105), sendo assim, seu uso envolve a espectroscopia de absorção e o sinal analisado será o transmitido ou o refletido, dependendo do equipamento utilizado e do material analisado. Em relação a compostos orgânicos, geralmente a espectroscopia de absorção é a mais indicada, pois existe uma diversidade de compostos que apresentam bandas de absorção na região espectral entre 4000 a 670  $\text{cm}^{-1}$  que é o segmento, dentre as regiões espectrais do infravermelho mostradas na Tabela 9, mais frequentemente usado nos equipamentos disponíveis (105; 104).

Tabela 9 - Subdivisões da região espectral do infravermelho (105)

	Número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ )	Frequência (Hz)	Comprimento de onda ( $\mu\text{m}$ )
Infravermelho próximo	12800 - 4000	$3,8 \times 10^{14}$ - $1,2 \times 10^{14}$	0,78 – 2,5
<b>Infravermelho médio</b>	4000 – 200	$1,2 \times 10^{14}$ – $6,0 \times 10^{12}$	2,5 – 50
Infravermelho distante	200 - 100	$6,0 \times 10^{12}$ – $3,0 \times 10^{11}$	50 - 1000

Como a energia fornecida pela radiação no IR tende a afetar os níveis vibracionais de uma ligação química, classifica-se as vibrações moleculares em dois tipos: deformações axiais e deformações angulares, simétricas ou assimétricas. Quando a deformação ocorre na direção do eixo da molécula, a distância interatômica aumenta e diminui alternadamente, o modo de vibração é denominado estiramento ou deformação axial. As vibrações de deformação angular correspondem ao movimento de um grupo de átomos em relação ao resto da molécula, sem que as posições relativas dos átomos do grupo se alterem, entretanto ocorre a variação do ângulo entre duas ligações e podem ser de quatro tipos: tesoura, balanço, sacudida e torção (47).

Como mencionado, o espectro de absorção no infravermelho tem origem quando a radiação eletromagnética incidente tem uma componente com frequência correspondente a uma transição entre dois níveis vibracionais, refletindo esse movimento vibracional, o que aparece em forma de bandas. Embora o espectro no IR seja característico da molécula como um todo, certos grupos de átomos dão origem a bandas que ocorrem próximas a uma mesma frequência, independentemente da estrutura da molécula. É justamente a presença destas bandas características de grupos que permite a obtenção de informações estruturais úteis. A frequência ou o comprimento de onda de uma banda de absorção depende das massas relativas dos átomos, das constantes de forças das ligações e da geometria dos átomos. Átomos leves vibram a frequências mais altas do que os átomos mais pesados. As ligações triplas são mais rígidas do que as duplas, que são mais rígidas que as ligações simples, logo as ligações triplas vibram a frequências mais altas. A intensidade de uma banda de absorção é proporcional a concentração do componente que causou essa banda. Essa intensidade pode ser expressa como transmitância ou absorbância. A transmitância é a razão entre a energia radiante transmitida por uma amostra e a energia radiante que nela incide. A absorbância é o logaritmo decimal do inverso da transmitância (105; 104; 106).

Na espectroscopia de absorção no infravermelho a radiação proveniente de uma luz contínua (usualmente na região espectral de 2.5 a 25  $\mu\text{m}$  ou 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ ) atravessa a amostra a ser analisa, a radiação transmitida é comparada com aquela transmitida na ausência de amostra e o espectrômetro registra o resultado na forma de uma banda de absorção. A técnica de medição mais sofisticada atualmente envolve o uso de um interferômetro de Michelson e a posterior transformada de Fourier do interferograma, a chamada Absorção no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR). Há várias técnicas de FTIR que devem ser escolhidas de acordo com o tipo de amostra e as informações que se deseja obter. Assim, há disponíveis as seguintes técnicas: de Transmissão, de Absorção, Reflexão Total Atenuada (ATR), Refletância Especular e Refletância Difusa. Além dessas, com o acoplamento do microscópio ao equipamento é possível realizar a microespectroscopia pelas técnicas de Transmissão, Absorção, ATR, e Refletância Especular (107).

A técnica de reflexão total atenuada (ATR) (Figura 13A) possibilita a obtenção de espectros qualitativos e quantitativos de amostras sólidas independente de sua espessura (104). Essa técnica consiste na reflexão de um feixe que passa de um meio menos denso (cristal) para um meio mais denso (amostra). No entanto, uma pequena parcela da radiação incidente penetra poucos micrometros na amostra, podendo ser absorvida. Essa radiação que penetra no material<sup>9</sup> é chamada de onda evanescente. O cristal, um material de alto índice de refração, pode ser de diamante, ZnSe (Seleneto de Zinco) ou Ge (Germânio) o qual deve ser escolhido de acordo com o material a ser analisado. A proporção de feixe refletido varia com o ângulo de incidência, havendo um ângulo crítico onde a reflexão é total, que depende do tipo de cristal. Com a absorção da radiação que penetrou na amostra, o feixe refletido tem sua intensidade atenuada, e assim se consegue identificar as bandas de absorção (103; 105; 104; 108).

A utilização do microscópio como acessório do equipamento caracteriza a técnica de  $\mu$ -ATR (Figura 13B), que proporciona uma profundidade de penetração da radiação da ordem de 0.66  $\mu\text{m}$  devido ao uso do cristal de Ge em contraste com os 2  $\mu\text{m}$  de profundidade de penetração obtida com o cristal de Seleneto de Zinco disponível no modo ATR (dados de profundidade de penetração de acordo com o cristal fornecidos pelo fabricante do equipamento). Isso permite que o sinal analisado fique restrito à superfície da amostra.

---

<sup>9</sup>A profundidade de penetração depende do comprimento de onda do feixe, do ângulo de incidência deste com a amostra, do índice de refração do cristal do equipamento e do material analisado

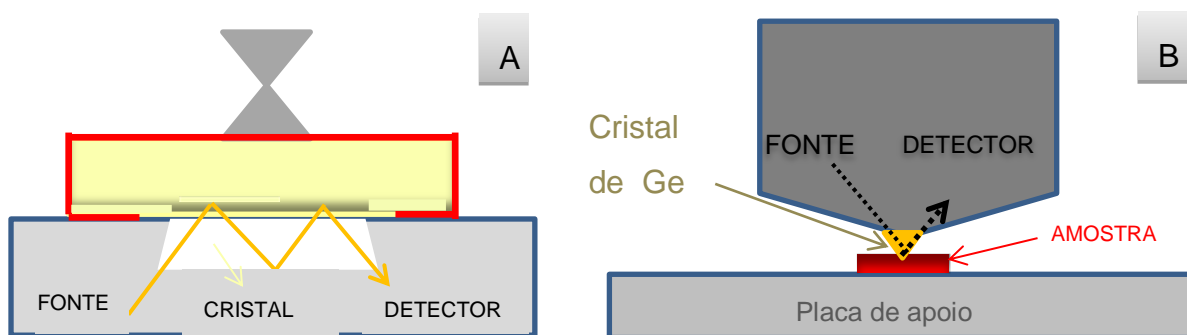


Figura 13 - Esquema de funcionamento. **A** - FTIR com acessório ATR; **B** -  $\mu$ -ATR.

### 3.5.2. Fluorescência

Fluorescência é um fenômeno bastante conhecido em ciência e tecnologia, tendo um grande número de aplicações. Esse fenômeno óptico consiste na absorção de energia pela estrutura eletrônica de uma molécula, fazendo com que os elétrons passem do estado fundamental para o estado excitado, que é menos estável. Entretanto, buscando maior estabilidade, esses elétrons retornam ao estado fundamental liberando a energia em excesso através da emissão de radiação, a qual envolve o estado quântico singleto e tem duração da ordem de nanosegundos. Essa quantidade de energia emitida corresponde à diferença de energia entre os estados envolvidos e é característica de cada molécula, podendo ser usada para detectá-la (109).

A análise de fluorescência de tecidos biológicos utiliza a propriedade da luz, na qual a radiação ao interagir com a matéria torna-se capaz de fornecer informações sobre processos físicos químicos ocorridos. Já foi relatado na literatura que imagens de fluorescência de amostras dentárias são capazes de proporcionar informações importantes sobre o processo de cárie (110; 111). Essa modalidade de imagem combina a técnica de espectroscopia com a formação de imagens digitais



das amostras e permite a análise de sinais ópticos através de informação espacial e espectral (distribuição bidimensional de intensidades) ao mesmo tempo. Representam uma grande vantagem quando comparada às técnicas tradicionais de espectroscopia, as quais só permitem o estudo de uma área muito pequena da amostra (112).

Em linhas gerais, um sistema de imagem da fluorescência (SIF) é composto por uma lente objetiva, uma câmera CCD científica, um computador, um sistema de iluminação para induzir a fluorescência e um elemento de seleção espectral (112). Quanto ao processamento das imagens de fluorescência, busca-se detectar diferenças de intensidade entre uma amostra teste e um controle e, a partir disso, utiliza-se processamentos para melhorar as imagens capturadas, por exemplo, por meio de filtros ópticos.

Desde a primeira detecção das diferenças na fluorescência do esmalte sadio e cariado, em 1928 , (113) tal propriedade tem sido estudada e usada em equipamentos para pesquisa e uso clínico. A utilização de uma câmera CCD para coletar as imagens produzidas por amostras dentárias iluminadas no infravermelho, utilizando um *laser de diodo* emissor no comprimento de onda de 830 nm foram pouco nítidas, no entanto demonstraram diferenças evidentes entre esmalte e dentina, sadio e cariado, apesar de não ter sido possível explicar qual a relação dos fenômeno de absorção, espalhamento e fluorescência com esses achados (114).

Apesar de a fluorescência ser bastante estudada, a origem dessa emissão nos tecidos dentários ainda não está completamente esclarecida. Há relatos de a autofluorescência ser proveniente do esmalte, da junção amelo-dentinária e da dentina, sendo que nessas últimas seria devido aos componentes orgânicos (111; 115; 116). Muitas são as teorias e poucas são as evidências para explicar o fenômeno. Além disso, os estudos apresentam variações entre os parâmetros utilizados o que deixa os resultados não conclusivos e inconsistentes entre si. Entretanto uma observação atenta parece indicar que para cada comprimento de onda de excitação parece haver uma ou mais moléculas específicas que fluorescem em um comprimento de onda também específico, sendo que o mecanismo desse fenômeno pode não ser o mesmo para todos os componentes fluorescentes.

O que se apresenta como certo é que a cor da fluorescência corresponde à energia emitida durante o decaimento da estrutura eletrônica de determinada molécula para o estado fundamental e que a banda de fluorescência emitida possui comprimentos de onda maiores que o da fonte de excitação. Assim, a excitação no ultravioleta dá origem a emissão de fluorescência entre o violeta e o azul; a excitação no azul origina emissão azul, verde ou amarela e da excitação vermelha provém a fluorescência vermelha ou infravermelha próxima (117). A literatura relata que os possíveis componentes que fluorescem, quando excitados com comprimento de onda na região do ultravioleta próximo e início do visível ( $\lambda < 400$  nm) correspondem a componentes inorgânicos (esmalte e hidroxiapatita sintética (116; 118) e a componentes orgânicos (produtos bacterianos, fluoróforos não identificados e alguns componentes de origem proteica como a tirosina, o triptofano e a piridina) (119). Há ainda um contínuo questionamento se a autofluorescência no verde é devida a cromóforos proteicos e tem apenas uma contribuição da apatita ou se é proveniente desse mineral (111; 120; 121; 122).

A literatura reporta vários estudos de fluorescência no esmalte e poucos na dentina (123). Outro fator complicador na comparação entre os vários relatos é a diferença de materiais e métodos, principalmente a variabilidade nos comprimentos de onda de excitação e nos procedimentos de análise, o que muitas vezes inviabiliza a comparação. Assim, consideraremos as evidências relatadas para o esmalte utilizando algum parâmetro semelhante ao usado no presente estudo e para as quais procuraremos analisar a viabilidade na dentina. Evidências (113; 114; 119) mostram que há diferenças na fluorescência do esmalte dentário hígido e cariado, na excitação com comprimento de onda no violeta ou azul e, provavelmente, essas diferenças são devido a modificações ópticas nos componentes desses tecidos e nas suas interações com a luz através dos fenômenos de espalhamento, transmissão ou absorção. Os métodos de detecção de cárie incipiente, tais como o QLF (111) e o Diagnodent (117), que usam a fluorescência, se baseiam nessas diferenças.

Quando a emissão de fluorescência foi comparada entre o esmalte humano e hidroxiapatita sintética em soluções, excitadas por uma luz com comprimento de onda de 375 nm (ultravioleta), foram encontradas fluorescências

semelhantes em picos de 460 (azul) e 540 nm (verde), tanto no componente humano quanto no sintético, o que levou os autores a concluir que nesse comprimento de onda de excitação, esses picos eram devido ao componente inorgânico do esmalte. Foi então sugerido que um método de diagnóstico de lesões cáries iniciais poderia ser feito com utilização de excitação em 488 nm (azul), um filtro de barreira até 540 nm, o que resulta em fluorescência dentro do espectro visível com  $\lambda$  maiores que esse (verde). Assim, foi observado que lesões de cárie mostram uma perda da fluorescência em relação ao tecido sadio e emitem menos fluorescência acima de 540 nm. Foi concluído que a perda de material inorgânico contribuiria para este decréscimo (111; 116).

Em decorrência desses achados, um método de detecção de cárie em superfície lisa foi proposto e denominado de quantificação da fluorescência induzida por laser, ou quantitative laser fluorescence (QLF) (124). Esse método apresentava um laser de argônio que emitia uma luz com comprimento de onda de 488 nm (azul), uma câmera CCD que captava a imagem e transmitia para um computador. Um filtro de 540 nm foi acoplado para barrar luz com comprimento de onda menor que esse, e assim detectar apenas a fluorescência emitida pelo dente. Um programa de computador específico foi desenvolvido para armazenar as imagens e quantificar a perda mineral das lesões de cárie usando a diferença entre a fluorescência do dente hígido (mais intensa) e a da região desmineralizada. Assim, três parâmetros eram fornecidos para as lesões: média da diferença de fluorescência, diferença máxima de fluorescência e área da lesão. Estudos *in vitro*, *in situ* e *in vivo* foram realizados e demonstraram que o método apresentava boa correlação com perda mineral, avaliada por microrradiografia transversa (125), e era também capaz de avaliar remineralização (125; 126). Devido a dificuldades de utilização clínica e em laboratório, um novo equipamento semi-portátil foi desenvolvido utilizando um sistema de filtros e um sistema de luz não coerente com comprimento de onda semelhante, mas que por essa ser absorvida no caminho, o espectro de excitação apresentava um pico em 404 nm (violeta).

Esse novo método, quantificação da fluorescência induzida por luz (QLF) mostrou-se efetivo na maioria dos estudos, entretanto não é adequado para detecção e quantificação de lesões oclusais, para lesões mais profundas (> 400 $\mu$ m),

próximas à dentina e também não apresenta grande precisão na quantificação de perda mineral de tecido cariado dentinário. Apesar de esse equipamento estar disponível para uso na prática clínica, é caro e necessita de um computador para armazenar e processar as imagens, fazendo com que o aparelho não seja portátil. Diante dessas limitações, outros equipamentos têm sido propostos (111; 118). É importante destacar que os comprimentos de onda de excitação e de fluorescência utilizados no presente estudo assemelham-se aos do novo QLF, com a vantagem de que o sistema usado nesse estudo pode vir a ser uma alternativa para ser usado na detecção de fluorescência na dentina, de maneira mais simples e mais barata.

Um sistema de imagem da fluorescência (SIF) (110), com algumas semelhanças ao utilizado no presente estudo, entretanto utilizando um espectrômetro, foi empregado em um estudo com um único pré-molar superior humano com lesões de cáries com cavidade na região da coroa e na porção da raiz, além de desmineralização radicular sem cavitação visível a olho nu. Através de imagens espectrais da autofluorescência dental com pico em 520 nm e 612 nm, com excitação em 405 nm, esse sistema mostrou ser capaz de detectar a diminuição ou ausência da fluorescência nestes comprimentos de onda, associada aos processos de desmineralização dental ou formação de cáries com perda da estrutura dental, nas mesmas regiões da amostra que apresentavam os sinais visuais desses processos. A imagem da autofluorescência emitida com pico em 520 nm apresentava-se com maior nitidez do que a outra. Entretanto esse sistema não era portátil, necessitava de calibração e trabalhava através de composição das imagens espectrais. Sendo assim, no presente estudo foi usado um SIF baseado em uma roda mecânica com filtro óptico banda larga no lugar do espectrógrafo, o que proporcionou um sistema robusto e portátil, mais rápido, além de não necessitar de calibração e composição das imagens espectrais (109; 110; 112).

Na literatura há predominância de relatos de maior fluorescência da dentina em relação ao esmalte, entretanto nesses estudos geralmente a fluorescência é atribuída ao componente orgânico e o comprimento de onda de excitação (127; 128) e de fluorescência não são os mesmos usados no presente trabalho. No entanto, em um estudo (129) com excitação em 488 nm e emissão > 515 nm, foi relatado que a cárie em dentina apresenta maior fluorescência que o

tecido sadio e não foi encontrada relação direta entre esse fenômeno e o componente mineral, sendo sugerido que nesses parâmetros, os cromóforos responsáveis deveriam ter natureza orgânica. Desse estudo é importante destacar que também foi discutido que se os cromóforos fossem de natureza estritamente inorgânica, seria esperado que a dentina saudável (especialmente as áreas hipermineralizadas) e o esmalte apresentariam um alto brilho de fluorescência assim como a dentina desmineralizada ou cariada exibiria uma menor fluorescência (118). Contudo, mais trabalhos são necessários para explicar a origem da fluorescência na região espectral do verde dos tecidos duros dentais (117).

## 4. MATERIAL E MÉTODO

### 4.1. Delineamento experimental

Foi conduzido um estudo *in vitro*, cego, empregando-se 60 blocos de dentina radicular bovina, os quais foram desmineralizados por 32 h buscando-se simular a instalação de uma lesão incipiente de cárie. Em seguida, os blocos foram aleatoriamente distribuídos em 6 grupos experimentais (n=10): G1 – grupo sem tratamento, o qual não foi submetido à ciclagem de pH (grupo cárie inicial); G2 – grupo sem tratamento e que foi submetido à ciclagem de pH (controle negativo); G3 – grupo tratado com flúor fosfato acidulado (FFA) com 1,23% F<sup>-</sup>, pH 3,3 – 3,9, durante 4 minutos (controle positivo); Grupo 4 – amostras irradiadas com laser de Nd:YAG ( $\lambda=1064$  nm); G5 – amostras irradiadas com laser de Nd:YAG e posterior aplicação de FFA; G6 – amostras com aplicação de FFA e posterior irradiação com laser de Nd:YAG. Na sequência, foi simulada a progressão das lesões de cárie por meio de ciclagem de pH com duração de 4 dias nos grupos G2 a G6, sendo o grupo G1 mantido para fins de comparação. Mudanças composicionais e de fluorescência foram monitoradas por meio da técnica da micro-reflexão atenuada da espectroscopia de absorção no infravermelho por transformada de Fourier ( $\mu$ -ATR/FTIR) e por meio de um sistema de imagens da fluorescência (SIF), respectivamente, em três momentos distintos, isto é, antes da desmineralização inicial, após a desmineralização inicial e após os tratamentos. Após a ciclagem de pH, as amostras foram submetidas à análise de fluorescência, assim como à análise da resistência à desmineralização por meio de análise de microdureza seccional. A análise estatística foi executada individualmente para cada metodologia de análise ( $\mu$ -ATR/FTIR, SIF e Microdureza), após a verificação dos pressupostos de independência, homogeneidade e normalidade dos dados amostrais, ao nível de significância de 5%. Em todas as análises efetuadas, os tratamentos foram considerados como fatores de variação, os blocos de dentina como unidade experimental e, como variáveis resposta, tem-se a variação composicional, a variação de fluorescência e a perda de microdureza em relação ao substrato sadio e

com cárie inicial. O fluxograma a seguir (Figura 14) ilustra o delineamento experimental empregado no presente estudo.

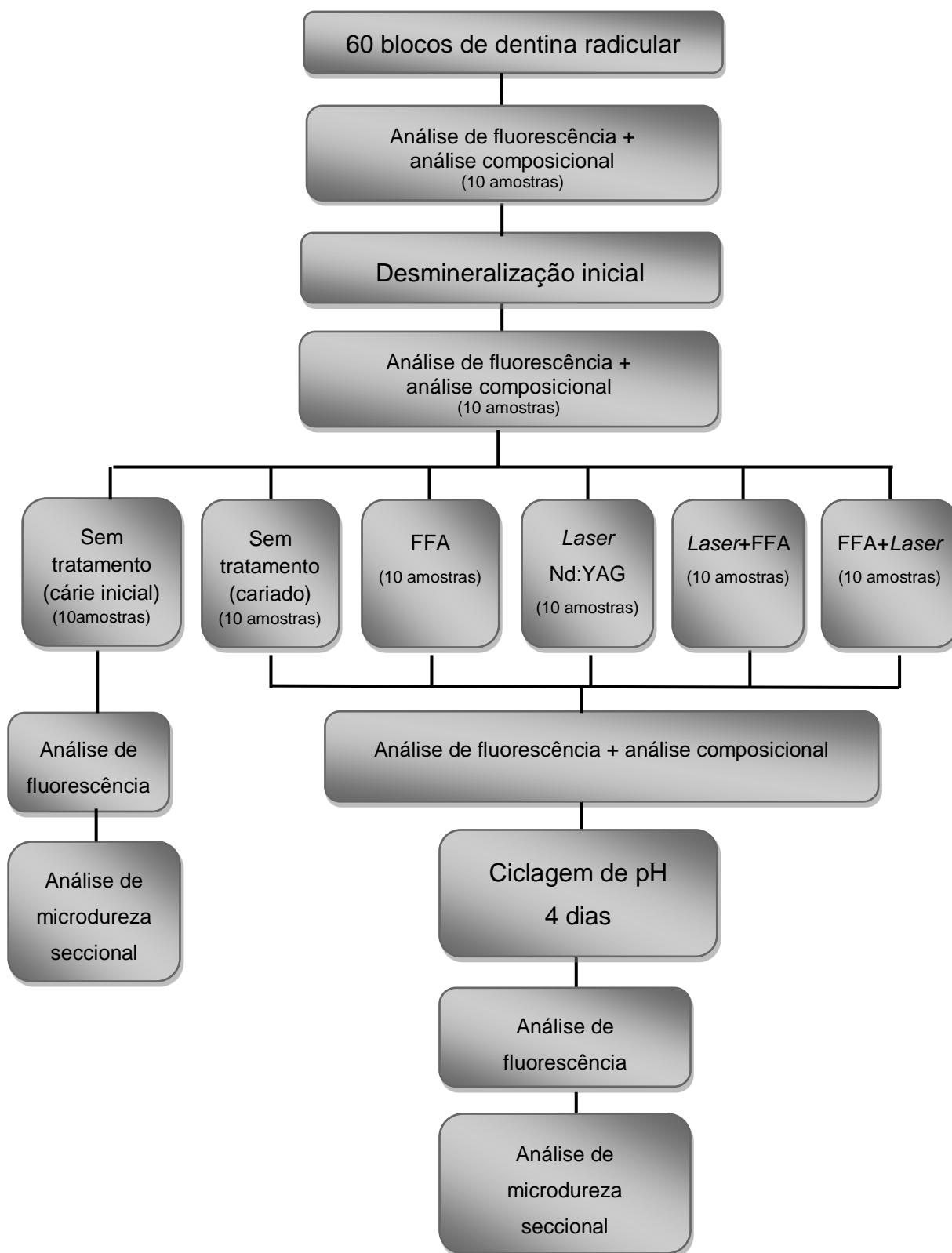


Figura 14 - Fluxograma que evidencia as diferentes fases experimentais do presente trabalho.

## 4.2. Preparo das amostras

Para este estudo foram utilizados 30 dentes incisivos inferiores bovinos, os quais podem substituir os dentes humanos em vista de sua similaridade em testes bioquímicos (130; 131). A vantagem da utilização de dentes bovinos é que eles são mais fáceis de obter e de manipular. Além disso, eles apresentam uma composição química relativamente mais uniforme o que proporciona menores variações nas respostas nos experimentos relacionados com efeitos cariogênicos e anticariogênicos, sendo já demonstrado em estudos *in situ* que a dentina bovina pode ser usada em substituição à humana para avaliar a progressão de cáries e o efeito de dentifrícios fluoretados (130; 131; 132; 133; 134). Tais dentes foram obtidos em um único frigorífico, provenientes de bois da mesma raça e idade, após aprovação do presente projeto pela Comissão de Ética de Uso Animal da Universidade Federal do ABC (CEUA-UFABC), conforme documento no Anexo 1.

Após a obtenção, os dentes foram lavados com água corrente e detergente aniônico e tiveram seus indutos removidos com raspagem ultrassônica e profilaxia com pedra-pomes e água, com escova tipo Robinson<sup>®</sup> sob baixa rotação. As amostras foram então mantidas em ambiente úmido em recipiente com algodão estéril, água destilada e timol, para evitar o crescimento de fungos, até o momento dos experimentos.

Para o preparo das amostras, os dentes foram aderidos individualmente com cera pegajosa de uso odontológico (amarela, Kota<sup>®</sup>, Brasil) à uma placa de acrílico de 5x5cm e levados à cortadeira metalográfica de precisão (IsoMet 1000-Precision Saw Buehler, EUA) onde tiveram a raiz separada da coroa por meio do uso de um disco de corte diamantado.

Em seguida, cada raiz teve sua face vestibular aderida à placa de acrílico e na superfície lingual foi demarcado um retângulo de 8 x 4 mm de maneira que fossem obtidos blocos na face vestibular e lingual com tamanhos semelhantes e, então, um corte transversal foi realizado. As amostras foram submetidas a novos cortes sequenciais conforme esquema indicado na Figura 15, até que foram obtidos 2 blocos de cada raiz, um de cada face, sempre na porção cervical de cada uma.



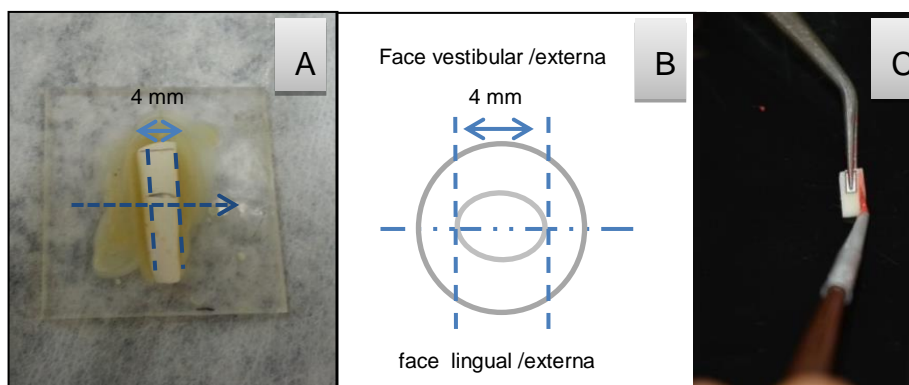


Figura 15 - Preparo das amostras de dentina radicular. A - raiz de incisivo inferior bovino aderido à placa de acrílico para ser seccionado; B - esquema de cortes da amostra de dentina pré-cortada transversalmente, para obtenção de blocos com 8 x 4 x 2 mm; C - proteção ácido-resistente sendo aplicada sobre a superfície frontal das amostras de dentina

Em seguida, as superfícies de cada bloco foram lixadas e planificadas com lixas de granulação 400,600 e 1200 (Silicon Carbide Grinding, Buehler, USA) em lixadeira polítrix (Arotec S.A. Ind. Com., Brasil). Esse procedimento resultou na obtenção de blocos padronizados de 8 x 4x 1,5 mm.

Com o objetivo de delimitar a área para desmineralização foram impressas máscaras de etiquetas autoadesivas (Pimaco, Brasil) com 4 x 2 mm, as quais foram posicionadas sobre a superfície externa das amostras com auxílio de pinça e explorador. Em seguida, as faces laterais, posterior e o restante da face anterior das amostras foram cobertas com 2 camadas de verniz ácido resistente (esmalte de unha) de cor forte (Figura 15C), facilitando a visualização de eventuais bolhas na aplicação do mesmo. Após a secagem desse esmalte, a etiqueta foi removida e a área exposta foi submetida à limpeza com cotonetes umedecidos em água destilada e deionizada para remoção de resíduos do adesivo proveniente das etiquetas, sob observação em lupa estereoscópica com aumento de 10 X (Nikon Inc. Instrument Group, EUA).

As amostras assim preparadas foram mantidas em ambiente úmido e sob refrigeração até o momento das análises

### **4.3. Análises efetuadas nas amostras hígidas**

#### **4.3.1. Análise composicional**

A análise composicional da dentina foi realizada empregando-se a espectroscopia de absorção no infravermelho por transformada de Fourier – FTIR (135). Inicialmente a técnica utilizada foi a de reflexão total atenuada (ATR-FTIR) empregando-se cristal de seleneto de zinco, que possibilita a obtenção de espectros qualitativos e quantitativos de amostras sólidas (104). Para a análise inicial das amostras hígidas antes da delimitação da área de 8mm<sup>2</sup> para desmineralização, essa técnica mostrou-se apropriada. Entretanto, após a delimitação da referida área com verniz ácido-resistente, essa técnica mostrou-se inadequada, pois, como a amostra era colocada sobre o cristal e pressionada suavemente (Figura 16), não era possível visualizar e posicionar a área a ser analisada, havendo então sobreposição do espectro dos componentes do verniz no espectro da dentina (Figura 17).

Assim, a obtenção de espectros foi efetuada, em todo o trabalho, utilizando a técnica de  $\mu$ ATR-FTIR, a qual permite uma análise não destrutiva e que pode ser realizada em vários momentos do estudo. Em acréscimo, essa técnica tornou-se a mais indicada pelo fato dessa técnica proporcionar uma profundidade de penetração da radiação da ordem de 0.66  $\mu$ m devido ao uso do cristal de Ge em contraste com os 2  $\mu$ m de profundidade de penetração obtida com o cristal de Seleneto de Zinco disponível no modo ATR (dados de profundidade de penetração de acordo com o cristal fornecidos pelo fabricante do equipamento). Isso permitiu que o sinal analisado ficasse restrito à superfície e portanto, à área dos tratamentos.

Assim, nesse trabalho foram conduzidos experimentos com o sistema de microespectroscopia utilizando o Microespectrômetro FTIR 610 acoplado ao Espectrômetro FTIR 660 (Varian Inc., EUA) instalado na Central Experimental Multiusuário da Universidade Federal do ABC (CEM-UFABC) (Figura 18). No momento de aquisição dos dados foram realizadas medidas em três pontos diferentes da mesma amostra, de onde foi tirada a média composicional de cada amostra. Em cada leitura, feitos 80 scans (103) resolução de 4 cm<sup>-1</sup> (136) sendo a

tomada de *background* realizada a cada 5 amostras. A faixa de espectros coletados variou entre 600 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ . O registro e a conversão dos espectros de absorção foram realizados através do programa específico do espectrômetro (Varian Resolutions Pro, Varian Inc., EUA). Os dados foram salvos em arquivos identificados individualmente por amostra, no formato .csv.

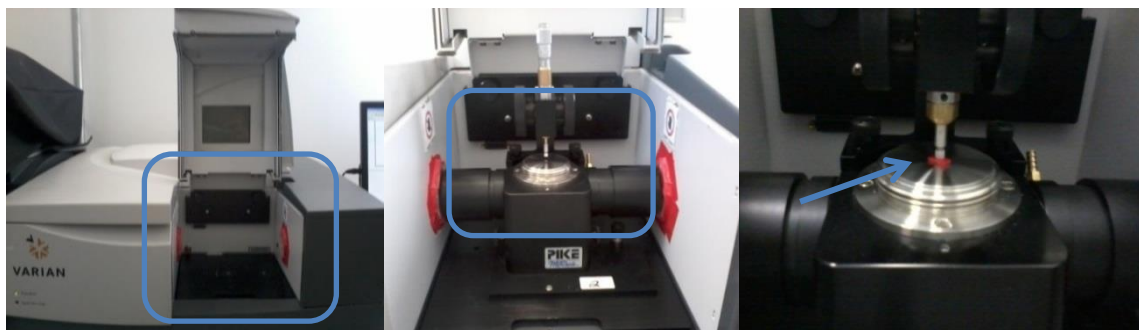


Figura 16 - Espectrômetro no infravermelho por transformada de Fourier –FTIR com destaque para o acessório de Reflexão Total Atenuada- ATR, onde está posicionada uma amostra de dentina (seta) .

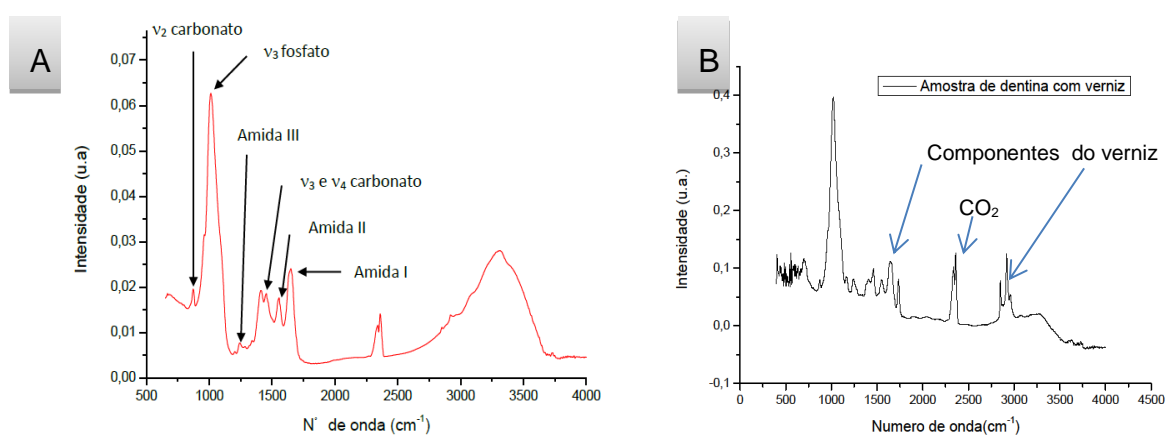


Figura 17 – Espectros representativos de amostras de dentina radicular bovina. **A** - espectro onde estão evidenciadas as principais bandas de absorção observadas nas análises qualitativa e semi-quantitativa nesse estudo; **B** - espectro de dentina radicular bovina com verniz ácido-resistente (esmalte de unha) obtido no ATR-FTIR.

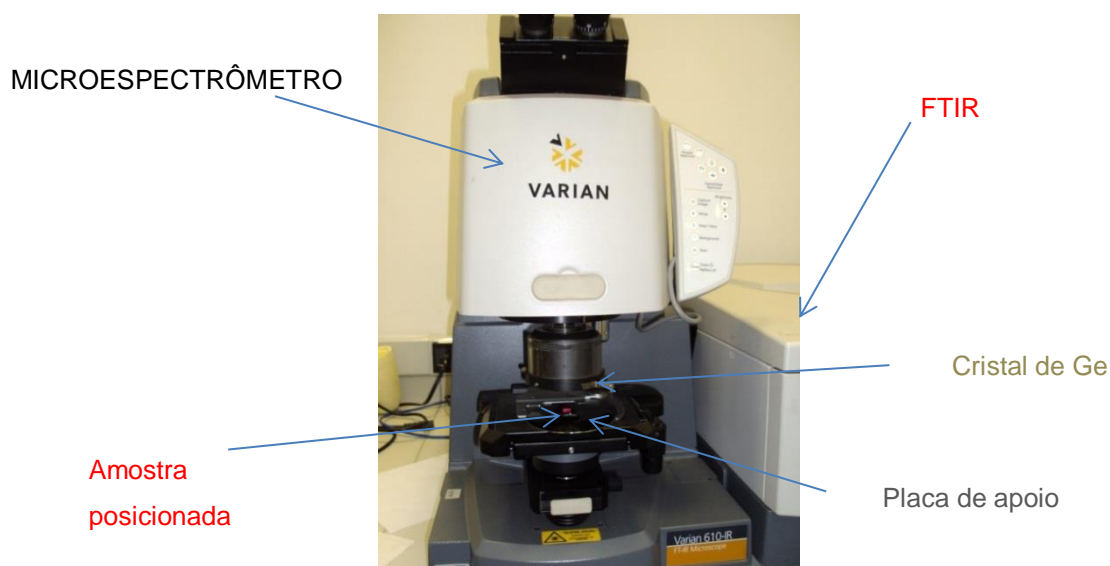


Figura 18 - Microespectrômetro Varian 610 onde foram tomados os dados para análise composicional da dentina.

Após a obtenção dos espectros foi utilizado o programa OriginPro (versão 8.0 - Origin®, OriginLab Corp, USA) para visualização desses e realização de uma análise qualitativa descritiva e semi-quantitativa das bandas presentes nas amostras. As bandas de absorção encontradas foram comparadas com os dados encontrados na literatura, conforme Tabela 10, Tabela 11 e Figura 17A. A faixa de interesse nesse trabalho é de  $800$  a  $1720\text{ cm}^{-1}$  onde estão localizados os picos de bandas de componentes da matriz orgânica e inorgânica dos tecidos duros dentais, havendo pequenas variações devido a características do equipamento, da técnica empregada e da local de origem do tecido dentinário utilizado em cada estudo.

Para comparação entre os grupos experimentais, foi realizada uma análise semi-quantitativa. Para tal, as áreas sob as bandas de absorção de interesse foram calculadas e normalizadas pela área sob a banda do fosfato, tendo em vista que este é o componente mais estável da dentina quando ocorre um aumento de temperatura. Isto é feito para se remover variações decorrentes do sinal infravermelho durante os experimentos, principalmente aqueles relacionados ao contato da amostra com o cristal (137).

Tabela 10 - Bandas de absorção associadas ao carbonato ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) e ao fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) presentes na dentina e no esmalte encontradas na literatura (#) e faixa das bandas usadas nesse estudo(♦) (103) (138) (139) (140) (46) (141).

Composto	Vibração	Frequência de vibração aproximada ( $\text{cm}^{-1}$ )		
		Dentina(#)	Dentina(♦)	Esmalte
<b>Carbonato (<math>\text{CO}_3^{2-}</math>)</b>	<b>Deformação angular assimétrica no plano (<math>v_2</math>)</b>	872	<b>826 a 888</b>	873/880
	<b>Estiramento assimétrico (<math>v_3</math> e <math>v_4</math>)</b>	1410; 1452; 1509; 1547	<b>1300 a 1516</b>	1415; 1460; 1480; 1543
<b>Fosfato (<math>\text{PO}_4^{3-}</math>)</b>	Deformação angular simétrica no plano ( $v_2$ )	471; 470/467	-	471
	Deformação angular assimétrica no plano ( $v_4$ )	563; 603; 755; 606; 559	-	561; 602; 582; 620
	<b>Estiramento assimétrico (<math>v_3</math>)</b>	1280 - 950	<b>888 a 1185</b>	1028 1008
	$v_1$	470 - 467	-	950 -1000

Tabela 11 - Bandas de absorção referentes ao conteúdo orgânico presentes na dentina e no esmalte encontradas na literatura(#) e faixa das bandas usadas nesse estudo(♦) (103) (142).

Composto	Vibração	Dentina (#)	Dentina (♦)	Esmalte
<b>Amida 3</b>	-	1224	<b>1185-1300</b>	1236
<b>Carbonato+Amida 2</b> N-H C-N	-	1393; 1442 1540	<b>1516 a 1590</b>	1395 1443 1534
Água + Amida 1 C=O	-	1550-1700	<b>1590 a 1720</b>	1643;1650
Estrutura do colágeno	-	1338/1333; 1288/1281 1204/1201	-	-
CH3	abano	1315	-	-
CONH (amida 3) C-N N-H	Estiramento Deformação	1245 1234	-	-
Água	-	-	2500 a 3664	-
CH (gordura) CH2 e CH3	-	-	2835 a 2980	-

### 4.3.2. Análise de fluorescência da dentina sadia – Sistema de Imagem da Fluorescência (SIF)

A análise de fluorescência da dentina utiliza a propriedade da luz, na qual a radiação ao interagir com a matéria torna-se capaz de fornecer informações sobre processos físicos químicos ocorridos.

No presente estudo, foi usado um SIF baseado em uma roda mecânica com filtros ópticos banda-larga, de acordo com o descrito previamente na literatura (112). A captura das imagens é feita por meio de uma câmera CCD científica mvBlueFOX120a (Matrix Vision, Alemanha); uma lente objetiva modelo #53-301(Edmund Optics, USA) e roda de filtros modelo CFW-1-8 (Finger Lakers Instrumentation, EUA) controlada por computador. No presente estudo, foi empregado o filtro banda larga com comprimento de onda de corte em 450 nm para auxiliar a captura da fluorescência, sendo a excitação da fluorescência efetuada por diodos emissores de luz (LEDs) de comprimento de onda de 405 nm e largura de banda de 30 nm. A roda de filtros, o sistema de iluminação e o suporte da amostra estão posicionados dentro de uma estrutura sob a forma de uma caixa preta. Um esquema do SIF e uma foto são apresentados na Figura 19 (112).

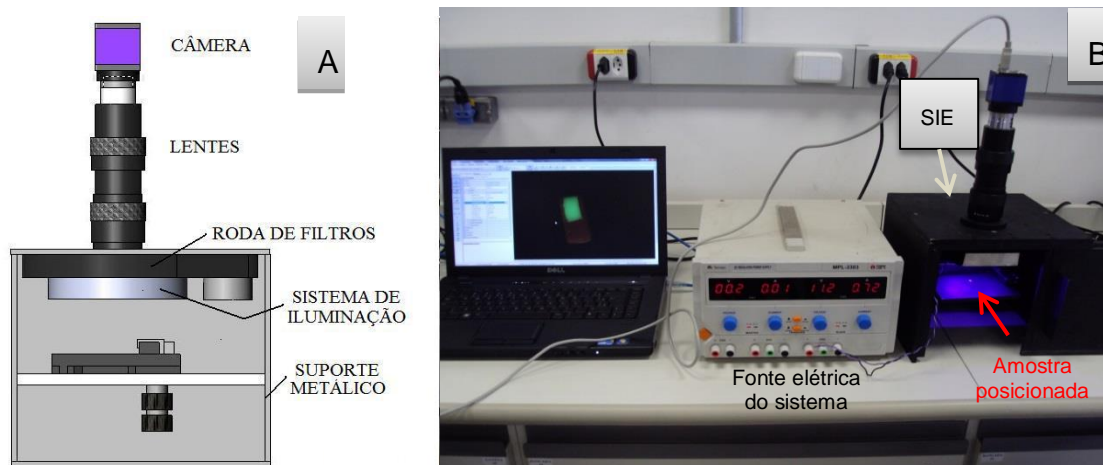


Figura 19 - Esquema do equipamento SIF empregado no presente estudo. **A** - esquema de montagem, destacando o alinhamento óptico dos principais componentes como câmera, lentes, roda de filtros e sistema de iluminação (71); **B** - imagem digital do sistema utilizado nesse experimento.

Antes do início da aquisição das imagens e depois a cada 10 imagens tomadas, foi realizada a aferição da potência óptica emitida pelos LEDs com o uso de um medidor de potência (FieldMaxII, Coherent, USA), o que garantiu a padronização da emissão dos diodos. Além disso, as amostras foram posicionadas duas a duas, em posição padronizada lado a lado, numa marca feita na placa suporte de amostras, para garantir que, em todas as aquisições, a energia recebida por cada uma delas tivesse a menor variação possível.

Para possibilitar o estudo comparativo entre as intensidades de fluorescência de todas as amostras do presente estudo, foi empregada uma amostra referência, a qual foi escolhida tomando-se por base a média de intensidade de fluorescência obtida nas amostras do grupo sadio.

Tendo em vista que o grau de hidratação das amostras influencia na fluorescência das mesmas, executou-se a análise de fluorescência imediatamente após a retirada de cada amostra do ambiente úmido no qual era mantida. Para tal, cada amostra foi suavemente seca com papel absorvente e posicionada no interior do equipamento. Imediatamente após a captura da imagem, a amostra era devolvida ao ambiente úmido. Para evitar a desidratação da amostra de referência, padronizou-se realizar a tomada das imagens de 10 amostras e, em seguida, a amostra de referência era devolvida ao ambiente úmido por 2 horas, tempo suficiente para permitir a re-hidratação da amostra referência, de acordo com estudo piloto.

Para aquisição das imagens o *software* de captura *wxPropView* (*driver version 2.5.17.1054*) para o ambiente Labview®, era acionado e então confirmado o reconhecimento por esse software da configuração da câmara digital através do aparecimento na tela do item “mvBlueFox-221-C”. Esse reconhecimento já proporcionava a abertura da tela de configuração da câmara no programa “Matrix Vision Hardware Configuration Tool” (Matrix Vision GmbH, USA) onde os itens de ganho de câmara e tempo de exposição eram ajustados em 10 dB e  $10^6\mu\text{s}$ , respectivamente. As amostras eram posicionadas, a caixa fechada, as imagens capturadas e salvas, após identificação, no formato Bitmap.

Essas imagens foram processadas através de uma rotina elaborada no programa Matlab<sup>®</sup> (The MathWorks, EUA) a qual utiliza o componente G do sistema RGB. Essa é a sigla do sistema de cores aditivas baseado na teoria da visão colorida tricromática usada na reprodução de cores em dispositivos eletrônicos, câmeras digitais e fotografias tradicionais. No sistema RGB, cada cor é definida pela quantidade de vermelho (Red), verde (Green) e azul (Blue) que a compõem e a maioria dos arquivos digitais atuais usam números inteiros entre 0 e 255 para especificar estas quantidades. O número 0 indica ausência de intensidade e o número 255 indica intensidade máxima, sendo que cada cor nesse sistema é identificada por uma tripla ordenada (R, G, B) de números inteiros entre esses limites (143; 144). No caso do processamento nesse estudo, foi considerada apenas a componente G da qual foram obtidas as médias de intensidade e desvios padrão de cada pixel da imagem, sendo esses valores representativos da fluorescência média de cada amostra. Utilizando o programa Excel, foram calculadas as médias de intensidade de fluorescência em cada grupo juntamente com o desvio padrão para a determinação da intensidade de fluorescência observada.

#### **4.4. Simulação do processo de cárie inicial *in vitro***

Para simular os efeitos dos tratamentos na progressão de lesões de cárie, foi necessária a desmineralização inicial das amostras visando-se criar uma lesão de cárie subsuperficial inicial com profundidade aproximada de 95  $\mu\text{m}$  (145).

Para tal, todas as amostras do presente estudo foram aderidas em placas de cera tipo 7 de uso odontológico (Tecnew, Brasil) e, em seguida, tiveram as regiões protegidas com o verniz ácido resistente e recobertas cuidadosamente com uma fina camada dessa cera. Objetivando mantê-las submersas na solução desmineralizante durante todo o processo, essas placas foram adaptadas 2 a 2, em suporte metálicos, os quais foram confeccionados com fio ortodôntico de 0,8 mm de diâmetro (Morelli, Brasil), conforme Figura 20. Assim, as amostras foram



desmineralizadas em grupos, permitindo que todas elas fossem colocadas e retiradas da solução ao mesmo tempo.

O processo de simulação de cárie inicial *in vitro* consistiu na submersão das 60 amostras, por 32 horas, em estufa a 37°C, numa solução desmineralizante, constituída por 1,4 mM de cálcio, 0,91 mM de fosfato e 0,06  $\mu\text{g F}^-/\text{mL}$ , em tampão acetato 0,05 M com pH 5,0 (2mL de solução/ $\text{mm}^2$  de substrato exposto, 16 ml por amostra) (145). Após esse período, as amostras foram lavadas com água deionizada e secas delicadamente com papel absorvente. As amostras com lesão de cárie subsuperficial inicial assim obtidas foram mantidas em ambiente úmido sob refrigeração.

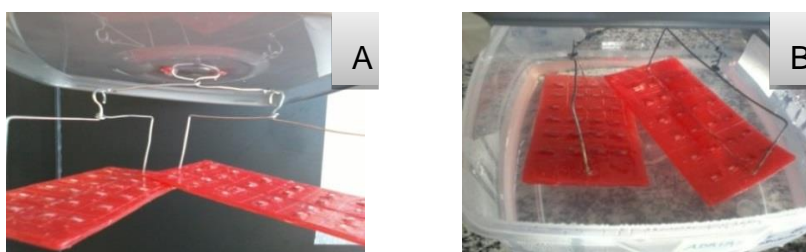


Figura 20 – Indução do processo de desmineralização inicial. A - amostras aderidas em cera tipo 7 adaptada em suporte metálico confeccionado com fio ortodôntico; B - amostras sendo submetidas ao processo de desmineralização inicial, simulando *in vitro*, o processo de cárie. Foram utilizados 2 mL de solução por  $\text{mm}^2$  de área da amostra exposta, totalizando 16 mL por cada amostra.

#### 4.5. Tratamentos para prevenção da progressão do processo de cárie radicular

Após a desmineralização inicial, as 60 amostras de dentina radicular foram aleatoriamente separadas em 6 grupos experimentais (n = 10), a saber:

**G1- Grupo cárie inicial:** grupo sem tratamento, o qual não foi submetido à ciclagem de pH;

**G2 – Grupo cariado sem tratamento** (grupo controle negativo): grupo sem tratamento, submetido à ciclagem de pH.

**G3 - Grupo FFA** (grupo controle positivo)

As amostras desse grupo após terem sua superfície suavemente secas com papel absorvente, foram abundantemente cobertas, com o auxílio de cotonete, com gel de flúor fosfato acidulado com 1,23 % de flúor, em pH que varia de 3,3 – 3,9, proporcionado pela presença de 0,1M de ácido fosfórico (Flúor Gel, Dentsply, Brasil), que permaneceu sobre elas por 4 minutos (4). Transcorrido esse tempo, os blocos foram lavados com água destilada e deionizada por 1 minuto e secos com papel absorvente.

**G4 - Grupo Laser**

Esse grupo recebeu irradiação com o equipamento laser de Nd:YAG, pulsado Pulse Master 1000 (American Dental Technology, USA), do Laboratório Experimental de Lasers em Odontologia da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (Figura 21). Este laser emite comprimento de onda de 1,064  $\mu\text{m}$  e possui um sistema de entrega de fibra óptica de quartzo de diâmetro interno de 300  $\mu\text{m}$ . Devido ao fato de ser um laser com comprimento de onda situado na faixa do espectro eletromagnético não visível, esse equipamento se utiliza de luz guia vermelha de um laser de He-Ne ( $\lambda = 632 \text{ nm}$ ). No momento das irradiações, o equipamento foi ajustado com potência média de 0,6 W, energia por pulso de 60mJ, taxa de repetição de 10Hz e densidade de energia de 84,9  $\text{J}/\text{cm}^2$ , sendo as irradiações realizadas sob a forma de varredura manual, com tempo de irradiação por amostra padronizado (91). No momento das irradiações, a energia emitida foi verificada por um medidor de energia (Coherent FieldMaster GS+ Detector LM45; Coherent, USA), a cada 10 amostras irradiadas (Figura 21A).

Visando aumentar a absorção do laser na superfície dental, uma película de fotoabsorvedor foi aplicada previamente às irradiações, o qual consistiu de uma pasta de pó de carvão vegetal finamente triturado, diluídas em uma solução de água destilada com etanol 50% (42) (Figura 21B). A aplicação do fotoabsorvedor foi realizada imediatamente antes das irradiações, com pincel #1 sobre toda a superfície a ser irradiada, consistindo de uma camada homogênea, conforme Figura 21C.

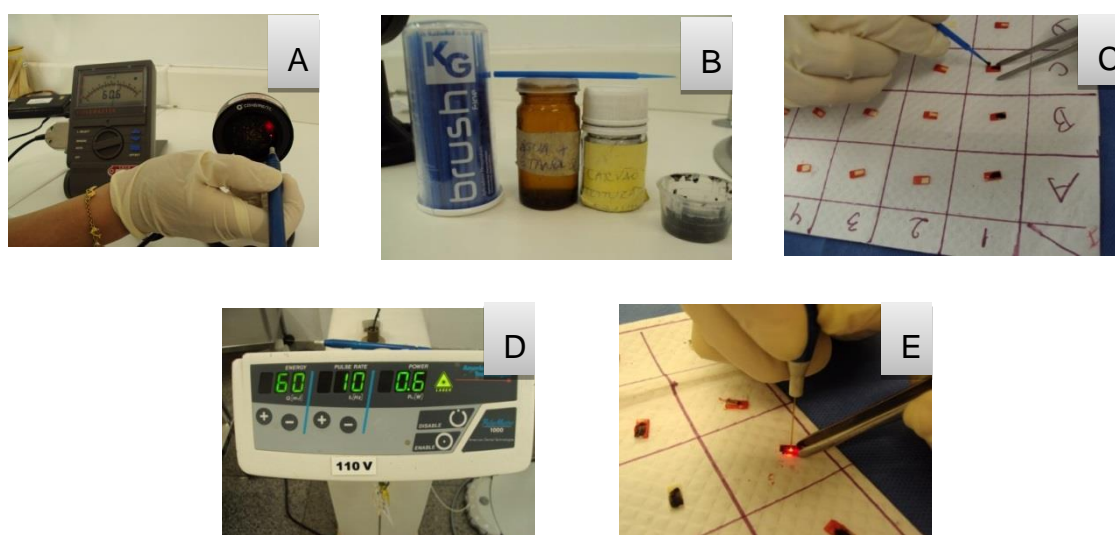


Figura 21 - Imagens relacionadas à irradiação laser realizada nesse estudo. **A** - verificação da energia emitida por meio de um medidor de energia; **B** - componentes da pasta fotoabsorvedora; **C** - pasta de fotoabsorvedor sendo aplicada nas amostras, previamente à irradiação; **D** - equipamento de laser de Nd:YAG utilizado; **E** irradiação com laser de Nd:YAG sendo realizada sobre a superfície das amostras de dentina radicular bovina.

### G5 - Grupo Laser + FFA

Nesse grupo as amostras foram irradiadas, conforme descrito para o Laser e então foi feita aplicação tópica de flúor conforme descrito para o Grupo FFA.

## **G6 - Grupo FFA + Laser**

Nesse grupo as amostras foram submetidas a aplicação tópica de flúor, conforme descrito para o Grupo FFA; em seguida, tiveram o fotoabsorvedor aplicado sobre sua superfície e logo após foram irradiadas, conforme descrito para o Grupo Laser.

### **4.6. Simulação do desenvolvimento do processo de cárie *in vitro*: Ciclagem de pH**

Nesse estudo, para possibilitar a simulação da progressão das lesões iniciais de cárie, as amostras foram individualmente submetidas a um modelo de ciclagem de pH conforme modelo proposto por ten Cate & Duijsters (1982) (146), modificado por Queiroz (2004) (145), por um período de 4 dias, visando-se evitar a perda estrutural da superfície da dentina.

Desta forma, a solução desmineralizadora (Des) foi constituída de 1,4 mM de cálcio, 0,91 mM de fosfato e 0,06 µg F-/mL, em tampão acetato 0,05 M com pH 5,0. A solução remineralizadora (Re) foi constituída de 1,5 mM de cálcio, 0,9 mM de fosfato, 150 mM de KCl e 0,05 µg F-/mL em 0,1 M de tampão TRIS em pH 7,0. Para a conservação, evitando-se o crescimento de fungos, ao final do preparo da quantidade necessária, acrescentou-se, ao recipiente de armazenagem, a quantidade de 0,64 gramas de Timol (Cromoline Química Fina Ltda, SP, Brasil) para cada litro de solução.

Na Tabela 12, observam-se os reagentes utilizados no preparo da solução, sua fórmula química, peso molecular, constituinte fornecido na ordem de adição para o preparo da solução, quantidade usada para o preparo de 1 litro da solução e para qual solução foi usada.

Tabela 12 - Informações sobre composição das soluções Desmineralizante (Des) e Remineralizante (Re) usadas nesse estudo.

Reagente	Fórmula química	Peso molecular (g/mol)	Quantidade usada para o preparo de 1 litro de solução	
			DES	RE
<b>Nitrato de Cálcio tetrahidratado</b>	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	236,15	0,330 g de reagente	0,354 g de reagente
<b>Fosfato de Sódio Bibásico</b>	$\text{Na}_2(\text{HPO}_4)_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$	268,07	0,244 g de reagente	0,241 g de reagente
<b>Cloreto de Potássio</b>	KCl	74,55	-	11,182 g de reagente
<b>Padrão de flúor de 100 ppm</b>	-	-	0,6 mL de reagente	0,5 mL de reagente
<b>Tampão ácido acético glacial</b>	$\text{CH}_3\text{COOH}$	60,05	2,86 g de reagente	-
<b>Tampão TRIS</b>	$\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$	121,14	-	12,114 g de reagente
<b>pH</b>	HCl a 20% NaOH a 20% (com H <sub>2</sub> O d.d)	-	5,0	7,0

O processo de ciclagem de pH (145) consistiu na submersão dos blocos na solução Des por um período de 4 horas, sendo utilizadas 6,25 mL de solução por  $\text{mm}^2$  de amostra. Após esse período, as amostras eram retiradas da solução Des, lavadas abundantemente com jato de água deionizada por 10 segundos, secas delicadamente com papel absorvente, e submersas na solução Re por um período subsequente de 20 horas, sendo utilizada 3,12 mL de solução Re por  $\text{mm}^2$  de amostra. O esquema da ciclagem de pH utilizado no presente estudo encontra-se na Figura 22.

As amostras foram submetidas ao procedimento de ciclagem separadas por grupos, sendo empregado um recipiente plástico e uma placa de cera 7 para cada grupo experimental. Os recipientes com as amostras eram mantidos em temperatura constante a 37 ° C, sem agitação e, durante o período de ciclagem proposto, não houve troca de soluções. No final da ciclagem de pH, as amostras foram removidas da placa de cera 7 empregadas durante a ciclagem, acondicionadas em recipientes com divisórias individuais e identificadas, separados por grupo e mantidas em ambiente fechado, úmido e sob refrigeração até o momento das análises.



Figura 22: Diagramação do processo de simulação da progressão de cárie em dentina radicular bovina realizado nesse estudo.

#### 4.7. Análise da perda de microdureza seccional

A análise de microdureza seccional foi efetuada para verificar os efeitos dos diversos tratamentos na inibição da progressão da lesão de cárie, tendo em vista a alta correlação entre os valores de microdureza (0,91) e a perda mineral medida por microtomografia (147). Para tal, esta análise foi efetuada imediatamente após indução de cárie incipiente no grupo sem tratamento e em todas as amostras submetidas à ciclagem de pH.

Assim, as amostras foram seccionadas longitudinalmente, por utilização de disco diamantado sob refrigeração em cortadeira metalográfica (Buehler, USA), com corte localizado próximo a uma das bordas das lesões, buscando-se preservar a integridade das lesões o máximo possível. Em seguida, as lesões seccionadas foram embutidas em resina acrílica termicamente ativada (Vipi Cril, Brasil), com a face seccionada voltada para baixo, com auxílio de embutidora metalográfica PRE-31 (Arotec, Brasil). Para o embutimento, os ciclos foram padronizados em 7 minutos

de aquecimento, com pressão mantida entre 125-150 Kgf/cm<sup>2</sup>, seguido por 9 minutos de resfriamento. As amostras assim embutidas foram planificadas e polidas, utilizando-se lixas de granulação 400, 600 e 1200 (Buehler, USA), assim como pasta de polimento de diamante de granulação de 1 µm e disco de feltro (Buehler, USA).

Após o polimento, as amostras foram submetidas à análise de microdureza seccional Knoop, utilizando-se o microdurômetro *Microscopic Hardness Tester* – HV-1000 (Huatec Group Corporation, China) com ponta de indentação do tipo Knoop (Figura 23A). Para tal, em cada amostra, foram realizadas três linhas de 19 indentações, com 10 µm de distância entre elas (até 80 µm de profundidade) e com 20 µm de distância até 300 µm de profundidade (Figura 23B). Estas linhas foram posicionadas na região central de cada amostra, de acordo com o determinado na literatura (50; 145). Entre as linhas, a distância padronizada foi de 100 µm, sendo todas as indentações realizadas com carga de 10 g durante 5 segundos (134; 145). Foi realizada a medida da maior diagonal de cada indentação utilizando o microscópio Olympus BX51M (Olympus, Japão), com aumento de 1000X, através do software Belview (Bel Photonics, EUA) (Figura 23C). Esses valores foram inseridos numa planilha Excel e utilizando a fórmula para cálculo específica de dureza Knoop (American National Bureau, 1939) foi obtido o KHN (*Knoop Hardness Number*) de cada indentação, de acordo com a equação 8 (148):

$$\text{KHN} = F/CL^2 \quad [8]$$

onde F é a carga aplicada em Kgf (nesse caso 0,01), C é a constante do penetrador (0,07028) e L é o comprimento medido da diagonal maior da impressão em mm. Para cada amostra, foi obtida a média do KHN das três colunas, em cada profundidade.

Esses dados foram transportados para planilhas, onde foram calculadas as médias dos valores em cada profundidade, para cada grupo. A plotagem dos valores de microdureza Knoop, relacionados à profundidade nas quais foram obtidos, permitem o traçado de uma curva característica da lesão de cada amostra ou grupo. Dessa forma, é possível o cálculo da perda de microdureza de cada amostra, correspondente à área sob a curva traçada. Também é feita a projeção do perfil mineral da parte da amostra considerada hígida e o cálculo da área sob essa

curva. Assim, a área de perda de microdureza ( $\Delta S$ ) corresponderá à diferença entre a área do tecido hígido e a área do tecido cariado (149) (Figura 24).

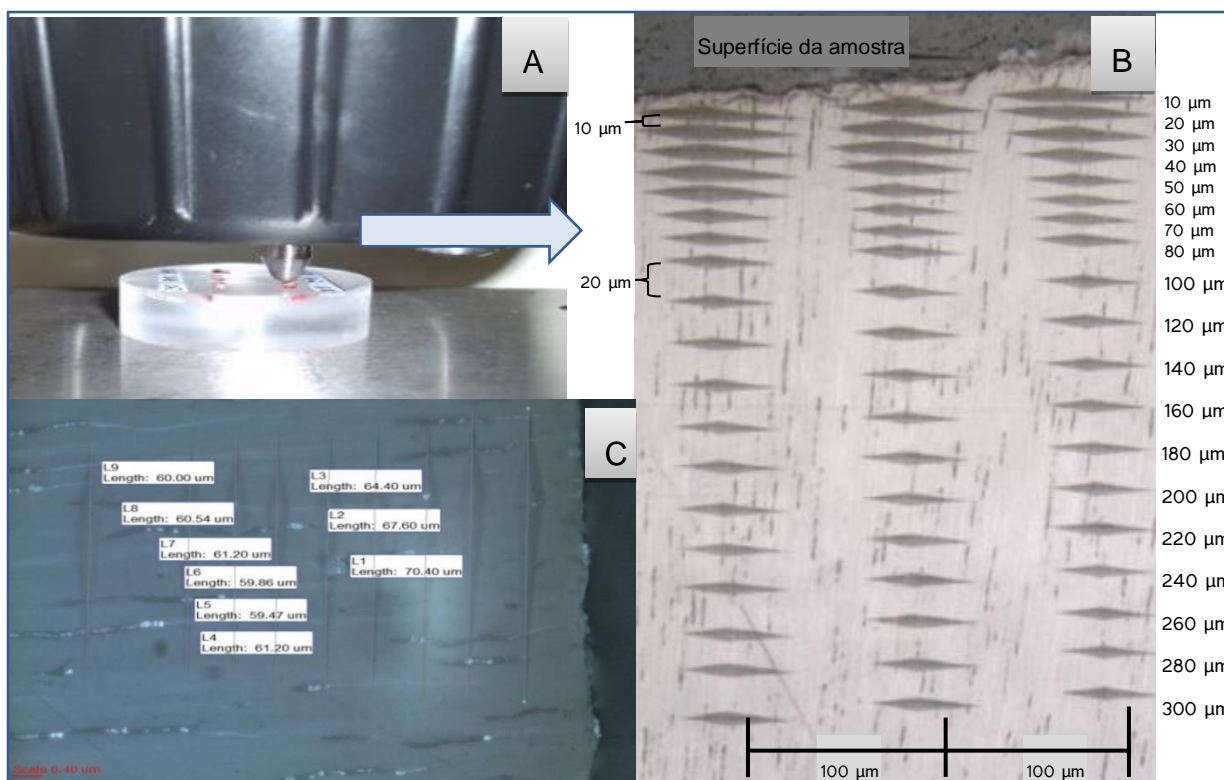


Figura 23 - Imagens relacionadas à análise de microdureza seccional realizada nesse estudo. **A** - microdurômetro indentando as amostras embutidas em resina acrílica; **B** - imagens de microscopia ( aumento de 200X) das indentações e distâncias utilizadas; **C** - imagens de microscopia da medição da maior diagonal das endentações (aumento de 1000X).

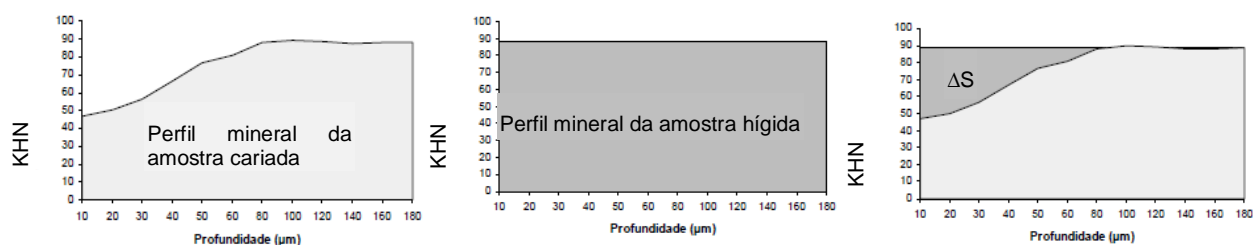


Figura 24 - Ilustração do parâmetro ( $\Delta S$ ), correspondente à diferença da área da projeção de cada amostra hígida e a área da amostra cariada.

Vale ressaltar que não foi realizado o cálculo da perda mineral a partir do cálculo do Delta S, tendo em vista a discrepância encontrada na literatura a respeito da forma de conversão dos dados de Delta S em perda mineral (147; 150)



## 4.8. Forma de análise dos resultados

### Análise de FTIR

Para comparação entre os grupos experimentais foi realizada uma análise semi-quantitativa para a qual as áreas sob as bandas de absorção de interesse foram calculadas e normalizadas pela área sob a banda do fosfato, tendo em vista que este é o componente mais estável da dentina quando ocorre um aumento de temperatura.

Para a análise estatística dos dados composicionais da dentina, os testes foram realizados separadamente para cada banda de absorção considerada, ao nível de significância de 5%. No caso de comparação de apenas 2 grupos por vez (grupos sadio x cariado), foi empregado o teste *t* de Student para dados que tinham variâncias com distribuição normal. Para os dados com distribuição não normal foi realizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney, utilizando-se os dados puros.

Na segunda fase, para a comparação entre os grupos de tratamento, primeiramente foram testados os pressupostos para a realização da análise de variância; assim, foram realizados os testes de normalidade e homogeneidade das variâncias, executando-se os testes de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente, sempre ao nível de significância de 5%. Testados estes pressupostos, para cada grupo de tratamento, foi empregada a análise de variância (ANOVA), com teste *post-hoc* de Tukey, ao nível de significância de 5%, para dados cujas variâncias apresentaram distribuição normal. Para os dados cujas variâncias apresentaram distribuição não normal, foi realizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls para contraste, ao nível de significância de 5%.

## Análise de fluorescência

Em um estudo piloto, foi observado que a amostra referência, apesar de ser a mesma em todas as imagens, apresentava uma variação na intensidade de fluorescência entre as várias imagens obtidas, as quais provêm da imprecisão do instrumento, ou até mesmo da flutuação estatística dos dados (dada pelo desvio padrão) a serem considerados para o cálculo da média em um grupo. Desse modo, quando se faz medições a fim de chegar indiretamente a outras grandezas, essas incertezas precisam ser levadas em conta, e a forma de se calcular a incerteza final da grandeza encontrada indiretamente é através do uso da “Teoria de Propagação de Erro Experimental” (151).

Como o próprio grupo controle apresenta uma variação na fluorescência, o cálculo do índice é proposto para excluir qualquer variação de sinal presente simultaneamente nas amostras experimental e controle. Assim, o índice representa a relação entre a média de intensidade de fluorescência do grupo considerado (grupo experimental) e a média de intensidade de fluorescência do controle (aqui representado pelo grupo formado pelos dados obtidos da mesma amostra referência). Sendo assim, nesse estudo foi usada a média do índice de propagação de erro de cada grupo ( $I_{nd}$ ) e o desvio padrão desse índice para a construção dos gráficos de barras e das barras de erro, respectivamente.

Após os cálculos dos valores de índice e desvio padrão do índice de cada grupo experimental, partiu-se para a análise estatística dos dados, considerando-se os valores de índice. Primeiramente foram testados os pressupostos para a realização da análise de variância; assim, foram realizados os testes de normalidade e homogeneidade das variâncias, executando-se os testes de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente, sempre ao nível de significância de 5%. Testados estes pressupostos, para cada grupo de tratamento, foi empregada a análise de variância (ANOVA), com teste *post-hoc* de Tukey, ao nível de significância de 5%. Utilizou-se o programa IBM SPSS Statistics 20 (SPSS Ins., EUA). Nos grupos cujas variâncias

tiveram distribuição não-normal, foi executado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e teste de Student-Newman-Keuls para contraste, ao nível de significância de 5%.

### **Análise de microdureza seccional**

Como os dados relativos às médias das áreas de perda de microdureza seccional apresentaram variância com distribuição não normal, foi realizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls para contraste, ao nível de significância de 5%.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Análise composicional

A Figura 25 representa os espectros médios de  $\mu$ -ATR/FTIR obtidos de amostras de dentina radicular bovina sadias e com desmineralização inicial (imediatamente antes dos tratamentos), nos quais podem ser observadas, nas mesmas posições, nos dois espectros, as bandas de absorção no infravermelho localizadas entre  $750\text{ cm}^{-1}$  a  $1800\text{ cm}^{-1}$ , as quais permitem a identificação de grupos funcionais específicos do tecido dentinário, correspondentes ao conteúdo orgânico e inorgânico.

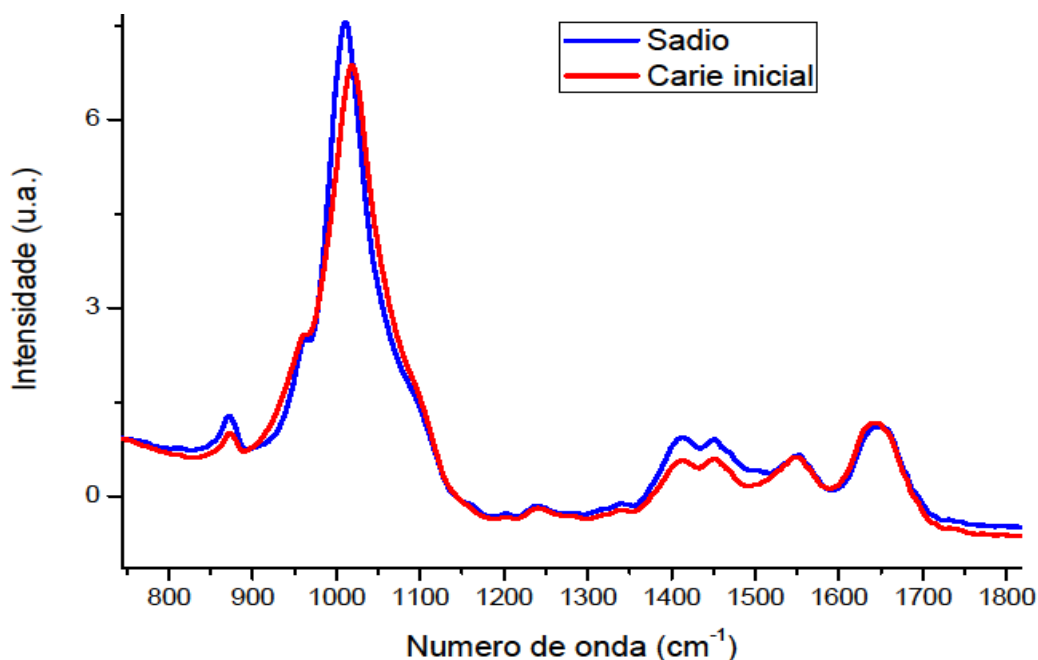


Figura 25 - Espectros médios de  $\mu$ ATR/FTIR, normalizados vetorialmente, de dentina radicular bovina sadia e submetida ao processo de desmineralização inicial.

A Figura 26 mostra os resultados da análise semi-quantitativa do grupo sadio e do grupo cárie inicial, onde se observa uma variação na relação entre as áreas sob as bandas de absorção. Pode-se evidenciar que houve uma significativa ( $p < 0,05$ ) diminuição na área correspondente à vibração  $\nu_2$  carbonato em relação ao conteúdo de fosfato, mas que a proporção referente aos grupos amidas (I, II e III) em relação ao fosfato aumentaram significativamente ( $p < 0,05$ ) no grupo cariado. Tendo em vista que o teor de carbonato e de fosfato está relacionado ao conteúdo inorgânico do tecido e que o teor de amidas está relacionado ao conteúdo orgânico, observa-se, neste processo de desmineralização inicial da dentina, uma perda do conteúdo inorgânico e uma maior exposição do conteúdo orgânico da dentina.

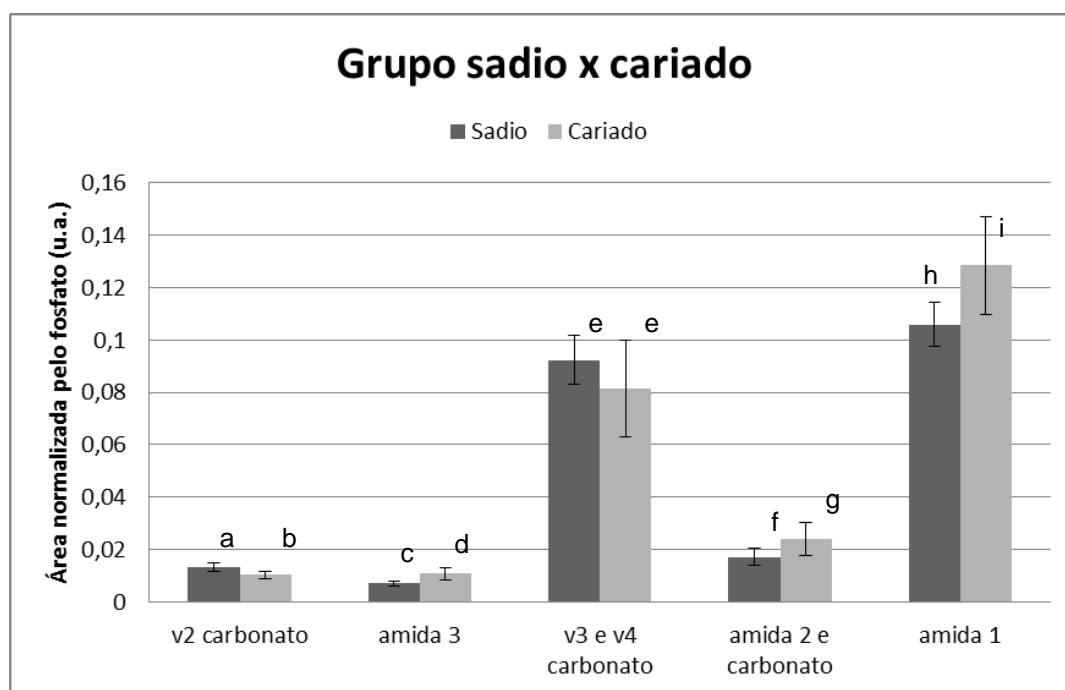


Figura 26 - Comparação entre as áreas sob as bandas de absorção no infravermelho, após normalização pela área do fosfato, entre o grupo sadio e o grupo submetido à criação de lesão de cárie incipiente. As barras indicam erro - padrão. Letras distintas indicam médias significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) de acordo com os testes  $t$  de Student ou Mann-Whitney. Dados não transformados.

Os gráficos das Figuras 27 e 28 mostram a média dos espectros de absorção no infravermelho das amostras de dentina radicular bovina dos diferentes grupos experimentais imediatamente após os tratamentos, bem como do grupo com amostras sadias. Foi possível identificar todas as bandas pretendidas em todos os grupos estudados, não sendo observada nenhuma nova formação ou desaparecimento de bandas. Pode-se verificar uma diminuição da intensidade da banda de absorção relativa ao  $\nu_3$  fosfato nos grupos que tiveram aplicação tópica de FFA, independente de haver ou não irradiação laser (linhas azul, vermelha e magenta). No grupo com apenas irradiação laser (linha laranja) essa intensidade variou menos, havendo uma aparência semelhante à do grupo cariado, ou seja, uma pequena redução na área relativa ao fosfato, em relação ao grupo sadio. Em contrapartida, observa-se que a intensidade das áreas sob a banda de absorção relativa às amidas II e I apresenta-se maior nos grupos com aplicação tópica de FFA em comparação com aqueles que não tiveram tal aplicação, assim como provável diminuição da intensidade das áreas referentes às diferentes bandas de vibração do carbonato.

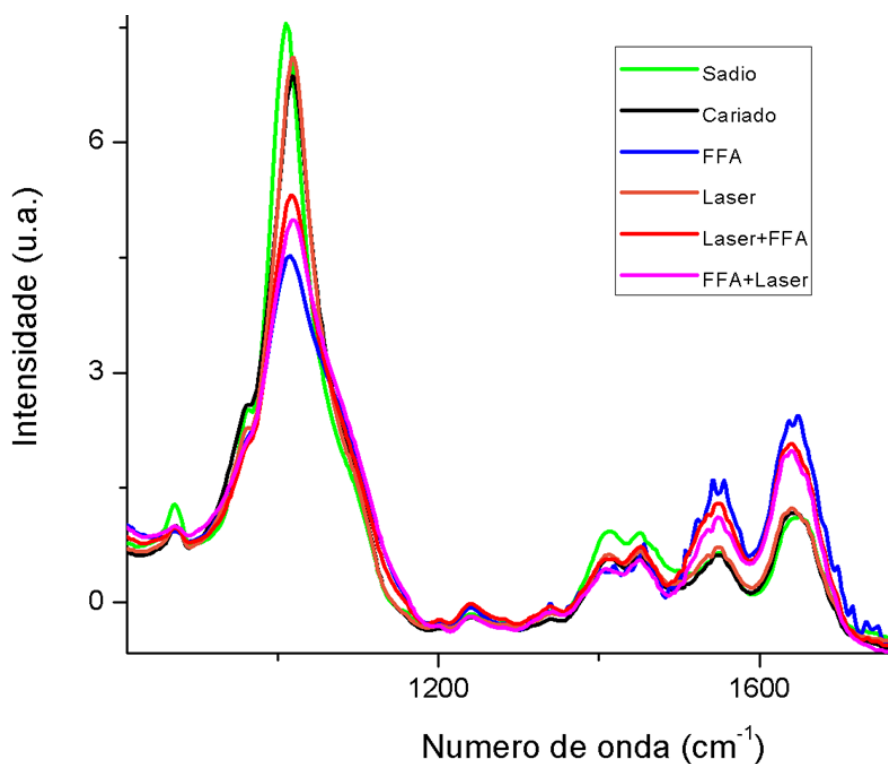


Figura 27 - Média dos espectros de infravermelho obtidos, utilizando-se a técnica de  $\mu$ ATR, de amostras de dentina radicular bovina desmineralizadas e submetidas aos diferentes tratamentos propostos. Espectros normalizados vetorialmente. Região compreendida entre  $800\text{ cm}^{-1}$  e  $1900\text{ cm}^{-1}$ .

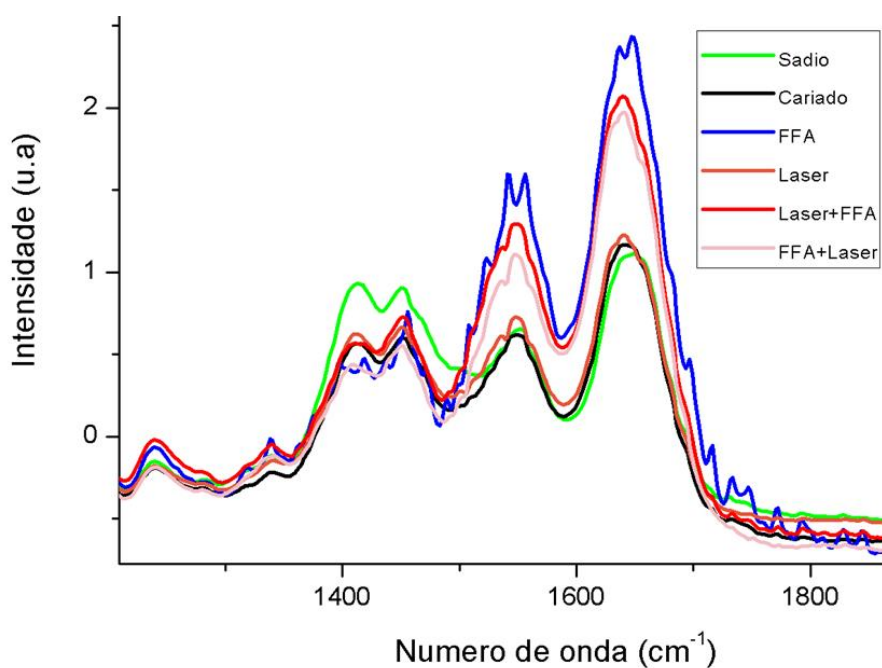


Figura 28 - Média dos espectros de infravermelho obtidos, utilizando-se a técnica de  $\mu$ ATR, de amostras de dentina radicular bovina desmineralizadas e submetidas aos diferentes tratamentos propostos. Espectros normalizados vetorialmente. Região compreendida entre  $1185\text{ cm}^{-1}$  e  $1900\text{ cm}^{-1}$ .

Os gráficos das Figuras 29 a 33 mostram os resultados da análise composicional semi-quantitativa da dentina radicular, obtida pela razão entre os valores das áreas sob as referidas bandas de absorção em relação à área sob a banda de absorção do fosfato. É possível observar que houve um aumento estatisticamente significativo da proporção amida 1/fosfato em todos os grupos que tiveram aplicação de FFA, independente se acompanhados ou não de irradiação laser (Figura 29); entretanto, não foi observada diferença estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ) entre a proporção amida/fosfato obtida no grupo apenas irradiado em comparação com o grupo cariado.

A área relativa à banda de absorção correspondente ao conteúdo de amida 2+carbonato se apresenta significativamente aumentada nos grupos com aplicação do gel de FFA isoladamente (Grupo G3) ou imediatamente após irradiação laser (Grupo G5) em relação ao grupo cariado (Figura 30). A irradiação laser isoladamente ou imediatamente após a aplicação de FFA não promoveu alterações significativas na proporção (amida2+fosfato)/fosfato em comparação com o grupo cariado.

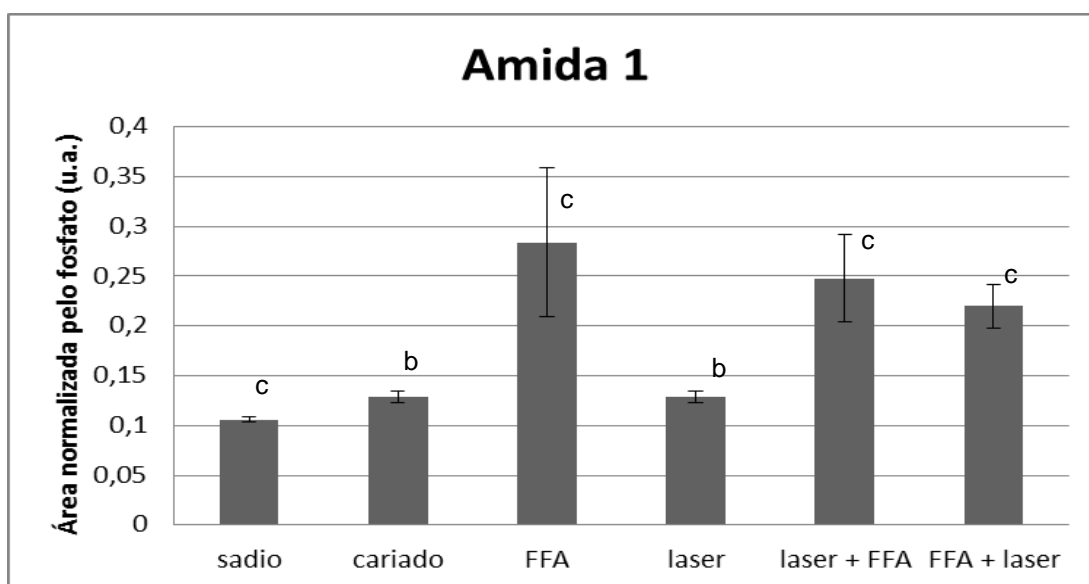


Figura 29 - Comparação entre as áreas sob a banda de absorção de amida 1, após normalização pela área do fosfato, entre os grupos de tratamento do presente estudo. As barras indicam erro padrão. Letras distintas indicam médias significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) de acordo com o teste de Kruskal-Wallis e Student-Newman-Keuls.



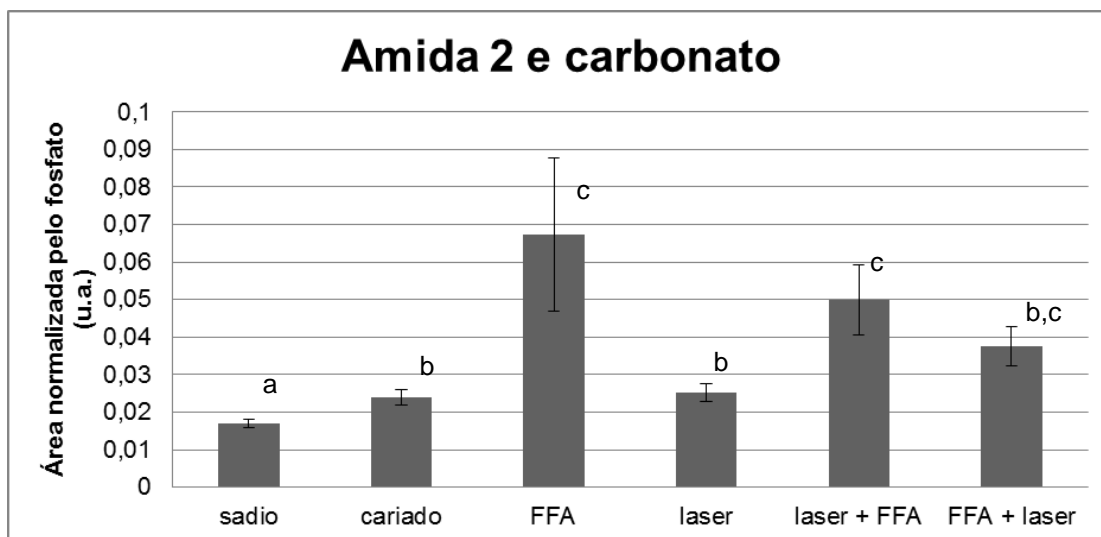


Figura 30 – Comparação entre as áreas sob a banda de absorção de amida 2 e carbonato, após normalização pela área do fosfato, entre os grupos de tratamento do presente estudo. As barras indicam erro padrão. Letras distintas indicam médias significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) de acordo com o teste de Kruskal-Wallis e Student-Newman-Keuls.

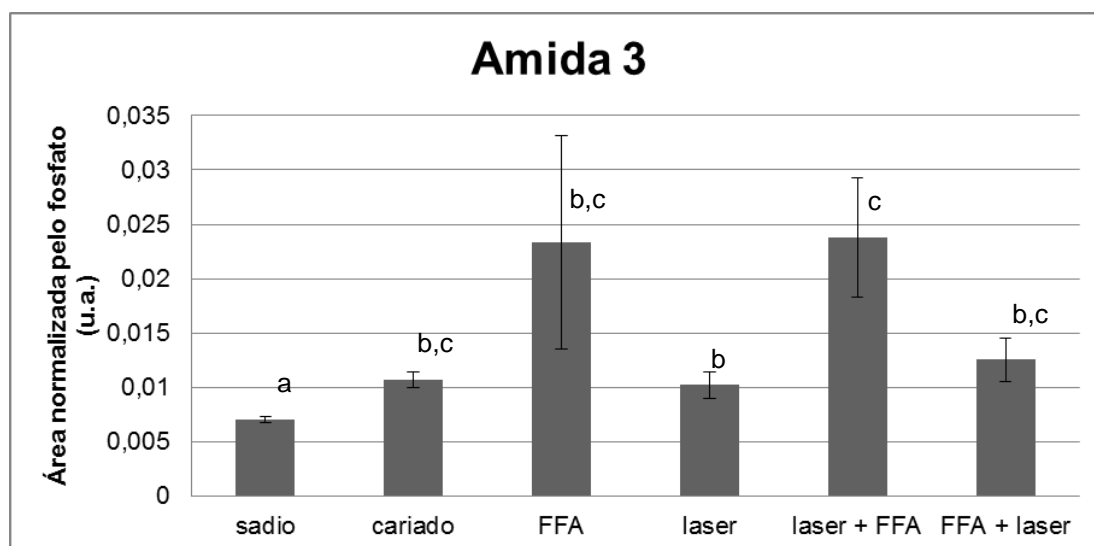


Figura 31 - Comparação entre as áreas sob a banda de absorção da amida 3, após normalização pela área do fosfato, entre os grupos de tratamento do presente estudo. As barras indicam erro padrão. Letras distintas indicam médias significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) de acordo com o teste de Kruskal-Wallis e Student-Newman-Keuls.

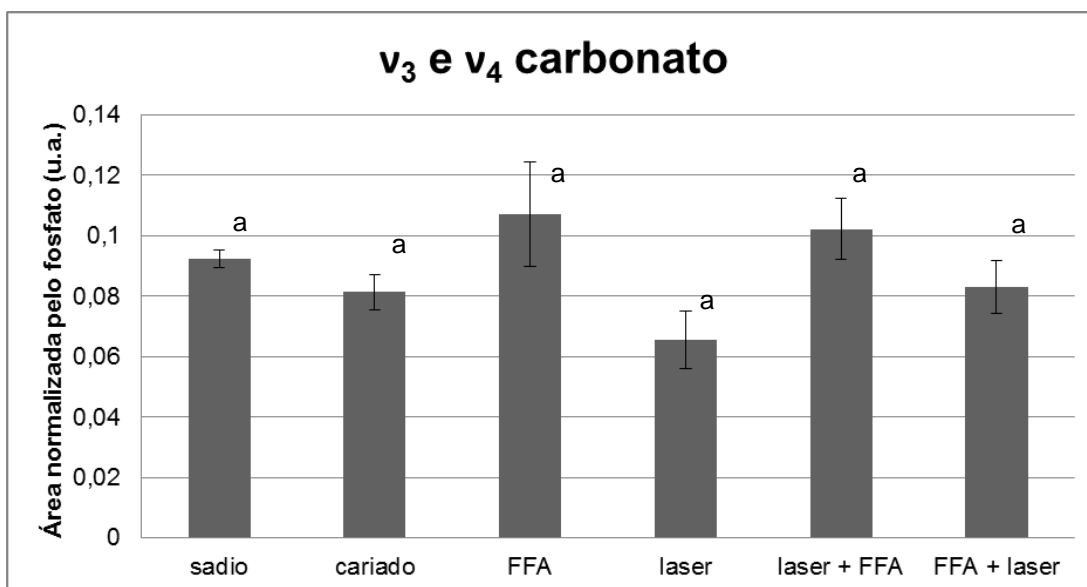


Figura 32 - Comparação entre as áreas sob a banda de absorção do v<sub>3</sub> e v<sub>4</sub> carbonato, após normalização pela área do fosfato, entre os grupos de tratamento do presente estudo. As barras indicam desvio-padrão. Letras distintas indicam médias significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) de acordo com o teste de Kruskal-Wallis e Student-Newman-Keuls.

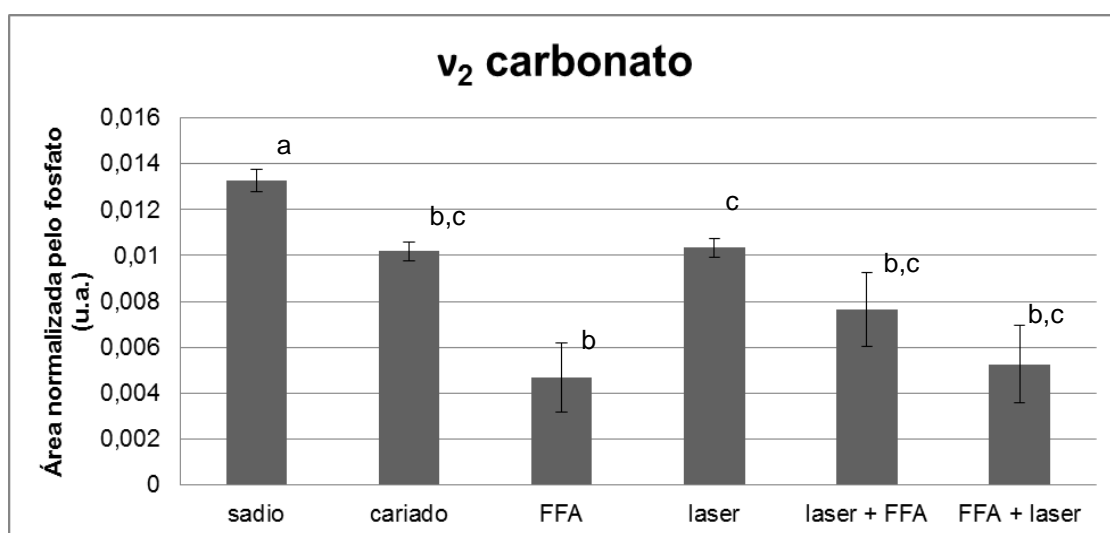


Figura 33 - Comparação entre as áreas sob a banda de absorção v<sub>2</sub> carbonato, após normalização pela área do fosfato, entre os grupos de tratamento do presente estudo. As barras indicam desvio-padrão. Letras distintas indicam médias significativamente diferente ( $p < 0,05$ ) de acordo com o teste de Kruskal-Wallis e Student-Newman-Keuls.

Em relação ao conteúdo de amida III em relação ao fosfato (Figura 31), observa-se que nenhum tratamento proposto propiciou a alteração significativa desta proporção em relação ao grupo apenas cariado. O mesmo se observa em relação à proporção de  $\nu_3$  e  $\nu_4$  carbonato/fosfato (Figura 32). Contudo, em relação à proporção de  $\nu_2$  carbonato/fosfato (Figura 33), é possível observar que nenhum dos tratamentos propostos alterou significativamente esta proporção em relação ao grupo sem tratamento (apenas cariado). Na comparação entre os grupos, detectou-se que a aplicação de FFA diminuiu significativamente a proporção  $\nu_2$  carbonato/fosfato em relação à irradiação laser ( $p = 0,04$ ); contudo, esta redução não foi estatisticamente significativa em comparação com os grupos que tiveram a associação dos tratamentos ( $p = 0,1$  para a comparação com o grupo laser + FFA e  $p = 0,57$  para a comparação com o grupo FFA + laser).

Visando-se avaliar se os componentes do gel de FFA empregado no presente estudo interferem nos espectros de FTIR obtidos, foi tomado um espectro do gel isoladamente, o qual foi depositado sobre o cristal de ATR/FTIR. Na Figura 34 pode ser observado o espectro do FFA obtido por FTIR-ATR sobreposto ao de dentina radicular bovina sadia, no qual podem ser observadas várias bandas de absorção, no espectro do FFA, na região entre  $1000\text{ cm}^{-1}$  e  $1700\text{ cm}^{-1}$  coincidentes com os picos das amidas I e III e amida II+Carbonato.

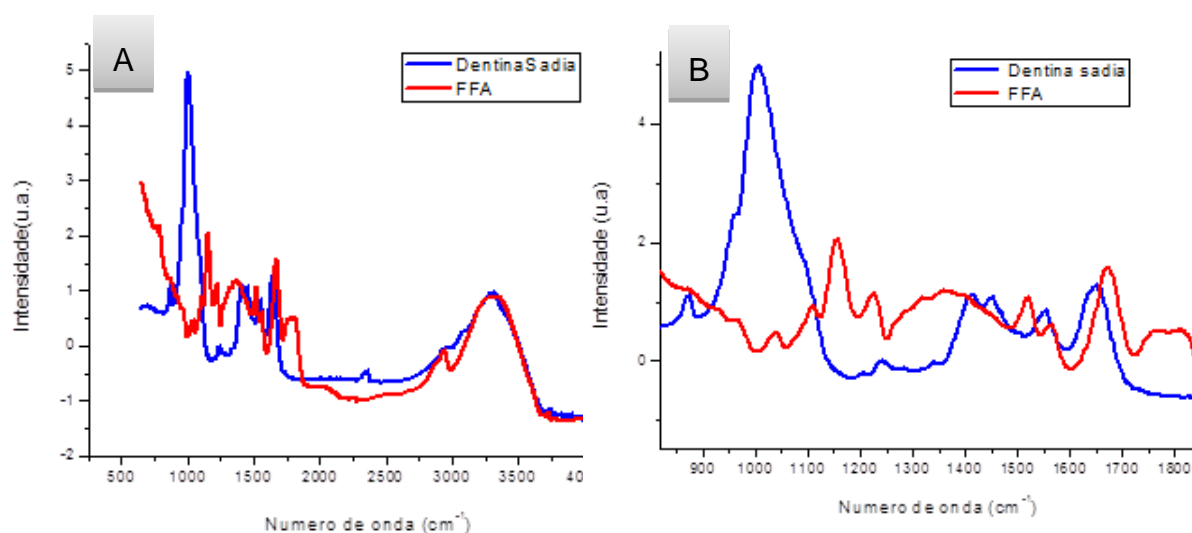


Figura 34 - Espectros obtidos por ATR-FTIR. **A** - espectro do gel de FFA empregado no presente estudo sobreposto ao espectro de dentina sadia; **B** - destaque para a região onde são evidenciadas bandas de absorção intensas na região compreendida entre  $1000$  a  $1750\text{ cm}^{-1}$ . Espectros normalizados vetorialmente.

## 5.2. Análise da imagem de fluorescência

Quando excitada com radiação com comprimento de onda de 405 nm, observou-se que a dentina radicular bovina prioritariamente fluoresce na região espectral do verde ( $492 < \lambda < 577\text{nm}$ ). A Figura 35 ilustra uma imagem de fluorescência de duas amostras de dentina hígida avaliadas pelo SIF no presente estudo. Pode-se observar fluorescência nas amostras evidenciada pelo maior brilho esverdeado das mesmas.

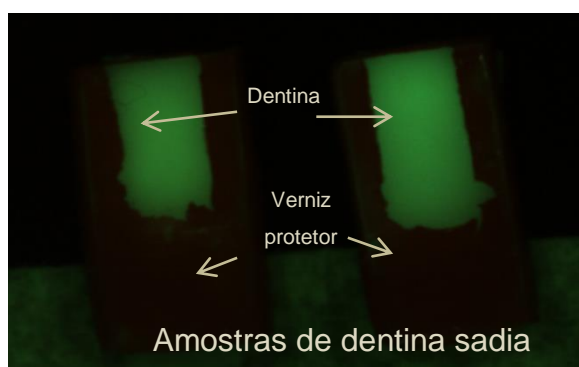


Figura 35 - Imagens digitais da fluorescência de duas amostras de dentina radicular bovina sadias, feitas pelo SIF.

Para a realização das análises das imagens de fluorescência, foram necessários testes para a determinação de uma amostra de referência, assim como para a padronização da tomada das imagens, cujos resultados estão descritos nos itens a seguir.

### 5.2.1. Escolha da amostra para referência

Para a análise das imagens de fluorescência, foi necessária a utilização de uma amostra referência que se mantivesse constante em todo o experimento, tendo em vista a necessidade de se ter uma mesma amostra para normalização dos

dados. Para tal, foram tomados dados de intensidade média de fluorescência de dez amostras de dentina sadia.

No presente estudo, a intensidade média da fluorescência de amostras sadias variou de 0,36 a 0,73 u.a.( unidades arbitrárias), com intensidade média de 0,47, considerando a escala de 0 a 1 (Tabela 13). Assim, foi selecionada a amostra GS8 para tal, tendo em vista que a intensidade de fluorescência desta amostra foi a que mais se aproximou da média de intensidade do grupo sadio (Tabela 13)

Tabela 13 - Intensidade média da fluorescência emitida por 10 amostras de dentina sadia.

Amostra	Média da fluorescência por amostra	Desvio Padrão da fluorescência por amostra
GS1	0,404	0,03
GS2	0,377	0,04
GS3	0,527	0,05
GS4	0,574	0,05
GS5	0,456	0,04
GS6	0,730	0,06
GS7	0,400	0,04
<b>GS8 *</b>	<b>0,463</b>	<b>0,04</b>
GS9	0,357	0,05
GS10	0,411	0,03
<b>Média de fluorescência do grupo</b>	<b>0,470</b>	0,04

\*Amostra usada como referência devido ao fato de seu valor médio de intensidade de fluorescência ser o mais próximo ao valor da intensidade média de fluorescência do grupo.

### 5.2.2. Padronização do grau de hidratação da amostra referência

Tendo em vista que o tecido dentinário é bastante susceptível à desidratação, foi necessária a execução de experimento piloto visando-se padronizar o grau de hidratação da amostra a ser utilizada como referência, visando-se evitar alterações expressivas nos dados obtidos. Para tal, foram empregadas 2 amostras de dentina hígida, as quais foram submetidas a diferentes procedimentos prévios à tomada da imagem de fluorescência:

1 – amostra úmida: amostra retirada do recipiente com algodão estéril umedecido sob refrigeração e imediatamente submetida à leitura pelo SIF;

2 – amostra seca com papel: amostra retirada do ambiente úmido sob refrigeração, seca com papel absorvente sob fricção e submetida à leitura por SIF;

3 – amostra exposta por 30 minutos: amostra retirada do ambiente úmido e deixada exposta ao ar livre por 30 minutos e depois submetida à leitura por SIF;

4 – amostra exposta por 1 hora: amostra retirada do ambiente úmido e deixada exposta ao ar livre por 1 hora e depois submetida à leitura por SIF;

5 - amostra exposta por 1 hora e 30 min: amostra retirada do ambiente úmido e deixada exposta ao ar livre por 1h30min e depois submetida à leitura por SIF.

Foi observado que a hidratação das amostras interferiu na intensidade da fluorescência da dentina, fato evidenciado nas imagens de fluorescência da Figura 36 . Pela Tabela 14, é possível evidenciar que, apesar dos valores iniciais diferentes, as duas amostras apresentam comportamento semelhante em relação ao aumento da intensidade de fluorescência com o decorrer do tempo: quanto maior o grau de hidratação da amostra, menor o valor de fluorescência média e menor intensidade de fluorescência.

Tabela 14 - Teste de hidratação realizado com amostras de dentina radicular bovina variando-se o grau de hidratação relacionado com a secagem das mesmas.

	Amostras Sadias - Diferentes hidratações			
	Amostra 1		Amostra 2	
	Média Fluorescência	Desvio Padrão	Média Fluorescência	Desvio Padrão
Início:úmida	0,540	0,027	0,468	0,061
Seca com papel	0,718	0,048	0,549	0,051
30 minutos*	0,777	0,064	0,662	0,062
1 hora*	0,781	0,071	0,659	0,067
1h30min*	0,801	0,058	0,669	0,059

(\*) Tempo de exposição ao ambiente.

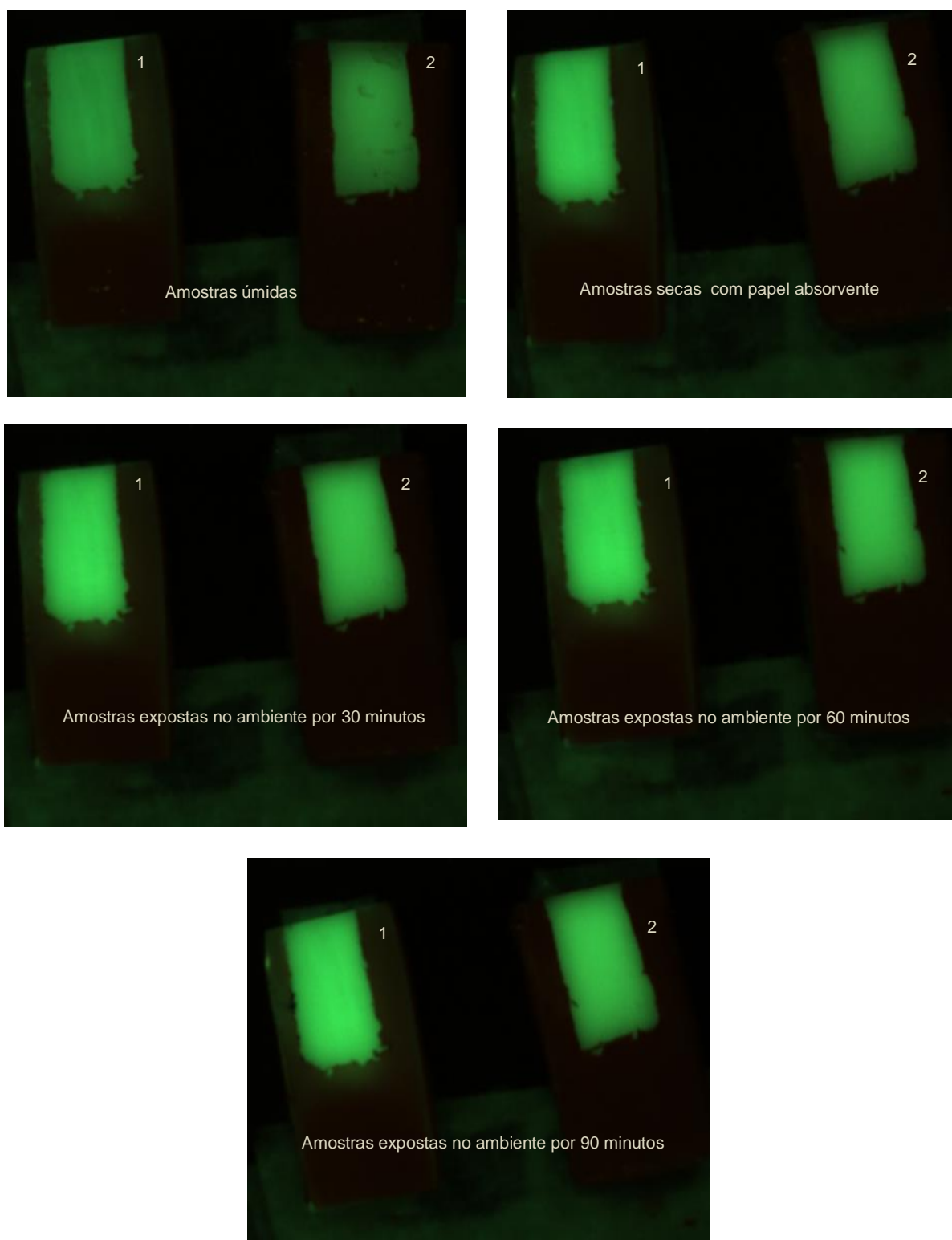


Figura 36 - Imagens de fluorescência obtidas de amostras de dentina radicular com vários graus de hidratação. Os números correspondem a numeração dada às amostras empregadas de acordo com a Tabela 14.

De acordo com os dados obtidos, optou-se por realizar os experimentos com SIF empregando-se a amostra referência e as amostras tratamento imediatamente após retirada do ambiente úmido e secas com papel absorvente. Como a amostra referência é sempre a mesma, ela foi empregada na leitura de um grupo experimental de 10 amostras (cujo tempo de leitura não ultrapassava 15 minutos), retornando ao ambiente úmido sob refrigeração por um período de 2 horas. Após este período, foram tomadas as leituras de outras 10 amostras e assim sucessivamente.

### **5.2.3. Análise das imagens de fluorescência das amostras com cárie inicial**

A Figura 37 mostra uma imagem representativa de fluorescência de uma amostra de dentina após 32h de desmineralização, em comparação com a amostra sadia empregada como referência (amostra GS8, Tabela 13). Pode-se observar que, na amostra desmineralizada, ocorre uma suave diminuição do brilho característico da fluorescência. O processamento das imagens confirmou essa observação, pois enquanto o tecido sadio apresentou uma intensidade média de fluorescência no grupo de 0,50 u.a., variando de 0,476 a 0,519 u.a., o tecido desmineralizado apresentou fluorescência média no grupo de 0,38 u.a., variando de 0,263 a 0,495 u.a., com  $Ind=0,761$  e  $\Delta Ind=0,23$ , conforme Tabela 15.

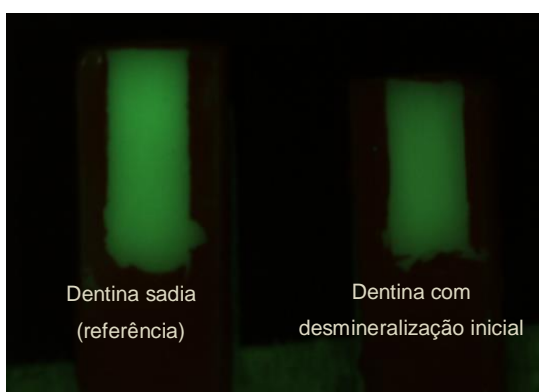


Figura 37 - Imagem de fluorescência de uma amostra de dentina radicular bovina com desmineralização inicial por 32h (à direita), em comparação com a amostra referência (à esquerda).



Tabela 15 - Tabela com valores de fluorescência média emitidas por 10 amostras desmineralizadas por 32h.

Imagem de Fluorescência	Intensidade amostra Referência	Desvio Padrão amostra Referência	Intensidade amostra Experimental	Desvio Padrão amostra Experimental	Ind amostra Experimental	$\Delta$ Ind amostra Experimental
1	0,476	0,036	0,360	0,020	0,952	0,024
2	0,482	0,036	0,348	0,035	0,6952	0,031
3	0,487	0,036	0,263	0,032	0,5254	0,026
4	0,489	0,035	0,495	0,076	0,9890	0,058
5	0,487	0,049	0,465	0,047	0,9294	0,042
6	0,517	0,041	0,338	0,041	0,6756	0,034
7	0,516	0,041	0,306	0,023	0,6128	0,024
8	0,511	0,044	0,380	0,034	0,7604	0,032
9	0,519	0,038	0,374	0,042	0,7471	0,036
10	0,515	0,041	0,478	0,035	0,9558	0,037
Média aritmética do grupo	0,500	0,040	0,381	0,039	0,761	0,034

Índice de propagação de erro experimental do grupo = 0,761 e  $(\Delta \text{Ind}) = 0,237$

#### **5.2.4. Análise das imagens de fluorescência das amostras após tratamentos e após ciclagem de pH**

O Ind,  $\Delta$ Ind das amostras de cada grupo experimental nos diversos momentos de análise de fluorescência estão especificados na Tabela 16. Pode-se evidenciar que com a progressão do processo de desmineralização houve acentuada diminuição do valor do Ind no grupo sem tratamento. No grupo FFA o valor do Ind foi mantido, contudo no grupo laser houve diminuição desse valor. Entretanto a associação de tratamentos apresentou resultados divergentes, sendo que no grupo laser + FFA houve discreto aumento e no grupo FFA + Laser houve uma acentuada diminuição no valor do Ind.

Tabela 16 - Valores de Ind,  $\Delta$ Ind da intensidade de fluorescência das amostras, de cada grupo experimental, nos vários tempos de análise de fluorescência do presente estudo.

Grupo experimental	Após desmineralização inicial		Após 4 <sup>o</sup> dia de ciclagem	
	Ind	$\Delta$ Ind	Ind	$\Delta$ Ind
Cariado (G1)	0,761	0,237	-	-
Cariado (G2)	0,761	0,237	0,502(G2)	0,430
FFA	0,546	0,395	0,547	0,311
Laser	0,771	0,243	0,614	0,278
Laser + FFA	0,804	0,223	0,813	0,198
FFA + Laser	0,909	0,199	0,764	0,272

Grupo sadio → Ind = 0,963,  $\Delta$ Ind = 0.208

A Figura 38 apresenta imagens de fluorescência de todos os grupos experimentais deste estudo imediatamente após os tratamentos e após 4 dias de ciclagem de pH. É possível observar que a intensidade de fluorescência diminui com o decorrer do tempo para todos os grupos em relação à amostra referência. Esse processo pode ser também observado na Figura 39, grupo cariado, onde se observa ter havido uma diminuição significativa no valor de índice de fluorescência das amostras após desmineralização inicial e após ciclagem de pH em relação ao grupo sadio ( $p < 0,05$ ); contudo, não houve diferença estatisticamente significante entre as intensidades de fluorescência obtidas nas amostras com cárie incipiente em relação às amostras submetidas à ciclagem de pH ( $p > 0,05$ ).

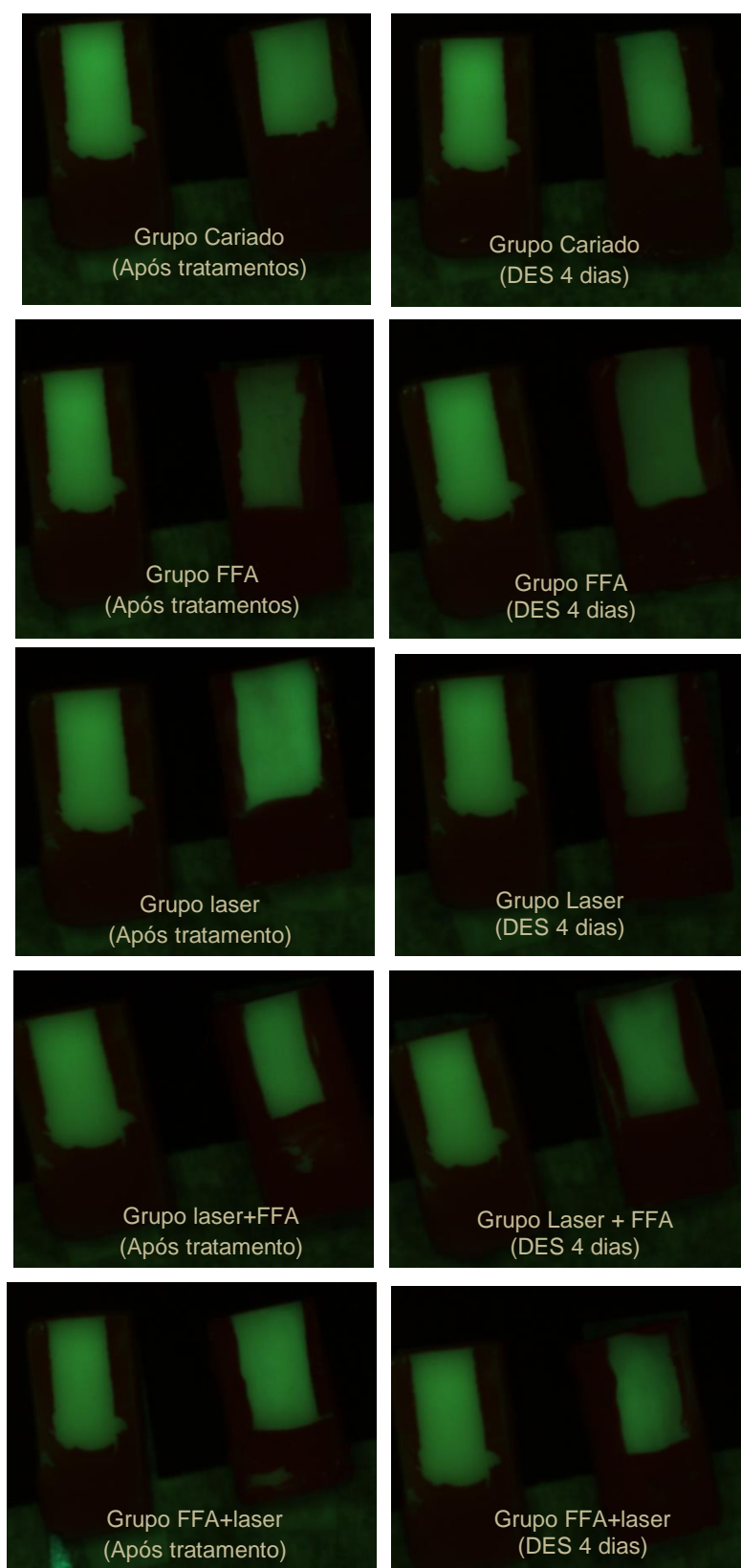


Figura 38 - Imagens de fluorescência de dentina radicular bovina obtidas pelo SIF em dois momentos distintos no decorrer do processo de simulação da progressão de cárie, nos grupos experimentais G2 a G6.

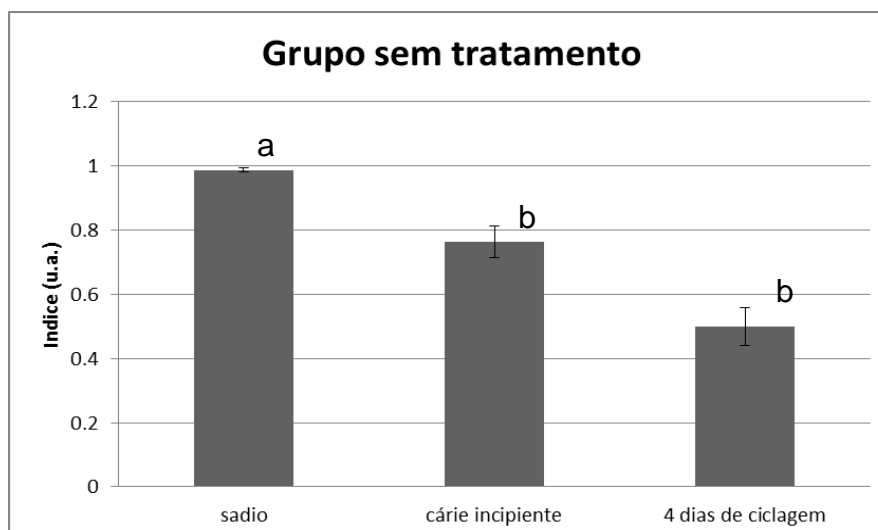


Figura 39 - Média dos índices obtidos a partir das imagens de fluorescência para o grupo sem tratamento, nos diferentes tempos experimentais. As barras indicam erro padrão. Letras diferentes indicam médias estatisticamente distintas de acordo com o teste de Tukey.

A Figura 40 ilustra os valores médios de índice obtidos para as amostras submetidas à aplicação tópica de FFA, dos diferentes tempos experimentais. Pode-se evidenciar que a aplicação de FFA promove uma redução significativa na fluorescência em relação ao grupo apenas com cárie incipiente ( $p = 0,03$ ). Contudo, após a ciclagem de pH, observa-se não haver alterações na fluorescência em relação ao grupo após tratamento ( $p = 0,95$ ).

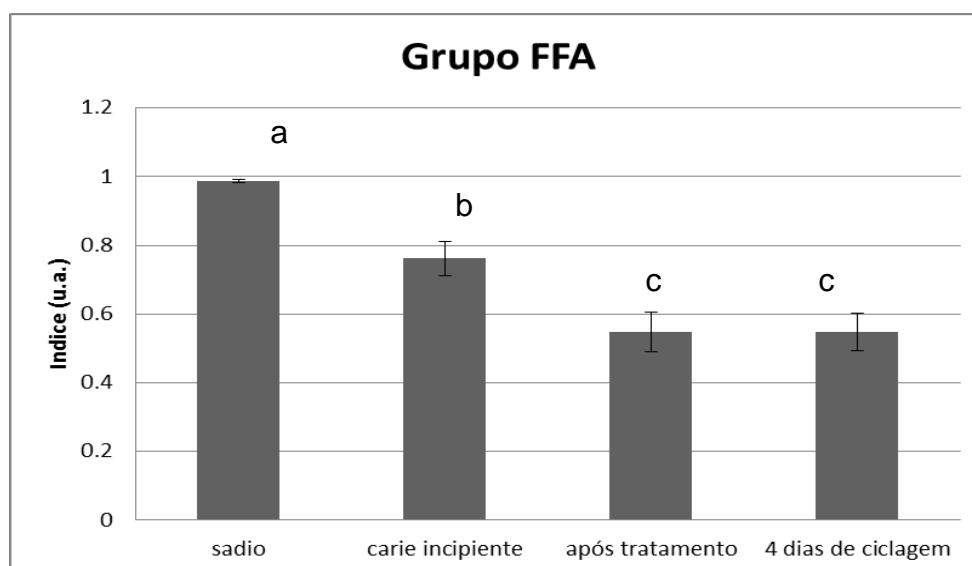


Figura 40 - Média dos índices obtidos a partir das imagens de fluorescência para o grupo tratado com flúor fosfato acidulado (FFA), nos diferentes tempos experimentais. As barras indicam erro padrão. Letras diferentes indicam médias estatisticamente distintas de acordo com o teste de Tukey.

A análise dos efeitos da irradiação laser sobre a fluorescência das amostras encontra-se na Figura 41. Observa-se que a irradiação laser não promoveu alterações significativas na fluorescência em relação à fluorescência emitida pelas amostras com cárie incipiente ( $p = 0,89$ ). Ainda assim, observa-se não haver diferenças significativas entre o índice de fluorescência emitido após a ciclagem de pH em relação ao período após tratamento ( $p = 0,14$ ).

Os efeitos da associação dos tratamentos no índice de fluorescência estão ilustrados nas Figuras 42 e 43. Observa-se que a irradiação laser, quando efetuada previamente à aplicação tópica de FFA, não propicia alterações significativas na fluorescência quando comparada ao grupo com cárie incipiente ( $p = 0,56$ ); ainda assim, não foram evidenciadas alterações estatisticamente significantes após ciclagem de pH ( $p = 0,82$ ). A irradiação laser efetuada após a aplicação tópica de FFA não promove alterações significativas na fluorescência emitida em relação ao grupo apenas com cárie incipiente ( $p = 0,31$ ), assim como não há diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo sadio ( $p = 0,06$ ). Após a ciclagem de pH, contudo, observam-se alterações significativas apenas em relação às amostras sadias ( $p = 0,01$ ).

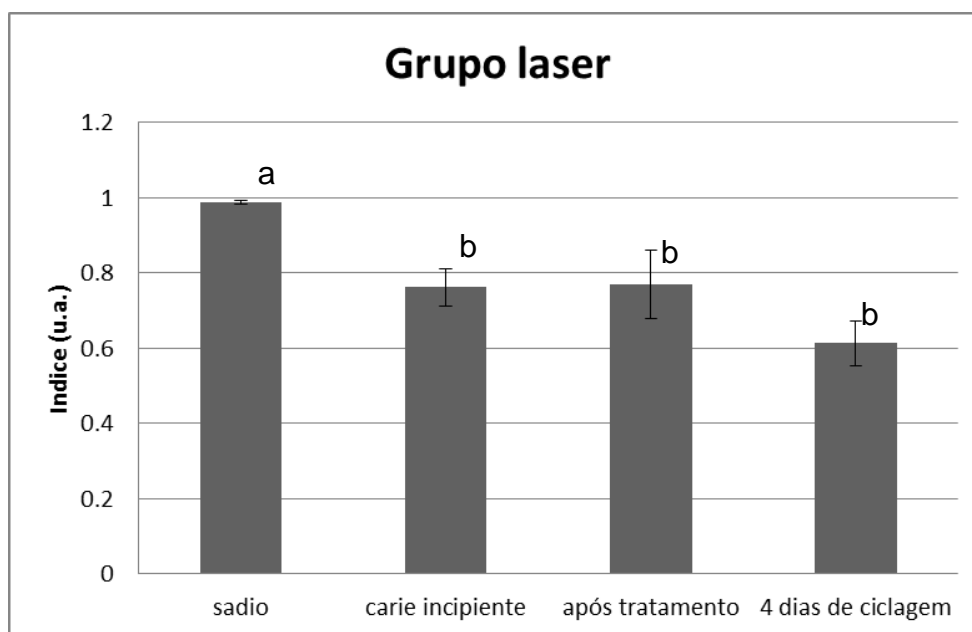


Figura 41 - Média dos índices obtidos a partir das imagens de fluorescência para o grupo irradiado com *laser* de Nd:YAG, nos diferentes tempos experimentais. As barras indicam erro padrão. Letras diferentes indicam médias estatisticamente distintas de acordo com o teste de Student-Newman-Keuls.

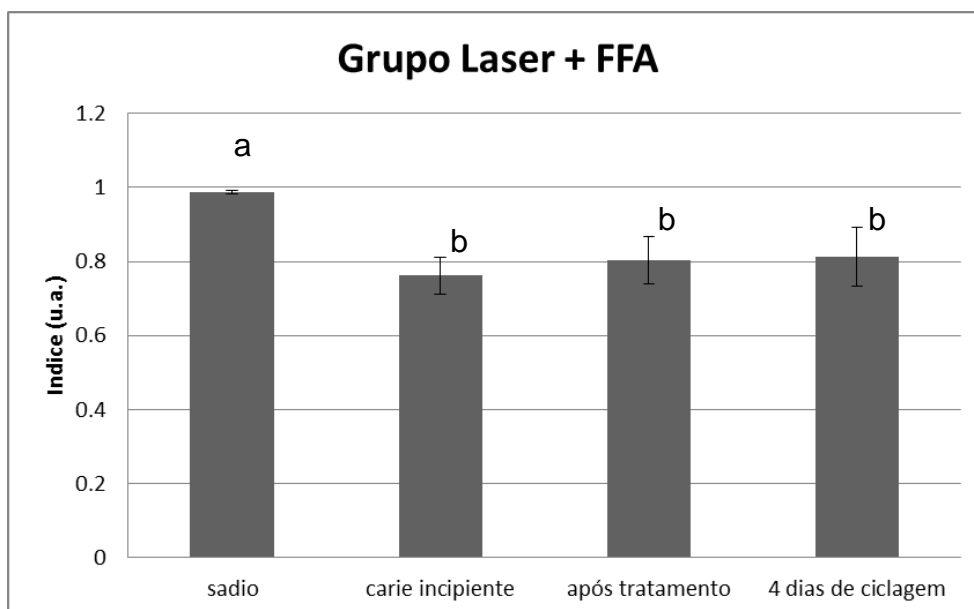


Figura 42 - Média dos índices obtidos a partir das imagens de fluorescência para o grupo *Laser + FFA*, nos diferentes tempos experimentais. As barras indicam erro padrão. Letras diferentes indicam médias estatisticamente distintas de acordo com o teste de Student-Newman-Keuls.

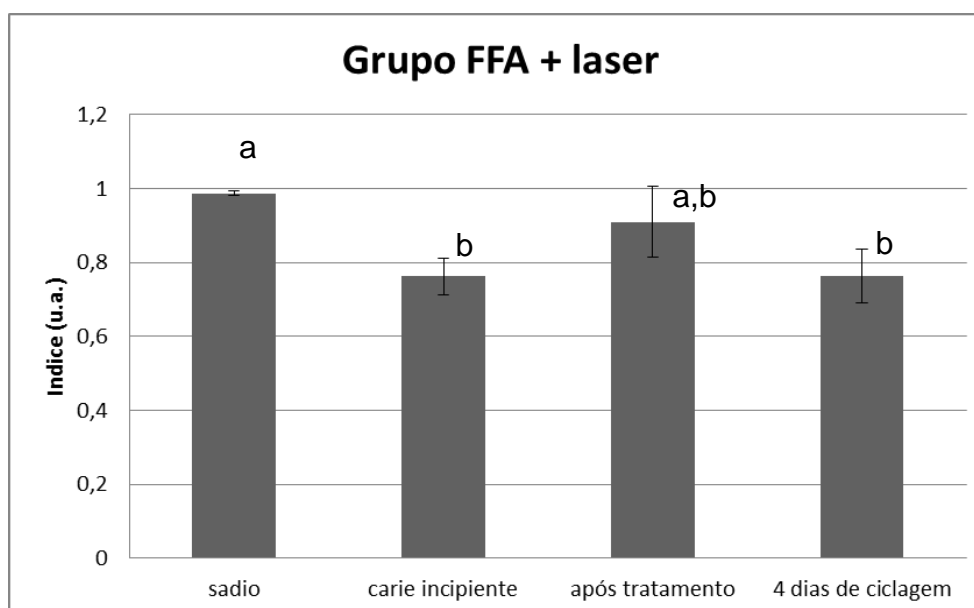


Figura 43 - Média dos índices obtidos a partir das imagens de fluorescência para o grupo *FFA + laser*, nos diferentes tempos experimentais. As barras indicam erro padrão. Letras diferentes indicam médias estatisticamente distintas de acordo com o teste de Student-Newman-Keuls.

Quando se analisa os gráficos comparativos dos diversos grupos experimentais no decorrer do tempo mostrados nas Figuras 44 e 45, evidencia-se que, imediatamente após os tratamentos, apenas a aplicação tópica de FFA promoveu diminuição significativa no índice de fluorescência quando comparado ao grupo com cárie inicial. Além disso, foi possível observar que a irradiação laser realizada após a aplicação tópica de FFA foi o único tratamento que não alterou significativamente o índice de fluorescência em comparação com o grupo sadio (Figura 44). Após a ciclagem de pH, observa-se que apenas os grupos que tiveram a associação de tratamentos (laser + FFA e FFA + laser) propiciaram aumento significativo no índice de fluorescência em comparação com o grupo apenas com cárie incipiente ( $p = 0,008$  e  $p = 0,013$ , respectivamente), enquanto que os tratamentos isolados não promoveram alterações significativas nos índices de fluorescência em relação às amostras com cárie incipiente ( $p > 0,05$ ). Contudo, ressalta-se que apenas o grupo Laser + FFA apresentou índice de fluorescência similar ao apresentado pelas amostras sadias ( $p = 0,104$ ).

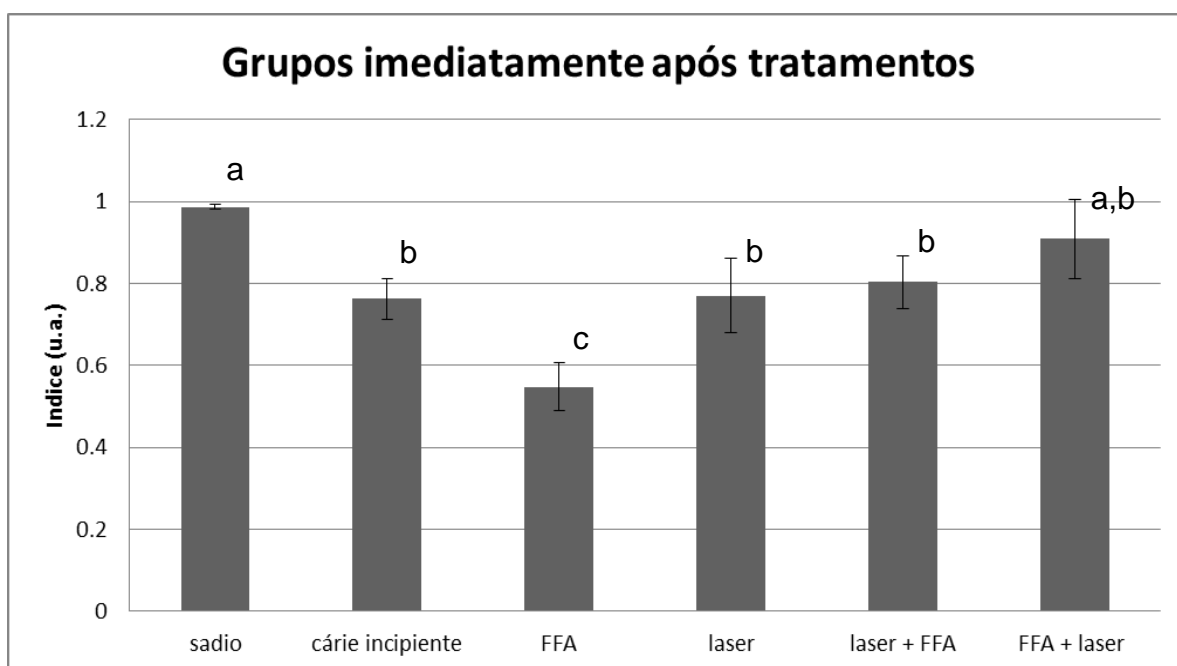


Figura 44 - Média dos índices obtidos a partir das imagens de fluorescência para todos os grupos experimentais do presente estudo, imediatamente após os tratamentos. As barras indicam erro padrão. Letras diferentes indicam médias estatisticamente distintas de acordo com o teste de Student-Newman-Keuls.

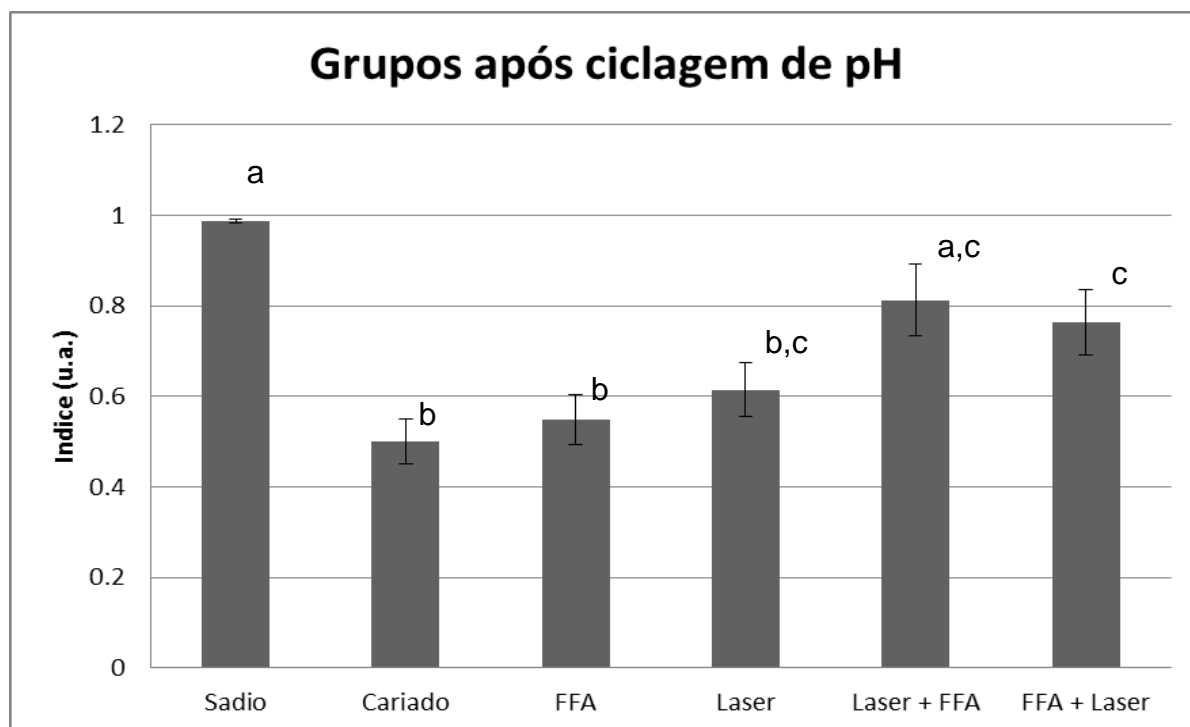


Figura 45 - Média dos índices obtidos a partir das imagens de fluorescência para todos os grupos experimentais do presente estudo, no 4º dia de ciclagem de pH. As barras indicam erro padrão. Letras diferentes indicam médias estatisticamente distintas de acordo com o teste de Student-Newman-Keuls.



### 5.3. Análise por Microdureza Seccional

A Figura 46 mostra os valores de microdureza, em função da profundidade, obtidos nas amostras submetidas à desmineralização inicial por 32h (grupo G1) e comparando-se com o grupo sem tratamento submetido à posterior ciclagem de pH (grupo G2). É possível observar que já na desmineralização inicial foram formadas lesões de cárie com profundidade ao redor de 80  $\mu\text{m}$ , sendo que a partir dessa profundidade o valor de dureza *Knoop* (KHN) permaneceu com valor ao redor de 50 nesse grupo, o que corresponde ao valor de um tecido sadio. No grupo G2, observa-se que não houve um aumento na profundidade da lesão de cárie formada, tendo em vista que os valores de microdureza *Knoop* têm comportamento ascendente até 80  $\mu\text{m}$  de profundidade, atingindo um patamar após tal profundidade. Contudo, observa-se, no grupo G2, maiores valores de microdureza *Knoop* de 10  $\mu\text{m}$  até 30  $\mu\text{m}$  de profundidade em comparação com o grupo G1.

A Figura 47 mostra os valores de microdureza *Knoop* em função da profundidade, obtidos após a ciclagem de pH, para as amostras submetidas aos tratamentos. Observa-se que o grupo com aplicação tópica de FFA (G3) apresentou maiores valores de microdureza seccional, em comparação com o grupo sem tratamento (G2), em até 50  $\mu\text{m}$  de profundidade. Para o grupo irradiado, observa-se um comportamento similar ao grupo sem tratamento nos primeiros micrometros de profundidade; contudo a partir de 40  $\mu\text{m}$ , as amostras irradiadas apresentaram menores valores de microdureza quando comparadas ao grupo sem tratamento, porém, as diferenças entre estes dois grupos desaparecem a partir de 100  $\mu\text{m}$  de profundidade. Por esse gráfico, também é possível observar que a associação de tratamentos, *Laser* + FFA ou FFA + *Laser*, grupos G5 e G6, respectivamente, propiciou um aumento nos valores de microdureza seccional em até 70  $\mu\text{m}$  de profundidade quando comparadas ao grupo sem tratamento (G2), sendo as maiores diferenças encontradas no grupo FFA + *Laser*, o qual também apresentou aumento nos valores de microdureza seccional em relação ao grupo FFA em até 80  $\mu\text{m}$  de profundidade.

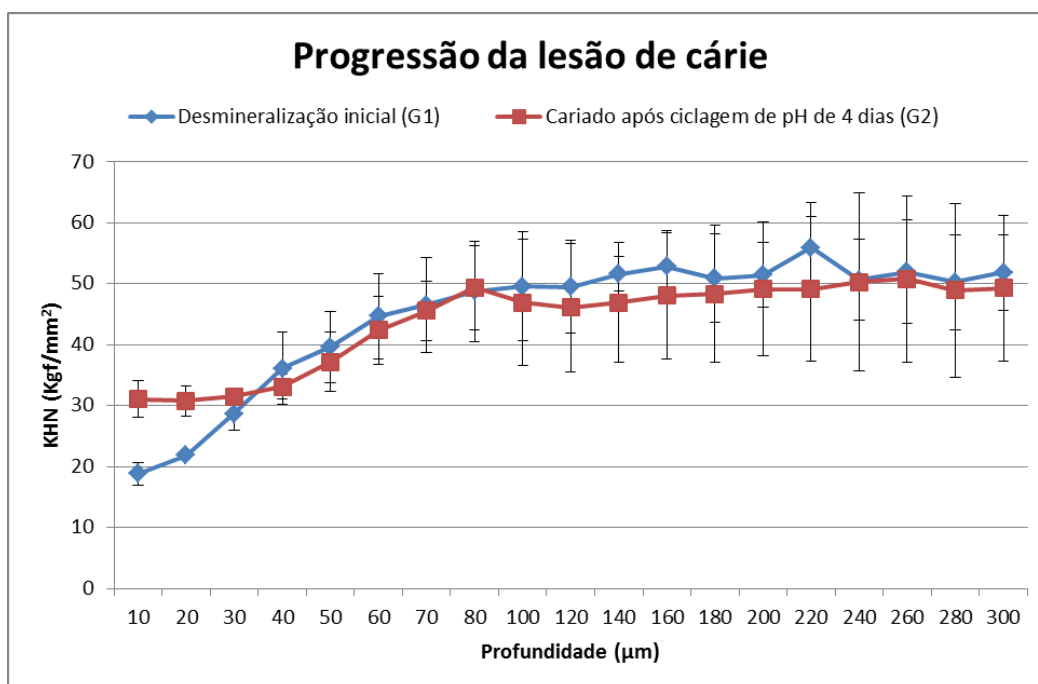


Figura 46 - Média dos valores de microdureza Knoop (Knoop Hardness Number – KHN), de acordo com a distância de superfície, comparando-se as amostras com cárie inicial e aquelas submetidas à ciclagem de pH por 4 dias. As barras indicam erro padrão.

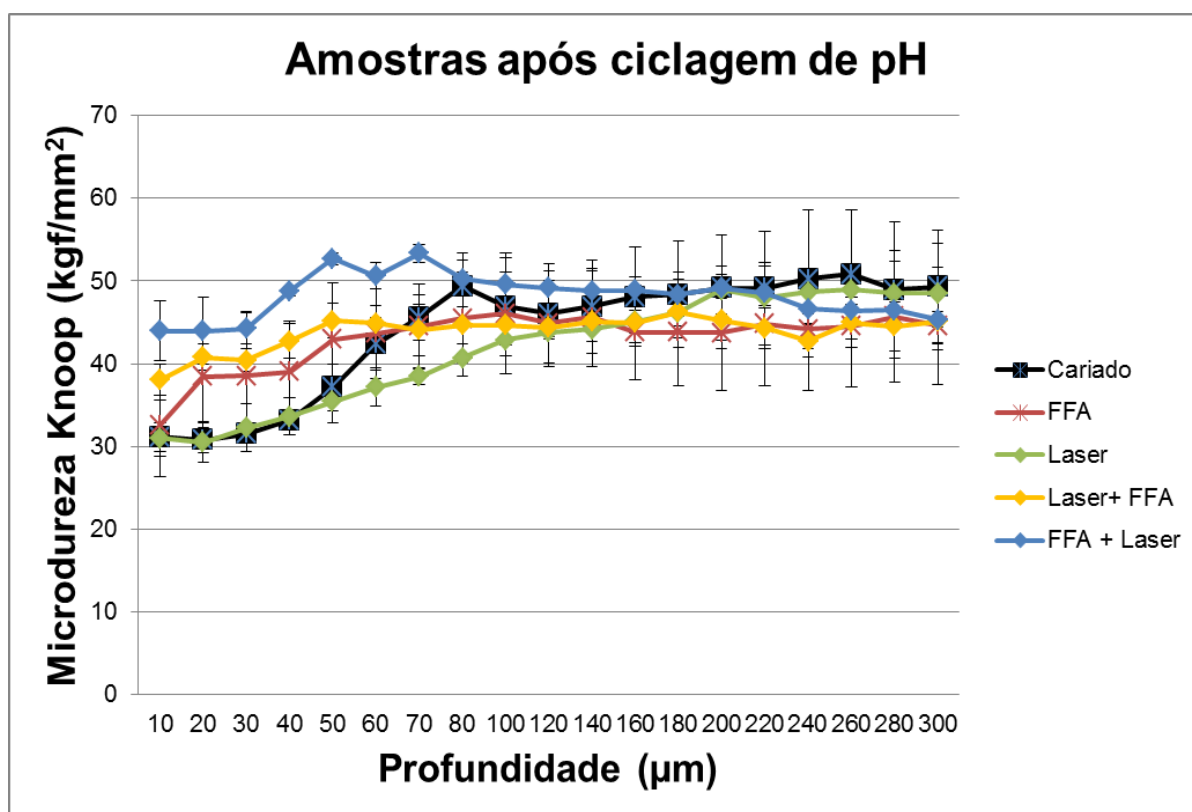


Figura 47 - Média dos valores de microdureza Knoop (kgf/mm²) obtidos nos diferentes grupos experimentais, de acordo com a distância de superfície, após ciclagem de pH. As barras indicam erro padrão.

A Figura 48 mostra os valores médios de Delta S (perda de microdureza) das amostras após a ciclagem de pH. Foi observado, pelo teste de Kruskal-Wallis, haver uma alta significância estatística ( $p = 0,0002$ ) em relação aos valores de Delta S obtidos entre os grupos. Na comparação entre os grupos pelo teste de Student-Newman-Keuls, observou-se que a aplicação tópica de FFA reduziu significativamente o valor de Delta S ( $p = 0,04$ ) em relação ao grupo sem tratamento. A irradiação laser isoladamente, contudo, não propiciou tal redução ( $p = 0,34$ ). A associação dos tratamentos proporcionou uma significativa redução nos valores de Delta S em relação ao grupo sem tratamento ( $p < 0,0001$  para o grupo Laser+FFA e  $p = 0,001$  para o grupo FFA+Laser). Contudo, apenas a irradiação laser antes da aplicação de FFA (grupo Laser+FFA) reduziu significativamente o valor de Delta S em relação ao grupo FFA ( $p = 0,04$ ).

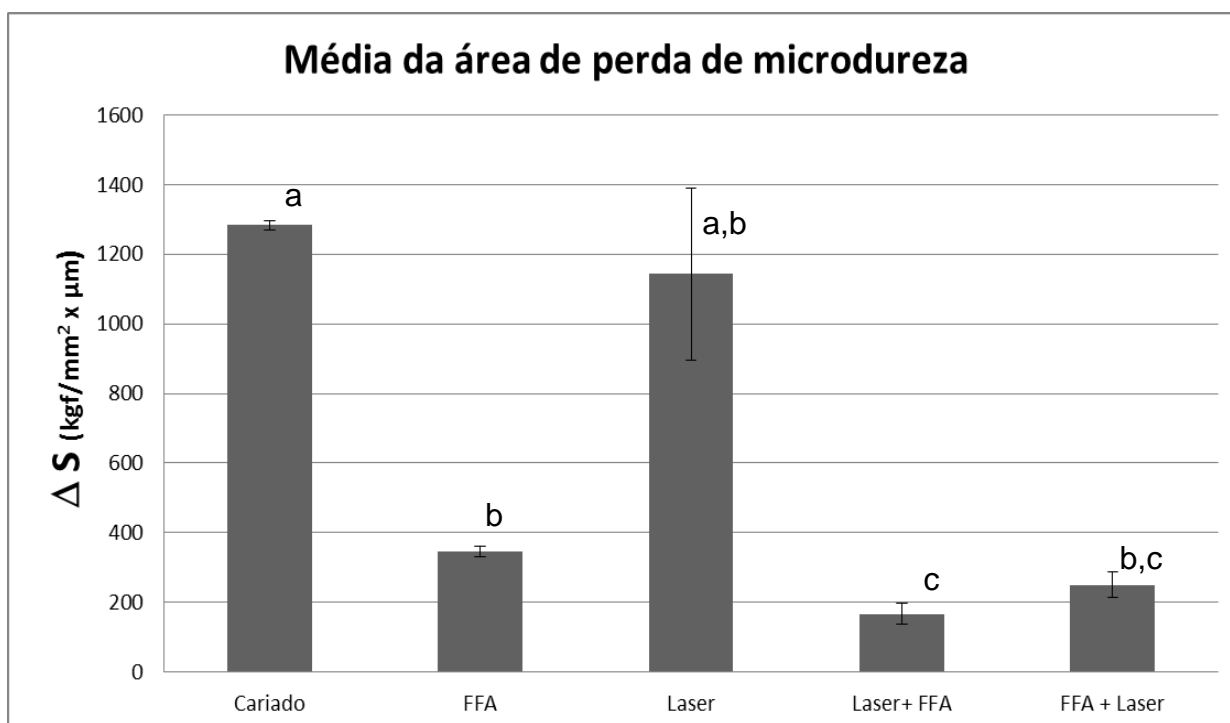


Figura 48 - Média da área de perda de microdureza seccional ( $\Delta S = \text{kg/mm}^2 \times \mu\text{m}$ ), de acordo com os tratamentos propostos. As barras indicam erro padrão. Letras distintas indicam diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) de acordo com o teste de Student-Newman-Keuls.

## 6. DISCUSSÃO

Embora avanços tenham ocorrido nas pesquisas relacionadas ao uso da tecnologia *laser* para prevenção de cárie (36), o flúor se tornou e se mantém como um dos meios mais consagrados nesse aspecto, pois interfere no equilíbrio dinâmico da interface dente/fluidos orais e possui um menor custo (4; 152). Porém estudos recentes indicam sua possível utilização em associação com lasers para prevenção de cárie de esmalte (27; 28; 35; 36; 37; 50). Além disso, a associação dos dois métodos poderia ter resultados muito favoráveis em casos específicos de cárie radicular onde não fosse possível a cooperação diária do indivíduo e a aplicação tópica profissional periódica fosse inviável devido a questões de manejo do paciente (27; 40; 43; 82).

Para simular os resultados de pesquisas *in situ* e *in vivo* de Cariologia, testes de laboratórios vêm sendo usados para avaliar o processo cariioso. Atualmente, os modelos de estudo *in vitro* são usados com frequência em pesquisas de cárie dental, principalmente na avaliação do efeito do fluoreto ( $F^-$ ) na inibição da desmineralização e na remineralização utilizando geralmente esmalte e dentina bovinos. Dentre os protocolos usados, o modelo de ciclagem de pH é usado porque mimetiza bioquimicamente o desenvolvimento da cárie *in vivo*.

No presente estudo foi usado o modelo de ciclagem de pH modificado por Queiroz (2004), no qual, durante seu desenvolvimento, foram feitos testes com soluções de concentrações crescentes de  $F^-$  (70 a 280  $\mu g F/mL$ ), sendo observado efeito do  $F^-$  dose-resposta, quer seja na redução da desmineralização como no ganho da remineralização do esmalte e da dentina bovinos. Esses efeitos foram validados pela análise de microdureza seccional, com a profundidade da lesão sendo avaliada pela microscopia de luz polarizada. Além disso, esse modelo de ciclagem de pH apresentou-se capaz de avaliar o potencial anti-cárie de dentifrícios com altas concentrações de  $F^-$  (1100  $\mu g F/g$ ) como também de concentrações reduzidas de  $F^-$  (500  $\mu g F/g$ ), quer seja na sua capacidade de aumentar a resistência da dentina na desmineralização como na ativação da remineralização. Os modelos de ciclagem de pH existentes haviam sido testados somente em tecido dentário

humano e portanto eram indicados somente para esse substrato (145). A base do modelo de ciclagem de pH modificado por Queiroz (2004) é a utilização de uma solução desmineralizante (Des) e de uma solução remineralizante (Re) de composição específica a qual determina a concentração de íons que elas oferecem e assim propiciam os processos de desmineralização e remineralização do substrato. A composição das soluções Des e Re foram originalmente obtidas de uma solução 50% saturada em relação à solubilidade da dentina, em tampão acetato, pH 5,0, preparada através do uso de dentina radicular de incisivos inferiores bovinos moída. A partir dessa solução de dentina, as concentrações de flúor, fósforo inorgânico e cálcio foram determinadas para a solução Des e Re (145).

Assim, no presente estudo, ao utilizar esse modelo de ciclagem de pH procurou-se utilizar de sua capacidade de avaliar o efeito dose-resposta para detectar o potencial anti-cárie da associação da aplicação tópica de flúor com irradiação laser aplicada à amostras de dentina radicular bovina. Esse fato é relevante, pois, como relatado na literatura, a dentina é mais susceptível à cárie que o esmalte, apresentando um pH crítico de uma unidade maior que o do esmalte (4; 17), sendo que também nela o uso do fluoreto tem sido efetivo em reduzir a cárie radicular, entretanto a concentração de flúor para esse efeito necessita ser maior do que para o esmalte (17; 44). Para monitorar as alterações químico-estruturais promovidas pela irradiação laser, associada ou não ao uso do fluoreto, quando empregada para prevenção da progressão de lesões de cárie radicular em substrato bovino foram utilizadas duas técnicas ópticas que permitem a monitoração da composição química da dentina, sem serem destrutivas para as amostras, possibilitando análises nos vários tempos experimentais propostos.

A análise composicional da dentina submetida a um processo de desmineralização inicial e aos diferentes tratamentos propostos nesse estudo foi realizada através da monitoração qualitativa e semi-quantitativa de componentes da matriz orgânica e inorgânica (103; 51) presentes na matriz dentinária antes e após os referidos procedimentos, utilizando a técnica de  $\mu$ ATR/FTIR. Adicionalmente e utilizando-se da propriedade de fluorescência, através da qual a luz ao interagir com a matéria torna-se capaz de fornecer informações sobre processos físicos químicos ocorridos (109), imagens da fluorescência da dentina foram adquiridas e analisadas

antes e após a aplicação dos tratamentos e após a submissão ao desafio cariogênico propostos no presente estudo. Já foi relatado na literatura que imagem da fluorescência emitida na região espectral do verde obtida de tecidos dentários cariados possibilita a diferenciação entre as áreas saudáveis e com lesões (110; 111), sendo que a referida fluorescência dental tem sido considerada como proveniente da hidroxiapatita.

É importante ressaltar que nos modelos de ciclagem de pH o fluoreto tem sido adicionado à solução desmineralizante (153; 154) para que possa ser estabelecido o grau de saturação adequado desse elemento em relação à sua concentração encontrada no substrato a partir do qual o modelo é desenvolvido, que no caso específico desse estudo corresponde a uma solução 50% saturada obtida da dentina em pó. Desse modo, as baixas concentrações usadas não interferem na resposta dos tratamentos e são relevantes para evitar a desmineralização erosiva (145) que ocorreria caso a solução desmineralizante estivesse insaturada para o íon flúor. Foi observado, no presente estudo, que o protocolo de desmineralização *in vitro* utilizado mostrou-se capaz de promover mudanças químicas na dentina, principalmente em sua matriz inorgânica levando à maior exposição da matriz orgânica, simulando o processo de desmineralização que ocorre *in vivo*, alterações essas detectadas pela técnica de  $\mu$ ATR-FTIR e pelo SIF.

Uma análise qualitativa descritiva das mudanças químicas decorrentes do processo de desmineralização pode ser obtida através da observação dos espectros médios de  $\mu$ -ATR/FTIR de amostras de dentina radicular bovina sadias e com desmineralização inicial (imediatamente antes dos tratamentos), nos quais podem ser observadas nas mesmas posições, nos dois espectros, as bandas de absorção no infravermelho localizadas de  $750\text{ cm}^{-1}$  a  $1800\text{ cm}^{-1}$ , as quais permitem a identificação de grupos funcionais específicos do tecido dentinário, conforme relatado na literatura com o uso da técnica FTIR-ATR (46).

Estes espectros também evidenciam que não houve o desaparecimento ou o surgimento de novas bandas de absorção após o processo de desmineralização, o que confirma relatos prévios da literatura (79). Observou-se, também, que as intensidades relativas das bandas correspondentes às vibrações do

carbonato foram alteradas, havendo diminuição das mesmas após o processo de cárie. Pode-se evidenciar que houve uma diminuição no conteúdo de carbonato em relação ao fosfato. Isso indica que o processo de desmineralização promove uma perda maior de carbonato do que de fosfato propriamente dito.

Este fato é esperado, pois o carbonato ligado à hidroxiapatita apresenta uma ligação menos estável e é, portanto, o constituinte mais facilmente perdido durante o processo de desmineralização (4; 24). Pela Figura 25, também é possível observar que o conteúdo de amidas aumentou no grupo cariado, o que pode evidenciar a maior exposição de colágeno após a perda do mineral. Como as amidas refletem o conteúdo orgânico da dentina, uma maior exposição deste tecido é detectado como aumento em quantidade pela técnica. Essa observação é corroborada pela literatura, onde na descrição de cortes histológicos de dentina (Figura 6) é relatada a presença de cristais de apatita carbonatada localizados entre e sobre as fibrilas de colágeno tipo I (23). Além disso, a literatura mostra que o processo de desmineralização empregado neste trabalho promove a formação de lesões de cárie com profundidade de até 95,4µm, evidenciando que se trata de um processo inicial; entretanto, com pequena perda mineral superficial decorrente de uma rápida desmineralização nos túbulos dentinários, seguida de uma lenta desmineralização da matriz intertubular (145; 155). Considerando que a técnica de µATR empregada no presente estudo analisa regiões de até 0,66 µm de profundidade (107), os resultados evidenciados aqui refletem a análise da superfície e não do corpo da lesão (17; 24), embora tenha ocorrido uma pequena perda de tecido superficial. Assim, neste processo de desmineralização inicial da dentina observa-se uma perda do conteúdo inorgânico e aparente aumento do orgânico. Desse modo, foi demonstrado que a técnica de FTIR empregando-se o acessório micro-ATR é indicada para análise qualitativa e semi-quantitativa da dentina desmineralizada.

Nos espectros médios de absorção no infravermelho das amostras de dentina radicular bovina dos diferentes grupos experimentais imediatamente após os tratamentos, bem como do grupo com amostras sadias foi possível identificar todas as bandas pretendidas em todos os grupos estudados, não sendo observada nenhuma nova formação ou desaparecimento de bandas, o que indicaria a formação

de compostos ou mudanças bruscas nos modos de vibração. Além disso, foi possível identificar, pela Figura 27, uma diminuição da intensidade da banda de absorção relativa ao  $\nu_3$  fosfato nos grupos que tiveram aplicação tópica de FFA, independente de haver ou não irradiação laser. Em contrapartida, na Figura 28 observa-se que a intensidade das áreas sob a banda de absorção relativa às amidas II e I apresenta-se maior nos grupos com aplicação tópica de FFA em comparação com aqueles que não tiveram assim como provável diminuição da intensidade da área referente ao carbonato ( $1300-1516\text{ cm}^{-1}$ ). Isso pode ser explicado pela presença de componentes do gel de FFA e pela ação do ácido fosfórico desse gel.

O flúor fosfato acidulado (FFA) tem sido reportado como um agente cariostático amplamente efetivo para prevenção da desmineralização do esmalte e da dentina e, por isso pode ser aplicado para prevenir ou paralisar a progressão das lesões de cárie. Seu mecanismo de ação deve-se à formação de cristais de fluoreto de cálcio ( $\text{CaF}_2$ ) sobre a superfície tratada, cuja liberação de fluoreto ( $\text{F}^-$ ) ocorre de forma lenta. Assim, o  $\text{F}^-$  liberado atua na diminuição do pH crítico para que ocorra a desmineralização e favorece a remineralização, interagindo com a hidroxiapatita carbonatada para formação de hidroxiapatita fluoretada ou, eventualmente, fluorapatita (4; 25).

Para otimizar sua interação com os cristais de hidroxiapatita, melhor eficiência foi demonstrada nos agentes de fórmula acidulada com ácido fosfórico, o qual dissolve levemente o tecido mineralizado superficialmente e disponibiliza maior quantidade de cálcio para formação de fluoreto de cálcio (17). No entanto, são dissolvidos alguns poucos micrometros de esmalte ou dentina em decorrência da ação do ácido fosfórico incorporado ao gel de flúor. Dessa maneira, supõe-se que a diminuição das áreas do fosfato e do carbonato nas amostras tratadas com FFA seja decorrente de uma desmineralização parcial da dentina pelo ácido fosfórico. Essa relação com o fluoreto foi também observada nas medidas de intensidade de fluorescência realizada no presente estudo. Entretanto mais trabalhos são necessários para confirmar tal hipótese.

Em relação às áreas das amidas, parece haver no gel de FFA compostos com o mesmo grupo funcional detectável nos mesmos comprimentos de onda que



se somam aos provenientes das amidas da matriz orgânica da dentina, conforme pode ser observado no espectro do FFA obtido por FTIR-ATR (Figura 34) (156). Nesta figura, podem ser observadas várias bandas de absorção na região entre  $1000\text{ cm}^{-1}$  e  $1700\text{ cm}^{-1}$  coincidentes com os picos das amidas I e III e amida II+Carbonato. Esses picos de absorção são devidos principalmente ao espessante do gel de flúor empregado (Fluoreto de sódio – com concentração de 1,23% de fluoreto, ácido fosfórico, ácido fluorídrico, sacarina sódica, celulose qsp 100, propilenoglicol, aroma, corante e água deionizada), os quais podem interferir na visualização dos efeitos promovidos pela irradiação laser ou pelo desafio cariogênico, na dentina radicular.

Essas observações são corroboradas pelas Figuras 29 a 33. Pela análise semi-quantitativa, obtida pela razão entre os valores das áreas sob as referidas bandas de absorção em relação à área sob a banda de absorção do fosfato, observa-se que houve um aumento da área da amida I em todos os grupos com aplicação de FFA, independente de acompanhado ou não de irradiação laser, entretanto não sendo observado esse aumento no grupo com somente a irradiação. A área relativa à amida 2+carbonato também se apresenta aumentada nos grupos com aplicação do gel de FFA em relação ao grupo cariado. Entretanto, como no grupo laser essa área não se apresenta alterada, assim como a área relativa ao carbonato, sugere-se que o aumento da intensidade das amidas I e II observadas nesse estudo nos grupos após os tratamentos é devido a componentes do gel de FFA. As pequenas alterações na intensidade das áreas sob a banda de absorção relativa à amida III não apresentaram significado estatístico quando realizada a análise semi-quantitativa, conforme Figura 31, apesar de no espectro do gel de FFA (Figura 34) haver a presença de bandas de absorção na mesma região correspondente à dessa amida.

De acordo com os resultados obtidos, observa-se que a irradiação da dentina cariada com laser de Nd:YAG não promoveu modificações químicas adicionais, quando comparadas com o grupo apenas cariado, nas bandas de carbonato e amidas I, II e III. Contudo, quando associada à aplicação tópica de flúor, a irradiação laser, principalmente se efetuada após a aplicação tópica de FFA, promove discreto decréscimo na proporção destas bandas em relação ao fosfato,

quando comparado com o grupo onde houve apenas a aplicação de FFA, porém sem diferença estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ). Estes achados sugerem que os efeitos térmicos exercidos pela irradiação laser possam ter ocasionado a discreta evaporação dos glóbulos de  $\text{CaF}_2$  formados, assim como dos componentes do gel de FFA que possam ter permanecido após aplicação tópica. Contudo, por tratar-se de uma técnica bastante sensível ao posicionamento da amostra, assim como à rugosidade da superfície (o que é crítico no caso das amostras desmineralizadas), os dados aqui apresentados sugerem parecer necessário o aumento do número de amostras para evidenciar diferenças estatísticas entre os grupos quando analisados por FTIR.

As alterações superficiais detectadas pela técnica de FTIR também foram percebidas como alterações na fluorescência da dentina. Quando excitada com radiação com comprimento de onda de 405 nm, a dentina sadia e cariada prioritariamente fluoresce na região espectral do verde ( $492 < \lambda < 577\text{nm}$ ). Estudos da literatura, empregando-se esmalte humano e hidroxiapatita sintética, indicam que essa fluorescência é proveniente da hidroxiapatita (111; 116). Isso discorda de outro estudo (123) que utilizando dentina radicular humana cariada encontrou maior intensidade de emissão de fluorescência na região espectral entre 600 e 700 nm, sendo essa atribuída a compostos derivados de porfirina produzidos por microorganismos orais.

As imagens de fluorescência relacionadas ao grau de hidratação das amostras evidenciam que, apesar dos valores iniciais diferentes, as duas amostras (referência e tratamento) apresentam comportamento semelhante em relação ao aumento da intensidade de fluorescência com o decorrer do tempo. Notou-se que, quanto maior o grau de hidratação da amostra, menor a média de fluorescência .

A razão da menor intensidade de fluorescência observada na dentina úmida talvez possa ser explicada pela alteração das propriedades ópticas da amostra que a presença da água causa. Parece que na presença de água, a qual apresenta índice de refração 1,33 (111), e que esta preenchendo os túbulos dentinários, ocorre maior espalhamento da luz comparando-se com o estado da dentina seca, na qual os túbulos encontram-se preenchidos por ar ( $n = 1$ ), e em

consequência, menor fluorescência é observada. Quando a água evapora dos túbulos dentinários, o espalhamento diminui e maior intensidade de fluorescência é então observada no tecido seco (157). Assim, a troca da água pelo ar diminui os agentes espalhadores e, portanto mais agentes fluorescentes são ativados resultando em maior intensidade de fluorescência.

Ao observarmos a imagem de fluorescência de uma amostra com cárie inicial, nota-se que ocorre uma suave diminuição do brilho característico da fluorescência. Esse achado corrobora os estudos prévios da literatura, realizados em esmalte, que reportam que lesões cariosas iniciais apresentam menor intensidade de fluorescência que o tecido sadio nesse comprimento de onda de excitação (111) (116). Assim, sugere-se que a perda de material inorgânico contribui para esse decréscimo. O processamento das imagens confirmou essa observação, pois enquanto o tecido sadio apresentou um índice de fluorescência média no grupo com valor 0,963, o tecido desmineralizado apresentou esse índice com valor de 0,761.

Como mencionado, para a análise estatística da intensidade de fluorescência e para a construção dos gráficos apresentados no presente estudo, foi calculado um índice que relaciona os dados de cada amostra experimental com a referência, o qual possui variação diretamente proporcional à variação do valor da média de intensidade de fluorescência do grupo analisado, nos diversos tempos. Ele foi utilizado para excluir qualquer variação de sinal presente simultaneamente nas amostras experimental e controle, possibilitando que a proposta de tratamento (FFA, Laser, Laser+FFA e FFA+Laser) seja analisada com mais especificidade.

Os resultados da análise de fluorescência apresentados aqui condizem com os efeitos da desmineralização *in vitro*, por 32 h, empregada no presente estudo, e também observados pela análise de microdureza onde fica evidenciado que ocorreu uma perda mineral em profundidade de aproximadamente 80  $\mu\text{m}$ . A lesão assim caracterizada corresponde a uma lesão rasa, ainda um processo de cárie inicial, com o corpo da lesão apresentando uma área de desmineralização. Esse processo pode ser observado na primeira linha de imagens da Figura 38, assim como no gráfico da Figura 39, onde é possível observar que, com o desenvolvimento da lesão de cárie incipiente, ocorre redução significativa do índice

de fluorescência. Contudo, este índice apresenta alteração não significativa estatisticamente após a ciclagem de pH. Este fenômeno pode ser explicado devido à pouca desmineralização promovida pela ciclagem de pH nas amostras já previamente desmineralizadas, conforme pode ser observado na Figura 46. Por esta mesma figura, nota-se ter havido uma discreta remineralização da superfície das amostras após ciclagem de pH, evidenciado pelo aumento dos valores de microdureza seccional em até 20  $\mu\text{m}$  proporcionado pela pouca quantidade de flúor disponível na solução remineralizadora. Desta maneira, estes efeitos podem ter contribuído pela pequena, porém não significativa, redução do índice de fluorescência no grupo sem tratamento após ciclagem de pH.

A Figura 38 apresenta imagens de fluorescência de todos os tratamentos propostos neste estudo, imediatamente após os tratamentos e após 4 dias de ciclagem de pH. É possível observar que a intensidade de fluorescência diminui em todos os grupos de tratamento, exceto para o grupo FFA + Laser. Esse comportamento é esperado, pois as amostras foram submetidas a um processo de desmineralização e, portanto perderam conteúdo mineral e estamos considerando a autofluorescência no verde como proveniente da hidroxiapatita (116).

No processo de desenvolvimento da cárie, parte desse mineral sofre dissolução quando as amostras de dentina são colocadas na solução DES durante a ciclagem de pH. Essa solução possui pH 5,0 e, portanto, abaixo do pH crítico para a dentina, o que propicia a dissolução de cristais de hidroxiapatita até que seja restabelecido a condição de saturação para o mineral quando, então, cessa a dissolução. Essa condição de saturação é obtida ao se submergir as amostras na solução RE, a qual possui pH 7,0 e representa condição de supersaturação para hidroxiapatita quando então, induz a precipitação de cristais sobre a área desmineralizada, resultando na recristalização da camada superficial da dentina (17). Entretanto, com o tempo de submersão na solução DES é de 4 horas, a quantidade de desmineralização supera a de remineralização e a perda de estrutura mineral progride (4; 17).

Há ainda uma incerteza a respeito da causa do decréscimo da fluorescência em lesões incipientes de cárie no esmalte. Uma teoria sugere que, no

esmalte cariado, ocorre um maior espalhamento da luz devido às diferenças dos índices de refração entre as condições sadio e desmineralizado. No tecido sadio a hidroxiapatita ( $n = 1,62$ ) predomina em relação à água e, como na presença da cárie ocorre um aumento da quantidade de água ( $n = 1,33$ ) nos espaços intercrystalinos em substituição à HAP, um maior espalhamento da luz pode ser observado (158) (117). Além disso, no esmalte sadio, devido à propriedade de guiar ondas da estrutura dos prismas, se o dente for irradiado com fótons, do UV até o IR, estes penetrarão profundamente no dente. Quando a estrutura do esmalte está alterada, as propriedades de guiamento de ondas diminuem ou desaparecem e assim a radiação não penetra tão profundamente. Dessa forma, um aumento significativo no espalhamento da luz pode ser observado no processo da doença. Assim, o maior espalhamento da luz no esmalte cariado induz a uma menor intensidade de fluorescência devido ao fato de diminuir a quantidade de luz que chega até os compostos fluorescentes ou por espalhar a fluorescência da dentina ou da ligação amelo-dentinária. Portanto, o sinal da fluorescência assim obtido apresenta menor intensidade quando comparado com a fluorescência do tecido sadio, quando o dente é excitado com luz azul, por exemplo, (111; 114; 117; 118; 159; 160).

Talvez esse raciocínio possa ser extrapolado para a dentina, considerando que em estudo (101) das propriedades óticas de amostras de  $170\ \mu\text{m}$  de espessura de dentina humana e de bovina em relação à luz visível, foi relatado que o coeficiente de absorção ( $\mu_a$ ) era independente do comprimento de onda, com um valor de  $\mu_a$  de aproximadamente  $4\ \text{cm}^{-1}$ . Porém o coeficiente de espalhamento variou de 30 a  $200\ \text{cm}^{-1}$ . Amostras com variação do conteúdo mineral e da densidade de túbulos mostravam uma nítida dependência do coeficiente de espalhamento com a densidade dos túbulos. Nenhuma dependência do conteúdo mineral foi encontrada, sugerindo que o espalhamento era devido a fenômeno relacionado aos túbulos dentinários. Além disso, outro estudo (161) também relatou que a estrutura dos túbulos era o principal espalhador com as fibras colágenas e os cristalitos minerais exercendo apenas um papel secundário. Contudo, essas informações não foram obtidas com as amostras imersas num fluido semelhante ao do meio oral, o que talvez interfira nos valores obtidos mas não na tendência de espalhamento da luz no tecido.

Entretanto, é importante considerar que a ultraestrutura do esmalte e dentina são diferentes. Enquanto o esmalte tem alta concentração de hidroxiapatita agrupada sob a forma de prismas, a dentina é formada por 48 % em volume de cristais de hidroxiapatita na forma de pequenas placas uniformes localizadas dentro, na periferia e por entre as fibrilas de colágeno (30% em volume). Vale ressaltar que devido ao alto conteúdo mineral (92% em volume) e matriz acelular mínima, a cor, dureza e outras propriedades físicas do esmalte como tecido podem ser consideradas similares às da hidroxiapatita (23). Além disso, o esmalte é um tecido quase homogêneo, enquanto que a dentina é heterogênea, formada por proteínas, células e água e, portanto com características físico-químicas e ópticas, além do comportamento perante os vários fenômenos, diferentes dos apresentados pelo esmalte. Considerando a intensidade da luz fluorescente proporcional à quantidade de material que causa a fluorescência e assumindo a fluorescência no verde com excitação em comprimento de onda de 405 nm somente da hidroxiapatita, o esmalte deveria apresentar uma intensidade de fluorescência bem maior que a dentina. A não ser que devido à estrutura em forma de prismas do esmalte ocorra um maior espalhamento da luz ao invés do guiamento dessa e a fluorescência emitida no esmalte, ao ser observada, esteja diminuída. Outra explicação para as observações de que a fluorescência na dentina seja maior que no esmalte poderia ser a de que essa seja devido ao mineral e também a um cromóforo orgânico com grande concentração na dentina. Estudos adicionais devem ser feitos comparando os dois tecidos sob as mesmas condições.

Sob essas considerações, parece lógico que o tecido desmineralizado apresente menor intensidade de fluorescência que o sadio, independente de ser esmalte ou dentina, pois apresenta menor quantidade de mineral além de maior quantidade de água, a qual é considerada substância espalhadora.

De acordo com os gráficos das Figuras 39 a 43 e as imagens de fluorescência da Figura 38, também pode ser observado que imediatamente após os tratamentos, o Grupo FFA foi o único grupo que apresentou redução significativa do índice de fluorescência em relação à condição de cárie incipiente. Entretanto esse fato não decorreu da perda mineral devido ao processo cariioso pois, na presença do flúor ocorreria menor perda mineral, pois o flúor promove uma remineralização. Além

disso, essa diminuição de intensidade de fluorescência ocorreu imediatamente após a aplicação tópica de flúor, antes mesmo das amostras serem submetidas à ciclagem de pH. Essa diminuição da intensidade de fluorescência pode ser devido a interferência nesse processo de algum componente do gel de flúor fosfato acidulado aplicado sobre as amostras, como por exemplo, do espessante usado nessa composição.

Visando otimizar a interação do fluoreto com os cristais de hidroxiapatita, melhor eficiência foi demonstrada com o uso do gel acidulado com ácido fosfórico, o qual dissolve levemente a dentina superficial, o que disponibiliza maior quantidade de cálcio para formação de fluoreto de cálcio (4). Assim, outra hipótese para explicar essa diminuição da intensidade de fluorescência observada no Grupo FFA é que, como o gel aplicado contém uma pequena quantidade de ácido fosfórico, esse ácido poderia propiciar uma leve dissolução superficial nas amostras e essa pequena desmineralização poderia ser detectada resultando em diminuição da intensidade de fluorescência. Entretanto, não é possível afirmar que o equipamento apresente tanta sensibilidade para essa detecção.

Entretanto, como pode ser observado nos gráficos das Figuras 41 a 43 e nas imagens da Figura 38 nos grupos onde houve irradiação laser, essa diminuição de fluorescência em relação às amostras com cárie incipiente promovida pelo FFA não ocorreu, uma vez que a irradiação laser promove a formação de novas fases cristalinas e não a perda de hidroxiapatita (51; 50; 82). No grupo FFA + *laser* (Figura 43) também não foi observada mudança significativa na intensidade de fluorescência quando comparada ao grupo sadio, o que pode ser explicado pelo fato de que a irradiação laser pode ter removido, por aquecimento, os componentes do gel de FFA que reduzem a emissão de fluorescência. Além disso, a irradiação laser, realizada após aplicação de FFA, pode ter originado a formação de compostos que reduzem a fluorescência das amostras cariadas. Contudo, são necessários estudos posteriores para se evidenciar quais os compostos que poderão ser formados neste processo e que interfiram com a fluorescência da dentina.

Quando se analisa os gráficos comparativos dos diversos grupos experimentais no decorrer do tempo mostrados nas Figuras 44 e 45, evidencia-se

que tanto a aplicação de FFA quanto a irradiação *laser*, aplicados isoladamente ou quando associados, não promove mudanças significativas de fluorescência no decorrer da ciclagem de pH. Essa manutenção na intensidade de fluorescência pode ser explicada pelo fato dos tratamentos realizados terem sido efetivos em reduzir a perda mineral. No caso do FFA, os mecanismos de redução da perda mineral referem-se, principalmente, à formação de fluoreto de cálcio sobre a superfície (25). No caso da irradiação *laser*, a literatura relata que o aumento da resistência à desmineralização da dentina irradiada é promovido por mudanças composicionais, tais quais evaporação de carbonato, água e componentes orgânicos, assim como por mudanças cristalinas, tais quais a formação de novas fases cristalográficas e o aumento do tamanho dos cristais de hidroxiapatita, resultando em uma dentina de maior grau de cristalinidade, estruturalmente modificada (50; 91; 97; 51). A associação de tratamentos revela, em estudos anteriores efetuados em esmalte com outros comprimentos de onda, a maior formação e retenção de fluoreto de cálcio (36), além da possível formação de fluorapatita (35). Contudo, não há estudos que relatam os efeitos da irradiação da dentina com laser de Nd:YAG associado à aplicação de FFA.

Nesse estudo pode ser observada uma maior intensidade de fluorescência decorrente da associação laser com aplicação tópica de flúor no 4º dia de ciclagem, em relação ao Grupo Cariado e em relação aos grupos de tratamento isolado (grupo FFA e grupo *laser*), conforme Figura 45. Melhores resultados foram observados no grupo laser+FFA, o qual apresentou índices médios de fluorescência, após ciclagem de pH, similares estatisticamente ao das amostras sadias. Considerando a hipótese do SIF empregado no presente estudo detectar a perda de hidroxiapatita, considera-se que este grupo foi o que apresentou menor perda de mineral, o que também é corroborado pelos dados de microdureza obtidos (Figura 48). Segundo relatos na literatura considerando o esmalte dental (51), a associação laser+ FFA pode induzir a um maior aumento da resistência à desmineralização devido ao fato da irradiação promover uma superfície mais rugosa, o que propicia a formação de um número maior de cristais de fluoreto de cálcio ( $\text{CaF}_2$ ), provenientes da aplicação tópica, que ficam retidos por um maior tempo, prolongando, assim, o efeito do fluoreto (51; 91). Dessa maneira, a progressão do processo carioso torna-se mais lenta, o que pôde ser evidenciado em quatro dias de ciclagem de pH.



A determinação das alterações do conteúdo mineral, resultantes da desmineralização e remineralização é considerada importante em vários estudos relacionados aos tecidos duros dentais, principalmente na área de cariologia. Dentre os diversos métodos utilizados destaca-se o teste de microdureza em corte transversal, que indiretamente evidencia a perda e/ou ganho mineral (162). Microdureza é definida como a resistência à deformação local, e o teste é baseado na indução de uma deformação superficial que permanece quando a carga é removida. Nesse teste, um penetrador de diamante é levemente pressionado contra a superfície a ser testada, usando carga e tempo pré-definidos de acordo com o tecido a ser analisado. O comprimento das impressões na amostra é determinado microscopicamente e se esse valor aumenta, indica que a microdureza diminuiu (163; 164). Essa análise tem sido usada em estudos *in vitro* e *in situ* para determinar a dureza em diferentes profundidades da lesão de cárie e determinar as mudanças na consistência dos tecidos duros dentais depois de serem submetidos a diferentes tipos de tratamento (50; 147; 165; 148; 166). O teste de microdureza seccional tem sido associado à perda do conteúdo mineral dos tecidos duros dentários, tendo em vista a alta correlação (0.91) existente entre a porcentagem de mineral medida por microrradiografia, uma técnica quantitativa, e a dureza do esmalte com lesão de cárie (147). Assim, se o valor da microdureza aumenta, indica que o tecido ganhou mineral, mas ao contrário, se esse valor apresenta-se diminuído, muito provavelmente o tecido perdeu mineral (50).

Diferentes métodos têm sido usados para avaliar a progressão de lesão de cárie em dentina radicular e dentre eles a microdureza tem sido reportado como sendo o único que considera as alterações nos componentes orgânico e inorgânico desse tecido (167). A diminuição da média da área de perda de microdureza seccional ( $\Delta S$ ) está correlacionada com a diminuição da perda ou com o ganho mineral e, portanto com a prevenção da progressão da lesão de cárie (147). Entretanto, considerando que a dentina é formada por uma rede de colágeno presente na matriz orgânica, foi sugerido que a remoção de parte desse componente deixa poros e espaços vazios que podem ser detectados como redução na dureza (100; 168).

Além disso, a microestrutura da dentina (quantidade relativa de túbulos, área dentina peritubular e intertubular) superficial varia muito em relação à dentina profunda, assim como a dentina coronária em relação à radicular e a dentina humana em relação à bovina (131). Contudo, estudos usando dentina humana hígida (169), mostraram que as diferenças na dureza da dentina em função da profundidade existem, mas não são relevantes para as propriedades mecânicas desse tecido (170). Adicionalmente, outro estudo, no qual foi usada a microscopia de força atômica em dentina sadia, mostrou que apesar da diminuição da rigidez da dentina intertubular ser devido à distribuição heterogênea do mineral dentro da matriz de colágeno e apesar da estrutura dos túbulos dentinários, esses fatores exerciam apenas efeito mínimo nessas propriedades (171). Portanto, parece que poros e vazios de dimensões nanométricas como os decorrentes da microestrutura da dentina não alteram a microdureza apresentada pela dentina sadia. Entretanto, após o processo de desmineralização, a perda de cristalitos de HAP pode alterar as propriedades mecânicas da matriz orgânica da dentina, possibilitando alterações nos valores de KHN observados.

Além disso, no presente estudo, através da análise de microdureza, foi possível observar que após a desmineralização inicial de 32 h houve a formação de lesão rasa de cárie na dentina radicular com aproximadamente 80  $\mu\text{m}$  de profundidade, conforme mostrado na Figura 46. Esse valor está próximo com o relatado na literatura para o uso do modelo de ciclagem aqui adotado (  $95,4 \pm 5,8$   $\mu\text{m}$ ), o que corresponde a uma lesão de cárie inicial (145). No grupo com apenas a desmineralização inicial (G1) o KHN da profundidade de até 30  $\mu\text{m}$  apresentou valores próximos a 20 (Figura 46), indicando que a superfície da lesão apresenta-se também desmineralizada após a permanência das amostras na solução Des pelo período de 32 h. Essa observação é corroborada pelo relato da literatura de que apesar da presença de fluoreto na solução Des, esse íon não interfere nos resultados obtidos, conforme discutido anteriormente. Caso o fluoreto presente na referida solução exercesse efeito remineralizante, ocorreria a remineralização da camada superficial da lesão que passaria a apresentar um valor de KHN maior, o que parece ter ocorrido no grupo sem tratamento somente após ser submetido aos ciclos de ciclagem de pH por um período de 4 dias (G2). Conforme pode ser observado na Figura 46, após esse período o grupo sem tratamento (G2), que

corresponde à condição cariado, apresentou maiores valores de microdureza em menor profundidade quando comparado com os valores apresentados pelo grupo com desmineralização inicial(G1), o que indica que provavelmente houve ganho mineral no tecido próximo à superfície, causado pelo fluoreto presente na solução Re, o que está de acordo com o efeito do flúor na remineralização da camada superficial da lesão, conforme relatado na literatura (17).

As observações em relação às diferenças entre as amostras com desmineralização inicial e após a ciclagem de pH obtidas pela análise de microdureza estão de acordo com aquelas fornecidas pela análise composicional por  $\mu$ -ATR-FTIR e pela análise de intensidade de fluorescência realizadas no presente estudo, as quais indicam que houve perda mineral com a evolução do processo cariioso nas amostras que não sofreram qualquer tratamento.

No presente estudo, também foi observado um pequeno aumento do valor da microdureza da superfície da lesão durante o processo de ciclagem no grupo *laser* em relação à condição de desmineralização inicial, o que pode ser evidenciado pelo valor de KHN nos 40  $\mu$ m superficiais, com magnitude próxima de 30 e 20, respectivamente (linha verde da Figura 47 e linha azul da Figura 46). Esse fato pode ser decorrente da remineralização superficial ocorrida durante o processo de ciclagem devido à presença do flúor na solução Re, pois comportamento semelhante foi observado no grupo sem tratamento (G2 - cariado), com o KHN apresentando valor próximo de 30 nos primeiros 30  $\mu$ m de profundidade.

Entretanto, após a referida profundidade, foi observado que o grupo com irradiação laser isoladamente não apresentou valores de microdureza maiores nem um  $\Delta S$  menor que o grupo sem tratamento, o que indicaria um maior conteúdo mineral e, portanto um efeito anticariogênico (Figuras 47 e 48). Esses achados sugerem que nas condições do presente estudo a irradiação laser isoladamente pode não ter promovido alterações cristalinas na dentina que possibilitassem a diminuição da progressão das lesões de cárie neste substrato. Contudo, não há relatos na literatura que expliquem quais os efeitos químicos e cristalográficos promovidos pelo laser de Nd:YAG na dentina cariada, o que sugere que estudos devam ser efetuados para se esclarecer esta hipótese. O presente estudo corrobora

os achados de microdureza, a partir do momento em que não foram evidenciadas, por FTIR, modificações composicionais na dentina cariada oriundas da irradiação laser isoladamente.

Tem sido relatado que em esmalte (51), a irradiação laser promove alterações cristalinas tais como as decorrentes da redução de carbonato, aumento do tamanho dos cristais de hidroxiapatita e formação de novas fases cristalinas que tornam o tecido menos solúvel. Para a dentina, foi relatado (172) que a irradiação com o laser de Nd:YAG com densidade de energia de  $207\text{J}/\text{cm}^2$  e duração de pulso de  $120\ \mu\text{s}$  e taxa de repetição de 10 Hz e posterior desmineralização não proporcionou efeito protetor para a dentina subjacente, apesar de ter produzido significativa recristalização e crescimento dos cristais de apatita, sem a formação de fosfato tricálcico tipo  $\beta$ , alterações comprovadas por difração de raio-X. Nesse estudo, foi sugerido que a ineficiência da camada recristalizada em resistir à desmineralização, apesar de sua permanência sobre a camada de colágeno desmineralizada mesmo depois de 80 horas imersa no gel ácido, conforme visto em microtomografia de raio-X, foi devido às rachaduras e poros macroscópicos que permitiram a penetração do gel desmineralizante.

Entretanto, como a dentina possui um menor volume mineral (48%) em forma de pequenos cristais dispersos sobre e entre as fibrilas de colágeno, diferentemente do esmalte onde os cristais de HAP formam estruturas bem maiores e alongadas (92%) com pequena quantidade de matriz orgânica e água entre essas estruturas, o que no esmalte significa uma maior proporção de mineral alterado em relação à proporção da dentina ; e, tendo em vista que no presente estudo, se trabalhou com um substrato que já estava parcialmente desmineralizado, pode ser que a irradiação laser tenha provocado as alterações mencionadas mas que tenha ocorrido mudanças em fases cristalinas em menor quantidade por haver menos cristais de hidroxiapatita e, portanto a irradiação laser isoladamente não foi capaz de prevenir a desmineralização durante o processo de ciclagem de pH.

Adicionalmente, a irradiação laser promove desnaturação de colágeno, evaporação proteica e de água (51), sendo que, ao ocorrer na dentina, esses efeitos podem aumentar a concentração mineral relativa desse tecido (94; 97). Entretanto,

pela análise composicional por  $\mu$ ATR-FTIR realizada imediatamente após os tratamentos, não foram observadas mudanças químicas adicionais, quando comparados com o grupo apenas cariado, nas bandas de carbonato e amidas I, II e III (Figuras 29-33). Porém essa análise abrange apenas 0,66  $\mu$ m de profundidade e sabe-se que a irradiação com o laser de Nd:YAG no esmalte, produz efeitos em profundidade de 1 a 5  $\mu$ m (102), assim, a análise composicional pode ter se restringido somente a uma pequena superfície do tecido irradiado. No entanto, caso essas mudanças tenham ocorrido, as mesmas não impediram a cárie de evoluir, pelo contrário, pois a remoção de colágeno pode ter causado o aparecimento de poros e espaços vazios que, adicionados aos espaços já presentes no tecido decorrentes da perda prévia de HAP, podem ter aumentado a permeabilidade da dentina e propiciado uma maior difusão das soluções durante a ciclagem de pH. Assim, ocorreu uma perda mineral maior (menor KHN), a qual foi observada como um valor de microdureza diminuído em relação ao grupo cariado na profundidade de 40 a 200  $\mu$ m e, portanto, resultado numa maior evolução da cárie no grupo irradiado. No entanto, esse aumento de permeabilidade teria permitido também uma maior difusão da solução Re que, nos grupos com aplicação de FFA apresentava-se potencializada, por entre as fibrilas da dentina intertubular além da difusão pelos túbulos dentinários. Esse fato pode ter possibilitado uma deposição de maior quantidade de cristais de HAP nos 40  $\mu$ m iniciais da lesão, o que justifica o maior KHN apresentado pelos grupos Laser+FFA e FFA+ Laser nessa profundidade de lesão em relação ao grupo cariado, ao grupo laser e mesmo ao grupo FFA.

Em estudo recente utilizando o laser de Nd:YAG na dentina hígida (100), observou-se que a irradiação resultou na redução dos valores de microdureza e em significativos danos térmicos à esse tecido. Entretanto foi utilizada uma potência média de 2 W com taxa de repetição de 20 Hz e as medidas de microdureza foram realizadas com ponta Vickers, com carga de 100 g e tempo de 10 s. Vale a pena ressaltar que tal valor de carga diminui a sensibilidade da técnica, não sendo possível detectar pequenas diferenças entre os tratamentos. Em uma tese recente (97) utilizando os lasers de Nd:YAG, Er:YAG e CO<sub>2</sub> para prevenção da cárie radicular, associado ou não ao uso de fluoreto de sódio, na qual também foi realizada a análise de microdureza *Knoop*, foi observado que o grupo irradiado com laser de Nd:YAG não apresentou dureza inferior ao grupo cariado, porém essa

também não foi similar à da dentina não-irradiada. Foi também sugerido que o subsequente desafio cariogênico acentuou a diminuição da microdureza (diminuiu o KHN), sendo esse comportamento decorrente da baixa potência empregada (0,5 W), o que pode ter promovido alterações menos evidentes, levando esse comprimento de onda *laser* a obter os resultados menos indicativos de promover resistência à desmineralização quando comparado aos outros pesquisados. Além disso, não foi encontrado sinergismo entre a irradiação laser e a aplicação de flúor gel usado previamente à irradiação (flúor + laser). No presente estudo foi observado um valor de microdureza no grupo irradiado menor que o do grupo cariado, na profundidade de 40 a 200  $\mu\text{m}$ , entretanto até 40  $\mu\text{m}$  de profundidade os valores nos dois grupos foi semelhante, indicando que esse laser isoladamente não foi capaz de promover resistência à desmineralização.

Como era esperado, a aplicação tópica de FFA inibiu a progressão das lesões de cárie em relação ao grupo sem tratamento. A diminuição da perda mineral ou o ganho desse, correlacionado com o aumento do KHN, pode ser evidenciado pelo menor  $\Delta S$  apresentado pelo grupo FFA em relação ao grupoariado, pois a presença do fluoreto interfere com o desenvolvimento da cárie.

Com a aplicação tópica do FFA sobre as amostras, há uma reação química com ou sobre essa superfície, formando um mineral tipo fluoreto de cálcio que funciona como um reservatório sobre a superfície tratada e tende a manter o fluoreto constante no meio. A presença desse íon diminui o pH crítico para que ocorra a desmineralização além de possibilitar que, durante a remineralização, ocorra a formação de hidroxiapatita fluoretada ou eventualmente de fluorapatita, minerais mais resistentes à dissolução ácida (35). Assim, ao submergir as amostras na solução RE, a qual possui pH acima do valor crítico, o flúor aumenta de 2 a 4 vezes a capacidade da solução de repor minerais perdidos pela dentina. Contudo, nem todo mineral perdido é repostado e uma lesão de cárie pode se desenvolver. No entanto, a presença do flúor reduz sua progressão.

Conforme pode ser observado na Figura 48, a associação da irradiação laser com aplicação tópica de FFA impediu a progressão da cárie, com resultados estatisticamente significativos em relação ao grupo sem tratamento. Entretanto,

melhores efeitos foram observados no grupo Laser +FFA, sendo que esse grupo apresentou o menor valor de  $\Delta S$ , inclusive com diferença estatisticamente significativa em comparação com o grupo FFA. Isso se deve ao fato de que a irradiação laser aumenta a área de superfície do tecido irradiado, expondo mais cristais de HAP para reagir com o FFA posteriormente aplicado e assim, é formado mais fluoreto de cálcio, o qual propicia a oferta de uma maior quantidade de fluoreto por um maior tempo em comparação com a aplicação de FFA isolada (51). Essas observações estão de acordo com as obtidas pela análise de fluorescência onde foi evidenciada que a associação Laser + FFA proporciona uma maior intensidade de fluorescência. A fluorescência foi considerada como sendo proveniente da HAP e portanto, o grupo *Laser+FFA* apresentou o maior conteúdo mineral após 4 dias de ciclagem em relação aos outros grupos experimentais, inclusive com valor médio equiparado ao do tecido sadio(Figura 45).

Entretanto, como a dentina tem cerca de 50% em volume de matriz orgânica e água, e considerando que o laser de Nd:YAG pode causar o aquecimento da superfície em até 1200°C, sendo que matriz orgânica é eliminada com temperaturas inferiores à 350° e um aquecimento de 60°C já promoveria a desnaturação de proteínas (46) , o aquecimento da matriz orgânica poderia causar sua desnaturação parcial, a qual somada aos microespaços deixados pela perda da HAP, favoreceria a difusão das soluções de ciclagem. Assim, a irradiação sobre uma superfície de dentina já desmineralizada aumentaria a permeabilidade dessa, entretanto quando associada ao FFA potencializaria o efeito do FFA, permitindo uma maior remineralização da lesão do que a proporcionada pelo FFA isoladamente. Esse fato justifica a maior microdureza nos 60  $\mu\text{m}$  iniciais da lesão, além da menor média da área de perda de microdureza apresentada pelos grupos *Laser +FFA* e *FFA + Laser* em relação ao grupo FFA.

## 7. CONCLUSÃO

De acordo com a proposta deste estudo e com os resultados obtidos, é possível concluir que:

1 – em associação com a aplicação tópica de flúor fosfato acidulado (FFA), a irradiação com laser de Nd:YAG promove alterações no conteúdo inorgânico e orgânico da dentina desmineralizada;

2 – tanto o processo de desmineralização quanto a associação da irradiação laser com a aplicação de FFA promovem mudanças na fluorescência da dentina, quando usado comprimento de onda de excitação de 405 nm, sendo que a irradiação laser previamente à aplicação de FFA foi o tratamento que apresentou imagem de fluorescência similar à da dentina sadia após desafio cariogênico;

3 – a associação de tratamentos reduz a progressão da desmineralização da dentina radicular, apresentando-se, como tratamento mais efetivo, aquele em que a irradiação laser efetuada antes da aplicação de FFA.

Desta maneira, conclui-se que a irradiação da dentina radicular com laser de Nd:YAG previamente à aplicação de FFA apresenta-se como a forma mais eficiente de prevenção da progressão de lesões de cárie radicular em comparação com os efeitos isolados destes tratamentos.



## 8. PERSPECTIVAS

Realização de um estudo semelhante, porém *in situ* para verificação do comportamento da fluorescência em dentina radicular humana e nas condições do ambiente oral, assim como para verificação do efeito preventivo da progressão de cárie radicular obtido pela irradiação com laser de Nd:YAG em associação com a aplicação tópica de FFA.

## 9. REFERÊNCIAS

1. GUTKNECHT, Norbert. **A Odontologia e o Laser - Atuação do laser na Especialidade Odontológica**. São Paulo: Quintessence, 2004.
2. JAWAD, M.M. *et al.* An overview: laser applications in Dentistry. **Internacional Journal of Pharmacology**, v. 7, p. 189-197, 2011.
3. BRASIL. Ministério da Saúde. **Notícias. Portal da Saúde/SUS**, 18 de agosto de 2013. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/saude/2010/12/brasil-entra-no-grupo-de-paises-com-baixo-indice-de-carie-na-populacao-diz-saude>> Acesso em: 03 de janeiro de 2014.
4. CURY, J.A. Uso do flúor e controle da cárie como doença. In: BARATIERI, L.N. *et al.* **Odontologia restauradora - Fundamentos e possibilidades**. São Paulo: Santos, 2001, p. 33-68.
5. CLARKSON, J.J.; LOUGHLIN, Mc. Role of fluoride in oral health promotion. **Int. Dent. J.**, v. 50, p. 119-128, 2000.
6. MARTHALER, T.M. Changes in dental caries 1953-2003. **Carie Res.**, v. 38, p. 173-181, 2004.
7. BRASIL. Ministério da Saúde. **Projeto SBBrasil 2010: Pesquisa Nacional de Saúde Bucal – Resultados Principais**. Brasília, 2011. Disponível em: <[http://dab.saude.gov.br/CNSB/sbbrasil/arquivos/projeto\\_sb2010\\_relatorio\\_final.pdf](http://dab.saude.gov.br/CNSB/sbbrasil/arquivos/projeto_sb2010_relatorio_final.pdf)>. Acesso em: 03 de janeiro de 2014.
8. BELTRAN-AGUILAR, E.D. *et al.* Surveillance for dental caries, dental sealants, tooth retention, edentulism and enamel fluorosis - United States, 1988-1994 and 1999-2001. **MMWR.**, v. SS-3, n. 54, p. 1-44, 2005.
9. BECK, J.D. The epidemiology of root surface caries: North American studies. **Adv. Dent. Res.**, v. 7, p. 42-51, 1993.
10. ETTINGER, R.L. Oral health needs of the elderly - an internacionl review. **Int. Dent. J.**, v. 43, p. 348-54, 1993.
11. LOCKER, D.; LEAKE, J.L. Coronal and root decay experience in older adults in Ontario, Canada. **J. Publi. Health Dent.**, v. 53, p. 158-64, 1993.
12. GILBERT, G.H. *et al.* Twenty-four month incidence of root caries among a diverse group of adults. **Caries Res.**, v. 35, p. 366-75, 2001.
13. MACCENTEE M.I.; CLARK, D.C.; GLICK, N. Predictors of caries in old age. **Gerontology**, v. 10, p. 90-7, 1993.

14. SALONEN, L.; ALLANDER, L.; BRATHALL, D. Oral health status in an adult Swedish population. Prevalence of caries. A cross-sectorial epidemiological study in Northern Alsvorg country. **Swed. Dent. J.**, v. 13, p. 111-23, 1989.
15. MORSE, W.J *et al.* Dental caries in person over the age of 80 living in Kungsholmen, Sweden: findings from the KEOHS project. **Community Dental Health.**, v. 19, p. 262-7, 2002.
16. LO E.C.; SCHWARZ, E.C. Tooth and root conditions in the middle-aged and the elderly in Hong Kong. **Community Dent. Oral Epidemiology.**, v. 22, p. 381-5, 1994.
17. FEJERSKOV, Ole; KIDD, Edwina. **Cárie dentária: a doença e seu tratamento clínico.** São Paulo: Santos, 2011. p. 44-48 e 210-231.
18. RAVALD N.; STARKHAMMAR JOHANSSON C. Tooth loss in periodontally treated patients. A long-term study of periodontal disease and root caries. **J. Clin. Periodontol.**, v. 39, p. 73-79, 2012.
19. WHIRW, B.A.; CAPLAN, D.J.; WEINTRAUB, J.A. A quarter century of changes in oral health in the United States. **Journal of Dental Education.**, v. 58, 1995.
20. MACCENTEE, M.I.; CLARK, D.C.; GLICK, N. Predictors of caries in old age. **Gerontology.**, v. 10, p. 90-7, 1993.
21. BURGUES, J.O. *et al.* Treating root-surface caries. **Dent. Clin. N. Am.**, v. 46, 2002, p. 385-404, 2002.
22. IBGE. **Pesquisa Nacional de Amostras de Domicílios 2012.** 27 de setembro de 2013. Disponível em : <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/trabalhoerendimento/pnad2012/default.shtm>. Acesso em 03 de janeiro de 2014.
23. NANCI, Antonio. **ten Cate; Histologia oral.** [trad.] Marcelo Sampaio Narciso. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013.
24. TENUTA, L.M.A.; CURY, J.A. Fluoride: its role in dentistry. **Braz. Oral Res.**, v. 24, Spec Iss 1, p. 9-17, 2010.
25. CURY, J; TENUTA, L.M.A. Enamel demineralization: controlling the caries disease or treating early caries lesions ?. **Braz. Oral Res.**, v. 23, Spec Iss 1, p. 23-30, 2009.
26. FEATHERSTONE, J.D.B. Remineralization, the natural caries repair process - the need for new approaches. **Adv. Dent., Res.**, v. 21, p. 4-7, 2009. On line version: <http://adr.sagepub.com/content/21/1/4>.
27. LIU, Y. *et al.* Potencial mechanism for the laser fluoride effect on enamel demineralization. **J. Dent. Res.**, v. 92, p. 71-5, 2013.

28. FEATHERSTONE, J.D.B. Caries detection and prevention with laser energy. **Dent. Clin. North. Am.**, v. 44, p. 955-69, 2000.
29. NIEMZ, M. H. **Laser-tissue interation. Fundamentals and Applications**. 1.ed. New York: Springer-Verlag, 1996.
30. ANA, P.A.; BACHMANN, L.; ZECELL, D. Lasers efeccts on enamel for caries prevention. **Laser Physics**, v. 16, p. 865-875, 2006.
31. FEATHERSTONE, J.D.B. *et al.* CO<sub>2</sub> laser inhibition of artificial caries-like lesion progression in dental enamel. **J. Dent. Res.**, v. 7, p. 1397-403, 1998.
32. RECHMANN, P. *et al.* Caries inhibition in vital teeth using 9,6 µm CO<sub>2</sub> laser irradiation. **J. Biomed. Optics.**, v. 16, p. 071405-1 - 071405-6, 2011.
33. STEINER-OLIVEIRA, C.; RODRIGUES, L.K.; LIMA, E.B., NOBRE-DOS-SANTOS, M. Effect of the CO<sub>2</sub> laser combined with fluoridated products on the inhibition of enamel demineralization. **J. Contemp. Dent. Pract.**, v. 9, p. 113-121, 2008.
34. YOKOYAMA, K. *et al.* Preventive effects of tooth fracture by pulsed Nd:YAG laser irradiation with diamine silver fluoride solution. **J. Clin. Laser Med. Surg.**, v. 19, p. 315-318, 2001.
35. PHAN, N.; FRIED, D.; FEATHERSTONE, J.D.B. Laser induced transformation of carbonated apatite to fluorapatite on bovine enamel. **SPIE**. v. 3593, p. 233-240, 1999.
36. ANA, P.A. *et al.* Effect of Er,Cr:YSGG laser and professional application on enamel demineralization and on fluoride retention. **Caries Res.**, v. 5, 46, p. 441-51, 2012.
37. NOBRE DOS SANTOS, M.; FEATHERSTONE, J.D.B.; FRIED, D. Effect of a new carbon dioxide laser and fluoride on sound and demineralized enamel. **Lasers in Dentistry.**, SPIE 4249, v. VII, p. 169-174, 2001.
38. McCORMACK, S.M. *et al.* Scanning electron microscope observations of CO<sub>2</sub> laser effects on dental enamel. **J. Dent. Res.** v. 74, n. 10, p. 1702-1708, 1995.
39. TAGLIAFERRO, E.P. *et al.* Combined effects of carbon dioxide laser and fluoride on demineralized primary enamel: an in vitro study. **Caries Res.**, v. 41, p. 74-76, 2007.
40. LE, C.Q.; FRIED, D.; FEATHERSTONE, J.D.B. Lack of dentin acid resistance following 9,3 µm CO<sub>2</sub> laser irradiation. [ed.] Fried D. Richmann P., p. 68430J-68435, 2008.

41. FEATHRSTONE, J.D.B. *et al.* Changes in acid resistance of dentin irradiated by a CW 10,6  $\mu\text{m}$  CO<sub>2</sub> laser. [ed.] Rechmann P; Fried D. , p. 684305, 2008.
42. BOARI, H.G.D. *et al.* Absorption and thermal study of dental enamel when irradiated with Nd:YAG laser with the aim of caries prevention. **Laser Physics**. v. 19, 2009.
43. GHOLAMI, G.A. *et al.* An evaluation of the occluding effects of Er,Cr:YSGG, Nd:YAG, CO<sub>2</sub> and diode lasers on dentine tubules; a scanning electron microscopy in vitro study. **Photomedicine and laser surgery**., v. 29, 2, p. 115-121, 2011.
44. ORGAAD, B.; ARENDS, J.; ROLLA, G. Action of fluoride on inhibition of early root surface caries in vivo. **Caries Res.**, v. 24, p. 142-4, 1990.
45. TEN CATE, A.R. **Histologia Bucal - desenvolvimento e função**. Rio de Janeiro: Guanabara, 1988.
46. ZECELL, D.M.; BACHMANN, L. **Estrutura e composição do esmalte e da dentina: tratamento térmico e irradiação com lasers emissores no infravermelho**. 1.ed. São Paulo: Livraria da Física, 2005.
47. RABELO NETO, J.S. **Hidroxiapatita sintética nanoestruturada e esmalte dental aquecidos e irradiados por laser Er,Cr:YSGG. Caracterização por FTIR e por DRX**. 2009. Dissertação (Mestrado). Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.
48. LEGEROS, R. Z. Calcium phosphates in desmineralization/remineralization. **J. Clin. Dent.**, v. 10, n. 2, p. 65-73, 1999.
49. NANCI, Antonio. **ten Cate's Oral Histology - Development, Structure and Function**. Elsevier, 2013.
50. ANA, P.A. **Estudo in vitro da resistência à desmineralização e da retenção de flúor em esmalte dental irradiado com laser de Er,Cr:YSGG**. 2007. Tese (Doutorado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear - Materiais). Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo .
51. ZECELL, D.M. *et al.* Compositional and cristallografic changes on enamel when irradiated by Nd:YAG or Er,Cr:YSGG lasers and its resistance to demineralization when associated with fluoride. **Proc SPIE.**, p. 7549;7549G-1 -7549G-12, 2010.
52. HUANG, G.T. Dental pulp and dent tissue engineering and regeneration: advancement and challenge. **Front. Biosc.**, v. 3, p. 788-800, 2011.
53. GOLDBERG, M. *et al.* Dentin: structure, composition and mineralization. **Front. Biosc.**, v. 3, p. 711-735, 2011.

54. FEATHERSTONE, J.D.B. The science and practice of caries prevention. **J.A.D.A.**, v. 131, p. 887-899, 2000.
55. WINSTON, A.E.; BHASKAR, S. Caries prevention in the 21st century. **J.A.D.A.**, v. 129, 1998.
56. SHEN, Shong; SAMARANAYAKE, L.P.; YIP, Hak-Kong. In vitro grown, acidogenicity and cariogenicity of predominant human root caries flora. **Journal of Dentistry.**, v. 32, p. 667-678, 2004.
57. KATZ, S. The use of fluoride and chlorhexidine for the prevention of radiation caries. **J. Am. Dent. Assoc.**, v. 104, p. 164-70, 1982.
58. TEN CATE, J.M.'Bob'. The need for antibacterial approaches to improve caries control. **Advances in Dental Research.**, v. 21, p. 8-9, 2009.
59. ZHANG, Q.; VAN'T HOF; M.A.; TRUIN, G.J. Caries-inhibiting effect of chlorhexidine varnish in pits and fissures. **J. Dent. Res.**, v. 85, p. 469-72, 2006.
60. SBPC. Cáries e Câncer. **Revista Ciência Hoje**, Vol. 52, p. 11, novembro de 2013.
61. MINE TEZAL *et al.* Caries dental and Head and Neck Cancers. **JAMA Otolaryngol Head Neck Surg.** 12 de Setembro de 2013. Disponível em: <<http://media.jamanetwork.com/news-item/cavities-appears-associated-reduced-risk-head-neck-squamous-cell-carcinoma>>. Acesso em 04 de janeiro de 2014.
62. HAHN, C.L.; BEST, .AM.; TEW, JG. Cytokine induction by *Streptococcus mutans* and pulpal pathogenesis. **Infect Immun.** v. 68, n. 12, p. 6785-6789, 2000.
63. HESSLE, C.; ANDERSSON, B.; WOLD, A.E. Gram-positive bacteria are potent inducers of monocytic interleukin-12 (IL-12) while gram-negative bacteria preferentially stimulate IL-10 production. **Infect Immun.** vol. 68, 6, p. 3581-3586, 2000.
64. ARNOLD, W.H. *et al.* Micromorphological and micronanalytical characterization of stagnating and progressin and root caries lesions. **Archives of Oral Biology.** v. 52, p. 591-597, 2007.
65. NYVAD, B.; FEJERSKOV, O. Assessing the stage of caries lesion activite on the basis of clinical and microbiological examination. **Community Dent. Oral Epidemiol.** v. 25, v. 1, p. 69-75, 1997.
66. NYVAD, B.; TEN CATE, J.M.; FEJERSKOV, O. Microradiography of experimental root surface caries in man. **Caries Res.**, v. 23, p. 218-23, 1989.
67. FRANK, R.M. Structural events in the caries process in enamel, cementum and dentin. **J Dent Res.**, Special Issue, v. 69, p. 559-66, 1990.

68. GARTON, B.J.; FORD, P.J. Root caries and diabetes: risk assessing to improve oral and systemic health outcomes. **Australian Dental Journal.**, v. 57, p. 114-122, 2012.
69. SAUNDERS, R.H; HANDELMAN, S.L. Effect of hiposalivatory medications on saliva flow rates and dental caries in adult aged 65 and older. **Spec. Care Dentist.**, v. 12, p. 116-21, 1992.
70. BOWDEN, G.H. *et al.* Association of selected Bacteria with the lesions of root surface caries. **Oral Microbiol Immunol.**, v. 5, p. 346-51, 1990.
71. GILBERT, G.H. *et al.* Twenty-four month incidence of root caries among a diverse group of adults. **Caries Res.**, v. 35, p. 366-75, 2001.
72. WHELTON, H. Overview of the impact of changing global patterns of dental caries experience on caries clinical trials. **J. Dent. Res.**, v. 83, p. 29-34, 2004.
73. FERREIRA, R.C. *et al.* Saúde bucal de idosos residentes em instituições de longa permanência de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. **Cad. Saúde Pública.** v. 11, n. 25, p. 2375-2385, nov. 2009.
74. CLARKSON, J.J.; LOUGHLIN, Mc. Role of fluoride in oral health promotion. **Int. Dent. J.**, v. 50, p. 119-128, 2000.
75. ZAVGORODNIY, A.V.; ROHANIZADEH, R.; SWAIN, M.V. Ultrastructure of dentine carious lesions. **Archives of Oral Biology.**, v. 53, p. 124-132, 2008.
76. TOHDA, H.; FEJERSKOV, O.; YANAGISAWA, T. Transmisson electron microscopy of cementum crystals correlated with Ca and F distribution in normal and carious human root surface. **J. Dent. Res.**, v. 75, p. 949-54, 1996.
77. TEN CATE, J.M.; DUIJSTERS, P.P. Influence of fluoride in solution on tooth demineralization. Chemical data. **Caries Res.**, v. 17, p. 193-9, 1983a.
78. FEATHERSTONE, J.D.B. Prevention and reversal of dental caries: role of low level fluoride. **Comm.Dent.Oral Epidemiol.**, v. 27, p. 31-40, 1999.
79. Ana, P.A. *et al.* FT-Raman spectroscopic analisys of Nd:YAG and ER,Cr:YSGG laser irradiated enamel for preventive purposes. **Laser Phys.**, v. 24, 2014.
80. SOGNARES, R.F.; STERN, R.H. Laser of human enamel to demineralization in vitro effect on resistance. **J.S.Calif. Dent. Assoc.**, v. 33, p. 328-329, 1965.
81. STERN, R.H.; SOGNARES, R.F.; GOODMAN, F. Laser effect on in vitro enamel permeability and solubility. **J. Am. Dent. Assoc.**, v. 73, p. 838-43, 1966.

82. DILBERT E.; MALKOC, M.A.; NILGUN OZTURK A.; OZTURK F. Effect of various lasers irradiation on the mineral content of dentin. **European Journal of Dentistry.**, v. 7, jan. 2013.
83. ZECELL, D.M.; RIBEIRO, M.S.; MALDONADO, E.P. Apostila da disciplina - Interação da Luz Laser com tecidos biológicos: aplicações. **Curso Mestrado Profissionalizante "Lasers em Odontologia"**, IPEN, 2007.
84. Oliveira, M.E. **Avaliação de diferentes parâmetros para irradiação do esmalte dental com o laser de CO<sub>2</sub>, visando a redução da desmineralização.** 2007. Tese (Doutorado em Odontologia, área de concentração: Dentística). Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, São Paulo .
85. YAMAMOTO, H.; OGYA, K. Potencial of itrium-aluminium-garnet laser in caries prevention. **J. Oral Pathol.**, v. 38, p. 7-15, 1974.
86. YAMAMOTO, H; SATO, H. Prevention of dental caries by Nd:YAG laser irradiation. **J. Dent. Res.**, v. 88, p. 1271-1277, 1980.
87. FEATHERSTONE, J.D.B; FRIED, D. Fundamental interations of lasers with dental hard tissues. **Med Laser Appl.**, v. 16, p. 181-194, 2001.
88. OHO, T.; MORIOKA, T. A possible mechanism of acquired acid resistance of human dental enamel by laser irradiation. **Caries Res.**, v. 24, p. 86-92, 1990.
89. MORIOKA, T.; TAGOMRI, S.; INAI, YUKO. An incremental effect of acid resistance and remineralization on incipient caries of enamel with laser irradiation. **J. Jpn Soc. laser Dent.**, v. 1, p. 9, 1991.
90. MORIOKA, T. Lasers in preventive dentistry.Prevention of dental caries. **J. Jpn. Soc. Laser Dent.**, v. 10, p. 247, 1993.
91. ZECELL, D.M. *et al.* Nd:YAG laser in caries prevention: a clinical trial. **Lasers in Surgery and Medicine.**, v. 41, p. 31-35, 2009.
92. ZACH, L.; COHEN, G. Pulp response to externally applied heat. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol.**, v. 19, p. 515-530, 1965.
93. HARAZAKI, M. *et al.* The Nd:YAG laser is useful in prevention of dental caries during orthodontic treatment. **Bull Tokyo Dent. Coll.** 2, v. 42, p. 79-86, 2001.
94. KANTOLA, S. Laser induced effects on tooth structure. IV A study of changes in the calcium and phosphorus contents in dentin by electron probe microanalysis. **Acta Odontologia Scandinavica.**, v. 30, p. 463-74, 1972.
95. RODRIGUES, L.K.A.; NOBRE DOS SANTOS, M. *et al.* Carbon dioxide laser in dental caries prevention. **Journal of Dentistry.**, v. 32, p. 531-540, 2004.



96. NELSON, D.G.A, LONGEBLOED, W.L.; FEATHERSTONE, J.D.B. Laser irradiation of human dental and dentine. **The New Zealand Journal.**, v. 82, p. 74-7, 1986.
97. LEPPI, C.P. **Influência do uso do laser na prevenção da cárie radicular.** 2012. Tese (Doutorado em Ciências). Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - USP, Ribeirão Preto.
98. ARANHA, A.C.; PIMENTA, L.A.; MARCH, G.M.I. Clinical evaluation of desensitizing treatments for cervical dentin hypersensitivity. **Braz. Oral Res.**, v. 23, n. 3, p. 333-9, 2009.
99. GAO, X.L.; PAN, J.S.; HSU, C.Y. Laser-fluoride effect on root demineralization. **J Dent Res.**, v. 85, n. 10, p. 919-23, 2006.
100. AL-OMARI, W.M.; PALAMARA, J.E. The effect of Nd:YAG and Er,Cr:YSGG lasers in the microhardness of human dentin. **Lasers Med Sci.**, 2012.
101. FRIED, D. et al. Nature of light scattering in dental enamel and dentin at visible and near-infrared wavelengths. **Applied Optics.**, v. 34, março 1995.
102. MAGALHÃES, M.F. Estudo *in vitro* do uso do laser de Nd:YAG na permeabilidade dentinária cervical. 2001. Dissertação (Mestrado profissional em lasers em Odontologia). IPEN - Universidade de São Paulo, São Paulo.
103. BENETTI, CAROLINA. **Estudo in-vitro dos efeitos do laser de Er,Cr:YSGG em tecido ósseo por espectroscopia ATR-FTIR.** 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear-Materiais). Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.
104. SILERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X. **Spectrometric Identification of Organic Compounds. Infrared Spectrometry.** USA : John Wiley & Sons, 2005.
105. SKOOG, D.A.; CROUCH, S.R.; HOLLER, F.J. **Principles of instrumental analysis.** 6th. Cengage Learning, 2006.
106. MORTAÇO-GUIDOLIN, L.B. **Caracterização bioquímica de células sadias e neoplásicas através de espectroscopia vibracional.** 2009. Dissertação (Mestrado). Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto .
107. CEM-UFABC. PropesUFABC. Disponível em: <<http://propes.ufabc.edu.br/cem/ftir.html>>. Acesso em: 08 de janeiro de 2014.]
108. DYER, J.R. **Aplicações da espectroscopia de absorção aos compostos orgânicos.** [trad.] Sob a direção de Autora Giora Albanese. Edgard Bçucher, 1969.
109. VO-DINH, T. **Biomedical Photonics Handbook.** CRC Press, 2003.

110. LINS, C.C.C.; MARCASSA, L.G. Construção e caracterização de um sistema de imagens hiperespectrais. **Rev. Bras. Eng. Biom.**, v. 25, p. 67-74, 2009.
111. ANGMAR-MANSSON, B.; TEN BOSH, J.J. Quantitative light induced fluorescence (QLF) : a method for assessment of incipient caries lesions. **Dentomaxillofac. Radiol.**, v. 30, p. 298-307, 2001.
112. LINS, E.C.C.C. **Espectroscopia da fluorescência na citricultura**. 2009. Tese(Doutorado em Física). Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.
113. Benedict, H.C. Note on fluorescence of teeth in ultraviolet rays. **Science**. 1928, v. 67, p. 422, 1928.
114. MENDONÇA, M.A.L.C. Laser e diagnóstico de cáries: estado da arte e avaliação in vitro das diferenças de fluorescência entre esmalte sadio, cariado e desmineralizado. 2001. Dissertação (Mestrado Profissionalizante na área de Lasers em Odontologia). IPEN , São Paulo.
115. ROUSSEAU, C. *et al.* The effect of Dentine on Fluorescence Measurements of Enamel Lesions in vitro. **Caries Res.**, v. 36, p. 381-385, 2002.
116. HAFSTROM-BJORKMAN, U.; SUNDSTROM, F.; TEN BOSCH, J.J. Fluorescence in dissolved fractions of human enamel. **Acta Odont. Scand.**, v. 49, n.3, p. 133-138, 1991.
117. ROCHA-CABRAL, R.M. **Deteção de lesões de cárie por fluorescência: correlação entre a histologia e os resultados obtidos com o DIAGNODENT e a Espectroscopia**. 2006. Tese (Doutorado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear - Materiais). IPEN, São Paulo.
118. MENDES, F.M. **Avaliação do uso de corantes fluorescentes associados ao Diagnodent para deteção de perda mineral decorrente da cárie dentária**. 2005 Tese (Doutorado ). Universidade de São Paulo.
119. BACHMANN, L. *et al.* Fluorescence Spectroscopy of Biological Tissues - A review. **Applied Spectroscopy Reviews.**, v. 41, n. 6, p. 575-590, 2007.
120. TAUBINSKY, I.M. *et al.* Prospects for applying fluorescence spectroscopy to diagnose the hard tissues of the tooth. **Crit. Rev. Biomed. Eng.** 2000, v. 28, n. 5, p. 137-144, 2000.
121. SONG, K.B, *et al.* Detection of incipient carous lesions formed on human teeth in vitro using ultraviolet laser. **Photomed. Laser Sur.**, v. 23, n.5, p. 498-503, 2005.
122. SPITZER, D.; TEN BOSH, J.J. The total luminescence of bovine and human dental enamel. **Calc. Tiss. Res.**, v. 20, p. 201-208, 1976.

123. BUCHALLA, WOLFGANG; LENNON, ÁINE M.; ATTIN, THOMAS. Comparative fluorescence spectroscopy of root caries lesions. **European Journal of Oral Sciences.**, v. 112, n. 6, p. 490--496, 2004.
124. DE JOSSELIN DE JONG, E. *et al.* A new method for in vivo quantification of changes in initial enamel caries with laser fluorescence. **Caries Res.**, v. 29, n. 1, p. 2-7, 1995.
125. HALL ANDO, M.; STOOKEY, G.K.; DESCHEPPER, E. ; STOOKEYL, A.F. In vitro studies of laser fluorescence for detection and quantification of mineral loss from dental caries. **Adv. Dent. Res.**, v. 11, p. 507-14, 1997.
126. AI-KATEEB, S. *et al.* Laser fluorescence quantification of remineralisation in situ of incipiente enamel lesions: influence of fluoride supplements. **Caries Res.** 1997a, v.. 31, n. 2, p. 132-40, 1997a.
127. FOREMAN, P.C. The excitation and emission spectra of fluorescence components of human dentine. **Archs. Oral Biol.**, v. 25, p. 641-647, 1980.
128. FOREMAN, PC. Fluorescent microestrutura of mineralized dental tissues. **Internacional Endodontic Journal.**, v. 21, p. 251-256, 1988.
129. BNERJEE, A.; BOYDE, A. Autofluorescence and mineral content of carious dentine: scanning optical and backscattered electron microscopic studies. **Caries Res.**, v. 32, 1998.
130. CAMPOSI, M.I.C. O Uso de Dentes Bovinos em Pesquisas Odontológicas. **Pesq. Bras. Odontoped. Clin.Integr.**, João Pessoa-PB, Vol. 8, p. 127-132 jan/abril de 2008.
131. GHAETH, H. YASSEN; JEFFREY, A. PLATT; ANDERSON T.HARA. Bovine teeth as substitute for human teeth in dental research: a review of literature. **Journal of Oral Science.**, v. 53, p. 273-282, 2011.
132. SANCHES, R.O. *et al.* Caracterização molecular da dentina humana e bovina. 2008.
133. MELLBERG, J.R. Hard-tissue substrates for evaluation of cariogenic and anti-cariogenic activity in situ. **J Dent Res. Special Issue**, v. 71, p. 913-19, 1992.
134. HARA, A.T. *et al.* Caries progression and inhibition in human and bovine root dentine in situ. **Caries Res.**, v. 37, p. 339-44, 2003.
135. BACHMANN, L. *et al.* Infrared Absorption Bands of Enamel and Dentin Tissues from Human and Bovine Teeth. **Applied Spectroscopy Reviews.**, v. 38, n. 1, p. 1-14, 2007.

136. CEM-UFABC, sob responsabilidade do Prof. Herculano Martins. **Manual do usuário do equipamento FT-IR 610/660 (Varian Inc)**. 2011. Disponível em: <<http://propes.ufabc.edu.br/cem/ftir.html>>. Acesso em: 10 de maio de 2014.
137. CORRÊA-AFONSO, A.M. *et al.* FTIR and SEM analysis of CO<sub>2</sub> laser irradiated human enamel. **Archives of Oral Biology**., v. 57, p. 1151-1158, 2012.
138. GADALETA, S. *et al.* Polarized FT-IR microscopy of calcified turkey leg tendon. **Connective Tissue Research**., v. 34, n. 4, p. 203-211, 1996.
139. BACHMANN, L.; GOMES, A.S.L.; ZECELL, D.M. Collagen absorption band in heated and rehydrated dentine. **Spectrochimica Acta Part A**., v. 62, p. 1045-1049, 2005.
140. EMERSON, W.; FISCHER, E.E. The Infra-Red absorption spectra of carbonate in calcified tissues. **Arch. Oral Biol.**, v. 7, p. 671-683, 1962.
141. REY, C. *et al.* Resolution-enhanced Fourier Transform Infrared Spectroscopy study of environment of phosphate ions in the early deposits as a solid phase of calcium-phosphate in bone and enamel, and their evolution with age. I Investigations in the  $\nu_4\text{PO}_4$  domain. **Calcif. Tissue Int.**, v. 43, p. 384-394, 1990.
142. SASAKI, S.K. *et al.* Compositional analysis of root cementum and dentin after Er:YAG laser irradiation compared with CO<sub>2</sub> laser and intact root using Fourier Transformed infrared spectroscopy. **J. Periodontal Research**., v. 37, p. 59-59., 2002
143. UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE. Disponível em: <[http://www.uff.br/cdme/matrix/matrix-html/matrix\\_color\\_cube/matrix\\_color\\_cube\\_br.html](http://www.uff.br/cdme/matrix/matrix-html/matrix_color_cube/matrix_color_cube_br.html)>. Acesso em 10 de janeiro de 2014.
144. GOMES, JONAS; LUIS VELHO. **Computação Gráfica: Imagem** . Rio de Janeiro : IMPA/SBM, 1994.
145. QUEIROZ, C.S. **Modelos de estudos in vitro para avaliar o efeito do fluoreto na desmineralização e remineralização do esmalte e dentina**. 2004. Tese (Doutorado em Odontologia - Área de concentração em Cariologia). Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba.
146. TEN CATE, J.M.; DUIJSTERS, P.P.E. Alternating demineralization and remineralization of artificial enamel lesions. **Caries Res.**, v. 16, p. 201-10, 1982.
147. FEATHERSTONE, J.B.D.; TEN CATE, J.M.; SHARIATI, M; ARENDS, J. Comparison of artificial caries-like lesions by quantitative microradiography and microhardness profiles. **Caries Res.**, v. 17, p. 385-91, 1983.
148. SOPRANO, V. **Estudo de parâmetros para ensaios de microdureza em amálgama de prata, resina composta, dentina e esmalte bovinos**. 2007.

Dissertação (Mestrado em Odontologia/Dentística). Universidade de São Paulo, São Paulo.

149. SOUZA, R.P. et al. In situ effects of restorative materials on dental biofilm and enamel demineralisation. **J. Dent.**, v. 37, n. 1, p. 44-51, 2008.

150. KIELBASSA, A.M.; WRBAS K.T.; SCHULTE-MÖNTING, J. Correlation of transversal microradiography. **Arch Oral Biol.**, v. 44, p. 243-251, 1999.

151. MEYER, STUART L. **Data Analysis for Scientists and Engineers**. Wiley, 1975.

152. GRIFFIN, S.O. et al. Effectiveness of fluoride in preventing caries in adults. **J Dent Res.**, v. 86, p. 410-415, 2007.

153. DAMEN, J.J.; BUIJS, M.J.; TEN CATE, J.M. Fluoride-dependent formation of mineralized layers in bovine dentin during demineralization in vitro. **Caries Res.**, v. 32, p. 435-40, 1998.

154. TEN CATE, J.M.; DAMEN, J.J.; BUIJS, M.J. Inhibition of dentin demineralization by fluoride in vitro. **Caries Res.**, v. 32, n. 2, p. 141-7, 1998.

155. MELLBERG, J.R.; SANCHEZ, M. Remineralization by a monofluorophosphate dentifrice in vitro of root dentin softened by artificial caries. **J. Dent. Res.**, v. 65, n. 7, p. 959-62, 1986.

156. SARTORI, LETÍCIA ; ANA, PATRÍCIA A.(Orientadora). **Avaliação das mudanças químicas promovidas por laser de Er,r:YSGG para prevenção da erosão dentária**. 2012. Trabalho submetido à UFABC como parte dos requisitos para obtenção da graduação em Engenharia Biomédica. UFABC, Santo André .

157. AL-KHATEEB, S. et al. Light-Induced Fluorescence Studies on Dehydration of Incipient Enamel Lesions. **Caries Res.**, v. 36, p. 25-30, 2002.

158. EKSTRAND, K.R. Improving clinical visual detection-potencial for caries clinical trials. **J. Dent. Res.**, v. 83, 2004.

159. MUJAT, C. et al. The influence on drying in quantitative laser fluorescence on optical pathlengths in incipient natural caries lesions. **Caries Res.**, v. 32, p. 484-492, 2004.

160. BORISOVA, E.; UZUNOV, T.; AVRAMOV, L. Laser-induced autofluorescence study of caries model in vitro. **Lasers Med. Sci.**, v. 21, p. 34-41, 2006.

161. ZIPJ, J.R.; TEN BOSCH, J.J. Angular dependence of HeNe laser light scattering by bovine and human dentine. **Arch. Oral Biol.**, v. 36, p. 283-289, 1991.

162. TEN BOSCH, J.J.; ANGMAR-MANSSON, B. A Review of Quantitative Methods for Studies of Mineral Content of Intra-oral Incipient Caries Lesions. **J. Dent. Res.**, v. 70, n. 1, p. 2-14, 1991.
163. TEN BOSCH, J.J.; ANGMAR-MANSSON, B. A review of quantitative methods for studies of mineral content of intra-oral incipient caries lesions. **J. Dent. Res.**, v. 70, 1, p. 2-14, 1991.
164. TAGLIAFERRO, E.P.S. **Avaliação in vitro da associação de laser de CO<sub>2</sub> e flúor fosfato na inibição da progressão de cárie em esmalte.** 2004. Dissertação (Mestrado em Odontologia, área de concentração Cariologia). Universidade Estadual de Campinas.
165. AIRES, C.P. et al. Effect of a lactose containing sweetener on root demineralization in situ. **Caries Res.**, v. 36, p. 167-69, 2002.
166. Meira, J.P. **Ação do laser de Er,Cr:YSGG, quando associado ou não ao flúor tópico, na prevenção da progressão de lesões de cáries incipientes de esmalte e dentina.** 2010. Dissertação (Mestrado Profissional de Lasers em Odontologia).IPEN - USP, São Paulo.
167. WEFEL, J.S.; HEILMAN, J.R.; JORDAN, T.H. Comparison of in vitro root caries models. **Caries Res.**, v. 29, p. 204-209, 1995.
168. Lee, B.S. et al. Effect of Nd:YAG laser irradiation on the hardness and elastic modulus of human dentin. **J.Clin. Laser Med. Surg.**, v. 21, p. 41-49, 2003.
169. FUENTES, V. et al. Microhardness of superficial and deep sound human dentin. 2003.
170. VICTORIA FUENTES et al. Microhardness of superficial and deep sound. **J. Biomed Mater Res A.**, v. 66, 4, p. 850-3, 2003.
171. KINNEY, J.H. et al. Atomic force microscope measurements of the hardness and elasticity off peritubular and intertubular human dentin. **J. Biomech Eng.**, v. 118, p. 133-135, 1996.
172. KINEY, J.H. et al. The Thereshold effects of Nd and Ho:YAG laser induced surface modification on demineralization of dentin surfaces. **J. Dent. Res.**, v. 75, n. 6, p. 1388-1395, June 1996.
173. TAGOMORI, S.; MORIOKA, T. Combined efects of laser and fluoride on acid resistance of human dental enamel. **Caries Res.**, v. 54, p. 15-7, 1989.

## 10. APÊNDICE 1



Comissão de Ética em Uso de Animais – CEUA  
Avenida dos Estados, 5001 – 1º andar – Torre I do Bloco A  
CEP: 09210-170 – Santo André, SP  
Tel: (11) 4996-7938  
E-mail: ceua@ufabc.edu.br

## CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **006/2013** nas fls. **15** do livro **01** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Patricia Aparecida da Ana, Coordenadora da linha de pesquisa **Alterações químico-estruturais promovidas pelo laser de CO<sub>2</sub> quando empregado para prevenção da progressão de lesões de cárie radicular** da qual participa a pesquisadora: **Adrienne Marlise Mendes Brito** está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA EM USO DE ANIMAIS (CEUA) no dia **24.04.2013**.

Com validade a partir de **Maio/2013** à **Maio/ 2014**.

Santo André-SP, 30 de abril de 2013.

  
Prof. Dra. Renata Simões  
Coordenadora  
CEUA - UFABC