

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOCiência

Graziela Santos Pereira

**CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DO BIOSILICATO® ASSOCIADO A LASER  
DE Nd:YAG PARA PREVENÇÃO DA CÁRIE RADICULAR**

São Bernardo do Campo – SP  
2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOCiência

Graziela Santos Pereira

**CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DO BIOSILICATO® ASSOCIADO A LASER  
DE Nd:YAG PARA PREVENÇÃO DA CÁRIE RADICULAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnociência da Universidade Federal do ABC, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnociência.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Patricia Aparecida da Ana

Coorientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Juliana Kelmy Macário Barboza Daguano

São Bernardo do Campo – SP  
2019

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do ABC  
Elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da UFABC  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Pereira, Graziela Santos

Caracterização e avaliação do Biosilicato® Associado a laser de Nd : YAG para prevenção da cárie radicular. / Graziela Santos Pereira. — 2019.

98 fls. : il.

Orientadora: Patrícia Aparecida da Ana

Dissertação (Mestrado) — Universidade Federal do ABC, Programa de Pós-Graduação em Biotecnociência, São Bernardo do Campo, 2019.

1. Laser em alta intensidade. 2. Biosilicato. 3. cárie. 4. dentina. 5. radioterapia. I. da Ana, Patrícia Aparecida. II. Programa de Pós-Graduação em Biotecnociência, 2019. III. Título.




**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO**  
**Fundação Universidade Federal do ABC**

Avenida dos Estados, 5001 – Bairro Santa Terezinha – Santo André – SP  
CEP 09210-580 · Fone: (11) 4996-0017

**FOLHA DE ASSINATURAS**


Assinaturas dos membros da Banca Examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata, GRAZIELA SANTOS PEREIRA realizada em 13 de Dezembro de 2019:

  
Prof.(a) **ARNALDO RODRIGUES DOS SANTOS JUNIOR**  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC

  
Prof.(a) **CHRISTIANE RIBEIRO**  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC

Prof.(a) **JEAN JACQUES BONVENT**  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC

Prof.(a) **LUIZ FERNANDO GRESPAN SETZ**  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC

  
Prof.(a) **PATRICIA APARECIDA DA ANA**  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC - Presidente

\* Por ausência do membro titular, foi substituído pelo membro suplente descrito acima: nome completo, instituição e assinatura

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho exclusivamente aos meus dois filhos Victor Hugo e Bianca, as crianças mais doces que eu conheço, onde muitos sábados ficaram trancados comigo no laboratório para analisar minhas amostras ou nos domingos que deixamos de ir no parque para que eu pudesse escrever e estudar...sem a compreensão deles nada disso seria possível.

## AGRADECIMENTOS

A Deus em primeiro lugar, por me dar a oportunidade de realizar um sonho!!!

À minha orientadora e “dupla” Prof.a Dra. Patrícia Aparecida da Ana por toda confiança, toda dedicação, apoio e ajuda possível e mensurável, não só pelo acolhimento, mas também por acreditar que eu poderia chegar até aqui, simplesmente sem palavras para descrever uma professora e pessoa como essa...falo com muito apreço desta pessoa maravilhosa que me aceitou como aluna, mesmo sabendo que trabalho como uma maluca e ainda com duas crianças maravilhosas que adoram a minha escola “como eles dizem”.

Ao meu pai Luiz e minha mãe Janete por ter sempre me apoiado e comemorado cada vitória.

Ao Anderson e a Rosirene meus irmãos de coração que sempre me ajudaram a lixar minhas amostras e pintá-las com esmalte... que tortura...

À Daniela que me ajudou em tudo o que pode... obrigada Dani.

À UFABC- SBC e a Central Experimental Multiusuários pela estrutura oferecida.

Ao Laboratório de Materiais Vítreos (LaMaV) da UFSCar pelo fornecimento de Biosilicato<sup>®</sup>.

À FAPESP (projeto número 2017/21887-4) pelo auxílio financeiro.

Ao IPEN-CNEN/SP pelas irradiações das amostras para simulação da radioterapia *in vitro*.

Ao Programa Nacional de Cooperação Acadêmica (PROCAD-CAPES edital 071/2013-88881.068505/2014-01) pelo auxílio financeiro.

Ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Fotônica (INFO, CNPq INCT #465763/2014-6) pelo apoio auxílio financeiro.

A todos que aqui não foram mencionados, mas que contribuíram para esta pesquisa, o meu muito obrigada.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

## Sumário

<b>Resumo</b> .....	9
<b>Abstract</b> .....	10
1. Introdução e justificativa .....	10
2. Objetivos.....	14
3. Revisão de literatura .....	15
3.1. Radioterapia - conceitos e doses em Câncer de Cabeça e Pescoço .....	15
3.2. Efeitos da radioterapia na dentina .....	19
3.3. Cárie de radiação .....	22
3.4. Lasers em alta intensidade e ação na prevenção da cárie radicular .....	24
3.5. Cerâmicas bioativas e Biosilicato® – definições, uso na odontologia e no manejo de lesões de cárie .....	27
3.6. A irradiação laser em alta intensidade e sua associação com vidros bioativos .....	29
3.7. Técnicas para análise dos efeitos de diferentes tratamentos na dentina. ....	30
3.7.1. Espectroscopia de absorção no infravermelho por transformada de Fourier - FTIR .....	30
3.7.2. Difração de raios X (DRX).....	32
4. Material e Método .....	35
4.1. Delineamento experimental.....	35
4.2. Preparo de amostras.....	37
4.3. Simulação da radioterapia <i>in vitro</i> .....	37
4.4. Indução de lesão incipiente de cárie após radioterapia.....	38
<b>4.5. Tratamentos propostos para impedir a progressão das lesões de cárie</b> .....	38
<b>4.5.1. Tratamento com Biosilicato®</b> .....	40
<b>4.5.2. Irradiação laser</b> .....	40
4.6. Análise das mudanças composicionais da superfície da dentina.....	41
4.7 Análise morfológica .....	42
4.8. Avaliação das mudanças de pH das soluções de saliva artificial decorrentes dos tratamentos .....	44
4.9. Avaliação das mudanças induzidas pela irradiação laser no Biosilicato® por difração de raios X.....	44

4.10. Análise estatística .....	45
5. Resultados e discussão .....	46
5.1. Análise composicional da dentina decorrente da radioterapia e indução de cárie artificial.....	46
5.2 Análise morfológica da dentina decorrente da radioterapia e indução de cárie artificial .....	51
5.3. Análise composicional da dentina após radioterapia, cárie e tratamentos propostos ....	53
5.4. Análise morfológica da dentina após radioterapia, cárie e tratamentos propostos.....	72
5.5. Análise das alterações de pH nas soluções de saliva artificial .....	84
5.6. Análise dos efeitos da irradiação laser sobre o Biosilicato® por difração de raios X (DRX).....	87
6. Conclusões.....	92
7. Referências bibliográficas .....	93



## Resumo

Um dos efeitos colaterais da radioterapia da região de cabeça e pescoço é a cárie de radiação, lesão agressiva que resulta rapidamente na perda dos dentes. A irradiação laser tem mostrado importante potencial preventivo, mas não há estudos que avaliem a associação da irradiação laser com material bioativo para paralisação de lesões de cárie após radioterapia. Este estudo avaliou as mudanças químicas e morfológicas da dentina radicular submetida à radioterapia e ao processo de cárie, assim como após a irradiação com laser de Nd:YAG *Q-switched* associado ou não ao Biosilicato®, buscando-se determinar o melhor veículo para o biomaterial, assim como o momento ideal para associação com a irradiação laser. Foi conduzido um estudo *in vitro* cego randomizado no qual 80 blocos de dentina radicular bovina foram submetidos a um processo de radioterapia simulada (Co-60, 2 Gy/dia, 30 dias) e, após, tiveram indução de lesão incipiente de cárie por 32h. As alterações composicionais e morfológicas nas amostras foram avaliadas por espectroscopia de absorção no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) e microscopia eletrônica de varredura (MEV). Posteriormente, as amostras foram aleatoriamente distribuídas em 8 grupos, nos quais houve a aplicação do Biosilicato®, veiculado em água Milli-Q ou em soro fetal bovino (SFB), seguida ou não da irradiação com laser de Nd:YAG (*Q-switched*, 1064 nm, 5 ns, 250 mJ) imediatamente ou após 24h da aplicação do biomaterial. Após, todas as amostras foram imersas em saliva artificial e avaliadas por FTIR e MEV após 48h e 7 dias. O pH da saliva artificial foi monitorado nos mesmos períodos. Adicionalmente, a análise de difração de raios-X foi efetuada em pasta de Biosilicato® seguida ou não da irradiação laser. A análise estatística foi efetuada ao nível de significância de 5%. A radioterapia alterou a proporção de amida 2 sobre fosfato e obliterou os túbulos dentinários, assim como a lesão de cárie promoveu maior exposição de material orgânico e abertura dos túbulos. Detectou-se maior formação de apatita, recobrimento da matriz orgânica e obliteração dos túbulos dentinários quando o Biosilicato® foi veiculado em SFB. A irradiação laser alterou a composição e morfologia da dentina e, quando efetuada 24 h após aplicação do Biosilicato®, promoveu a presença da fase de fosfato de sódio e cálcio, auxiliando na maior conversão para apatita. A associação de tratamentos é promissora para remineralização de lesões de cárie radiculares oriundas de radioterapia, sendo a melhor estratégia de tratamento a irradiação laser efetuada 24h após aplicação de Biosilicato® veiculado em SFB sobre a dentina desmineralizada.

**Palavras chave:** *Laser* em alta intensidade, lasers de pulsos curtos, Biosilicato®, cárie, dentina, prevenção, radioterapia.

## Abstract

One of the side effects of head and neck radiotherapy is radiation-related caries, an aggressive injury that quickly results in tooth loss. Laser irradiation has shown an important preventive potential, but there are no studies that evaluate the association of laser irradiation with bioactive material for preventing caries lesions after radiotherapy. This study evaluated the chemical and morphological changes of root dentin submitted to radiotherapy and caries process, as well as after *Q-switched* Nd:YAG laser irradiation associated or not with Biosilicate®, aiming to determine the best vehicle for biomaterial, as well as the ideal time for association with laser irradiation. A randomized blinded *in vitro* study was conducted in which 80 bovine root dentin slabs were submitted to a simulated radiotherapy process (Co-60, 2 Gy/day, 30 days) and, afterwards, induction of incipient caries lesion for 32h. The compositional and morphological changes in samples were evaluated by Fourier transformed infrared spectroscopy (FTIR) and scanning electron microscopy (SEM). Subsequently, the samples were randomly distributed into 8 groups, in which Biosilicate® was applied, either in Milli-Q water or fetal bovine serum (SBF), followed or not by Nd:YAG laser irradiation (*Q-switched*, 1064 nm, 5 ns, 250 mJ) immediately or after 24 hours of biomaterial application. Afterwards, all samples were immersed in artificial saliva and evaluated by FTIR and SEM after 48h and 7 days. The pH of artificial saliva was monitored over the same periods. Additionally, X-ray diffraction analysis was performed on Biosilicate® tablets which were treated or not by laser irradiation. Statistical analysis was performed at a significance level of 5%. Radiotherapy changed the proportion of amide 2 to phosphate and obliterated the dentinal tubules, just as caries lesion promoted greater exposure of organic material and opening of the tubules. Biosilicate® promoted greater formation of apatite, the covering of the organic matrix and the obliteration of dentinal tubules when conveyed in SBF. Laser irradiation altered the composition and morphology of dentin and, when performed after application of Biosilicate®, promoted the presence of sodium and calcium phosphate phase, helping in the greater conversion to apatite. It was concluded that the combination of treatments is promising for remineralization of radiation-related caries. The best treatment strategy seems to be the laser irradiation 24h after application of Biosilicate® carried in SBF on demineralized dentin.

**Key words:** High-intensity infrared laser, short pulse laser, Biosilicate®, caries, dentin, prevention, radiotherapy.

## 1. Introdução e justificativa

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado (maligno) de células, que invadem tecidos e órgãos, podendo espalhar-se (metástase) para outras regiões do corpo<sup>1</sup>. Com base no documento World Cancer Report 2014 da Internacional Agency for Research on Cancer (IARC), da Organização Mundial de Saúde, é inquestionável que o Câncer é um problema de saúde pública, especialmente entre os países em desenvolvimento, onde é esperado que, nas próximas décadas, o impacto do câncer na população corresponderá a 80% dos mais de 20 milhões de novos casos estimados para 2025. No Brasil o câncer também alcançou uma grande magnitude. Estima-se que entre 2020-2022 aponta-se a ocorrência de cerca de 625 mil casos novos por ano do triênio. Excetuando-se o câncer de pele não melanoma (aproximadamente 177 mil casos novos), ocorrerão cerca de 420 mil novos casos de câncer. O perfil observado do povo brasileiro assemelha-se ao da América Latina e do Caribe<sup>2</sup>.

Em razão de sua significativa incidência, prevalência e mortalidade, o câncer de cabeça e pescoço é considerado um dos principais tumores no Brasil e no mundo<sup>8</sup>. O câncer de cabeça e pescoço representa aproximadamente 5% de todas as neoplasias e atinge cerca de 1,7% da população brasileira, correspondendo a um grupo grande e heterogêneo de tumores localizados na pele, lábios, cavidade oral, faringe, laringe, glândulas salivares, cavidade nasal e seios paranasais, meato acústico externo e ouvido médio. O câncer de cabeça e pescoço (CCP) acomete ambos os sexos e todas as raças, sendo até 3 a 4 vezes mais frequentes em homens que em mulheres e mais comuns em negros e asiáticos. A incidência do CCP aumenta com a idade e sua ocorrência é maior em pessoas acima de 50 anos. O aumento da sua incidência em mulheres foi observado nos últimos anos e é atribuído ao aumento do tabagismo e etilismo entre elas<sup>3</sup>. A literatura<sup>4</sup> demonstra que os principais fatores que estão associados ao CCP são o consumo de bebidas alcoólicas e tabaco, havendo um efeito de colaboração pelo uso frequente de ambos. A associação dos produtos ao longo do tempo e o hábito constante de sua utilização se tornam fatores de risco e é demonstrado na literatura<sup>4</sup>. O tabagismo ainda é o principal fator associado ao desenvolvimento do CCP, apresentado com grande frequência em pacientes com histórico de sua utilização, estando amplamente associado principalmente ao câncer de laringe e assoalho da boca<sup>3</sup>.

Outros fatores implicados na carcinogênese do CCP são viroses, principalmente no câncer da laringe e da rinofaringe (vírus de Epstein – Barr); exposições ocupacionais nas

refinarias de níquel, marcenarias e fábricas de artigos de couro e trabalhos em minas de asbestos. A exposição à radiação ionizante e a exposição solar se mostram extremamente importantes principalmente no câncer de lábios e câncer de pele localizada em região de cabeça e pescoço. Fatores dietéticos também estão relacionados ao aparecimento do CCP, quando se observa que a carência de vitamina A e carotenoides propicia o aparecimento destes tumores. A suscetibilidade genética também deve ser considerada um possível fator, isolada ou associada ao tabagismo, podendo manifestar-se na forma de síndrome de suscetibilidade ao câncer claramente definidas, defeitos de reparo do DNA, alterações da capacidade de metabolização do carcinógeno ou alterações nas respostas imunológicas do hospedeiro<sup>3</sup>. Neste contexto, o câncer oral assume um importante papel, mesmo não sendo um tumor de fácil identificação, com lesões nem tanto visíveis e definidas, ainda ocupa um lugar de destaque onde corresponde a cerca de 30% de todos os tumores de cabeça e pescoço<sup>2</sup>. Sua elevada mortalidade e morbidade se dão pelo diagnóstico tardio da doença, assim como pela dificuldade em se fazê-lo<sup>2</sup>.

O Câncer oral é um subgrupo das neoplasias de cabeça e pescoço que, de acordo com os códigos da Classificação Internacional das Doenças versão 9 (International Classification of Diseases – ICD), desenvolve-se em várias regiões da cavidade oral, representadas pelos seguintes códigos: (140) lábios, (141) língua, (143) gengiva, (144) assoalho da boca e (145) outros locais não específicos. As principais glândulas salivares (142), orofaringe (146) e nasofaringe (147) não são incluídas<sup>5</sup>. A causa do carcinoma oral é multifatorial, onde vários agentes ou fatores etiológicos atuam em conjunto para o aparecimento do mesmo<sup>6</sup>. Associados ao aparecimento do Câncer Oral, os fatores de risco que aparecem com maior incidência são o fumo, radiação ultravioleta e álcool, e ou até mesmo como casos de desnutrição geral. Além disto, alguns pacientes desenvolveram carcinoma oral sem qualquer utilização ou exposição ao álcool e tabaco. Neste caso sugere-se que fatores adicionais podem tornar os indivíduos mais suscetíveis como: alterações imunológicas, fatores genéticos, histórico familiar de câncer de cabeça e pescoço na família e dieta alimentar<sup>7, 8</sup>.

Na literatura<sup>4</sup> observa-se a associação entre as condições socioeconômicas e a falta de tratamento adequado da doença. A falta de tratamento correto causa um impacto negativo ao paciente sobre a qualidade de vida e imagem do corpo que se associa à depressão, ansiedade e isolamento, além disso, associa-se à diminuição significativa da função oral<sup>4</sup>.

Para o tratamento do câncer da cavidade oral, a radioterapia associada com a quimioterapia e cirurgia são as principais modalidades de tratamento devido seu poder de controlar e dar uma sobrevida maior ao paciente com esta patologia. Sendo assim, efeitos

secundários das terapias citadas para o tratamento do câncer oral são comuns no tratamento, durante e após como: mucosite, radiodermite, xerostomia, hipossalivação crônica, cárie de radiação e a osteorradionecrose<sup>9</sup>. Dentre os efeitos secundários associados às terapias citadas vamos tratar a cárie de radiação. O uso da terapia para pacientes com câncer oral melhora o controle local da doença e sobrevida em geral, porém o uso da mesma está associado ao aumento agudo e efeitos que resultam em uma carga de sintomas e diminuição da qualidade de vida do paciente<sup>10</sup>.

Xerostomia (o sintoma de boca seca) e hipossalivação (fluxo salivar diminuído), estão entre os efeitos colaterais mais comuns com a utilização da terapia de radiação, que não só danifica as células com divisões errôneas, mas também as células normais, não as diferenciando. Pacientes com hipossalivação aguda apresentam frequentemente a perda da dentição, uma vez que a saliva é fundamental para a manutenção dos tecidos bucais e, desta forma, pacientes com perda de fluxo salivar, em decorrência da radioterapia, tendem a desenvolver, dentre outras alterações, uma alta atividade de cárie<sup>11</sup>.

A Cárie de Radiação é uma doença complexa e destrutiva com origens diversas. Efeitos diretos como a radiação podem destruir o esmalte e a dentina em pacientes de câncer oral e efeitos indiretos, como higiene bucal e dieta cariogênica, são também fatores que contribuem para sua piora<sup>12</sup>. A cárie de radiação pode surgir de 3 a 12 semanas após a radioterapia, se caracterizando por ser um processo rápido e ser altamente destrutivo, citando ainda que os componentes orgânicos e inorgânicos dos dentes podem sofrer alterações devido à utilização da radiação, tornando-os mais susceptíveis ao processo cariioso<sup>13</sup>. Acomete, inicialmente, as regiões cervicais dos dentes e pode atingir as regiões planas, uma vez que alterações na saliva impedem o desempenho de sua função tampão<sup>12</sup>.

Desta forma, é fundamental que o paciente adote medidas profiláticas, antes de ser tratado com a radioterapia, a fim de prevenir a doença. Sendo assim, uma vez manifesto, o tratamento deste tipo de cárie pode configurar um verdadeiro desafio odontológico devido à gravidade das lesões e alterações no ambiente oral provocada pela radiação, que ainda pode favorecer infecções oportunistas<sup>9</sup>. Estudos comprovam que a utilização de fluoreto, sob as mais diversas formas, tem tido um resultado favorável para a diminuição do surgimento de lesões de cáries, assim possibilitando a paralização das lesões incipientes<sup>14, 15, 16</sup>. Porém, a existência de pessoas que não possuem acesso à água e produtos fluoretados, doentes e com dificuldades de higienização e locomoção ressalta a necessidade de se aperfeiçoar o que se tem de preventivos existentes nos dias atuais<sup>17</sup>.

Dentro deste contexto geral, a irradiação *laser* tem sido bastante aprofundada para a

finalidade preventiva, considerando sua importante interação com os tecidos duros dentais<sup>17</sup>. Os *lasers* em alta intensidade, por seu efeito térmico, podem promover modificações químico-estruturais nos tecidos irradiados, ao qual depende tanto da temperatura superficial atingida quanto ao tempo de exposição dos tecidos à irradiação<sup>18</sup>. Quando associados ao fluoreto, estudos anteriores<sup>14,15,19</sup> demonstram que a utilização da irradiação *laser* pode reduzir significativamente a progressão da lesão de cárie<sup>16</sup>.

Os odontologistas, no que diz respeito à cárie de radiação, atualmente empregam a profilaxia com flúor<sup>20, 21</sup>; contudo, trata-se de um método que requer múltiplas repetições do tratamento<sup>20</sup>. Assim sendo, cerâmicas bioativas e *lasers* apresentam-se como viável e atrativa para prevenção das lesões de cárie de radiação.

Em relação ao *laser*, podemos dizer que são utilizados desde a preparação cavitária até a descontaminação, retirada e prevenção da cárie<sup>22</sup>. A irradiação *laser* provoca modificações cristalográficas e nos tecidos dentais modificam sua formação estrutural as quais atrapalham o desenvolvimento da cárie<sup>23</sup>. Por sua vez as cerâmicas bioativas englobam vidros e vitrocerâmicas que são preparados para se ligar quimicamente ao osso ao produzir uma camada de hidroxiapatita carbonatada na interface do biomaterial/tecido e, portanto, pode promover uma regeneração tecidual<sup>24, 25, 26, 27, 28</sup>. O Biosilicato<sup>®</sup> vem sendo aplicado com sucesso na odontologia no tratamento de hipersensibilidade dentinária<sup>29, 30</sup> e na remineralização de lesões que foram ocasionadas por cárie ou por erosão<sup>31, 32, 33</sup>.

Considerando o exposto, a associação das terapias (irradiação laser e aplicação de Biosilicato<sup>®</sup>) poderia exercer um maior efeito benéfico para paralisação da cárie de radiação, o que ainda não foi estudado. Desta maneira, este estudo foi proposto.

## **2. Objetivos**

### **2.1. Objetivo geral**

Este estudo objetivou avaliar as mudanças químicas e morfológicas da dentina radicular submetida à radioterapia e ao processo de cárie, assim como após a irradiação com laser de Nd:YAG *Q-switched* associado ou não ao Biosilicato®, buscando-se determinar o melhor veículo para o biomaterial, assim como o momento ideal para associação com a irradiação laser.

### **2.2. Objetivos específicos**

1 - Avaliar as mudanças composicionais e morfológicas na dentina radicular promovidas pela radioterapia simulada *in vitro* e seus efeitos na indução de lesão incipiente de cárie;

2 - Avaliar as mudanças composicionais e morfológicas promovidas pelo Biosilicato® sobre a dentina desmineralizada quando aplicado empregando-se dois veículos diferentes (água Milli-Q e soro fetal bovino), buscando-se predizer seu uso para prevenção da progressão de lesões de cárie de radiação;

3 - Avaliar os efeitos da irradiação com laser de Nd:YAG de pulsos curtos sobre a dentina cariada após radioterapia simulada *in vitro* e sobre o Biosilicato®, buscando-se determinar o melhor momento de associação das duas técnicas.

### 3. Revisão de literatura

#### 3.1. Radioterapia - conceitos e doses em Câncer de Cabeça e Pescoço

Câncer é a denominação dada a um agrupamento de mais de 100 patologias que têm em conjunto o crescimento desordenado de células que envolvem tecidos e órgãos (referência). Dentro destas patologias, tem-se o câncer de cabeça e pescoço (CCP), cuja prevalência vem aumentando em todo o mundo. De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA), no Brasil, no ano de 2018, as taxas em homens correspondem a 11.200 novos casos por ano, tendo uma incidência de 5,2% na população geral e em mulheres 3.500 novos casos no ano e tendo uma incidência de 1,7%<sup>34</sup>.

A etiologia da doença é diversa, podendo ser ocasionada por fatores internos ou externos, estando ambos inter-relacionados. Os causadores externos associam-se ao meio ambiente e costumes individuais e/ou sociais e culturais como, por exemplo, o consumo de álcool e tabaco<sup>35,36,37,38,39,40</sup>. Os causadores internos, na maioria das vezes geneticamente pré-determinados, são pertencentes à capacidade do organismo de se proteger de agressões externas. Estes fatos podem relacionar-se, aumentando a possibilidade de transformações malignas nas células normais. Dos casos de câncer apresentados e conhecidos, 80 a 90% estão relacionados a fatores ambientais<sup>34</sup>.

A incidência do câncer de cabeça e pescoço aumenta com a idade, sendo o carcinoma de células escamosas o tipo mais constante presente em 90% dos casos, com episódios aproximadamente em 40% na cavidade bucal, 25% na laringe e 15% na faringe<sup>41</sup>. O restante dos casos relatados ocorre, por exemplo, nas glândulas salivares. Os demais tipos de câncer, como da face, tireoide e cérebro, não são convencionalmente inclusos no termo “câncer de cabeça e pescoço”<sup>42</sup>.

O tratamento desta patologia (CCP) costumeiramente envolve radioterapia, quimioterapia, cirurgia ou uma junção destas modalidades<sup>35, 43</sup>. A radioterapia é uma modalidade de tratamento que utiliza radiação ionizante como agente terapêutico<sup>44,45</sup>. Este tratamento é grandemente utilizado para o tratamento do câncer de cabeça e pescoço como terapia primária, auxiliar ao tratamento cirúrgico e à quimioterapia, ou como tratamento paliativo em estágios finais ou inoperáveis da doença<sup>44,45</sup>.

Ainda que a radioterapia possa aumentar as taxas de cura da doença, os pacientes irradiados na região da cabeça e pescoço são passíveis a sequelas na cavidade bucal, que



incluem as seguintes ocorrências: xerostomia, mucosite, perda do paladar, perda progressiva do ligamento periodontal, alterações microvasculares, necrose dos tecidos moles, osteoradionecrose e cárie dental, também denominada, aqui, de cárie de radiação por sua etiologia<sup>46,47,48,49</sup>.

De acordo com a literatura<sup>48,50,51,52,53</sup>, os efeitos indiretos da radiação, que seriam alterações na quantidade e qualidade da saliva, impedimento em realizar a higiene bucal correta em decorrência do aparecimento de mucosites e da rigidez muscular, aumento do consumo de alimentos cariogênicos e mudanças microbiota bucal, são uns dos principais fatores causadores da cárie de radiação. Esta, por sua vez, ocasiona rigorosa destruição da dentina e do esmalte de dentes de pacientes acometidos a radioterapia de cabeça e pescoço.

Para demonstrar a quantidade absorvida de radiação pelos tecidos, foi definida inicialmente uma unidade internacional, o rad (*radiation absorbed dose*), o que significa a diferença entre a radiação empregada e a que atravessou os tecidos. Posteriormente, esta unidade foi substituída pelo Gray, determinado como 1 Joule por quilograma. O Gray é abreviado como Gy, sendo que:  $1\text{Gy} = 100\text{ cGy} = 100\text{ rad}$ <sup>54,55</sup>. A radioterapia pode ser fracionada em seções de curta duração até protocolos extremamente prorrogados, durante várias semanas. O argumento das aplicações em pequenas quantidades diárias tem sua demonstração nos “5 Rs” da radiobiologia: reoxigenação (oxigenar novamente), redistribuição no ciclo celular, recrutamento, repopulação e regeneração<sup>45</sup>. A maior parte dos pacientes sujeitos à radioterapia recebe doses fracionadas em um período de mais ou menos 5-7 semanas, uma vez por semana, com dose diária de, aproximadamente,  $2\text{Gy}$ <sup>39</sup>.

Objetivando esclarecer outros fatores que poderiam predispor os pacientes tratados com radioterapia de cabeça e pescoço à maior susceptibilidade ao surgimento da cárie de radiação, estudos foram executados a fim de pesquisar as causas diretas da radiação na estrutura dental, mas com resultados controversos. Desta forma, Jansma *et al.*<sup>50</sup> (1990), Kielbassa *et al.*<sup>57</sup> (1999; 2000), Kielbassa<sup>58</sup> (2000) e Silva *et al.*<sup>53</sup>(2009) averiguaram que a radiação não é capaz de ocasionar alterações nas estruturas dos dentes permanentes.

Em 1990, Jansma *et al.*<sup>50</sup> analisaram a consequência da irradiação terapêutica (dose de  $2\text{Gy}$ , duas vezes ao dia, total de  $72\text{Gy}$ ) na penetrabilidade do esmalte dental bovino, por meio de difusão de radioisótipo. Foi observado que não ocorreu nenhuma alteração na permeabilidade dos dentes irradiados.

No ano de 1999 foi publicado um estudo *in situ*<sup>57</sup> que determina a correlação entre os resultados das microrradiografias de lesões de cáries induzidas e microdureza, em esmalte humano irradiado com doses de  $60\text{ Gy}$ . Os autores observaram que as microrradiografias e a

microdureza não apresentaram diferença significativa na comparação entre as lesões de cárie oriundas de dentes irradiados e não irradiados e, desta forma, concluíram que o esmalte irradiado não é mais propenso à carie que o não irradiado, desde que os métodos adequados de higiene bucal sejam adotados.

Em 2000, Kielbassa *et al.*<sup>57, 58</sup> acompanharam, *in situ*, o processo da desmineralização do esmalte dental humano irradiado com 60 Gy e não irradiado, durante 6 semanas. Observaram que os efeitos diretos da irradiação no esmalte dental não são os maiores responsáveis pelo início da desmineralização que ocorre sob condições clínicas, e que o início das lesões de cárie em esmalte irradiado pode ser contido por correta higiene bucal. Ainda em 2000, Kielbassa *et al.*<sup>51</sup> avaliaram, *in situ*, a desmineralização inicial da dentina humana irradiada e não irradiada com doses de 60 Gy, durante 5 semanas. Os autores observaram a inexistência de diferenças significantes em relação à perda de mineral e profundidade da lesão de cárie entre os dentes irradiados e não irradiados, sendo esta diferença verificada apenas entre os espécimes não escovados e escovados. Por fim, a dentina de dentes irradiados não se tornou mais propensa à cárie, em comparação à dos dentes não irradiados, quando sujeita adequadamente à higiene bucal.

Silva *et al.*, em 2009<sup>53</sup>, analisaram os padrões de desmineralização das lesões de cárie de pacientes irradiados e averiguaram que lesões de cárie que ocorrem nas regiões cervical e incisal foram amplamente observadas. Descoloração na cor marrom difusa da superfície do esmalte foi observada constantemente e as análises por microscopia de luz polarizada sugeriram que essas áreas fossem pertinentes a lesões de cárie incipientes. Foi concluído que a lesão da cárie de radiação tem a mesma morfologia e padrão que as não relacionadas à irradiação, com a existência de dentina mineralizada, zona translúcida, dentina reacional, dentina terciária e deposição de dentina intertubular.

Por outro lado, demais estudos conduzidos com dentes permanentes humanos e em dentes bovinos<sup>54,55,56,57,58</sup> demonstraram que a irradiação causa efeitos diretos sobre a estrutura dental, os quais fazem parte da patologia da cárie de radiação. Springer *et al.*<sup>59</sup>, em 2005, analisaram a mensuração de proteínas (hidroxilisilpirinolina e lisipiridinolina), as quais são dois tipos de reações cruzadas não reduzidas no colágeno maduro que aumentam quando acontece a destruição do colágeno por irradiação (6,3 Gy/dia, por 5 dias). Tais autores observaram que a irradiação causou danos diretos sobre o colágeno do tecido pulpar. Entretanto, não observaram alterações mensuráveis do componente colágeno nos tecidos mineralizados e creditaram esse fato à concentração relativamente baixa destas proteínas no esmalte e na dentina.

No ano de 2007<sup>60</sup>, foi publicada uma avaliação *in vitro* sobre o dano direto e imediato ao colágeno, como consequência direta da irradiação com dose de 60 Gy, em tecido ósseo, periósteo e pele de mandíbulas de porcos, em comparação a mandíbulas não irradiadas. Os tipos de colágeno foram caracterizados por eletroforese em gel de poliacrilamida e a maturação das fibras determinada pela quantidade de ligações cruzadas hidroxilisilpirinolina (HP) e lisilpiridilina (LP) avaliadas por meio de cromatografia líquida de alta performance (HPLC). A mensuração da quantidade de hidroxiprolina (Hyp) foi utilizada para determinar a razão entre quantidade de fragmentos de colágeno nas amostras irradiadas comparado às amostras não irradiadas. As concentrações de HP, LP e Hyp no grupo irradiado encontraram-se marcadamente aumentadas. Foi também demonstrada a presença de colágeno I e IV no osso não irradiado, I e III na pele não irradiada, e no I no periósteo não irradiado. Nas amostras irradiadas, bandas difusas demonstraram a fragmentação da molécula de colágeno. O aumento da concentração de HP, LP e Hyp no ultrafiltrado indicaram o aumento da concentração de colágeno desnaturado, demonstrando o dano direto e imediato da irradiação sobre o colágeno<sup>61</sup>.

Soares *et al.* (2010)<sup>62</sup> estudaram o efeito da irradiação gama sobre a resistência à tração do esmalte e da dentina em dentes permanentes, em relação à orientação dos prismas, dos túbulos dentários e localização dos mesmos na dentina. Quarenta terceiros molares humanos permanentes foram usados, metade dos quais foram submetidos a 60 Gy de irradiação gama, sendo 2 Gy/dia e avaliados por meio de testes de microtração. Os resultados demonstraram que o tratamento com irradiação diminuiu significativamente a resistência à tração da dentina radicular e coronária do esmalte, a respeito da orientação dos túbulos e dos prismas. Entretanto, quando os dentes foram irradiados, não houve influência da orientação dos túbulos, demonstrando que a irradiação é mais danosa aos componentes orgânicos que os inorgânicos.

Em 2011, Soares *et al.*<sup>61</sup> realizaram um estudo *in vitro*, com o objetivo de avaliar se diferentes protocolos de enxagatários bucais seriam capazes de prevenir os problemas causados pela radioterapia com irradiação gama, em relação à resistência à tração do esmalte e da dentina. Cento e vinte e três dentes foram divididos em dois grupos: irradiados (submetidos a 60 Gy de irradiação gama, em incrementos diários de 2 Gy) e não-irradiados. Os resultados apontaram que a radiação gama diminuiu significativamente a resistência à tração do esmalte e da dentina coronária e radicular. Alterações macromoleculares foram sugeridas na dentina. Modificações estruturais em ambos os substratos foram detectados por microscopia eletrônica de varredura. Bochechos com clorexidina a 0,12% preveniram

parcialmente os problemas relacionados às propriedades mecânicas da dentina coronária irradiada, enquanto o fluoreto de sódio a 0,05% ocasionou similaridade no teste de resistência à tração para o esmalte irradiado e o não irradiado.

Conforme descrito acima, os mecanismos envolvidos no aparecimento da cárie dental pós-radioterapia na região da cabeça e pescoço continuam controversos. Por um momento este mecanismo é imputado em efeitos indiretos da radioterapia, que remetem a alterações salivares, pioras de higiene bucal, consumo considerável de alimentos cariogênicos e modificações na microbiota bucal. Em outro momento, os mecanismos são atribuídos aos efeitos diretos da radiação, os quais acarretam alterações na estrutura e na composição química do esmalte e da dentina. Estes efeitos são ainda mais desconhecidos na dentina de dentes decíduos, uma vez que a maioria dos trabalhos publicados foram realizados em dentes permanentes humanos ou dentes bovinos<sup>63</sup>.

### **3.2. Efeitos da radioterapia na dentina**

Para se compreender melhor a cárie de radiação se faz necessário o conhecimento anatômico e histológico da estrutura dentária. Os tecidos mineralizados ou duros do corpo humano, sendo eles tecido ósseo, cemento, dentina e esmalte, estão relacionados ao dente<sup>64</sup> conforme demonstrado na Figura 1. Anatomicamente, o dente é fracionado em coroa, onde se localiza a parte mais externa e visível, e raiz, a extensão encoberta que o prende a um conjunto de estruturas de suporte, as quais compõem em osso alveolar, ligamento periodontal e cemento, os quais se encontram cobertos pela gengiva<sup>64</sup>.

Histologicamente, o órgão dental é composto de tecidos especializados: esmalte, dentina, cemento e polpa. O esmalte se constitui como uma proteção em forma de cobertura para a coroa dentária, sendo altamente mineralizado, com uma característica dura e friável, além de avascular, inerte e acelular<sup>64</sup>.

Figura 1 – Esquema da estrutura do dente e tecidos envolvidos.



Fonte: Faculdade de Odontologia da USP – Disponível em: <http://www.fo.usp.br><sup>68</sup>

Embora a dentina e a polpa sejam tecidos histologicamente distintos, normalmente são consideradas como uma única entidade. Isto ocorre porque estes tecidos estão intimamente relacionados, devido à estrutura tubular da dentina. Os prolongamentos dos odontoblastos, células constituintes da polpa, estão contidos nos túbulos dentinários. Além disso, o movimento do fluido dentinário, presente nos túbulos da dentina, é capaz de estimular receptores de dor presentes na polpa<sup>64</sup>.

O cemento por sua vez é um tecido conjuntivo mineralizado que recobre a dentina radicular possuindo como principal função a inserção de fibras de ligamento periodontal na raiz do dente, sendo que uma vez depositado sobre a dentina radicular, sofre mineralização, aderindo-se firmemente a mesma<sup>64</sup>.

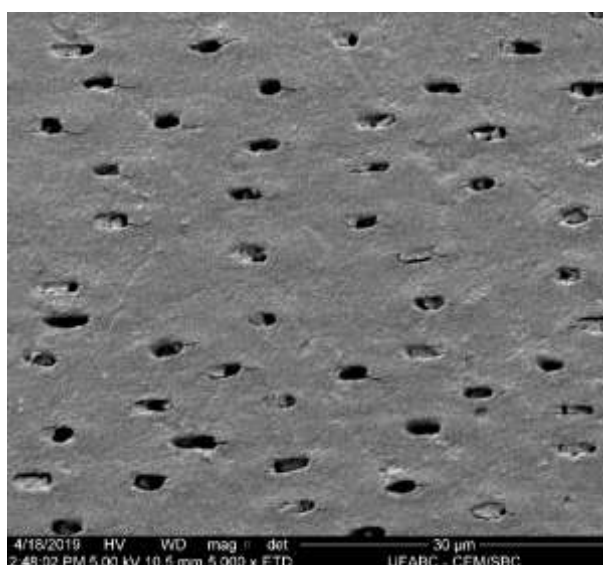
O órgão dental sofre danos em suas estruturas quando a radioterapia é aplicada na região de cabeça e pescoço, pois são acarretadas mudanças físicas e químicas nos dentes. Como alteração das propriedades mecânicas, pode-se descrever a alteração na microdureza superficial<sup>65, 66</sup>, resistência à tração e resistência à fratura<sup>67</sup>.

Em relação aos danos causados de forma direta na composição química dos dentes, há uma diminuição da interação entre os componentes orgânicos e os cristais de hidroxiapatita do esmalte e da dentina, o que também fundamenta a fragilidade do dente frente ao acometimento da cárie de radiação<sup>69</sup>. Sendo assim, a redução do colágeno tipo IV em dentes

submetidos à radioterapia pode representar um mecanismo de instabilidade da junção amelodentinária (região de interface entre esmalte e dentina), uma vez que a mesma protege a polpa e sustenta o esmalte dentário<sup>70</sup>. Além desta situação, conforme se aumenta a dose de radiação, há o aumento também das alterações morfológicas na região interprismática do esmalte, sendo que na dentina há fragmentação das fibras colágenas, juntamente com a presença de fissuras e obliteração dos túbulos dentinários<sup>71</sup>.

Desse modo, o entendimento da composição química da dentina é extremamente relevante para melhor entender os efeitos da radioterapia sobre este tecido. A dentina é um tecido de origem mesenquimal, constitui o corpo do dente e tem as principais funções de preservar a polpa e dar base para o esmalte sobrejacente. A dentina madura é composta de, aproximadamente, 70% mineral, 20% de matriz orgânica e 10% de água. Seu componente inorgânico consiste em hidroxiapatita e a parte orgânica é essencialmente colágeno, que possibilita a resiliência necessária para a coroa suportar o ato mastigatório. As estruturas organizacionais da dentina são os túbulos dentinários, com diâmetro médio de 2,0 a 3,2 $\mu$ m que abrigam os prolongamentos citoplasmáticos dos odontoblastos e são responsáveis pela transmissão dos estímulos à polpa<sup>72, 73</sup>. A Figura 2 mostra imagens de microscopia eletrônica de varredura de dentina com túbulos dentinários abertos.

Figura 2 – Imagem de microscopia eletrônica de varredura da dentina radicular bovina, evidenciando os túbulos dentinários abertos. Magnificação original: 5000X.



Fonte: Elaboração da autora, 2019.

Assim sendo, por conter um maior teor de água, a dentina é mais suscetível aos efeitos da radiação do que o esmalte<sup>71</sup>, devido aos danos às moléculas de água nela presentes promovidos pela radiação, formando radicais livres reativos, como oxigênio e peróxido de hidrogênio, que interatuam com biomoléculas e ocasionam danos celulares<sup>75</sup>. Neste processo, podem causar desnaturação dos componentes orgânicos das estruturas dentárias<sup>76</sup>. Cabe ainda descrever que a estrutura química dos dentes humanos são iguais a estrutura química dos dentes bovinos utilizados neste trabalho, sendo assim a literatura nos reporta esta utilização<sup>54,55,56,57,58</sup>.

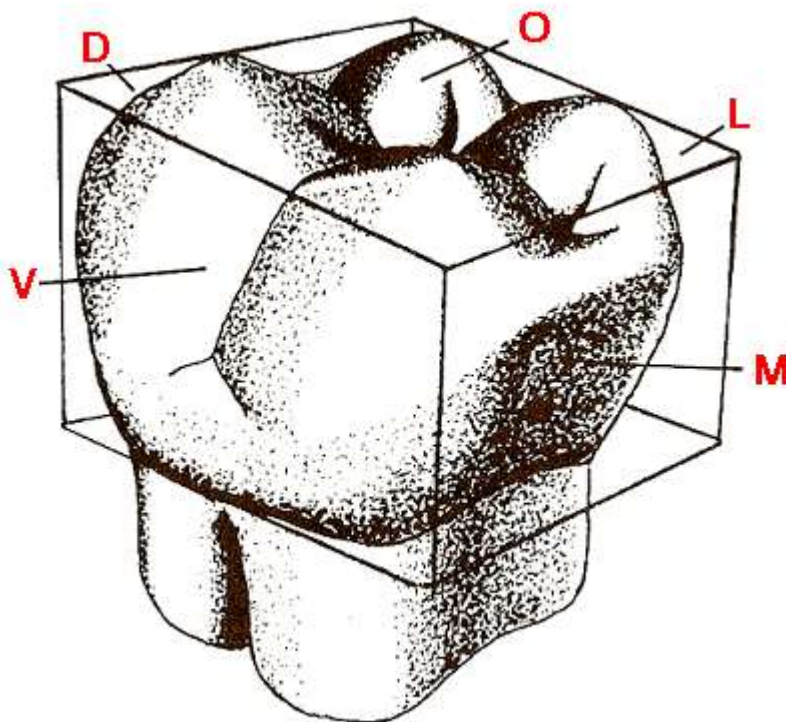
O prosseguimento de lesões de cárie acontece com uma grande regularidade nos dentes de pacientes submetidos à radioterapia<sup>77</sup>. A variação provocada na microbiota bucal, onde a placa bacteriana torna-se altamente acidogênica, leva a um aumento expressivo da quantidade de *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus*<sup>78</sup>. Estes micro-organismos, mergulhados em um meio com pH baixo e pouco fluxo salivar, devido ao dano causado pela radiação às glândulas salivares, podem promover uma desmineralização da estrutura dental. Esta desmineralização ocorre primeiramente no esmalte e, no caso da raiz do dente, se a mesma se encontrar exposta, a lesão acomete a dentina diretamente. Com a co-existência dos demais fatores ambientais para a patologia, as lesões aumentam em extensão e severidade, levando o tecido dentinário também à desmineralização. Na dentina, ocorre a perda de matriz orgânica causada pelas bactérias e enzimas proteolíticas bacterianas<sup>79</sup>. Em pacientes submetidos ao tratamento radioterápico, as lesões cariosas se desenvolvem de forma mais rigorosa e possui características específicas, as quais serão detalhadas no tópico a seguir<sup>65, 68</sup>.

### **3.3. Cárie de radiação**

A lesão de cárie induzida por radiação, também identificada como cárie de radiação, é um resultado tardio da radioterapia para tratamento de pacientes com câncer de cabeça e pescoço<sup>80</sup>. Tem como particularidade a ausência de dor aguda e aparece inicialmente em regiões normalmente resistentes à carie de indivíduos não expostos à radiação, tais como face vestibular, lingual e incisal dos dentes anteriores<sup>81,82</sup>, conforme apresentado na Figura 3. O progresso das lesões tem começo geralmente de 3 a 6 semanas após o fim do tratamento radioterápico na região da cabeça e pescoço e, quando não diagnosticados e tratados preliminarmente, costumam avançar para a destruição de todos os dentes e perda total das coroas dentárias a um curto espaço de tempo<sup>83</sup>. Fatores como nível sócio econômico e desigualdade social foram incluídos nos estudos<sup>84</sup>. Sendo assim, a cárie é, portanto, não só

um problema de saúde, mas também um problema multifatorial e com características populacionais, não sendo somente a eliminação de um microrganismo suficiente para sua eliminação<sup>85</sup>.

Figura 3 – Figura anatômica dos dentes anteriores. O dente possui 5 faces, FACE MESIAL (M) - próximo da linha média do arco dentário; FACE DISTAL (D) - mais afastado da linha média do arco dentário; FACE INCISAL - superfície dos dentes de canino a canino; FACE OCLUSAL (O) - superfície dos dentes dos pré-molares e dos molares; FACE VESTIBULAR (V) - parte de frente para os lábios; FACE LINGUAL (L) - parte voltada para língua nos dentes inferiores; FACE PALATINA - parte voltada para o palato nos dentes superiores.



Fonte: Faculdade de Odontologia da USP – Disponível em: <http://www.fo.usp.br><sup>68</sup>; acesso em: 30 de maio de 2019.

Em um artigo de revisão de literatura<sup>86</sup>, foi revelado que a prevalência de cáries em pacientes pós-radioterapia e pós-radioquimioterapia foi de 24% e 21,4%, respectivamente. Neste mesmo estudo, os autores sugeriram que o índice de dentes cariados, perdidos e obturados (CPOD) pode alcançar cerca de 17,01% nos pacientes tratados com radioterapia na região de cabeça e pescoço. Contudo, acredita-se que esses números podem diversificar



significativamente dependendo da população analisada e, essencialmente, do nível cultural e socioeconômico dos pacientes.

A lesão de cárie se inicia pelo processo fisiológico de desmineralização<sup>87, 88, 89</sup> que acontece em decorrência de diversos fatores inerentes à rotina do ambiente bucal<sup>90</sup>. Os fatos descritos a seguir são classificados como desencadeantes para as lesões de cárie, tais como a frequência de alimentação, microbiota, a baixa exposição ao flúor ou xerostomia; e protetivos, sendo eles a saliva, a insuficiente exposição ao flúor, a higiene oral correta que promova a desorganização do biofilme e a dieta com mais fibras e menos carboidratos fermentáveis<sup>91, 92</sup>.

Os fenômenos de desmineralização e remineralização são processos físico-químicos que acontecem devido à variação do pH no ambiente bucal, essencialmente no biofilme dentário afixado à superfície do dente. Em pH entre 6,7 a 5,6<sup>93</sup> acontece o início da desmineralização da dentina, com dissolução da hidroxiapatita. Neste processo, íons de cálcio e fosfato ficam livres na superfície do dente e no biofilme aderido, sendo dissolvidos na saliva, que se demonstra saturada em relação ao dente. O aumento do pH favorece o efeito tampão da saliva, fazendo que a mesma se torne supersaturada em relação ao dente: desta maneira, os íons de cálcio e fosfato voltam a se ligar no dente e, assim sendo, ocorre a remineralização<sup>87,88,94</sup>.

Além da dissolução da parte mineral, o processo de composição da lesão da cárie de radiação resulta na exposição da matriz orgânica e sua degradação por enzimas presentes nos fluídos circundantes (fluído dentinário, fluído do biofilme e saliva)<sup>93,95</sup>. Estas enzimas endógenas (metaloproteínas) são responsáveis por degradar várias matrizes de proteínas, incluindo as formas diversas do colágeno<sup>96</sup>. Estas enzimas fazem parte do processo de cárie da dentina, degradam a matriz orgânica deste tecido exposta pela desmineralização e prosseguem esse processo mesmo enquanto ocorre o processo de tamponamento da saliva<sup>96</sup>.

### **3.4. Lasers em alta intensidade e ação na prevenção da cárie radicular**

A aplicação do laser em alta intensidade demonstra-se eficaz para tratamentos em tecidos biológicos, dentre eles o esmalte e a dentina<sup>99 - 109, 111</sup>. Dentre esses tratamentos, este estudo propõe pesquisar o uso do laser em alta intensidade para a prevenção da progressão da cárie radicular após radioterapia.

O resultado preventivo do laser em alta intensidade acontece quando o tecido absorve a energia irradiada, a qual promove um efeito térmico localizado. Este efeito frequentemente é

obtido, nos tecidos duros dentais, quando se emprega a radiação com comprimento de onda na região do infravermelho<sup>104, 106, 108,109</sup>.

Sabe-se que 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 essencial que sejam empregados comprimentos de onda absorvidos pela estrutura do tecido duro dental, composta principalmente por cristais de hidroxiapatita, proteínas e água. Quanto superior for 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<sup>113, 114</sup>. Entre os lasers mais estudados, evidencia-se os lasers de CO<sub>2</sub>, Nd:YAG, Argônio, Ho:YLF, Er:YAG, Er,Cr:YSGG e de diodo<sup>115</sup>. Estudos anteriores já evidenciaram 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<sup>114,115</sup>.

A literatura demonstrou que a irradiação laser pode ser utilizada para aumentar o conteúdo mineral relativo da dentina pela ablação de proteínas e da água intrínseca desse tecido<sup>99</sup>. Ainda, pesquisadores têm verificado o acréscimo da resistência à desmineralização da dentina irradiada com diversos equipamentos de lasers. Os resultados obtidos têm demonstrado o aparecimento de fusão desse tecido (dentina) com zonas de recristalização, o que levaria à inibição do processo de desmineralização e à obliteração dos túbulos dentinários<sup>100,101, 102, 103</sup>. Contudo, estudos recentes mostraram que não é mais necessária a fusão do tecido duro para que se observe efeito preventivo, mas sim que os tecidos sejam modificados estruturalmente<sup>102, 103</sup>.

As modificações químico-estruturais nos tecidos duros dentais são provocadas pelo efeito térmico, e dependem da temperatura atingida. A matriz orgânica do esmalte e da dentina é inicialmente modificada com temperaturas entre 100 a 350 °C<sup>112</sup>, com perda de água, remoção de carbonato e desnaturação proteica. A remoção de carbonato começa a ser notada após aquecimento a 100 °C, sendo quase totalmente extinto após aquecimento a 1100 °C<sup>111</sup>. Entre 100 °C e 650 °C ocorre a oxidação de fosfato<sup>111</sup> e formação de pirofosfatos; no

entanto, a fusão da hidroxiapatita ocorre por volta de 1570 °C<sup>111</sup>. A formação de novas estruturas cristalográficas, tais como fosfato tricálcico nas fases  $\alpha$  e  $\beta$  e fosfato tetracálcico ocorre acima de 1100 °C<sup>111</sup>.

As razões exatas para a inibição de lesões de cárie na dentina irradiada também são ainda desconhecidas. Diversas hipóteses têm sido apresentadas. 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 hidroxiapatita (HAP) do esmalte normal<sup>99</sup>. Além disso, a formação de uma camada de selamento superficial dos túbulos dentinários diminuiria a difusão dos ácidos para a dentina sadia, o que reduziria a extensão da lesão de cárie<sup>100</sup>.

A ação da irradiação laser associada ao fluoreto também tem sido investigada, sugerindo que pode acontecer um efeito sinérgico de inibição da desmineralização, ocasionada pela incorporação do flúor na estrutura cristalina<sup>114</sup>. Em estudos<sup>114,115</sup> utilizando o laser de Nd:YAG na dentina, foi verificada a diminuição dos valores de microdureza da dentina hígida e consideráveis danos térmicos ao tecido. No entanto, resultados favoráveis têm sido agregados ao uso deste laser para tratamento da hipersensibilidade dentinária<sup>113</sup>. Em uma tese de doutorado<sup>102</sup> foi verificada, *in vitro*, a influência da irradiação dos lasers de CO<sub>2</sub>, Nd:YAG 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 Knoop da dentina 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 maiores 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. Nesse estudo, não foi observada sinergia entre a irradiação laser e o fluoreto, sendo que somente a associação do flúor gel aplicada previamente à irradiação foi testada.

Seria importante conceituar 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<sup>106</sup>. Portanto, essa absorção pela água e proteínas deve também ter uma importante relação com os efeitos observados e deve ser 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, o que pode resultar em maiores consequências negativas como a vaporização da subsuperfície, trincas do tecido e necrose pulpar<sup>106</sup>. Além de tudo, já foi verificado que a espessura de dentina influencia no aumento da temperatura nesse tecido e também na polpa<sup>107</sup>. Assim, parece ser necessário o uso de densidades de energia menores que as usadas para o esmalte para efeitos preventivos.

Acrescentando a estes fatos, 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<sup>108</sup> poderia caracterizar a probabilidade de obliteração dos túbulos dentinários conferindo proteção à penetração bacteriana para o complexo dentino-pulpar, o qual possivelmente apresenta sua capacidade regenerativa já diminuída devido à idade. Além do que, essa camada representaria uma superfície com microrrugosidades 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 se verificar esses efeitos.

### **3.5. Cerâmicas bioativas e Biosilicato® – definições, uso na odontologia e no manejo de lesões de cárie**

De acordo com a ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária, os biomateriais se definem por serem substâncias (materiais), excluídos os alimentos e drogas, que são utilizados em sistemas terapêuticos ou de diagnóstico em contato direto com tecidos ou fluídos biológicos. Constituem um grupo heterogêneo de compostos vivos ou inanimados, natural ou sintético e orgânico ou inorgânico. São induzidos ou colocados no corpo com o propósito de melhorar ou substituir determinada função que esteja doente, avariada ou com perda de tecido, ou ainda um órgão. Estas propriedades caracterizam a biocompatibilidade<sup>116</sup>. Os materiais são utilizados em dispositivos médicos com intenção de reação com os sistemas biológicos.

Os biomateriais obtêm sua utilização na odontologia e medicina, sendo que, na ortopedia, vários exemplares são utilizados para preenchimento e estabilização óssea<sup>117</sup>. Em geral, os biomateriais não devem estimular uma resposta negativa do tecido hospedeiro e, sendo assim, devem se assemelhar quimicamente ao mesmo. Dentre as características mais

importantes associadas a um material que deverá representar um tecido ósseo são a capacidade do material implantado de viabilizar íons para o ambiente vizinho e sua porosidade, características estas que são notadamente encontradas em um tipo especial de biomaterial: as biocerâmicas.

A primeira biocerâmica testada foi o gesso em Paris no século XIX. Os primeiros estudos tomaram como hipótese que a implantação de sais minerais de cálcio e/ou fosfato nos defeitos ósseos poderia promover a reparação óssea pelo fornecimento de minerais liberados que seriam incorporados na regeneração óssea<sup>118</sup>. As biocerâmicas compõem-se de uma farta gama de materiais, como os monocristais, policristais, vidros, vitrocerâmicas e compósitos<sup>119</sup>. As primeiras restrições de utilização das biocerâmicas estão associadas com a vida útil sob o complexo estado de tensão presente, ao qual normalmente manifesta uma lenta propagação de fadiga e trincas, situações estas que podem ocasionar fracasso nas diversas aplicações clínicas<sup>119</sup>.

Visto esta necessidade, criou-se a expressão bioatividade que foi utilizada primeiramente para descrever a competência que certas composições de vidros, desenvolvidos no final da década de 60 e começo da década de 70, têm de se unir ao tecido ósseo circundante ao implante, estimulando a formação de uma camada de HA – hidroxiapatita – em sua superfície (a HA é um fosfato de cálcio hidratado, composição majoritária de cerca de 95% da fase mineral dos dentes humanos e ossos)<sup>120</sup>. Nos dias atuais, outros materiais também podem ser bioativos, como os vidros, vitrocerâmicas da família como a HA sintética, o fosfato tricálcico sintetizado e algumas outras vitrocerâmicas também podem ser bioativas sob algumas condições de síntese<sup>120</sup>.

Por suas características ímpares já estudadas, os materiais bioativos demonstram índices de bioatividade diversos, sendo o tempo de ligação com o tecido distinto. O índice de bioatividade ( $I_a$ ) está relacionado com o tempo, em dias, para que o material tenha no mínimo 50% de ligação com o tecido. Um exemplo de bioatividade baixa é a HA (tempo médio de bioatividade de 32 dias), inferior em relação a alguns vidros e vitrocerâmicas. Exemplificando-se, o índice da bioatividade do Bioglass<sup>®</sup> 45S5 (vidro do sistema quaternário  $\text{SiO}_2 - \text{CaO} - \text{Na}_2 - \text{P}_2\text{O}_5$ ) é de 8 dias, tempo este suficiente para que 50% destes materiais estejam ligados com os tecidos, se relatados sobre as mesmas condições experimentais.

De um modo geral, maiores índices de bioatividade são observados nos materiais vítreos, porém estes mesmos materiais demonstram valores baixos nas propriedades mecânicas, sendo este um desconforto para sua ampla utilização em implantes, por exemplo. Em contrapartida, há cerâmicas e vitrocerâmicas bioativas com altas propriedades mecânicas,

porém a cristalinidade do material pode diminuir radicalmente seus índices de bioatividade<sup>119,121 e 122</sup>.

Nesta necessidade de se obter um material vitrocerâmico que mantém o índice de bioatividade alto e ainda demonstrasse propriedades mecânicas significativamente melhores em relação aos anteriores, houve a formulação do Biosilicato®, que é um biomaterial desenvolvido no LaMav – coordenado pelo professor da Universidade Federal de São Carlos, Edgar Dutra Zanotto na década de 1990 – e patenteado em 2004. O Biosilicato® é um material composto basicamente por sódio, potássio, fosforo, oxigênio e silício. Pode ser aplicado no local a ser tratado na forma de grânulo, de *scaffold*, de fibras ou como uma peça exclusiva, feita sob medida para substituir, por exemplo, ossículos do ouvido. Também pode ser aplicado sobre a dentina em pó em uma solução aquosa<sup>122</sup>. Trata-se de um material bioativo implantável e que apresenta uma evolução na área dos materiais bioativos, pois possui propriedades diferentes dos materiais disponíveis no mercado atualmente, como sua cristalinidade próxima a 100% (sua característica mais notável) e seu módulo de elasticidade mais próximo ao osso cortical. Por estas razões, este material vem se tornando um dos materiais altamente ativos mais utilizados dentre os estudos e pesquisas<sup>24</sup>.

Em sua originalidade, o Biosilicato® foi desenvolvido para o tratamento de hipersensibilidade dentinária, que também é popularmente conhecida como “dentes sensíveis”, onde a mesma atinge cerca de 17% da população brasileira<sup>24,123,124,125</sup>. Os estudos com enfoque na hipersensibilidade dentinária demonstram que cada vez mais o Biosilicato® tem potencialidade para estagnar as lesões de erosão e cáries, além de ser também utilizado como pré-tratamento com a finalidade de estabelecer a aderência de resinas nas restaurações dos tecidos dentais<sup>126,127 e 128</sup>.

### **3.6. A irradiação laser em alta intensidade e sua associação com vidros bioativos**

São escassos os estudos que associam o uso do *laser* de Nd:YAG com cerâmicas bioativas. Mesmo insuficientes, é possível verificar que alguns estudos são recorrentes, sendo eles: a deposição de vidros bioativos, por intermédio da irradiação *laser*, para melhorar a adesão na interface implante/tecido<sup>125,129</sup>; o tratamento da hipersensibilidade dentinária<sup>130,131</sup> e as modificações na bioatividade de materiais para uso na Odontologia<sup>132</sup>.

Quanto às pesquisas com foco em uso de vidros bioativos como revestimento em implantes de titânio, há evidências de que o *laser* de Nd:YAG fomenta o aumento tanto da cristalinidade quanto da porosidade da camada de recobrimento resultante, demais, verificam-

se alterações composicionais, já que, por efeitos térmicos, pode acontecer a volatilização de elementos em dependência dos parâmetros elegidos para o *laser*. Sendo assim, a bioatividade desses materiais é acometida<sup>125, 129</sup>.

No que diz respeito à administração da hipersensibilidade dentinária, verifica-se a obliteração dos túbulos dentinários expostos que fazem com que o indivíduo vivencie um desconforto quando ingere qualquer alimento ou bebida com temperaturas elevadas tanto para o quente, quanto para o frio. As pesquisas realizadas por Farmakis *et al.* mostraram que a associação da NovaMin<sup>®</sup> (dentifrício comercial com partículas de Biovidro 45S5<sup>®</sup>) com *laser* de Nd:YAG é sinérgica em relação ao tratamento da hipersensibilidade dentinária, ainda que não se tenha elucidado as razões do sucesso da associação<sup>130,131</sup>.

Por último, um estudo de Beketova *et.al.* pesquisou os efeitos do *laser* de Nd:YAG sobre a bioatividade de um compósito formado pelo vidro bioativo 58S (60SiO<sub>2</sub>-36CaO-4P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) e por uma porcelana dental cuja a composição não foi exposta. Foi possível analisar que o tratamento com *laser* produziu a camada de hidroxiapatita carbonatada mais rapidamente. Contudo, a ação mais acelerada de hidroxiapatita não provocou proliferação e viabilidade celular, como era almejado<sup>132</sup>.

Ressalta-se que não são observados estudos publicados sobre os efeitos da associação do *laser* de Nd:YAG com vitrocerâmicas bioativas. Em especial, o Biosilicato<sup>®</sup>, já foi apreciado com *lasers* em baixa intensidade para indução osteogênica<sup>24</sup>, porém não identificados estudos com lasers de alta potência os quais configuram como objetivo deste trabalho.

### **3.7. Técnicas para análise dos efeitos de diferentes tratamentos na dentina.**

Para este trabalho, os efeitos do Biosilicato<sup>®</sup> em associação ou não com a irradiação laser em alta intensidade foram avaliados por Espectroscopia de absorção no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), Difração de raios X (DRX) e Microscopia eletrônica de varredura, que estão resumidamente descritas nos subitens a seguir.

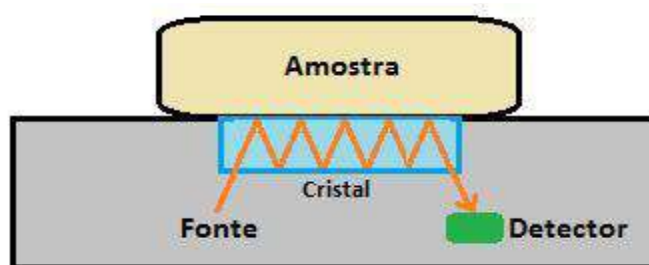
#### **3.7.1. Espectroscopia de absorção no infravermelho por transformada de Fourier - FTIR**

A espectroscopia de absorção no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR, do inglês, *Fourier Transformed Infrared Spectroscopy*) é um tipo de espectroscopia onde a energia a ser absorvida se encontra na região do infravermelho médio do espectro

eletromagnético<sup>133</sup>. Trata-se de uma técnica que utiliza dois feixes de radiação eletromagnética a fim de obter-se um interferograma. Sendo assim, através da variação do caminho óptico entre dois feixes, um sinal é criado. Por meio de cálculos matemáticos, a distância do comprimento óptico pode ser transformada para o valor da frequência de radiação e vice-versa<sup>133</sup>. Os instrumentos utilizados para alcance do espectro de absorção na região do infravermelho de um composto são nomeados de espectrômetros de absorção no infravermelho. Estes instrumentos são compostos principalmente por uma fonte de radiação infravermelha, um recipiente para a amostra, um seletor de comprimento de onda e um detector, organizados. Os espectrômetros com transformada de Fourier são os mais utilizados, pois esta metodologia demonstra mais vantagens sobre os demais equipamentos, como uma melhor relação sinal-ruído, coleta de dados com maior resolução e rapidez<sup>134,135</sup>.

Esta técnica permite o uso de diferentes acessórios, dentre os quais se destaca o de reflexão total atenuada (ATR) e a Reflectância Difusa, o qual permite a obtenção de espectros amostras sólidas<sup>136</sup>. O princípio deste primeiro tipo de acessório (ATR) para análise baseia-se no fato de que, quando um feixe de radiação passa de um meio mais denso (cristal de ATR) para um meio menos denso (amostra), ocorre reflexão. A fração do feixe de luz incidente que é refletida aumenta conforme aumenta o ângulo de incidência e, quando excede um determinado ângulo crítico, a reflexão é completa<sup>136</sup>. A Figura 4 representa um esquema simplificado do acessório ATR de um FTIR. A radiação infravermelha que penetra na amostra é chamada de onda evanescente. Quando esta onda evanescente penetra na amostra, há uma atenuação do feixe em comprimentos de onda correspondentes às bandas de absorção no infravermelho correspondentes aos constituintes daquela amostra, originando o espectro<sup>136</sup>, como demonstra a figura 4.

*Figura 4: Esquema simplificado de um equipamento ATR-FTIR sobre uma amostra sólida.*



*Fonte: BENETTI, 2010* <sup>137</sup>.



O segundo acessório, o de Reflectância Difusa, é usualmente aplicado na análise de amostras sólidas, sem uma necessidade de preparação laboriosa das amostras, com a viabilidade de analisar materiais opacos ou pouco reflexivos. O acontecimento da reflexão não é só observado especificadamente na superfície da amostra, uma vez que ocorrem interações entre a radiação incidente e a matriz<sup>138</sup>. Quando a radiação infravermelha incide sobre a amostra, uma parte dela é refletida na sua superfície (reflexão especular), sendo que os ângulos de incidência e o refletido pela superfície são homólogos. Na radiação incidente uma segunda parte penetra a superfície da amostra não só sendo parcialmente absorvida, mas também sofrendo espalhamentos múltiplos nas interfaces das partículas individuais. Logo após, o feixe regressa à superfície em ângulos aleatórios singularizando, desta maneira, o processo da reflexão difusa<sup>139</sup>.

### **3.7.2. Difração de raios X (DRX)**

A técnica de difração de Raios X tornou-se um dos mais adequados e disseminados métodos para a identificação e quantificação de minerais em materiais poli cristalinos industriais e naturais<sup>140</sup>. À simplicidade de sua preparação e manipulação da técnica, a metodologia da difração de raios X vem aumentando sua importância e utilização em experimentos científicos desde o século XX, quando foram descobertos os raios X pelo físico alemão Wilhelm C. Rontgen (1845-1923)<sup>140</sup>.

A difratometria de raios X refere-se a uma das notáveis técnicas de caracterização microestrutural de materiais cristalinos, apresentando diversas aplicações nos variáveis campos do conhecimento, em particularidade nas engenharias, na química, geociência, dentre outras<sup>141</sup>. Ao alcançarem um material, os raios X podem ser espalhados elasticamente, sem desaparecimento de energia pelos elétrons de um átomo. Após a colisão com elétrons, os fótons de raios X mudam sua trajetória, mantendo-se, porém, na mesma fase e energia do fóton incidente<sup>141</sup>. Pode-se afirmar, do ponto de vista da física ondulatória, que a onda eletromagnética é absorvida imediatamente pelo elétron e reemitida, sendo que cada elétron age como centro de emissão de raios X<sup>141</sup>.

Os efeitos de difração de raios X podem ser observados em vários ângulos quando os átomos que geram o espalhamento estiverem ajustados de maneira sistemática, como uma estrutura cristalina, exibindo entre eles distâncias próximas ao comprimento de onda da radiação incidente<sup>141</sup>. Pressupondo dois ou mais planos de uma estrutura cristalina, as circunstâncias para que aconteça a difração de raios X dependerão da diferença de caminho

percorrida pelos raios X e o comprimento de onda da radiação incidente. Esta condição é expressa pela lei de Bragg, descrita abaixo na equação 1.

$$n \lambda = 2 d \operatorname{sen} \theta \quad (1)$$

Onde:

$\lambda$  corresponde ao comprimento de onda da radiação incidente;

$n$  corresponde a um número inteiro (ordem de difração);

$d$  corresponde à distância interplanar para o conjunto de planos  $hkl$  (índice de Miller) da estrutura cristalina;

$\theta$  corresponde ao ângulo de Bragg, ou seja, de incidência dos raios X (medido entre o feixe incidente e os planos cristalinos)<sup>142</sup>.

A potência difratada, entre outros fatores, é dependente de elétrons no átomo; aditivamente, os átomos são distribuídos no espaço, sendo que os diversos planos de uma estrutura cristalina dispõem de diferentes densidades de elétrons e átomos, decorrendo com que as intensidades difratadas por fim sejam distintas para os diversos planos cristalinos<sup>141</sup>. Os planos de difração e suas devidas distâncias interplanares, como também as densidades dos átomos (elétrons) de cada um dos planos cristalinos, são características tão específicas e individuais de cada substância cristalina, da mesma maneira que o padrão difratométrico por ela concebido que a mesma equivale como se fosse uma impressão digital<sup>143</sup>.

As principais informações cristalográficas básicas e algumas propriedades físicas de compostos cristalinos são mantidas e constantemente atualizadas em um banco de dados pelo ICDD, International Center for Diffraction Data, com sede nos EUA. Estão presentes atualmente neste banco de dados mais de 70.000 compostos cristalinos, assim sendo que as mais essenciais, para identificação de um composto cristalino, é a distância interplanar e a intensidade difratada normalizada (relativa a 100%) sendo para os planos (hkl) que difratam construtivamente os raios X<sup>143</sup>.

### 3.7.3. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A multifuncionalidade da microscopia eletrônica de varredura se esbarra nas possibilidades de capturar e medir os diferentes tipos de radiações provenientes das interações dos elétrons com as amostras<sup>144</sup>.

Uma das principais limitações da microscopia ótica é o aumento máximo atingido em

torno de 2.000 vezes, como resultado, detalhes pequenos estruturais das amostras não são identificados nesta técnica, o que não procede na microscopia eletrônica de varredura (MEV) onde o material a ser estudado permite a técnica alcançar até um aumento de 900.000 vezes, resultando em visualizações nítidas e de alta resolução da superfície das amostras. Devido à peculiaridade de como as imagens são criadas, possuem uma aparência tridimensional que é extremamente útil para se analisar a topografia e outras características diversas que compõem o material<sup>144</sup>.

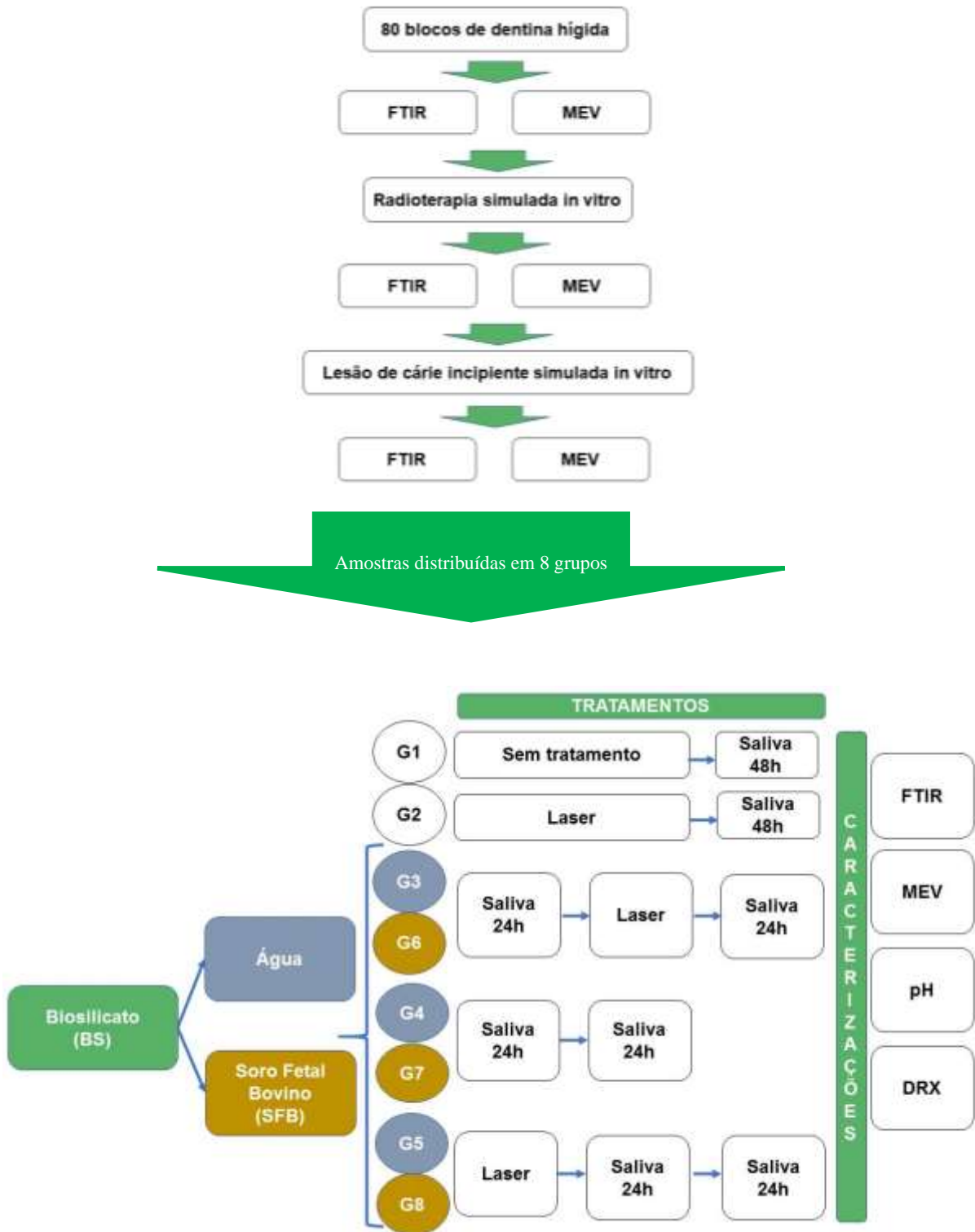
O fundamento do funcionamento do microscópio eletrônico de varredura se dá na utilização de um feixe de elétrons, que “varre” a superfície da amostra ponto a ponto transmitindo o sinal do detector a uma tela catódica, o feixe, ao exercer interação com a amostra, produz elétrons e fótons que podem ser coletados e convertidos em um sinal de vídeo. Os raios eletromagnéticos e/ou partículas resultados da interação do feixe eletrônico com a amostra retornam à superfície da amostra e atingem o detector, sendo detectadas rapidamente. As imagens resultantes deste processo procedem de um sinal alcançado de uma interação entre o feixe eletrônico e o material da amostra. Cabe salientar que diversos sinais podem ser emitidos pela amostra e, dentre estes sinais, os mais empregados para a obtenção da imagem são originados dos elétrons secundários e/ou elétrons retroespalhados, sendo que os elétrons secundários fornecem a imagem topográfica da superfície da amostra e são responsáveis pela obtenção das imagens de alta resolução e os elétrons retroespalhados ofertam imagens com características de variação de composição<sup>145</sup>.

## 4. Material e Método

### 4.1. Delineamento experimental

Foi conduzido um estudo *in vitro* cego randomizado no qual foram empregados 80 blocos de dentina radicular bovina que foram submetidos a um tratamento de radioterapia simulada e, após, tiveram lesão de cárie incipiente induzida por meio de imersão em solução desmineralizadora (tampão acetato, pH = 5,0) por 32h<sup>15</sup>. Todos os blocos foram avaliados composicionalmente por espectroscopia de absorção no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) e 10 blocos foram analisados morfológicamente por microscopia eletrônica de varredura (MEV) imediatamente após preparo (dentina hígida), imediatamente após radioterapia (dentina após radioterapia) e imediatamente após indução de lesão de cárie (dentina cariada). Após estas avaliações, os blocos foram aleatoriamente distribuídos em 8 grupos experimentais de 10 amostras cada, para tratamento com irradiação laser de Nd:YAG (*Q-switched*, 1064 nm, 5 ns, 250 mJ/pulso, 10 Hz) ou Biosilicato® veiculado em água Milli-Q ou em soro fetal bovino, em associação ou não com irradiação laser. Em seguida, os blocos foram analisados composicionalmente por FTIR e morfológicamente por MEV nos períodos de 48h e 7 dias após os tratamentos propostos, assim como as mudanças no pH das salivas artificiais empregadas durante os experimentos também foram avaliadas. Adicionalmente, testes de difração de raios X foram realizados em amostras de Biosilicato® em associação ou não com irradiação laser. Para todas as variáveis resposta, foi efetuada análise estatística ao nível de significância de 5%, considerando-se os blocos de dentina como unidades experimentais, as variações na composição e na morfologia como variáveis resposta e, como fatores de variação, considerou-se a radioterapia, a desmineralização e os tratamentos, conforme fluxograma abaixo na Figura 5.

Figura 5: Fluxograma do delineamento experimental do presente estudo.



Fonte: Elaboração da autora, 2019.

## 4.2. Preparo de amostras

Foram utilizados 40 dentes incisivos inferiores bovinos, tendo em vista sua similaridade bioquímica com dentes humanos<sup>54,55,56</sup>, os quais foram obtidos em frigorífico após aprovação do presente projeto pela Comissão de Ética de Uso Animal da Universidade Federal do ABC (CEUA-UFABC, processo número 9614190917). Destes, foram preparados 80 blocos de dentina radicular de 4 x 4 x 2 mm empregando-se disco de diamante refrigerado em baixa rotação. Após o corte, as amostras foram planificadas com lixas d'água de granulação 600 e limpas por meio de banho ultrassônico e solução de detergente aniônico (Buehler, EUA) e água destilada por 5 minutos.

Após preparo, todas as amostras foram mantidas identificadas em ambiente úmido hermético (algodão estéril umedecido com água deionizada e solução antifúngica de timol 0,64 g/L)<sup>146</sup> sob refrigeração em + 4 °C até o início dos experimentos e entre todas as fases experimentais, evitando-se desidratação e contaminação das amostras. O algodão de cada amostra foi trocado semanalmente.

## 4.3. Simulação da radioterapia *in vitro*

A radioterapia foi simulada *in vitro* empregando-se uma fonte de radiação gama Co-60 (Theratron Phoenix External Beam Therapy System, Best Theratronics Ltd., Ottawa, Canadá), no IPEN-CNEN/SP, conforme o protocolo estabelecido para pacientes sob tratamento oncogênico para tumores de cabeça e no centro de câncer especializado com uma unidade de teleterapia Co-60 (Theratron Phoenix ExternalBeamTherapy System, Best Theratronics Ltd., Ottawa, ON, Canadá)<sup>39</sup>. Para tal, os blocos de dentina foram imersos em 5 mL de saliva artificial em tubos criogênicos estéreis e receberam dose total de 60 Gy de radiação, fracionada em doses diárias de 2 Gy, 5 dias por semana, durante 6 semanas consecutivas, a uma taxa de dose de 1 Gy/minuto. As soluções de saliva não foram substituídas e, entre as irradiações, os tubos criogênicos com as amostras foram mantidos em temperatura ambiente. Após a radioterapia, as amostras foram retiradas da saliva artificial e mantidas em ambiente úmido sob refrigeração (em algodão estéril umedecido com água deionizada e timol 0,64 g/L) até as análises subsequentes.

A saliva artificial empregada foi preparada em laboratório e era composta por 1,5 mM cálcio, 0,9 mM fosfato em 0,1 M tampão tris, pH 7,0<sup>147</sup>. Os reagentes empregados para preparo da saliva artificial empregada foram Nitrato de Cálcio tetrahidratado, Fosfato de

Sódio Bibásico, Padrão de flúor de 100 ppm e Tampão TRIS (Sigma Aldrich, EUA).

#### **4.4. Indução de lesão incipiente de cárie após radioterapia**

A indução das lesões incipientes de cárie foi efetuada *in vitro* de acordo com o método estabelecido por Queiroz (2004)<sup>15</sup>. Para tal, a área de cada uma das amostras foi mensurada individualmente por meio de um paquímetro digital, para possibilitar o cálculo do volume de solução desmineralizadora para cada amostra. E, seguida, as faces laterais e posterior de cada amostra foram revestidas com verniz ácido-resistente (Impala, São Paulo, Brasil) de tal modo que apenas a face cujas dimensões foram medidas (face vestibular dos blocos) ficou exposta. Posteriormente, cada uma das amostras de dentina foi submersa em uma solução desmineralizadora (2 mL/mm<sup>2</sup>), com pH = 5,0 e composição de 1,4 mM de cálcio, 0,91 mM fosfato, 0,06 ppm de flúor em 0,05 M tampão acetato, por 32 horas a 37 °C. Após este período, as amostras foram lavadas com água deionizada corrente por 1 minuto cada e colocadas novamente em ambiente úmido sob refrigeração até o início das fases seguintes.

#### **4.5. Tratamentos propostos para impedir a progressão das lesões de cárie**

Os 80 blocos de dentina radicular, após desmineralização, foram aleatoriamente distribuídos em 8 grupos experimentais distintos de 10 amostras cada, conforme Tabela 1.

Após os tratamentos, cada uma das amostras foi individualmente submersa em 1,5 mL de saliva artificial<sup>147</sup> por um período de até 48h e, em seguida, submetida a uma primeira análise composicional (FTIR) e morfológica (MEV). Após esta primeira análise, as amostras foram novamente submersas individualmente em 1,5 mL de nova saliva artificial por 7 dias, para então serem novamente avaliadas por FTIR e MEV. Todas as salivas empregadas nesta fase experimental foram armazenadas para leitura do pH, conforme descrito posteriormente. As salivas empregadas antes da primeira análise (saliva 1, 48h de imersão) foram substituídas por salivas não usadas (saliva 2, 7 dias), as quais permaneceram as mesmas durante os 7 dias até a segunda análise de FTIR e MEV.

Tabela 1: Grupos experimentais do presente estudo.

<b>Grupo experimental</b>	<b>Biomaterial aplicado</b>	<b>Tempo de imersão em saliva artificial após aplicação do biomaterial</b>	<b>Irradiação laser</b>	<b>Tempo de imersão em saliva após irradiação laser</b>
<b>G1</b>	-	-	-	-
<b>G2</b>	-	-	Sim	48 h
<b>G3</b>	BS + água	24h	Sim, após 24h em saliva	24h
<b>G4</b>	BS + água	48h	-	-
<b>G5</b>	BS + água	-	Sim, imediatamente após BS + água	48 h
<b>G6</b>	BS + SFB	24h	Sim, após 24h em saliva	24h
<b>G7</b>	BS + SFB	48h	-	-
<b>G8</b>	BS + SFB	-	Sim, imediatamente após BS + SFB	48 h

\* BS = Biosilicato®; BS + água = Biosilicato® veiculado em água Milli-Q; BS + SFB = Biosilicato® veiculado em soro fetal bovino.

No grupo G1, as amostras (após radioterapia e após indução de lesão de cárie) não tiveram qualquer tratamento adicional, sendo armazenadas em saliva artificial por 48h antes de serem avaliadas novamente por FTIR e MEV. Para as amostras do grupo G2, as amostras foram irradiadas com laser de Nd:YAG após indução de lesão de cárie e mantidas em saliva artificial por 48h antes das primeiras leituras de FTIR e MEV.

Para as amostras dos grupos G4 e G7, foram efetuados os tratamentos com Biosilicato® veiculado em água ou SFB, respectivamente e, em seguida, as amostras foram mantidas em saliva artificial por 48h até as primeiras leituras de FTIR e MEV. Nos grupos G5 e G8, as amostras foram irradiadas com laser de Nd:YAG imediatamente após os tratamentos com Biosilicato® veiculado em água ou SFB, respectivamente e, em seguida, as amostras foram mantidas em saliva artificial por 48h até as primeiras leituras de FTIR e MEV.

Nas amostras dos grupos G3 e G6, as amostras foram tratadas com Biosilicato®



veiculado em água ou SBF, respectivamente e, em seguida, as amostras foram armazenadas em saliva artificial por 24h. Após este período, as amostras foram irradiadas com laser de Nd:YAG e, então, armazenadas por mais 24h em saliva artificial até as primeiras análises de FTIR e MEV. Esta saliva também foi trocada em relação à saliva anterior. Após tais análises, estas amostras foram também armazenadas em outras salivas por mais 7 dias e então foram novamente analisadas por FTIR e MEV. Desta forma, estes dois grupos experimentais tiveram três imersões em salivas diferentes, as quais também tiveram as mudanças de pH avaliadas.

Os tratamentos efetuados em cada grupo experimental estão detalhados a seguir.

#### **4.5.1. Tratamento com Biosilicato®**

Nos grupos G3 a G8, foi empregado o Biosilicato®, gentilmente cedido pelo Laboratório de Materiais Vítreos da Universidade Federal de São Carlos (LaMav). Antes das diluições, o material foi triturado e desaglomerado empregando-se grau e pistilo de ágata. Para os grupos experimentais, foi realizado o seguinte preparo:

- Biosilicato® veiculado em água Milli-Q (BS + água): obtido por meio da diluição de 0,25 mg de Biosilicato® por mL de água Milli-Q;
- Biosilicato® veiculado em soro fetal bovino (BS + SFB): obtido por meio da diluição de 0,25 mg de Biosilicato® por mL de soro fetal bovino (Sigma Aldrich, EUA).

Após as diluições, as soluções foram mantidas em estufa a 37 °C durante 6 horas para acondicionamento<sup>148</sup>; após este período, foram realizadas as aplicações sobre a superfície dos blocos de dentina.

Para os tratamentos, sobre a superfície de cada bloco de dentina, foi esfregado 150 µL da solução (BS + água ou BS + SFB) com um microaplicador odontológico (Microbrush, KG Sorensen, Brasil) durante 30 segundos<sup>149</sup>. Este volume foi fracionado em 3 porções com auxílio de micropipeta. Em seguida, as amostras foram colocadas imediatamente em 1,5 mL de saliva artificial<sup>149</sup> sem lavagem. Após todos os tratamentos, as amostras foram mantidas em temperatura de 37 °C<sup>149</sup> até as próximas fases experimentais. As amostras dos grupos G3 e G6 tiveram as salivas trocadas após a irradiação laser.

#### **4.5.2. Irradiação laser**

Nos grupos G2, G3, G5, G6 e G8, foi empregado laser de Nd:YAG (*Q-switched*, Quantel, EUA), de comprimento de onda de 1064 nm, largura temporal de pulso de 5 ns,

energia por pulso de 250 mJ, densidade de energia de  $1,48 \text{ J/cm}^2$ , diâmetro do feixe de 5 mm e taxa de repetição de 10 Hz. A energia por pulso foi monitorada antes da irradiação de cada amostra por meio de um medidor de potência e energia (Coherent, EUA). As amostras foram posicionadas individualmente na frente do feixe e foram mantidas estáticas, a uma distância padronizada de 5 cm, de forma que um único pulso atingisse toda a superfície da amostra de uma única vez. Em cada amostra, foram dados 3 pulsos após aplicação de uma pasta de pó de carvão, empregada como fotoabsorvedor<sup>150</sup>. Esta pasta foi empregada para restringir a absorção dos fótons oriundos da radiação laser na superfície da dentina, tendo em vista que os fótons de comprimento de onda de 1064 nm são fracamente absorvidos pelos cromóforos presentes neste tecido (água, hidroxiapatita e proteínas).

#### **4.6. Análise das mudanças composicionais da superfície da dentina**

A análise composicional das amostras foi efetuada por espectroscopia de absorção no infravermelho por transformada de Fourier – FTIR. Nas três análises efetuadas dos blocos de dentina antes dos tratamentos (dentina hígida, dentina após radioterapia e após lesão de cárie), foram conduzidos experimentos com a técnica no modo de reflexão atenuada (ATR), sendo utilizado o espectrômetro Frontier (Perkin Elmer, EUA), com um cristal de ATR composto de diamante e base de seleneto de zinco. Nestas análises, cada amostra foi retirada do ambiente úmido imediatamente antes de seu posicionamento sobre o cristal, cuidadosamente seca com papel absorvente e então posicionada sobre o cristal. Todas as amostras foram mantidas posicionadas empregando-se a prensa do próprio equipamento, com força padronizada em 105 kgF. Considerando a área do cristal de  $1,5 \text{ mm}^2$ , foi tomado um espectro único de cada amostra, em sua área central. Os espectros foram tomados com resolução de  $4 \text{ cm}^{-1}$ , 60 varreduras, na faixa entre  $650$  a  $4000 \text{ cm}^{-1}$ , com *background* a cada 20 amostras, sendo coletados por meio do software do equipamento (Spectrum 10, Perkin Elmer, EUA).

Depois da tomada dos espectros, foi realizada uma análise qualitativa descritiva, além da análise semi-quantitativa. Para tal, em cada espectro foi efetuado o traçado de uma linha de base e, em seguida, efetuada a integração das áreas sob as seguintes bandas de absorção: entre  $800 \text{ cm}^{-1}$  e  $887 \text{ cm}^{-1}$  para vibração  $\nu_2$  carbonato, entre  $887 \text{ cm}^{-1}$  e  $1181 \text{ cm}^{-1}$  para  $\nu_3$  fosfato; entre  $1181 \text{ cm}^{-1}$  e  $1296 \text{ cm}^{-1}$  para amida III; entre  $1300 \text{ cm}^{-1}$  e  $1510 \text{ cm}^{-1}$  igualmente para carbonato (superposição do alongamento e flexão); entre  $1510 \text{ cm}^{-1}$  e  $1580 \text{ cm}^{-1}$  amida II e, entre  $1593 \text{ cm}^{-1}$  e  $1720 \text{ cm}^{-1}$  para amida I<sup>23</sup>. A comparação semi-quantitativa foi executada após normalização, isto é, divisão das áreas obtidas de cada uma das bandas de absorção pela

área do  $\nu_3$  fosfato. Todos estes cálculos foram efetuados por meio de rotina desenvolvida pelo grupo em ambiente MatLab.

Para verificar a ação dos diferentes tratamentos propostos sobre a dentina, foi efetuada a avaliação composicional 48h e 7 dias após os tratamentos. Para tal, foi empregado o método de refletância difusa, tendo em vista que este método de análise permite a avaliação de amostras sólidas rugosas e com maior faixa de detecção espectral (entre 450 e 4000  $\text{cm}^{-1}$ ), e, portanto, possibilita a melhor avaliação da bioatividade do Biosilicato®. Para tal, as amostras foram posicionadas sobre o acessório de refletância difusa do mesmo equipamento, após alinhamento de feixe e tomada de *background* tomado com auxílio de um espelho de referência. Os espectros foram coletados com resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$  e 60 varreduras. Para as análises, foi empregado o software OriginPro 8 (Origin Lab, EUA).

Para a análise semi-quantitativa comparativa, após a normalização vetorial dos espectros, foi efetuado o traçado de uma linha de base e, em seguida, a integração das áreas sob as seguintes bandas de absorção<sup>151,152,153,154,155</sup>: entre 450  $\text{cm}^{-1}$  e 493  $\text{cm}^{-1}$  para dobramento da ligação Si-O-Si do biomaterial; entre 500  $\text{cm}^{-1}$  e 543  $\text{cm}^{-1}$  (com pico em 530  $\text{cm}^{-1}$ ), correspondente à vibração de  $\text{HPO}_4^{2-}$ , fase amorfa da apatita; entre 536  $\text{cm}^{-1}$  e 587  $\text{cm}^{-1}$  para a vibração do modo de flexão  $\nu_4$  do fosfato (com pico em 562  $\text{cm}^{-1}$ , banda 1 do tripleto); entre 584  $\text{cm}^{-1}$  e 645  $\text{cm}^{-1}$  para a vibração do modo de flexão  $\nu_4$  do fosfato (com pico em 600  $\text{cm}^{-1}$ , banda 2 do tripleto); entre 711  $\text{cm}^{-1}$  e 881  $\text{cm}^{-1}$  para a vibração referente ao estiramento  $\nu_2$  do carbonato (indicativo de substituição do tipo A e B na apatita carbonatada) e/ou superposição da banda referente ao estiramento das ligações Si-O-Si do biomaterial; entre 877  $\text{cm}^{-1}$  e 1140  $\text{cm}^{-1}$  (com pico em 1021  $\text{cm}^{-1}$ ) para as bandas correspondentes às vibrações de modo assimétrico  $\nu_3$  (fase pouco cristalina da apatita) e  $\nu_1$  do fosfato (com pico sobreposto em 962  $\text{cm}^{-1}$ , correspondente ao modo de alongamento simétrico não degenerado). Todas as análises foram feitas empregando-se o software OriginPro 8 (Origin Lab, EUA). Os resultados obtidos foram expressos em médias e desvio-padrão, sendo comparados estatisticamente conforme descrito posteriormente.

#### 4.7 Análise morfológica

A análise morfológica foi realizada por microscopia eletrônica de varredura (MEV), em diferentes momentos:

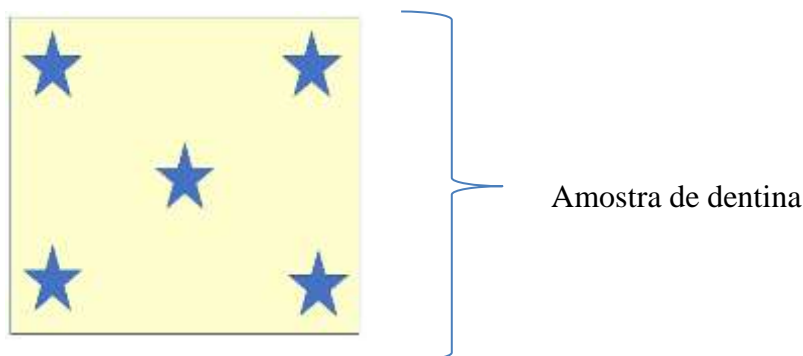
- Dentina hígida;

- Dentina após radioterapia;
- Dentina após indução de lesão incipiente de cárie;
- Dentina 48h após tratamentos;
- Dentina 7 dias após tratamentos.

Para esta análise, foi empregado o microscópio eletrônico de varredura FEI Quanta, pertencente à Central Multiusuário da UFABC. Para tal, as amostras foram coladas em suportes metálicos apropriados (*stubs*) com auxílio de fita de carbono e recobertas com uma fina camada de ouro (20 nm) empregando-se equipamento Sputtering Leica ACE 200.

De cada amostra, foram tomadas imagens de magnificações padronizadas (8000, 4000, 2000 e 1000x) em cinco regiões distintas, por um examinador cego, conforme Figura 6. Para a análise quantitativa, foram utilizadas todas as imagens de todas as amostras obtidas sob magnificação de 8000x; nestas, foram contados o número de túbulos dentinários abertos, assim como medidas as áreas de cada um destes túbulos (em  $\mu\text{m}^2$ ) e feita a proporção da área de túbulos abertos pela área total da imagem (em %). Para tal, foi empregado o software ImageJ (National Institutes of Health, EUA).

Figura 6: Esquema de tomada das imagens por microscopia eletrônica de varredura de cada uma das amostras de dentina. Os símbolos indicam os locais das sequências das imagens obtidas sob as magnificações em 8000x, 4000x, 2000x e 1000x.



Fonte: Elaboração da autora, 2019.

#### **4.8. Avaliação das mudanças de pH das soluções de saliva artificial decorrentes dos tratamentos**

As salivas artificiais empregadas durante os tratamentos propostos, nos grupos G3 a G8, tiveram seu pH avaliado após 24h, após 48h (grupos G3 e G6) e após 7 dias, empregando-se medidor de pH (Hanna Instruments, EUA) devidamente calibrado e em temperatura ambiente (25 °C). Para as medidas, considerando-se o pequeno volume de solução de saliva artificial de cada amostra (1,5 mL), foram somados os volumes correspondentes a cada três amostras de um mesmo grupo experimental para possibilitar a leitura pelo eletrodo.

#### **4.9. Avaliação das mudanças induzidas pela irradiação laser no Biosilicato® por difração de raios X**

Poços de 15 mm de diâmetro por 2 mm de profundidade em placas de acrílico foram preenchidos com pasta de Biosilicato® particulado veiculado em água destilada, sendo esta proporção suficiente para formar uma pasta sólida que não se movimentasse durante o transporte. Desta maneira, a proporção empregada aqui não é a mesma que foi efetuada nos tratamentos dos blocos de dentina.

Para esta análise, foram considerados os seguintes grupos experimentais:

- Biosilicato®;
- Biosilicato® imerso em saliva artificial durante 24h a 37 °C;
- Biosilicato® irradiado com laser de Nd:YAG após aplicação de fotoabsorvedor;
- Biosilicato® irradiado com laser de Nd:YAG sem aplicação de fotoabsorvedor;
- Biosilicato® irradiado com laser de Nd:YAG após aplicação de fotoabsorvedor seguido de imersão em saliva artificial durante 24h a 37 °C;
- Biosilicato® irradiado com laser de Nd:YAG sem aplicação de fotoabsorvedor seguido de imersão em saliva artificial durante 24h a 37 °C.

Os parâmetros de irradiação laser foram os mesmos empregados nas fases anteriores deste estudo. As placas foram analisadas por Difração de Raios X utilizando equipamento Ultima IV (Rigaku, Japão), com radiação  $\text{CuK}\alpha$ , intervalo de difração  $2\theta = 20^\circ - 50^\circ$ , passo

angular de  $0,02^\circ$  e tempo de contagem de 2s.

Os dados de Difração de Raios X foram analisados pelo programa Crystallographica Search-Match e Origin, com base no banco de dados do JCPDS (Joint Committee on Powder Diffraction Standards).

#### 4.10. Análise estatística

A análise estatística de todos os dados experimentais deste estudo foi efetuada separadamente para cada variável resposta, a saber:

- Na fase 1 (análises composicionais das amostras hígidas, após radioterapia e após lesão de cárie): proporção amida I/fosfato, proporção amida II/fosfato, proporção amida III/fosfato e proporção carbonato/fosfato. Apenas 1 único fator de variação foi considerado (tratamento), composto por radioterapia e desmineralização;
- Na fase 2 (análises das amostras após os tratamentos), sendo considerado um único fator de variação (tratamentos):
  - análise composicional: bandas de Si-O-Si; de  $\text{HPO}_4^{2-}$ ; banda 1 do tripleto do fosfato; banda 2 do tripleto de fosfato;  $\nu_2$  do carbonato e/ou Si-O-Si; e as bandas de  $\nu_3$  e  $\nu_1$  do fosfato;
  - análise morfológica: número de túbulos dentinários abertos, área dos túbulos abertos e proporção entre área total dos túbulos abertos pela área total da superfície exposta.

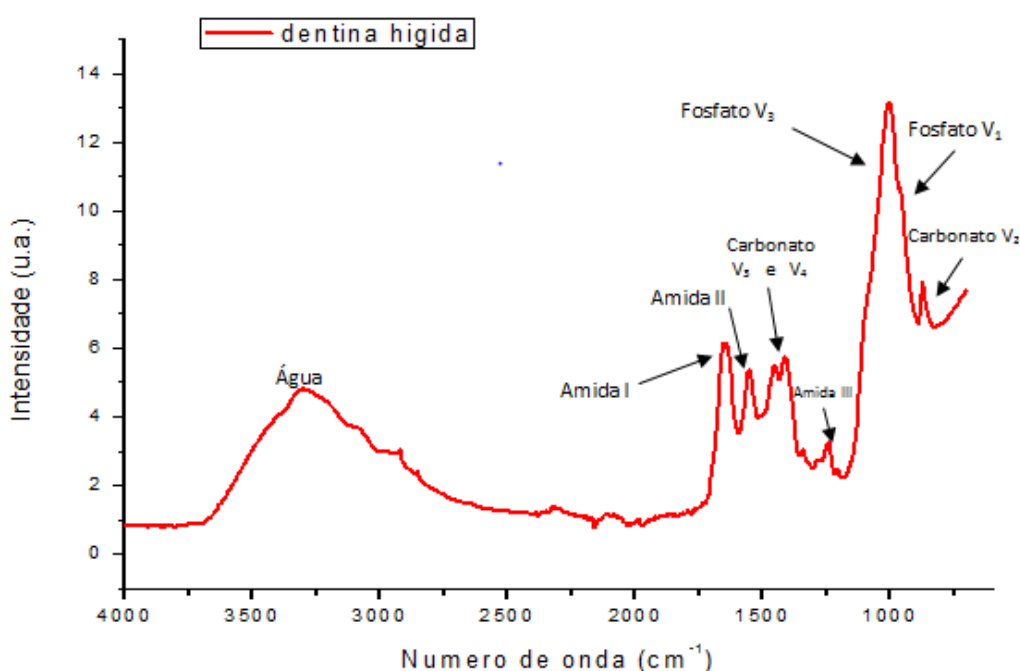
Para todas as análises, as unidades experimentais consideradas foram os blocos de dentina. A normalidade e a homogeneidade das variâncias foram testadas utilizando os testes de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. Em todas as análises efetuadas, a distribuição não se verificou normal e, desta forma, foi empregado o teste não paramétrico, para dados independentes, de Kruskal-Wallis e *post hoc* de Student-Newmann-Keuls. O software empregado para as análises foi o BioStat 5.0 e o nível de significância estatístico adotado foi de 5%.

## 5. Resultados e discussão

### 5.1. Análise composicional da dentina decorrente da radioterapia e indução de cárie artificial

A Figura 7 mostra um espectro médio, obtido pela técnica de ATR-FTIR, de uma amostra de dentina bovina hígida, com a identificação das principais bandas de absorção. É possível notar a presença das bandas de fosfato e carbonato atribuídas à matriz inorgânica e as bandas de amida I, II e III que estão relacionadas com a matriz orgânica<sup>72,73</sup>.

Figura 7: Representação de um espectro de absorção no infravermelho, entre 4000 e 600  $\text{cm}^{-1}$ , das amostras de dentina radicular bovina híginas, com o reconhecimento das principais bandas de absorção.

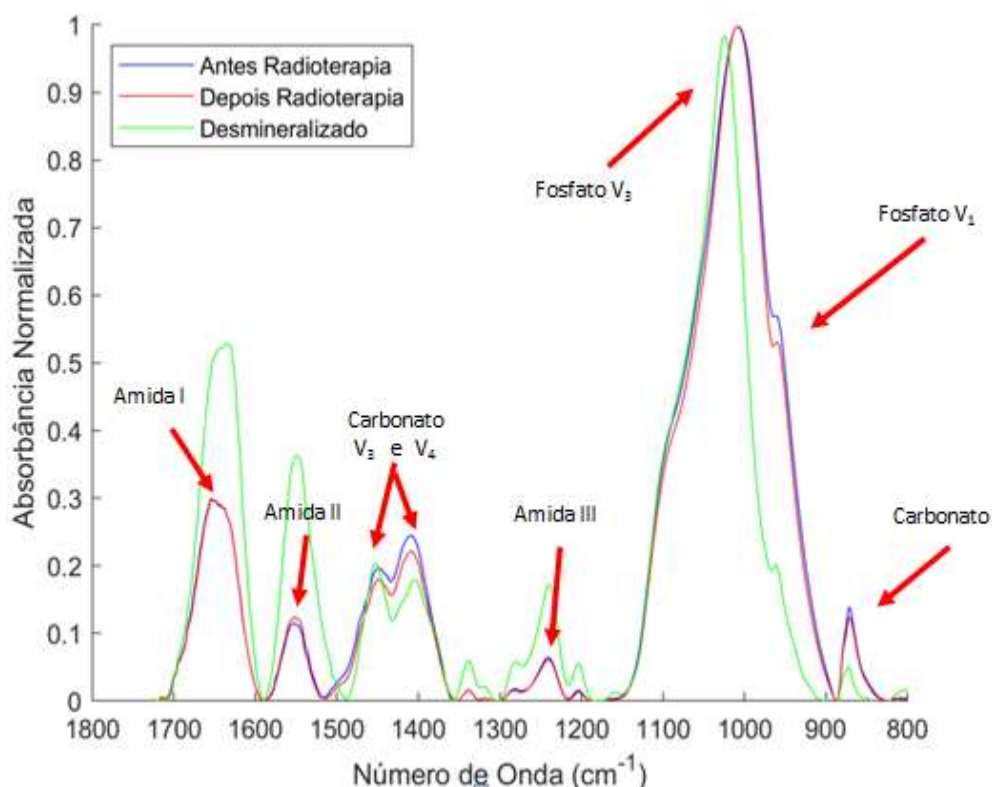


Fonte: Elaboração da autora, 2019.

É importante ressaltar, que mediante a dificuldade em se controlar o grau de umidade dos blocos de dentina e do ambiente em que o ensaio do ATR-FTIR foi realizado, a banda de água (detectada na região de aproximadamente 3000 e 3500  $\text{cm}^{-1}$ ) foi desconsiderada para análise dos resultados.

A Figura 8 mostra os espectros médios de FTIR obtidos na região entre 1800 e 800  $\text{cm}^{-1}$  (normalizados pela intensidade da banda de  $\nu_3$  fosfato e após traçado da linha de base) obtidos das amostras de dentina radicular hígida, após a radioterapia e após a desmineralização. É possível notar provável alteração na intensidade relativa das bandas de absorção de  $\nu_3$  e  $\nu_4$  carbonato das amostras submetidas à radioterapia (seta), em relação às amostras sadias (antes da radioterapia), enquanto que não parece haver diferenças considerando as demais bandas de absorção. Contudo, após a desmineralização, observa-se expressivo aumento nas intensidades relativas correspondentes às bandas de amida I, II e III, assim como a diminuição na intensidade relativa da banda correspondente à vibração  $\nu_3$  e  $\nu_4$  carbonato. Além disso, observa-se um estreitamento e deslocamento para maior número de onda da banda de  $\nu_3$  fosfato após desmineralização.

Figura 8: Média dos espectros de absorção no infravermelho, compreendidos entre 1800 e 800  $\text{cm}^{-1}$ , das amostras de dentina antes da radioterapia (linha azul), depois da radioterapia (linha vermelha) e após desmineralização (linha verde) após normalização pela intensidade da banda de  $\nu_3$  fosfato e traçado da linha de base.

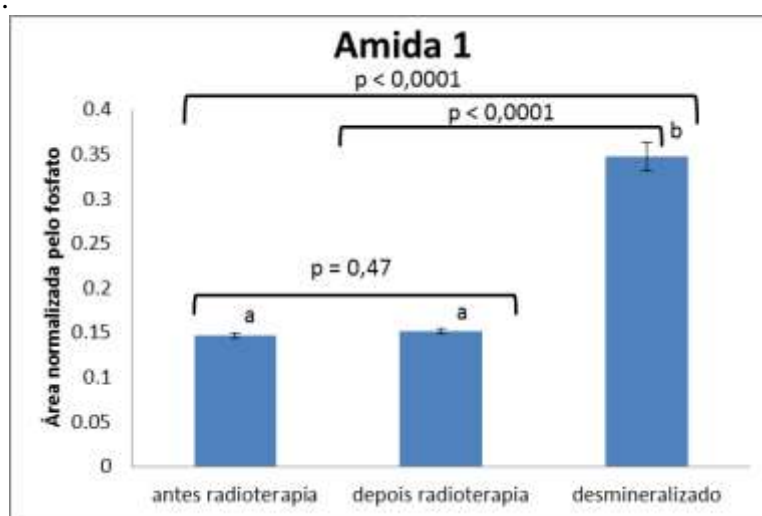


Fonte: Elaboração da autora, 2019.



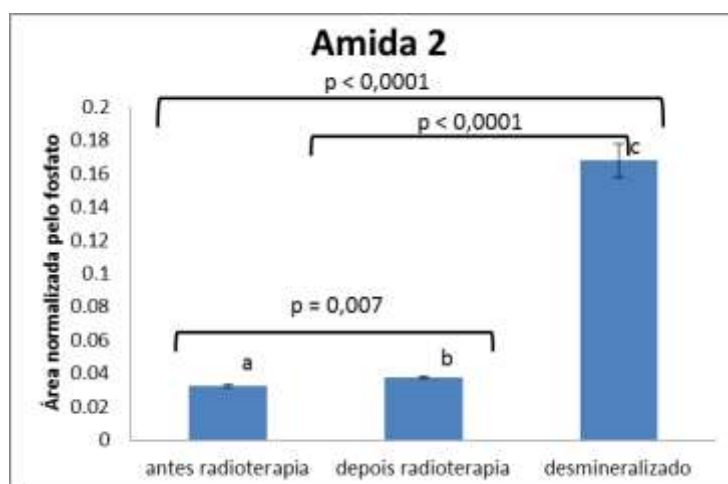
Os resultados das análises semiquantitativas efetuadas encontram-se nas Figuras 09, 10, 11 e 12. Nota-se que a radioterapia não resultou em alterações estatisticamente significativas ( $p > 0,05$ ) nas proporções de amida I e III, nem na proporção de  $v_3$  e  $v_4$  carbonato em relação ao fosfato; contudo, observou aumento significativo na proporção de amida 2 após radioterapia ( $p = 0,007$ ).

Figura 09: Valores médios, com os respectivos valores de desvio padrão, das áreas de amida I normalizadas pela banda de  $v_3$  fosfato antes, depois da radioterapia e depois da desmineralização. As barras indicam erro padrão. Letras diferentes indicam médias estatisticamente distintas ( $p < 0,05$ ) de acordo com o teste de Kruskal-Wallis + Student Newmann Keuls.



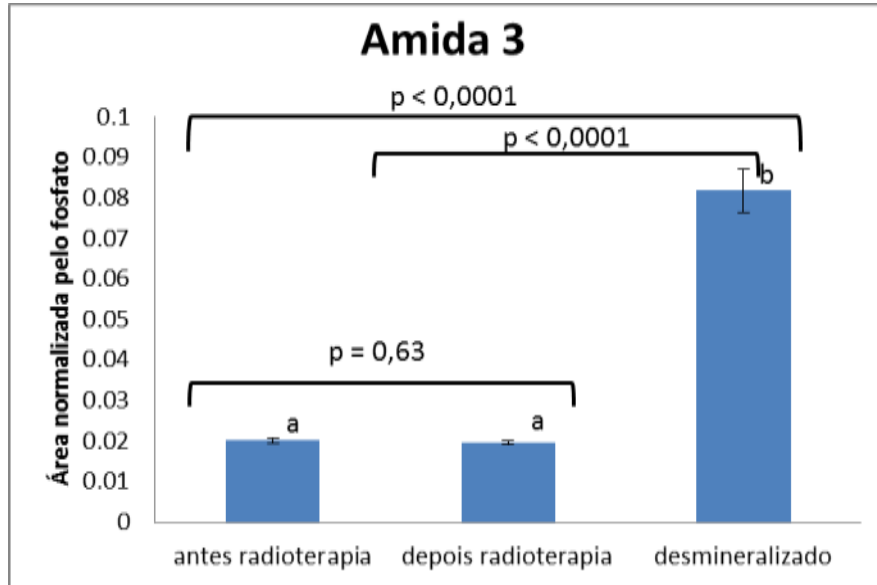
Fonte: Elaboração da autora, 2019.

Figura 10: Valores médios, com os respectivos valores de desvio padrão, das áreas de amida II normalizadas pela banda de  $v_3$  fosfato antes, depois da radioterapia e depois da desmineralização. As barras indicam erro padrão. Letras diferentes indicam médias estatisticamente distintas ( $p < 0,05$ ) de acordo com o teste de Kruskal-Wallis + Student Newmann Keuls.



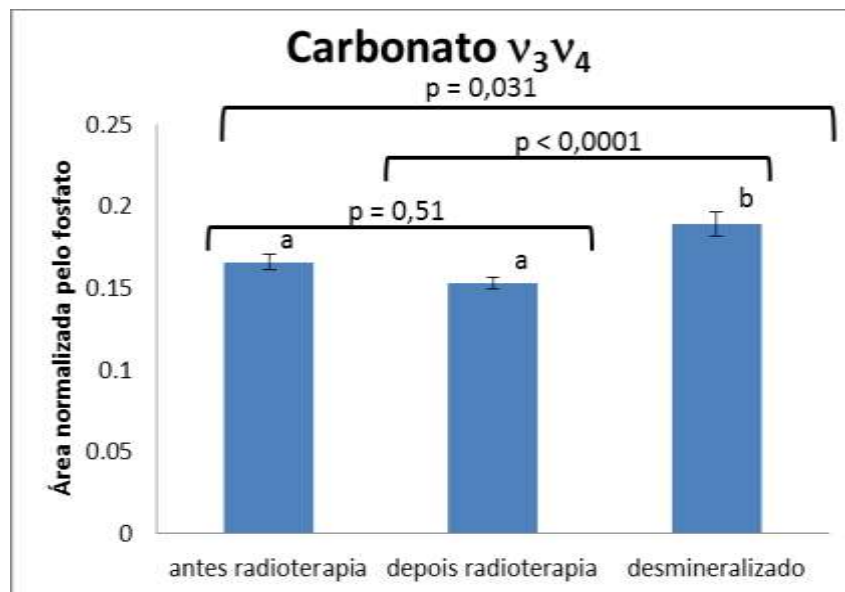
Fonte: Elaboração da autora, 2019.

Figura 11: Valores médios, com os respectivos valores de desvio padrão, das áreas de amida III normalizadas pela banda de  $\nu_3$  fosfato antes, depois da radioterapia e depois da desmineralização. As barras indicam erro padrão. Letras diferentes indicam médias estatisticamente distintas ( $p < 0,05$ ) de acordo com o teste de Kruskal-Wallis + Student Newmann Keuls.



Fonte: Elaboração da autora, 2019.

Figura 12: Valores médios, com os respectivos valores de desvio padrão, das áreas de  $\nu_3\nu_4$  carbonato normalizadas pela banda de  $\nu_3$  fosfato antes, depois da radioterapia e depois da desmineralização. As barras indicam erro padrão. Letras diferentes indicam médias estatisticamente distintas ( $p < 0,05$ ) de acordo com o teste de Kruskal-Wallis + Student Newmann Keuls.



Fonte: Elaboração da autora, 2019.

Após a desmineralização, observou-se aumento estatisticamente significativo nas proporções das amidas I, II e III, além da diminuição na proporção de  $\nu_3$  e  $\nu_4$  carbonato, em relação ao  $\nu_3$  fosfato. Tais efeitos são esperados e indicam que houve de fato a remoção de parte do mineral durante a exposição à solução desmineralizadora, com maior exposição do conteúdo orgânico da dentina, representado pelo colágeno e outras proteínas, assim como de água. Vale ressaltar que a lesão de cárie desenvolvida neste protocolo atingiu a profundidade média de  $95,4 \mu\text{m}^{15}$ , e se caracteriza por uma lesão incipiente e de pequena dimensão sob o ponto de vista clínico.

A radioterapia é uma modalidade de tratamento rotineira para este tipo de câncer- CCP, mas por sua vez pode causar danos aos tecidos saudáveis<sup>23</sup>. A literatura evidencia efeitos controversos, mas que podem acometer a estrutura dos tecidos duros, incluindo mudanças nas propriedades mecânicas e na composição química do esmalte e da dentina<sup>23</sup>.

Para caracterização de materiais biológicos com o propósito de identificação dos compostos orgânicos e inorgânicos tanto para o processo de radioterapia, quanto para o processo de desmineralização das amostras, a técnica de reflexão total atenuada (ATR) vem sendo empregada<sup>133</sup>. Suas vantagens se aplicam em facilitar a preparação das amostras e também a capacidade de realizar verificações em até  $6\mu\text{m}$  de profundidade em tecidos duros dentais, sujeito ao material constituinte do cristal de ATR, o que determina a profundidade da onda evanescente<sup>134</sup>. Por demonstrar apenas informações das amostras em sua superfície, é de extrema importância a investigação das sequelas das irradiações, sejam elas ionizantes ou não ionizantes, relativamente sobre os tecidos<sup>133,134</sup>.

De acordo com informações supracitadas, a dentina é formada por uma matriz orgânica de hidroxiapatita carbonatada (69%) e matriz orgânica de colágeno tipo I (20%) e o restante de sua formação de 11% por água. São detectados, no espectro das amostras de dentina bovina hígida (Figura 7), as bandas de amida I, II e III, as quais estão atribuídas à matriz orgânica, e as bandas de fosfato e carbonato à matriz inorgânica<sup>134,135</sup>.

Cabe ainda salientar que ocorrem sobreposições de bandas no espectro da dentina, ou seja, na banda determinada à amida I, por exemplo, há sobreposição com uma banda de água adsorvida<sup>133,135</sup>; a banda de amida II é influenciada pelos modos rotacionais do vapor de água presente no ar e bandas de carbonato<sup>135</sup>. Ainda, a literatura reporta que as bandas de prolina e hidroxiprolina (dois aminoácidos que constituem o colágeno) na região de  $1450 \text{ cm}^{-1}$ , se sobrepõem diretamente onde ocorrem as vibrações  $\nu_3$  e  $\nu_4$  do íon carbonato<sup>136</sup>.

O estudo realizado por Rodrigues *et al.* demonstrou que a radioterapia, em dose total de 72 Gy, empregada em doses fracionadas de 1,8 Gy/dia durante 8 semanas com as amostras

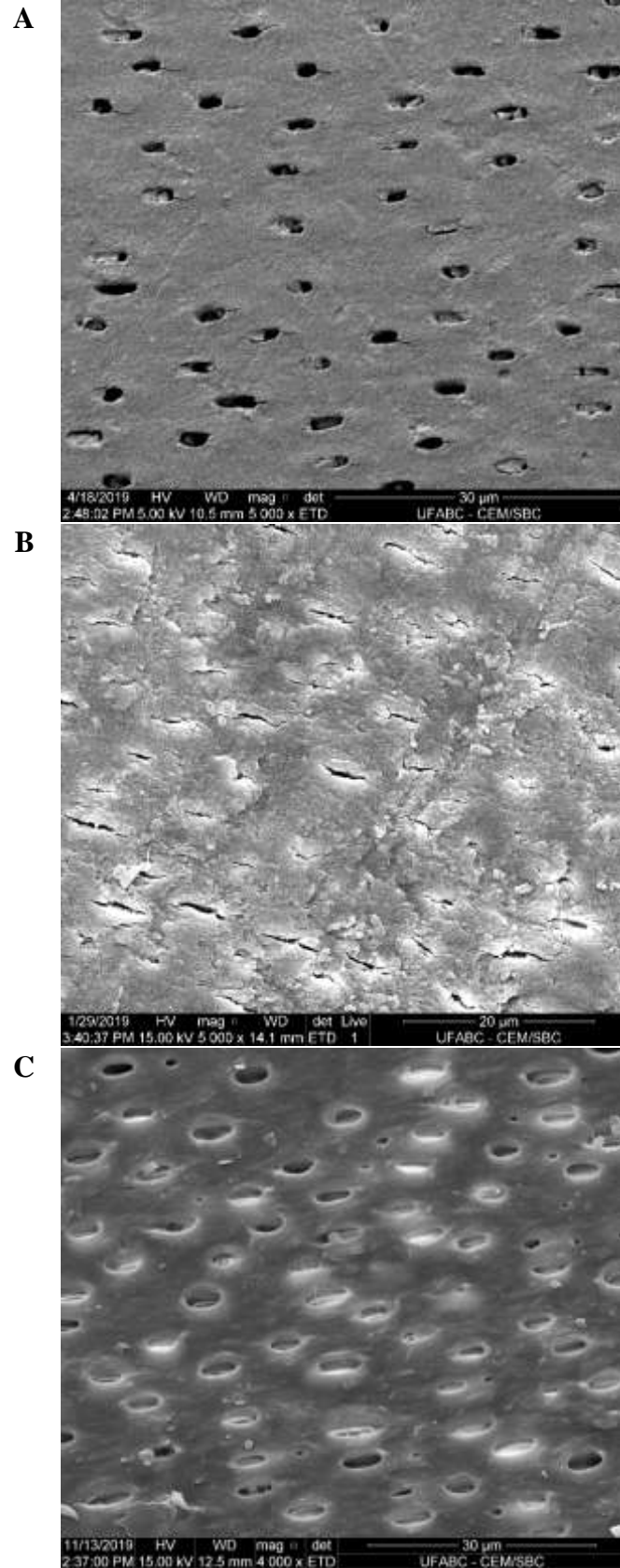
mantidas em água destilada, promove aumentos nas intensidades de todas as bandas de absorção da dentina humana<sup>136</sup>. Contudo, as bandas do carbonato, nos modos de vibração  $v_3$  e  $v_4$ , são influenciadas pelas vibrações da banda amida II, que está associada à estrutura em hélice do colágeno<sup>134</sup>.

A lesão de cárie incipiente induzida no presente estudo segue protocolo estabelecido na literatura<sup>15</sup> e foi efetuada na intenção de simular uma lesão de mancha branca, de superfície íntegra e desmineralização em profundidade, mas passível de remineralização clínica. Observa-se na figura 8 um aumento expressivo nas intensidades das bandas de amidas I, II e III, assim como a diminuição na intensidade das bandas correspondentes do carbonato  $v_3$  e  $v_4$ . Além disto, nota-se um estreitamento e deslocamento para maior da banda de  $v_3$  fosfato após desmineralização. Este fato é esperado, pois o carbonato ligado à hidroxiapatita apresenta uma ligação menos estável<sup>134,136</sup> e, portanto, é facilmente perdido no processo de desmineralização. A literatura demonstra que o processo de desmineralização empregado neste trabalho promove a formação de lesões de cárie com profundidade de até 95,4  $\mu\text{m}$ , evidenciando que se trata de um processo inicial<sup>134</sup>. Neste processo de desmineralização inicial da dentina observa-se uma perda do conteúdo inorgânico e aparente aumento do orgânico, o que é devido à maior exposição do colágeno devido à perda do mineral.

## **5.2 Análise morfológica da dentina decorrente da radioterapia e indução de cárie artificial**

As eletromicrografias observadas na Figura 13 sugerem que a radioterapia promove a formação de uma superfície mais rugosa e com obliteração parcial dos túbulos dentinários. Cabe salientar uma maior quantidade de túbulos obliterados na dentina após a radioterapia (Figura 13B) quando em confronto com a dentina hígida (Figura 13A). Após a indução da lesão de cárie (Figura 13C), é possível observar os túbulos totalmente abertos e de diâmetro aparentemente aumentado em relação à dentina hígida<sup>18,101,102</sup>.

Figura 13: Eletromicrografias representativas dos blocos de dentina hígida (A), antes (B) e após a radioterapia (C). Magnificação original: 5000x (A e B) e 4000x (C).



Fonte: autor.

A avaliação morfológica empregando-se a técnica de Microscopia Eletrônica por Varredura (MEV) se tornou essencial para complementar as análises composicionais, pois nos permite entender as correlações entre a microestrutura, os defeitos e as alterações morfológicas, além de prever as propriedades dos materiais quando estas relações são estabelecidas<sup>144,145</sup>. Suas imagens em alta resolução permitem se ter uma imagem topográfica da amostra<sup>144,145</sup>.

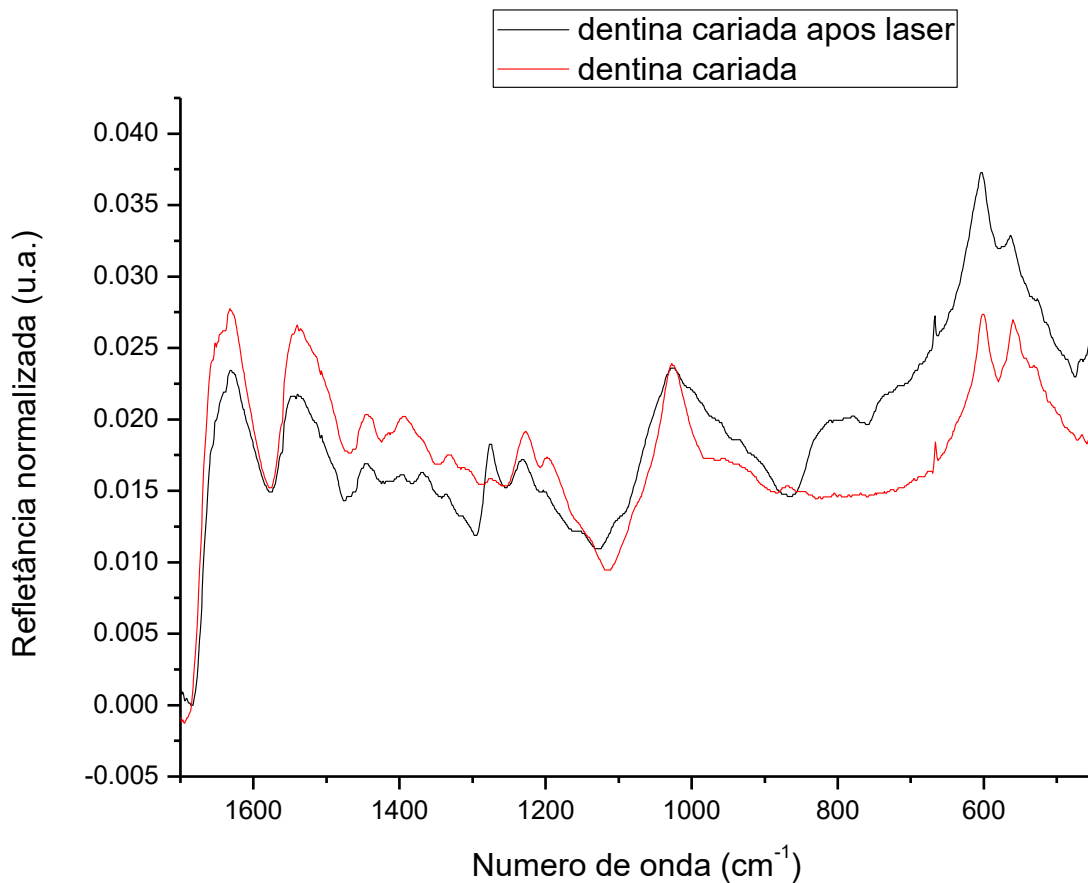
A literatura reporta que, devido à radiação ionizante, a dentina pode sofrer desidratação e alterações composicionais. Os resultados observados no presente estudo concordam com tais assertivas, sugerindo que a obliteração de túbulos dentinários seria favorecida pela formação de apatita amorfa ou pela reorganização da estrutura do colágeno na dentina<sup>60,61,62,63</sup>. De fato, provavelmente a obliteração parcial dos túbulos após a radioterapia pode ter ocorrido devido à deposição de íons da saliva artificial sobre a dentina, considerando que a mesma não foi trocada durante os 30 dias de simulação de radioterapia. A radiólise da água promovida pela radiação ionizante pode favorecer o processo de deposição de íons da saliva artificial sobre a dentina, o que reflete na obliteração parcial dos túbulos dentinários, assim como pode ter sido formada alguma fase que não tenha sido esperada durante o estudo. Após o processo de criação de lesão incipiente de cárie, sugere-se que esta camada depositada seja removida pela solução desmineralizadora, promovendo nova abertura dos túbulos dentinários decorrente do processo de remoção de mineral, o que condiz com os efeitos da cárie observados em estudos anteriores.

### **5.3. Análise composicional da dentina após radioterapia, cárie e tratamentos propostos**

A Figura 14 mostra os espectros médios normalizados vetorialmente, obtidos pelo método de refletância difusa do FTIR na região compreendida entre 1700 e 450  $\text{cm}^{-1}$ , de amostras de dentina cariada sem tratamento (G1) e após irradiação com laser de Nd:YAG (G2). Ao se comparar os dois espectros médios, nota-se que, após a irradiação *laser*, as bandas do fosfato  $\nu_4$  (região entre 500 e 700  $\text{cm}^{-1}$ ) e do fosfato  $\nu_3$  (aproximadamente 1000  $\text{cm}^{-1}$ ) apresentam-se aparentemente mais intensas e com maior largura, respectivamente, em relação às suas correspondentes na dentina apenas cariada (G1). Além disso, observa-se que as bandas da matriz orgânica (amidas I, II e III) assim como as bandas correspondentes às vibrações  $\nu_3$  e  $\nu_4$  do carbonato estão menos intensas após o tratamento com *laser*. Todas estas

características são compatíveis com alterações por efeito térmico do *laser*, caracterizadas pela evaporação da água livre (interprismática) e dos íons  $\text{CO}_3^-$  e  $\text{OH}^-$  ligados à hidroxiapatita. Tais alterações térmicas, por sua vez, podem ter sido capazes de provocar a reorganização cristalográfica da hidroxiapatita presente no tecido dentinário<sup>18,101,102</sup>. Além disso, é possível notar diminuição na intensidade das bandas referentes ao conteúdo orgânico da dentina, o que condiz com os efeitos relacionados à evaporação de água e desnaturação de proteínas deste tecido também por efeito térmico e descritos na literatura<sup>17, 18, 23</sup>.

Figura 14: Média dos espectros de FTIR na região compreendida entre 1700 e 450  $\text{cm}^{-1}$ , de amostras de dentina cariada sem tratamento (G1) e após irradiação com laser de Nd:YAG (G2). Espectros normalizados vetorialmente.



Fonte: autor.

A Figura 15 mostra os espectros médios normalizados vetorialmente, na região compreendida entre 1700 e 450  $\text{cm}^{-1}$ , de amostras de dentina cariada sem tratamento (G1) e após tratamento com Biosilicato® veiculado em água destilada e irradiação laser após 24h (G3). Em todos os grupos tratados com Biosilicato®, nota-se a presença de todas as bandas de

absorção descritas no item 4.6. Em nenhum dos espectros, em qualquer um dos grupos experimentais do presente estudo, foi observada a banda 3 do tripleto do fosfato, com máximo em  $632\text{ cm}^{-1}$ , correspondente à vibração do grupo hidroxila da rede cristalina da hidroxiapatita<sup>157</sup>. Este fato corrobora estudos da literatura<sup>163</sup> que também não detectam esta vibração em amostras de dentina radicular. A não detecção desta banda de absorção após aplicação de biomaterial pode sugerir que a camada de material formada pode ter sido insuficiente para ser detectada pela técnica, ou que pode ter havido uma substituição de hidroxila pelo  $\text{CO}_3^-$  durante a exposição em saliva artificial.

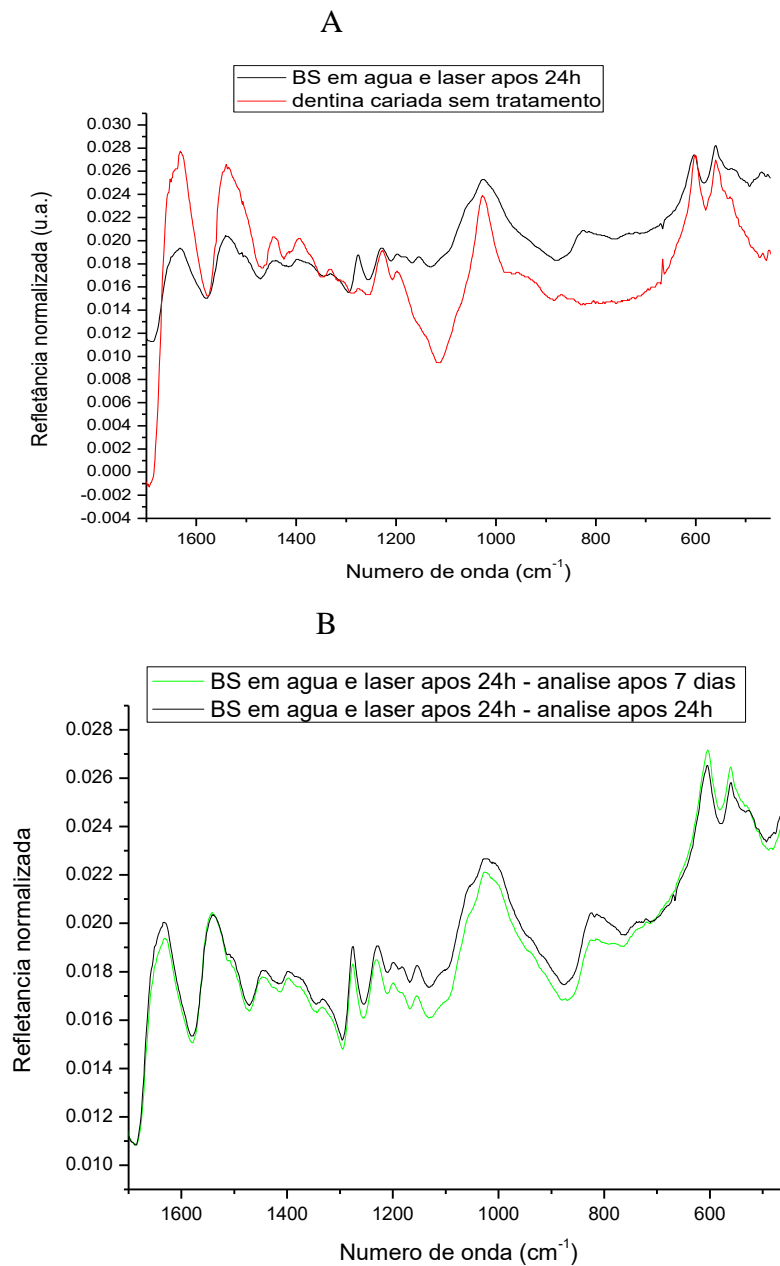
Ainda na Figura 15A, é possível notar diminuição das intensidades das bandas correspondentes ao conteúdo orgânico da dentina (amidas I e II), assim como das bandas correspondentes às vibrações  $\nu_3$  e  $\nu_4$  do carbonato, o que sugere o recobrimento da dentina parcialmente desmineralizada pelo biomaterial. Ainda, evidencia-se um alargamento na banda de absorção correspondente à vibração  $\nu_3$  do fosfato após o tratamento. Ainda, observa-se aumento na intensidade da banda  $560\text{ cm}^{-1}$ , correspondente a uma das bandas do tripleto do fosfato, à vibração  $\nu_2$  do carbonato (indicativo de substituição do tipo A e B na apatita carbonatada, entre  $711\text{ cm}^{-1}$  e  $881\text{ cm}^{-1}$ ) e/ou superposição da banda referente ao estiramento das ligações Si-O-Si (siloxano) do biomaterial após 24 horas. Tal achado sugere a formação de hidroxiapatita carbonatada após o tratamento<sup>151</sup>.

A Figura 15B mostra os espectros no infravermelho, normalizados vetorialmente, das amostras de dentina tratadas com Biosilicato® veiculado em água destilada e irradiação laser (G3) após 24 horas e 7 dias de imersão em saliva artificial. Nota-se a permanência do biomaterial após 7 dias por meio da manutenção das intensidades das bandas referentes à matriz orgânica da dentina após este período. Contudo, observa-se a redução da intensidade das bandas correspondentes às vibrações  $\nu_3$  do fosfato e do  $\nu_2$  do carbonato (ou do siloxano, entre  $711\text{ cm}^{-1}$  e  $881\text{ cm}^{-1}$ ), o que sugere uma pequena diminuição na quantidade do biomaterial depositado sobre a dentina, assim como um pequeno aumento nas intensidades das bandas correspondentes ao tripleto do fosfato ( $560$  e  $602\text{ cm}^{-1}$ ) após 7 dias, o que sugere o início da bioatividade do material neste período. De acordo com Peitl *et al.* (2001)<sup>151</sup>, as vitrocerâmicas totalmente cristalizadas apresentam, além da decomposição dos picos localizados em  $1050\text{ cm}^{-1}$ ,  $910\text{ cm}^{-1}$  e  $490\text{ cm}^{-1}$ , um aumento da intensidade do pico em  $575\text{ cm}^{-1}$ , atribuído ao desenvolvimento de uma fase cristalina. No presente projeto, observamos esta ação no aumento da intensidade do pico  $560\text{ cm}^{-1}$ , cuja diferença de absorção (deslocamento da banda) em relação ao estudo de Peitl *et al.* (2001)<sup>151</sup> pode estar relacionada



principalmente ao equipamento e ao tipo de substrato avaliado. Os picos localizados em  $1050\text{ cm}^{-1}$ ,  $910\text{ cm}^{-1}$  e  $490\text{ cm}^{-1}$  não podem ser avaliados no presente estudo devido à provável sobreposição com a bandas de constituintes na dentina.

Figura 15: Média dos espectros de FTIR na região compreendida entre  $1700$  e  $450\text{ cm}^{-1}$ , de amostras de dentina cariada sem tratamento (G1) e após tratamento com Biosilicato® veiculado em água destilada e irradiação laser após 24h (G3). A = análise após 24h; B = análise após 7 dias. Espectros normalizados vetorialmente.



Fonte: autor.

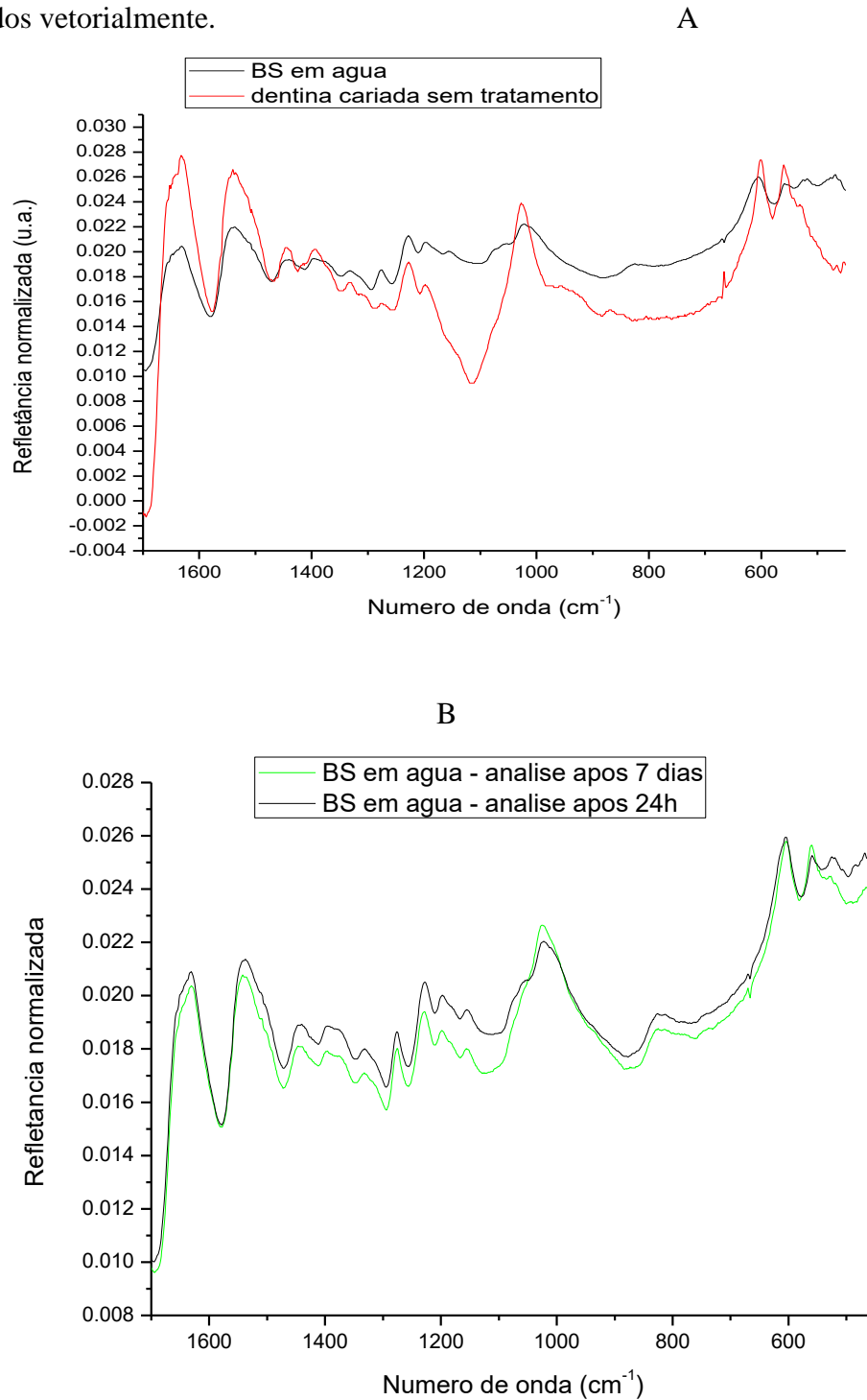
A Figura 16 mostra os espectros médios normalizados vetorialmente, na região compreendida entre 1700 e 450  $\text{cm}^{-1}$ , de amostras de dentina cariada sem tratamento (G1) e tratamento com Biosilicato<sup>®</sup> veiculado em água deionizada, sem irradiação laser (G4). Nota-se que, na figura 16A, após os tratamentos das amostras, as bandas atribuídas à matriz orgânica (amida I e II) estão com intensidades relativas reduzidas em relação às correspondentes na dentina cariada sem tratamento. Cabe descrever que a banda de fosfato  $\nu_3$  apresenta-se mais larga, porém com menor intensidade, provavelmente devido à redução da quantidade de íons hidroxila da dentina expostos após a aplicação do biomaterial, que se encontra sobre a superfície da dentina. Além disso, as bandas do tripleto apresentam-se com menor intensidade em relação à dentina sem tratamento, o que sugere novamente um recobrimento da dentina pelo biomaterial que ainda não se encontra totalmente cristalizado<sup>151</sup>.

Já na figura 16B nota-se o aumento da intensidade relativa da banda do tripleto do fosfato, com pico em 560  $\text{cm}^{-1}$ , assim como da banda referente à vibração  $\nu_3$  do fosfato após 7 dias de tratamento. Tal fato sugere a formação de uma camada amorfa rica em  $\text{CaO-P}_2\text{O}_5$  (estágio IV da dissolução do Biosilicato<sup>®</sup> *in vitro*) e, de acordo com a literatura, essa fase seria o início da cristalização do filme de fosfato de cálcio<sup>151,152</sup>. Ainda, observa-se uma pequena redução das intensidades das bandas correspondentes ao conteúdo orgânico da dentina, o que indica ter havido um maior recobrimento da dentina pelo material após exposição em saliva artificial por 7 dias.

A Figura 17 mostra os espectros médios normalizados vetorialmente, na região compreendida entre 1700 e 450  $\text{cm}^{-1}$ , de amostras de dentina cariada sem tratamento (G1) e após tratamento com Biosilicato<sup>®</sup> veiculado em água deionizada com posterior irradiação imediata com laser de Nd:YAG (G5). É possível observar que, após os tratamentos, as intensidades das bandas atribuídas à matriz orgânica, isto é, as amidas I, II e III, assim como das vibrações  $\nu_3$  e  $\nu_4$  do carbonato, estão reduzidas em relação às correspondentes na dentina cariada sem tratamento (Figura 17A). Tais efeitos podem ser oriundos ou do efeito térmico da irradiação laser, o qual produziu desnaturação parcial do conteúdo orgânico e evaporação de água e carbonato da dentina<sup>17,18,23</sup>, ou pelo recobrimento da dentina parcialmente desmineralizada pelo biomaterial, o qual não foi removido pela irradiação laser, mas sim se manteve sobreposto à dentina no momento das análises de FTIR. Ainda, nota-se o aumento da intensidade da banda correspondente à vibração  $\nu_3$  do fosfato, com ausência da banda de  $\nu_2$  do carbonato (ou do siloxano, entre 711  $\text{cm}^{-1}$  e 881  $\text{cm}^{-1}$ ) e diminuição das intensidades das

bandas com picos em  $560\text{ cm}^{-1}$  e  $602\text{ cm}^{-1}$  após o tratamento. Tais achados sugerem que o biomaterial ainda não se encontra totalmente cristalizado sobre a superfície<sup>151</sup>.

Figura 16: Média dos espectros de FTIR na região compreendida entre  $1700$  e  $450\text{ cm}^{-1}$ , de amostras de dentina cariada sem tratamento (G1) e após tratamento com Biosilicato® veiculado em água destilada (G4). A = análise após 24h; B = análise após 7 dias. Espectros normalizados vetorialmente.

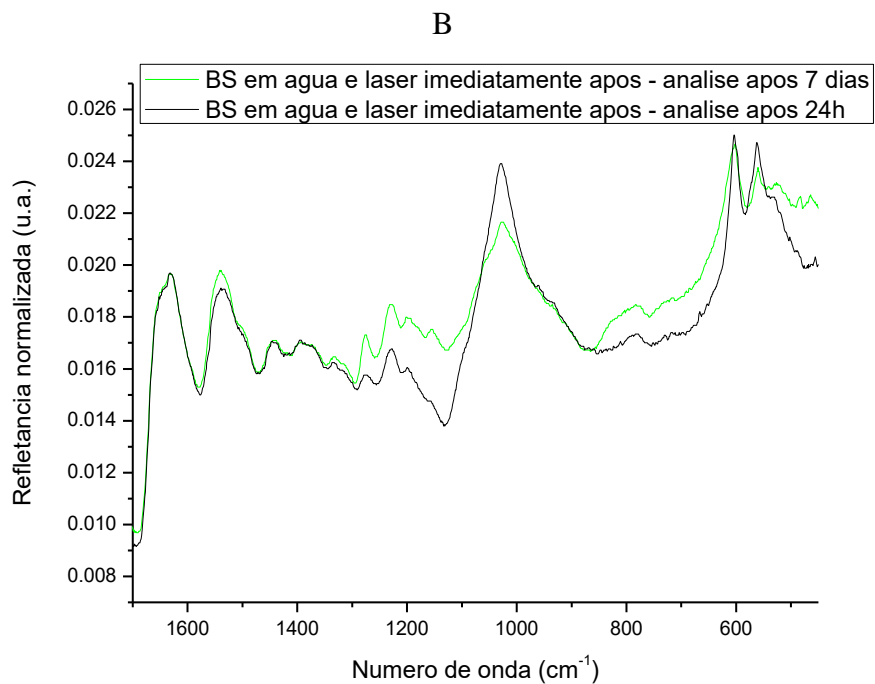
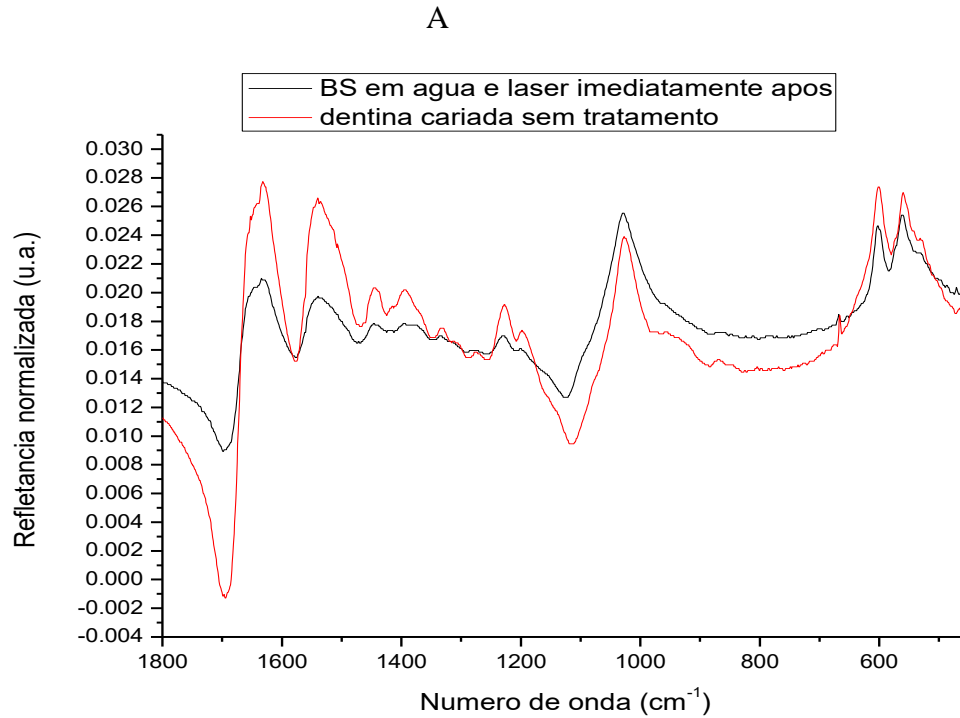


Fonte: autor.

Na Figura 17B, por sua vez, observa-se que, após 7 dias de imersão em saliva artificial, as bandas correspondentes às ligações de siloxano (Si-O-Si em aproximadamente  $800\text{ cm}^{-1}$ ), da amida II e da amida III apresentam maior intensidade quando comparadas as análogas após 24 horas. Possivelmente, o aumento na intensidade da primeira banda está relacionado à formação de uma camada rica em sílica que é capaz de absorver íons da saliva artificial em que a dentina estava imersa. Outra possibilidade seria a maior formação de hidroxiapatita carbonatada ou outra fase cristalina, tal como fosfato tetracálcico, após 7 dias, devido ao aumento da intensidade da banda correspondente ao  $\nu_2$  carbonato<sup>151</sup>; contudo, não é possível notar aumento na intensidade de qualquer uma das bandas correspondentes a ligações fosfato, o que sugere que esta segunda hipótese pode não ter ocorrido. A segunda e terceira bandas referentes às amidas II e III, por sua vez, podem estar associadas à ligação do colágeno ao biomaterial<sup>151,152</sup>, ou podem evidenciar a dissolução do biomaterial na saliva artificial. Contudo, nota-se também a diminuição na intensidade da banda entre  $950\text{ cm}^{-1}$  e  $1100\text{ cm}^{-1}$  após 7 dias. Esta região compreende tanto a banda de absorção de estiramento ( $\nu_3$ ) fosfato (entre  $1350\text{ cm}^{-1}$  e  $1080\text{ cm}^{-1}$ ) quanto ligação tetrahédrica do siloxano ( $1175\text{ cm}^{-1}$  a  $710\text{ cm}^{-1}$ )<sup>151</sup>. Desta maneira, pode-se sugerir que tenha havido uma dissolução do siloxano em 7 dias, comprovando o processo de devitrificação do biomaterial, ou uma perda do biomaterial que estava sobre a superfície após 7 dias, o que refletiria na diminuição no conteúdo de fosfato.

A banda de siloxano (Si-O-Si,  $800\text{ cm}^{-1}$ ) está relacionada à formação de uma camada rica em sílica, que é apta a incorporar íons de saliva artificial ao qual a dentina estava imersa. É importante mencionar que essa alteração é compatível com os mecanismos descritos no estágio 2 (Estágio 2: com a continuidade da troca iônica e o aumento do pH, ligações de siloxano (Si-O-Si) são atacadas por íons hidroxila). Quando todas as quatro ligações de um único átomo de silício são quebradas, sílica solúvel ( $\text{Si(OH)}_4$ ) é liberada do material para a solução. Isto aumenta o número de grupos silanol na interface vidro/solução. Ainda, é possível observar modificações compatíveis com o estágio 3, na qual ocorre a condensação e a polimerização dos grupos silanol que resulta na formação de uma camada rica em sílica capaz de absorver íons da solução, no caso, da saliva, que auxiliariam na formação de hidroxiapatita carbonatada ou outra fase de fosfato de cálcio<sup>24</sup>. A literatura reporta que a formação da camada de hidroxiapatita carbonatada a partir da dissolução do Biosilicato® ocorre em 24 horas<sup>24,148,149,151</sup>. Os resultados aqui exibidos, no entanto, demonstram que a dissolução total do biomaterial em questão, na metodologia empregada neste estudo, provavelmente ocorreria em um tempo maior do que 7 dias para este grupo experimental.

Figura 17: Média dos espectros de FTIR na região compreendida entre 1700 e 450  $\text{cm}^{-1}$ , de amostras de dentina cariada sem tratamento (G1) e após tratamento com Biosilicato® veiculado em água destilada e irradiação laser imediatamente após (G5). A = análise após 24h; B = análise após 7 dias. Espectros normalizados vetorialmente.

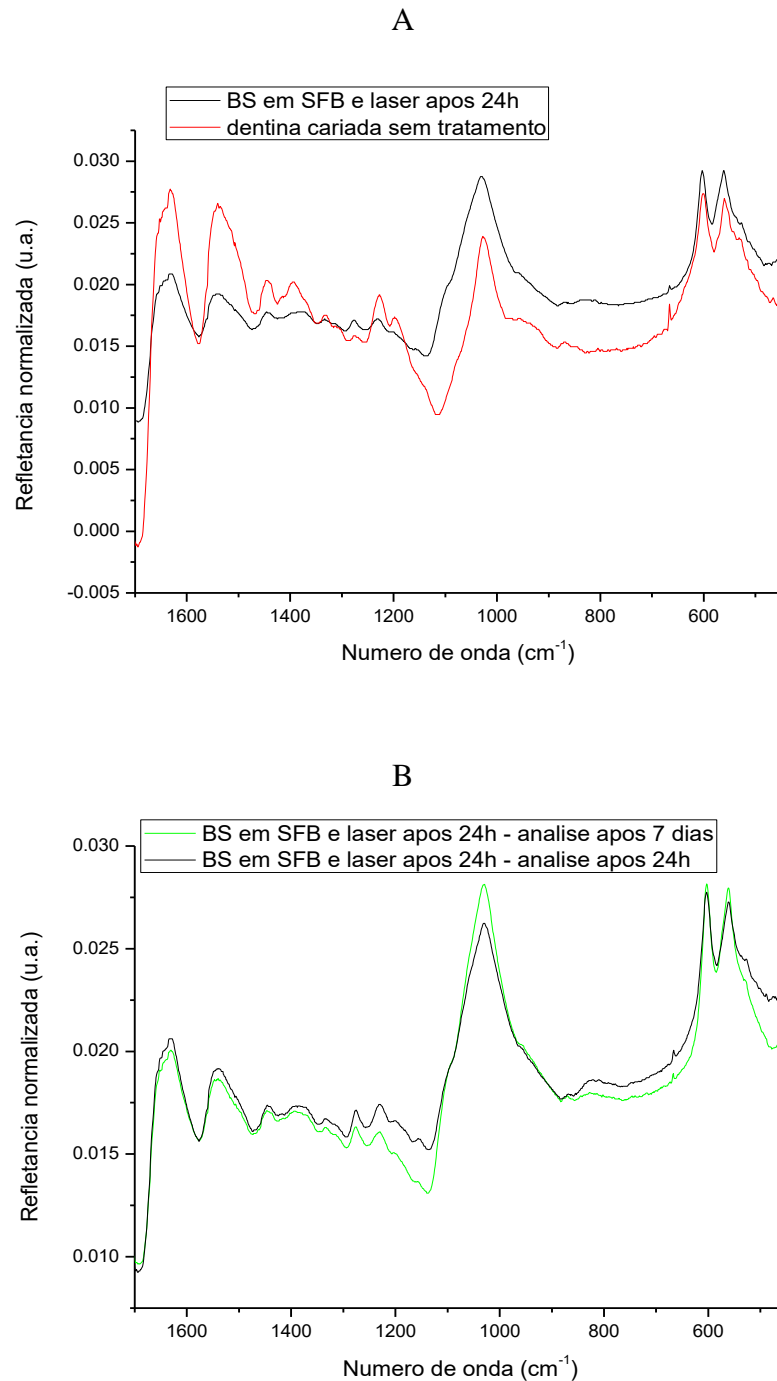


Fonte: autor.

A Figura 18 mostra os espectros médios, na região compreendida entre 1700 e 450  $\text{cm}^{-1}$ , de amostras de dentina cariada sem tratamento (G1) e após tratamento com Biosilicato<sup>®</sup> veiculado em soro fetal bovino com posterior irradiação com laser de Nd:YAG (G6). É possível observar que, após os tratamentos, as intensidades das bandas atribuídas à matriz orgânica (amidas I, II e III) e também as correspondentes às vibrações  $\nu_3$  e  $\nu_4$  do carbonato da dentina estão reduzidas em relação às correspondentes na dentina cariada sem tratamento (Figura 18A), o que também sugere o recobrimento da dentina parcialmente desmineralizada pelo biomaterial, o qual se manteve após a irradiação laser, ou ao efeito térmico da irradiação que promoveu desnaturação do conteúdo orgânico e evaporação de água e carbonato da dentina<sup>17,18</sup>. Além disso, nota-se que a banda de fosfato  $\nu_3$  apresenta-se mais larga e mais intensa após o tratamento, o que sugere provável formação de hidroxiapatita após tratamento. Ainda, nota-se maior intensidade das bandas 560  $\text{cm}^{-1}$  e 602  $\text{cm}^{-1}$  após o tratamento. Tais achados sugerem que houve o início de uma provável devitrificação do biomaterial após irradiação laser, considerando que as bandas supracitadas correspondem à ligação de dobramento da ligação fosfato (560  $\text{cm}^{-1}$  da fase amorfa e 602  $\text{cm}^{-1}$  da fase cristalina).

Na figura 18B observa-se que as intensidades das amidas I e II e do carbonato  $\nu_3$  e  $\nu_4$  são praticamente idênticas após 7 dias, o que sugere que o material não foi perdido para a saliva, mas continua retido sobre a superfície da dentina, recobrinho-a. Contudo, observa-se aumentos nas intensidades das bandas correspondentes às vibrações de fosfato  $\nu_3$  e tripleto (bandas com picos em 560 e 602  $\text{cm}^{-1}$ ) após 7 dias de imersão em saliva quando comparado ao espectro médio após 24 horas de imersão em saliva, o que sugere maior presença de hidroxiapatita sobre a dentina após 1 semana de tratamento, comprovando a bioatividade do material. Além disso, é possível notar a redução na intensidade da banda compreendida entre 711  $\text{cm}^{-1}$  e 881  $\text{cm}^{-1}$  após 7 dias, o que corresponde à vibração referente ao estiramento  $\nu_2$  do carbonato (indicativo de substituição do tipo A e B na apatita carbonatada) e/ou superposição da banda referente ao estiramento das ligações Si-O-Si (siloxano) do biomaterial. Tal achado novamente reforça a formação de uma camada de hidroxiapatita sobre a dentina parcialmente desmineralizada em 7 dias de imersão em saliva, sendo comprovada pela redução da camada de sílica evidenciada pelo siloxano. Desta maneira, sugere-se que o processo de devitrificação do biomaterial continuou ocorrendo após 1 semana de tratamento.

Figura 18: Média dos espectros de FTIR na região compreendida entre 1700 e 450  $\text{cm}^{-1}$ , de amostras de dentina cariada sem tratamento (G1) e após tratamento com Biosilicato® veiculado em soro fetal bovino e irradiação laser após 24h (G6). A = análise após 24h; B = análise após 7 dias. Espectros normalizados vetorialmente.

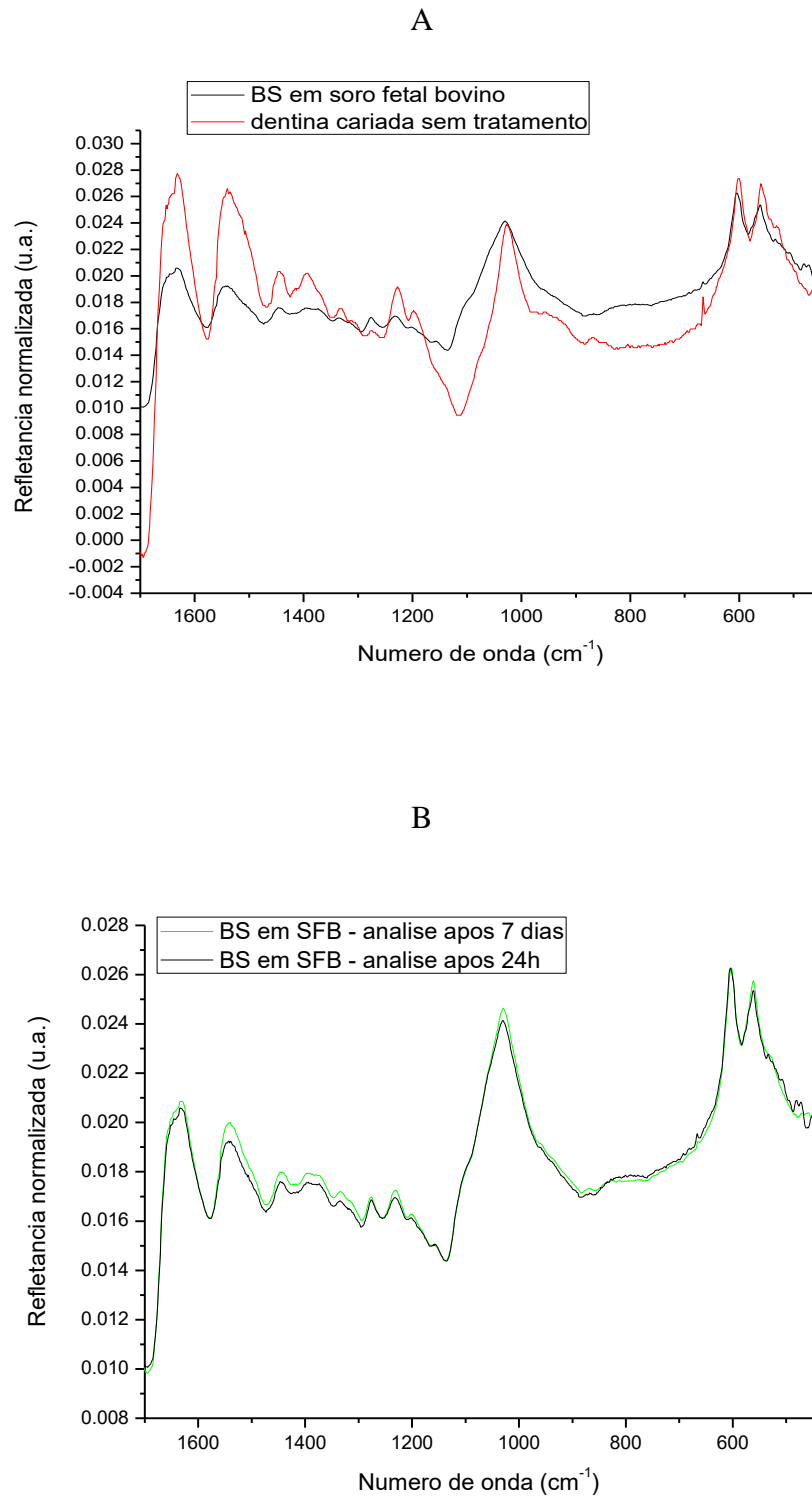


Fonte: autor.

A Figura 19 mostra os espectros médios, na região compreendida entre 1700 e 450  $\text{cm}^{-1}$ , de amostras de dentina cariada sem tratamento (G1) e após tratamento com Biosilicato<sup>®</sup> veiculado em soro fetal bovino, sem irradiação com laser de Nd:YAG (G7). Observa-se que, após os tratamentos, as intensidades das bandas atribuídas à matriz orgânica (amidas I, II e III) e das vibrações  $\nu_3$  e  $\nu_4$  do carbonato estão reduzidas em relação às correspondentes na dentina cariada sem tratamento (Figura 19A), o que novamente sugere o recobrimento da dentina parcialmente desmineralizada pelo biomaterial. Além disso, nota-se que a banda de fosfato  $\nu_3$  apresenta-se mais larga, o que reforça a possibilidade da formação inicial de hidroxiapatita. Na figura 19B observa-se que as intensidades de todas as bandas de absorção avaliadas se apresentam praticamente inalteradas após 7 dias de imersão em saliva artificial, ou seja, tal achado sugere não ter havido ação adicional do biomaterial sobre a dentina neste período.



Figura 19: Média dos espectros de FTIR na região compreendida entre 1700 e 450  $\text{cm}^{-1}$ , de amostras de dentina cariada sem tratamento (G1) e após tratamento com Biosilicato® veiculado em soro fetal bovino (G7). A = análise após 24h; B = análise após 7 dias. Espectros normalizados vetorialmente.

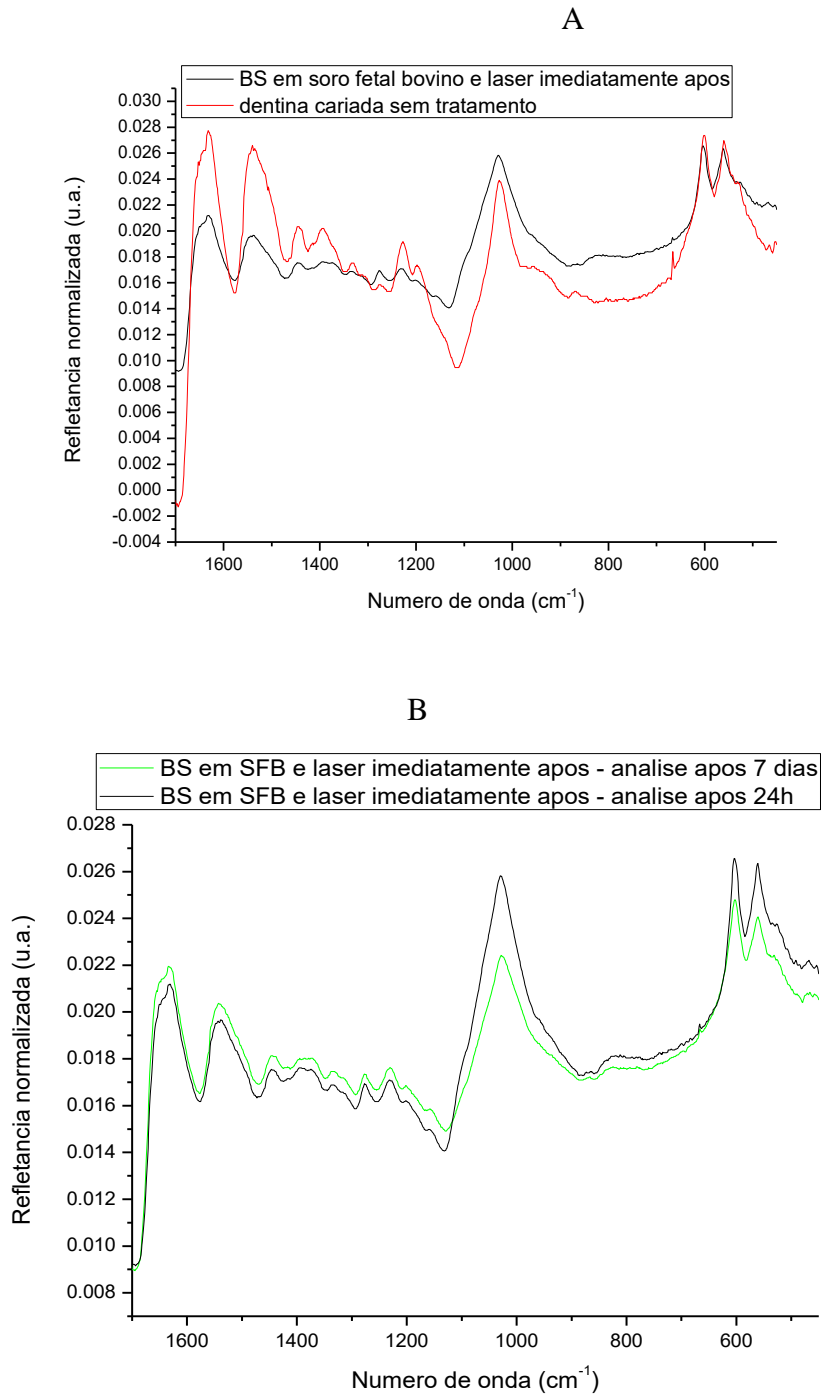


Fonte: autor.

A Figura 20 mostra os espectros médios, na região compreendida entre 1700 e 450  $\text{cm}^{-1}$ , de amostras de dentina cariada sem tratamento (G1) e após tratamento com o Biosilicato<sup>®</sup> veiculado em soro fetal bovino com posterior irradiação imediata com laser de Nd:YAG (G8). É possível observar novamente que, após os tratamentos, as intensidades das bandas atribuídas à matriz orgânica (amidas I, II e III), assim como as  $\nu_3$  e  $\nu_4$  do carbonato, estão reduzidas em relação às correspondentes na dentina cariada sem tratamento (Figura 20A), o que novamente corrobora o recobrimento da dentina parcialmente desmineralizada pelo biomaterial ou os efeitos térmicos promovidos pela irradiação laser na dentina. Além disso, nota-se que a banda de fosfato  $\nu_3$  e de carbonato  $\nu_2$  (ou do siloxano, que estão sobrepostas na mesma região) apresentam-se aparentemente mais largas e com picos de maior intensidade, o que pode sugerir a formação de hidroxiapatita carbonatada sobre a superfície.

Na figura 20B, observa-se que um pequeno aumento das intensidades das bandas correspondentes ao conteúdo orgânico da dentina (amidas I, II e III) e do carbonato  $\nu_3$  e  $\nu_4$  após 7 dias, o que sugere que tenha havido uma pequena dissolução do biomaterial em saliva no período de uma semana. Ainda, é possível notar que as intensidades das bandas de absorção correspondentes às vibrações fosfato  $\nu_3$  e tripleto, assim como a banda correspondente à vibração  $\nu_2$  do carbonato (ou do siloxano, que estão sobrepostas na mesma região) estão diminuídas após 7 dias quando comparadas às intensidades observadas após 24 horas, o que sugere novamente corrobora ter havido uma dissolução do biomaterial após 7 dias.

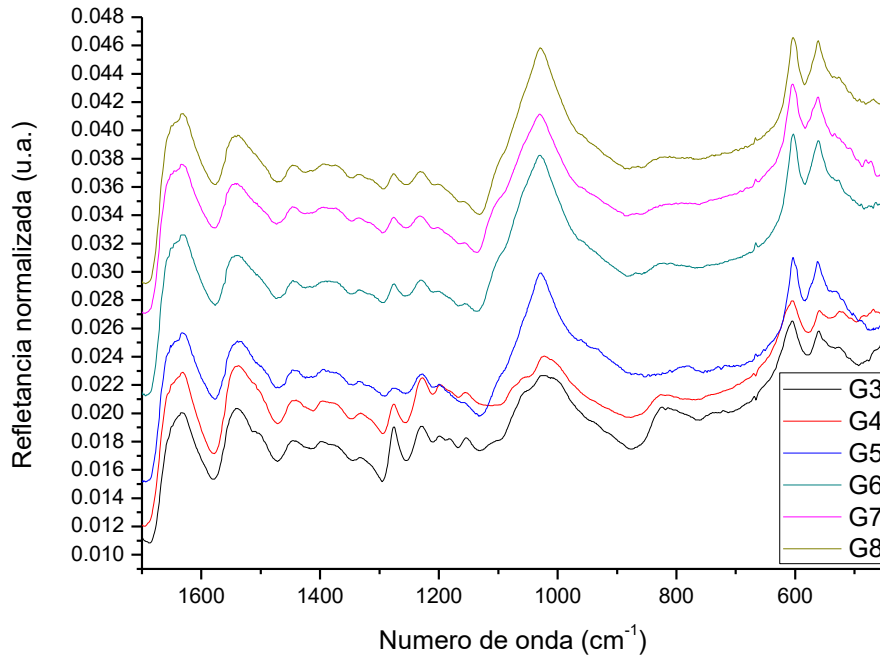
Figura 20: Média dos espectros de FTIR na região compreendida entre 1700 e 450  $\text{cm}^{-1}$ , de amostras de dentina cariada sem tratamento (G1) e após tratamento com Biosilicato® veiculado em soro fetal bovino e irradiação laser imediatamente após (G8). A = análise após 24h; B = análise após 7 dias. Espectros normalizados vetorialmente.



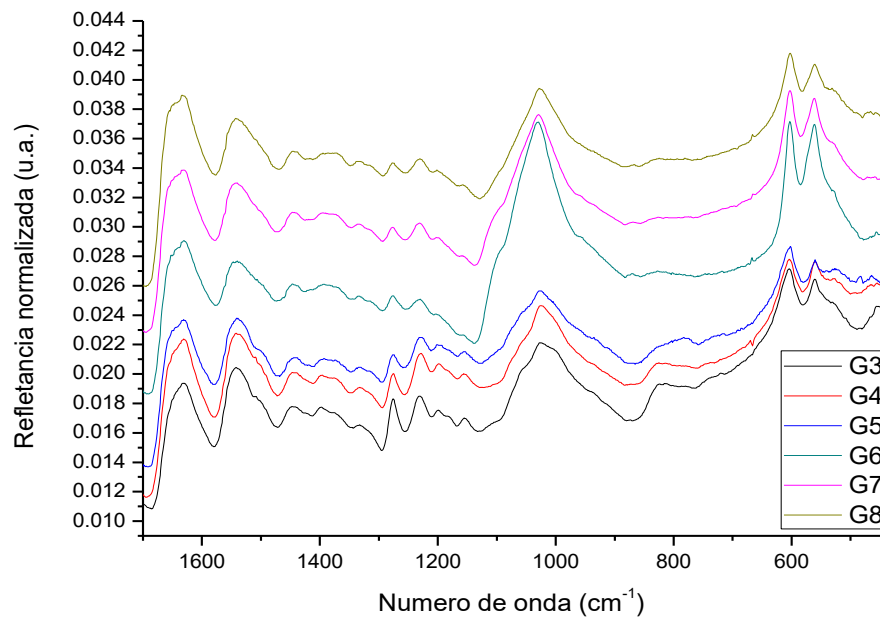
Fonte: autor.

A Figura 21 mostra os espectros médios, na região compreendida entre 1700 e 450  $\text{cm}^{-1}$ , de todos os grupos experimentais propostos neste estudo. É possível observar que nos grupos tratados com Biosilicato<sup>®</sup> condicionado em soro fetal bovino (G6, G7 e G8) a banda de 860  $\text{cm}^{-1}$  (estiramento do carbonato ou do siloxano) é menos intensa do que nos grupos tratados com Biosilicato<sup>®</sup> veiculado em água deionizada. Além disso, nestes grupos, observa-se uma maior intensidade das bandas correspondentes às vibrações fosfato  $\nu_3$  e tripleto o que sugere que o soro fetal bovino parece facilitar a bioatividade do Biosilicato, o que é evidenciado pelo aumento da intensidade das bandas correspondentes à fase cristalina e diminuição das bandas correspondentes à fase amorfa do biomaterial. Tal fato se repete após 7 dias de avaliação. Este achado corrobora estudo anterior<sup>148</sup>, refletindo que o soro fetal bovino aumenta a bioatividade do Biosilicato<sup>®</sup>. Desta forma, este parece ser o melhor método de acondicionamento do biomaterial visando futura aplicação clínica. Ainda, pelas análises de FTIR já apresentadas e pela análise da Figura 21, pode-se inferir que a irradiação com laser de Nd:YAG pode auxiliar na bioatividade do material, porém se for efetuada após 24 horas (grupo G6).

Figura 21: Média dos espectros de FTIR na região compreendida entre 1700 e 450  $\text{cm}^{-1}$ , de amostras de dentina cariada após todos os tratamentos propostos com Biosilicato® (grupos G3 a G8). A = análise após 24h; B = análise após 7 dias. Espectros normalizados vetorialmente.



A



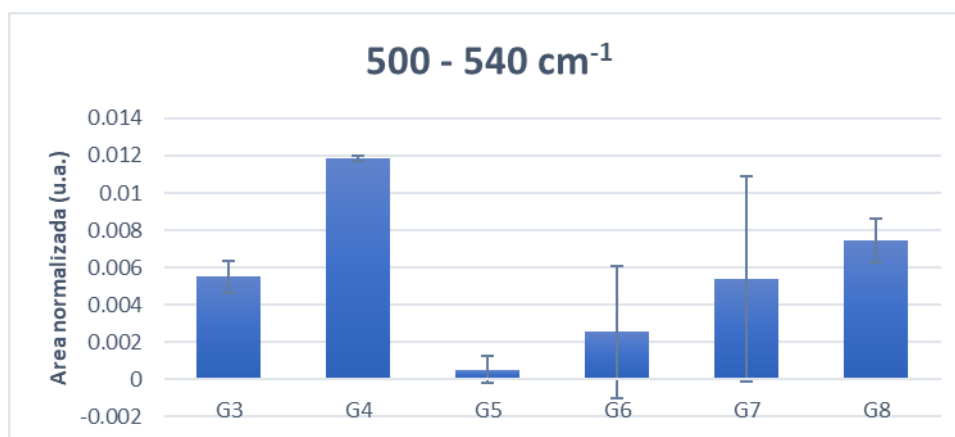
B

Fonte: autor.

As figuras 22, 23, 24, 25 e 26 mostram os resultados da análise semi-quantitativa efetuada para os grupos que utilizaram o Biosilicato®, ou seja, grupos G3, G4, G5, G6, G7 e G8, após 24 horas dos tratamentos. Estes resultados corroboram a formação de apatita quando o Biosilicato® é veiculado ao soro fetal bovino.

Na análise da Figura 22, é possível notar aumento na intensidade da banda entre 500-540  $\text{cm}^{-1}$  no grupo G4 em relação aos demais; ainda, nota-se que o grupo G5 foi o que apresentou menor intensidade desta banda. Esta banda refere-se ao conteúdo de  $\text{HPO}_4^{2-}$  ou de Si-O-Si (estiramento siloxano), o que indica uma fase amorfa do material. Desta forma, pode-se inferir que o grupo G4 (Biosilicato® em água sem irradiação laser) foi o que apresentou menor bioatividade do material, enquanto que o grupo G5 (Biosilicato® em água com irradiação laser imediatamente após) apresentou a maior bioatividade. Contudo, ressalta-se que as médias obtidas pelos grupos G5, G6 e G7 não são diferentes entre si, ou seja, todos estes grupos apresentaram bioatividade similares, quando consideramos a banda entre 500 a 540  $\text{cm}^{-1}$ .

Figura 22: Médias das áreas normalizadas sob a banda de absorção localizada na faixa entre 500 a 540  $\text{cm}^{-1}$  (vibração de  $\text{HPO}_4^{2-}$ ) dos grupos G3 a G8, 24 horas após os tratamentos. As barras identificam desvio-padrão.

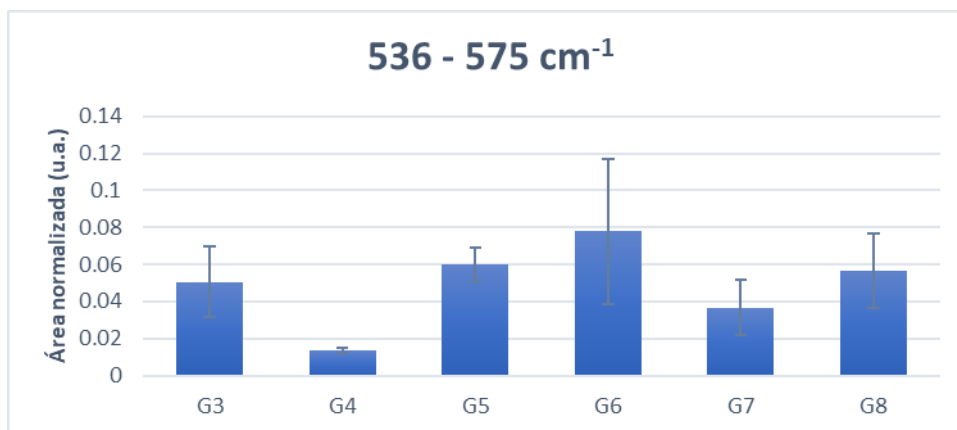


Fonte: autor.

A Figura 23 mostra as médias das áreas sobre a banda de absorção localizada na faixa entre 536 a 575  $\text{cm}^{-1}$  (banda 1 do tripleto do  $\text{PO}_4$ ), em que é possível observar maior quantidade no grupo G6 (Biosilicato® em SFB com irradiação laser 24 horas após) e menor no grupo G4, o que reforça a afirmação de que tanto o SFB quanto a irradiação laser

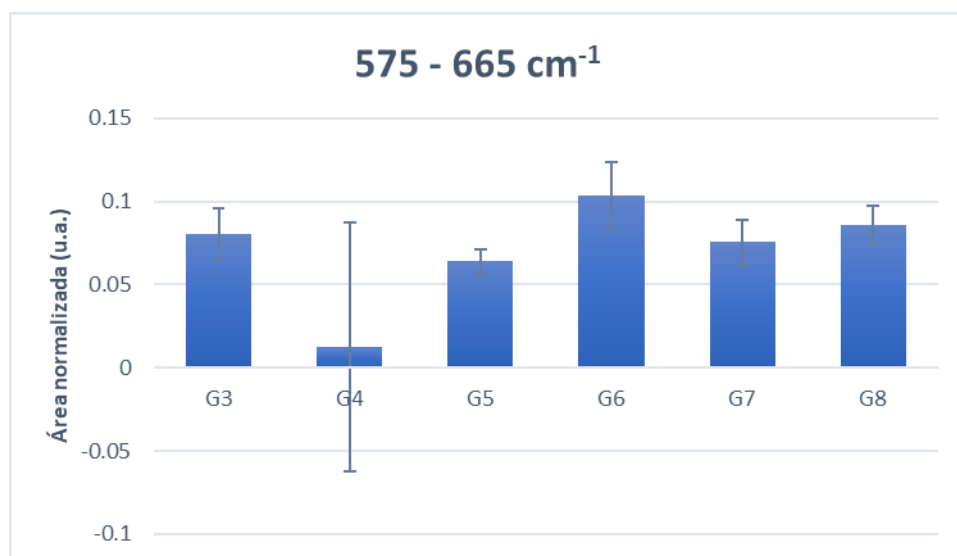
melhoram a bioatividade do material. Quando consideramos a banda de absorção localizada na faixa entre 575 a 665  $\text{cm}^{-1}$  (banda 2 do tripleto do  $\text{PO}_4$ , Figura 24), não é possível observar diferença significativa entre os grupos experimentais.

Figura 23: Médias das áreas normalizadas sob a banda de absorção localizada na faixa entre 536 a 575  $\text{cm}^{-1}$  (banda 1 do tripleto do  $\text{PO}_4$ ) dos grupos G3 a G8, 24 horas após os tratamentos. As barras identificam desvio-padrão.



Fonte: autor.

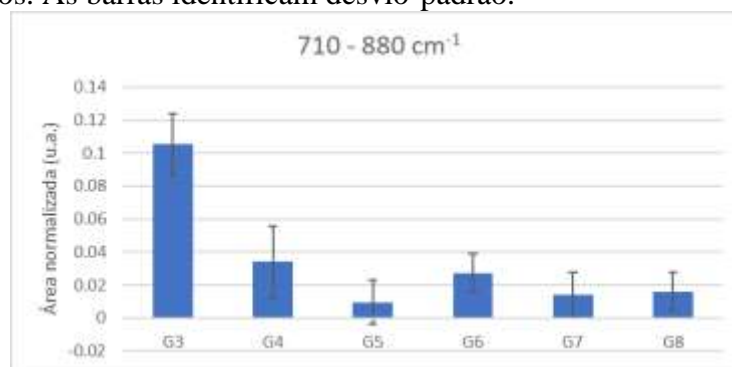
Figura 24: Médias das áreas normalizadas sob a banda de absorção localizada na faixa entre 575 a 665  $\text{cm}^{-1}$  (banda 2 do tripleto do  $\text{PO}_4$ ) dos grupos G3 a G8, 24 horas após os tratamentos. As barras identificam desvio-padrão.



Fonte: autor.

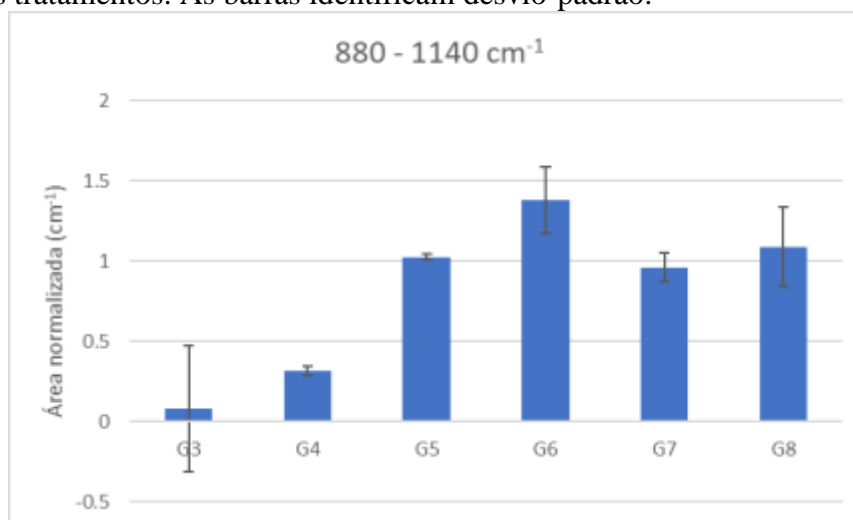
Na análise da Figura 25, nota-se que o grupo G3 (Biosilicato® em água com irradiação laser 24 horas após) foi o que apresentou maior quantidade de estiramento  $\nu_2$  do carbonato e/ou superposição da banda referente ao estiramento das ligações Si-O-Si do biomaterial quando comparada aos demais grupos experimentais, os quais não diferem entre si. Ainda, este mesmo grupo experimental apresentou a menor quantidade de vibrações de modo assimétrico  $\nu_3$  e  $\nu_1$  do fosfato quando comparado aos demais grupos experimentais (Figura 26). Estes achados sugerem a menor formação de hidroxiapatita carbonatada neste grupo experimental.

Figura 25: Médias das áreas normalizadas sob a banda de absorção localizada na faixa entre 710 a 880  $\text{cm}^{-1}$  (vibração referente ao estiramento  $\nu_2$  do carbonato e/ou superposição da banda referente ao estiramento das ligações Si-O-Si do biomaterial) dos grupos G3 a G8, 24 horas após os tratamentos. As barras identificam desvio-padrão.



Fonte: autor.

Figura 26: Médias das áreas normalizadas sob a banda de absorção localizada na faixa entre 880 a 1140  $\text{cm}^{-1}$  (vibrações de modo assimétrico  $\nu_3$  e  $\nu_1$  do fosfato) dos grupos G3 a G8, 24 horas após os tratamentos. As barras identificam desvio-padrão.



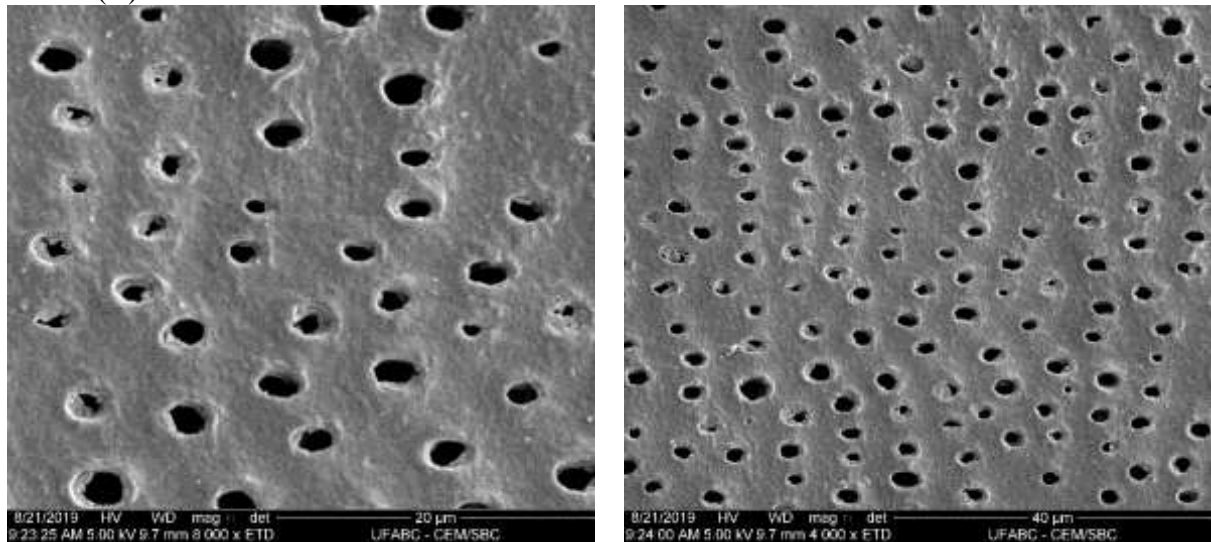
Fonte: autor.



#### 5.4. Análise morfológica da dentina após radioterapia, cárie e tratamentos propostos

A Figura 27 mostra eletromicrografias representativas de uma amostra do grupo G1 (sem tratamento) após imersão em saliva artificial por 24 horas. É possível observar uma superfície uniforme, com morfologia dos túbulos dentinários expostos, distribuídos de forma não homogênea, devido ao processo de carie induzido na dentina<sup>80,159</sup>.

Figura 27: Eletromicrografias representativas das amostras do grupo G1 (amostras sem tratamento) após 24 horas imersas em saliva artificial. Magnificação original: 8000x (A) e 4000x (B).



A

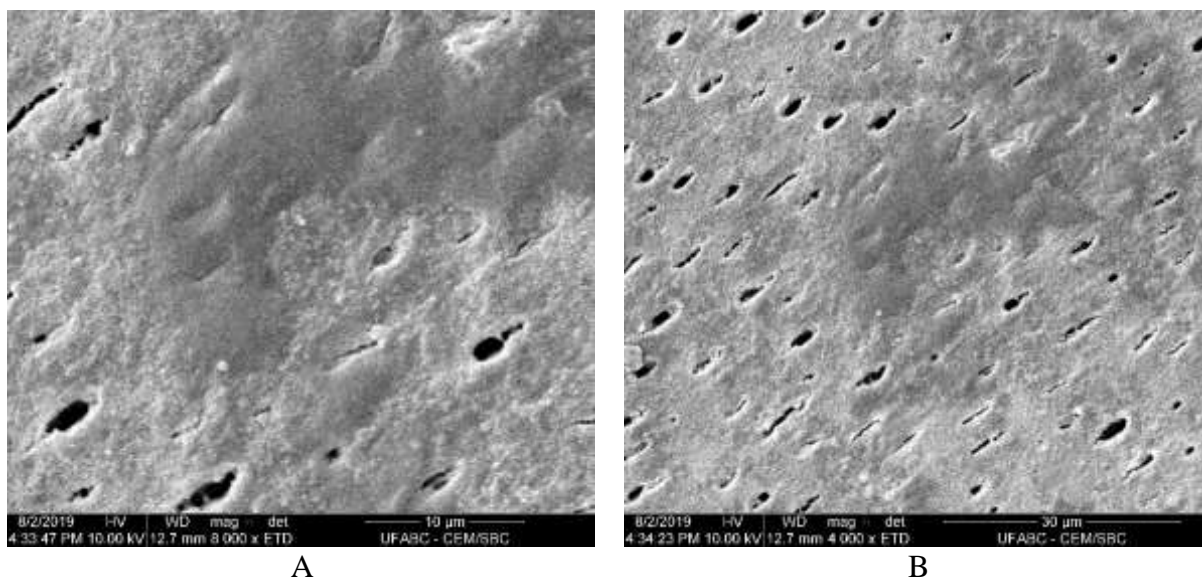
B

Fonte: autor.

A Figura 28 mostra eletromicrografias representativas de uma amostra do grupo G2 (tratadas com laser de Nd:YAG) após imersão em saliva artificial por 24 horas. É possível observar a formação de uma camada de selamento superficial dos túbulos dentinários; a morfologia evidencia a obliteração parcial dos túbulos dentinários e uma superfície com aspecto de derretimento e recristalização devido ao efeito térmico do laser, o que corrobora achados da literatura<sup>22</sup>. A literatura demonstra que a irradiação laser, sob parâmetros similares ao usado no presente estudo, pode também alterar o tamanho dos cristais de hidroxiapatita, assim como pode promover a formação de novas fases cristalinas, tais como o fosfato tetracálcico e tricálcico nas fases alfa e beta. Em dentina radicular, contudo, estas análises precisam ser efetuadas em estudos posteriores para que tais alterações cristalográficas sejam confirmadas. Tais mudanças morfológicas encontradas no presente estudo sugerem aumentos

na temperatura superficial acima de 1100 °C, o que é compatível com a fusão e recristalização da hidroxiapatita superficial e concorda com a literatura<sup>71,74,76,78</sup>.

Figura 28: Eletromicrografias representativas das amostras do grupo G2 (amostras tratadas com laser de Nd:YAG) após 24 horas imersas em saliva artificial. Magnificação original: 8000x (A) e 4000x (B).



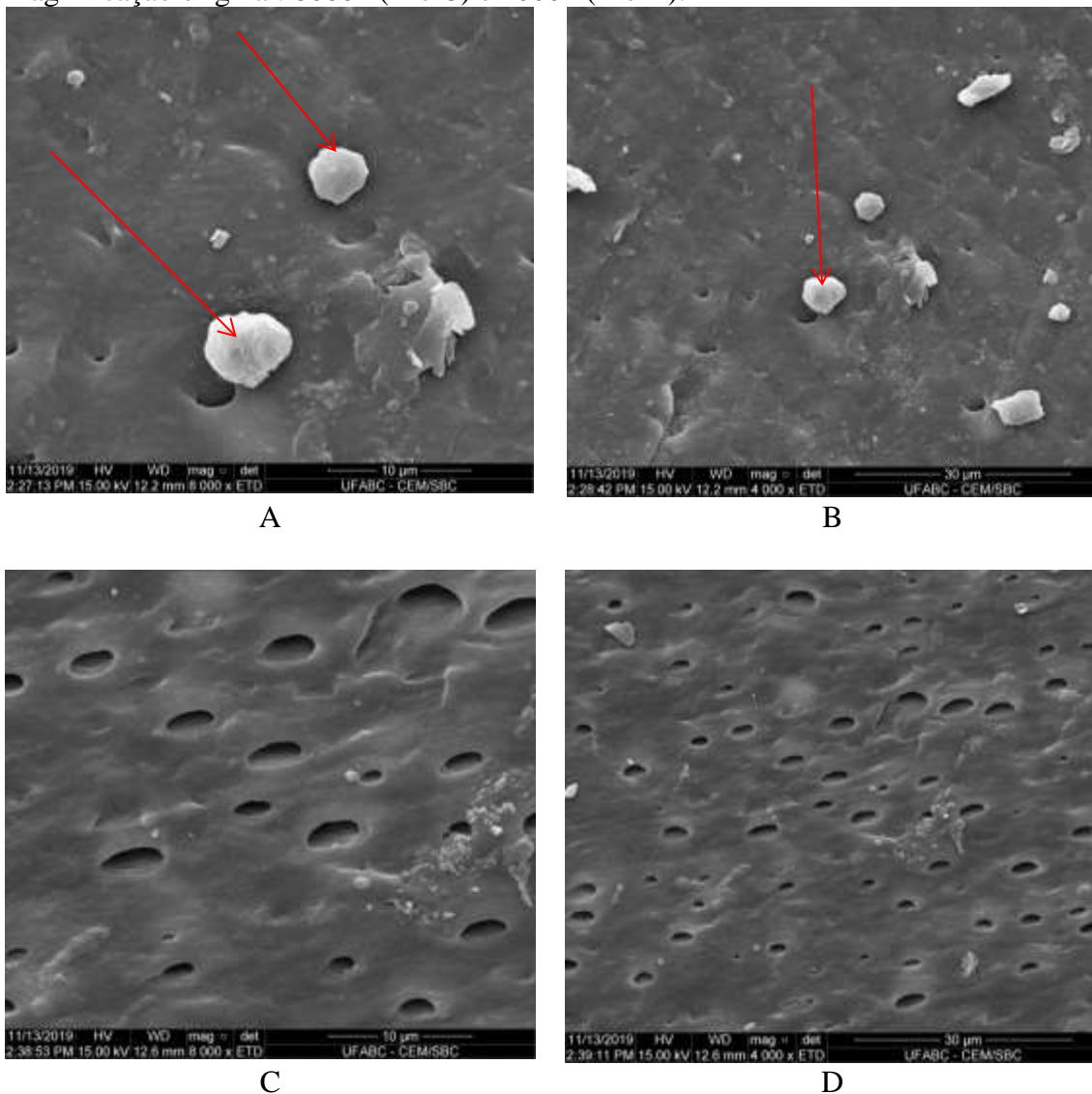
Fonte: autor.

A Figura 29 mostra eletromicrografias representativas de amostras do grupo G3 (tratadas com Biosilicato® veiculado em água destilada e irradiação laser após 24 horas) após imersão em saliva artificial por 24 horas (Figura 29 A e B) e por 7 dias (Figura 29 C e D). É possível observar que, nas figuras 29A e B, os túbulos dentinários estão quase que totalmente obliterados, com uma superfície não homogênea; ainda, há a presença do biomaterial não dissolvido (setas vermelhas), assim como a formação de aglomerados, localizados preferencialmente nas reentrâncias da superfície dentinária. Tal estado de aglomeração é favorecido provavelmente pela alta área de superfície do Biosilicato®. Se tais aglomerados fossem menores que o diâmetro dos túbulos dentinários, provavelmente ocasionaria a entrada do biomaterial nestes túbulos, favorecendo, assim, sua ação em profundidade e provavelmente a retenção do biomaterial. Ainda, vale ressaltar que a retenção inicial do biomaterial pode ter sido favorecida pela rugosidade da superfície promovida tanto pelo processo de preparo de amostras (lixamento) quanto pela indução da lesão de cárie.

Na figura 29C e D observa-se a formação de uma camada não uniforme que ainda recobre parcialmente os túbulos dentinários, com aparente menor quantidade de biomaterial

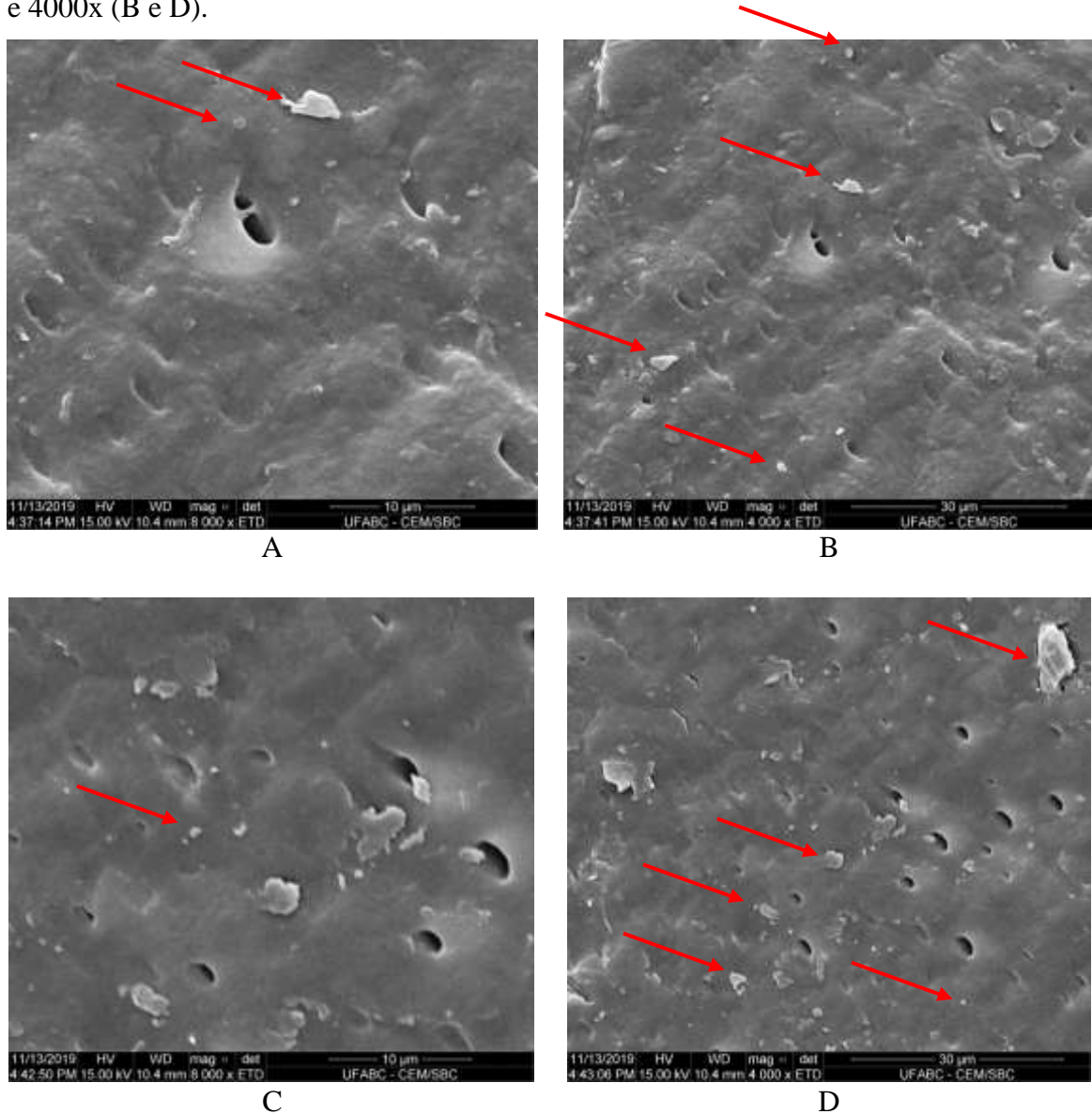
sobre a superfície quando comparada com as imagens da Figura 29A e B, sem a presença de grânulos do biomaterial. Tal achado sugere que o biomaterial tenha se dissolvido parcialmente na saliva artificial durante os 7 dias de imersão, e corrobora os achados do FTIR (Figura 15), que evidenciou uma leve diminuição dos picos correspondentes ao fosfato e carbonato após 7 dias em saliva artificial.

Figura 29: Eletromicrografias representativas das amostras do grupo G3 (amostras tratadas com Biosilicato® veiculado em água destilada e irradiação laser após 24 horas). As imagens 34 A e B referem-se às amostras após 24 horas de imersão em saliva artificial, enquanto as imagens 34 C e D referem-se às amostras após 7 dias de imersão em saliva artificial. Magnificação original: 8000x (A e C) e 4000x (B e D).



Fonte: autor.

Figura 30: Eletromicrografias representativas das amostras do grupo G4 (amostras tratadas com Biosilicato® veiculado em água destilada). As imagens A e B referem-se às amostras após 24 horas de imersão em saliva artificial, enquanto as imagens C e D referem-se às amostras após 7 dias de imersão em saliva artificial. Magnificação original: 8000x (A e C) e 4000x (B e D).



Fonte: autor.

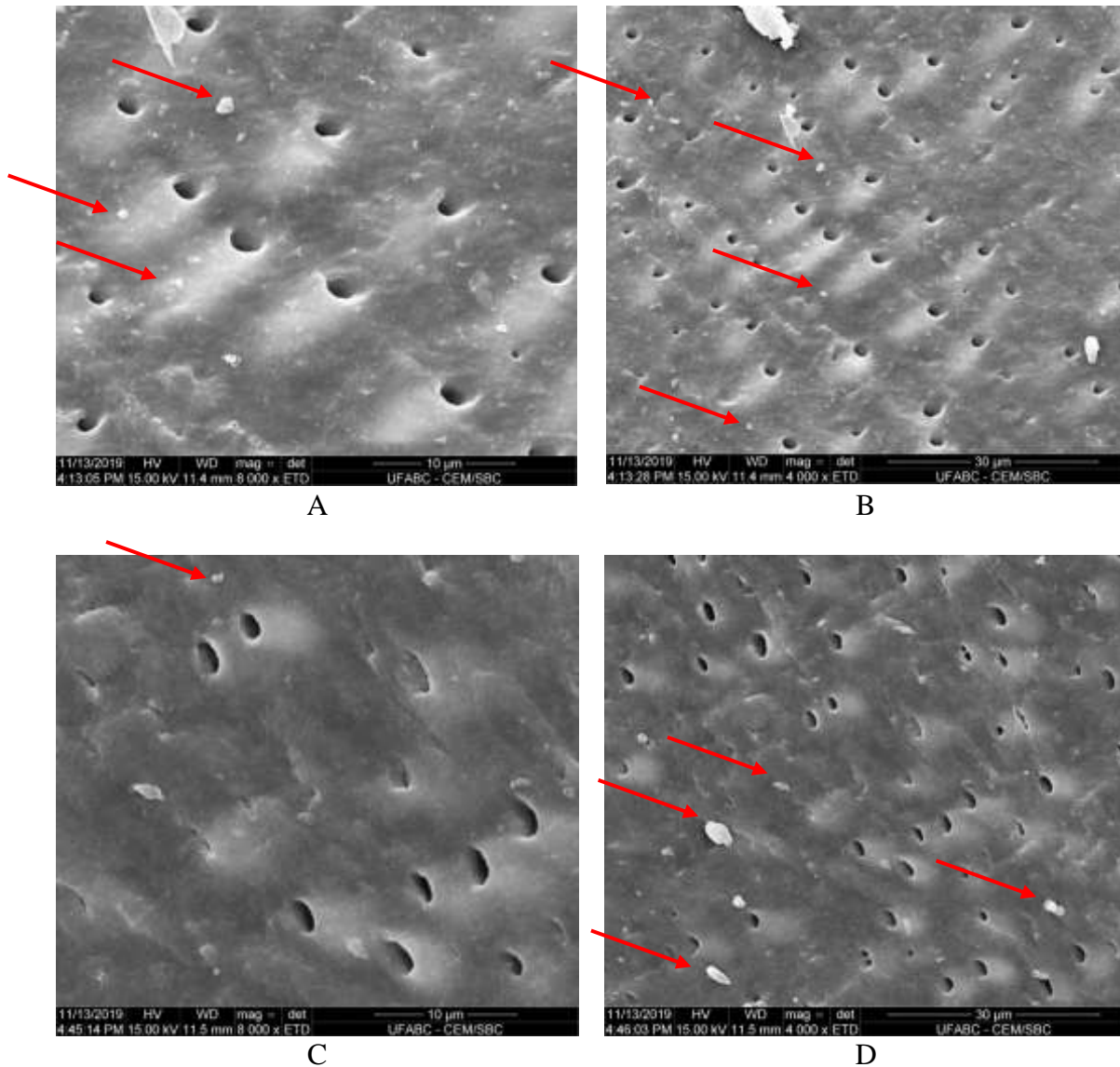
A Figura 30 mostra eletromicrografias representativas de amostras do grupo G4 (tratadas com Biosilicato® veiculado em água destilada) após imersão em saliva artificial por 24 horas (Figura 30 A e B) e por 7 dias (Figura 30 C e D). É possível observar obliteração parcial dos túbulos dentinários nos dois períodos avaliados, com a formação de uma camada de cobertura sobre que recobre a superfície da dentina, mantendo apenas poucos túbulos parcialmente expostos. É possível também observar a presença de algumas partículas sobre a superfície da dentina (setas). Não são observadas diferenças significativas entre as imagens

obtidas 24h e 7 dias em imersão em saliva, o que sugere retenção do biomaterial na dentina. Ainda, quando confrontamos com os resultados da análise composicional, observamos que o material retido teve maior conversão em hidroxiapatita carbonatada, por meio do aumento da intensidade dos picos de fosfato.

A Figura 31 mostra eletromicrografias representativas de amostras do grupo G5 (tratadas com Biosilicato® veiculado em água destilada e irradiação laser imediatamente após aplicação do Biosilicato®) após imersão em saliva artificial por 24 horas (Figura 36 A e B) e por 7 dias (Figura 31 C e D). É possível observar nas figuras 31A e B e nas figuras 31C e D uma superfície não homogênea, com túbulos dentinários parcialmente obliterados, porém mais expostos que a Figura 30 (tratadas com Biosilicato® veiculado em água destilada sem irradiação), com a presença de poucas partículas do biomaterial na superfície da amostra (setas). Provavelmente, a alta temperatura atingida durante a irradiação laser promoveu a evaporação da água na qual o Biosilicato® estava dissolvido e, com isso, ejetou também partículas do biomaterial.

Nestas imagens, também é possível notar que o biomaterial aparenta estar mais uniforme do que nas imagens anteriores, fenômeno ocorrido provavelmente a um amolecimento do material devido ao efeito térmico da irradiação laser. Este fato sugere que foram atingidas temperaturas que superam o ponto de transição vítrea do material; contudo, ao observarmos as imagens da Figura 31 C e D, notamos que este amolecimento não foi suficiente para alterar a viscosidade do material a ponto de promover uma entrada do mesmo nos túbulos dentinários, o que poderia facilitar a sua ancoragem no tecido. Tal achado corrobora também os achados da análise composicional (Figura 17), que sugerem que o material possa ter tido uma solubilização na saliva em 7 dias, evidenciada pela diminuição das intensidades dos picos correspondentes ao fosfato, diminuindo sua atividade e a quantidade disponível para atuar no tecido.

Figura 31: Eletromicrografias representativas das amostras do grupo G5 (amostras tratadas com Biosilicato® veiculado em água destilada e irradiação laser imediatamente após aplicação do Biosilicato®). As imagens 31 A e B referem-se às amostras após 24 horas de imersão em saliva artificial, enquanto as imagens 31 C e D referem-se às amostras após 7 dias de imersão em saliva artificial. Magnificação original: 8000x (A e C) e 4000x (B e D).



Fonte: autor.

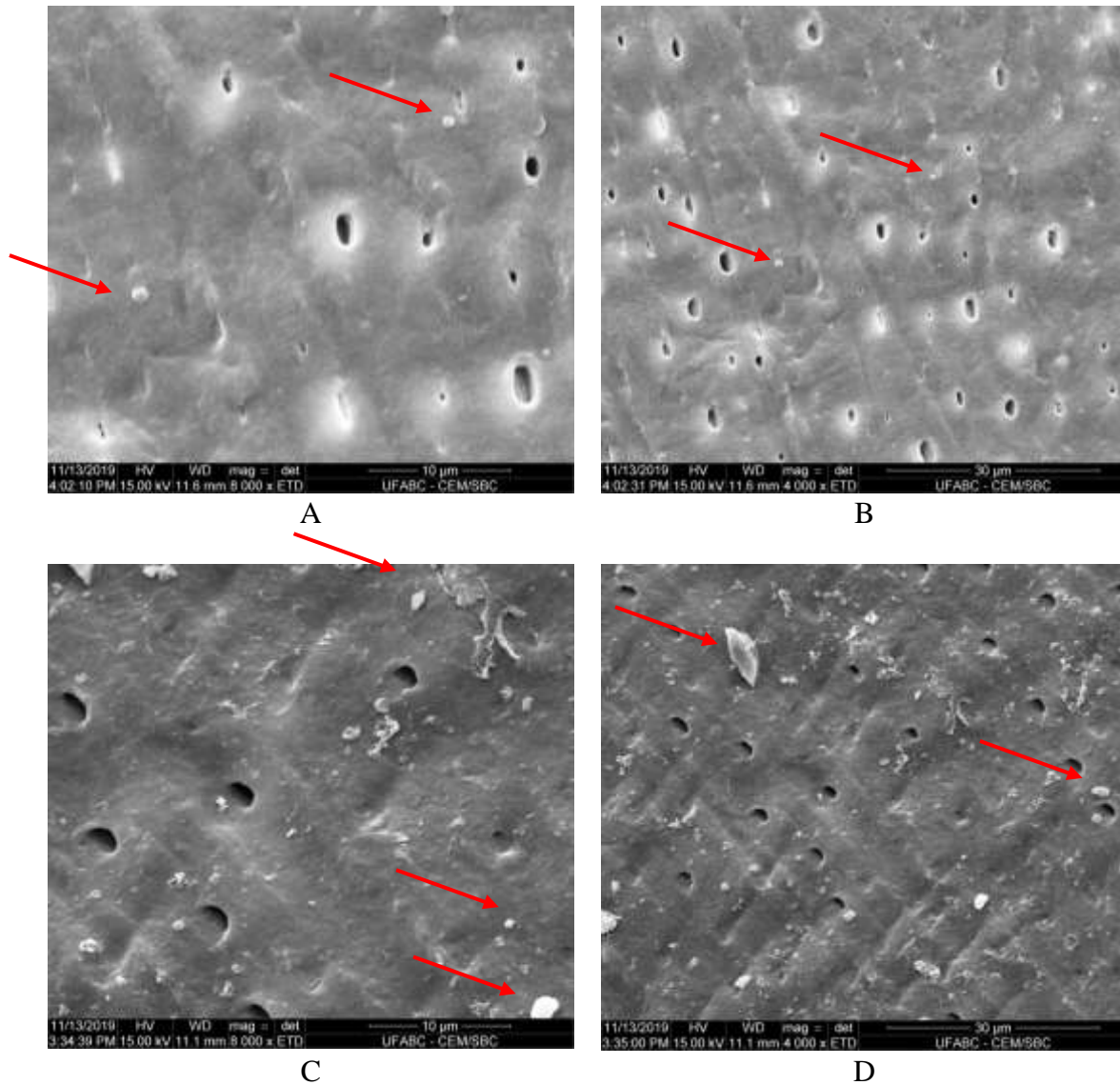
A Figura 32 mostra eletromicrografias representativas de amostras do grupo G6 (tratadas com Biosilicato® veiculado em soro fetal bovino e irradiação laser após 24 horas) após imersão em saliva artificial por 24 horas (Figura 32A e B) e por 7 dias (Figura 32 C e D). É possível observar obliteração parcial dos túbulos dentinários, o recobrimento da dentina com uma camada mais uniforme e a presença de pequenas partículas do material (setas). Tal achado também sugere a evaporação de parte do biomaterial pela irradiação laser



(provavelmente da porção aquosa do SFB), o que ejetou parte do Biosilicato®. Além disso, pode-se sugerir também um amolecimento do material devido à elevação de temperatura promovido pela irradiação laser. Após 7 dias, as imagens das Figuras 32 C e D não apresentam diferenças significativas, o que sugere que o material permaneceu retido na superfície. Ao confrontarmos com os resultados da análise por FTIR (Figura 18), observamos que se trata de um material rico em hidroxiapatita, ou seja, os achados sugerem que a irradiação laser efetuada após 24 horas de aplicação do biomaterial favorece a bioatividade e a retenção do mesmo; assim, ao se fazer a irradiação após 24 horas, já houve tempo suficiente para início de sua atividade, a qual foi aprimorada após irradiação. A presença de SFB, por sua vez, por conter diferentes componentes (ácidos graxos, fatores de crescimento, aminoácidos e vitaminas) que alteram o pH do meio, também potencializam a bioatividade.

A Figura 33 mostra eletromicrografias representativas de amostras do grupo G7 (tratadas com Biosilicato® veiculado em soro fetal bovino) após imersão em saliva artificial por 24 horas (Figura 33 A e B) e por 7 dias (Figura 33 C e D). É possível observar a presença de poucos túbulos dentinários expostos, com diâmetro reduzido, além da formação de uma camada uniforme com a presença de poucos grânulos do biomaterial (setas). Após 7 dias, as imagens também sugerem uma pequena dissolução do biomaterial por meio da maior quantidade de abertura de túbulos dentinários; contudo, a pouca presença de grânulos do biomaterial evidencia maior dissolução do mesmo. Contudo, ao confrontarmos com os resultados na análise composicional (Figura 19), observamos que esta provável redução de espessura do material não implica em redução de bioatividade, pois os picos correspondentes à hidroxiapatita carbonatada são mantidos após 7 dias.

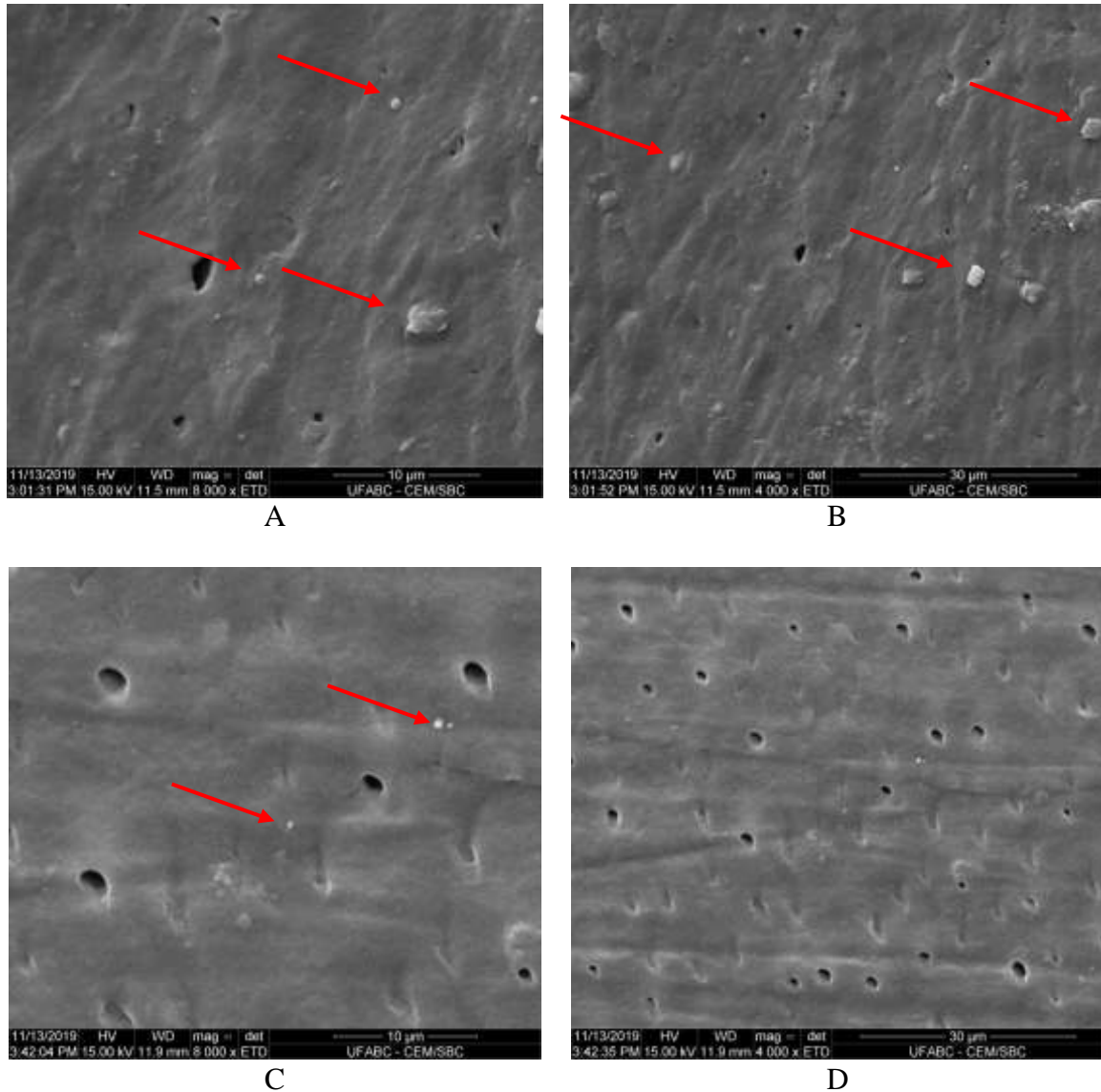
Figura 32: Eletromicrografias representativas das amostras do grupo G6 (amostras tratadas com Biosilicato® veiculado em soro fetal bovino e irradiação laser após 24 horas). As imagens 32 A e B referem-se às amostras após 24 horas de imersão em saliva artificial, enquanto que as imagens 32 C e D referem-se às amostras após 7 dias de imersão em saliva artificial. Magnificação original: 8000x (A e C) e 4000x (B e D).



Fonte: autor.



Figura 33: Eletromicrografias representativas das amostras do grupo G7 (amostras tratadas com Biosilicato® veiculado em soro fetal bovino). As imagens A e B referem-se às amostras após 24 horas de imersão em saliva artificial, enquanto as imagens C e D referem-se às amostras após 7 dias de imersão em saliva artificial. Magnificação original: 8000x (A e C) e 4000x (B e D).

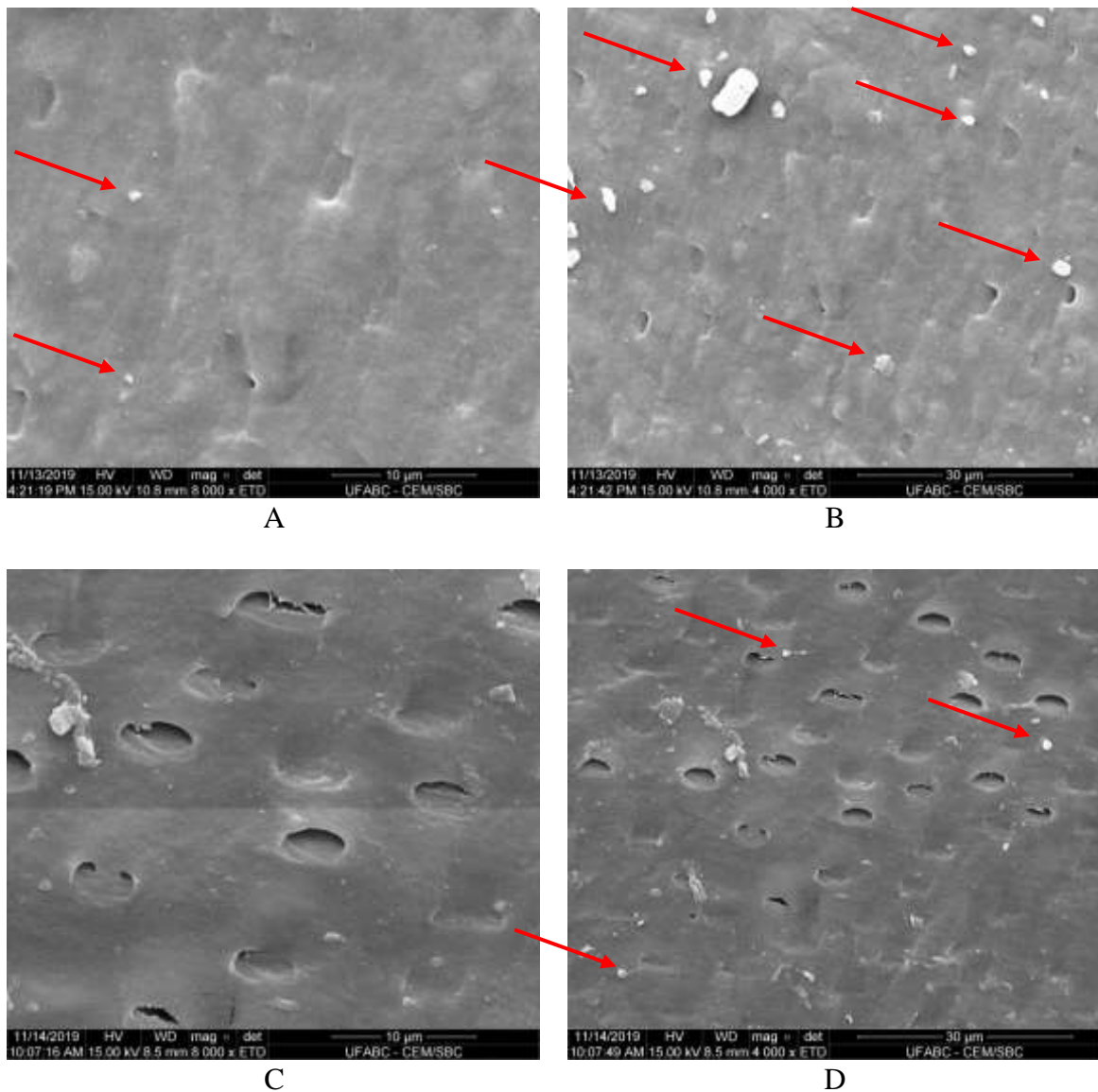


Fonte: autor.

A Figura 34 mostra eletromicrografias representativas de amostras do grupo G8 (tratadas com Biosilicato® veiculado em soro fetal bovino e irradiação laser imediatamente após aplicação do Biosilicato®) após imersão em saliva artificial por 24 horas (Figura 34 A e B) e por 7 dias (Figura 34 C e D). É possível observar a formação de uma camada uniforme sobre a superfície, com os túbulos dentinários cobertos quase em sua totalidade, e a presença e pequenos grânulos de biomaterial (setas). Após 7 dias, nota-se evidente dissolução do

biomaterial, com maior exposição dos túbulos dentinários, que se encontram também de diâmetro aumentado. Ainda, é possível notar a presença de grânulos do biomaterial (setas). Tais achados corroboram os resultados da análise composicional (Figura 20), que mostram claramente a dissolução do biomaterial na saliva após 7 dias por meio da diminuição expressiva das intensidades dos picos de fosfato.

Figura 34: Eletromicrografias representativas das amostras do grupo G8 (amostras tratadas com Biosilicato® veiculado em soro fetal bovino e irradiação laser imediatamente após aplicação do Biosilicato®). As imagens A e B referem-se às amostras após 24 horas de imersão em saliva artificial, enquanto as imagens C e D referem-se às amostras após 7 dias de imersão em saliva artificial. Magnificação original: 8000x (A e C) e 4000x (B e D).



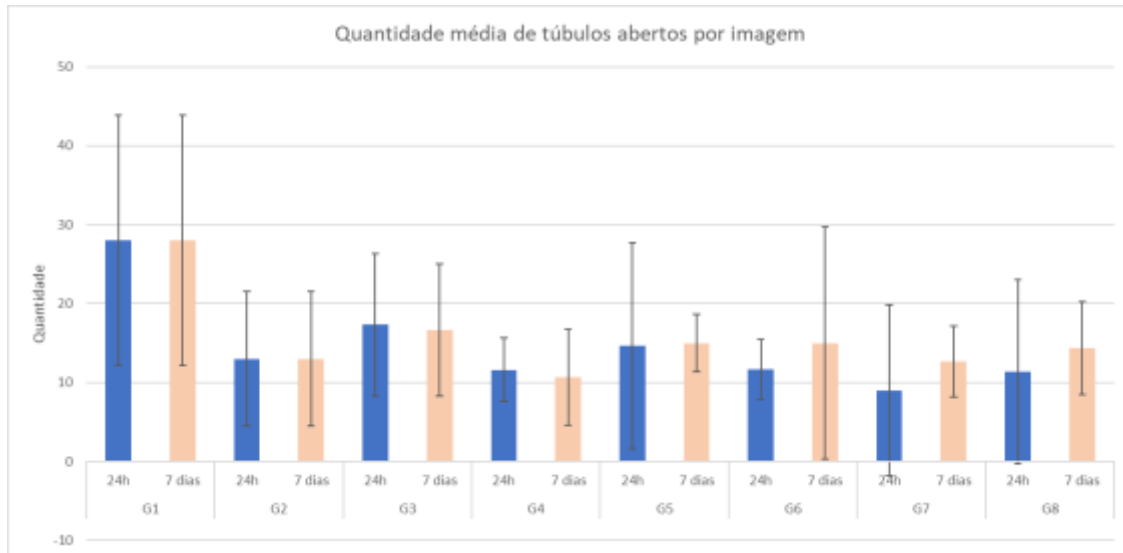
Fonte: autor.

Os resultados da análise morfológica também corroboram com as análises composicionais semi-quantitativas, nas quais podemos notar que o grupo G6 foi o que apresentou maior bioatividade e retenção que os demais grupos experimentais, por conter maior conteúdo de fosfato e menor conteúdo de siloxano quando comparado com os demais grupos experimentais (Figuras 23 a 26).

A figura 35 mostra a quantidade média de túbulos dentinários abertos por imagem de microscopia eletrônica analisada (todas as imagens sob magnificação original de 8000 x), com as respectivas barras de desvio-padrão. Nota-se que o grupo G1 (apenas com lesão de cárie) é o que possui maior quantidade de túbulos abertos, enquanto que o grupo G4 (Biosilicato® veiculado em água sem irradiação laser) é o que apresentou menor quantidade de túbulos expostos, com números muito próximos ao grupo G2 (apenas irradiado com laser de Nd:YAG). Tal fato é esperado, pois no grupo G1 temos apenas uma dentina exposta à solução desmineralizadora e, portanto, com lesão aparente de cárie incipiente, enquanto que os grupos experimentais de G3 a G8 possuem aplicação de biomaterial e, portanto, a dentina apresenta-se coberta por este. No grupo G2, a irradiação laser promoveu a fusão e recristalização da superfície da dentina, corroborando achados da literatura (MATOS *et al.*, 2012). Observa-se, também, que a alta dispersão dos dados reflete a não homogeneidade dos valores decorrentes dos tratamentos e acarreta ausência de diferença estatística significativa entre os grupos ( $p > 0,05$ ). De fato, foi possível observar, principalmente nos grupos tratados com Biosilicato®, que o material se distribui de forma irregular em todas as amostras avaliadas por MEV, nos quais parece ter maior deposição na periferia das amostras, havendo maior exposição de túbulos dentinários na região central. Este fato ocorreu em todas as amostras e persistiu mesmo após 7 dias de imersão em saliva artificial.

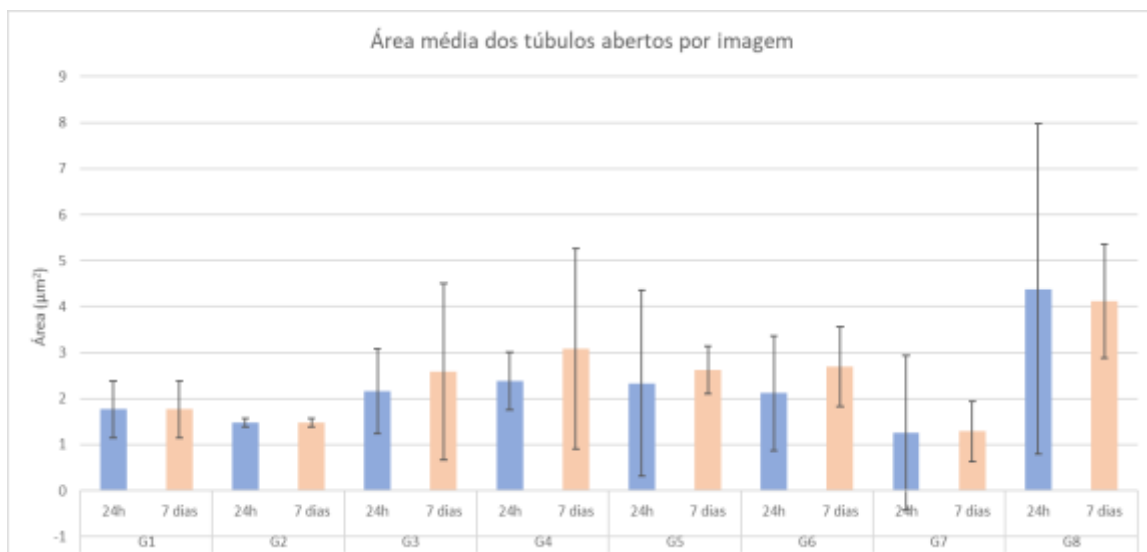
A Figura 36 ilustra a área média dos túbulos dentinários que se encontravam abertos em todas as eletromicrografias analisadas. É possível notar que o grupo G8 (Biosilicato® veiculado em soro fetal bovino e irradiação laser imediatamente após) é o que apresentou túbulos de maiores áreas, enquanto que o grupo G7 (Biosilicato® veiculado em soro fetal bovino sem irradiação laser) apresentou as menores áreas de túbulos expostos, seguido também pelo grupo G2 (apenas irradiado). Há grande dispersão de dados nos grupos tratados com Biosilicato®, o que indica grande variação também nas áreas dos túbulos em decorrência da presença do biomaterial. Também é possível notar que não há diferenças significativas entre as áreas após 24h e após 7 dias de imersão em saliva artificial para todos os grupos experimentais.

Figura 35 Quantidade média de túbulos dentinários abertos, por eletromicrografia de dentina, de todos os grupos experimentais após 24h e após 7 dias dos tratamentos propostos. As barras evidenciam desvio-padrão.



Fonte: autor.

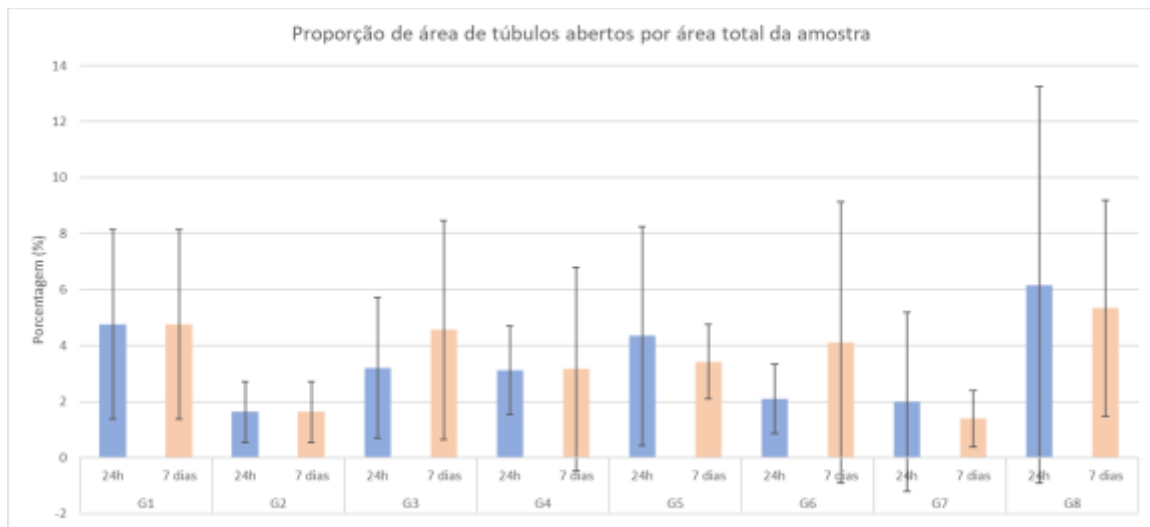
Figura 36 Áreas médias dos túbulos dentinários abertos, por eletromicrografia de dentina, de todos os grupos experimentais após 24h e após 7 dias dos tratamentos propostos. As barras evidenciam desvio-padrão.



Fonte: autor.

A Figura 37 ilustra as médias das proporções entre as áreas de todos os túbulos dentinários abertos pelas áreas totais da superfície da dentina presente em cada imagem de MEV. Observou-se uma menor proporção no grupo G2 (tratado apenas com laser) seguido do grupo G7 (Biosilicato® veiculado em soro fetal bovino sem irradiação laser), enquanto que o grupo G8 (Biosilicato® veiculado em soro fetal bovino e irradiação laser imediatamente após) é o que apresentou uma maior proporção, seguido do grupo G1 (sem tratamento). Também é possível notar que não há diferenças significativas em nenhum dos grupos comparando-se as amostras após 24h e após 7 dias de imersão em saliva artificial, assim como é perceptível a grande dispersão dos dados, o que reflete a grande variabilidade nos dados obtidos e a não observância de diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos ( $p > 0,05$ ).

Figura 37 Proporção entre a área de todos os túbulos dentinários abertos por área total da superfície da dentina presente em cada eletromicrografia, de todos os grupos experimentais, após 24h e após 7 dias dos tratamentos propostos. As barras evidenciam desvio-padrão.



Fonte: autor.

## 5.5. Análise das alterações de pH nas soluções de saliva artificial

Na Tabela 2 são mostradas as alterações de pH nas soluções de saliva artificial empregadas neste estudo, para os grupos experimentais que utilizaram o Biosilicato® (G3 a G8). Observa-se que há uma tendência de queda nos valores iniciais de pH da saliva artificial (ajustada para pH 7,0 inicialmente) em todos os grupos experimentais, sendo esta queda mais pronunciada no grupo G4 (Biosilicato® veiculado em água sem irradiação laser) e menos

expressiva no grupo G3 (amostras tratadas com Biosilicato® veiculado em água destilada e irradiação laser após 24 horas). Após 7 dias de imersão em saliva artificial, nota-se aumento do pH da saliva em todos os grupos experimentais, com exceção do grupo G8 (Biosilicato® veiculado em soro fetal bovino e irradiação laser imediatamente após), cujo pH continuou mais baixo. O Biosilicato® possui uma série de metais alcalinos que se difundem para o meio após sua aplicação sobre a dentina e, desta forma, o aumento do pH da saliva reflete em sua bioatividade pois propicia a conversão de fosfato de cálcio em hidroxiapatita carbonatada. Embora sejam esperados valores de pH acima de 8,0 após 7 dias, supõe-se que a estequiometria da saliva artificial empregada neste estudo pode ter influenciado neste processo, disponibilizando ou não mais cálcio e fosfato para a reação química.

Desta forma, de acordo com os dados obtidos, nota-se que a bioatividade é reduzida nas primeiras 48 horas e, então, há uma tendência de maior bioatividade nos grupos G3, G4, G6 e G7. Os resultados observados nos grupos G5 (amostras tratadas com Biosilicato® veiculado em água destilada e irradiação laser imediatamente após aplicação do Biosilicato®) e no G8 (Biosilicato® veiculado em soro fetal bovino e irradiação laser imediatamente após) corroboram com as avaliações morfológica e composicional, quando se evidenciou a provável dissolução de parte do biomaterial na saliva, sendo mais pronunciada no Grupo G8. Vale também ressaltar que ao alta dispersão dos dados obtidos nesta análise podem ser devido à pouca quantidade de saliva por amostra disponível para análise, a qual somente foi possível de ser efetuada por meio da mistura das salivas de três amostras por medida.

Tabela 2: Valores médios de pH (e respectivos valores de desvio-padrão) das soluções de saliva artificial empregadas neste estudo para os grupos G3 a G8 (todos tratados com Biosilicato®).

<b>Grupo</b>	<b>pH (24 horas)</b>	<b>pH (48 horas)</b>	<b>pH (7 dias)</b>
<b>G3</b>	6,97 (0,14)	7,03 (0,11)	7,12 (0,07)
<b>G4</b>	Amostras permaneceram na saliva até 48h	6,65 (0,53)	7,13 (0,07)
<b>G5</b>	Amostras permaneceram na saliva até 48h	6,83 (0,13)	7,02 (0,05)
<b>G6</b>	6,94 (0,02)	6,84 (0,07)	7,10 (0,03)
<b>G7</b>	Amostras permaneceram na saliva até 48h	6,75 (0,15)	7,10 (0,04)
<b>G8</b>	Amostras permaneceram na saliva até 48h	6,89 (0,05)	6,53 (0,29)

Fonte: autor.

A literatura descreve<sup>160,161</sup> que mudanças no pH da saliva auxiliar na identificação da bioatividade do biomaterial, a qual está descrita em fases, conforme resumido abaixo:

♣ Estágio 1: rápida troca iônica entre íons Na<sup>+</sup> e Ca<sup>2+</sup> que pertencem à superfície do material com íons H<sup>+</sup> da solução. Isso leva à formação de silanóis (Si-OH) e, como consequência, há um aumento no pH do meio. Se houver íons fosfato na composição do vidro, estes podem ser liberados.



♣ Estágio 2: com a continuidade da troca iônica e o aumento do pH, ligações de siloxano (Si-O-Si) são atacadas por íons hidroxila. Quando todas as quatro ligações de um único átomo de silício são quebradas, sílica solúvel (Si(OH)<sub>4</sub>) é liberada do material para a solução. Isto aumenta o número de grupos silanol na interface vidro/solução.

♣ Estágio 3: ocorre a condensação e a polimerização dos grupos silanol que resulta na formação de uma camada rica em sílica capaz de absorver íons da solução.

♣ Estágio 4: formação de uma camada amorfa rica em CaO e P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> sobre a camada de sílica mediante a difusão de íons cálcio (Ca<sup>2+</sup>) e fosfato (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>).

♣ Estágio 5: formação de hidroxiapatita carbonatada na superfície do material em consequência da cristalização da camada amorfa de cálcio fosfato pela incorporação de íons hidroxila (OH<sup>-</sup>) e carbonato (CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>) presentes na solução.

♣ Estágio 6: adsorção de proteínas sobre a camada de hidroxiapatita carbonatada que permite a colonização de células sobre a superfície do material.

♣ Estágio 7: macrófagos passam a atuar como resposta imunológica.

♣ Estágio 8: células-tronco osteoblásticas são fixadas.

♣ Estágio 9: diferenciação e proliferação de osteoblastos progenitores em ativos.

♣ Estágio 10: os osteoblastos ativos dão origem a uma matriz extracelular. 32

♣ Estágio 11: mineralização da matriz extracelular que resulta em crescimento ósseo<sup>24</sup>.

A literatura reporta<sup>151,158</sup> que o Biosilicato® após 1h em contato com a solução simuladora de fluido corpóreo (SBF-K9) é capaz de formar uma camada de sílica em sua superfície, que após 16h de imersão tende a desaparecer, para o completo recobrimento por uma camada de hidroxiapatita carbonatada (HCA) bastante cristalina. Entretanto, em nosso estudo não foi identificada exatamente a formação de HCA, mas uma iapatita com

substituição do grupamento hidroxila. Acredita-se que a diferença na fase formada, que poderia estar inviabilizando a formação de HCA no período de tempo estudado, é a composição da saliva, que difere substancialmente da SBF-K9.

## 5.6. Análise dos efeitos da irradiação laser sobre o Biosilicato® por difração de raios X (DRX)

Na Figura 38 são mostradas as placas de acrílico analisadas durante o ensaio de difração de raios X. Como pode ser observado, há alterações na superfície do Biosilicato® contido nas placas de acrílico, tanto em função da irradiação do laser de Nd:YAG, com aspecto de ejeção das partículas, quanto da imersão em saliva artificial, que aparenta ocasionar lixiviação destas.

Figura 38 – Placas de acrílico utilizadas para avaliação por DRX do efeito do laser e da imersão em saliva artificial sobre a fase cristalina do Biosilicato®.



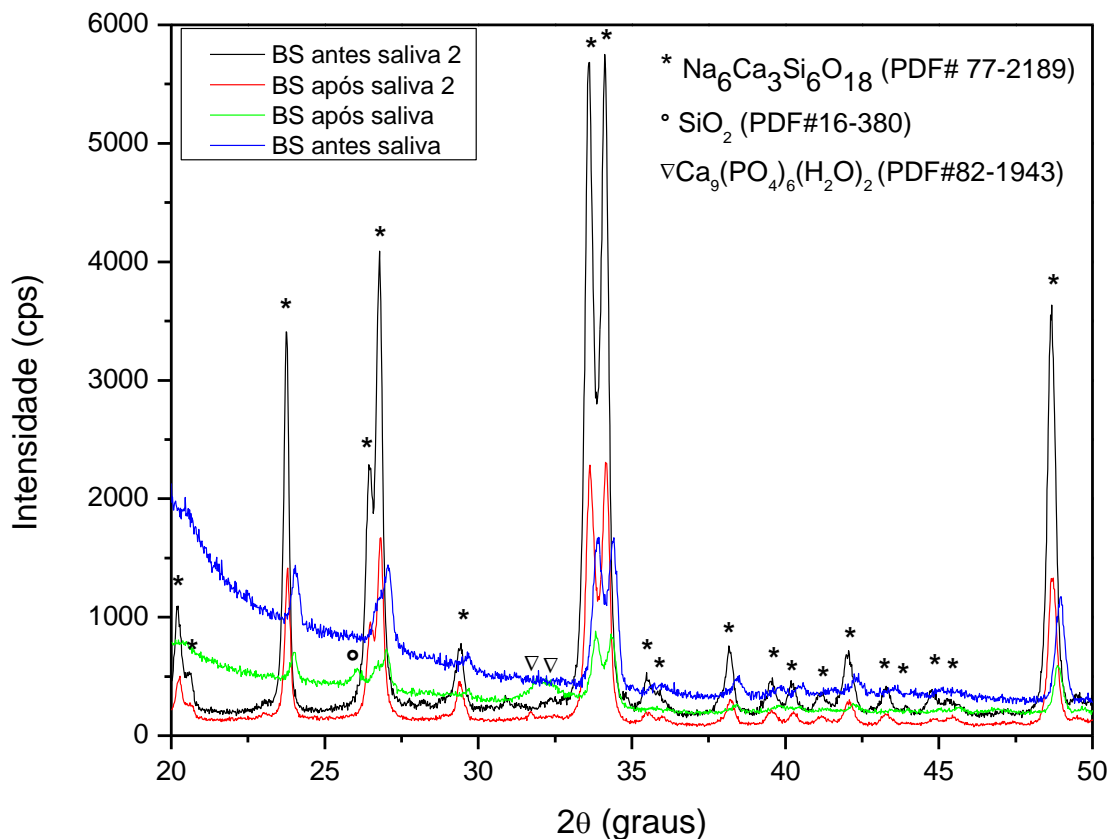
Fonte: autor.

A Figura 39 apresenta o difratograma do Biosilicato® antes e após imersão em saliva artificial durante 24 h. Inicialmente, para o Biosilicato® veiculado em água destilada, antes da imersão em saliva, é identificada somente a fase cristalina de silicato de sódio e cálcio ( $\text{Na}_2\text{Ca}_3\text{Si}_6\text{O}_{18}$ , PDF#77-2189/ ICSD 060502), a qual apresenta os três principais picos de difração em  $26,4^\circ$ ,  $33,5^\circ$  e  $34,1^\circ$ . Após contato com a saliva artificial, o Biosilicato® apresentou uma ligeira redução na cristalinidade da fase principal, e a formação de quartzo



( $\text{SiO}_2$ , PDF#16-380), com um pico cristalino evidente em torno de  $26^\circ$ , e hidroxiapatita ( $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6\text{H}_2\text{O}_2$  (PDF#82-1943)), com picos próximos a  $32,5^\circ$ .

Figura 39 – Difratoograma do Biosilicato® (BS) antes e após imersão em saliva artificial. As amostras analisadas após etapa de homogeneização em almofariz estão identificadas como “2”.

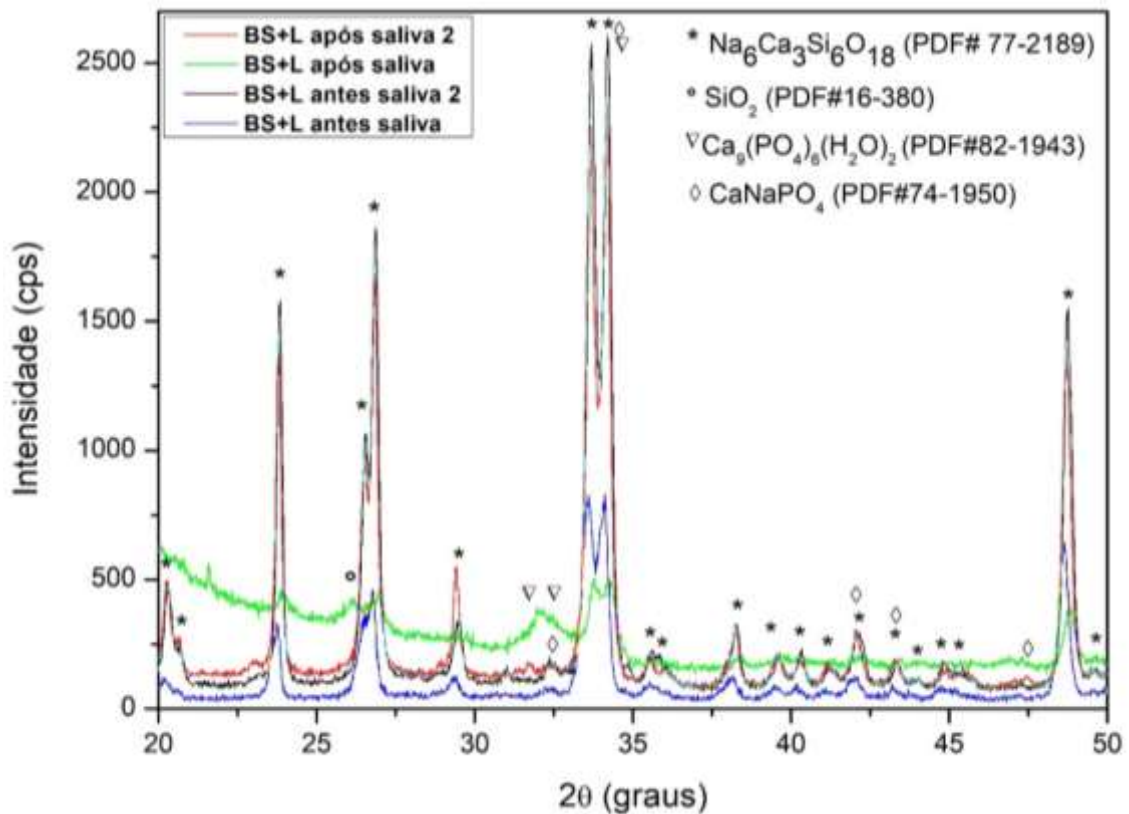


Fonte: autor

Ao comparar o difratograma das amostras antes e após homogeneização em almofariz, é possível notar um deslocamento da posição dos picos em  $2\theta$  para os primeiros difratogramas, devido à textura e orientação do pó de Biosilicato®, quando as placas foram submetidas à irradiação laser ou à saliva. Essa observação pode ser constatada na Figura 38. Além disso, a fase de silicato de cálcio não foi identificada para a amostra após imersão em saliva, nessa segunda análise por DRX. Isso é um indicativo de que a fase deva estar somente na superfície da amostra, devido à baixa fração em volume do silicato de cálcio, que é limitante para a detecção pela técnica.

Na Figura 40 são apresentados os difratogramas das amostras de Biosilicato® irradiadas com laser de Nd:YAG.

Figura 40 – Difratograma do Biosilicato® (BS) irradiado com laser de Nd:YAG (L) antes e após imersão em saliva artificial. As amostras analisadas após etapa de homogeneização em almofariz estão identificadas como “2”.

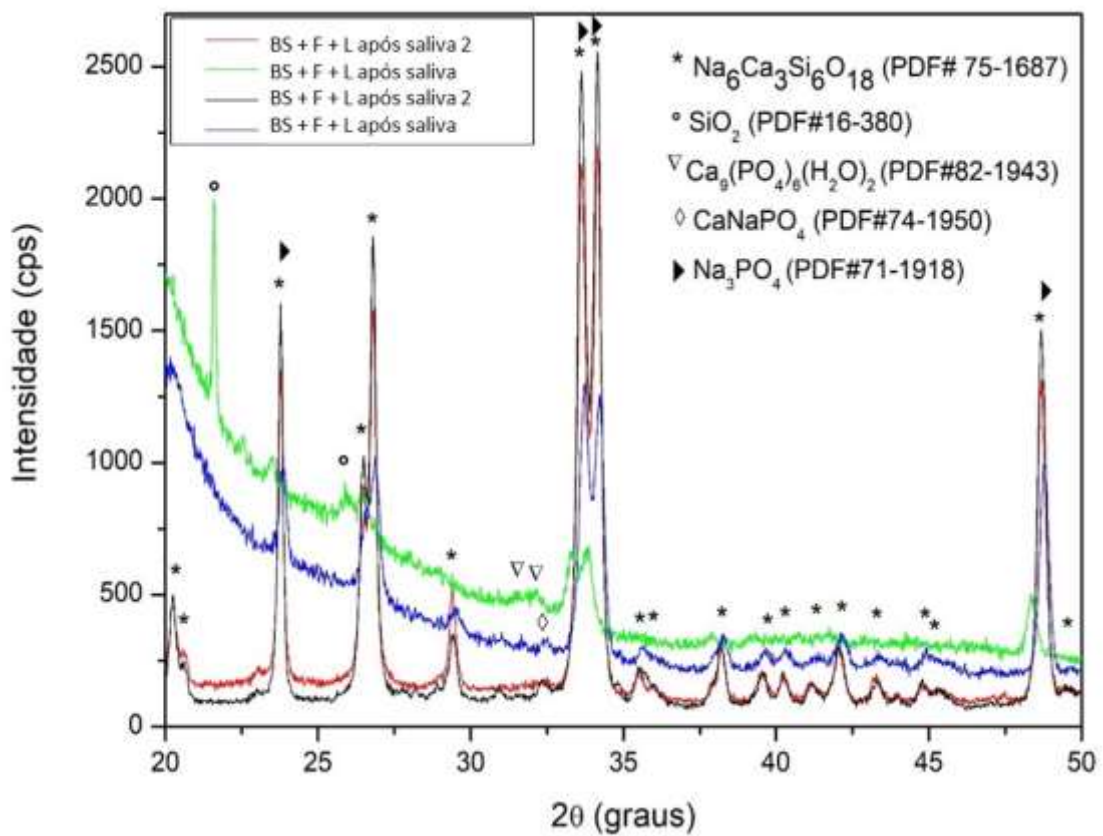


Fonte: autor.

Assim, como os difratogramas da Figura 39 é possível sugerir uma provável formação de silicato de sódio e cálcio, anteriormente à exposição em saliva artificial, e quartzo e hidroxiapatita após exposição a esse fluido. Entretanto, há um ponto bastante interessante a ser notado, que diz respeito à indução do aparecimento da fase de fosfato de sódio e cálcio ( $\text{CaNaPO}_4$ , PDF#74-1950, ICSD 035629) após irradiação do Biosilicato® pelo laser. Essa fase tem um pico característico em 32,5° e outro em 47,5°. Vale a pena notar também que a formação de hidroxiapatita é intensificada quando da presença da fase de fosfato de sódio e cálcio, como pode ser comparado com o difratograma de Biosilicato® após imersão em saliva da Figura 43 com maior consumo da fase  $\text{Na}_2\text{Ca}_3\text{Si}_6\text{O}_{18}$ , para seu surgimento.

Na Figura 41 é mostrada a análise de DRX para a adição de fotoabsorvedor no sistema. Comparando-se os difratogramas dessa etapa aos anteriores, é possível notar que há da mesma maneira a formação de silicato de sódio e cálcio e de fosfato de sódio e cálcio, mais ainda da fase de fosfato de sódio. Porém, com a adição do fotoabsorvedor, a formação de hidroxiapatita após imersão do material em saliva artificial se mostrou menos expressiva.

Figura 41– Difratograma do Biosilicato® (BS) irradiado com laser de Nd:YAG (L) após aplicação de fotoabsorvedor (F), antes e após imersão em saliva artificial. As amostras analisadas após etapa de homogeneização em almofariz estão identificadas como “2”.



Fonte: autor.

A associação da irradiação laser com o Biosilicato® promoveu efeitos distintos, dependendo do momento da irradiação, assim como do veículo do material. A literatura<sup>162</sup> mostra que a fase de fosfato de sódio e cálcio pode ser obtida no Biosilicato® em tratamento térmico adicional a 800 °C/1h, com formação prévia da fase de silicato de sódio e cálcio. Como a irradiação laser pode provocar um aquecimento instantâneo de até 1100 °C na região de incidência, a cristalização da fase  $\text{CaNaPO}_4$  pode ser explicada. A presença dessa segunda fase potencializa a bioatividade do material, reduzindo o tempo de crescimento de HCA em

testes *in vitro* de bioatividade, bem como estimula a atividade de osteoblastos sob condições osteogênicas de testes com cultura celular<sup>162</sup>.

O presente estudo demonstrou que o tratamento da lesão de carie inicial se dá em melhores condições quando a se tem a irradiação *laser* Nd:YAG após 24h da associação ao Biosilicato® veiculado ao soro fetal bovino, pois foram observadas alterações composicionais que sugerem a formação de hidroxiapatita carbonatada. Desta forma, sugere-se que a melhor estratégia de tratamento é a aplicação do *laser* após 24h pois, se as irradiações forem feitas imediatamente, pode ocorrer a evaporação da água e ejeção do material. A irradiação *laser* pode favorecer a formação de uma nova fase, onde nota-se a presença provável da fase  $\text{CaNaPO}_4$ ; contudo, estudos posteriores com o uso de difração de raios-X rasantes são necessários para se confirmar tal hipótese. Esta fase favorece a bioatividade do material, ou seja, ela permite uma atuação muito mais rápida e com melhores resultados. Ainda, a irradiação *laser* pode favorecer a maior retenção do biomaterial, o que poderá também ser determinado em ensaios futuros.

## 6. Conclusões

De acordo com a metodologia empregada e os resultados preliminares obtidos, é possível concluir que:

1 - A radioterapia simulada *in vitro* promove mudanças químicas na dentina radicular, refletida no conteúdo de amida II, além de mudanças morfológicas, com obliteração dos túbulos dentinários. A desmineralização promove alterações composicionais mais significativas, com maior exposição de material orgânico, redução do conteúdo inorgânico e abertura dos túbulos dentinários;

2 – O Biosilicato® promove a remineralização da dentina com lesão incipiente de cárie, fato evidenciado pela redução do pH da saliva artificial nas primeiras horas pós o tratamento, formação de apatita cristalina, recobrimento da matriz orgânica exposta da dentina e obliteração parcial ou total dos túbulos dentinários. Para que sua ação seja potencializada, o melhor veículo para aplicação deste material é o soro fetal bovino após acondicionamento;

3 – O laser de Nd:YAG de pulsos curtos promove alterações composicionais na dentina, tais como a remoção de água e carbonato e a desnaturação de conteúdo orgânico, assim como a obliteração parcial dos túbulos dentinários. Quando efetuada após aplicação do Biosilicato®, a irradiação laser promove a presença da fase de fosfato de sódio e cálcio, o que intensifica a formação de hidroxiapatita pelo biomaterial;

4 – Sobre a dentina com lesão incipiente de cárie, a irradiação laser também auxilia a ação do Biosilicato®, evidenciada pela maior conversão para apatita, menor quantidade de bandas de siloxano e menor quantidade de apatita amorfa.

Para tal, a melhor estratégia de tratamento é a irradiação laser ser efetuada 24h após aplicação de Biosilicato® veiculado em soro fetal bovino sobre a dentina desmineralizada.

## 7. Referências bibliográficas

- <sup>1</sup> INCA. Incidência e mortalidade por Câncer no Brasil, 2002.
- <sup>2</sup> INCA. Incidência e mortalidade por Câncer no Brasil 2020.
- <sup>3</sup> VIEIRA, S.C., et al. **Oncologia Básica** 1º Edição p. 9-23, 2012.
- <sup>4</sup> BOING A.F, ANTUNES J.L. Socioeconomic conditions and head and neck cancer: a systematic literature review. **Red de Revistas Científicas de America Latina y el Caribe, Españã y Portugal**, p.615-622, 2007.
- <sup>5</sup> WORRALL S.F. **Oral Cancer** – An Overview, 2001.
- <sup>6</sup> KHALILI J. Oral cancer: risk factors, prevention and diagnostic. **Expo Oncol**, 2008; 30 (4) p. 259-264.
- <sup>7</sup> WALKER D.M, BOEY G., McDONALD L.A. The pathology of **oral cancer**, v.5 p. 376-83,2003.
- <sup>8</sup> NEMES J.A, Red P, Boda R, Kiss C and Marton IJ: Oral Cancer report from Northeastern Hungary. **Pathol Oncol Res**14 p. 85-92, 2008.
- <sup>9</sup> GUPTA, N., et al., Radiation-induce dental caries, prevention and treatment- A systematic review. **National Journal of Maxillofacial Surgery**, 2015. 6(2): p.160-166.
- <sup>10</sup> DENG, J, et.al., Dental demineralization and caries in patients with head and neck cancer. **Oral Oncology** v.51, p.824-831 2015.
- <sup>11</sup> MATOS, I. S. et al. Avaliação do Fluxo Salivar em Pacientes Submetidos a Radioterapia de Cabeça e Pescoço. **Revista da Faculdade de Odontologia da UFBA**, v.14-15, p.6-10, jan./dez. 1994/1995.
- <sup>12</sup> ROLIM, A.E.H; COSTA, L.J.D; RAMALHO, L.M.P. Repercussões da radioterapia na região orofacial e seu tratamento. **Radiologia Brasileira**, 2011. 44: p.388-395.
- <sup>13</sup> WHITMYER CC; WASKOWSKI, J. C. A. Radiotherapy and sequelae: preventive and management protocols. **Chicago**. 1997; v. 71, n. 1, 23-29.
- <sup>14</sup> CLARKSON, J.J.; Mc LOUGHLIN, J. Role of fluoride in oral health promotion. **Int. Dent J**, v. 50, n.3, p. 119-128, 2000.
- <sup>15</sup> QUEIROZ, C.S. Modelos de estudos *in vitro* para avaliar o efeito do fluoreto na desmineralização e remineralização do esmalte e dentina. Tese (Doutorado em Cariologia). **Faculdade de Odontologia da Unicamp**, Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba, 2004.

16. 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
17. FEATHERSTONE, J.D.B. Caries detection and prevention with *laser* energy. **Dent Clin North Am**, v.44, p. 955-69, 2000.
18. ANA, P.A.; BACHMANN, L.; ZEZE D. *Lasers* Effects on Enamel for Caries Prevention. **Laser Physics**, v. 16, n. 5, p. 865-875, 2006.
19. WHITE, D.J. Reactivity of fluoride dentifrices with artificial caries. **Caries Res**, v. 21, n. 2, p. 126-40, 1987.
20. KIELBASSA, A. M. et al. Radiation-related damage to dentition. **The Lancet Oncology**, v. 7, n. 4, p. 326-335, 2006.
21. HOFFMAN, R. et al. Dental oncology in patients treated with radiation for head and neck cancer. **the Journal of Community and Supportive Oncology**, v. 14, n. 9, p. 374-379, 2016.
22. MATOS, A. B. et al. Laser Technology for Caries Removal. **Contemporary Approach to Dental Caries**, p. 309-330, 2012.
23. ZEZE DM, ANA PA, BENETTI C, GOULART VP, BACHMANN L, TABCHOURY CPM, CURY JA. Compositional and crystallographic changes on enamel when irradiated by Nd:YAG or Er,Cr:YSGG *lasers* and its resistance to demineralization when associated with fluoride. **SPIE** 2010; 7549: 75490G-1-75490G-12.
24. CROVACE, M. C. et al. Biosilicate® — A multipurpose, highly bioactive glass-ceramic. In vitro, in vivo and clinical trials. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 432, p. 90-110, 2016.
25. BAINO, F. Bioactive glasses – When glass science and technology meet regenerative medicine. **Ceramics International**, v. 44, n. 13, p. 14953-14966, 2018.
26. FERNANDES, J. S. et al. Multifunctional bioactive glass and glass-ceramic biomaterials with antibacterial properties for repair and regeneration of bone tissue. **Acta Biomaterialia**, v. 59, p. 2-11, 2017.
27. FERNANDES, H. R. et al. Bioactive Glasses and Glass-Ceramics for Healthcare Applications in Bone Regeneration and Tissue Engineering. **Materials**, v. 11, n. 12, p. 1996-1944 2018.

- <sup>28</sup>. ISLAM, M. T. et al. Bioactive calcium phosphate-based glasses and ceramics and their biomedical applications: A review. **Journal of tissue engineering**, v. 8, p. 2041731417719170-2041731417719170, 2017.
- <sup>29</sup>. TIRAPELLI, C. et al. The effect of a novel crystallised bioactive glass-ceramic powder on dentine hypersensitivity: a long-term clinical study. **J Oral Rehabil**, v. 38, n. 4, p. 253-62, 2011.
- <sup>30</sup>. TIRAPELLI, CAMILA et al. A novel bioactive glass-ceramic for treating dentin hypersensitivity. **Brazilian Oral Research**, v. 24, p. 381-387, 2010.
- <sup>31</sup>. CHINELATTI, M. A. et al. Effect of a Bioactive Glass Ceramic on the Control of Enamel and Dentin Erosion Lesions. **Brazilian Dental Journal**, v. 28, p. 489-497, 2017.
- <sup>32</sup>. DE MORAIS, R. C. et al. Biosilicate as a dentin pretreatment for total-etch and self-etch adhesives: In vitro study. **International Journal of Adhesion and Adhesives**, v. 70, p. 271-276, 2016.
- <sup>33</sup>. DE MORAIS, R. C. et al. Bond strength of adhesive systems to sound and demineralized dentin treated with bioactive glass ceramic suspension. **Clinical Oral Investigations**, v. 22, n. 5, p. 1923-1931, 2018.
- <sup>34</sup>. INCA. Incidência e mortalidade por Câncer no Brasil, 2018.
- <sup>35</sup>. KIM, E. S.; HONG, W.K.; KHURI, F. R. Chemoprevention of aerodigestive tract cancers. **Annu Rev Med**, v.53, p.223-43,2002. ISSN 0066-4219
- <sup>36</sup>. HASHIBE, M. et al. Alcohol drinking in never users of tobacco, cigarette smoking in never drinkers, and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. **J Natl Cancer Inst**, v.99, n.10, p.777-89, May 16, 2007. ISSN 0027-8874
- <sup>37</sup>. JEMAL, A. et al. Global cancer statistics. **CA CANCER J CLIN**, v.61, n.2, p.69-90, Mar-Apr 2011. ISSN 0007-9235
- <sup>37</sup>. ZHOU, J. et al. Smokeless tobacco and risk of head and neck cancer: evidence from a case-control study in New England. **Int J Cancer**, v.132, n.8, p.1911-7, Apr 15, 2013. ISSN 0020-7136
- <sup>39</sup>. GAUDET, M. M. et al. Anthropometry and head and neck cancer: a pooled analysis of cohort data. **In J Epidemiology**, v.44, n.2, p.673-81, Apr 2015. ISSN 0300-5771
- <sup>40</sup>. RETTIG, E. M.; D' SOUZA, G. Epidemiology of head and neck cancer. **Surg Oncol Clin N Am**, v.24, n.3, p. 379-96, Jul 2015. ISSN 1055-3207



- <sup>41</sup>.CASIGLIA, J, WOO SB. A comprehensive review of oral cancer. **Gen Dent**, 2001 Jan-Feb; 49(1) : 72-82
- <sup>42</sup>.DOBROSSY, L. Epidemiology of head and neck cancer: magnitude of the problem. **Cancer Metastasis Rev**. 2005 Jan;24(1): 9-17.
- <sup>43</sup>.QING, P. et al. Effect of gamma irradiation on the wear behavior of human tooth enamel. **Sci Rep**, v. 5, p.11568, 2015. ISSN 2045-2322
- <sup>44</sup>.CHAACHOUAY. H, OHNESEIT. P, TOULANY. M, KEHLBACH. R, MULTHOFF. G, RODEMANN. HP. Autophagy contributes to resistance of tumor cells to ionizing radiation. **Radiother Oncol** 2011; Jun 29.
- <sup>45</sup>.NOVAES PERS. Radioterapia. In: Brentani MM, Coelho FRG, Iyeyasu H, Kowalski LP, editors. **Bases da Oncologia**. 1 ed. São Paulo: ED. Marina;1998
- <sup>46</sup>.RAMIREZ-AMADOR. V, SILVERMAN. S. JR, MAYER. P, TYLER. M, QUIVEY. J. Candidal colonization and oral candidiasis in patients undergoing oral and pharyngeal radiation therapy. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**. 1997;84(2): 149-53
- <sup>47</sup>.SULAIMAN. F, HURYN. JM, ZLOTOLOW. IM. Dental extractions in the irradiated head and neck patient: a retrospective analysis of Memorial Sloan-Kettering Cancer Center protocols criteria, and end results. **J Oral Maxillofac Surg** 2003;61(10): 1123-31
- <sup>48</sup>.VISSINK. A, JANSMA. J. SPIJKERVET. FK, BURLAGE. FR, COPPES. RP. Oral sequelae of head and neck radiotherapy. **Crit Rev Oral Biol Med** 2003;14(3):199-212
- <sup>49</sup>.JHAM. BC, REIS. PM, MIRANDA. EL, LOPES. RC, CARVALHO. AL, SCHEPER. MA, FREIRE. AR. Oral health status of 207 head and neck cancer patients before, during and after radiotherapy. **Clin Oral Investig** 2008;12(1): 19-24
- <sup>50</sup>.JANSMA. J, BORGGREVEN. JM, DRIESSENS. FC, 's- GRAVENMADE. EJ. Effect of X-ray irradiation on the permeability of bovine dental enamel. **Caries Res** 1990;24(3):164-8
- <sup>51</sup>.KIELBASSA. AM. In situ induced demineralization in irradiated and non-irradiated human dentin. **Eur J Oral Sci** 2000;108(3): 214-21
- <sup>52</sup>.KIELBASSA. AM, HINKELBEIN.W, HELLWING. E, MEYER-LUCKEL. H. Radiation-related damage to dentition. **Lancet Oncol** 2006;7(4): 326-35
- <sup>53</sup>.SILVA. AR, ALVES. FA, ANTUNES. A, GOES. MF, LOPES. MA. Patterns of demineralization and dentin reactions in radiation-related caries. **Caries Res** 2009; 43(1): 43-9(a).
- <sup>54</sup>.ROTHWELL. BR. Prevention and treatment of the orofacial complications of radiotherapy. **JADA** 1987; 114:316-22.

55. KOWALSKI. LP, AGNELLI. A, SALVAJOLI. JV, LOPES. LF. **Manual de condutas diagnósticas e terapêuticas em oncologia**. 2.ed. São Paulo: FAP; 2002.
56. TSUJII. II. Quantitative dose-response analysis of salivary function following radiotherapy using sequential RT-sialography. **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 1985; 11:1603-12.
57. KIELBASSA, AM. WRBAS. KT, SCHULTE-MONTING. J, HELLWING. E. Correlation of transversal microradiography and microhardness on in situ-induced desmineralition in irradiated and nonirradiated human dental enamel. **Arch Oral Biol** 1999;44(3):243-51
58. KIELBASSA, AM. SHENDERA.A, SCHULTE-MONTING. J. Microradiographic and microscopic studies on in situ induced initial caries in irradiated and nonirradiated dental enamel. **Caries Res** 2000;34(1):41-7
59. AL-NAWAS. B, GROTZ. KA, ROSE. E, DUSCHNER. H, KANN. P, WAGNER, W. Using ultrasound transmission velocity to analyse the mechanical properties of teeth after in vitro, in situ, and in vivo irradiation. **Clin. Oral Investig** 2000; 4(3):168-72
60. AÇIL. Y, SPRINGER. IN, NIEHOFF. P, GASSLING. V, WARNKE. PH, AÇMAZ. S, SONMEZ. TT, KIMMIG. B, LEFTERIS. V, WILTFANG. J. Proof of direct radiogenic destruction of collagen in vitro. **Strahlenther Onkol** 2007;183(7): 374-9
61. SOARES. CJ, NEIVA. NA, SOARES. PV, DECHICHI. P, NOVAIS. VR, NAVES. LZ, MARQUES. MR. Effects of chlorhexidine and fluoride on irradiated enamel and dentin. **J Dent Res** 2011;90(5):659-64
62. SOARES. CJ, CASTRO. CG, NEIVA. NA, SOARES. PV, SANTOS-FILHO. PC, NAVES. LZ, PEREIRA. PN. Effect of gama irradiation on ultimate tensile strength of enamel and dentin. **J Dent Res** 2010;89(2):159-64
63. SPRINGER. IN, NIEHOFF. P, WARNKE. PH, BOCEK. G, KOVÁCS. G, SUHR. M, WILTFANG. J, AÇIL. Y. Radiation caries-radiogenic destruction of dental collagen. **Oral Oncol** 2005;41(7):723-8
64. TEN CATE, A.R. **Histologia Bucal - desenvolvimento e função**. Rio de Janeiro: Guanabara, 1988
65. KIELBASSA, AM, BEETZ, I, SCHENDERA, A, HELLWING E. Irradiation effects on microhardness of fluoridated and non-fluoridated bovine dentin. **Eur J Oral Sci** 105: 444– 7, (1997).
66. FRANZEL, W, GERLACH, R, HEIN, HJ, SCHALLER, HG. Effect of tumor therapeutic irradiation on the mechanical properties of teeth tissue. **Z Med Phys** 16:148-54, (2006).
67. AOBA, T, TAKAHASHI, J, YAGI, T, DOI, Y, OKAZAKI, M, MORIWAKI, Y. High-voltage electron microscopy of radiation damages in octacalcium phosphate. **J Dent Res** 60:9549 (1981).

68. FACULDADE DE ODONTOLOGIA USP, IMAGENS- 2019.
69. LIESHOUT, HF, BOTS, CP. The effect of radiotherapy on dental hard tissue – a systematic review. **Clin Oral Invest.** 2014;18(1):17-24.
70. MCGUIRE, JD, MOUSA, AA, ZHANG, BJ, TODOKI, LS, HUFFMAN, NT, CHANDRABABU, KB, et al. Extracts of irradiated mature human tooth crowns contain MMP- 20 protein and activity. **J Dent.** 2014;42(5):626-35.
71. GONSALVEZ, L.M.N, PALMA-DIBB, R.G., PAULA-SILVA, F.W.G, OLIVEIRA, H.F., NELSON-FIHO, P., SILVA, L.A.B., QUEIROZ, A.M. Radiation therapy alters microhardness and microstructure of enamel and dentin of permanent human teeth. **Journal of Dentistry** 42 (2014) 986 – 992.
72. AVERY, JK. Desenvolvimento e histologia bucal. 3ª ed. Porto Alegre: **Artmed, Liv.** Santos, 2005.
73. NANCI, A. Ten Cate histologia oral: desenvolvimento, estrutura e função. 8 ed. Rio de Janeiro: **Elsevier**, 2013
74. DE LIMA PEREIRA, DAÍSA. Uso de técnicas ópticas no monitoramento dos efeitos do laser de Nd: YAG sobre a erosão dentária. **São Paulo**,2014
75. FANG, YZ, YANG, S, WU G. Free radicals, antioxidants and nutrition. **Nutrition.** 2002;18(10):872-9.
76. PIOCH. T, GOLFELS. D, STAEHLE. HJ. An experimental study of the stability of irradiated teeth in the region of the dentinoenamel junction. **Endod Dent Traumatol.** 1992;8(6):241-4.
77. SILVA. ARS, ALVES. FA, ANTUNES. A, GOES. MF, LOPES, MA. Patterns of demineralization and dentin reactions in radiationrelated caries. **Caries Res** 43:43–49 (2009).
78. MATOS, I. S. et al. Avaliação do Fluxo Salivar em Pacientes Submetidos a Radioterapia de Cabeça e Pescoço. **Revista da Faculdade de Odontologia da UFBA**, v.14-15, p.6-10, jan./dez. 1994/1995.
79. THYSLSTRUP, A.; FEJERSKOV, O. Tratado de cariologia clínica. 2.ed. São Paulo: **Santos**, 2001. Cap.18, p.367-381.
80. **DOBROS, K. et al.** Radiation-induced caries as the late effect of radiation therapy in the head and neck region. **Contemp Oncol (Pozn)**, v. 20, n. 4, p. 287-90, 2016.
81. KIELBASSA, AM, HINKELBEIN, W, HELLWING E, MEYER-LUCKEL, H. Radiation-related damage to dentition. **Lancet Oncol.** 2006; 7 (4): 326-35.
82. SPECHT L. Oral complications in the head and neck radiation patient. Introduction and scope of the problem. **Support Care Cancer.** 2002; 10 (1): 36–39.

83. JHAM. C.BRUNO et.al Oral health status of 207 head and neck cancer patients before during and after radiotherapy. **Clin Oral Investig.** 2008; 12 (1): 19-24
84. P.C. NARVAI, P. FRAZÃO, A.G. RONCALLI, J.L.F. ANTUNES. “Cárie dentária no Brasil: declínio, iniquidade e exclusão social,” **Rev Panam Salud Publica.** Vol.19, n.6, pp. 385–93,2006.
85. S. M. COSTA, A. K. ADELÁRIO, M. VASCONCELOS, M. H. N. G. ABREU, “Explanatory Models for Dental Caries: From the Organismic to Ecosystemic Model”, **Pesq Bras Odontoped Clin Integr**, Vol.12, n.2, pp. 285-91, abr./jun., 2012.
86. HONG, CH, NAPENAS, JJ, HODGOSON, BD, STOKMAN, MA, MATHERS-STAUFFER, V, ELTING, LS et al. Dental Disease Section, Oral Care Study Group, Multi-national Association of Supportive Care in Cancer (MASCC)/International Society of Oral Oncology (ISOO). A systematic review of dental disease in patients undergoing cancer therapy. **Support Care Cancer.** 2010 Aug;18(8):1007-21.
87. R.Z. LE GEROZ. “Chemical and Crystallographic Events In the Caries Process”, **JDent Res**, Vol. 69(Spec 155), pp. 567-574, February, 1990.
88. R.M. FRANK. “Structural Events in the Caries Process in Enamel, Cementum, and Dentin”, **J Dent Res**, Vol. 69(Spec 155), pp.559-566, February 1990.
89. E.A.M. KIDD, O. FEJERSKOV. “What Constitutes Dental Caries? Histopathology of Carious Enamel and Dentin Related to the Action of Cariogenic Biofilms”, **J Dent Res**, Vol.83(Spec Iss C),pp.C35-C38, 2004
90. J.E.O. LIMA. “Cárie dentária: um novo conceito”, **R Dental Press OrtodonOrtop Facial**, Vol. 12, n. 6, pp. 119-130, nov./dez. 2007
91. C. MATA, G. MCKENNA, F.M. BURKE. “Caries and the older patient”, **Dent.Update.**, Vol.38, n.6, pp. 376-8, pp.381, 2011
92. M. MALTZ, L. S. ALVES, · J. E. A. ZENKNERB. “Biofilm Control and Oral Hygiene Practices”, **Monogr Oral Sci. Basel**, Vol 26, pp 76–82, 2017.
93. N. DAMÉ-TEIXEIRA, C. C. F. PAROLO, M. MALTZ, “Specificities of Caries on Root Surface”, **Monogr Oral Sci. Basel**, Vol 26, pp 15–25, 2017.
94. T. AOBA. “Solubility properties of human tooth mineral and pathogenesis of dental caries”, **Oral Diseases**, Vol.10, pp. 249–257, 2004.
95. M. GOLDBERG, A. B. KULKARMI, M. YOUNG, A. BOSKEY.” Dentin: Structure, Composition and Mineralization: The role of dentin ECM in dentin formation and mineralization,” **Front Biosci (Elite Ed)**, Vol.3, pp. 711–735, 2012
96. C. CHAUSSAIN-MILLER, F. FIORETTI, M. GOLDBERG, S. MENASHI. “The Role of Matrix Metalloproteinases (MMPs) in Human Caries”, **J Dent Res.**, Vol.85, n.1, pp.22-32, 2006.

- <sup>97</sup>. L. TJADERHANE, M.A. R. BUZALAF, M. CARRILHO, C. CHAUSSAIN. “Matrix Metalloproteinases and Other Matrix Proteinases in Relation to Cariology: **The Era of ‘Dentin Degradomics’**”, **Caries Res**, Vol.49, pp.193–208, 2015.
- <sup>98</sup>. M. A. R. BUZALAF, S. CHARONE, L. TJADERHANE. “Role of Host-Derived Proteinases in Dentine Caries and Erosion”, **Caries Res**, Vol. 49(suppl 1), pp.30–37, 2015.
- <sup>99</sup>. M. HOSSAIN, YUICHI KIMURA, YUKIO NAKAMURA, YOSHISHIGE YAMADA, JUN-ICHIRO KINOSHITA, KOUKICHI MATSUMOTO, “A Study on Acquired Acid Resistance of Enamel and Dentin Irradiated by Er,Cr:YSGG Laser”, **J. of Clin.Laser Med & Surg**, Vol. 19, n. 3, pp. 159–163, 2001.95
- <sup>100</sup>. A.C.T. JORGE, A.CASSONI, P.M. DE FREITAS, A.F. REIS, A.BRUGNERA JR., J.A. RODRIGUES, “Influence of Cavity Preparation with Er,Cr:YSGG Laser and Restorative Materials on In Situ Secondary Caries Development”, **Photomed and Laser Surg.**, Vol.33, n.2, pp. 98–103, 2015.
- <sup>101</sup>. R. FEKRAZAD, L. EBRAHIMPOUR, “Evaluation of acquired acid resistance of enamel surrounding orthodontic brackets irradiated by laser and fluoride application” **Lasers Med Sci**, Vol.29, pp.1793–1798, 2014.
- <sup>102</sup>. P.M. DE FREITAS, M. RAPOZO-HILO, C. DE P. EDUARDO, J.D.B FEATHERSTONE, “In vitro evaluation of erbium, chromium: yttrium–scandium–gallium–garnet laser-treated enamel demineralization”, **Lasers Med Sci.**, Vol. 25, pp.165–170, 2010.
- <sup>103</sup>. K.M. RAMALHO, CHIN-YING, STEPHEN HSU, P.M. DE FREITAS, A.C.C.AРАНHA, M.ESTEVES-OLIVEIRA, R.G. ROCHA, C.DE P. EDUARDO, “Erbium Lasers for the Prevention of Enamel and Dentin Demineralization: A Literature Review”, **Photomed and Laser Surg.**, Vol.33, n.6, pp. 301–319, 2015.
- <sup>104</sup>. H.G.D. BOARI, P.A. ANA, C.P. EDUARDO, G.L. POWELL, D.M. ZEZELL, “Absorption and Thermal Study of Dental Enamel when Irradiated with Nd: YAG Laser with the Aim of Caries Prevention”, **Laser Physics**, Vol. 19, n. 7, pp. 1463–1469, 2009.
- <sup>105</sup>. V.R. GERALDO-MARTINS, C.P. Lepri, R.G. Palma-Dibb, “Influence of Er,Cr: YSGG laser irradiation on enamel caries prevention”, **Lasers Med Sci**, Vol.28, pp.33–39, 2013.
- <sup>106</sup>. GLENN VAN AS, “Erbium lasers in dentistry”, **Dent Clin N Am**, Vol.48, pp.1017–1059, 2004.
- <sup>107</sup>. J.J. BELTRANO, L. TORRISI, E. CAMPAGNA, E. RAPI SARDA, I. FINOCCHIARO, G. OLIVI “Er, Cr:YSGG Pulsed laser applied to medical dentistry”, **Radiation Effects & Defects in Solids**, Vol.163, n.4–6, pp.331–338, April–June 2008.
- <sup>108</sup>. D. FRIED, J.D.B. FEATHERSTONE, S.R. VISURI, W. EKA, J.T. WALSH, “The Caries Inhibition Potential of Er: YAG and Er:YSGG **Laser Radiation**”,

**SPIE**, Vol.2672, pp. 73-78, 1996.

<sup>109.</sup> J.D.B FEATHERSTONE, D.G.A. NELSON, “Laser Effects on Dental Hard Tissues”, **Adv Dent Res.**, Vol.1, n.1, pp.21-26, October,1987.

<sup>110.</sup> C.B. ZAMATARO, P.A. Ana, C. BENETTI, D, M. ZEZELL, “Influence of Er,Cr:YSGG Laser on CaF<sub>2</sub>-Like Products Formation Because of Professional Acidulated Fluoride or to Domestic Dentifrice Application”, **Microsc.Res.Tech.**, Vol.76, pp.704–713, 2013.

<sup>111.</sup> D. WHOLCOMB, R.A. YOUNG, “Thermal decomposition of human tooth enamel”, **Calcif Tissue Int.**, Vol.31, pp.189–201, 1980.

<sup>112.</sup> T. SAKAE, H. MISHIMA, Y. KOZAWA, “changes in bovine dentin mineral with sodium hypochlorite treatment”, **Journ. of Dent. Res.**, Vol.67, n.9, pp.1229-1234, 1988.

<sup>113.</sup> FEATHRSTONE, J.D.B. et al. Changes in acid resistance of dentin irradiated by a CW 10,6 µm CO<sub>2</sub> laser. [ed.] **Rechmann P; Fried D.**, p. 684305, 2008.

<sup>114.</sup> 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. Tese (Doutorado em Odontologia, área de concentração: Dentística). **Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo**, São Paulo,2007.

<sup>115.</sup> 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. Tese (Doutorado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear - Materiais). **Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares**, São Paulo, 2007.

<sup>116.</sup> ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária – 2019

<sup>117.</sup> BOSE, S.et al. Processing and characterization of porous alumina scaffolds. **Journal of materials science: materials in medicine**, 2002, vol.13, pp. 23-28

<sup>118.</sup> HULBERT, S.F.; HENCH, L.L.; FORBERS, D.; BOWMAN, L.S. History of Bioceramics. **Ceramics Inetrnational**, 1982, vol.8, n.4, pp.131-140.

<sup>119.</sup> HENCH, L.L.; WILSON, J.; Introdtion to bioceramics. Singapore. **Word Scientific Publishing Co. Pte. Ltd.** 1993, Cap. 4-6.

<sup>120.</sup> ANDRADE, A. L.; DOMINGUES, R. Z. Cerâmicas Bioativas – Estado da Arte. **Química Nova**, 2006, vol.29, n.1, pp. 100-104

<sup>121.</sup> DE AZA, P. N.; DE AZA, A. H.; PENA, P.; DE AZA, S.; **Bol. Soc. Esp. Ceram.** 2007, 46,45.

<sup>122.</sup> HENCH, L.L.; **Biomaterials** 1998, 19, 1419.

<sup>123.</sup> SIQUEIRA, R. L.; ZANOTTO, E. D. Biosilicato®: histórico de uma vitrocerâmica

brasileira de elevada bioatividade. **Química Nova**, v. 34, p. 1231-1241, 2011.

<sup>124</sup>. MONTAZERIAN, M.; DUTRA ZANOTTO, E. History and trends of bioactive glass-ceramics. **J Biomed Mater Res A**, v. 104, n. 5, p. 1231-49, 2016.

<sup>125</sup>. COMESAÑA, R. et al. Laser cladding of bioactive glass coatings. **Acta Biomaterialia**, v. 6, n. 3, p. 953-961, 2010

<sup>126</sup>. CHINELATTI, M. A. et al. Effect of a Bioactive Glass Ceramic on the Control of Enamel and Dentin Erosion Lesions. **Brazilian Dental Journal**, v. 28, p. 489-497, 2017.

<sup>127</sup>. DE MORAIS, R. C. et al. Biosilicate as a dentin pretreatment for total-etch and self-etch adhesives: In vitro study. **International Journal of Adhesion and Adhesives**, v. 70, p. 271-276, 2016.

<sup>128</sup>. \_\_\_\_\_. Bond strength of adhesive systems to sound and demineralized dentin treated with bioactive glass ceramic suspension. **Clinical Oral Investigations**, v. 22, n. 5, p. 1923-1931, 2018.

<sup>129</sup>. KONGSUWAN, P.; BRANDAL, G.; LAWRENCE YAO, Y. Laser Induced Porosity and Crystallinity Modification of a Bioactive Glass Coating on Titanium Substrates. **Journal of Manufacturing Science and Engineering**, v. 137, n. 3, p. 031004-031004-12, 2015.

<sup>130</sup>. FARMAKIS, E. T. et al. In vitro evaluation of dentin tubule occlusion by Denshield and Neodymium-doped yttrium-aluminum-garnet laser irradiation. **J Endod**, v. 38, n. 5, p. 662-6, 2012.

<sup>131</sup>. \_\_\_\_\_. The influence of different power settings of Nd: YAG laser irradiation, bioglass and combination to the occlusion of dentinal tubules. **Photomed Laser Surg**, v. 31, n. 2, p. 54-8, 2013.

<sup>132</sup>. BEKETOVA, A. et al. Inducing bioactivity of dental ceramic/bioactive glass composites by Nd: YAG laser. **Dental Materials**, v. 32, n. 11, p. e284-e296, 2016.

<sup>133</sup>. STUART, B.; *Biological Applications of Infrared Spectroscopy*. **1 Ed. John Wiley & Sons**, Inglaterra, 1997.

<sup>134</sup>. SKOOG, D. A.; Holler, F. J.; Nieman, T. A.; *Princípios de Análise Instrumental*, 6ª ed., **Bookman: São Paulo**, 2009.

<sup>135</sup>. PAIVA, D. L.; Lampman, G. N.; Kriz, G. S.; Vyvyan, K. J.; *Introdução à Espectroscopia*, 1ª ed.; Cengage Learning, - **Tradução da Quarta Edição Americana: São Paulo**, São Paulo, 2010.

<sup>136</sup>. SILERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F. X.; *Spectrometric Identification of Organic Compounds*. **Infrared Spectrometry. USA: John Wiley & Sons**, 2005.

<sup>137</sup>. BENETTI, C.; Estudo in-vitro dos efeitos do laser de Er,Cr:YSGG em tecido ósseo por espectroscopia ATR-FTIR. Dissertação (Mestrado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear-Materiais). **Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São**

Paulo, 2010.

- <sup>138.</sup> COATES, J.; Vibrational Spectroscopy: Instrumentation for Infrared and Raman Spectroscopy, **Applied Spectroscopy Reviews**, 33, p. 267- 425, 1998.
- <sup>139.</sup> WETZEL, D.L.; Near-infrared Reflectance Analysis, Sleeper Among Spectroscopy Techniques, **Analytical Chemistry**, 55, p. 1165-A- 1176A, 1983.
- <sup>140.</sup> GOLDSMITH, C. C. *et.al*; Semicondutores: Integrated Circuit Manufactures. In: \_\_\_ Chung F.H. e Smith D.K. Industrial Applications of X-Raf Diffraction. **New York: Marcel Dekker**, 2000, pp.55-88
- <sup>141.</sup> FONSECA, FILHO.; LOPES. Avanços em caracterização de amostras sólidas cristalinas através de **Difratometria de Raios-X**, v.3,pp.31-45, 2013
- <sup>142.</sup> VAN VLACK, L. H. Princípios de Ciência dos Materiais. **8ª reimpr. São Paulo:Edgard Blucher**, 1970.
- <sup>143.</sup> FACULDADE FEDERAL DO CEARÁ – Apostila interna – Aula de difração de raio X– FFC.
- <sup>144.</sup> **UNIVERSIDADE SÃO PAULO** - Apostila interna – Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV - USP.
- <sup>145.</sup> DEDAVID, A. B.; GOMES, I. C.; MACHADO, G. Microscopia electronica de varredura – Aplicações e preparação de amostras, **EdiPUCRS**, v.1,2007.
- <sup>146.</sup> MAHMOUDZADEUH, MAJID *et.al* Effect of CO2 Laser and Fluoride Varnish Application on Microhardness of Enamel Surface Around Orthodontic Brackets - **J Lasers Med Sci**. 2018 Winter; 9(1): 43–49
- <sup>147.</sup> HARA, AT, QUEIROZ, CS, GIANNINI, M, CURY, JA, SERRA, MC. Influence of the mineral content and morphological pattern of artificial root caries lesion on composite resin bond strength. **Eur J Oral Sci** 2004; 112: 67–72. Eur J Oral Sci, 2004
- <sup>148.</sup> CASTRO, LARISSA MOREIRA SPINOLA DE. Osteogênese *IN VITRO* sobre vitrocerâmica 100% cristalina e altamente bioativa (BIOSILICATO®): efeitos do condicionamento de superfície e dos produtos de dissolução iônica. **Dissertação de Mestrado pela Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade São Paulo**, 2009.
- <sup>149.</sup> TIRAPELLI, CAMILA. Avaliação da eficácia de um biomaterial e conhecidos agentes dessensibilizantes no tratamento da hipersensibilidade dentinária- Estudo *IN VITRO* e *IN VIVO*. **Dissertação de Doutorado pela Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade São Paulo**, 2007.
- <sup>150.</sup> 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,



n. 7, p. 1463-1469, 2009.

<sup>151</sup>. O. PEITL, *et.al* – “Highly bioactive P2O5-Na2O-SiO2 glass-ceramics”. **Journal of Non-Crystalline Solids**, 2001.

<sup>152</sup>. L.M. Miller, V. Vairavamurthy, M.R. Chance, R. Mendelsohn, E.P. Paschalis, F. Betts, A.L. Boskey, In situ analysis of mineral content and crystallinity in bone using infrared micro-spectroscopy of the  $\nu_4$  PO4  $3^-$  vibration, *Biochimica et Biophysica Acta* **1527** (2001) 11–19.

<sup>153</sup>. F. Zafarina Zakaria, J. Mihaćly, I. Sajoć, R. Katona, L. Hajba, F. Abdul Aziz, J. Mink, FT-Raman and FTIR spectroscopic characterization of biogenic carbonates from Philippine venus seashell and *Porites* sp., **Coral Journal of Raman Spectroscopy** **39** (2008) 1204–1209.

<sup>155</sup>. C. Rey, V. Renugopalakrishnan, B. Collins, M.J. Glimcher, *Calcified Tissue International* **49** (1991) 251–258.

<sup>156</sup>. V.C. Farmer, *The Infrared Spectra of Minerals*, Bartholomew Press, Dorking, Surrey, 1974, p. 390.

<sup>157</sup>. N. Ignjatovic and D. Uskokovic, *Spectros. Int. J.* **18**, 553 (2004).

<sup>158</sup>. CROVACE, M. C., SOUZA, M. T., CHINAGLIA, C. R., PEITL, O., ZANOTTO, E. D., "Biosilicate® — A multipurpose, highly bioactive glass-ceramic. In vitro, in vivo and clinical trials", **Journal of Non-Crystalline Solids**, 2015

<sup>159</sup>. BOTTA, S. B. *et al.* Effect of dental tissue conditioners and matrix metalloproteinase inhibitors on type I collagen microstructure analyzed by Fourier transform infrared spectroscopy. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, v. 100B, n. 4, p. 1009-1016, 2012.

<sup>160</sup>. M. CERRUTI *et.al* -Effect of pH and ionic strength on the reactivity of Bioglass 45S5 - **Biomaterials** **26** (2005) 1665–1674.

<sup>161</sup>. V. AINA *et al.* / On the dissolution/reaction of small-grain Bioglass® 45S5 and F-modified bioactive glasses in artificial saliva (AS) **Applied Surface Science** **257** (2011) 4185–4195.

<sup>162</sup>. EMANUELA PRADO FERRAZ, GILEADE PEREIRA FREITAS, MURILO CAMURI CROVACE, OSCAR PEITL, EDGAR DUTRA ZANOTTO, PAULO TAMBASCO DE OLIVEIRA, MARCIO MATEUS BELOTI, ADALBERTO LUIZ ROSA, Bioactive-Glass Ceramic with Two Crystalline Phases (BioS-2P) for Bone Tissue Engineering, **Biomedical Materials**. **12** (4) (2017) 045018.

<sup>163</sup>. R KARTHIKEYAN, PRADEEP KUMAR YADALAM, A J ANAND, KAMALAKANNAN PADMANABHAN, AND G SIVARAM, Morphological and Chemical Alterations of Root Surface after Er:YAG laser, Nd:YAG Laser Irradiation: A Scanning Electron Microscopic and Infrared Spectroscopy Study, **J Int Soc Prev Community Dent**. 2020 Mar-Apr; 10(2): 205–212.

---