

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA

Daniela Casimiro de Figueredo

**EFEITOS DA ASSOCIAÇÃO DO BIOSILICATO® E *LASER* EM ALTA
INTENSIDADE NA PARALISAÇÃO DA CÁRIE DE RADIAÇÃO**

São Bernardo do Campo – SP

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA

Daniela Casimiro de Figueredo

**EFEITOS DA ASSOCIAÇÃO DO BIOSILICATO[®] E *LASER* EM ALTA
INTENSIDADE NA PARALISAÇÃO DA CÁRIE DE RADIAÇÃO**

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

Orientadora: Prof^a Dr^a Juliana Kelmy Macário Barboza Daguano

Coorientadora: Prof^a Dr^a Patricia Aparecida da Ana

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).

Casimiro de Figueredo, Daniela
Efeitos da associação do Biosilicato® e laser em alta
intensidade na paralisação da cárie de radiação / Daniela
Casimiro de Figueredo. — 2019.

234 fls. : il.

Orientadora: Juliana Kelmy Macário Barboza Daguano
Coorientadora: Patricia Aparecida da Ana

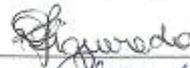
Dissertação (Mestrado) — Universidade Federal do ABC,
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica, São
Bernardo do Campo, 2019.

1. Cárie de radiação. 2. Dentina radicular. 3. Biosilicato®. 4.
Laser. I. Kelmy Macário Barboza Daguano, Juliana. II.
Aparecida da Ana, Patricia. III. Programa de Pós-Graduação em
Engenharia Biomédica, 2019. IV. Título.

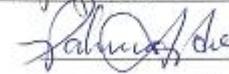
Este exemplar foi revisado e alterado em relação à versão original, de acordo com as observações levantadas pela banca no dia da defesa, sob responsabilidade única do(a) autor(a) e com a anuência do(a) orientador(a).

São Bernardo do Campo/SP 05 de dezembro de 2019

Assinatura do(a) autor(a):



Assinatura do(a) orientador(a):





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, DANIELA CASIMIRO DE FIGUEREDO realizada em 26 de Setembro 2019:

Prof.(a) Dr.(a) DENISE MARIA ZEZELL
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - Membro Titular

Prof.(a) Dr.(a) OSCAR PEITL FILHO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS - Membro Titular

Prof.(a) Dr.(a) ILKA TIEMY KATO PRATES
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC - Membro Suplente

Prof.(a) Dr.(a) MARINA TREVELIN SOUZA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS - Membro Suplente

Prof.(a) Dr.(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

A um sertanejo que em 1979 deixou família e amigos na Paraíba em busca de uma vida melhor. Que passou parte de sua vida profissional desdobrando-se em trabalhos no chão de fábrica de empresas metalúrgicas e transportando pessoas em ônibus coletivos. Que sempre foi um exemplo de integridade, honestidade, empatia e, acima de tudo, de bondade. Que partiu desta vida precocemente, depois de várias batalhas árduas das quais jamais desistiu. De quem eu não me esqueço jamais e amo incondicionalmente. A você, meu pai.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A minha orientadora, prof.^a Juliana Daguano que me acolheu ao seu grupo de pesquisa (GPBiomat) em outubro de 2015. Obrigada por toda a dedicação nestes anos, por ter batalhado para que eu tivesse uma bolsa no momento em que mais precisei e por ter me incluído aos seus projetos em conjunto com a prof^a Patricia da Ana.

A minha coorientadora, prof^a Patricia da Ana, Patty ♥, que foi a mais grata surpresa nestes anos de UFABC. Obrigada por apoiar minhas ideias malucas, por estar sempre disponível e disposta a ajudar. Espero que o Giuliano me perdoe por te fazer deixá-lo no Tatuapé tantas vezes. Você é para mim um exemplo a ser seguido como profissional, mulher, amiga e mãe. Meu trabalho de graduação e este mestrado não teriam ocorrido, em hipótese alguma, sem você. Saiba que, para mim, a orientação é apenas uma formalidade: você é tão orientadora quanto à Juliana. Que privilégio ter sido orientada por você esses anos!

Ao Matheus Del Valle, outra grata surpresa neste mestrado. Obrigada pelas rotinas no MATLAB, que você teve que mexer um trilhão de vezes, por toda a ajuda remota e presencial com n *softwares* e por discutir resultados comigo. E, obviamente, obrigada pelas mensagens às 2 horas da madrugada, pelos *happy hours* no Madero (ou em qualquer outro lugar na Kennedy) e por toda a companhia dentro e fora da UFABC. Este mestrado não seria o mesmo sem você. Sério.

Aos meus pais, José (*in memorian*) e Zilma, e irmã, Deyse, por terem me apoiado incondicionalmente ao longo desses anos. Sem o apoio e o carinho de vocês, eu jamais teria chegado até aqui. Vocês são meu porto seguro; o lugar para onde eu sempre posso voltar.

AGRADECIMENTOS

Na ciência e na vida, nada se faz sozinho. Eis aqui alguns agradecimentos a pessoas que tornaram este mestrado possível:

À prof.^a Dra. Denise Maria Zezell, do Laboratório de Biofotônica no Centro de *Lasers* no IPEN. Obrigada por ter viabilizado a realização de parte dos experimentos que compõem este estudo na infraestrutura do IPEN. Agradeço também toda a atenção que me foi dedicada em todas as vezes que estive em seu laboratório.

Ao prof. Renato Prates, da UNINOVE, que possibilitou a realização do desafio cariogênico em seu laboratório. Obrigada por toda a acolhida e atenção enquanto estive lá.

À engenheira Elizabeth Somessari pela irradiação das amostras de dentina no IPEN.

À Daísa de Lima Pereira e à Cláudia Zamataro por toda a acolhida e atenção todas as vezes que fui até o IPEN. Obrigada por estarem sempre dispostas a ajudar.

Ao Pedro Castro, do IPEN, que, sem me conhecer, aceitou me ajudar na análise dos espectros de FT-Raman. Muito obrigada pela análise semiquantitativa e pelos gráficos.

Ao Luiz e à Márcia Cabral por terem conduzido os experimentos com *S. mutans* na UNINOVE. Agradeço também por toda a acolhida e a atenção que vocês dedicaram a mim enquanto estive lá.

À professora Carolina Benetti, da UFABC, por toda a ajuda nas análises estatísticas e, também, por toda a atenção que me é dedicada quando estou na sala que você divide com a Patty.

Ao professor Luiz Fernando Setz que apoiou a realização desta dissertação e contribuiu com discussões sobre cerâmicas, além de ter remanejado sua agenda inúmeras vezes para ficar com o Giuliano enquanto a Patty estava comigo.

Ao Leonardo Messias que me auxiliou muito ao realizar um projeto de IC, paralelo ao meu, que norteou alguns pontos do meu estudo. Em especial, agradeço

pelas leituras de FTIR e por toda a companhia no laboratório, com altos papos sobre séries e livros.

Ao Rodrigo Monteiro pela ajuda na análise de DRX e por todas as vezes que esclareceu minhas dúvidas sobre procedimentos de química. Além, é claro, das boas conversas ao longo desses anos de GPBiomat. Tenho certeza de que você terá muito sucesso como professor e pesquisador.

À equipe técnica da Central Multiusuário da UFABC – SBC: Adrian e Tanil e as estagiárias Dianne e Gabriela. Obrigada por todo o suporte, pela paciência (eu ligo muitas vezes para tirar dúvidas) e pela boa vontade em ajudar sempre. Em especial, agradeço ao Adrian por sempre procurar uma forma de simplificar procedimentos, por estar sempre de prontidão e por ter realizado boa parte das aquisições de imagens de MEV que compõem este trabalho.

Ao técnico Fabiano, da Central Multiusuário da UFABC – SA, pelo treinamento no difratômetro de raio-X.

Aos técnicos Renan e João, da Central Multiusuário da UFABC – SA, por todo o auxílio no equipamento de FT-Raman.

Aos técnicos Wilson, Marília e Arnaldo do laboratório de engenharia de materiais (L501-1). Desde a graduação, vocês sempre se mostraram dispostos a esclarecer dúvidas e a treinar a manipulação de equipamentos. Sem vocês, graduação e mestrado não seriam os mesmos.

Aos técnicos do bloco Ômega: Henrique, Robson, Luís, Felipe (Paka), Rafael, Lúcio, Fábio e William. Muito obrigada por toda a ajuda com diversas solicitações que eu fiz ao longo desses anos. E, é claro, obrigada pela companhia nos almoços no RU ou no café no fim da tarde.

Ao Henrique Urbano que me ensinou um atalho que mudou minha vida: windows + shift + S. Como eu não sabia disso antes?

A todos os meus colegas de grupo de pesquisa, em especial, Kátia Inomata, Ana Namba e Débora Ferraraz. Obrigada pela companhia dentro e fora de laboratório. Vocês são sensacionais.

Aos meus amigos que estão sempre ao meu lado e dispostos a me ajudar quando mais preciso. Em especial, Amanda Moraes. Obrigada por tudo, especialmente por me ouvir e a me dar conselhos que eu não ousa desobedecer.

À UFABC que, desde 2009, é a minha segunda casa. Foi aqui que eu me apaixonei por pesquisa em *hard sciences* e tornei esta minha opção de carreira profissional. Sou muito grata pelas oportunidades que a mim foram dadas na universidade e, em especial, pelas bolsas que foram concedidas ao longo dos anos.

E, como vivemos um atual desmonte da Ciência promovida pelo atual governo, deixo aqui meus agradecimentos ao governo Lula que promoveu a expansão do ensino superior público ao criar novas universidades e institutos federais, ampliar a oferta de bolsas de pós-graduação e democratizar o acesso a este tipo de ensino. Não existe desenvolvimento econômico sem Educação e Ciência.

Ao Laboratório de Materiais Vítreos (LaMaV) da UFSCar pelo fornecimento de Biosilicato[®].

À FAPESP (Processo 2017/21887-4), CAPES (projeto PROCAD-CAPES edital 071/2013, 88881.068505/2014-01) e CNPq (INCT # 465763/2014-6 – Photonics National Institute for Science and Technology – INFO) pelo auxílio financeiro.

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

“Valeu a pena? Tudo vale a pena

Se a alma não é pequena”

Fernando Pessoa

RESUMO

A cárie de radiação é um efeito secundário da radioterapia na região da cabeça e pescoço. Caracteriza-se por ser indolor, rampante e acometer superfícies do dente que são mais resistentes à ação de bactérias, como as margens cervicais. Seu tratamento pode ser desafiador devido aos riscos de infecções oportunistas e de desenvolvimento de osteorradionecrose aos quais os pacientes oncológicos estão sujeitos. Neste sentido, a associação de cerâmicas bioativas, que promovem a remineralização de tecidos ósseos, como o Biosilicato[®] (BS), com *lasers* em alta intensidade, como o Nd:YAG ($\lambda = 1064$ nm), surge como uma alternativa viável para a paralisação da progressão de lesão de cárie de radiação em dentina radicular. Para atingir este objetivo, este estudo foi dividido em três fases experimentais. Na Fase I, escolheu-se o veículo mais apropriado para aplicação do BS na superfície da dentina; na Fase II, avaliaram-se os efeitos da radioterapia *in vitro* sobre as propriedades de 90 amostras de dentina radicular; e na Fase III, as amostras de dentina tratadas por radioterapia na Fase II foram desmineralizadas artificialmente, distribuídas aleatoriamente em 6 grupos de tratamento (G1 – sem tratamento (controle negativo); G2 - aplicação tópica de flúor (FFA, controle positivo); G3 – irradiação *laser* (Nd:YAG); G4 – FFA+Nd:YAG; G5 – BS e G6 – BS+Nd:YAG) e submetidas à desafio cariogênico com *S. mutans*. As caracterizações foram feitas por meio de espectroscopia de absorção no infravermelho por transformada de Fourier (ATR-FTIR), espectroscopia Raman (FT-Raman), tomografia por coerência óptica (OCT), microdureza superficial Knoop e microscopia eletrônica de varredura (MEV). Na Fase I, concluiu-se que o melhor veículo para aplicação de BS foi a água deionizada; na Fase II, constatou-se que a radioterapia provocou mudanças composicionais, ópticas, mecânicas e morfológicas na dentina radicular compatíveis com a desmineralização e na Fase III, percebeu-se que todos os tratamentos propostos tiveram ação remineralizadora e ofereceram à dentina radicular alguma resistência à progressão da lesão de cárie por *S. mutans*, embora não tenha sido possível identificar qual tratamento foi o mais eficaz. Destaca-se que o tratamento com *laser* de Nd:YAG, em associação ao BS, parece ser promissor, uma vez que permitiu a formação de uma camada uniforme sobre a superfície da dentina e com poucas partículas remanescentes não dissolvidas de BS.

Palavras-chaves: Cárie de radiação, Dentina radicular, Biosilicato[®] e *Laser*.

ABSTRACT

Radiation-related caries is a side effect of radiotherapy in the head and neck region. It is painless, rampant and affects surfaces of the tooth which are more resistant to bacterial activity, such as the cervical areas. The treatment may be a challenge because oncologic patients are prone to opportunistic infections and osteoradionecrosis. In this context, the association of bioactive ceramics, which are capable of remineralizing bone tissues, such as Biosilicate[®] (BS), with high-intensity lasers, such as Nd:YAG ($\lambda = 1064$ nm), arises as a viable alternative to promote the paralysis of the progression of radiation-related caries lesion on root dentin. In order to achieve this aim, this study was conducted in three experimental stages. At Stage I, the most appropriate vehicle to apply BS over root dentin surface was chosen; at Stage II, the effects of radiotherapy *in vitro* on the properties of 90 root dentin slabs were evaluated; and at Stage III, all the root dentin slabs treated with radiotherapy at Stage II were chemically demineralized, randomly distributed into 6 treatment groups (G1 – no treatment (negative control); G2 – topical acidulated phosphate fluoride application (APF gel, positive control); G3 – Nd:YAG laser irradiation; G4 – APF gel +Nd:YAG; G5 – BS and G6 – BS+Nd:YAG) and underwent cariogenic challenge with *S. mutans*. The root dentin slabs were characterized by means of Fourier transform infrared absorption spectroscopy (ATR-FTIR), Raman spectroscopy (FT-Raman), optical coherence tomography (OCT), Knoop surface microhardness and scanning electron microscopy (SEM). At Stage I, the best vehicle to apply BS over root dentin slabs was deionized water; at Stage II, it was noted that radiotherapy promoted compositional, optical, mechanical and morphological changes on root dentin compatible with demineralization and, at Stage III, it was verified that all the proposed treatments remineralized and enhanced the resistance of root dentin slabs to *S. mutans*, despite the fact that it was not possible to identify which treatment was the most effective of all. It is worthy to mention that the treatment with Nd:YAG laser, in association with BS, seems to be promising since it promoted the formation of a uniform layer with few remaining undissolved BS particles on the root dentin surface

Keywords: Radiation-related caries, root dentin, Biosilicate[®] and *laser*.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. OBJETIVO.....	12
2.1. Objetivo geral.....	12
2.1.1. Objetivos específicos	12
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
3.1. Estrutura e composição do dente	13
3.2. Cárie dental	15
3.3. A radioterapia na região da cabeça e pescoço e a cárie de radiação	20
3.4. O <i>laser</i> de Nd:YAG – usos na Odontologia e no manejo da cárie.....	27
3.5. Cerâmicas bioativas e Biosilicato [®] - definições, usos em odontologia e no manejo de cárie	31
3.6. Associação de <i>laser</i> de Nd:YAG e cerâmicas bioativas.....	38
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	40
4.1. Delineamento experimental	40
4.2. Considerações éticas	42
4.3. Preparação das amostras de dentina radicular bovina.....	43
4.4. Obtenção do Biosilicato [®] (BS).....	43
4.5. Fase I.....	43
4.5.1. Indução da lesão incipiente de cárie	43
4.5.2. Tratamentos com BS em diferentes veículos	44
4.6. Fase II.....	44
4.7. Tratamento radioterápico <i>in vitro</i> com Co-60	44
4.8. Fase III.....	45
4.8.1. Indução da lesão incipiente de cárie	45
4.8.2. Tratamentos.....	45
4.8.3. Desafio cariogênico com <i>Streptococcus mutans</i>	47

4.9. Técnicas de caracterizações	48
4.9.1. Técnica de reflexão total atenuada da espectroscopia de absorção na região do infravermelho por transformada de Fourier (ATR - FTIR).....	48
4.9.2. Espectroscopia Raman com transformada de Fourier (FT-Raman)	49
4.9.3. Tomografia por coerência óptica (OCT).....	49
4.9.4. Microdureza superficial Knoop	50
4.9.5. Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	50
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
5.1. Fase I – Determinação do veículo de Biosilicato®	52
5.2. Fase II – determinação dos efeitos da radiação ionizante na composição e propriedades ópticas, mecânicas e morfológicas da dentina radicular.....	55
5.2.1. Análise composicional por ATR – FTIR	55
5.2.2. Análise composicional por FT-Raman	61
5.2.3. Avaliação de propriedades ópticas por OCT	69
5.2.4. Avaliação de propriedade mecânica por microdureza superficial Knoop	76
5.2.5. Análise morfológica por MEV	79
5.3. Fase III – Avaliação da associação de diferentes tratamentos de remineralização <i>in vitro</i> sobre a progressão da cárie em dentina radicular.....	82
5.3.1. Indução das lesões artificiais de cárie	82
5.3.1.1. Análise composicional por ATR-FTIR	82
5.3.1.2. Análise composicional por FT-Raman.....	86
5.3.1.3. Avaliação de propriedade óptica por OCT.....	91
5.3.2. Tratamentos de remineralização	97
5.3.2.1. Avaliação morfológica por MEV	97
5.3.2.2. Avaliação composicional por ATR-FTIR	115
5.3.2.3. Avaliação de propriedades ópticas por OCT.....	137
5.3.3. Desafio cariogênico com <i>Streptococcus mutans</i>	159

5.3.3.1. Avaliação morfológica por MEV	159
5.3.3.2. Avaliação composicional por ATR-FTIR	169
5.3.3.3. Avaliação de propriedades ópticas por OCT	194
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	210
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	214
ANEXO	227

1. INTRODUÇÃO

Segundo dados do Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), estimam-se, no biênio 2018-2019, 14.700 novos casos de câncer na cavidade oral. Destes, 76% deverão atingir indivíduos do sexo masculino. Os fatores de risco para o desenvolvimento dessas neoplasias são tabagismo, elitismo, infecções por HPV, dieta desequilibrada e má higiene bucal. Os tratamentos geralmente incluem cirurgia, radioterapia, quimioterapia ou uma combinação destes¹.

A radioterapia, em especial, pode ser empregada como tratamento definitivo, adjuvante ou como paliativo nos cânceres de cabeça e pescoço^{2,3}. Apesar do tratamento radioterápico ter como objetivo inviabilizar a replicação de células neoplásicas, a radiação ionizante também causa danos a células saudáveis por não ser seletiva^{2,4}. Surgem, assim, efeitos secundários dose-dependentes, que podem ser agudos ou tardios².

Um dos efeitos secundários tardios da radioterapia na região da cabeça e pescoço, em doses terapêuticas totais entre 50 e 70 Gy⁴, é a cárie de radiação. Esta se difere da cárie clássica por ser indolor^{2,5,6}, rampante, progredir de maneira rápida e agressiva^{2,5,7} e acometer regiões do dente que são mais resistentes à ação de bactérias, como as margens cervicais^{2,3,5,7,8}. As primeiras lesões podem surgir entre 3 e 6 meses após a conclusão da radioterapia e podem levar à destruição total da dentição em um período entre 3 e 5 anos³. Nos casos mais severos, a perda da dentição pode ocorrer em até um ano^{2,5,6}.

Do ponto de vista etiológico, a cárie de radiação é classificada, *a priori*, como um efeito secundário indireto da radioterapia^{5,6,9} porque é resultante das alterações no fluxo e na composição da saliva que, por sua vez, são consequências diretas da radiação ionizante sobre as glândulas parótidas. No entanto, há uma discussão na atualidade que tenta esclarecer se os tecidos duros dentais também seriam afetados por essa mesma radiação ionizante e, conseqüentemente, se os efeitos nestes tecidos contribuiriam para a etiologia desta modalidade de cárie. Até este momento, não há consenso a respeito disso^{9,10}.

Ainda hoje, a abordagem preferencial de odontologistas em relação à cárie de radiação é a profilaxia com flúor^{5,11}. No entanto, o subproduto da aplicação tópica

de flúor, o fluoreto de cálcio (CaF_2), dissolve-se com facilidade quando submetido a um fluxo contínuo de saliva¹² e, por isso, são necessárias muitas aplicações do agente para se obter um efeito cariostático eficiente, o que pode ser complicado para um paciente oncológico. Desta maneira, o uso de estratégias que promovam uma ação mais duradoura nos tecidos duros dentais é primordial.

No caso de pacientes oncológicos, uma vez que as lesões cariosas desenvolvem-se, o seu tratamento torna-se desafiante devido aos riscos de infecções oportunistas e de osteorradionecrose aos quais os indivíduos tratados com radioterapia na região da cabeça e pescoço estão sujeitos⁵. Desta forma, é necessário que procedimentos minimamente invasivos sejam desenvolvidos com a finalidade de preservar a dentição deste tipo de paciente.

Neste sentido, *lasers* e cerâmicas bioativas tornam-se uma possibilidade viável e atrativa para o manejo de lesões de cárie de radiação. Os primeiros, especificamente, são utilizados desde a preparação cavitária até a descontaminação, remoção e prevenção da cárie¹³. É reportado que a irradiação *laser* provoca alterações cristalográficas e composicionais nos tecidos dentais que tornam o tecido irradiado mais resistente à desmineralização¹⁴. Devido a este fato, *lasers* em alta intensidade podem promover um efeito mais duradouro^{15,16}. Contudo, os efeitos deste tipo de *lasers* sobre a cárie de radiação nunca foram estudados.

As cerâmicas bioativas, por sua vez, englobam vidros e vitrocerâmicas que são capazes de se ligar quimicamente ao osso ao formar uma camada de hidroxiapatita carbonatada (HAC) na interface do biomaterial/tecido e, desta forma, promovem uma regeneração tecidual^{17,18,19,20,21}. Em especial, o Biosilicato[®] (BS) tem sido empregado com êxito na odontologia no tratamento de hipersensibilidade dentinária^{22,23} e na remineralização de lesões provocadas por cárie ou por erosão^{24,25,26}.

Neste estudo, propõe-se o uso do Biosilicato[®] em associação a um *laser* em alta intensidade de Nd:YAG ($\lambda = 1064 \text{ nm}$) a fim de avaliar seus efeitos em relação à paralisação da progressão de cárie de radiação em dentina radicular, que é mais comumente afetada por esta patologia.

2. OBJETIVO

2.1. Objetivo geral

Avaliar os efeitos de diferentes tratamentos *in vitro* na paralisação da progressão da cárie de radiação em dentina radicular bovina por meio da associação (ou não) de flúor fosfato acidulado (FFA), Biosilicato[®] (BS) e *laser* de Nd:YAG ($\lambda = 1064$ nm).

2.1.1. Objetivos específicos

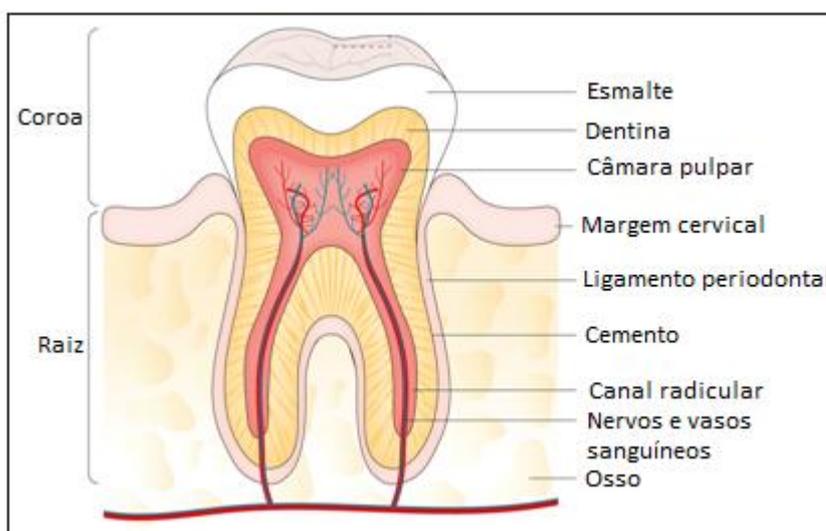
1. Avaliar o melhor veículo para aplicar o Biosilicato[®] sobre a dentina desmineralizada, testando-se um gel dental, óleo de silicone ou água deionizada;
2. Estudar as alterações ópticas, composicionais, morfológicas e de microdureza decorrentes da radioterapia *in vitro* na dentina radicular;
3. Avaliar as mudanças composicionais e ópticas promovidas por um protocolo de desmineralização *in vitro* com a finalidade de criar lesões incipientes de cárie na dentina submetida à radioterapia;
4. Avaliar os efeitos composicionais, ópticos e morfológicos promovidos na dentina submetida à radioterapia com lesão incipiente de cárie após os tratamentos com *laser* de Nd:YAG ($\lambda = 1064$ nm) com pulsos curtos, Biosilicato[®], flúor fosfato acidulado (FFA) ou a associação destes;
5. Estudar os efeitos composicionais, morfológicos e ópticos dos tratamentos supracitados na progressão de lesão de cárie por *S. mutans*.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Estrutura e composição do dente

O dente humano (Figura 1) é formado, basicamente, por cinco diferentes tecidos: esmalte, dentina, polpa, ligamento periodontal e cimento²⁷. Do ponto de vista anatômico, no entanto, o dente pode ser dividido em duas grandes regiões: coroa (parte mais externa e visível) e raiz (parte mais interna e majoritariamente oculta)²⁸. A junção entre a coroa e a raiz é designada margem cervical²⁷.

Figura 1: Representação de um dente humano e seus principais componentes.



Fonte: Adaptado de Pitts et al²⁹.

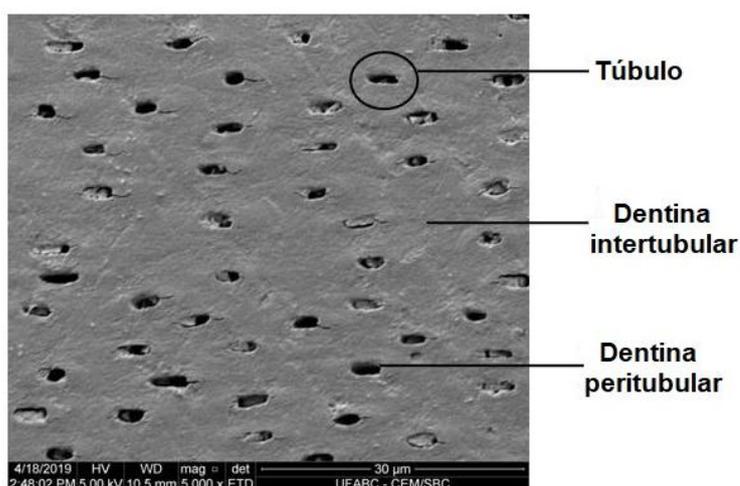
O esmalte recobre a dentina e é o tecido mais mineralizado no corpo humano, uma vez que sua matriz inorgânica, composta por hidroxiapatita carbonatada, corresponde a 97% em peso²⁸. Esta alta mineralização permite ao esmalte resistir às tensões provocadas pela mastigação, bem como aos ataques de ácidos provenientes de alimentos ou bactérias²⁷.

De coloração amarela, a dentina contém a câmara pulpar e suporta o esmalte²⁷. É constituída por uma matriz inorgânica (aproximadamente 69% em peso) de hidroxiapatita carbonatada, bem como por uma matriz orgânica (aproximadamente 20% em peso) cujo principal componente é o colágeno tipo I. Os outros 11% são formados, majoritariamente, por água, além de proteínas e

prolongamentos celulares²⁸. É importante ressaltar que a matriz orgânica confere elasticidade à dentina e compensa a fragilidade do esmalte²⁷.

Morfologicamente, a dentina é constituída por inúmeros túbulos micrométricos (Figura 2), dispostos paralelamente entre si, cujas paredes internas são hipermineralizadas e pobres em colágeno. Cada túbulo é circundado por dentina peritubular cujo conteúdo mineral pode atingir até 90%. Na região entre os túbulos está a dentina intertubular, cuja composição mineral é de aproximadamente 70%. A densidade de túbulos tende a aumentar na proximidade à polpa (entre 4,5 e 6,5 x 10⁶ túbulos/cm²)^{30,31}.

Figura 2: Eletromicrografia de uma amostra de dentina radicular hígida com a identificação de túbulo, dentina intratubular e dentina peritubular. Magnificação original: 5000x.



Fonte: Do próprio autor.

A polpa, por sua vez, é um tecido conjuntivo mole vascularizado que está contido na câmara pulpar e se comunica com o restante do dente por meio do canal radicular²⁸. É responsável por formar, nutrir, proteger e reparar a dentina que a circunda. Estas funções da polpa somente são possíveis devido à existência de odontoblastos²⁷.

Por fim, o ligamento periodontal e o cemento, juntamente com o osso alveolar, constituem um aparato de suporte (periodonto), protegido pela gengiva, que possibilita a fixação dos dentes à mandíbula e à maxila²⁸. O ligamento periodontal é formado por um tecido conjuntivo fibroso de colágeno que fixa o dente

ao osso alveolar, ao passo que o cimento é um tecido avascular mineralizado, com matriz orgânica de colágeno, que recobre a dentina radicular²⁷.

3.2. Cárie dental

A cárie é uma doença infecciosa, transmissível, crônica, multifatorial e de lenta progressão que pode acometer dentes decíduos e permanentes. Inicia-se por bactérias que, a partir do metabolismo de carboidratos fermentáveis, produzem ácidos que dissolvem a matriz inorgânica dos tecidos duros dentais (desmineralização). Por ser uma doença multifatorial, o desenvolvimento e a progressão da lesão cariosa dependem de uma série de fatores, dentre os quais se destacam o tipo de substrato, o tipo de dieta e o tempo de permanência no pH crítico. O surgimento da lesão, portanto, está relacionado ao equilíbrio entre desmineralização e remineralização^{29,32,33,34}.

As bactérias são cruciais para o desencadeamento da lesão de cárie. Intrínsecas ao ambiente oral, centenas de espécies coexistem e formam um biofilme (ou placa bacteriana) sobre a superfície dos dentes. Assim, o biofilme consiste em uma matriz orgânica de polissacarídeos e proteínas e que propicia não apenas a deposição de subprodutos do metabolismo dos micro-organismos ali existentes, mas também os protege de agentes antimicrobianos e facilita a difusão de nutrientes^{29,34}.

Algumas das espécies de bactérias existentes na microbiota oral, tais como *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* e *Lactobacillus* spp, são acidogênicas, isto é, são capazes de produzir ácidos fracos como subprodutos do metabolismo de carboidratos fermentáveis, em especial da sacarose. Essas mesmas espécies de bactérias também são acidúricas, ou seja, conseguem viver em meios ácidos^{29,32,33,34}.

Os ácidos fracos mais comuns produzidos por bactérias acidogênicas no biofilme dental são o láctico, o acético, o propiônico e o fórmico³³. Estes ácidos difundem-se pelos dentes e causam uma queda no pH local que, quando inferior a um valor crítico ($\text{pH} \leq 5,5$ para esmalte e $\text{pH} \leq 6,5$ para dentina)³⁵, possibilita a dissolução de cálcio, fosfato e carbonato presentes no esmalte, cimento e dentina em um processo conhecido como desmineralização^{32,33}.

Tanto a desmineralização quanto a remineralização são regidas pela capacidade de substituição iônica dos cristais de hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), principal constituinte da matriz inorgânica dos tecidos duros²⁷. Uma camada de água, que circunda cada cristal, favorece a troca de cálcio (Ca^{2+}) por sódio (Na^+), potássio (K^+) ou magnésio (Mg^{2+}), ao passo que o fosfato (PO_4^{-3}) e a hidroxila (OH^-) podem ser trocados por carbonato (CO_3^{-2}), fluoreto (F^-), cloreto (Cl^-) ou água (H_2O)²⁸.

Nos tecidos duros dentais, o substituinte mais comum do fosfato na hidroxiapatita é o carbonato que, conseqüentemente, origina a hidroxiapatita carbonatada. No esmalte, estima-se que um em cada dez íons fosfatos é substituído por carbonato; na dentina esta mesma proporção é de um para cinco²⁸. É importante salientar que o carbonato aumenta a solubilidade da hidroxiapatita em meios ácidos e, por isto, torna os tecidos dentais duros mais propensos à cárie^{32,33}.

A progressão, paralisação ou reversão da cárie dependem de um equilíbrio entre desmineralização e remineralização^{29,32,33}. Se a primeira predominar sobre a segunda, há a possibilidade do desenvolvimento de uma lesão esbranquiçada (Figura 3A) com superfície íntegra, devida à deficiência de hidroxiapatita, que pode evoluir para a cavitação (Figura 3B), que é a destruição da matriz inorgânica⁸. Geralmente, a progressão da cárie até atingir a cavitação é um processo lento que pode levar de meses até anos para ser concluído, em dependência dos diversos fatores mencionados anteriormente^{29,32,33}.

Figura 3: (A) Ilustração do processo inicial de desmineralização que resulta em lesões esbranquiçadas e (B) ilustração de uma lesão cariosa cavitada.



Fonte: (A) Deng et al³⁵ e (B) Yip et al³⁶.

O desenvolvimento da lesão cáriosa não cavitada, no entanto, pode ser paralisado ou revertido mediante a remineralização. Neste processo, íons de cálcio e fosfato, presentes na saliva, são difundidos para os dentes e se adsorvem sobre o que remanesceu nos cristais desmineralizados^{32,33}. Quando isto ocorre na presença de íons fluoreto, as regiões remineralizadas são mais resistentes ao ataque de ácidos do que a estrutura original devido à formação de hidroxiapatita fluoretada e/ou fluorapatita^{27,33}.

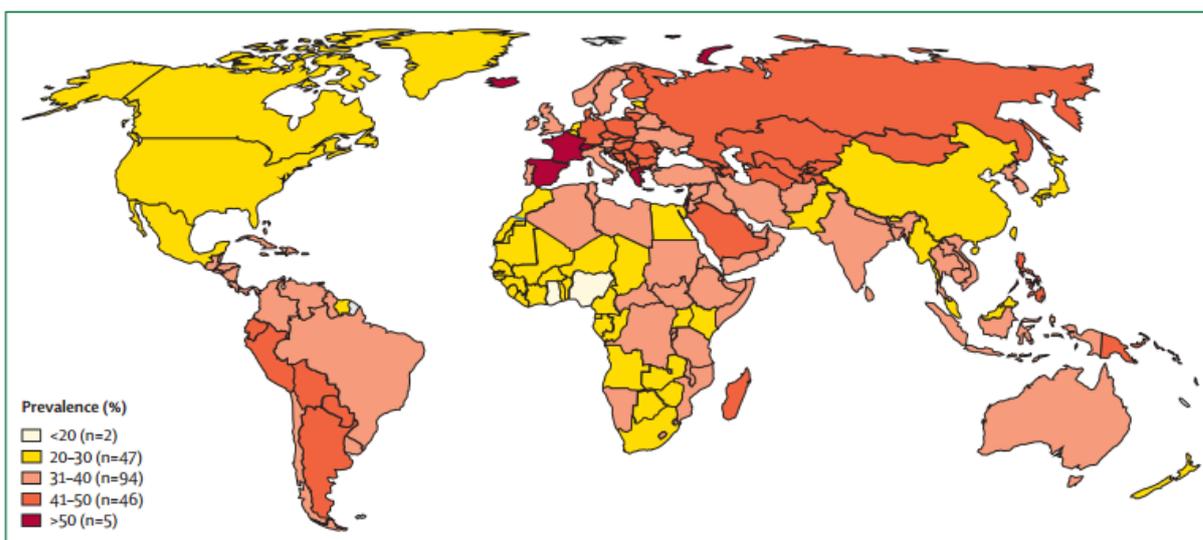
É perceptível que a saliva desempenha um papel essencial na remineralização. A saliva, além de ser a principal fonte de cálcio e fosfato, age como uma solução tampão e tem como função neutralizar o pH oral que varia entre 6,5 a 7,5 após as refeições e higienização³⁵. Alterações na composição ou no fluxo salivar podem levar ao desenvolvimento de cárie rampante, isto é, que progride de modo agressivo e rápido^{29,32,33,35}.

Ressalta-se que outros fatores, assim como a saliva, contribuem positivamente para o processo de remineralização tais como: a exposição do indivíduo ao flúor; o controle do biofilme por meio de escovação e fio dental e mudanças na dieta de modo a reduzir o consumo de carboidratos fermentáveis, sobretudo o de sacarose, uma vez que esta se constitui no principal substrato para as bactérias do biofilme^{29,32,34,36}. Em contrapartida, má higiene oral; dieta rica em carboidratos refinados; uso frequente de medicamentos com açúcar em sua composição; métodos inapropriados de alimentação infantil; pobreza; marginalização social; menor número de anos em educação formal; uso de aparelhos ortodônticos e próteses mal projetadas são considerados fatores de risco para o desenvolvimento de cárie³².

Faz-se necessário elucidar brevemente os aspectos socioeconômicos relacionados à cárie. Indivíduos de classes sociais mais baixas são suscetíveis à falta de acesso a água fluoretada e a itens de higiene pessoal (como escovas de dente e dentifrícios fluoretados)³⁷, além de possuírem uma dieta mais rica em carboidratos e refrigerantes. De modo particular, no Brasil, a desigualdade salarial entre homens e mulheres é um fator de desenvolvimento de cárie nestas últimas, uma vez que tal diferença impacta o seu poder de compra de serviços e mercadorias³⁸. Conseqüentemente, os fatores socioeconômicos contribuem para

que a cárie não tratada seja a doença de maior ocorrência no mundo, afetando 34,1% da população mundial (Figura 4)³⁹.

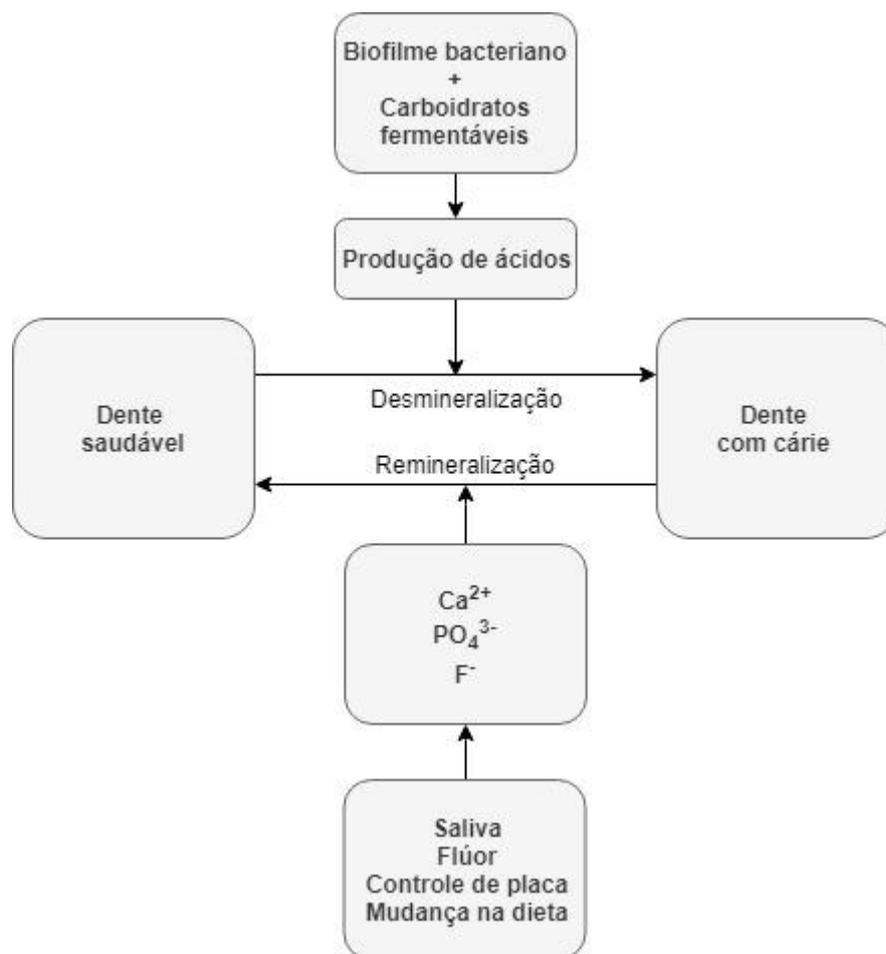
Figura 4: Estimativa da prevalência de cárie não tratada, em dentes permanentes, em 2017 mundialmente.



Fonte: Peres et al³⁹.

A Figura 5 resume esquematicamente o processo de formação e desenvolvimento da lesão cáriosa sob a óptica dos mecanismos de desmineralização e remineralização dos tecidos duros. No mesmo esquema, há também uma relação dos principais fatores que favorecem a ocorrência de cada um destes mecanismos.

Figura 5: Ilustração esquemática do processo de formação e desenvolvimento da cárie.



Fonte: Adaptado de Selwitz et al³².

Conforme mencionado anteriormente, a cárie pode acometer o esmalte, a dentina e o cemento e, portanto, pode ocorrer tanto na coroa como na raiz. Apesar de poder se manifestar em qualquer porção de cada um desses tecidos, observa-se uma prevalência de lesões cariosas, em dentes permanentes, em superfícies interproximais (áreas entre dentes adjacentes) ou planas em comparação às oclusais (com fissuras)^{32,33}.

O diagnóstico da cárie é feito por um profissional, principalmente odontologista, por meio de inspeção táctil-visual das superfícies dentárias com auxílio de uma sonda odontológica. Em alguns casos, radiografias panorâmicas ou interproximais podem ser muito úteis no diagnóstico de lesões cariosas em superfícies proximais^{29,32}.

Na atualidade, a prevenção, especialmente com uso de flúor, é a abordagem preferencial adotada por odontologistas em relação à cárie^{32,33}. Contudo, quando já há lesões cavitadas, recomenda-se a realização de restauração nos casos de não haver possibilidade de realização de terapia minimamente intervencionista. Embora no passado tenha havido uma crença generalizada de que esta seria a cura da cárie, trata-se apenas da remoção de bactérias de uma cavidade específica³³. O tratamento da doença requer cuidados e estratégias preventivas para que novas lesões não surjam em outros locais, assim como nas margens das restaurações³².

3.3. A radioterapia na região da cabeça e pescoço e a cárie de radiação

O câncer de cabeça e pescoço designa os tumores malignos que acometem a cavidade oral, a faringe, a laringe, os seios paranasais, a cavidade nasal e as glândulas salivares^{40,41,42}. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2018 surgiram aproximadamente 900.000 novos casos desta modalidade de câncer no mundo inteiro. A taxa de mortalidade, por sua vez, foi de aproximadamente entre 450.000 óbitos naquele ano⁴³.

A escolha dos tratamentos mais adequados para essas neoplasias depende da localização e do estadiamento clínico do tumor; das características histopatológicas; da existência de comorbidades; e também da idade e condição de saúde do paciente^{2,40,41,44,45}. Em geral, os tratamentos baseiam-se em procedimentos cirúrgicos, radioterapia, quimioterapia e imunoterapia. Estes podem ser empregados isoladamente ou de maneira combinada entre si^{40,41,45,46}.

A radioterapia, em especial, pode ser utilizada como tratamento definitivo, adjuvante ou como paliativo nos cânceres de cabeça e pescoço^{2,3}. Seu mecanismo de ação baseia-se no fato de que a radiação ionizante, proveniente de raios-X, gama, nêutrons ou prótons, é capaz de produzir radicais livres, a partir da interação com água, que podem causar danos diretos ou indiretos ao DNA de células, em especial, nas neoplásicas. Conseqüentemente, estas são impedidas de se proliferar^{2,4}.

Embora as células cancerosas sejam mais radiosensíveis, devido a sua constante atividade mitótica, não são as únicas a serem afetadas pela radiação

ionizante⁴². A radioterapia também causa danos às células saudáveis por não se tratar de um procedimento seletivo^{2,4}. Surgem, assim, efeitos secundários (colaterais ou adversos) dose-dependentes no organismo².

Os efeitos secundários da radioterapia podem ser classificados em agudos e tardios e estão relacionados à capacidade de sobrevivência de células tronco, bem como de renovação das células maduras, de um determinado tecido. Tecidos com alta capacidade de renovação celular, como os epiteliais, experimentam efeitos agudos que se manifestam em poucos dias após o início da radioterapia. Em contrapartida, tecidos com uma taxa de renovação mais baixa, como os ósseos, apresentam maior suscetibilidade a efeitos tardios que podem surgir meses ou anos após o fim do tratamento radioterápico².

Geralmente, as neoplasias de cabeça e pescoço são tratadas com doses cumulativas totais que variam entre 50 e 70 Gy⁴. Estas doses são administradas de forma fracionada com uma dose diária de 2 Gy em um período de 5 a 7 semanas^{4,5}. No entanto, efeitos secundários agudos, como a mucosite (inflamação da mucosa oral), começam a surgir com doses baixas, isto é, entre 10 e 15 Gy^{2,4,44}. Em contrapartida, não há consenso sobre o valor da dose mínima necessária para o surgimento de efeitos secundários tardios.

Considerando o tratamento do câncer na região da cabeça e pescoço, os efeitos secundários agudos mais comuns são: mucosite, hipossalivação, xerostomia, espessamento de secreções, dor e alterações sensoriais (hipogeusia, disgeusia e ageusia). Os efeitos secundários tardios de maior incidência, por sua vez, são cárie de radiação, fibrose, dor neuropática, osteorradionecrose e doença periodontal^{8,47}.

A cárie de radiação, em especial, é um dos efeitos colaterais tardios indiretos mais prejudiciais aos pacientes submetidos à radioterapia na região da cabeça e pescoço, pois pode levar à amputação de coroas ou, ainda, à perda total da dentição em até um ano após o início do tratamento oncológico nos casos mais severos (Figura 6)^{2,5,6}. Além disso, predispõe o paciente ao desenvolvimento de osteorradionecrose (exposição e necrose dos ossos que compõem a mandíbula e maxila)⁵. Caracteriza-se por ser indolor^{2,5,6}, rampante e progredir de maneira rápida e agressiva^{2,5,7}.

Figura 6: Ilustração de um paciente com coroas amputadas por lesão de cárie 4 meses após a radioterapia.



Fonte: Kielbassa et al.⁵

Esta modalidade de cárie costuma acometer regiões do dente que são mais resistentes à cárie clássica, tais como superfícies vestibulares, linguais e cervicais; cúspides; bordas incisais e dentes anteriores mandibulares^{2,3,5,7,8}. Clinicamente, as lesões provocadas pela cárie de radiação podem apresentar diferentes aspectos⁷. As lesões mais frequentes (Figura 7A) caracterizam-se por atingir as margens cervicais e estenderem-se até a junção cimento-esmalte dos dentes. A lesão cariiosa assume um formato anelar e propicia a amputação da coroa. Outras lesões (Figura 7B) manifestam-se como regiões desmineralizadas em superfícies incisais e oclusais desgastadas. E, por fim, há ainda lesões (Figura 7C) que fazem com que a coroa adquira uma coloração de tons marrons ou pretos. Salienta-se que um paciente pode apresentar mais de um tipo de lesão cariiosa (Figura 7D)⁷.

Figura 7: (A) Ilustração de uma lesão cariosa com padrão anelar na margem cervical; (B) lesão cariosa com regiões de desmineralização em superfícies oclusais; (C) lesão cariosa com coroas de coloração amarronzada e superfícies oclusais desgastadas e (D) paciente com dois tipos de lesões cariosas.



Fonte: (A) Campos Velo et al⁶; (B e C) Aguiar et al⁷ e (D) Ray-Chaudhuri et al².

As primeiras lesões de cárie surgem usualmente entre 3 e 6 meses após o término do tratamento radioterápico e podem progredir para a destruição total da dentição em um período entre 3 e 5 anos³. Contudo, há autores que defendem que o risco de desenvolvimento de cárie de radiação é vitalício⁵. Em relação à incidência, as estatísticas variam muito de acordo com as populações analisadas, mas estudos apontam que, em média, entre 11% a 24% dos pacientes submetidos à radioterapia de cabeça e pescoço desenvolverão cárie em algum momento^{3,44,48}.

Conforme mencionado anteriormente, a cárie de radiação é um efeito secundário tardio indireto da radioterapia^{5,6,9}. É, portanto, resultante da combinação de efeitos colaterais diretos do tratamento radioterápico que se traduzem em alterações no fluxo e na composição salivares, na percepção de sabores que, por sua vez, influencia a dieta do paciente, bem como mudanças na microbiota oral^{5,6,7,8}.

As glândulas parótidas, responsáveis pela produção de saliva, são rapidamente afetadas pela radiação ionizante⁷. É reportado que uma dose acumulada de 20 Gy é suficiente para que 80% da função salivar sejam perdidos^{7,46}. Não há consenso, porém, sobre o valor mínimo de dose a partir do qual as perdas nas funções salivares sejam irreversíveis. Alguns estudos indicam que seja 30 Gy³⁵;

outros, 54 Gy⁴⁸; outros, ainda, 58 Gy⁷. O que se sabe, de fato, é que as células serosas acinares sofrem uma reação inflamatória degenerativa a partir de doses entre 60 e 70 Gy e provocam disfunções salivares permanentes^{2,4,5,42}.

A hipossalivação, isto é, a redução no fluxo salivar, é uma das primeiras consequências manifestadas da interação da radiação com as glândulas parótidas. Nos pacientes irradiados na cabeça e pescoço, a taxa de fluxo salivar diminui gradualmente até atingir valores inferiores a 0,3 mL/min⁴ (em indivíduos normais esta taxa é de 1,0 mL/min em salivacão estimulada)^{4,35}, o que corresponde, em volume, a uma redução de 90% da quantidade de saliva produzida inicialmente^{4,5}.

Ainda, a hipossalivação pode ser acompanhada de modificações composicionais na saliva, que, por sua vez, pode exibir perda de transparência ou, ainda, adquirir uma coloração amarelada⁴. É comum também que a saliva apresente maior viscosidade; redução da capacidade de tamponamento; alterações nas concentrações de eletrólitos (cálcio, fosfato, potássio e sódio) e diminuição na atividade das amilases e de anticorpos^{5,7,42}.

Pacientes irradiados na cabeça e pescoço exibem, em média, um pH oral de aproximadamente 5,0, que é cariogênico e favorece a desmineralização do esmalte e da dentina. Devido à diminuição da capacidade de tamponamento da saliva, bem como às alterações na concentração de eletrólitos, o processo de remineralização é dificultado, o que propicia um ambiente adequado para o desenvolvimento de lesões cariosas^{2,5,7,8,42}.

Normalmente, pacientes com hipossalivação costumam queixar-se também de xerostomia (sensação de boca seca). Tanto a hipossalivação quanto a xerostomia podem dificultar a fonação, a mastigação, a deglutição, o uso de próteses, bem como a percepção de sensações gustativas^{2,4,5,47}. Ressalta-se, no entanto, que as alterações na percepção de sabores não se devem somente à hipossalivação e à xerostomia, mas também aos efeitos da irradiação sobre as papilas gustativas^{5,7,47}.

Entre as mudanças na percepção de sensações gustativas, destaca-se a disgeusia, que é definida como uma distorção na percepção dos sabores². A princípio, há uma diminuição na percepção do sabor doce que leva a um aumento na percepção dos sabores amargo e ácidos. Conforme o tratamento radioterápico

progride, há uma redução na percepção geral dos sabores (hipogeusia) que pode levar à ageusia (ausência total da percepção de sabores). Há, ainda, a possibilidade da redução na percepção do sabor umami, que pode acarretar no desinteresse pela alimentação por parte do paciente⁸.

Tanto a disgeusia quanto a disfagia (dor durante a deglutição), bem como o próprio tratamento oncológico, contribuem para que haja mudanças na dieta do paciente, que podem acarretar a preferência por alimentos moles, viscosos e mais ricos em carboidratos a fim de obter algum prazer gustativo. É possível também que estes alimentos sejam ingeridos em pequenas porções ao longo do dia. Tais ações, portanto, favorecem a formação de biofilmes e, conseqüentemente, a cárie^{2,5,7,35}.

Além de tudo que foi exposto, a hipossalivação também provoca alterações imunoproteicas na saliva que, por sua vez, podem propiciar as condições adequadas para a proliferação de micro-organismos cariogênicos e acidogênicos, tais como *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus* spp e *Candida albicans*. Essas mudanças podem ocorrer desde o início da radioterapia até aproximadamente 3 meses após o término do tratamento e permanecem praticamente constantes durante a vida do paciente. E, obviamente, contribuem para o surgimento de lesões de cárie^{5,7,8,11,35}.

Embora a cárie de radiação tenha a mesma etiologia que a cárie em populações não irradiadas portadoras de hipossalivação⁸, estudos *in vitro*, nas últimas décadas, têm demonstrado que a radiação ionizante provoca alterações composicionais, estruturais e mecânicas nos dentes. Todavia, até o presente momento inexistem teorias ou explicações que relacionem estas alterações à patogênese da cárie de radiação⁹.

A abordagem adotada por oncologistas e odontologistas em relação à cárie de radiação é a prevenção. Recomenda-se que o paciente, entre 10 e 15 dias antes de iniciar a radioterapia, consulte um odontologista para uma avaliação na qual será verificada a condição clínica da dentição e da cavidade oral como um todo. Quaisquer tratamentos necessários (extrações, restaurações, etc) devem ser realizados antes do tratamento radioterápico^{5,11}.

A extração de dentes é recomendada quando: (i) não for possível fazer restaurações; (ii) o dente estiver exposto diretamente à radiação ionizante e (iii) o paciente for portador de doença periodontal e houver bolsas com mais de 5 mm.

Nestes casos, a extração de dentes é essencial para a prevenção de osteorradionecrose. Uma vez que a perda de dentes pode afetar negativamente a qualidade de vida do paciente oncológico, deve-se preservar a dentição sempre que possível^{2,4,5}.

Além da extração de dentes nas condições mencionadas, o paciente deve ser orientado quanto à importância da profilaxia com flúor (geralmente aplicado de maneira tópica com auxílio de moldeira), de uma dieta balanceada com restrições a alimentos cariogênicos, não fumar, não ingerir bebidas alcoólicas e também de boas práticas de higiene oral. Contudo, é importante ressaltar que ainda que o paciente siga estritamente as orientações do odontologista ou outros profissionais da saúde, o risco de desenvolvimento de cárie permanece como uma ameaça^{4,5,35}.

Se houver a ocorrência de hipossalivação e xerostomia durante o tratamento radioterápico, devem-se tratar estas condições a fim de prevenir o surgimento de cárie. Nestes casos, podem ser utilizados estimulantes salivares como sialogogos (pilocarpina, cevimelina, betanecol e urecolina) ou saliva artificial. Ainda, é possível o uso de enxaguantes bucais baseados em bicarbonato de sódio ou de antimicrobianos para o controle de populações de micro-organismos cariogênicos (clorexidina, por exemplo)^{4,5,7,8,11,35,42}.

Indubitavelmente, a melhor maneira de evitar o aparecimento de hipossalivação e xerostomia é a exclusão da região das glândulas parótidas do campo de irradiação. No entanto, se isso não for possível, o uso de espaçadores radiográficos pode minimizar os danos causados a essas glândulas. Além disso, técnicas de radioterapia de intensidade modulada e estereotáxica são mais eficientes em prevenir efeitos colaterais do que as técnicas baseadas em 3D e, por isso, devem ser preferíveis quando se tratar da região da cabeça e pescoço^{5,7,40}.

Após o tratamento radioterápico, sugere-se que o paciente visite um odontologista a cada 6 meses para acompanhamento da saúde bucal⁸. Caso surjam lesões cariosas, procedimentos como restaurações, obturações ou extrações devem ser realizados com cautela^{5,11}. Em muitos casos, é necessário profilaxia com antibióticos sistêmicos ou até mesmo tratamento com câmara hiperbárica^{5,11}. Estas medidas são necessárias quando o paciente oncológico encontrar-se imunossuprimido e houver riscos de desenvolvimento de infecções e sepse^{5,48}.

As restaurações das lesões provocadas pela cárie de radiação, em especial, podem ser extremamente desafiadoras devido à dificuldade no preparo cavitário, sobretudo das lesões localizadas próximas às margens cervicais. Além disso, a seleção do material adequado também é um desafio, uma vez que este deve demonstrar boa adesão, resistir à desidratação e à erosão ácida e, também, prevenir cáries secundárias num ambiente oral adverso⁷.

Assim, é necessário que se desenvolva procedimentos para lidar com as lesões cariosas em pacientes irradiados na cabeça e pescoço. Tais procedimentos devem priorizar a preservação da dentição, haja vista que a perda de dentes pode afetar negativamente a qualidade de vida do paciente oncológico, e devem também ser minimamente invasivos para evitar o risco de infecções oportunistas e de desenvolvimento de osteorradionecrose^{5,11,48}.

3.4. O laser de Nd:YAG – usos na Odontologia e no manejo da cárie

O termo *laser* é um acrônimo, em inglês, para *light amplification by the stimulation emission of radiation*^{49,50,51} que, em português, corresponde à amplificação da luz por emissão estimulada da radiação⁵². Os *lasers* caracterizam-se por apresentar monocromaticidade, coerência temporal e espacial, além de unidirecionalidade⁵². São amplamente utilizados na Medicina, Odontologia, Metrologia, espectroscopia e em indústrias em geral⁵³.

Em Odontologia, os *lasers* são empregados como adjuvantes em procedimentos nos tecidos duros ou moles⁴⁹. Tais procedimentos incluem, dentre outros: ablação de tecidos duros; corte hemostático de tecidos moles, descontaminação, anti-inflamação e analgesia^{13,49}. Na Odontologia restauradora, os *lasers* são utilizados desde a preparação cavitária até a descontaminação, remoção e prevenção da cárie¹³.

A utilização dos *lasers* em Odontologia também é benéfica no que diz respeito à diminuição de ansiedade e medo por parte do paciente. Ao substituir o uso de pontas e do famigerado “motorzinho”, a radiação *laser* proporciona ao paciente uma experiência muitas vezes indolor, sem administração de anestésicos em alguns procedimentos, com redução de ruídos e vibrações. Além disso, pode

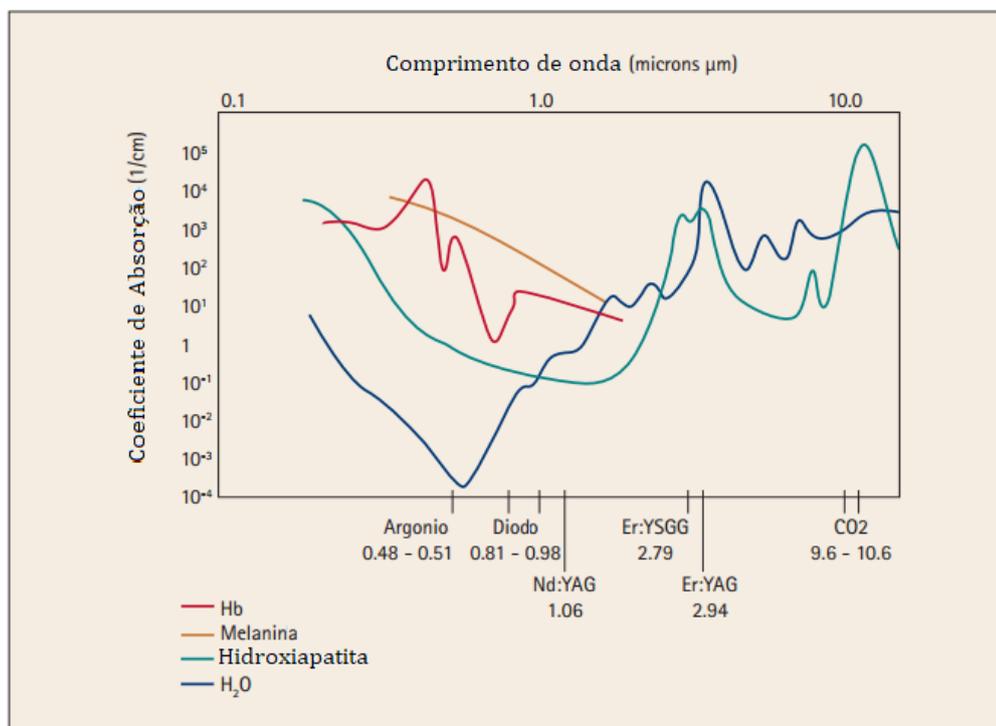
haver maior preservação de tecidos dentais saudáveis durante a realização de procedimentos odontológicos^{50,51,54}.

Para selecionar o equipamento mais adequado para um determinado procedimento clínico, devem ser levados em consideração tanto parâmetros do *laser* quanto do tecido a ser irradiado. Em relação ao *laser*, deve-se conhecer: comprimento de onda; modo de emissão; duração de pulso; energia de pulso; taxa de repetição; tamanho de *spot* e o sistema de entrega do feixe. Em relação ao tecido a ser irradiado, por sua vez, deve-se considerar o índice de refração; o coeficiente de espalhamento; o coeficiente de absorção e a anisotropia^{13,14,51}.

Um dos primeiros *lasers* disponíveis para uso em Odontologia foi o de Nd:YAG (granada de ítrio e alumínio dopada com neodímio). Desenvolvido na década de 1960, possui comprimento de onda de 1064 nm e, conseqüentemente, emite na região do infravermelho próximo. Em geral, opera no modo pulsado com pulsos que duram microssegundos (μs). É classificado como um *laser* em alta intensidade (ou de alta potência), o que significa que sua interação com tecidos traduz-se em efeitos fototérmicos que podem ser empregados para benefício clínico^{13,49,55}.

Para que haja uso clínico apropriado, é essencial que a radiação emitida pelo *laser* seja fortemente absorvida pelo tecido irradiado, além de ser convertida em calor sem causar danos tanto aos tecidos irradiados quanto aos adjacentes^{13,14}. Assim, é importante salientar que o esmalte e a dentina, que possuem coeficientes de absorção menores que $4 \times 10^{-2} \text{ cm}^{-1}$ e têm como principais cromóforos água e hidroxiapatita, absorvem fracamente na região do visível (400-700 nm) e no infravermelho próximo (700-2.000 nm), mas absorvem fortemente no infravermelho médio (2.000-3.000 nm) e distante ($>9.000 \text{ nm}$) (Figura 8)^{13,49,54,56,57}.

Figura 8: Ilustração esquemática dos coeficientes de absorção dos principais cromóforos dos tecidos biológicos (hemoglobina (Hb), melanina, hidroxiapatita e água) em função do comprimento de onda.



Fonte: Adaptado de S. Parker⁵⁸.

Apesar de ser fracamente absorvido pelos tecidos duros dentais, o *laser* de Nd:YAG demonstra uma capacidade de penetração óptica (entre 2 e 5 mm) que possibilita a transmissão da radiação até a polpa dentária, o que pode comprometer a vitalidade dos dentes. Esse efeito sobre a polpa é especialmente acentuado na presença de altas densidades de energia, longa exposição dos tecidos ao *laser* e na ausência de um fotoabsorvedor^{13,14,54}.

Os fotoabsorvedores, em especial, desempenham um papel importante na preservação dos tecidos dentais por ocasião de irradiação com *laser* de Nd:YAG. Trata-se de corantes que são previamente aplicados na superfície dos tecidos a serem irradiados com a finalidade de absorver os fótons provenientes da irradiação, de modo a restringir a sua absorção e, com isso, a propagação de calor. Nanquim, carvão e grafite são exemplos de substâncias que foram empregadas como fotoabsorvedores. A principal desvantagem do uso destes corantes é a dificuldade na remoção, o que pode provocar danos estéticos^{56,59}.

Além de aumentarem a absorção do *laser* pelos tecidos dentais, os fotoabsorvedores permitem que as energias de pulso sejam depositadas em um pequeno volume de tecido. Isso evita uma penetração excessiva do feixe *laser* em estruturas mais profundas do dente. Como consequência, há menor risco de dano pulpar, bem como de vaporização subsuperficial e de formação de trincas^{51,56}.

Outro fator que contribui para a preservação dos tecidos dentais é a seleção da densidade de energia adequada. Como o *laser* de Nd:YAG produz efeitos fototérmicos, é importante assegurar que a temperatura do tecido irradiado não ultrapasse um aumento na polpa de 5,6 °C, pois há riscos de desencadear um processo inflamatório irreversível neste tecido. A literatura também reporta que a necrose completa da polpa ocorre quando se atinge um aumento de 16 °C⁵⁶.

A preparação cavitária, descontaminação, remoção e prevenção da cárie com *lasers* em alta intensidade são possíveis devido ao aquecimento do esmalte e da dentina. Este aquecimento pode induzir mudanças composicionais e cristalográficas nos tecidos irradiados que resultam na formação de microestruturas mais resistentes à dissolução por ácidos e, conseqüentemente, à formação de lesões de cárie^{13,55}.

Os mecanismos de ação que possibilitam o manejo de cárie com *lasers* são essencialmente a ablação térmica e os efeitos termomecânicos. A ablação térmica (ou explosiva) é resultante do aquecimento rápido das moléculas de água confinadas abaixo da superfície dos tecidos duros dentais que, por sua vez, promovem um aumento da pressão que levam à microexplosões do tecido duro acima^{13,51}.

É importante ressaltar que a ablação explosiva ocorre em temperaturas inferiores ao ponto de fusão dos tecidos duros (1.200 °C) e varia de acordo com o comprimento de onda do *laser*. Desta forma, trata-se de um parâmetro crucial na seleção do *laser* mais adequado para remover as porções do tecido com lesão cariada de modo a minimizar os efeitos térmicos¹³.

Ainda, é crucial que o *laser* possua duração de pulso compatível com a relaxação térmica dos tecidos duros dentais. Caso a duração de pulso seja menor do que tempo de relaxamento térmico, o calor não penetrará além da penetração dos fótons. Alternativamente, se a duração do pulso for muito superior ao tempo de

relaxamento térmico, há o risco de distribuição de calor desnecessário em regiões mais profundas dos tecidos irradiados^{51,60}.

Lasers de Nd:YAG podem promover a fusão do esmalte⁵⁶, da dentina⁶¹ e do cimento²⁸ dependendo da densidade de energia ajustada, e tais efeitos podem ocorrer tanto com feixes de pulsos de largura temporal de microssegundos quanto nanossegundos⁶². Tal achado morfológico sugere que a temperatura foi elevada para além de 1.200 °C. Elevações de temperatura acima de 100 °C alteram quimicamente os tecidos duros dentais, iniciando-se pela matriz orgânica e, posteriormente, com mudanças cristalográficas nestes tecidos.

Nos últimos anos, estudos têm reunido evidências de que a capacidade do *laser* de Nd:YAG em remover seletivamente tecidos pigmentados^{13,55}, aliado a um bom controle dos efeitos térmicos causados pela irradiação, faz com que este *laser* possa ser empregado de maneira segura em procedimentos odontológicos. Em especial, a associação do *laser* com flúor tem demonstrado resultados promissores na paralisação da progressão da cárie na dentina, bem como na prevenção de erosão dental^{61,63,64}.

3.5. Cerâmicas bioativas e Biosilicato® - definições, usos em odontologia e no manejo de cárie

O termo biomateriais designa uma classe de materiais que interagem diretamente com os sistemas biológicos com o objetivo de tratar, aumentar ou substituir um tecido ou órgão do corpo. Atualmente, há aproximadamente 300.000 dispositivos para uso em saúde que se enquadram nesta definição¹⁷. Sob uma perspectiva histórica, o desenvolvimento de biomateriais pode ser sistematizado em três gerações^{17,18,65}.

Os biomateriais de primeira geração, desenvolvidos entre 1960 e 1980, proporcionavam uma combinação de propriedades físicas semelhantes às do tecido substituído com uma resposta minimamente tóxica ao hospedeiro⁶⁵. Esses materiais são designados bioinertes e são capazes de formar uma fina cápsula fibrosa que os isolam do tecido hospedeiro^{17,65,66}. Como eram empregados na confecção de próteses, havia o problema de *stress-shielding*, que é a reabsorção óssea devido às

diferenças no módulo de elasticidade do biomaterial e do osso. Tal problema levou à busca de biomateriais mais semelhantes aos tecidos ósseos⁶⁵.

A partir da década de 1980, os biomateriais desenvolvidos passaram a exibir bioatividade, isto é, possuíam a capacidade de provocar ações e reações de forma controlada no meio fisiológico^{17,65}. Biomateriais desta geração são comumente utilizados como recobrimentos em próteses metálicas a fim de melhorarem a adesão com o tecido ósseo⁶⁵.

E, por fim, os biomateriais de terceira geração, desenvolvidos a partir deste século, são projetados para estimular respostas celulares específicas no âmbito da biologia molecular, ou seja, têm como objetivo ativar determinados genes para estimular a regeneração de tecidos vivos. São empregados na confecção de arcabouços (*scaffolds*) na engenharia de tecidos e no desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de fármacos, por exemplo^{17,18,65}.

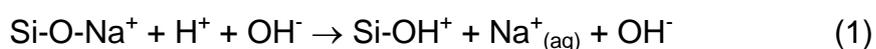
Em um primeiro momento, cerâmicas bioativas, em especial os vidros e as vitrocerâmicas, foram classificadas como biomateriais de segunda geração. Anos mais tarde, porém, foram reclassificados como materiais de terceira geração^{17,18,19}. O Biovidro 45S5[®], desenvolvido em 1969 pelo professor Larry Hench nos Estados Unidos, foi o primeiro material bioativo capaz de se ligar quimicamente ao osso ao formar uma camada de hidroxiapatita carbonatada (HAC) na interface do biomaterial/tecido^{17,18,19,20,21}.

O Biovidro 45S5[®] possui composição $45\text{SiO}_2-24,5\text{Na}_2\text{O}-24,5\text{CaO}-6\text{P}_2\text{O}_5$ e exibe o maior índice de bioatividade ($I_B = 12,5$) entre os materiais bioativos existentes^{17,67}. Além de se ligar quimicamente ao osso, o Biovidro 45S5[®] é capaz de se ligar aos tecidos conjuntivos^{18,65,66,68,69}. É empregado em uma ampla variedade de aplicações tais como: enxertos ósseos, arcabouços, sistemas de liberação de fármacos, recobrimentos e em engenharia de tecidos em geral¹⁷. Ainda, é considerado um padrão-ouro no desenvolvimento de novas composições de silicatos bioativos^{17,21}.

A bioatividade de um vidro está relacionada à taxa de crescimento da camada de hidroxiapatita em sua superfície, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. O processo de formação da hidroxiapatita começa, *in vivo*, logo após o implante do vidro no corpo humano ou, *in vitro*, quando imerso em soluções que mimetizam fluidos

corporais como o SBF (*simulated body fluid* ou fluido corporal simulado) ou a saliva artificial¹⁸. O mecanismo pelo qual os vidros bioativos, bem como outros silicatos, ligam-se quimicamente aos tecidos envolve 11 estágios^{17,18,65,67}:

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

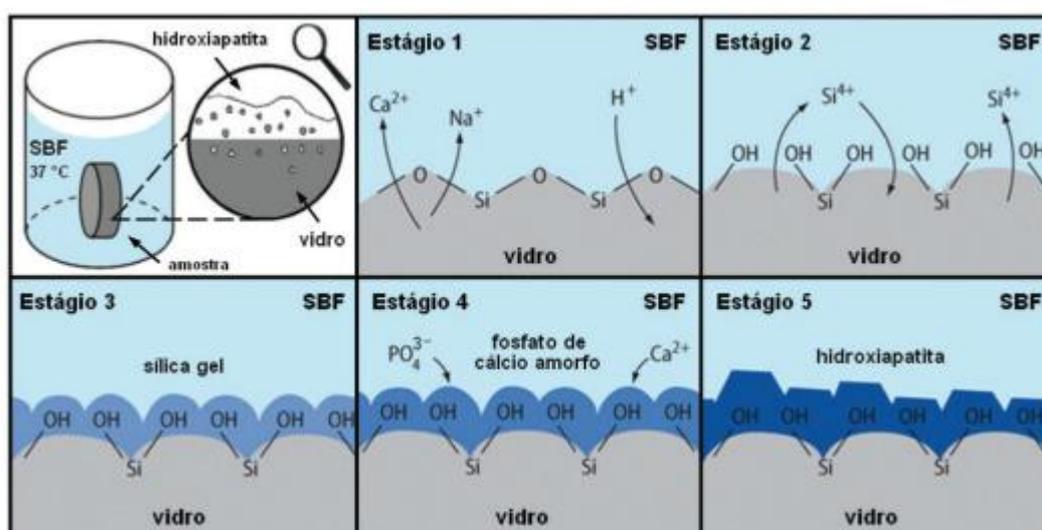


- **Estágio 2:** com a continuidade da troca iônica e o aumento do pH, ligações de siloxano (Si-O-Si) são atacadas por íons hidroxila. Quando todas as quatro ligações de um único átomo de silício são quebradas, sílica solúvel (Si(OH)_4) é liberada do material para a solução. Isto aumenta o número de grupos silanol na interface vidro/solução.
- **Estágio 3:** ocorre a condensação e a polimerização dos grupos silanol que resulta na formação de uma camada porosa rica em sílica capaz de absorver íons da solução.
- **Estágio 4:** formação de uma camada amorfa rica em CaO e P_2O_5 sobre a camada porosa de sílica mediante a difusão de íons cálcio (Ca^{2+}) e fosfato (PO_4^{3-}).
- **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^-) e carbonato (CO_3^{2-}) 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.
- **Estágio 11:** mineralização da matriz extracelular que resulta em crescimento ósseo.

É importante enfatizar que os cinco primeiros estágios do mecanismo pelo qual os silicatos bioativos ligam-se quimicamente aos tecidos biológicos, e que estão ilustrados esquematicamente na Figura 9, ocorrem tanto em modelos *in vitro* quanto os *in vivo*. Os outros estágios (a partir do 6 em diante) ocorrem exclusivamente *in vivo*.

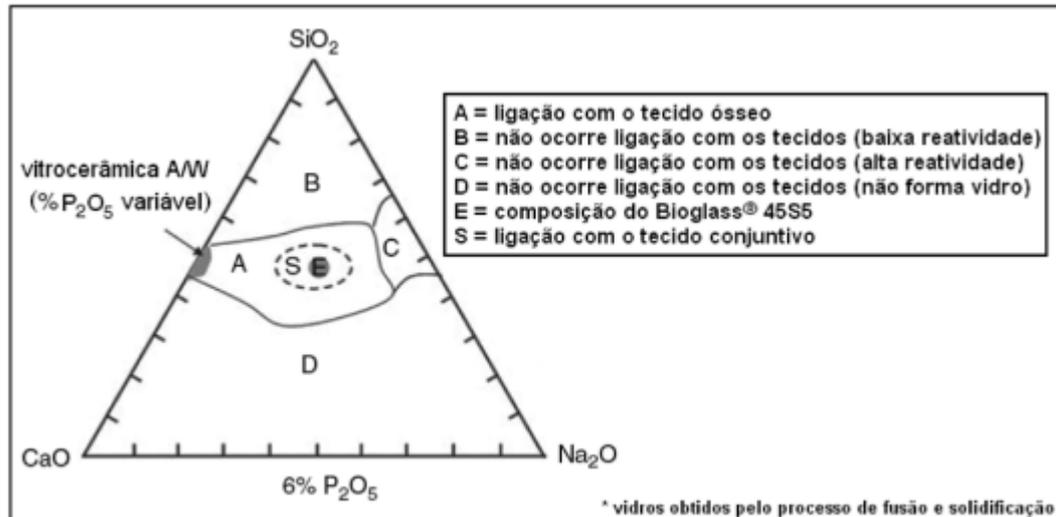
Figura 9: Ilustração esquemática dos cinco primeiros estágios do mecanismo pelo qual silicatos bioativos ligam-se quimicamente aos tecidos biológicos. Tais estágios ocorrem tanto em modelos *in vitro* quanto *in vivo*.



Fonte: Siqueira e Zanotto⁶⁷.

A bioatividade dos silicatos em geral, nos quais o Biovidro 45S5[®] está incluído, é dependente da sua composição (Figura 10) e da área superficial. De fato, se a concentração molar de sílica (SiO₂) estiver entre 40 e 52%, o material é capaz de se ligar tanto ao tecido ósseo quanto ao conectivo e a cristalização da camada de hidroxapatita carbonatada ocorre em até 2 horas. Com concentrações de SiO₂ superiores a 58% mol, os silicatos ligam-se apenas ao osso e a cristalização de HAC leva até 48 horas para ocorrer. No entanto, composições a partir de 60% de SiO₂ são bioinertes^{18,20,21,67}.

Figura 10: Ilustração do diagrama de fases do sistema $\text{SiO}_2\text{-CaO-Na}_2\text{O}$ com ênfase na relação entre composição e índice de bioatividade.



Fonte: Siqueira e Zanotto⁶⁷.

Apesar de todas as vantagens exibidas pelos vidros bioativos, estes apresentam como desvantagens: baixa resistência mecânica (70 MPa); baixa tenacidade à fratura ($K_{IC} = 0,5 \text{ MPa} \cdot \text{m}^{1/2}$); superfície cortante e usinabilidade limitada. Tais características restringem o uso desses vidros bioativos a aplicações que não demandam solicitações mecânicas. É justamente para contornar essas limitações que as vitrocerâmicas bioativas foram desenvolvidas^{17,18,67,70}.

Vitrocerâmicas são materiais policristalinos que contêm uma ou mais fases cristalinas embebidas em uma fase vítrea residual^{21,70,71}. A cristalinidade desses materiais varia entre 0,5% e 99,5%, embora seja mais comum que as composições apresentem entre 30% e 70%⁷¹. São obtidas por meio de tratamentos térmicos de vidros, pela sinterização de vidros ou via sol-gel^{18,70,71}. Comercialmente, as vitrocerâmicas bioativas mais conhecidas são vendidas sob as marcas Ceravital[®], Bioverit[®] e Cerabone[®] A/W^{17,67,70}.

As principais vantagens das vitrocerâmicas sobre os vidros são: a possibilidade de serem obtidas em formatos complexos, uma vez que podem ser processadas por meio de várias técnicas (extrusão, estampagem, laminação, etc); e,

também, por apresentarem melhorias nas propriedades mecânicas, haja vista que são obtidas microestruturas finas com poucos poros²⁰.

A principal desvantagem das vitrocerâmicas bioativas, no entanto, incide no fato de que a presença de fases cristalinas diminui a bioatividade destes materiais e, conseqüentemente, há a demora na formação da camada de hidroxiapatita carbonatada^{17,18,67}. É reportado que em composições com até 60% de cristalinidade, a HAC forma-se em menos do que 20 horas. Acima disso, contudo, pode levar mais de 25 horas. Para efeito comparativo, o Biovidro 45S5[®] necessita de menos de 10 horas para formar a mesma camada¹⁸.

Com o intuito de contornar o problema da diminuição da bioatividade e aliar o desempenho mecânico do Cerabone[®] A/W, pesquisadores da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), liderados pelo professor Edgar D. Zanotto com colaboração do também professor Larry Hench, mobilizaram esforços ainda na década de 1990 para o desenvolvimento de uma vitrocerâmica com estas características. Tais esforços culminaram na criação do Biosilicato^{®17,67,70,71}.

O termo Biosilicato[®] refere-se à composição $48,5\text{SiO}_2\text{-}23,75\text{Na}_2\text{O-}23,75\text{CaO-}4\text{P}_2\text{O}_5$ que pode apresentar uma ou duas fases cristalinas de acordo com o método em que foi obtido: apenas silicato de sódio e cálcio ($\text{Na}_2\text{CaSi}_2\text{O}_6$) ou $\text{Na}_2\text{CaSi}_2\text{O}_6$ e fosfato de sódio e cálcio (NaCaPO_4)^{17,70,71}. Apesar de sua cristalinidade ser elevada (aproximadamente 99,5%)⁶⁷, seu índice de bioatividade ($I_B > 8$) é o maior entre as vitrocerâmicas bioativas comerciais⁷⁰, o que significa que necessita apenas de 24 horas para formar a camada de hidroxiapatita carbonatada com os tecidos⁷¹.

Em relação às propriedades mecânicas, o Biosilicato[®] possui resistência à flexão em 4 pontos equivalente a 210 MPa, que é próxima a do Cerabone[®] A/W (215 MPa). Além disso, apresenta um módulo de elasticidade de 80 GPa e é o valor mais próximo ao do osso cortical (20 GPa) entre as vitrocerâmicas bioativas comerciais. E, por fim, a tenacidade à fratura é da ordem de $1,0 \text{ MPa m}^{1/2}$, o que representa um aumento de 60% em relação ao vidro precursor devido à deflexão de trincas⁷¹.

O Biosilicato[®] foi inicialmente concebido para tratamento de hipersensibilidade dentinária⁶⁷ e sua efetividade na obliteração de túbulos

dentinários foi comprovada por meio de testes *in vitro* e clínicos^{17,67,70,71}. Além deste uso em odontologia, testes clínicos com implantes auriculares e orbitais evidenciaram que o Biosilicato[®] tem potencial para estas aplicações.

Devido ao sucesso do uso do Biosilicato[®] no tratamento de hipersensibilidade dentinária, testes *in vitro* para remineralização de dentinas em decorrência de lesões de erosão e de cárie têm sido realizados. Estes testes indicam que o Biosilicato[®] tem potencial em paralisar o desenvolvimento destas lesões e, também, pode ser utilizado como um pré-tratamento para melhorar a adesão de resinas aos tecidos dentais para fins de restauração^{24,25,26}.

Por se tratar de um material relativamente novo, inexistente uma padronização em relação à quantidade de Biosilicato[®] que deve ser utilizada para o tratamento de amostras de esmalte ou dentina em estudos *in vitro* ou clínicos. Desta forma, há uma variedade de estudos que descrevem diferentes protocolos, como os que seguem:

- Em dois estudos sobre hipersensibilidade dentinária, um *in vitro* e outro clínico, o BS foi utilizado de duas formas: como 1 gota de gel com concentração de 1% de Biosilicato[®] e como uma suspensão preparada com 0,15 mg de Biosilicato[®] para 1,35 mL de água destilada. No estudo *in vitro*, ambas as formulações foram aplicadas durante 30 segundos com um microaplicador. Por sua vez, no estudo clínico, o paciente foi orientado a colocar 1 gota de gel em seu indicador e massagear os dentes por 30 segundos, duas vezes ao dia, por 30 dias; ao passo que o odontologista, foi instruído a aplicar a suspensão com um microaplicador semanalmente durante 4 semanas. Apenas no estudo *in vitro* há a informação de que as amostras foram enxaguadas para remover eventuais excessos^{22,23}.
- Em outros estudos *in vitro* cujos temas estavam relacionados à erosão, cárie ou restauração, parece haver a preferência pelo uso de uma suspensão de 0,1 g de Biosilicato[®] para 1 mL de água destilada. Esta suspensão é esfregada sobre a superfície da amostra (seja esmalte ou dentina) por 30 segundos com um microaplicador e ali permanece durante 5 minutos. Em seguida, o material é removido com papel absorvente^{24,72}. Outros dois estudos *in vitro* adotaram um protocolo similar, mas com uma proporção de 0,1 mg de Biosilicato[®] para 1 mL de água destilada e

deionizada. Em apenas um deles, a suspensão de Biosilicato[®] permaneceu na superfície das amostras tratadas por 5 minutos antes de ser removida com papel toalha^{25,26}.

- E, por fim, um estudo clínico com o objetivo de melhorar a adesão de resinas fotopolimerizáveis sobre a dentina cariada empregou um protocolo no qual aproximadamente 0,04 g de Biosilicato[®] em pó são aplicados, com auxílio de um microaplicador, previamente à aplicação de resina fotopolimerizável⁷³.

Além dessas divergências, a literatura não esclarece se a quantidade especificada deve ser empregada para tratar apenas uma amostra ou a população considerada para um determinado grupo experimental. A falta de consenso também abrange o procedimento posterior à aplicação do Biosilicato[®]: alguns deixam a suspensão de Biosilicato[®] permanecer por 5 minutos antes de removê-la com papel absorvente; outros não especificam se há enxágue ou remoção por outro meio^{22,23,25,26,73}.

Por todos esses motivos, neste estudo, pretende-se propor um protocolo para aplicação de Biosilicato[®] para paralisar a progressão de cárie de radiação em dentina radicular de modo a simular o uso em consultório clínico.

3.6. Associação de *laser* de Nd:YAG e cerâmicas bioativas

Há poucos estudos publicados que investigam a associação do uso do *laser* de Nd:YAG com cerâmicas bioativas. Apesar da escassez, é possível identificar que os temas mais recorrentes nesses estudos são: a deposição de vidros bioativos, por meio de *lasers*, sobre substratos de titânio para melhorar a adesão na interface implante/tecido^{74,75}; o tratamento de hipersensibilidade dentinária^{76,77} e as alterações na bioatividade de materiais para uso em odontologia⁷⁸.

Em relação às pesquisas centralizadas no uso de vidros bioativos como revestimento em implantes de titânio, demonstram-se evidências de que o *laser* de Nd:YAG promove aumento tanto na cristalinidade quanto na porosidade da camada de recobrimento resultante, além de possibilitar alterações composicionais, uma vez que, por efeitos térmicos, pode haver a volatilização de elementos em dependência

dos parâmetros selecionados para o *laser*. Como consequência, a bioatividade desses materiais é afetada^{74,75}.

O tratamento da hipersensibilidade dentinária, por sua vez, consiste em ocluir os túbulos dentinários expostos que fazem com que o indivíduo sinta um desconforto quando ingere bebidas ou alimentos muito quentes ou muito frios. Os estudos *in vitro* conduzidos por Farmakis *et al.* indicaram que a associação da NovaMin[®] (dentrífcio comercial com partículas de Biovidro 45S5[®]) com *laser* de Nd:YAG é sinérgica para o tratamento da hipersensibilidade, embora não tenham conseguido elucidar os motivos pelos quais tal associação foi bem sucedida^{76,77}.

E, por fim, uma pesquisa de Beketova *et al.* investigou os efeitos do *laser* de Nd:YAG sobre a bioatividade de um compósito formado pelo vidro bioativo 58S ($60\text{SiO}_2\text{-}36\text{CaO-}4\text{P}_2\text{O}_5$) e por uma porcelana dental cuja composição foi omitida. Observou-se que o tratamento com o *laser* fez com que a camada de hidroxiapatita carbonatada crescesse mais rápido. No entanto, a formação mais rápida da camada de hidroxiapatita não promoveu proliferação e viabilidade celular, como era esperado⁷⁸.

É importante ressaltar que não foram encontrados, até este momento, artigos publicados sobre os efeitos da associação do *laser* de Nd:YAG com vitrocerâmicas bioativas. O Biosilicato[®], em especial, já foi avaliado com *lasers* em baixa intensidade para indução osteogênica¹⁷, mas não há nenhum estudo com *lasers* em alta intensidade que estão no escopo desta dissertação.

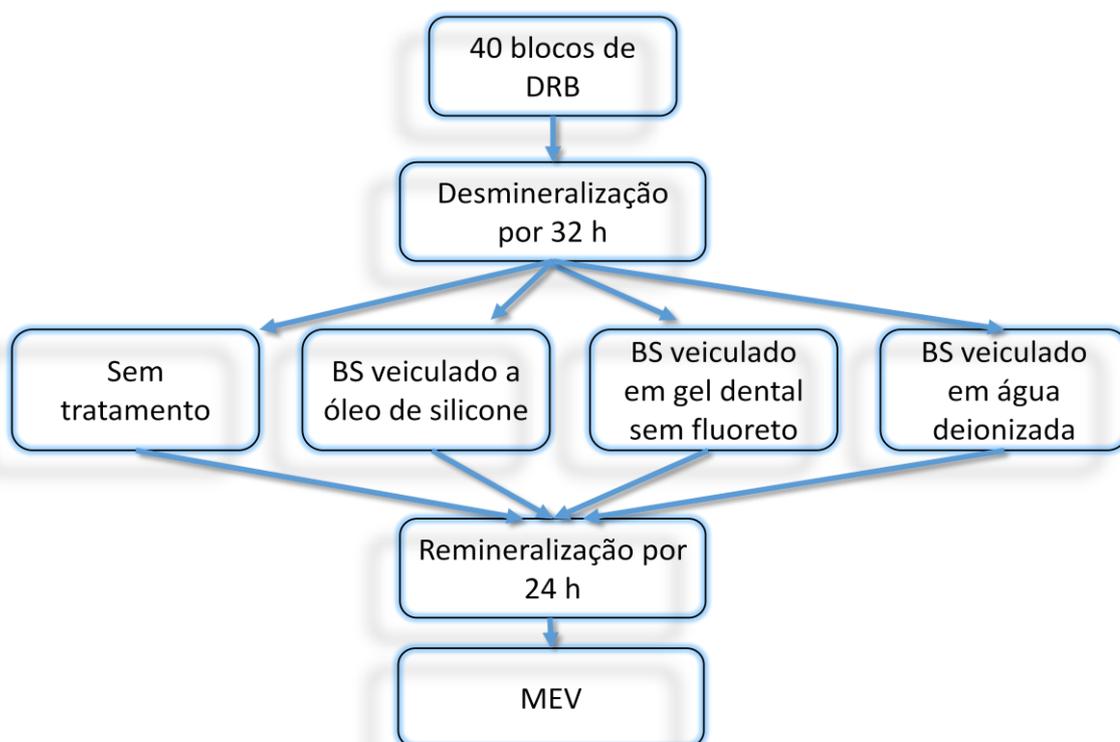
4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Delineamento experimental

Foi conduzido um estudo *in vitro* randomizado dividido em três fases experimentais. Na Fase I, foi determinado o veículo mais apropriado para aplicação do Biosilicato[®] (BS) sobre blocos de dentina radicular bovina (DRB); na Fase II, os efeitos da radioterapia *in vitro* sobre a composição e as propriedades ópticas, mecânicas e morfológicas da dentina radicular bovina foram avaliados; e, última fase experimental (Fase III), foram determinados os efeitos da associação de BS e Nd:YAG na paralisação da progressão da cárie radicular de radiação.

Para a primeira Fase I (Figura 11), foi efetuada a avaliação morfológica, por microscopia eletrônica de varredura (MEV), de amostras de dentina radicular desmineralizadas submetidas a tratamentos com BS veiculados em: (i) silicone gel, (ii) dentifrício gel infantil comercial e (iii) água deionizada.

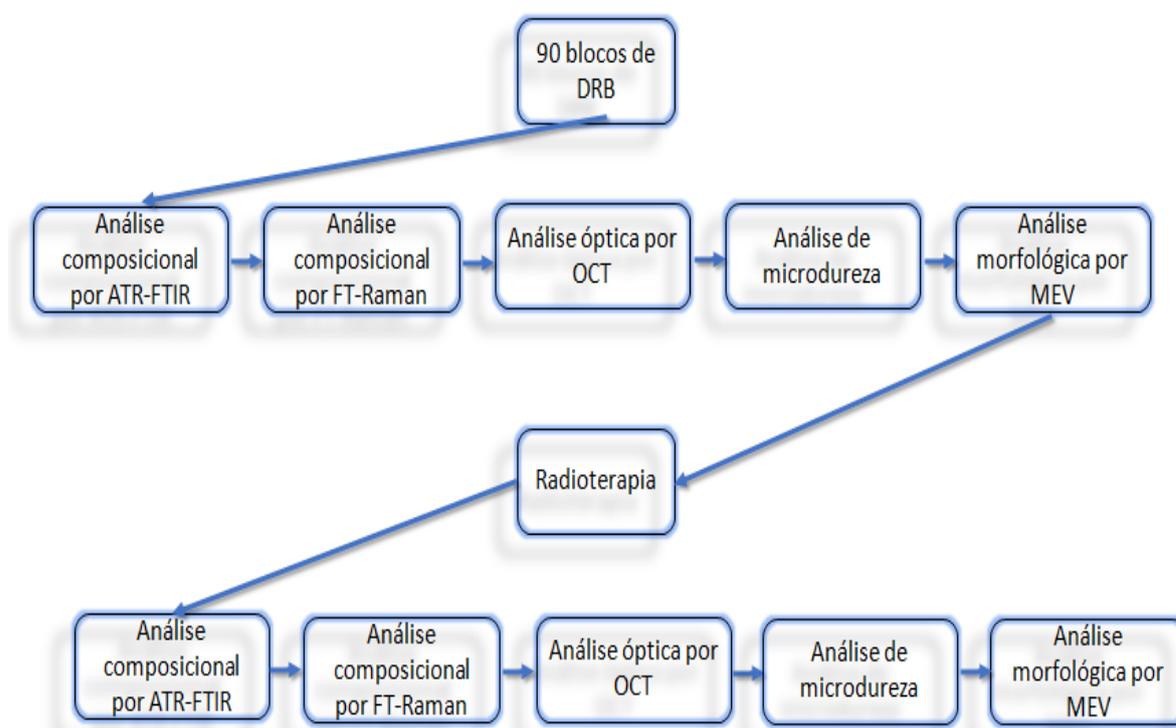
Figura 11: Fluxograma da Fase I.



Fonte: Do próprio autor.

Na Fase II (Figura 12), 90 amostras de dentina radicular bovina foram submetidas a um tratamento radioterápico *in vitro* com Co-60 e caracterizadas, antes e após radioterapia, pela técnica da reflexão atenuada da espectroscopia de absorção no infravermelho por transformada de Fourier (ATR-FTIR), espectroscopia FT-Raman, tomografia por coerência óptica (OCT), microdureza superficial Knoop e MEV.

Figura 12: Fluxograma da Fase II.

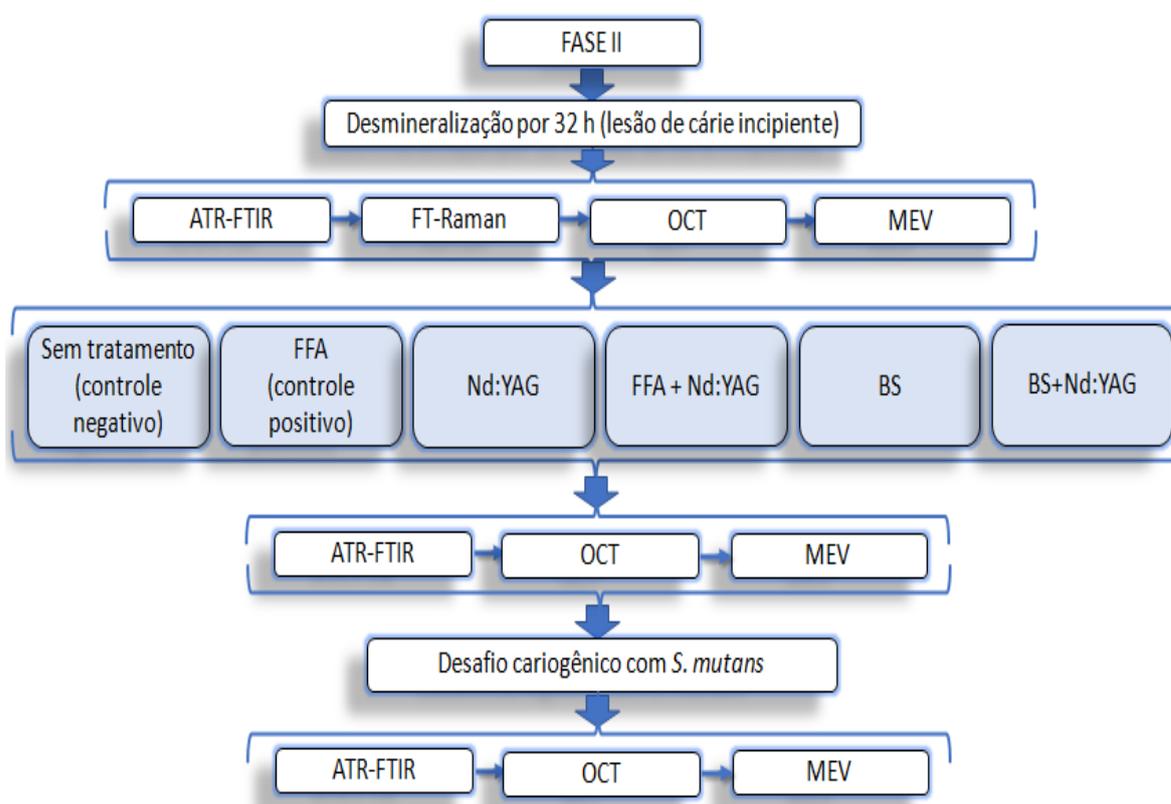


Fonte: Do próprio autor.

Na Fase III (Figura 13), por sua vez, as mesmas amostras da Fase II foram desmineralizadas e, em seguida, aleatoriamente distribuídas em 6 grupos experimentais (n = 15): G1 - Sem tratamento (controle negativo); G2- tratamento com flúor fosfatado acidulado (controle positivo); G3 - irradiação com Nd:YAG; G4 - FFA + Nd:YAG; G5 - tratamento com BS; G6 - BS + Nd:YAG. Posteriormente, foi induzida a progressão da lesão de cárie com *S. mutans*. As amostras foram avaliadas por ATR-FTIR, OCT e MEV após desmineralização, após tratamentos e após progressão de cárie. Salienta-se que, após a desmineralização, houve ainda a avaliação composicional por FT-Raman. As análises estatísticas foram realizadas de

forma diferente em cada fase experimental e individualmente para cada variável resposta, considerando os blocos de DRB como unidades experimentais e os tratamentos de cada fase como fatores de variação. Antes de cada análise, os pressupostos de normalidade e homogeneidade de variâncias foram testados de acordo com os testes de D'Agostino & Person e Shapiro Wilk e adotou-se o nível de significância estatístico de 5% para todas as análises.

Figura 13: Fluxograma da Fase III deste estudo.



Fonte: Do próprio autor.

4.2. Considerações éticas

Este estudo recebeu aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Fundação da Universidade Federal do ABC (CEUA-UFABC) sob processo de número 9614190917 (vide Anexo) e foi realizado com a observância dos procedimentos exigidos por este mesmo comitê.

4.3. Preparação das amostras de dentina radicular bovina

130 blocos de dentina radicular, com dimensões de aproximadamente 4,0 x 4,0 mm, foram preparados a partir de 65 raízes de dentes bovinos. Para isto, cada dente foi fixado a uma placa de acrílico com auxílio de cera pegajosa (Kota Indústria e Comércio Ltda, Cotia, Brasil) para ser seccionado transversalmente e longitudinalmente com um micromotor de bancada (Beltec LB 2000, Beltec, Araraquara, Brasil) em baixa rotação (aproximadamente 5.000 RPM) sob refrigeração. Desta forma, obtiveram-se dois blocos de dentina para cada um dos dentes seccionados: um lingual e outro bucal. Após os cortes, estes blocos de dentina foram lixados manualmente com uma lixa de carbetto de silício com granulação de 600 a fim de se obter uma face plana livre de irregularidades. Logo em seguida, esses mesmos blocos foram submetidos a um banho em cuba ultrassônica (Cristófoli, Campo Mourão, Brasil) durante oito minutos para remoção de resíduos de cera ou quaisquer outras sujidades. Depois do preparo, os blocos de dentinas foram mantidos em ambiente fechado e úmido sob refrigeração (± 4 °C, com algodão estéril umedecido com água destilada e timol (0,64 g/L) trocado semanalmente) até o início dos experimentos. É importante mencionar que os dentes bovinos foram escolhidos para este estudo pela facilidade de obtenção e pelas similaridades bioquímicas com os dentes humanos, que os tornam modelos viáveis de estudo *in vitro*.

4.4. Obtenção do Biosilicato[®] (BS)

O Biosilicato[®] (BS) utilizado neste estudo foi gentilmente cedido pelo Laboratório de Materiais Vítreos da Universidade Federal de São Carlos (LaMaV - UFSCar).

4.5. Fase I

4.5.1. Indução da lesão incipiente de cárie

40 blocos de dentina radicular bovina foram medidos com um paquímetro para o cálculo exato da área de uma das suas faces que seria exposta a uma solução desmineralizadora para indução de lesões incipientes de cárie. Uma vez

realizadas as medidas, cada amostra de dentina foi revestida com verniz ácido-resistente (Impala, São Paulo, Brasil) de tal modo que apenas a face cujas dimensões foram medidas ficou intacta. Posteriormente, cada uma das amostras de dentina foi submersa em uma solução desmineralizadora (2 mL/mm²), com pH = 5,0 e composição de 1,4 mM de cálcio, 0,91 mM fosfato, 0,06 ppm de flúor, 0,64 g/L timol em 0,05 M tampão acetato, por 32 horas a 37 °C^{79,80}.

4.5.2. Tratamentos com BS em diferentes veículos

Os 40 blocos desmineralizados foram distribuídos aleatoriamente em 4 grupos de 10 amostras cada (n=10): (i) sem tratamento (controle negativo); (ii) BS veiculado em silicone gel; (iii) BS veiculado em dentifrício gel infantil comercial sem flúor (Boni Baby, Brasil) e (iv) BS veiculado em água destilada. Para tratar as 10 amostras de cada grupo, utilizaram-se 20 mg de BS para 10 gotas de cada veículo. Com o auxílio de um microaplicador, cada amostra de dentina radicular recebeu os tratamentos que foram aplicados por 30s e enxaguadas com água deionizada por outros 30s. Em seguida, cada amostra foi imersa por 24 horas em saliva artificial (com composição de 1,5 mM cálcio, 0,9 mM fosfato e 0,64 g/L timol em 0,1 M tampão tris e pH=7,0)^{79,80}, na proporção de 2 mL/mm² por área de dentina tratada, e mantidas em estufa a 37 °C. Posteriormente, as amostras foram enxaguadas em água deionizada e caracterizadas por MEV.

4.6. Fase II

4.7. Tratamento radioterápico *in vitro* com Co-60

90 amostras de dentinas radiculares foram submetidas à radioterapia em uma unidade de teleterapia Co-60 (Theratron Phoenix External Beam Therapy System, Best Theratronics Ltd., Ottawa, Canadá) a uma taxa de 1 Gy/min, em doses fracionadas de 2 Gy, por 5 dias consecutivos, durante 6 semanas até atingir a dose total de 60 Gy. Estes parâmetros foram escolhidos porque são os protocolos mais comumente utilizados em pacientes com neoplasias na região da cabeça e pescoço^{4,5}. As irradiações foram realizadas no Centro de Tecnologia das Radiações (Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN, São Paulo, Brasil). Durante

as irradiações, as amostras foram mantidas imersas em 5 mL de saliva artificial, com pH = 7,0 e composição de 1,5 mM cálcio, 0,9 mM fosfato, 0,64 g/L timol em 0,1 M tampão tris^{79,80}, em tubos criogênicos estéreis. As soluções de saliva não foram substituídas e, entre as irradiações, os tubos criogênicos com as amostras foram mantidos em temperatura ambiente. Finalizada a radioterapia, as amostras foram retiradas dos tubos criogênicos, enxaguadas abundantemente em água deionizada e armazenadas em ambiente fechado e úmido sob refrigeração (± 4 °C, com algodão estéril umedecido com água destilada e timol (0,64 g/L) trocado semanalmente) até o início das caracterizações. Após a radioterapia as amostras foram caracterizadas por ATR-FTIR, FT-Raman, OCT, microdureza superficial Knoop e MEV.

4.8. Fase III

4.8.1. Indução da lesão incipiente de cárie

As 90 amostras de dentina radicular bovina utilizadas na Fase II foram medidas com um paquímetro para o cálculo exato da área de uma das suas faces que seria exposta a uma solução desmineralizadora para indução de lesões incipientes de cárie. Uma vez realizadas as medidas, cada amostra de dentina foi revestida com verniz ácido-resistente (Impala, São Paulo, Brasil) de tal modo que apenas a face cujas dimensões foram medidas ficou intacta. Posteriormente, cada uma das amostras de dentina foi submersa em uma solução desmineralizadora (2 mL/mm²), com pH = 5,0 e composição de 1,4 mM de cálcio, 0,91 mM fosfato, 0,06 ppm de flúor, 0,64 g/L timol em 0,05 M tampão acetato e pH = 5,0, por 32 horas a 37 °C^{79,80}. Decorrido este período, cada uma das amostras foi enxaguada e mantida em ambiente fechado e úmido sob refrigeração (± 4 °C, com algodão estéril umedecido com água destilada e timol (0,64 g/L) trocado semanalmente) até o início das caracterizações. Após a desmineralização, as amostras foram caracterizadas por ATR-FTIR, FT-Raman e OCT.

4.8.2. Tratamentos

As 90 amostras desmineralizadas foram distribuídas aleatoriamente em seis grupos com 15 amostras cada: G1 – sem tratamento, controle negativo; G2 –

tratamento com aplicação tópica de uma composição comercial de flúor fosfato acidulado (FFA, 1,23% F⁻); G3 – irradiação com *laser* de Nd:YAG; G4 – aplicação de FFA com posterior irradiação *laser*; G5 – tratamento apenas com BS; G6 – aplicação de BS com posterior irradiação *laser*.

Para os tratamentos com FFA (G2 e G3), aplicou-se, com auxílio de um microaplicador, uma quantidade suficiente da formulação para cobrir a superfície exposta da dentina. Após 5 minutos, cada amostra foi enxaguada abundantemente com água deionizada.

Para os tratamentos com BS (G5 e G6), utilizou-se 0,4 g de BS para 1 mL de água deionizada para tratar 15 amostras. Essa suspensão foi aplicada na superfície exposta das amostras de dentina com auxílio de um microaplicador por 30s. Depois, as amostras secaram em temperatura ambiente por 5 minutos. Após a secagem, as amostras não foram enxaguadas e nem tiveram excesso removido por papel absorvedor.

Para os tratamentos com irradiação *laser* (G3, G4 e G6), utilizou-se um *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 280 mJ e diâmetro do feixe de 5 mm. 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 fotoabsorvedor que, neste estudo, foi tinta de lula. É importante mencionar que, para as amostras dos grupos G4 e G6 em que houve primeiramente a aplicação de FFA e BS, respectivamente, o fotoabsorvedor somente foi colocado sobre a superfície das amostras após a conclusão do procedimento descrito para a aplicação de cada um.

Após os tratamentos, as amostras foram imersas em saliva artificial, na proporção de 2 mL para mm² de área de dentina tratada, e mantidas em estufa a 37 °C durante 24 horas. Decorrido este período, as amostras foram retiradas da solução de saliva artificial (de 1,5 mM cálcio, 0,9 mM fosfato, 0,64 g/L timol em 0,1 M tampão tris, com pH=7,0^{79,80}) e mantidas em ambiente fechado e úmido sob refrigeração (± 4

°C, com algodão estéril umedecido com água destilada e timol (0,64 g/L) trocado semanalmente) até o início das caracterizações.

Posteriormente, as amostras foram caracterizadas por ATR-FTIR, OCT e MEV.

4.8.3. Desafio cariogênico com *Streptococcus mutans*

O desafio cariogênico com *S. mutans* foi realizado no Laboratório de Biofotônica da Universidade Nove de Julho (UNINOVE). Ressalta-se que foi um teste cego no qual os pesquisadores desconheciam os tratamentos pelos quais as amostras haviam sido submetidas antes.

A fim de formar uma película adquirida, realizou-se uma coleta de saliva humana com 8 voluntários. Ressalta-se que essa coleta foi realizada no período da manhã para minimizar os efeitos das variações composicionais na saliva. Além disso, os voluntários foram instruídos para não ingerirem quaisquer substâncias ou escovar os dentes pelo período de duas horas antes da coleta. Para cada voluntário, foi disponibilizado um coletor universal estéril (Olen, Brasil) para o armazenamento da saliva. A salivagem foi estimulada por meio de mastigação de um fragmento de Parafilm® (Bemis, EUA).

Após a coleta de saliva humana, esta foi transferida para um frasco *erlenmeyer* e filtrado com filtro para seringa Membrana (PES 0,22 µm, 30mm) (Cobetter, Benjiang-China). Em seguida, as amostras de dentina radicular bovina foram imersas em saliva humana em placa de 24 poços fundo chato (Kasvi-São, Brasil) durante 60 minutos em estufa bacteriológica a 37°C.

Finalizada a etapa de película adquirida, as amostras de dentina foram transferidas para outra placa de 24 poços com 1 mL de BHI (3% de glicose) e 1 mL de *S. mutans* (ATCC 25175) (106 CFU/ml), que foi cultivado anaerobicamente, e armazenadas a 37°C em estufa bacteriológica por 12 horas.

Decorrido este período, substituiu-se 1 mL da solução de cada poço na qual as amostras estavam imersas por outro 1 mL de BHI (3% de glicose). De hora em hora, essas mesmas amostras foram imersas em outra placa de poços com 2 mL de

BHI a 10% de glicose durante 3 minutos. Esse ciclo foi repetido por 8 horas durante 2 dias.

Após 48 horas, as amostras foram cuidadosamente desinfetadas em uma solução de gluconato de clorexidina (10 mg/mL) por 15 minutos. Posteriormente, as amostras foram mantidas em ambiente fechado e úmido sob refrigeração (± 4 °C, com algodão estéril umedecido com água destilada e timol (0,64 g/L) trocado semanalmente) até o início das caracterizações. Posteriormente, as amostras foram caracterizadas por ATR-FTIR, OCT e MEV.

4.9. Técnicas de caracterizações

4.9.1. Técnica de reflexão total atenuada da espectroscopia de absorção na região do infravermelho por transformada de Fourier (ATR - FTIR)

As amostras foram avaliadas composicionalmente por meio da técnica da reflexão atenuada da espectroscopia de absorção no infravermelho por transformada de Fourier (ATR-FTIR, Frontier, Perkin Elmer, EUA), pertencente à Universidade Federal do ABC (UFABC). Para a realização das leituras, foi acoplado um acessório de ATR (reflexão total atenuada) em conjunto com cristal de diamante. Para a aquisição dos dados, configurou-se o equipamento para realizar 80 *scans* de cada amostra, na resolução de 4 cm^{-1} , com *background* a cada 5 amostras. Os espectros coletados variaram de 4000 a 700 cm^{-1} . Para registrar e converter os dados dos espectros de absorção foi utilizado o software do próprio espectrômetro (Spectrum 10, Perkin Elmer, EUA).

Para a análise dos dados, foi desenvolvida pelo grupo uma rotina em ambiente MATLAB, na qual, após traçado do *baseline*, foi efetuada a integração das áreas sob as seguintes bandas de absorção: fosfato ($1181\text{-}887\text{ cm}^{-1}$), amida I ($1720\text{-}1593\text{ cm}^{-1}$), amida II ($1580\text{-}1510\text{ cm}^{-1}$), amida III ($1296\text{-}1181\text{ cm}^{-1}$), o modo de vibração ν_2 do carbonato ($887\text{-}800\text{ cm}^{-1}$) e a superposição do alongamento ν_3 e flexão ν_4 modo de vibração do carbonato (entre $1510\text{-}1300\text{ cm}^{-1}$)^{63,81}. Para a análise semiquantitativa, cada uma das bandas foi normalizada, após o traçado do *baseline*, a partir da área sob a banda do fosfato de maior intensidade ($1181\text{-}887\text{ cm}^{-1}$) que, em diversos estudos, mostrou-se mais estável quando submetido a irradiações^{63,81}.

Essa técnica foi empregada após: (i) a preparação das amostras de dentina radicular; (ii) tratamento radioterápico; (iii) desmineralização; (iii) tratamentos e (iv) desafio cariogênico.

4.9.2. Espectroscopia Raman com transformada de Fourier (FT-Raman)

Utilizou-se o espectrômetro MultiRAM (Bruker, EUA) pertencente à Central Multiusuário da Universidade Federal do ABC cuja fonte é um *laser* de Nd:YAG (com comprimento de onda de 1064 nm), potência de 110 mW e 100 *scans* por leitura. A análise dos dados foi realizada por meio de uma rotina desenvolvida pelo grupo em ambiente MATLAB. Realizou-se uma normalização vetorial com suavização por Savitzky-Golay (segunda ordem polinomial com uma janela de 11 pontos) e consideraram-se as seguintes bandas para semiquantificação: fosfato (flexão simétrica ν_2 em 430 cm^{-1} ; flexão antissimétrica ν_4 em 590 cm^{-1} e estiramento simétrico ν_1 em 960 cm^{-1})⁸²; carbonato (estiramento simétrico ν_1 do carbonato tipo B em 1074 cm^{-1})^{82,83,84}; amida III (CH_2 , associação do estiramento de C-N e deformação de N-H em 1276 cm^{-1})⁸²; metileno (CH_2 , associação entre deformação angular N-H e estiramento C-N em 1454 cm^{-1})³¹ e amida I (estiramento de C=O em 1666 cm^{-1})⁸².

Essa técnica foi empregada após: (i) a preparação das amostras de dentina radicular; (ii) tratamento radioterápico e (iii) desmineralização.

4.9.3. Tomografia por coerência óptica (OCT)

As amostras foram também avaliadas por tomografia por coerência óptica (OCT) com os dados coletados do equipamento OCT CALLISTO (Thorlabs Inc., New Jersey, EUA), pertencente à Central Multiusuário da Universidade Federal do ABC: comprimento de onda de excitação de 930 nm, 1,2 kHz, resolução lateral de 8 μm , resolução axial de 7,0 μm , profundidade máxima de imageamento de 1,6 mm e *probe* para obtenção de imagens 3D. Para cada amostra, foram realizados 5 escaneamentos (*B-scan*), em regiões igualmente espaçadas entre elas (500 μm).

Foi elaborada pelo grupo uma rotina em ambiente MATLAB para realizar as análises das imagens obtidas por OCT⁸⁵. Primeiramente, foi definida uma ROI

(*Region of Interest*), por meio da seleção manual de uma máscara para cortar as regiões referentes ao ar e à linha de superfície saturada, devido à reflexão de Fresnel, e para fixar uma profundidade física de 0,7 mm. As intensidades da ROI foram convertidas de decibels (dB) para unidades arbitrárias (u.a.) e a profundidade foi ajustada pelo índice de refração da dentina de 1,63⁸⁶. Dois parâmetros foram calculados: coeficiente de atenuação óptica total (μ_t) e refletividade integrada (ΔR).

Para calcular o coeficiente de atenuação óptica total (μ_t), foi realizado um ajuste exponencial em cada *A-scan*, em que os parâmetros do ajuste foram comparados com uma equação baseada na equação de Beer-Lambert (Equação 1)⁸⁷. O valor de μ_t do *B-scan* foi dado pela média dos valores calculados em todos *A-scan*.

$$I(z) = I_0 \exp(-2\mu_t z) \quad (1)$$

A refletividade integrada (ΔR) foi dada pela intensidade total detectada. Para isso, a área sob a curva de cada *A-scan* foi calculada por meio do método de integração trapezoidal. O valor de ΔR do *B-scan*, por sua vez, foi definido pela média das áreas calculadas⁸⁸.

Essa técnica foi empregada após: (i) a preparação das amostras de dentina radicular; (ii) tratamento radioterápico; (iii) desmineralização; (iii) tratamentos e (iv) desafio cariogênico.

4.9.4. Microdureza superficial Knoop

Um microdurômetro (SHIMADZU HMV 2T, Laboratório de Biofotônica, IPEN-CNEN/SP) com penetrador tipo Knoop, com carga estática de 10 g/5 segundos, foi utilizado para mensurar a microdureza superficial de 30 blocos de dentina (15 hígidos e 15 após tratamento radioterápico). Para cada amostra, realizou-se 5 indentações, na sua parte central, separadas entre si por uma distância de 100 μm ⁸⁹.

4.9.5. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Utilizou-se o microscópio eletrônico de varredura FEI Quanta, da Central Multiusuário da UFABC para avaliação morfológica das amostras de dentina. Antes

do imageamento, as amostras permaneciam em estufa a 37 °C por 24 horas e, depois, eram fixadas em *stubs* com fita dupla face simples. Em seguida, as amostras eram metalizadas com 20 nm de ouro em evaporador a vácuo (*sputtering* LEICA EM ACE 2000).

Essa técnica foi empregada após: (i) a Fase I (ii) a preparação das amostras de dentina radicular; (iii) tratamento radioterápico; (iv) tratamentos e (v) desafio cariogênico.

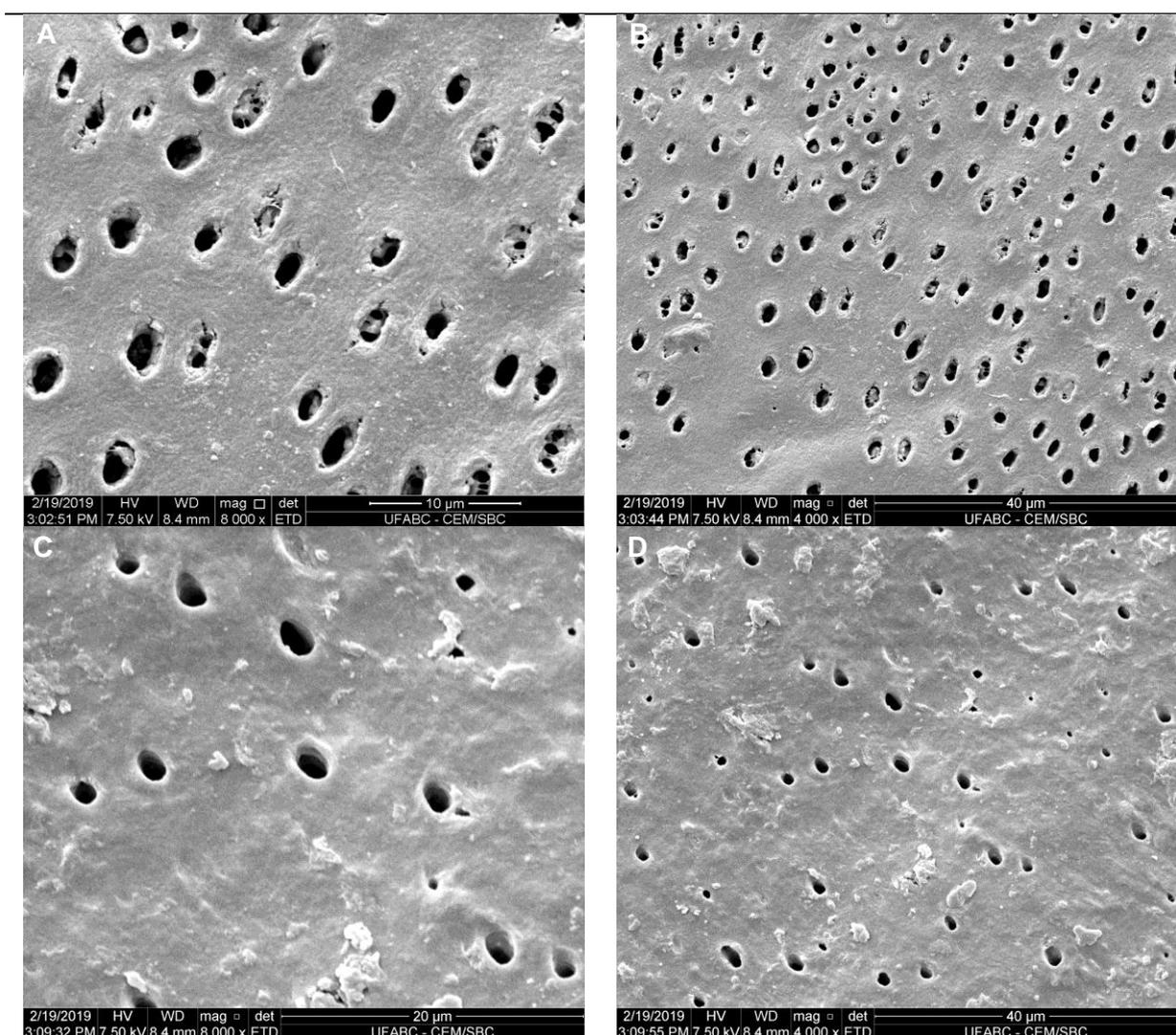
É importante mencionar que após os tratamentos e o desafio cariogênico, a MEV foi realizada na forma de um teste cego. Um operador experiente e, que desconhecia os tratamentos realizados nas amostras de cada grupo, fez as aquisições de imagem mediante uma única instrução: de que ele deveria adquirir sequências de imagens de 4 regiões distintas de cada amostra, porém mais próximas ao centro.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Fase I – Determinação do veículo de Biosilicato[®]

A Figura 14 e a Figura 15 exibem eletromicrografias representativas dos três veículos propostos para aplicação de Biosilicato[®] (BS) sobre a superfície de amostras de dentina radicular bovina. Na Figura 14, observam-se as amostras sem tratamento de BS (A e B) e que foram tratadas com BS veiculado em silicone gel (C e D).

Figura 14: Eletromicrografias representativas das amostras: (A,B) – sem tratamento, apenas imersão em saliva artificial por 24 horas e (C,D) – tratamento com BS veiculado em silicone gel. Magnificações originais: 8000x e 4000x.



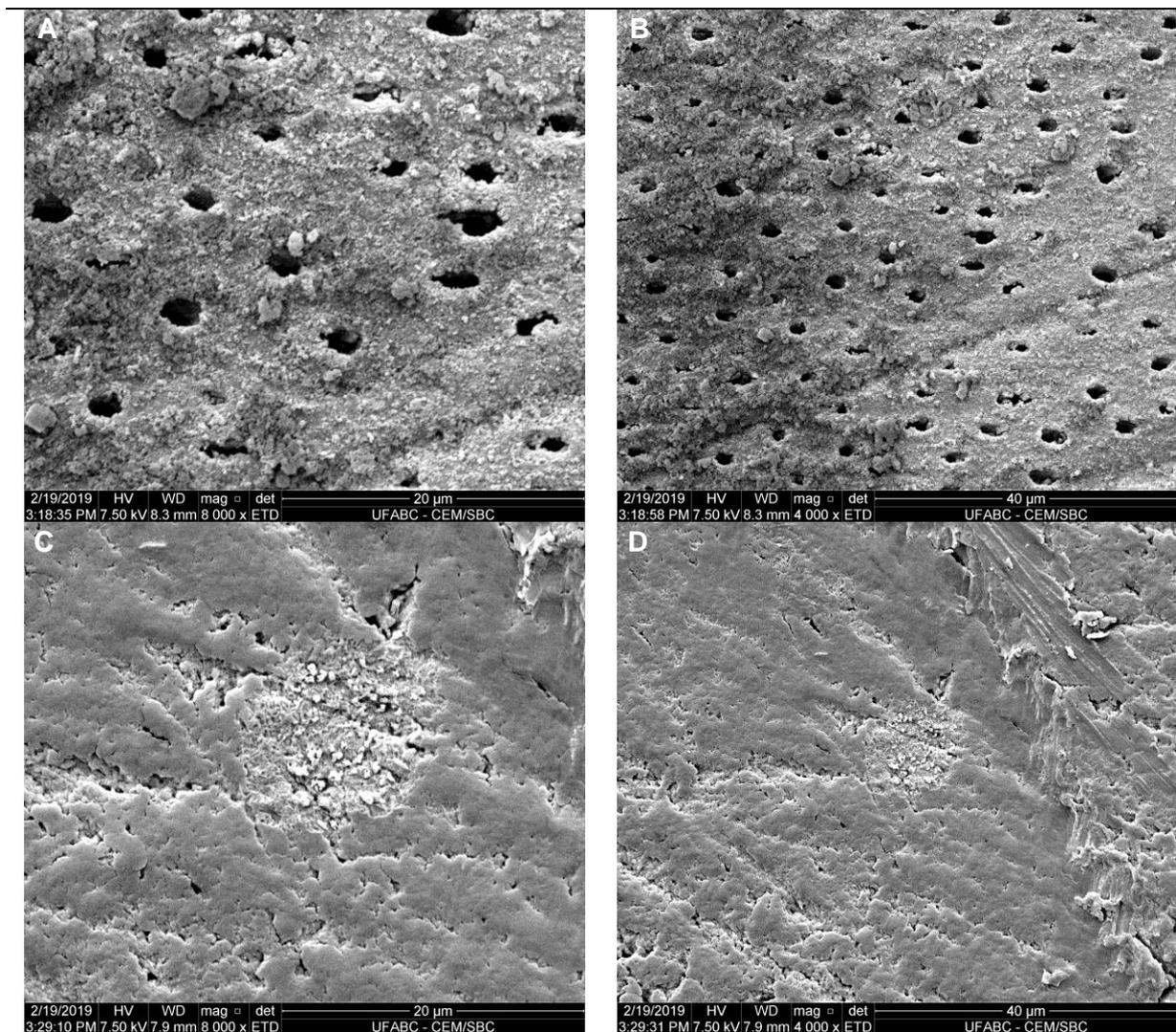
Fonte: Do próprio autor.

Na Figura 14A, nota-se a presença de túbulos dentinários totalmente expostos que coexistem com outros parcialmente obliterados. Além disso, é possível distinguir as estruturas de dentina intertubular e peritubular. Ainda, é possível notar a existência de pequenas partículas sobre a superfície da dentina que, possivelmente, são provenientes da deposição de íons presentes na saliva artificial na qual essas amostras permaneceram imersas por 24 horas. Na Figura 14B, por sua vez, percebe-se a presença de uma camada de *smear* com túbulos total e parcialmente expostos. Ainda, notam-se a presença de particulados na superfície que podem ser: (i) resquícios dos componentes do silicone gel; (ii) deposição de íons presentes na saliva artificial; (iii) partículas remanescentes de BS ou (iv) uma combinação destes.

Na Figura 15, por sua vez, observam-se as imagens correspondentes às amostras tratadas com BS veiculado numa formulação de dentifrício gel infantil comercial (A e B) e em água deionizada (C e D). Em específico, nas Figuras 15A-B, observam-se características morfológicas semelhantes àquelas descritas para as amostras tratadas com silicone gel; ou seja, constata-se a formação de uma camada de *smear*, bastante irregular, com a presença de túbulos parcial e totalmente expostos. Além disso, verifica-se a presença de partículas sobre a superfície da dentina que podem ser resquícios do dentifrício ou as demais possibilidades mencionadas anteriormente para as amostras tratadas. O mesmo, no entanto, não ocorreu com as amostras tratadas com BS em água deionizada (Figuras B-C), pois houve a formação de uma camada uniforme que, possivelmente se trata de hidroxiapatita carbonatada resultante da dissolução das partículas de BS, recobre os túbulos dentinários, obliterando-os de modo a ser impossível distinguir dentina peritubular e intertubular. Adicionalmente, não se nota a existência de material particulado sobre a superfície.

Desta forma, a partir dos achados morfológicos, escolheu-se a água deionizada como veículo para aplicação de BS. Este resultado está em concordância com outro estudo em que diferentes veículos foram testados e se demonstrou que água destilada permitia melhor adesão à superfície de amostras de dentina²³.

Figura 15: Eletromicrografias representativas das amostras: (A,B) – tratamento com BS veiculado em dentifrício infantil comercial e (C,D) – tratamento com BS veiculado em água deionizada. Magnificações originais: 8000x e 4000x.



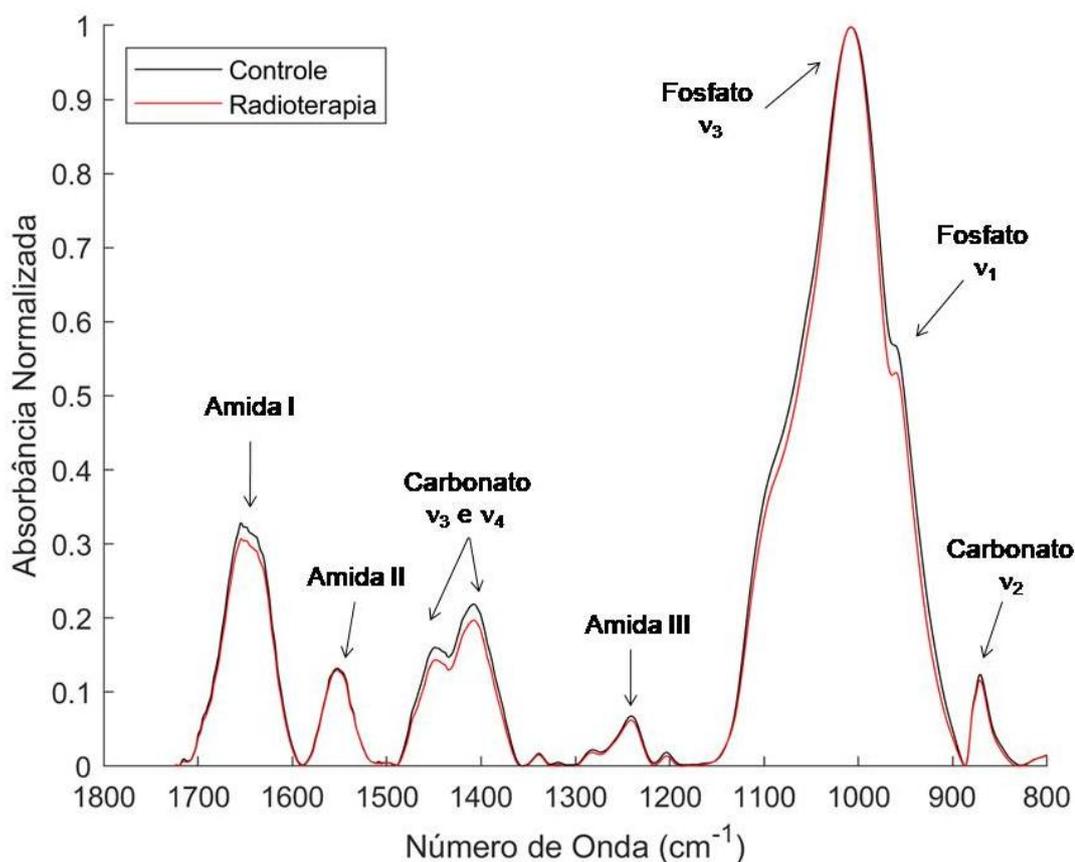
Fonte: Do próprio autor.

5.2. Fase II – determinação dos efeitos da radiação ionizante na composição e propriedades ópticas, mecânicas e morfológicas da dentina radicular

5.2.1. Análise composicional por ATR – FTIR

A Figura 16 apresenta a média dos espectros de absorção no infravermelho entre 1800 e 800 cm^{-1} (região de *fingerprint*) das amostras de dentina radicular bovina hígida (controle) e após a radioterapia.

Figura 16: Média dos espectros de absorção no infravermelho, entre 1800 e 800 cm^{-1} , das amostras de dentina radicular bovina hígida (controle) e após a radioterapia com a identificação das principais bandas de absorção.



Fonte: Do próprio autor.

Conforme mencionado anteriormente, a dentina é constituída por uma matriz inorgânica (69% em peso) de hidroxiapatita carbonatada e por uma matriz orgânica (20% em peso) de colágeno tipo I. Os outros 11% são formados, majoritariamente, por água²⁸. Na espectroscopia por ATR-FTIR, a detecção de bandas de fosfato e

carbonato é atribuída à matriz inorgânica, ao passo que as amidas I, II e III estão relacionadas à matriz orgânica^{28,63}.

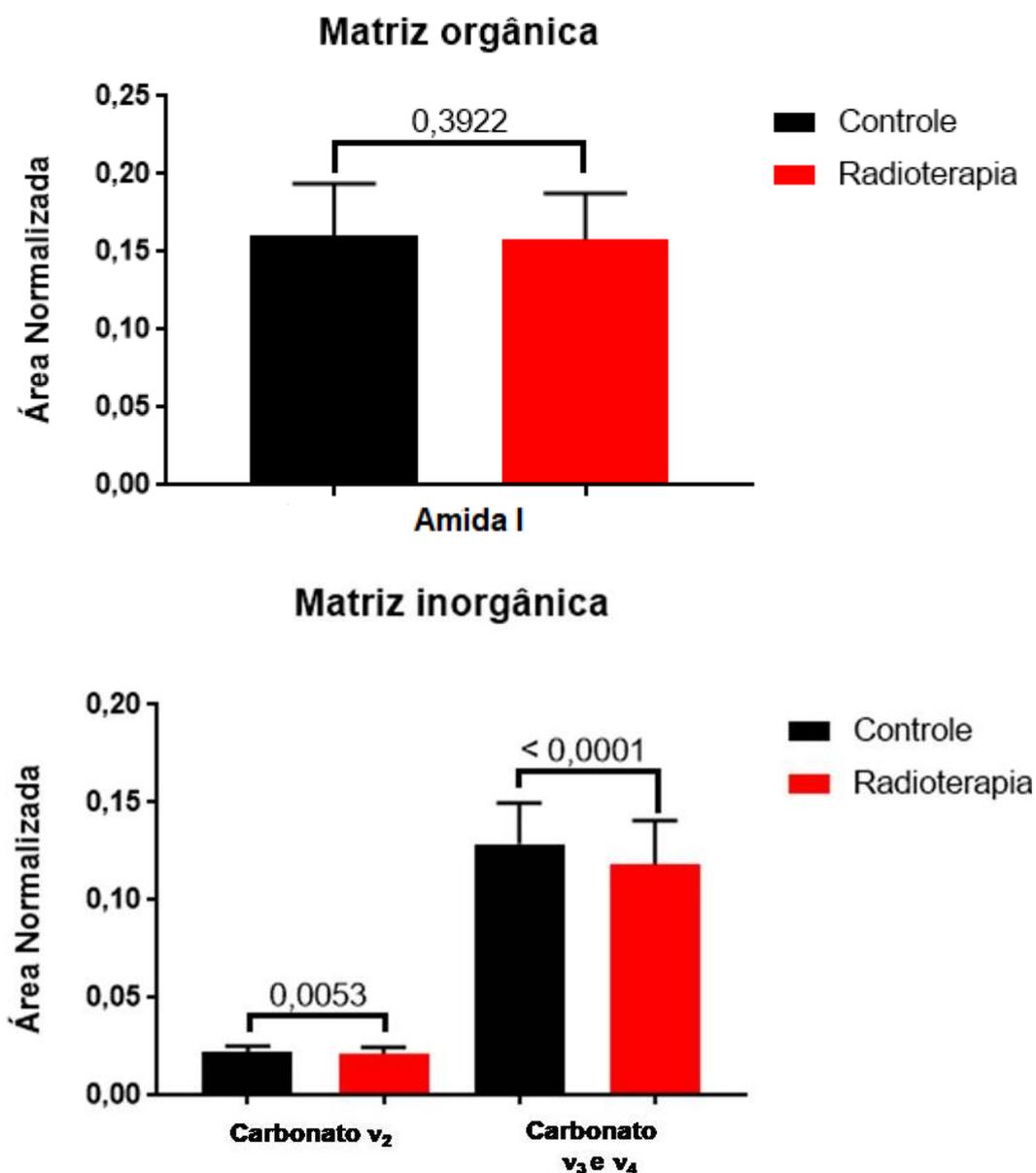
Na Figura 16, verificam-se bandas de: amida I (estiramento de C=O em 1645 cm^{-1}); amida II (combinação fora de fase da flexão de N-H e do estiramento de C-N em 1553 cm^{-1}); íon carbonato (estiramento antissimétrico ν_3 e ν_4 entre 1450 e 1410 cm^{-1} e deformação antissimétrica ν_2 em 872 cm^{-1}); amida III (associação do estiramento de C-N e deformação de N-H em 1240 cm^{-1}); outras estruturas do colágeno (modos de vibração em 1340, 1283 e 1202 cm^{-1}) e íon fosfato (estiramento antissimétrico ν_3 em 1005 cm^{-1} e estiramento simétrico ν_1 em 957 cm^{-1})^{28,63,81,90}. Salienta-se que as bandas observadas na Figura 16 ocorreram em números de onda cujos valores são próximos aos relatados na literatura^{28,63,81,90}.

Além disso, é importante ressaltar que há sobreposições de bandas no espectro na dentina. Na banda atribuída à amida I, por exemplo, há também uma banda de água adsorvida^{28,81}. A banda da amida II, por sua vez, é influenciada pelas bandas de carbonato (e vice-versa) e dos modos rotacionais do vapor de água presentes no ar²⁸. Ainda, é reportado na literatura que há bandas de prolina e hidroxiprolina (dois dos aminoácidos que constituem o colágeno) na região de 1450 cm^{-1} , justamente onde há as vibrações ν_3 e ν_4 do íon carbonato⁹⁰.

Ainda em relação à Figura 16, observa-se que há a preservação tanto das bandas dos constituintes da dentina, quanto das posições em que estas ocorrem. Além disso, não se nota o surgimento de novas bandas. A princípio, todos esses fatos são indícios de que a radiação ionizante na dose total utilizada nesse estudo (60 Gy) não promoveu a degradação total dos constituintes da dentina.

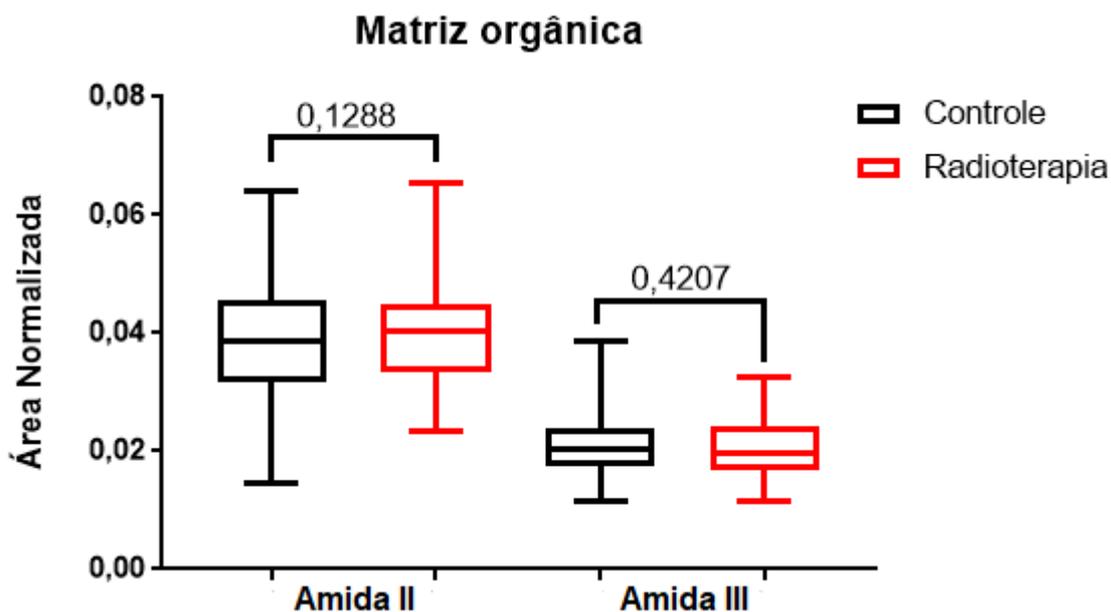
A análise semiquantitativa de cada uma das áreas das bandas da região do *fingerprint*, no entanto, revelou diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre as bandas correspondentes aos modos de vibração ν_2 , ν_3 e ν_4 do carbonato, quando comparados os grupos controle e radioterapia (Figura 17 e Figura 18).

Figura 17: Valores médios, com os respectivos desvios-padrão, das proporções das áreas normalizadas pela banda de fosfato ν_3 das bandas de amida I e de carbonato (modos de vibração ν_2 , ν_3 e ν_4) das amostras de dentina radicular bovina antes (controle) e depois da radioterapia. Os valores de p, acima de cada barra, são referentes à comparação estatística pelo teste t de Student para amostras dependentes, com $\alpha = 0,05$.



Fonte: Do próprio autor.

Figura 18: Distribuição dos valores médios, com os respectivos desvios-padrão e medianas, das áreas normalizadas pela banda de fosfato ν_3 das bandas de amida II e amida III das amostras de dentina radicular bovina antes (controle) e depois da radioterapia. Os valores de p , acima de cada barra, são referentes à comparação estatística pelo teste de Wilcoxon para amostras dependentes, com $\alpha = 0,05$.



Fonte: Do próprio autor.

Os resultados apresentados nas Figuras 17 e 18 são particularmente interessantes porque não há um consenso na literatura sobre os efeitos da radiação ionizante, em doses terapêuticas para neoplasias de cabeça e pescoço, sobre os tecidos duros dentais. A falta de consenso deve-se, em parte, por diferenças metodológicas tais como: a dose de radiação aplicada, o tipo de dente empregado (bovino, permanente humano ou decíduo humano), irradiação em ambiente úmido ou seco, a forma de armazenamento das amostras de dentina durante o tratamento radioterápico e o modelo de estudo adotado (*in vitro* ou *ex-vivo*)⁹¹. Por exemplo, um estudo conduzido por Rodrigues *et al.* chegou à conclusão de que a radioterapia, em dose total de 72 Gy, aplicada em doses fracionadas de 1,8 Gy/dia durante 8 semanas com as amostras mantidas em água destilada, promove aumentos em todas as bandas de absorção da dentina humana⁹⁰. Com estas mesmas doses, Miranda *et al.* constataram que o tratamento radioterápico provoca alterações na matriz orgânica de amostras de dentina coronária e radicular, evidenciadas pela diminuição das razões mineral/matriz, obtidas a partir de incisivos e caninos extraídos de pacientes oncológicos irradiados⁹². O estudo de Qing *et al.*, por sua

vez, demonstrou que há uma redução nas bandas de absorção do carbonato e do fosfato em doses totais de 60 Gy (aplicada em doses fracionadas de 2 Gy/dia durante 6 semanas com as amostras armazenadas em saliva artificial)⁹³. Guardadas as diferenças metodológicas, os resultados deste estudo tendem a concordar parcialmente com estes dois últimos.

A fim de compreender o porquê houve uma diminuição nas bandas de carbonato, é necessário elucidar o mecanismo pelo qual a radioterapia atua. Esta age por meio da formação de radicais livres de hidrogênio e de espécies reativas de oxigênio, a partir da quebra das moléculas de água^{90,94}. Estes radicais (como peróxidos, por exemplo), por sua vez, podem atuar como oxidantes fortes e provocar alterações nos tecidos, sobretudo nos compostos orgânicos que os constituem^{90,95}, ou ainda, ativar enzimas que desnaturam o colágeno^{95,96,97}. Como a dentina possui uma quantidade expressiva de água (11% em peso)²⁸ que circunda o colágeno³⁰, diversos estudos têm sugerido que os efeitos da radioterapia sobre as propriedades da dentina não devem ser ignorados⁹⁰.

Para Rodrigues *et al.*, os radicais livres formados pela quebra das moléculas de água em função da radiação ionizante seriam capazes de promover uma reorganização estrutural nos componentes orgânicos⁹⁰. Tal desorganização e rearranjo do colágeno explicariam alterações nas propriedades físicas e mecânicas da dentina, tais como o aumento na solubilidade, redução na resistência à tração e a propensão à ocorrência de fraturas por cisalhamento³¹. Também explicariam o porquê há a preservação tanto das bandas dos constituintes orgânicos que formam a dentina, bem como das posições em que estas bandas ocorrem (Figura 17), uma vez que há apenas o rearranjo do colágeno e não sua degradação.

Em relação às alterações na matriz inorgânica, Marangoni-Lopes *et al.*, por meio da técnica de espectroscopia Raman com transformada de Fourier, propuseram que a diminuição das bandas de carbonato após a radioterapia ocorre devido à formação de oxidantes fortes que afetariam não apenas os compostos orgânicos, mas também os compostos inorgânicos. Estes mesmos pesquisadores mediram as concentrações de íons presentes na saliva artificial em que as amostras de dentina foram mantidas durante a radioterapia. Concluíram que, após a radioterapia, a saliva artificial apresentava teores mais altos de fosfato e cálcio.

Logo, a perda de carbonato e fosfato deu-se para a saliva artificial, que ficou supersaturada⁹⁵.

É importante salientar que neste estudo, assim como o de Marangoni-Lopes *et al.*, as amostras de dentina foram mantidas em saliva artificial durante o tratamento radioterápico. Verificou-se que, após as irradiações, a saliva artificial originalmente transparente tornou-se turva e amarelada. Embora não tenha sido realizado nenhum teste que visasse a algum tipo de medição na saliva, a modificação na sua cor sugere que alterações composicionais devem ter ocorrido.

Conforme mencionado anteriormente, as bandas do carbonato nos modos de vibração ν_3 e ν_4 são influenciadas pelas vibrações da banda de amida II, que está relacionada à estrutura em hélice do colágeno^{63,98}, e vice-versa. Há, ainda, na mesma região do carbonato, a ocorrência de bandas de prolina e hidroxiprolina do colágeno. Assim, a diminuição nas bandas na região entre 1450 e 1410 cm^{-1} observada neste estudo pode estar relacionada também a alterações em componentes orgânicos e não apenas na matriz inorgânica.

Em relação à banda do carbonato no modo de vibração ν_2 (em 872 cm^{-1}), mais especificamente, sabe-se que este é substituinte do fosfato (PO_4^{-3}) no cristal de apatita e, conseqüentemente, dá origem à apatita carbonatada tipo B^{99,100,101}. Este tipo de apatita carbonatada aumenta a solubilidade da matriz inorgânica da dentina.

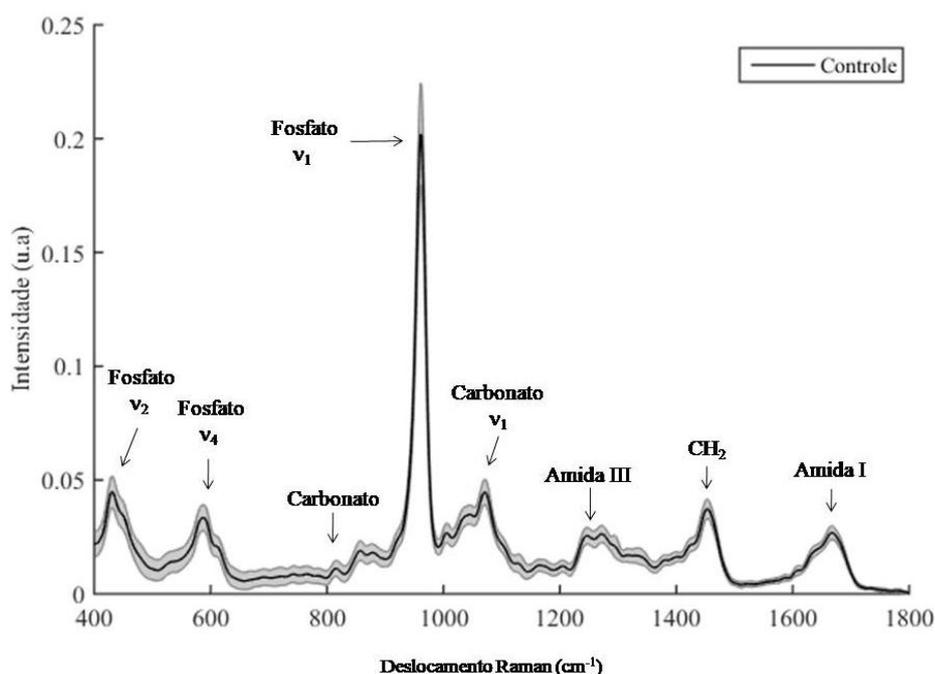
É importante reiterar que a literatura reporta resultados controversos de técnicas de espectroscopia a respeito dos efeitos da radioterapia sobre tecidos ósseos^{90,93,95}. Alguns demonstram que doses terapêuticas (entre 50 e 72 Gy) são suficientes para promoverem alterações composicionais, ao passo que outros afirmam que doses tão altas quanto 75 kGy, em dose única e com as amostras mantidas em ambiente refrigerado, não causam alteração composicional alguma⁶³. Os resultados descritos neste presente estudo, no entanto, parecem evidenciar que a radiação ionizante em dose de 60 Gy promoveu alterações composicionais na dentina radicular que indicam uma provável desorganização e rearranjo do colágeno e perda de carbonato, o que pode ser indício de desmineralização.

5.2.2. Análise composicional por FT-Raman

A espectroscopia Raman com transformada de Fourier (FT-Raman) é uma técnica amplamente utilizada para caracterizar compostos sintéticos e tecidos biológicos⁸². É considerada uma técnica complementar à de ATR-FTIR, pois ambas as técnicas são baseadas em princípios físicos distintos^{92,100}.

A Figura 19 apresenta a média dos espectros Raman entre 400 e 1800 cm^{-1} das amostras de dentina do grupo controle com a identificação das principais bandas neste tecido. Verifica-se a presença de bandas de: fosfato (flexão simétrica ν_2 em 430 cm^{-1} ; flexão antissimétrica ν_4 em 590 cm^{-1} e estiramento simétrico ν_1 em 960 cm^{-1})⁸²; carbonato (estiramento simétrico ν_1 do carbonato tipo B em 1074 cm^{-1} e em 870 cm^{-1})^{82,83,84}; amida III (CH_2 , associação do estiramento de C-N e deformação de N-H em 1276 cm^{-1})⁸²; metileno (CH_2 , associação entre deformação angular N-H e estiramento C-N em 1454 cm^{-1})³¹ e amida I (estiramento de C=O em 1666 cm^{-1})⁸². Destas bandas, as de fosfato e de carbonato estão relacionadas à matriz inorgânica, ao passo que as de metileno e de amida, à matriz orgânica³¹. É importante mencionar que as bandas observadas nesta figura ocorreram em números de deslocamento cujos valores são próximos aos relatados na literatura.

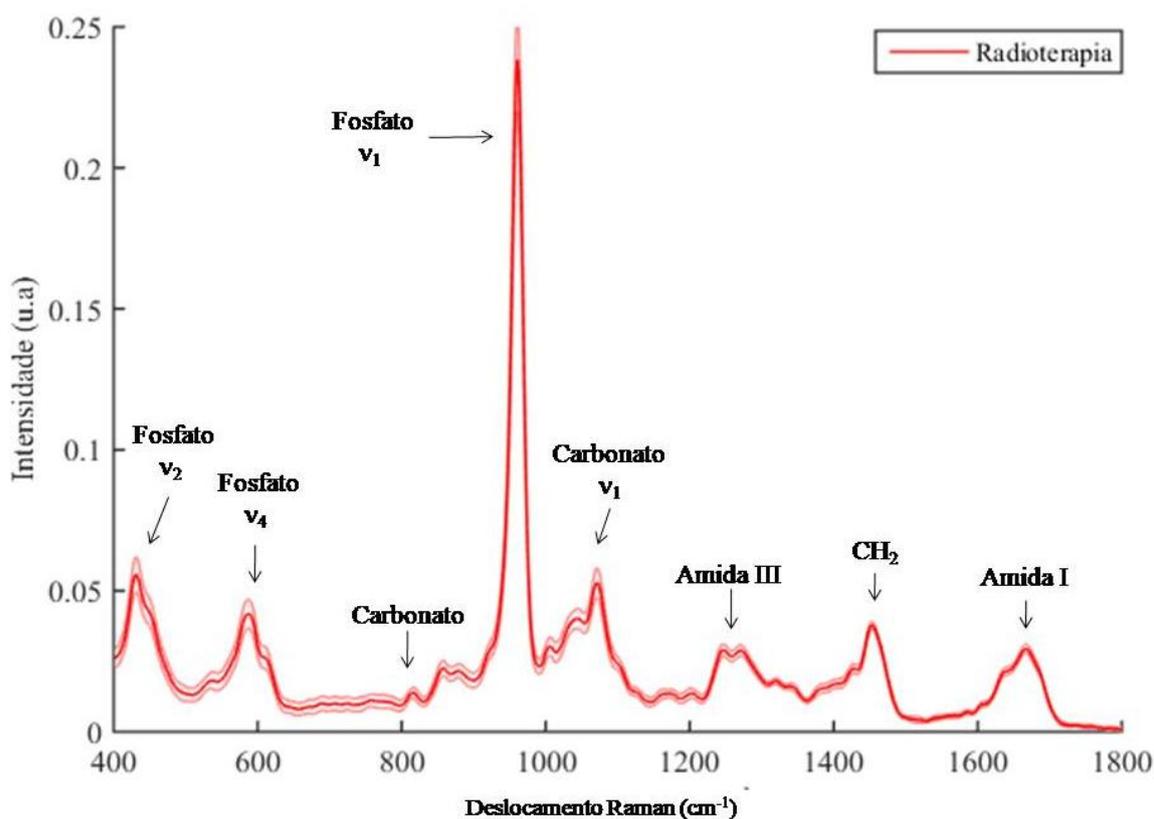
Figura 19: Espectro Raman médio das amostras de dentina radicular bovina do grupo controle (hígidas) com a identificação das principais bandas deste tecido. A área sombreada denota o desvio-padrão.



Fonte: Do próprio autor.

A Figura 20, por sua vez, apresenta a média dos espectros Raman entre 400 e 1800 cm^{-1} das amostras de dentina após a radioterapia com a identificação das principais bandas neste tecido. É possível observar que há a preservação das bandas da dentina após a radioterapia, bem como das posições em que estas ocorrem em relação às amostras sem radioterapia. Além disso, não se nota o surgimento de novas bandas. A princípio, todos estes fatos sugerem que a radioterapia com dose total de 60 Gy não promoveu a degradação total dos constituintes da dentina radicular, o que corrobora os resultados obtidos com os espectros de ATR-FTIR (Figura 16).

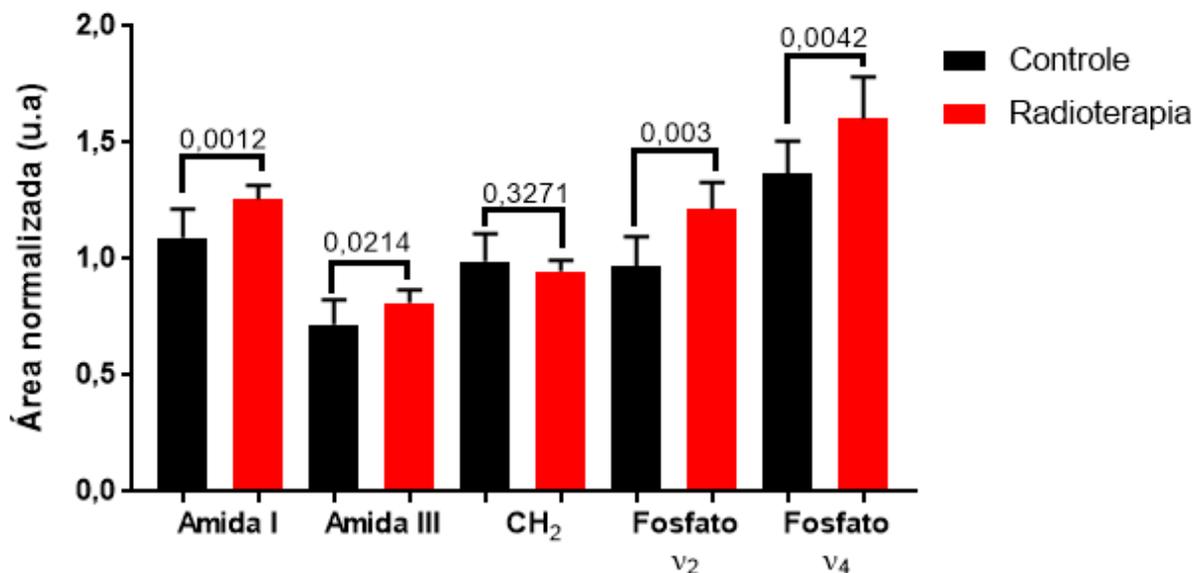
Figura 20: Espectro Raman médio das amostras de dentina radicular bovina após a radioterapia com a identificação das principais bandas deste tecido. A área sombreada denota o desvio-padrão.



Fonte: Do próprio autor.

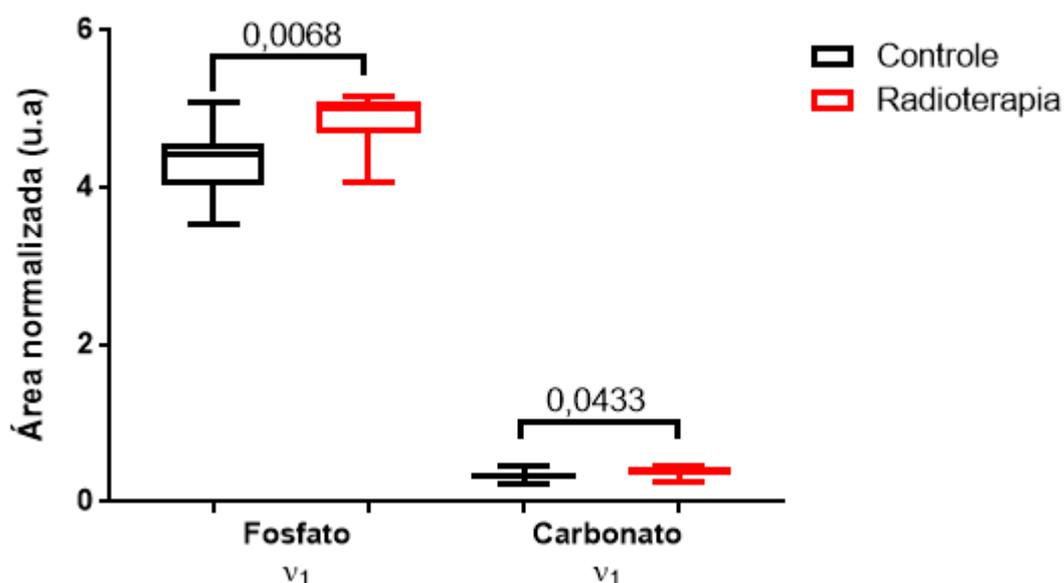
A fim de comparar os espectros Raman obtidos antes (controle) e após a radioterapia, realizou-se uma análise semiquantitativa. Os resultados desta análise são apresentados nas Figuras 21 e 22.

Figura 21: Valores médios, com os respectivos desvios-padrão, das áreas normalizadas das bandas de amida I, amida III, CH₂ e fosfato (modos de vibração ν_2 e ν_4) do espectro Raman da dentina. Os números, acima de cada barra, correspondem aos valores de p resultantes do teste t de Student para amostras independentes, com $\alpha = 0,05$.



Fonte: Do próprio autor.

Figura 22: Distribuição dos valores médios, com os respectivos desvios-padrão e medianas, das áreas normalizadas das bandas de fosfato ν_1 e de carbonato ν_1 do espectro Raman da dentina. Os números, acima de cada barra, correspondem aos valores de p resultantes do teste de Mann-Whitney para amostras independentes, com $\alpha = 0,05$.



Fonte: Do próprio autor.

De acordo com as Figuras 21 e 22, as bandas de amida (I e III), fosfato (nos modos de vibração ν_1, ν_2 e ν_4) e de carbonato ν_1 apresentaram diferenças estatisticamente significantes quando comparados os grupos controle e radioterapia. Assim como ocorreu com os resultados de ATR-FTIR, a literatura de FT-Raman é controversa sobre os efeitos da radioterapia sobre a dentina. É importante reiterar que a falta de consenso na literatura pode advir de diferenças metodológicas, como discutido anteriormente.

Entre os estudos que se propuseram a investigar os efeitos da radioterapia sobre a dentina por meio da técnica de FT-Raman destacam-se o de Marangoni-Lopes *et al.*, o de Campi *et al.* e o de Miranda *et al.*⁹².

O estudo conduzido por Marangoni-Lopes *et al.* demonstrou a existência de uma relação dose-dependente com a intensidade das bandas detectadas. Com doses acumuladas de 10,8 e 21,6 Gy, foi observado um aumento nas intensidades das bandas de fosfato ν_2 , amida III e CH_2 . No entanto, com uma dose total acumulada de 30,6 Gy, estas mesmas bandas apresentaram uma redução. A banda de carbonato, por sua vez, sofreu um aumento com 21,6 Gy e uma redução após 30,6 Gy. É importante mencionar que estes pesquisadores utilizaram dentes decíduos humanos que receberam uma dose total de 30,6 Gy, aplicada em 17 doses fracionadas de 180 cGy/dia, com as amostras armazenadas em saliva artificial⁹⁵.

Campi *et al.*, por sua vez, investigaram os efeitos da radioterapia em diferentes regiões da dentina radicular. Para isso, utilizaram dentes permanentes humanos que foram irradiados com uma dose acumulada total de 60 Gy, aplicada em doses fracionadas de 2 Gy/dia, na presença de água destilada, embora armazenados em saliva artificial. Concluíram que na dentina radicular intracanal há uma diminuição das bandas de amida III, carbonato, fosfato ν_4 e na razão amida I/amida III. Na dentina radicular média, contudo, observaram diminuição apenas na banda de fosfato ν_4 ³¹.

E, por fim, o estudo de Miranda *et al.* com dentinas obtidas a partir de incisivos e caninos de pacientes oncológicos, com idade média de 55 anos, que foram tratados com uma dose total de 72 Gy, aplicada em doses fracionadas de 1,8 Gy/dia, concluiu que a dentina coronária sofreu um acréscimo na cristalinidade do fosfato e um decréscimo na cristalinidade do carbonato. Além disso, constatou-se

que tanto a dentina coronária como a radicular exibiram menores valores na razão amida I/amida III após a irradiação⁹².

Os resultados aqui apresentados divergem parcialmente daqueles obtidos por Marangoni-Lopes *et al.*⁹⁵, de Campi *et al.*³¹ e de Miranda *et al.*⁹², pois houve um aumento estatisticamente significativo na intensidade das bandas de amida (I e III), fosfato (nos modos de vibração ν_1 , ν_2 e ν_4) e de carbonato ν_1 após o tratamento radioterápico. É importante reiterar que, para este estudo, foram empregadas amostras de dentina radicular bovina irradiadas com uma dose total acumulada de 60 Gy, aplicada em doses fracionadas de 2 Gy/dia, com as amostras imersas em saliva artificial.

A banda de amida I, que neste estudo apresentou um aumento após a radioterapia, está relacionada à estrutura secundária do colágeno e, por isso, é utilizada para determinar a conformação da proteína (alfas hélices e folhas beta)^{98,102,103,104}. De acordo com a literatura, o aumento nesta banda é indício de dano causado por radioterapia¹⁰². Para Miranda *et al.* este aumento deve-se à ação dos radicais livres e outras espécies reativas, resultantes da interação entre a radiação ionizante e as moléculas de água, sobre as ligações cruzadas do colágeno que, como consequência, é rearranjado molecularmente. Ainda segundo esses autores, alterações na banda de amida I podem acarretar a formação de um novo colágeno com qualidade inferior ao original⁹².

Por sua vez, a banda de amida III é complexa e instável⁹⁰ e por estar associada às cadeias laterais do colágeno, alterações nesta banda podem ter implicações na interação entre as matrizes orgânica e inorgânica^{31,92} e, assim, podem comprometer a adesão de materiais aos tecidos dentais³¹. Para Rodrigues *et al.* as alterações nesta banda devem-se aos efeitos dos radicais livres gerados pela radiólise da água que promovem o rearranjo na estrutura do colágeno após a radioterapia⁹⁰, o que está em concordância com o argumento de Miranda *et al.* a respeito das alterações na banda de amida I⁹².

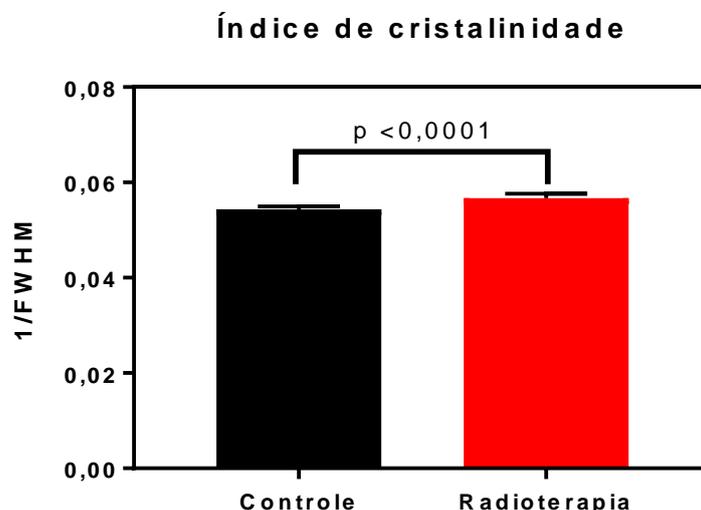
E, por fim, a literatura reporta que a presença de bandas de fosfato ν_1 , ν_2 e ν_4 no espectro Raman é uma evidência da natureza cristalina dos minerais que compõem a dentina⁸². Como supracitado, neste estudo as bandas de fosfato nos modos de vibração ν_1, ν_2 e ν_4 aumentaram após a radioterapia. Embora Marangoni-

Lopes *et al.* tenham observado que, em determinadas doses, a banda de fosfato ν_2 sofreu aumento em sua intensidade, estes mesmos pesquisadores não ofereceram uma explicação para tal fato⁹⁵. Isso também ocorreu com o estudo de Miranda *et al.*⁹². Apenas Rodrigues *et al.*, que constataram aumento nas bandas de fosfato por ATR-FTIR em amostras de dentina submetidas à radioterapia, propuseram que a radiação ionizante é capaz de alterar as ligações químicas da hidroxiapatita de modo a promover sua reorganização estrutural e, assim, favorecer a formação de íons fosfato. Inclusive, estes mesmos pesquisadores correlacionaram o aumento de fosfato com o acréscimo na microdureza Vickers após a radioterapia⁹⁰. A propósito, a reorganização estrutural da hidroxiapatita promovida pela radiação ionizante pode explicar também as alterações na banda de carbonato ν_1 .

Outra maneira dos efeitos da radioterapia sobre a matriz inorgânica dos tecidos dentais serem avaliados dá-se por meio do índice de cristalinidade, que representa o ordenamento de uma determinada fase, bem como o tamanho médio de um cristalito^{104,105,106}. Este índice é inversamente proporcional à largura total à meia altura (*full width at half maximum*, FWHM) para a banda de fosfato ν_1 em 960 cm^{-1} e apresenta boa correlação com a cristalinidade calculada a partir da técnica de difração de raio-X, que é considerada referência^{105,106,107}. No método FWHM, uma estrutura totalmente cristalina apresenta um pico estreito e um tamanho grande de cristalito^{102,105,107}.

Desta forma, a Figura 23 exhibe as médias do índice de cristalinidade, que foram calculadas por meio do método de largura total à meia altura (FWHM) para a banda de fosfato ν_1 em 960 cm^{-1} , dos grupos controle e radioterapia. Observa-se que o índice de cristalinidade aumentou após a radioterapia, o que significa que o cristal de hidroxiapatita carbonatada, principal constituinte mineral da dentina²⁸, torna-se mais ordenado e passa a ter um tamanho de cristalito maior após a radioterapia.

Figura 23: Médias dos índices de cristalinidade, com seus respectivos desvio-padrão, dos grupos controle e radioterapia calculados por meio do método FWHM para a banda de fosfato ν_1 em 960 cm^{-1} . Para comparação estatística, utilizou-se o teste t de Student para amostras independentes, com $\alpha = 0,05$.



Fonte: Do próprio autor.

Novamente, a literatura reporta resultados controversos para o índice de cristalinidade de tecidos duros dentais tratados radioterapeuticamente. Lu *et al.*, por exemplo, relataram que o índice de cristalinidade do esmalte e da dentina, obtidos a partir de molares humanos e submetidos à radioterapia com doses de 30 e 60 Gy, diminuíram com o aumento da dose de radiação¹⁰⁸. Reed *et al.*, por sua vez, constataram que amostras de dentes humanos submetidas à radioterapia com dose total de 70 Gy, aplicada em doses fracionadas de 2 Gy/dia, não apresentaram mudanças quanto à cristalinidade do esmalte, mas exibiram uma tendência ao aumento no índice de cristalinidade da dentina⁸³.

A controvérsia persiste em relação ao índice de cristalinidade de tecidos ósseos submetidos à radioterapia. Kubisz *et al.* analisaram amostras de fêmur bovino esterilizadas com diferentes doses de irradiação gama (10, 25, 50, 100, 500, 750 e 1000 kGy) e constataram que não houve alterações na cristalinidade da hidroxiapatita presente no tecido. Por sua vez, Zzell *et al.* investigaram os efeitos da radiação gama sobre tíbias bovinas submetidas a doses de 0,01; 0,1; 1; 15 e 75 kGy em meio úmido. Concluíram que o índice de cristalinidade do tecido ósseo foi reduzido mediante a dose de 0,01 kGy, mas permaneceu inalterado em doses

maiores⁶³. Por fim, Gong *et al.* analisaram tíbias de camundongos BALB/F que foram tratados radioterapeuticamente com uma dose total de 20 Gy, aplicada em frações de 5 Gy/dia. As amostras obtidas a partir de camundongos eutanasiados 4 semanas após a radioterapia exibiram um aumento na cristalinidade, que se deveu ao crescimento dos cristalitos existentes¹⁰⁴.

Ainda, salienta-se que a literatura também descreve que, em apatitas carbonatadas sintéticas, o aumento na cristalinidade acarreta o estreitamento da banda de fosfato e é acompanhado pela redução de carbonato como substituinte no cristal de apatita¹⁰². Embora a análise de FT-Raman realizada neste estudo tenha apresentado aumento significativo na banda de carbonato ν_1 após a radioterapia (Figura 22), os resultados de ATR-FTIR demonstraram reduções nas bandas de carbonato nos modos de vibração ν_2 , ν_3 e ν_4 (Figura 17).

É importante mencionar que a técnica de FT-Raman, cuja fonte é um *laser* de Nd:YAG com comprimento de onda de 1064 nm, possui capacidade de detecção em maior profundidade na dentina quando comparado à técnica de ATR-FTIR. Esta possui um cristal de diamante que gera uma onda evanescente com penetração de, no máximo, 5 μm na dentina^{63,81,92}. Desta forma, é plausível que a perda de carbonato evidenciada pela técnica de ATR-FTIR tenha acontecido de modo mais acentuado nas proximidades da superfície da dentina. Como as amostras permaneceram imersas em saliva artificial, composta predominantemente por cálcio e fosfato, durante todo o tratamento radioterápico, é provável que o carbonato tenha sido liberado para esta solução por meio das reações químicas promovidas pela ação da radiação ionizante com as moléculas de água. A perda de carbonato, conseqüentemente, pode ter favorecido tanto o rearranjo dos íons fosfato já existentes quanto a introdução de novos íons oriundos da saliva artificial no cristal de hidroxiapatita, o que explicaria o aumento na cristalinidade demonstrado na Figura 23.

Ainda, é possível que o aumento no índice de cristalinidade seja resultante da combinação de todas as alterações composicionais detectadas pelas técnicas de ATR-FTIR e FT-Raman, que, em suma, foram:

- (i) o aumento nas intensidades das bandas de amida I e III, detectado por FT-Raman, que pode ser indício tanto da desorganização de colágeno como da formação de um novo tipo;
- (ii) a diminuição na banda de carbonato nos modos de vibração ν_3 e ν_4 , constatada por ATR-FTIR, que pode estar relacionada à perda de conteúdo orgânico ou inorgânico.
- (iii) a redução na banda de carbonato no modo de vibração ν_2 , detectada por ATR-FTIR, que pode ter conexão com a perda de conteúdo inorgânico que atuava como substituinte do fosfato no cristal de hidroxiapatita;
- (iv) o aumento nas bandas de fosfato nos modos de vibração ν_1 , ν_2 e ν_4 , demonstrado por FT-Raman, que pode estar relacionado a um rearranjo da estrutura da hidroxiapatita por ação da radiação ionizante.

Portanto, os resultados obtidos com a técnica de FT-Raman sugerem que a radiação ionizante, em dose terapêutica para neoplasias de cabeça e pescoço, é capaz de provocar o rearranjo do conteúdo orgânico e inorgânico da dentina, além de aumentar a cristalinidade da hidroxiapatita. Desta forma, pode-se dizer que tal técnica complementou a análise de ATR-FTIR que também tinha indicado evidências de alterações composicionais na dentina após o tratamento radioterápico *in vitro*.

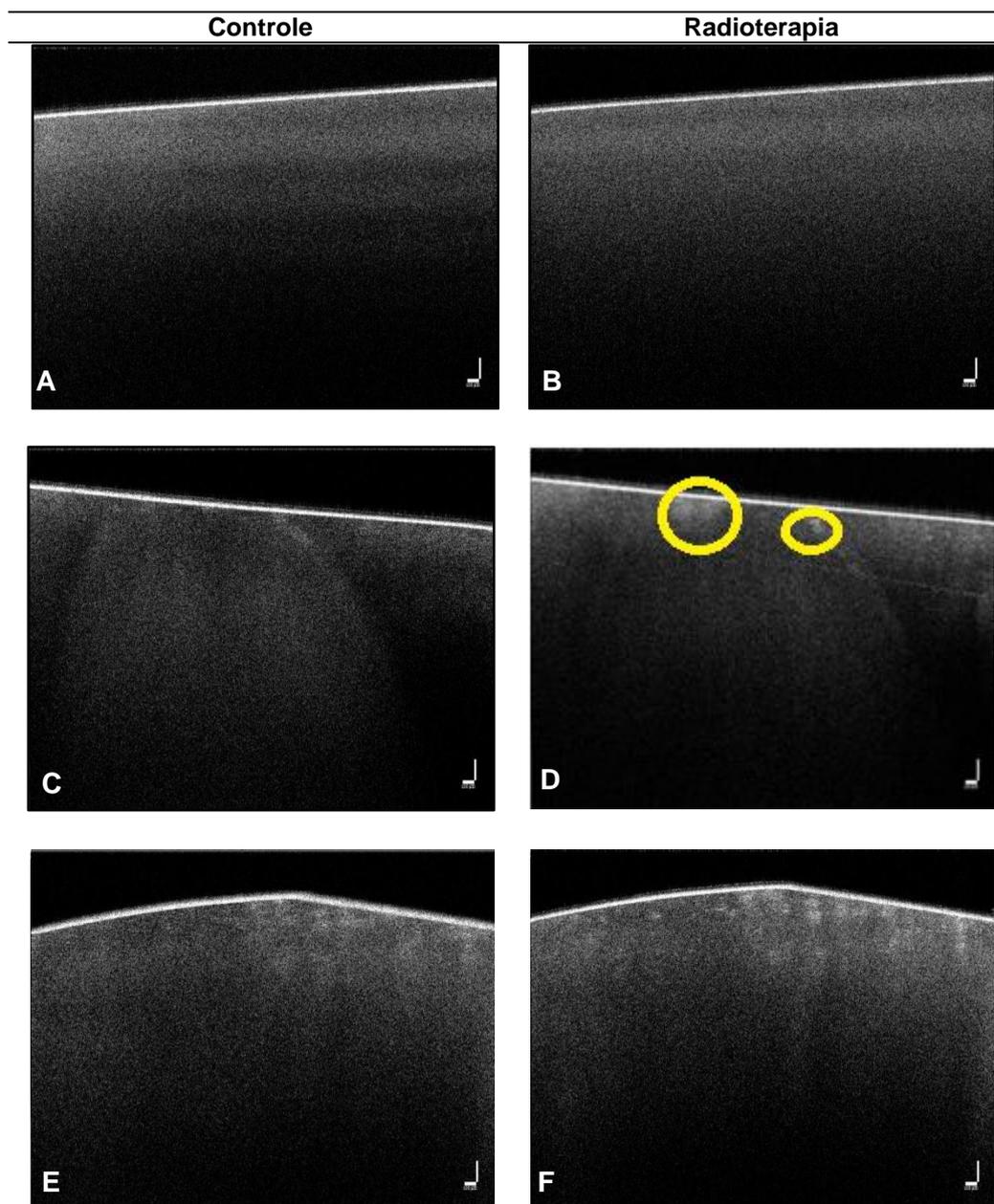
5.2.3. Avaliação de propriedades ópticas por OCT

A tomografia por coerência óptica (OCT, na sigla em inglês) é uma técnica que tem sido empregada para a avaliação de desmineralização e remineralização em tecidos dentais. Consequentemente, nos últimos anos, diversos estudos têm sido realizados com o uso da OCT como forma de avaliar lesões de cárie, sejam elas naturais ou artificiais, principalmente as incipientes. Trata-se de uma técnica não invasiva e que não faz uso de radiação ionizante, como é o caso das radiografias que são amplamente utilizadas para este fim^{87,88,109,110,111,112}. No entanto, até este momento, nenhum estudo adotou esta técnica a fim de mensurar os efeitos da radioterapia sobre os tecidos dentais¹⁰⁹.

A Figura 24 exhibe imagens representativas de *B-scan* dos blocos de dentina radicular avaliados neste estudo antes (controle) e após a radioterapia. Salienta-se

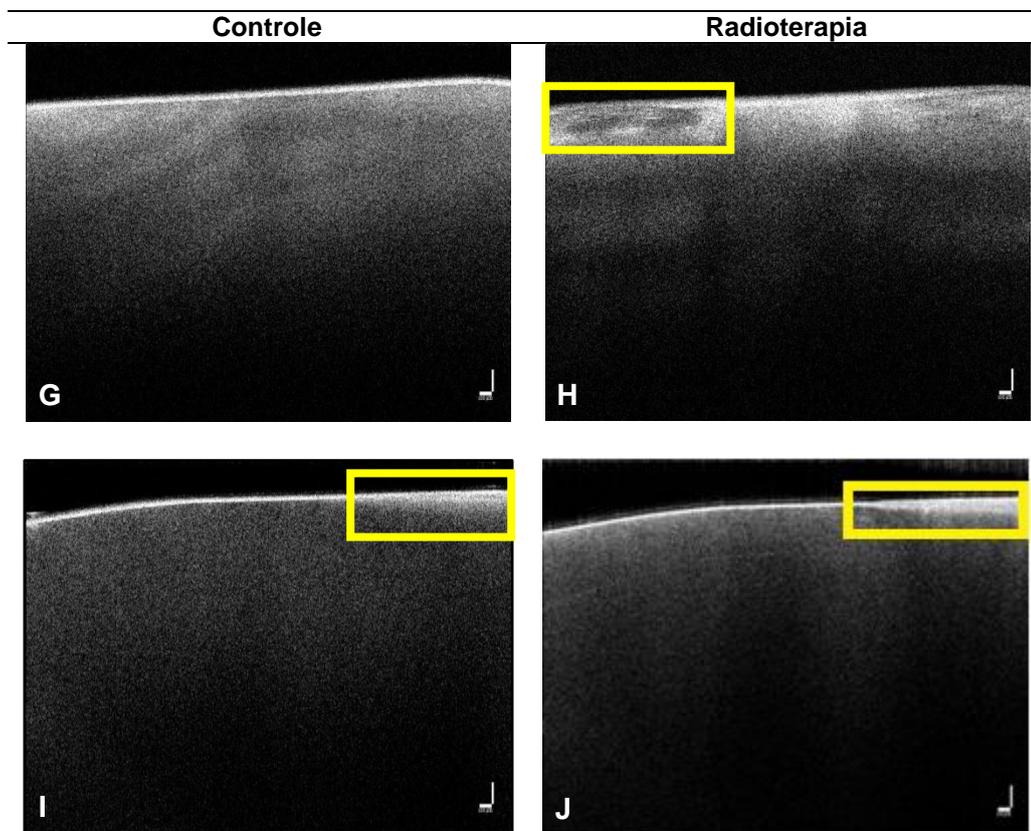
que se trata de imagens de *B-scan* obtidas na mesma posição de mesmas amostras em diferentes etapas experimentais. Houve uma variabilidade no padrão das imagens de *B-scan* depois que os blocos de dentina foram submetidos ao tratamento radioterápico.

Figura 24: Imagens de *B-scan* representativas da população de amostras de dentinas radiculares avaliadas neste estudo antes (controle) e após a radioterapia. Escala: 100 μm .



Fonte: Do próprio autor.

Figura 24 (cont.): Imagens de *B-scan* representativas da população de amostras de dentinas radiculares avaliadas neste estudo antes (controle) e após a radioterapia. Os traços em amarelo evidenciam mudanças ópticas significativas nas estruturas. Escala: 100 μm .



Fonte: Do próprio autor.

O *B-scan* de dentinas hígidas (Figuras 24A e B) apresenta um primeiro sinal de reflexão intensa na interface ar/tecido (linha branca intensa e bem definida), decorrente da interação da luz com a superfície polida da amostra, e, em seguida, observa-se o decaimento rápido do sinal em função da profundidade (tonalidade branca intensa na superfície perde gradualmente a intensidade conforme a profundidade na amostra aumenta) devido à diminuição do retroespalhamento da luz ao interagir com minerais e espaços presentes no tecido dentinário¹¹¹. Este padrão de imagem foi o de maior ocorrência nas amostras, mesmo após a radioterapia, e condiz com a literatura que atribui esse padrão à dentina sadia^{111,113}.

No entanto, houve uma quantidade expressiva de amostras que exibiram outros padrões de imagens após o tratamento radioterápico. Na Figura 24D, por exemplo, observam-se pequenas regiões no interior da dentina com sinal intenso que inexistiam na amostra hígida (Figura 24C). A literatura reporta que essas

regiões internas podem ser poros^{109,111,113,114} que podem ter sido formados após a radioterapia. Similarmente, na Figura 24F nota-se uma intensificação do sinal nos poros preexistentes (Figura 24E) após a radioterapia. Além disso, é possível perceber uma intensificação do sinal (regiões claras mais espessas) próxima à superfície das amostras (Figura 24H e J) após o tratamento radioterápico quando se compara aos correspondentes no grupo controle (Figuras 24F e G). Ainda, na Figura 24H, observa-se o surgimento de uma provável lesão no interior da dentina que não estava presente na amostra hígida (Figura 24G).

Tanto a presença de microporos quanto o surgimento de regiões mais claras nas imagens representadas nas Figuras 24D,F,H e J são compatíveis com processos de desmineralização dos tecidos dentais^{109,110,111,113}. Esses microporos, por sua vez, geram um maior número de interfaces que causam maior retroespalhamento e retrorrefletividade do sinal da OCT e, como consequência, traduzem-se em maior brilho nas imagens de *B-scan*^{113,115,116}.

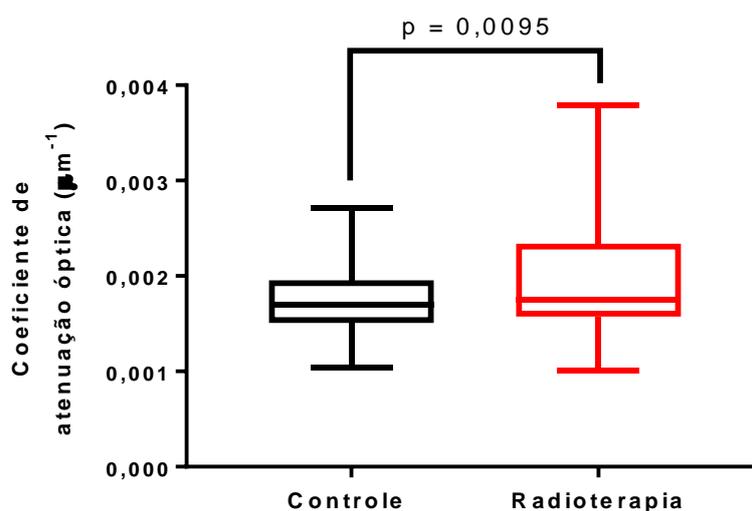
Na técnica de OCT, a avaliação da desmineralização é baseada em dois princípios: (i) por meio do aumento do retroespalhamento do sinal no tecido poroso desmineralizado ou (ii) por meio de alterações na despolarização do sinal incidente pelo tecido desmineralizado. O primeiro pode ser obtido tanto por sistemas de OCT convencionais ou sensíveis à polarização (PS-OCT); ao passo que o segundo é obtido exclusivamente por PS-OCT^{114,115,117}. Uma das maneiras de quantificar as alterações ocasionadas pelo processo de desmineralização nos padrões de imagem gerados pela OCT é por meio do coeficiente de atenuação óptica total ($\bar{\mu}_t$)^{87,111,112,113,114,118}. Não há um consenso na literatura quanto à relação de $\bar{\mu}_t$ com o grau de desmineralização dos tecidos dentais: para alguns autores, trata-se de grandezas diretamente proporcionais^{87,112,113}, ao passo que outros afirmam que são inversamente proporcionais^{111,118}.

A análise estatística dos valores de $\bar{\mu}_t$ (Figura 25) demonstrou que houve um aumento no valor de $\bar{\mu}_t$ estatisticamente significativo ($p = 0,0095$) após o tratamento radioterápico. Embora o uso do $\bar{\mu}_t$ para quantificar perdas de mineral esteja bem estabelecido, a literatura difere quanto à sua interpretação. Alguns autores relatam que a atenuação do sinal da OCT em tecido saudável é maior do que em tecidos desmineralizados, porque, nesses últimos, os cristais desorganizados de

hidroxiapatita e o grande volume de poros com diversos tamanhos prejudicam a propagação da luz. Nas 0

interfaces com os poros, a reflexão da luz ocorre devido a mudanças bruscas no índice de refração, bem como à redução efetiva na dispersão quando a luz viaja sem se desviar pelo espaço dentro dos poros. No entanto, outros estudos relatam que o aumento dos espaços inter cristalinos e a desorganização da estrutura prismática dos tecidos duros promovem maiores valores de $\bar{\mu}_t$.

Figura 25: Distribuição dos valores médios, com os respectivos desvios-padrão e medianas, dos coeficientes de atenuação óptica total ($\bar{\mu}_t$) dos blocos de dentina antes (controle) e após a radioterapia. Para comparação estatística, utilizou-se o teste de Wilcoxon para amostras dependentes, com $\alpha=0,05$.



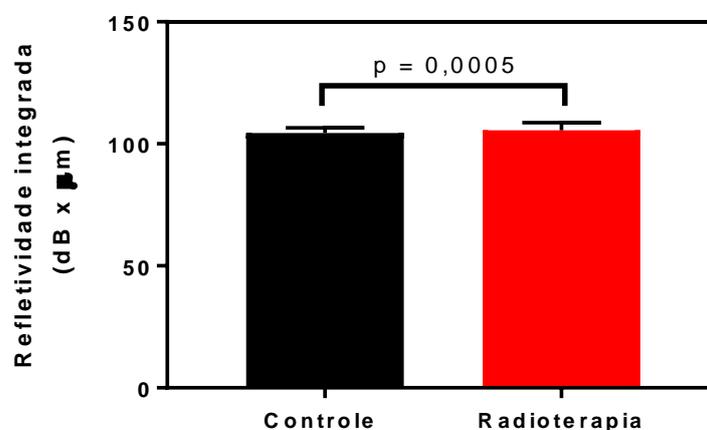
Fonte: Do próprio autor.

Outra forma de avaliar quantitativamente as mudanças ópticas nos tecidos duros dentais, principalmente às relacionadas à matriz inorgânica, é a refletividade integrada (ΔR)^{119,120,121}. O uso deste parâmetro é proposto para a mensuração da atividade de lesões de cárie por meio de PS-OCT e considera que a luz polarizada despolariza-se rapidamente quando retorna de um tecido desmineralizado⁸⁸. Um estudo anterior demonstrou a possibilidade de medir mudanças nas lesões de cárie radicular por meio do cálculo da refletividade integrada usando um sistema de OCT sem sensibilidade de polarização, equipamento parecido com o empregado no

presente estudo¹²². A ΔR no eixo perpendicular, por sua vez, foi positivamente relacionada com a perda mineral medida por microrradiografia transversal¹²¹. Em estudo anterior efetuado pelo nosso grupo, também se comprovou que a ΔR foi a forma mais eficiente de mensurar a perda mineral óssea, em uma relação diretamente proporcional⁸⁵.

No presente estudo, a análise da ΔR também evidenciou um aumento estatisticamente significativo ($p = 0,0005$) nas amostras após tratamento radioterápico, como ilustrado na Figura 26, o que reforça a hipótese de que houve uma perda de mineral nas amostras de dentina após a radioterapia. Vale a pena ressaltar que, neste estudo, não houve troca da solução de saliva artificial durante a radioterapia, o que pode ter favorecido o processo de troca iônica entre amostra e saliva até um determinado limiar de saturação. Por outro lado, se tivesse havido substituição diária da saliva artificial, como ocorre em alguns estudos da literatura^{31,93,95,123,124}, essa troca iônica poderia ter sido ainda mais favorecida e a perda mineral, portanto, mais intensa. Embora este estudo tenha buscado simular *in vitro* um protocolo de tratamento de radioterapia, devem ser consideradas as limitações de um estudo *in vitro* em relação a um clínico, nos quais a composição da saliva, assim como o seu fluxo ou até mesmo a sua ausência, variam de um indivíduo para outro. Certamente, com outros delineamentos experimentais, poderíamos ter obtido respostas divergentes.

Figura 26: Valores médios, com os respectivos desvios-padrão, de refletividade integrada (ΔR) dos blocos de dentina antes (controle) e após a radioterapia. Para comparação estatística, utilizou-se o teste t de Student para amostras dependentes, com $\alpha = 0,05$.



Fonte: Do próprio autor.

É importante mencionar que o aumento nos valores médios do $\bar{\mu}_t$ e de ΔR refletividade integrada (Figura 25 e Figura 26, respectivamente), bem como as alterações nos padrões de imagem observados nas amostras de dentina após a radioterapia (Figuras 24D, F, H e J) podem ser ferramentas úteis para o acompanhamento clínico deste tecido por OCT com a finalidade de monitorar as alterações promovidas pela radioterapia. Se, de fato, estas alterações estiverem associadas à etiologia da cárie de radiação, é plausível que a OCT, em pacientes oncológicos irradiados na região da cabeça e pescoço, venha a ser uma técnica útil para o diagnóstico precoce de lesões incipientes deste tipo de cárie de modo a preservar a dentição, haja vista que se trata de uma patologia com progressão rápida e agressiva^{2,5,7}. Além disso, estudos anteriores apontaram que as lesões incipientes de cárie de radiação dificilmente são detectadas por métodos de radiologia convencionais devido à imposição de estruturas, o que não ocorreu com a OCT^{114,125}. Um estudo anterior que empregou a OCT para o diagnóstico de cárie de radiação evidenciou a possibilidade de caracterizar as lesões já estabelecidas com esta técnica¹⁰⁹; entretanto, o presente estudo é o único que comprova a possibilidade de monitoramento de alterações microestruturais anteriores ao estabelecimento da lesão de cárie de radiação.

Conforme já discutido, a literatura reporta resultados controversos a respeito dos efeitos da radioterapia sobre tecidos dentais. Neste estudo, tanto as imagens

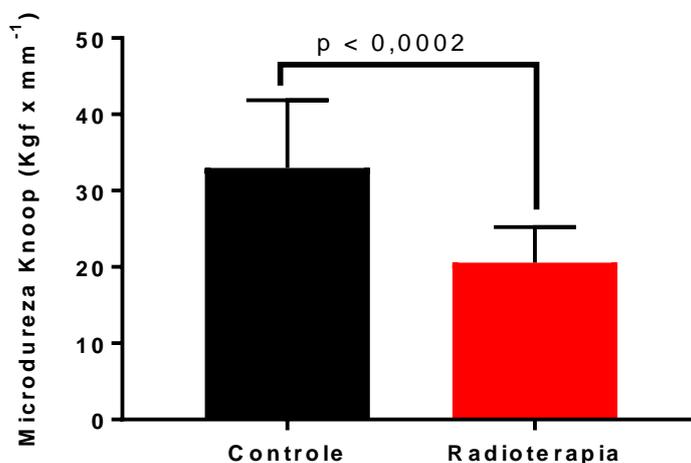
obtidas pela OCT quanto o aumento nos valores médios do $\bar{\mu}_t$ e da ΔR das amostras de dentina radicular após a radioterapia sugerem que estas apresentam características compatíveis com as que são resultantes do processo de desmineralização. Deste modo, estes resultados de OCT reforçam os achados de ATR-FTIR e de FT-Raman que indicaram alterações na matriz inorgânica das mesmas amostras de dentina radicular após tratamento radioterápico.

5.2.4. Avaliação de propriedade mecânica por microdureza superficial Knoop

A microdureza é uma das propriedades avaliadas em diversos estudos sobre os efeitos da radiação ionizante, em doses terapêuticas para neoplasias de cabeça e pescoço, nos tecidos dentais. Em geral, os resultados são bastante controversos, pois inexistente uma padronização quanto à metodologia utilizada para avaliar esta propriedade. Fatores como o tipo de dente avaliado (bovino, permanente humano ou decíduo humano), a preparação das amostras e os parâmetros escolhidos para o teste (célula de carga, tempo de aplicação da carga e escala adotada, por exemplo) influenciam o resultado final^{90,93,95,97,123,126}. É amplamente estabelecida, contudo, a relação direta entre os achados de perda de microdureza Knoop superficial ou seccional com a perda de mineral de esmalte e dentina. Inclusive, esta técnica é considerada padrão-ouro nos estudos de Cariologia^{127,128}

Os resultados do ensaio de microdureza Knoop superficial são apresentados na Figura 27. Observa-se que o valor médio desta propriedade sofreu redução de $32,99 \pm 8,859 \text{ Kgf/mm}^2$ para $20,56 \pm 4,673 \text{ Kgf/mm}^2$ após a radioterapia e é estatisticamente significativa ($p = 0,0002$).

Figura 27: Valores médios, com os respectivos valores de desvio-padrão, da microdureza superficial Knoop das amostras de dentina radicular bovina antes (controle) e após a radioterapia. Para comparação estatística, utilizou-se o teste t de Student para amostras independentes, com $\alpha = 0,05$



Fonte: Do próprio autor.

Sabe-se que a as propriedades mecânicas da dentina, nas quais se inclui a microdureza, estão fortemente relacionadas à sua estrutura interna e composição¹²⁹. Inclusive, a microdureza tem sido amplamente empregada para avaliar o seu grau de mineralização^{94,130}, uma vez que há uma relação linear entre esta propriedade e a quantidade de minerais presentes na dentina⁹⁴. Além da estrutura interna e da composição, a microdureza é afetada pelas condições ambientais nas quais o substrato está inserido e pode ser reduzida em até 30% em meios úmidos¹²⁹.

Em relação a sua estrutura interna, é reportado que a microdureza varia de acordo com a região na dentina¹²⁹. Regiões mais mineralizadas, como as paredes dos túbulos e a dentina peritubular, apresentam valores maiores de microdureza do que regiões menos mineralizadas, como a dentina intertubular¹²⁹. Também foi demonstrado que a microdureza varia com a profundidade e apresenta valores distintos para a dentina superficial, média e profunda, as quais possuem diferentes densidades de túbulos^{31,123}. Outro fator de ordem estrutural que afeta a microdureza é a orientação dos túbulos presentes na dentina¹⁰⁸. Por estas razões, neste estudo, padronizou-se a região central da superfície dos blocos (superfície cervical da dentina radicular) como região de interesse para avaliação da microdureza.

De modo geral, a maioria dos artigos reporta que a microdureza da dentina diminui após a radioterapia^{93,94,95,97,108,123,126}. Outros estudos ainda sugerem que a diminuição na microdureza ocorre progressivamente com o aumento da dose de radiação ionizante^{95,123}. As explicações que são atribuídas a este comportamento estão relacionadas a alterações no colágeno e à reestruturação dos cristais que formam a matriz mineral promovidas pela radioterapia¹²⁶.

Como mencionado anteriormente, a dentina está sujeita à ação dos radicais livres e peróxidos originados pela radiólise por ser um tecido rico em água. Por serem espécies reativas, tais substâncias podem provocar a reorganização ou desnaturação dos componentes que formam o colágeno e, como consequência, interferem na estabilidade interna da dentina. Esta, por sua vez, torna-se mais dúctil, friável e vulnerável à formação de trincas, o que compromete sua capacidade de fornecer suporte ao esmalte^{95,123,126,131}. A respeito da reestruturação dos cristais que compõem a matriz mineral de hidroxiapatita carbonatada, Rodrigues *et al.* propuseram que a radiação ionizante é capaz de alterar as ligações químicas de modo a promover a reorganização dessa estrutura e, assim, favorecer a formação de íons fosfato⁹⁰.

Apesar da microdureza estar positivamente relacionada ao conteúdo mineral da dentina, essa propriedade parece ter sido influenciada tanto pelas alterações na matriz orgânica quanto na matriz inorgânica da dentina, conforme resultados observados de ATR-FTIR e FT-Raman. Isso fica evidente quando se observam as alterações nas bandas de carbonato detectadas no ATR-FTIR e nas bandas de fosfato (ν_1 , ν_2 e ν_4) detectadas no FT-Raman, todas relacionadas ao conteúdo mineral. Ainda em relação à matriz inorgânica, observa-se que o índice de cristalinidade (Figura 23) das amostras de dentina radicular aumentou após a radioterapia e, como consequência, deveria ter refletido em um acréscimo na microdureza das amostras tratadas¹⁰⁵. O fato da microdureza das amostras tratadas radioterapeuticamente não ter exibido aumento, apesar de sua cristalinidade mais elevada, pode ser explicado de três formas, sob o ponto de vista da matriz mineral: (i) o novo ordenamento da hidroxiapatita pode ter induzido deformações residuais locais que podem ter afetado as propriedades mecânicas¹⁰⁴; (ii) o rearranjo da estrutura da hidroxiapatita pode ter ocorrido em curto alcance¹⁰⁶, isto é, pode ter abrangido somente algumas regiões das amostras, em vez de sua totalidade e (iii)

os efeitos do maior ordenamento cristalino da estrutura podem ter sido anulados por outros efeitos concorrentes, tais como da desorganização do colágeno.

É importante ressaltar que os resultados provenientes das técnicas de ATR-FTIR e FT-Raman revelaram alterações nas bandas de amida I, amida III, fosfato (modos de vibração ν_1 , ν_2 e ν_4) e carbonato das amostras de dentina após a radioterapia. Desta forma, as explicações (i) e (ii) podem ser viáveis se for considerado que as alterações nas bandas relacionadas à matriz inorgânica são devidas ao rearranjo de suas estruturas cristalinas por efeito dos radicais livres originados pela radioterapia. A explicação (iii), por sua vez, é plausível se forem consideradas as mudanças nas bandas de amida I e III atribuídas à matriz orgânica. Como mencionado anteriormente, o aumento na banda de amida I pode ser um indício da reorganização de um novo colágeno com qualidade inferior ao original⁹². A banda de amida III, por sua vez, está associada às cadeias laterais do colágeno que são responsáveis pela interação da matriz orgânica com a inorgânica^{90,92,94,132}. Como essas bandas foram alteradas após a radioterapia, é possível inferir que a interação entre o colágeno e a hidroxiapatita pode ter sido comprometida.

Com base em todas essas informações, é plausível que as alterações composicionais promovidas pela radioterapia tenham desestabilizado tanto a estrutura interna da dentina quanto a estrutura original da hidroxiapatita. Como consequência, tal instabilidade acarretou alterações microestruturais que foram detectadas por OCT e, possivelmente, seus efeitos sobressaíram-se perante aqueles que eram esperados pelo aumento da cristalinidade (que seria o acréscimo na microdureza). Assim, a redução na microdureza superficial Knoop das amostras de dentina radicular após a radioterapia verificada neste estudo está relacionada às alterações composicionais promovidas pela radiação ionizante, conforme evidenciado pelos resultados de ATR-FTIR e de FT-Raman.

5.2.5. Análise morfológica por MEV

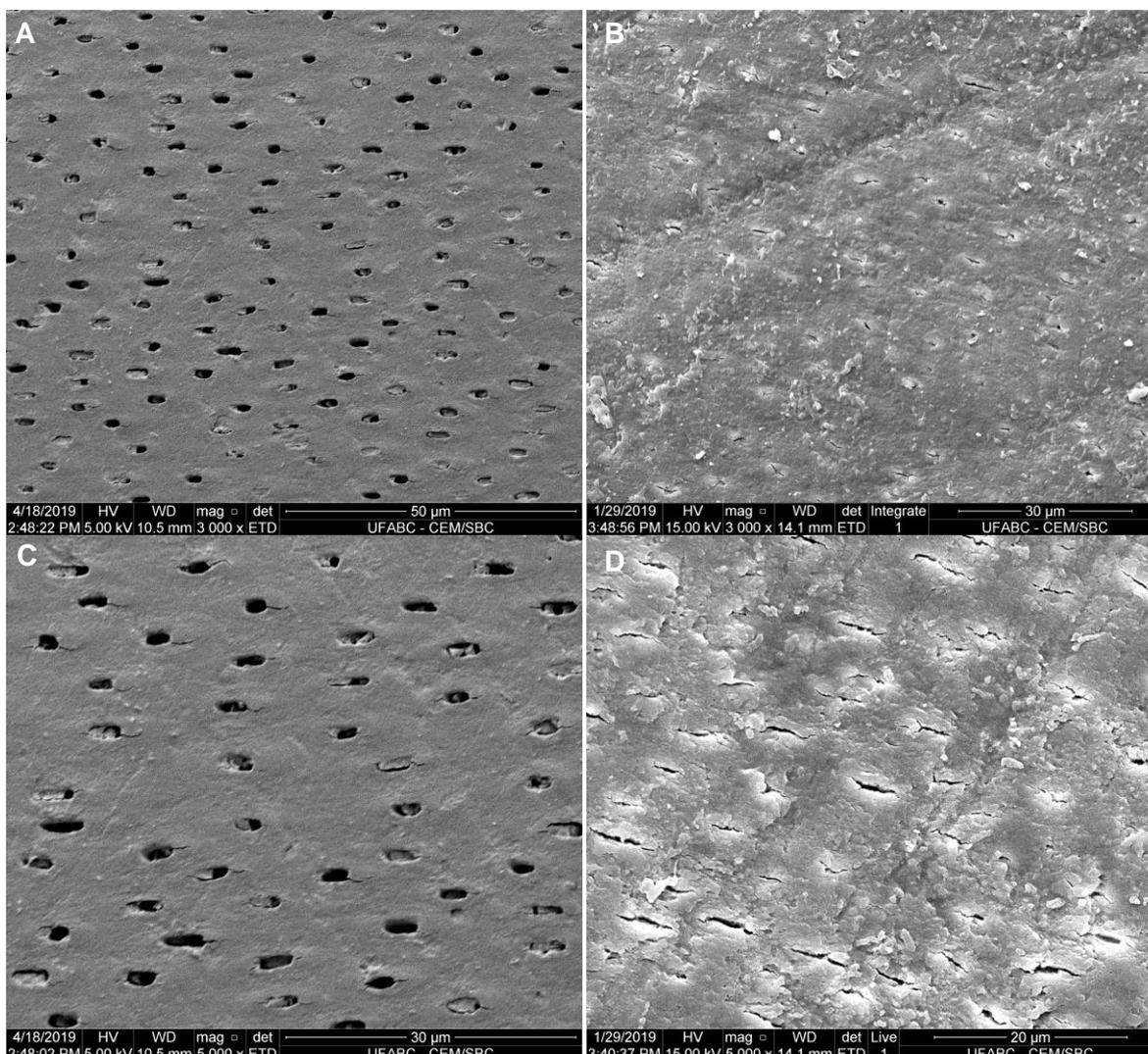
A microscopia eletrônica de varredura (MEV) é uma das técnicas que têm sido empregadas na investigação dos efeitos da radioterapia, em doses terapêuticas para neoplasias de cabeça e pescoço, sobre os tecidos duros dentais^{90,94,95}. A Figura 28 apresenta eletromicrografias representativas dos blocos de dentina

radicular antes e após o tratamento radioterápico, sob diferentes magnificações. É possível perceber que a dentina hígida (Figuras 28A e C) apresenta morfologia com túbulos parcialmente expostos, além da camada de *smear* que é oriunda do preparo da amostra por lixamento e polimento⁹⁸. Inclusive, podem-se notar marcas superficiais provenientes destes processos. Apesar da amostra ter sido desidratada para imageamento, não se observa a existência de trincas em sua superfície. Ainda, nota-se que a dentina intertubular e peritubular são bem distinguíveis e que os túbulos exibem uniformidade quanto a seu tamanho e distribuição. Todos esses aspectos são compatíveis com a morfologia de uma dentina hígida^{94,124}.

Similarmente, nas Figuras 28B e D, por sua vez, nota-se que a dentina também exibe uma camada de *smear*, obliteração parcial dos túbulos dentinários e a ausência de trincas superficiais após o tratamento radioterápico. Entretanto, percebe-se que há uma maior quantidade de túbulos obliterados na dentina após a radioterapia do que em comparação com a dentina hígida. Além disso, as estruturas da dentina peritubular e intertubular não são tão distinguíveis como antes da radioterapia (Figuras 28A e C).

A literatura reporta que a dentina sofre desidratação e alterações composicionais devido à ação da radiação ionizante com as moléculas de água presentes no tecido. Desta forma, a morfologia evidenciada por microscopia eletrônica de varredura apresentaria a formação de trincas e a obliteração de túbulos dentinários. Outros estudos ainda demonstram que a radioterapia seria capaz de desorganizar a estrutura da dentina de modo a dificultar a distinção entre dentina peritubular e intertubular^{90,94,123,132}. Tais alterações morfológicas seriam favorecidas pela formação de apatita amorfa ou pela reorganização da estrutura do colágeno na dentina^{9,90,95,97,123,132}.

Figura 28: Eletromicrografias representativas dos blocos de dentina radicular antes (A e C) e após a radioterapia (B e D). Magnificação original: 5000x e 3000x.



Fonte: Do próprio autor.

Neste estudo, todavia, as eletromicrografias apresentadas na Figura 28 não permitem concluir que a obliteração dos túbulos dentinários após a radioterapia (Figuras 28B e D) é decorrente de efeitos causados pela radiação gama diretamente sobre o tecido ou se a radioterapia possa ter promovido a deposição de íons provenientes da saliva artificial. Contudo, os achados morfológicos observados aqui são compatíveis com a literatura.

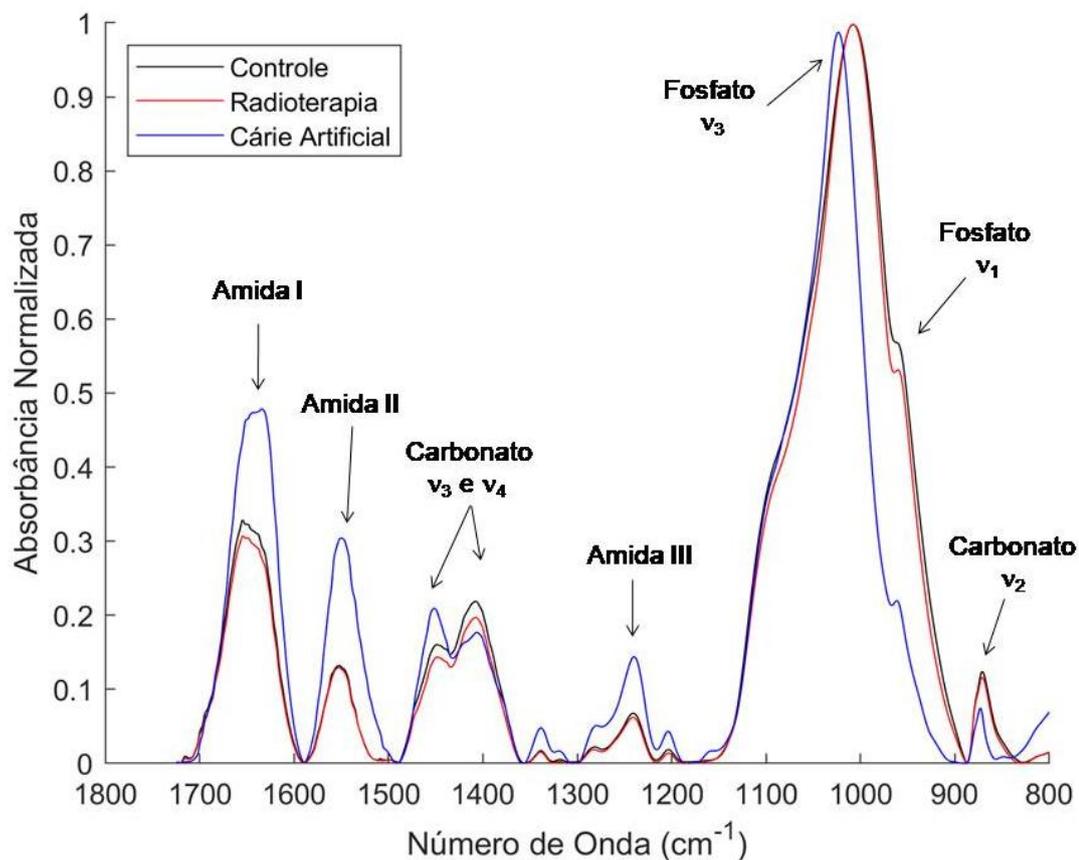
5.3. Fase III – Avaliação da associação de diferentes tratamentos de remineralização *in vitro* sobre a progressão da cárie em dentina radicular

5.3.1. Indução das lesões artificiais de cárie

5.3.1.1. Análise composicional por ATR-FTIR

A Figura 29 apresenta os espectros médios na região entre 1800 e 800 cm^{-1} após normalização pela banda de fosfato ν_3 e traçado da linha de base para as amostras de dentina radicular sadias (controle), após radioterapia e após desmineralização (cárie artificial). Observa-se a preservação das principais bandas de absorção nas amostras de dentina analisadas mesmo após a desmineralização (cárie artificial). Ainda, nota-se que não há a formação ou extinção de bandas. Em relação à matriz orgânica, verifica-se que a desmineralização promoveu maior intensidade nas bandas das amidas I, II e III em comparação com os demais grupos. Ao que se refere à matriz inorgânica, por sua vez, é perceptível que a desmineralização promoveu um aumento na intensidade do carbonato nos modos de vibração ν_3 e ν_4 , mas causou uma redução nas intensidades do fosfato e do carbonato nos modos de vibração ν_1 e ν_2 (embora tenha havido uma diminuição em 1400 cm^{-1}), respectivamente. Além disso, nota-se que o fosfato, no modo de vibração ν_3 , deslocou-se de 1005 cm^{-1} para 1024 cm^{-1} e sofreu estreitamento.

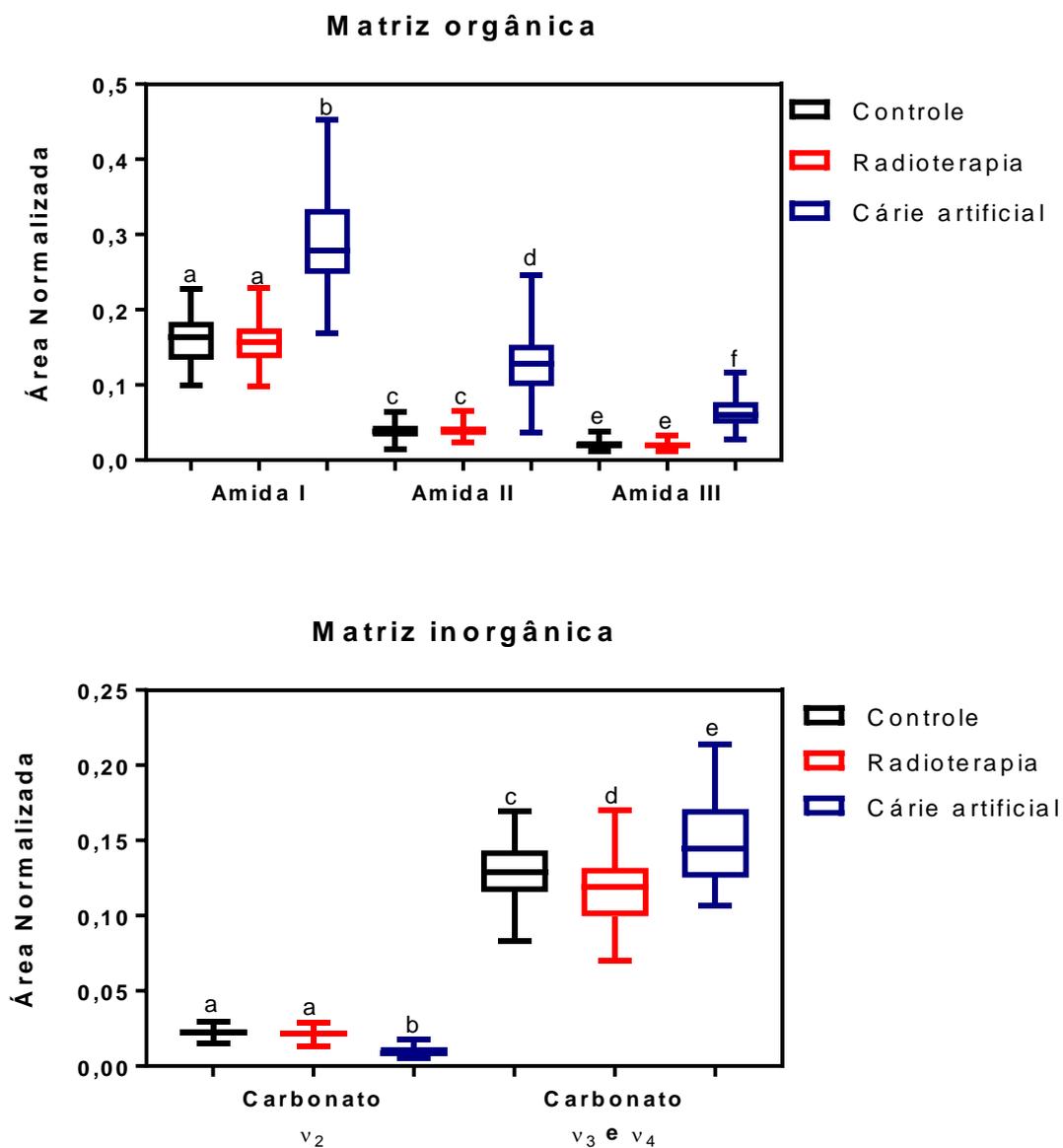
Figura 29: Média dos espectros de absorção no infravermelho, na região entre 1800 e 800 cm^{-1} , após normalização pela intensidade da banda ν_3 fosfato e traçado da linha de base, das amostras de dentina em três condições: controle, após a radioterapia e depois da desmineralização (cárie artificial).



Fonte: Do próprio autor.

A análise estatística da comparação semiquantitativa das bandas de absorção, proporcionalmente em relação à banda de fosfato ν_3 , dos três grupos (controle, radioterapia e cárie artificial) está ilustrada na Figura 30 e os valores de p, por sua vez, estão discriminados na Tabela 1.

Figura 30: Distribuição dos valores médios, com os respectivos desvios-padrão e medianas, das proporções das áreas normalizadas pela banda de fosfato ν_3 das bandas de amida (I, II e III) e de carbonato (nos modos de vibração ν_2 , ν_3 e ν_4) das amostras de dentina radicular sadias (controle), após radioterapia e após desmineralização (cárie artificial). Letras distintas, acima de cada barra, indicam que há diferenças estatísticas entre os grupos segundo o teste de Friedman com pós-teste de Dunn para amostras dependentes, com $\alpha=0,05$.



Fonte: Do próprio autor.

Tabela 1: Valores de p resultantes da comparação intergrupos (controle, radioterapia e cárie artificial) por meio do teste de Friedman com pós-teste de Dunn para amostras dependentes para as proporções das principais bandas de absorção da dentina em relação à banda de fosfato ν_3 . Valores de p inferiores a 0,05 (em vermelho) são estatisticamente significantes.

	Valores de p				
	Amida I	Amida II	Amida III	Carbonato ν_2	Carbonato ν_3 e ν_4
Controle vs. Radioterapia	0,6668	>0,9999	>0,9999	0,7684	0,004
Controle vs. Cárie artificial	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Radioterapia vs. Cárie artificial	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001

Fonte: Do próprio autor.

A partir da Figura 30 e da Tabela 1, é possível verificar que, após a indução de cárie artificial, houve um aumento significativo nas proporções de todas as bandas relacionadas à matriz orgânica da dentina (isto é, a amida I, a amida II e a amida III), bem como da banda de carbonato ν_3 e ν_4 em relação ao fosfato, quando comparadas aos seus correspondentes no grupo controle e radioterapia. Em contrapartida, nota-se uma redução na proporção da banda de carbonato ν_2 nas condições supracitadas.

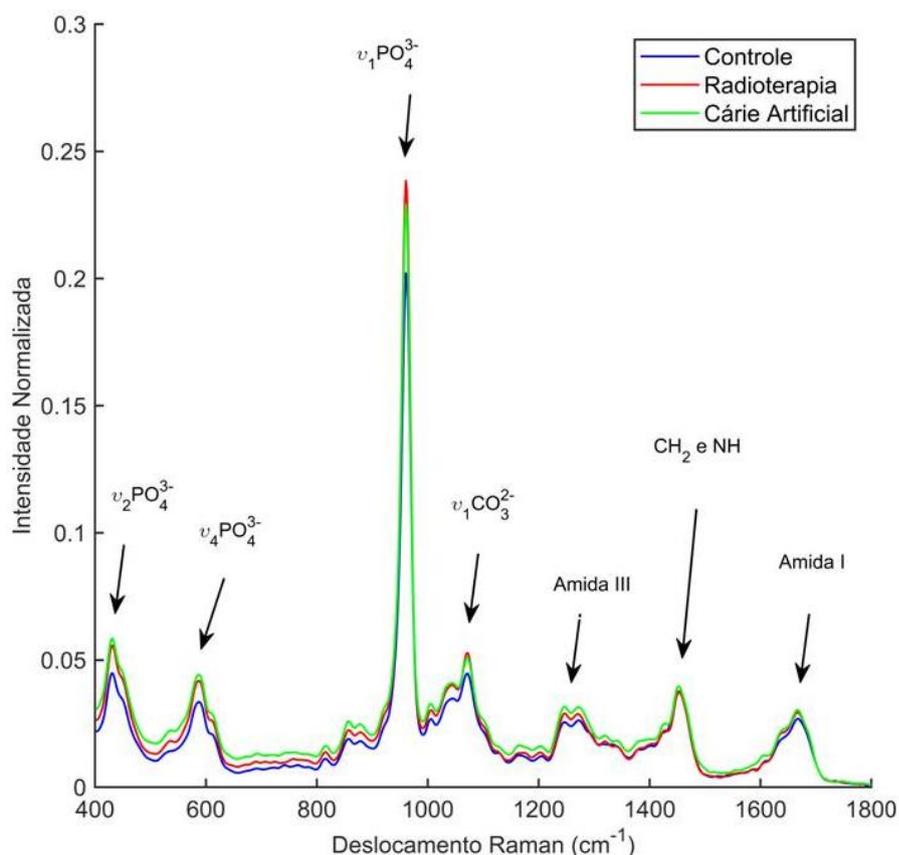
É importante enfatizar que o aumento na intensidade das bandas das amidas após a indução de cárie artificial é decorrente de maior exposição do colágeno ocasionada pela perda de minerais que compõem a dentina^{133,134}. O aumento na intensidade das bandas do carbonato ν_3 e ν_4 após a cárie artificial, por sua vez, pode ser explicado pela interferência dos modos de vibração da amida II²⁸.

Salienta-se também que a redução na banda de carbonato ν_2 juntamente com o fato das bandas correspondentes à matriz inorgânica não terem desaparecido, bem como o estreitamento da banda de fosfato ν_3 e seu deslocamento para um número de onda maior sugerem que a desmineralização ocorreu parcialmente¹³⁵, porém foi suficiente para causar algum nível de desorganização na estrutura da fase mineral da dentina. Logo, é possível concluir que o protocolo de desmineralização artificial adotado foi eficiente em simular lesões incipientes de cárie e, assim, corrobora a literatura^{79,80}.

5.3.1.2. Análise composicional por FT-Raman

A Figura 31 exibe a média dos espectros Raman entre 400 e 1800 cm^{-1} das amostras de dentina após a indução da cárie artificial com a identificação das principais bandas neste tecido. Observa-se que há a preservação das bandas da dentina após a indução de cárie artificial, bem como das posições em que estas ocorrem em comparação aos grupos sadio (controle) e radioterapia. Além disso, não se notam o alargamento ou o estreitamento dos picos, bem como o surgimento de novas bandas. Tais resultados estão em concordância com aqueles obtidos por ATR-FTIR (Figura 29) e com a literatura^{31,84,92}.

Figura 31: Espectro Raman médio das amostras de dentina radicular bovina em três condições: sadias (controle), após a radioterapia e após a indução de cárie artificial com a identificação das principais bandas deste tecido.

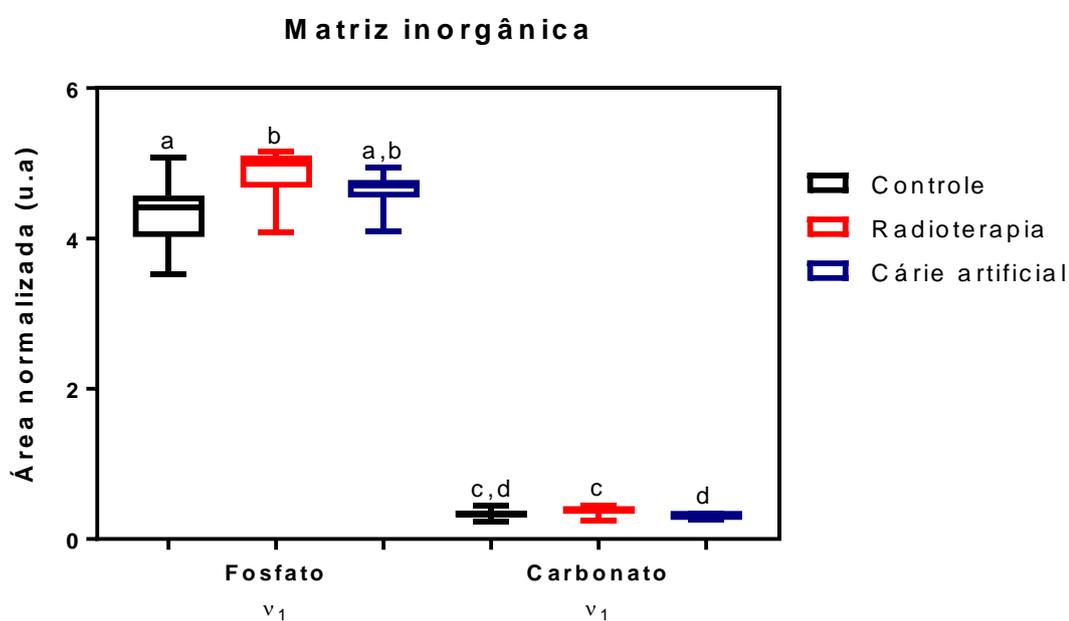


Fonte: Do próprio autor.

Os resultados da análise semiquantitativa das principais bandas da dentina são exibidos nas Figuras 32 e 33 para os constituintes das matrizes inorgânica e

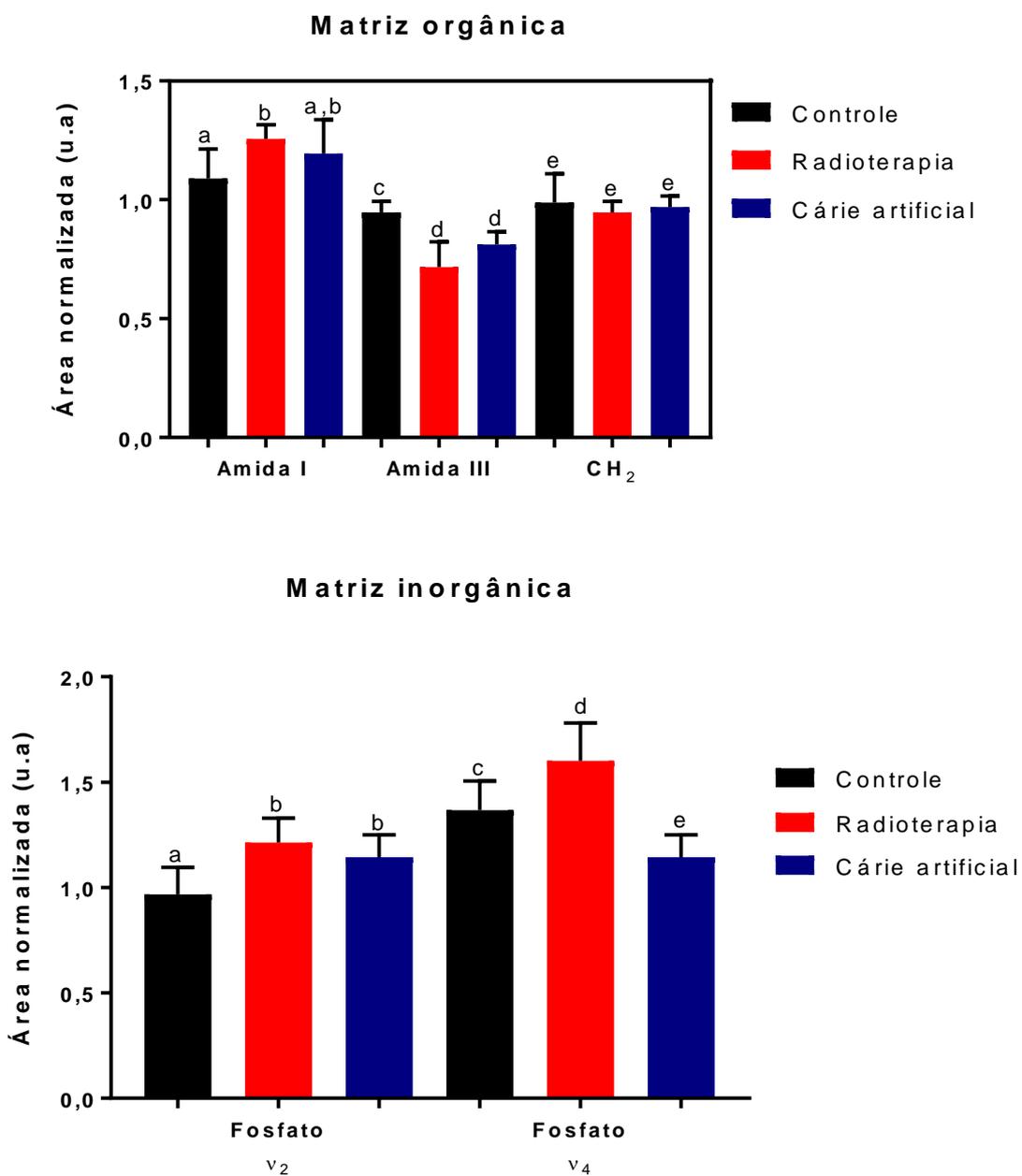
orgânica. Os valores de p resultantes da comparação estatística são apresentados na Tabela 2. Após a desmineralização (cárie artificial), detectaram-se alterações significativas nos conteúdos das bandas de fosfato ν_4 e carbonato ν_1 quando comparados aos conteúdos após a radioterapia.

Figura 32: Distribuição dos valores médios, com os respectivos desvios-padrão e medianas, das áreas normalizadas das bandas de fosfato ν_1 e carbonato ν_1 das amostras de dentina radicular dos grupos controle, radioterapia e cárie artificial. Letras iguais, acima de cada barra, denotam a inexistência de diferenças estatisticamente significativas de acordo com o teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn para amostras independentes, com $\alpha = 0,05$.



Fonte: Do próprio autor.

Figura 33: Valores médios, com os respectivos desvios-padrão, das áreas normalizadas das bandas de amida I, amida III, CH₂ e fosfato (nos modos de vibração ν_2 e ν_4) das amostras de dentina radicular dos grupos controle, radioterapia e cárie artificial. Letras distintas, acima de cada barra, denotam a existência de diferenças estatisticamente significantes de acordo com o teste de ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey para amostras independentes, com $\alpha = 0,05$.



Fonte: Do próprio autor.

Tabela 2: Valores de p resultantes da comparação intergrupos (controle, radioterapia e cárie artificial) por meio do teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn (para as bandas de fosfato ν_1 e carbonato ν_1) ou de ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey (para as bandas de amida I, amida III, fosfato ν_2 e fosfato ν_4). Ambos os testes consideraram amostras independentes. Valores de p inferiores a 0,05 (em vermelho) são estatisticamente significantes.

	Valores de p						
	Amida I	Amida III	CH ₂	Fosfato ν_1	Fosfato ν_2	Fosfato ν_4	Carbonato ν_1
Controle vs. Radioterapia	0,0084	0,0211	0,4867	0,0049	0,0002	0,0032	0,0925
Controle vs. Cárie artificial	0,1202	0,0005	0,8482	0,4647	0,0063	0,0052	>0,9999
Radioterapia vs. Cárie artificial	0,4610	0,3237	0,8150	0,2524	0,3853	<0,0001	0,0248

Fonte: Do próprio autor.

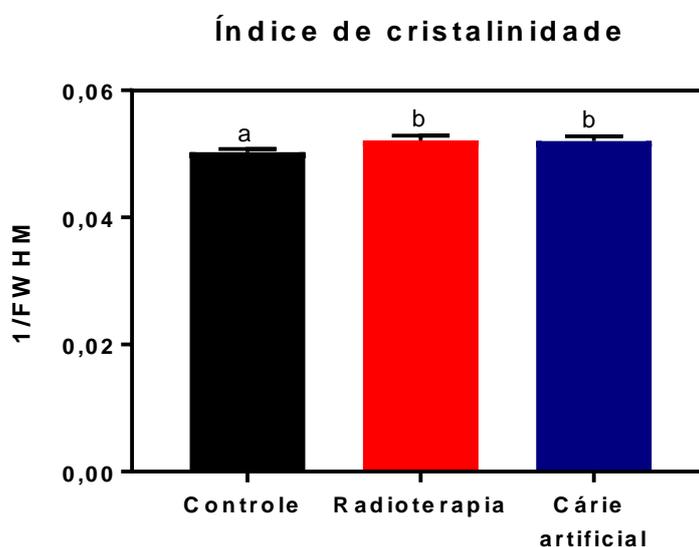
Tais resultados divergem parcialmente daqueles que foram obtidos por ATR-FTIR (Figura 30 e Tabela 1). Esta divergência é decorrente da profundidade de análise de cada técnica. Enquanto a primeira consegue medir apenas a superfície da amostra em contato com o cristal de ATR (com limitação de até 5 μm para o caso da dentina)^{63,81}, a segunda, por fazer uso de um *laser* de Nd:YAG com comprimento de onda de 1064 nm, consegue medir em maiores profundidades da amostra⁹². Uma vez que, neste estudo, foi utilizado propositalmente um protocolo de desmineralização artificial para simular a indução de lesões incipientes de cárie (isto é, lesões com perda mineral subsuperficial com preservação da integridade da superfície, de profundidade aproximada de 70 μm)^{79,80}, as mudanças composicionais causadas por este protocolo foram inferiores à penetração do *laser* do FT-Raman; desta forma, não foi possível detectar todos os efeitos da desmineralização por esta técnica devido ao efeito de *bulk*.

Similarmente, a radiação gama oriunda de uma fonte de Co-60 que foi empregada no tratamento radioterápico neste estudo é capaz de penetrar de modo mais profundo em tecidos biológicos (entre 2 e 5 mm)^{13,14,54}. Como consequência, a radioterapia foi capaz de provocar alterações nos componentes presentes nas amostras de dentina radicular como um todo e, por isso, foram eficientemente detectados por FT-Raman.

Os valores médios de cristalinidade e seus respectivos desvios-padrão para cada um dos grupos (controle, radioterapia e cárie artificial) são apresentados na

Figura 34. Os valores de p resultantes da comparação estatística intergrupos são descritos na Tabela 3. Nota-se que o índice de cristalinidade exibiu alterações significativas quando se comparam as amostras dos grupos controle e radioterapia, mas não se observa o mesmo na comparação entre os grupos radioterapia e cárie artificial. Esses resultados, por sua vez, reforçam o argumento de que as alterações provocadas pela desmineralização por cárie artificial ocorreram superficialmente.

Figura 34: Médias dos índices de cristalinidade, com seus respectivos desvio-padrão, dos grupos controle, radioterapia e cárie artificial calculadas por meio do método FWHM para a banda de fosfato ν_1 em 960 cm^{-1} . Para comparação estatística, utilizou-se o teste t de ANOVA com pós-teste de Tukey para amostras independentes, com $\alpha = 0,05$.



Fonte: Do próprio autor.

Tabela 3: Valores de p resultantes da comparação intergrupos (controle, radioterapia e cárie artificial) por meio do teste de ANOVA com pós-teste de Tukey para o índice de cristalinidade. Valores de p inferiores a 0,05 (em vermelho) são estatisticamente significantes.

	Valores de p Índice de cristalinidade
Controle – Radioterapia	< 0,0001
Controle – Cárie artificial	< 0,0001
Radioterapia – Cárie artificial	0,9359

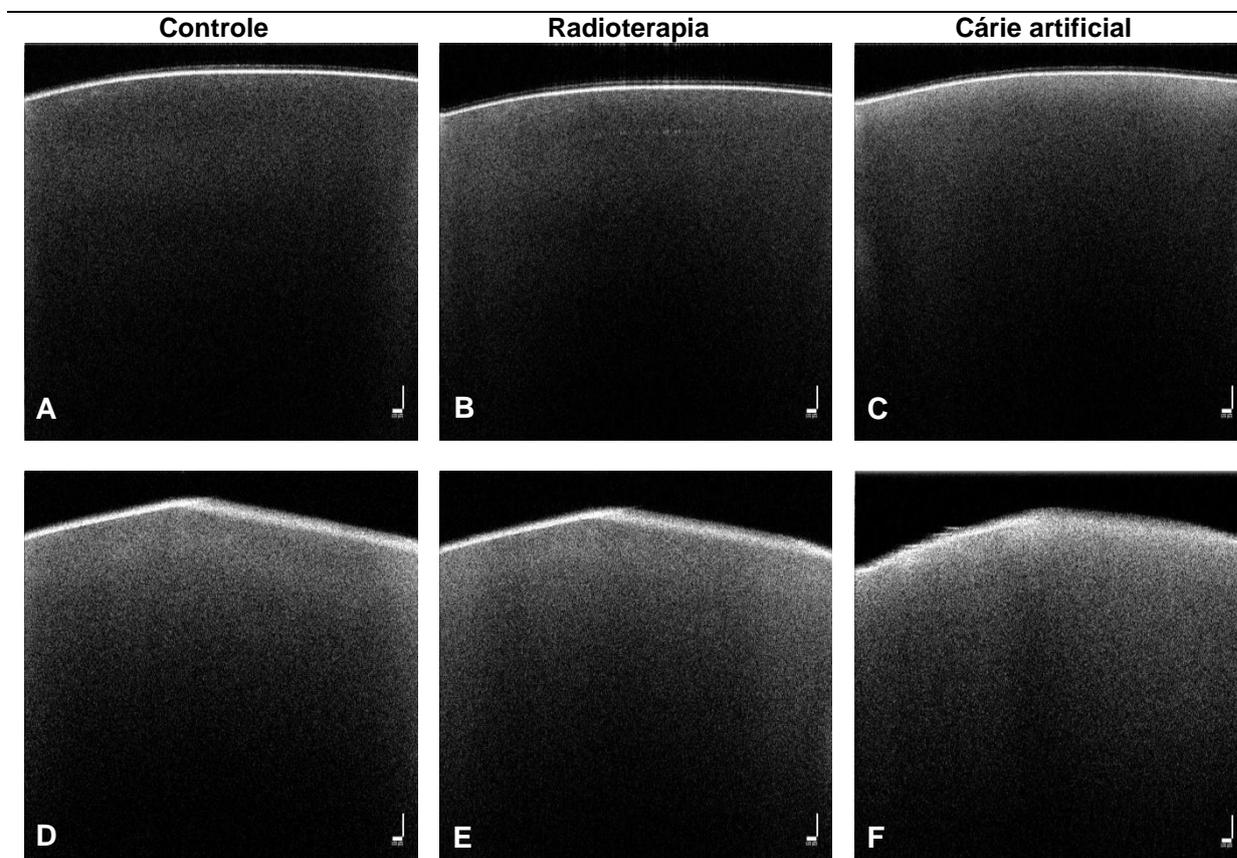
Fonte: Do próprio autor.

Assim, é possível inferir que a técnica de FT-Raman, em comparação a de ATR-FTIR, não apresentou sensibilidade suficiente para detectar as mudanças composicionais ocasionadas pelo modelo de cárie artificial adotado neste estudo que, por sua vez, visava à simulação proposital de lesões cariosas não cavitadas em estágio inicial de desenvolvimento. Não obstante, essa mesma técnica demonstrou que as alterações promovidas pela radioterapia permaneceram nas amostras de dentina radicular analisadas, apesar destas terem sido submetidas posteriormente a outro procedimento.

5.3.1.3. Avaliação de propriedade óptica por OCT

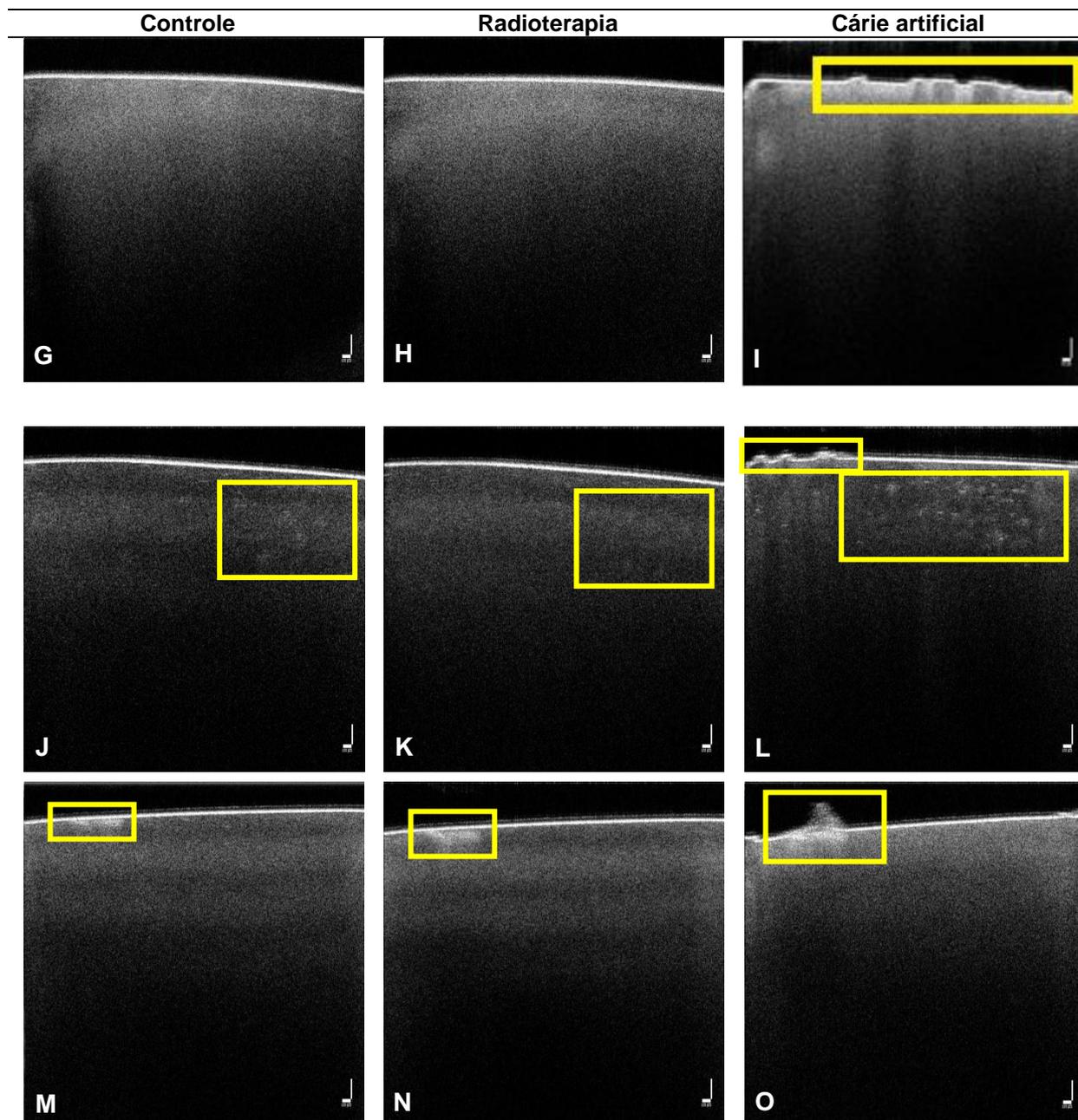
A Figura 35 exibe imagens representativas de *B-scan* dos mesmos blocos de dentina radicular em diferentes contextos: controle (dentinas híginas), após a radioterapia e depois da cárie artificial.

Figura 35: Imagens de *B-scan* representativas de uma mesma região de uma mesma amostra de dentina radicular avaliada neste estudo antes (controle), após a radioterapia e depois da cárie artificial. As linhas em amarelo evidenciam mudanças estruturais significativas. Escala: 100 μm .



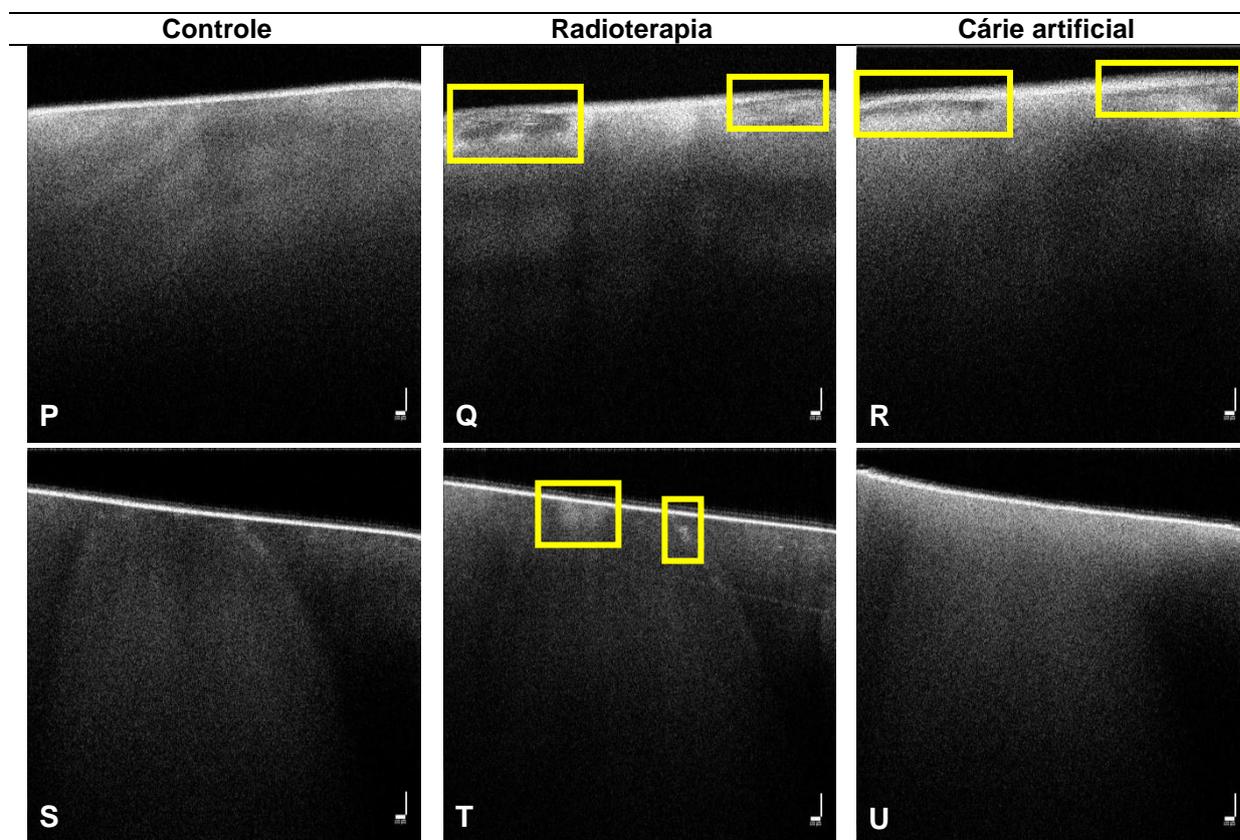
Fonte: Do próprio autor.

Figura 35 (cont.): Imagens de *B-scan* representativas de uma mesma região de uma mesma amostra de dentina radicular avaliada neste estudo antes (controle), após a radioterapia e depois da cárie artificial. As linhas em amarelo evidenciam mudanças estruturais significativas. Escala: 100 μm .



Fonte: Do próprio autor.

Figura 35 (cont.): Imagens de *B-scan* representativas de uma mesma região de uma mesma amostra de dentina radicular avaliada neste estudo antes (controle), após a radioterapia e depois da cárie artificial. As linhas em amarelo evidenciam mudanças estruturais significativas. Escala: 100 μ m.



Fonte: Do próprio autor.

Como pode ser observado na Figura 35, há uma variedade no padrão de imagens de *B-scan* obtidas por OCT após a indução de cárie artificial. As Figuras 35A-C, por exemplo, assemelham-se com aquele descrito para a dentina hígida na Fase II deste estudo; ou seja, nota-se um primeiro sinal de reflexão intensa na interface ar/tecido (linha branca intensa e bem definida) e, em seguida, observa-se o decaimento rápido do sinal em função da profundidade (tonalidade preta na porção inferior do *B-scan*)¹¹¹. No entanto, na Figura 35C o sinal da OCT decai mais vagorosamente na dentina desmineralizada, que é evidenciado pelo maior brilho (tonalidade de branco) em regiões mais profundas da amostra analisada^{111,115,116}. Isso ocorre porque o sinal da OCT, ao interagir com o tecido desmineralizado, sofre maior retroespalhamento e refletividade nas microinterfaces no interior da dentina criadas pelo processo de dissolução dos minerais que constituem tal tecido^{113,114}.

Salienta-se que porções do colágeno expostos como consequência do processo de desmineralização são capazes de causar maior retroespalhamento e refletividade do sinal¹¹⁵.

Nas imagens de *B-scan* exibidas nas Figuras 35D- F, por sua vez, verifica-se que a linha branca intensa e bem definida que delimita a interface ar/tecido apresenta contorno menos definido após a indução de cárie artificial (Figura 35F). Isso se deve ao fato de que a desmineralização aumentou a rugosidade na superfície do esmalte e da dentina^{121,136,137}. Como consequência, o sinal da OCT sofre reflexão difusa ao interagir com essa superfície mais rugosa¹³⁷ e, deste modo, resulta em uma imagem de *B-scan* cuja interface ar/tecido apresenta contorno menos definido. Inclusive, o aumento na rugosidade da superfície da dentina provocado pelo processo de desmineralização é o motivo pelo qual se observa, nas Figuras 35I e L, o surgimento de descontinuidades nas superfícies dos blocos de dentina que, até antes da indução de cárie, eram contínuas e uniformes (Figuras 35G-H e 35J-35K, respectivamente).

Ainda ao que concerne à imagem de *B-scan* representada na Figura 35L, nota-se que há a intensificação do sinal da OCT em pequenas regiões no interior da dentina, que possivelmente são poros preexistentes, que já eram perceptíveis antes da indução da cárie artificial (Figuras 35J e K), bem como o surgimento de novas regiões internas com maior brilho. Esses fatos, provavelmente, são indícios de que a desmineralização provocada pela cárie artificial acentuou um processo que já existia de dissolução de minerais.

A sequência de imagens representadas nas Figuras 35M-35O demonstra a progressão gradual de uma lesão subsuperficial preexistente. Este tipo de lesão é mais comum nos estágios iniciais de desenvolvimento da cárie e se caracteriza por estar coberto por uma superfície intacta, mais mineralizada e menos propensa à ação de ácidos, que contrasta com a região logo abaixo dessa superfície (subsuperficial) onde a desmineralização está em curso¹¹⁴. Embora este tipo de lesão seja frequentemente descrito para o esmalte, as Figuras 35M-O sugerem que algo análogo ocorreu com a dentina. Conforme discutido na Fase II deste estudo, tanto as imagens de *B-scan* quanto à média refletividade integrada obtidas após a radioterapia parecem indicar que este tipo de tratamento é capaz de desencadear um processo de desmineralização. Assim, a lesão preexistente na amostra de

dentina hígida (Figura 35M) é intensificada pela desmineralização provocada pela radioterapia (Figura 35N) e, finalmente, culmina com o rompimento da superfície mais externa após a cárie artificial (Figura 35O).

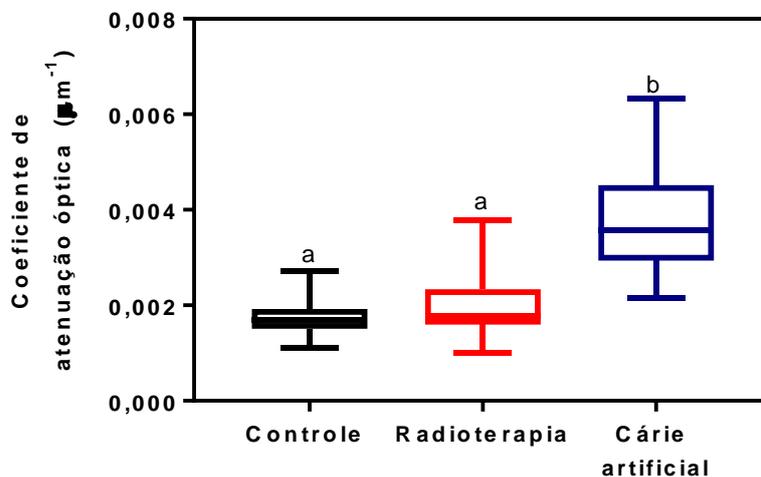
Algo semelhante parece ter ocorrido nas imagens de *B-scan* exibidas nas Figuras 35P-R. É perceptível, na Figura 35Q, o surgimento de uma lesão subsuperficial resultante possivelmente do processo de desmineralização iniciado pelo tratamento radioterápico. Após a cárie artificial, no entanto, essa lesão é acentuada, haja vista o aumento no comprimento das lesões, bem como na intensificação do brilho.

Nas Figuras 35S-U, verifica-se que as pequenas regiões no interior da dentina com sinal intenso após a radioterapia (Figura 35T) não são mais distinguíveis após a cárie artificial (Figura 35U). Isso provavelmente é um indício de que a desmineralização promovida pela cárie artificial foi capaz de intensificar o processo de dissolução de minerais que já havia sido iniciado pelo tratamento radioterápico, porém com abrangência de uma região maior no interior da dentina.

Apesar da variabilidade de imagens de *B-scan* obtidas após a indução de cárie artificial, é importante ressaltar que os padrões de imagens são compatíveis com os de cárie em estágio inicial, uma vez que não se constatou a ocorrência de cavitação^{111,114}.

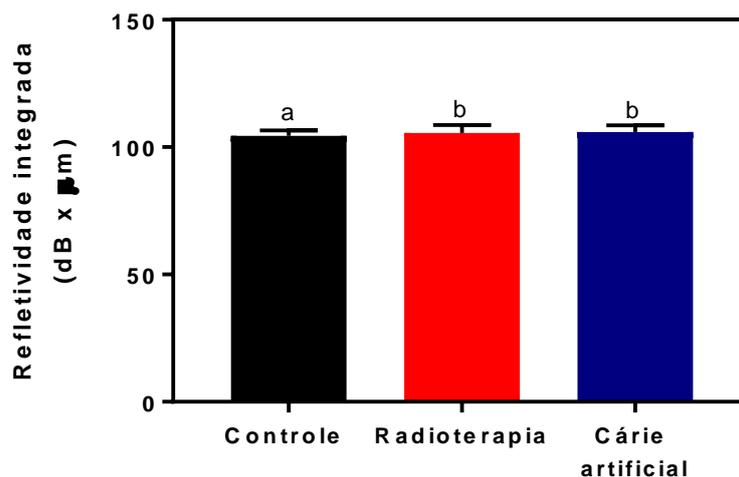
As médias dos coeficientes de atenuação óptica total ($\bar{\mu}_t$) (Figura 36) e de refletividade integrada (ΔR) (Figura 37), assim como os respectivos valores de p resultantes das comparações intragrupos (Tabela 4), evidenciam um aumento significativo no $\bar{\mu}_t$ após a desmineralização (cárie artificial), em contrapartida, não houve diferença na ΔR . E esses resultados são consistentes com a literatura, pois esta indica que a desmineralização cria defeitos no tecido dental que aumentam o espalhamento da luz e impactam os valores de $\bar{\mu}_t$ e ΔR ^{109,112,113,114,119,120}. No entanto, o primeiro pareceu ser mais sensível do que o segundo na detecção das mudanças provocadas pelo protocolo desmineralização empregado neste estudo.

Figura 36: Distribuição dos valores médios, com os respectivos desvios-padrão e medianas, dos coeficientes de atenuação óptica total ($\bar{\mu}_t$) das amostras de dentina dos grupos controle, radioterapia e cárie artificial. Letras diferentes, acima de cada barra, denotam a existência de diferenças estatisticamente significantes ($\alpha = 0,05$) segundo o teste de Friedman com pós-teste de Dunn para amostras pareadas.



Fonte: Do próprio autor.

Figura 37: Valores médios, com os respectivos desvios-padrão, da refletividade integrada (ΔR) das amostras de dentina dos grupos controle, radioterapia e cárie artificial. Letras diferentes, acima de cada barra, denotam a existência de diferenças estatisticamente significantes ($\alpha = 0,05$) segundo o teste de ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey para amostras pareadas.



Fonte: Do próprio autor.

Tabela 4: Valores de p resultantes da comparação intergrupos (controle, radioterapia e cárie artificial) das médias dos coeficientes de atenuação óptica total ($\bar{\mu}_t$), por meio do teste de Friedman com pós-teste de Dunn para amostras pareadas, e de refletividade integrada (ΔR), segundo o teste de ANOVA com pós-teste de Tukey para amostras pareadas. Valores de p inferiores a 0,05 são estatisticamente significantes.

	Valores de p	
	$\bar{\mu}_t$	ΔR
Controle vs. Radioterapia	0,3475	0,0014
Controle vs. Cárie artificial	<0,0001	<0,0001
Radioterapia vs. Cárie artificial	<0,0001	0,4543

Fonte: Do próprio autor.

Desta forma, é possível concluir, tanto por meio dos padrões de imagem de *B-scan* obtidos, como pelo aumento no valor médio dos coeficientes de atenuação óptica total ($\bar{\mu}_t$), que o protocolo de desmineralização empregado neste estudo foi eficiente em induzir lesões sem cavitação superficial. Estes resultados do OCT, portanto, corroboram os de ATR-FTIR que demonstram maior exposição de matriz orgânica.

5.3.2. Tratamentos de remineralização

5.3.2.1. Avaliação morfológica por MEV

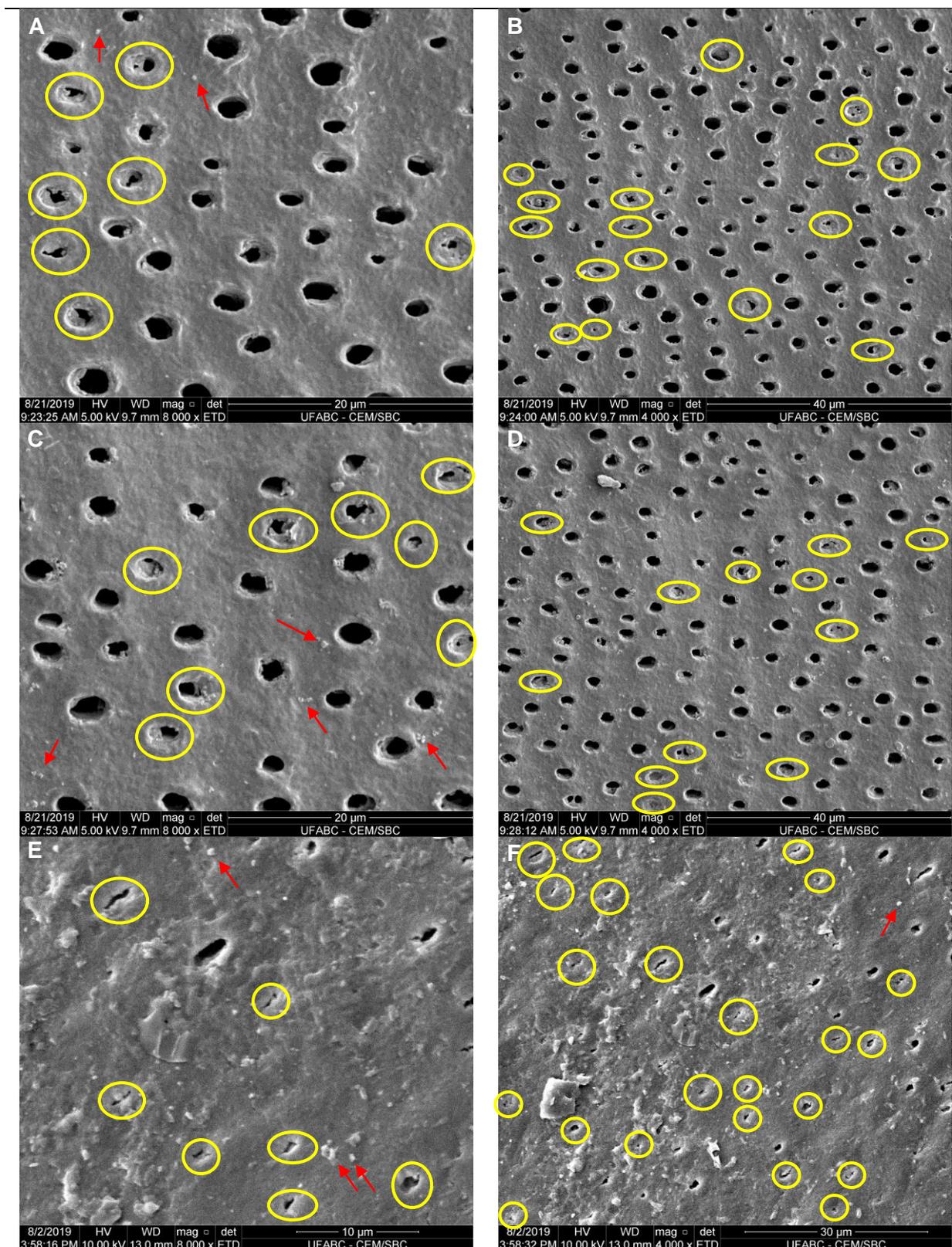
As Figuras 38 a 43 exibem 6 eletromicrografias de varredura representativas de amostras de dentina radicular dos grupos G1 a G6, respectivamente. As imagens na Figura 38, correspondentes ao grupo G1 (controle negativo), mostram a presença de túbulos dentinários totalmente expostos e que coexistem com uma minoria de túbulos parcialmente obliterados (indicados nas imagens com círculos amarelos). Também se nota que a estrutura da dentina é mantida; ou seja, ainda é possível distinguir túbulos, dentina peritubular e dentina intertubular.

Em comparação com as características morfológicas de dentinas híidas (Figuras 28A e C), verifica-se que os túbulos das amostras do grupo G1 apresentam diâmetros de tamanho maior. Tal aumento é uma consequência da ação da solução desmineralizadora utilizada nesse estudo para simular a indução de cárie. Por se tratar de uma substância ácida (pH = 5,0), a solução remove a camada de *smear* da dentina, abre seus túbulos, dissolve os minerais presentes na superfície (com

profundidade máxima de 8 μm , dependendo da solução ácida utilizada e do tempo de exposição) e aumenta a microporosidade da dentina intertubular¹³⁸.

As Figuras 38E e F, no entanto, apresentam aspectos morfológicos distintos daqueles observados nas Figuras 38A - D. Apesar de haver túbulos parcialmente obliterados (indicados nas Figuras 38E e F por círculos amarelos) e alguns totalmente expostos, a maioria está encoberta por uma camada de *smear* que foi formada, muito possivelmente, a partir da deposição de íons presentes na saliva artificial na qual as amostras ficaram imersas por 24 horas. A literatura indica que essa camada pode ser facilmente removida pela ingestão de alimentos ácidos, escovação ou pelos mecanismos de desmineralização e remineralização naturalmente mediados pela saliva¹³⁹. Inclusive, as pequenas partículas, das quais se indicam algumas com setas vermelhas na Figura 38, podem ter sido fornecidas pela saliva artificial cuja composição é rica em cálcio e fosfato.

Figura 38: Eletromicrografias representativas de duas amostras distintas pertencentes ao grupo G1 (controle negativo). Os círculos em amarelo indicam exemplos de túbulos dentinários parcialmente obliterados. As setas vermelhas, por sua vez, indicam deposição de material particulado à superfície. Magnificações originais: 8000x e 4000x.



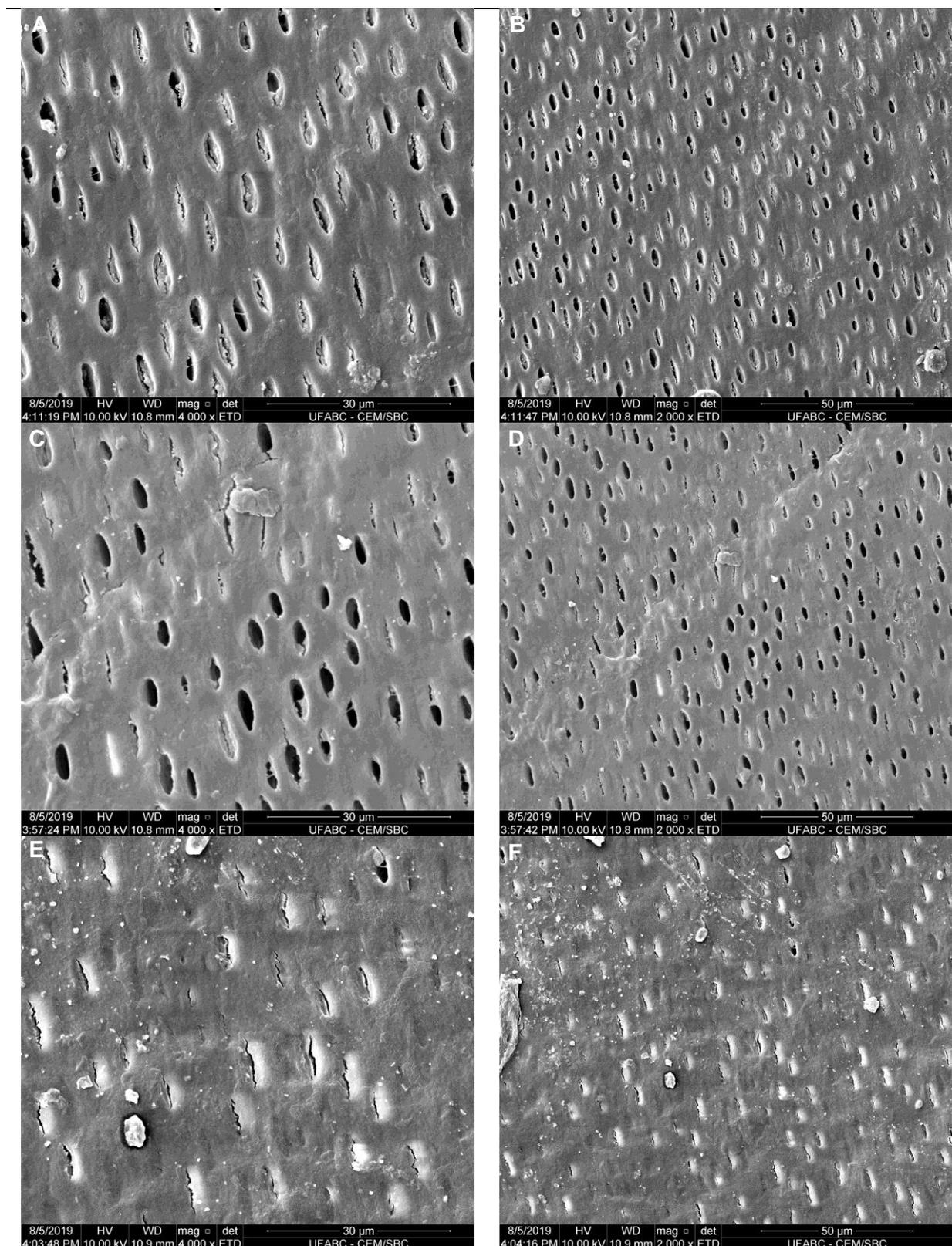
Fonte: Do próprio autor.

As imagens na Figura 39, por sua vez, representam as amostras do grupo G2 que foi tratado com uma formulação comercial de flúor fosfato acidulado (FFA) e é o controle positivo deste grupo, uma vez que esta substância é considerada padrão-ouro quanto à remineralização de tecidos dentais¹⁴⁰. Nas Figuras 39A - D, nota-se a existência da camada de *smear*, bem como de regiões onde coexistem túbulos dentinários totalmente expostos e outros parcialmente obliterados, com a predominância dos primeiros.

A existência de túbulos parcialmente obliterados nas Figuras 39A - D pode ser explicada pelo mecanismo de atuação do FFA. Este possui em sua composição uma concentração de ácido fosfórico (0,1 M)⁶¹ cuja função é favorecer a formação de glóbulos de fluoreto de cálcio (CaF_2)¹⁴⁰. Para isto, o ácido fosfórico ocasiona uma desmineralização moderada na superfície da dentina a fim de liberar íons cálcio (Ca^{2+}), existentes em sua matriz inorgânica, para que estes reajam com os íons fluoreto (F^-) e, assim, formem glóbulos de CaF_2 ¹⁴⁰. Como consequência do processo de desmineralização moderado, o ácido fosfórico remove a camada de *smear* e abre os túbulos dentinários^{61,138}.

E, por fim, nas Figura 39E - F observam-se regiões em que há túbulos total e parcialmente obliterados, decorrentes da presença de resquícios do gel de FFA, bem como a presença de pequenas partículas compatíveis com glóbulos de CaF_2 ^{61,141,142}.

Figura 39: Eletromicrografias representativas de duas amostras distintas pertencentes ao grupo G2 (tratamento com flúor fosfato acidulado (FFA, controle positivo)). Magnificações originais: 4000x e 2000x.



Fonte: Do próprio autor.

Na Figura 40, são exibidas as imagens das amostras do grupo G3 que foram irradiadas com o *laser* de Nd:YAG. Sabe-se que a irradiação *laser* é capaz de provocar alterações composicionais e morfológicas nos tecidos dentais irradiados de modo a diminuir sua solubilidade em meios ácidos, dependendo da dose utilizada, dentre outras características da irradiação, tais como comprimento de onda, densidade de energia, largura temporal de pulso, tempo de relaxação térmica, potência pico e cromóforos presentes no tecido^{13,14}.

As Figuras 40A – 40D exibem regiões com a predominância de túbulos parcialmente obliterados e diâmetro de tamanho aparentemente menor quando comparados ao do grupo G1 (Figura 38). Além disso, verifica-se a existência de pequenos glóbulos sobre a dentina intertubular e áreas com aspecto de derretimento superficial que, neste contexto, podem ser resultantes da ação térmica do *laser*. A literatura reporta que a irradiação *laser* pode aquecer a superfície do tecido a temperaturas superiores a 1100 °C e, assim, favorece a formação de outras estruturas cristalográficas, como a de fosfato tricálcico (fases α ou β), além de fosfato tetracálcico e cristais de hidroxiapatita de tamanho aumentado^{14,28,61,84}. Adicionalmente, podem ser promovidas outras alterações composicionais na estrutura da matriz orgânica e inorgânica, tais como evaporação de água e carbonato, desnaturação de proteínas, formação de pirofosfatos, dentre outros^{14,28,61,84}. Todavia, são necessários outros testes, tais como difração de raio-X rasante, que não estão no escopo deste estudo, para comprovar se, de fato, as formações globulares na dentina intertubular são resultantes de alterações composicionais e cristalográficas provocadas pela irradiação *laser*.

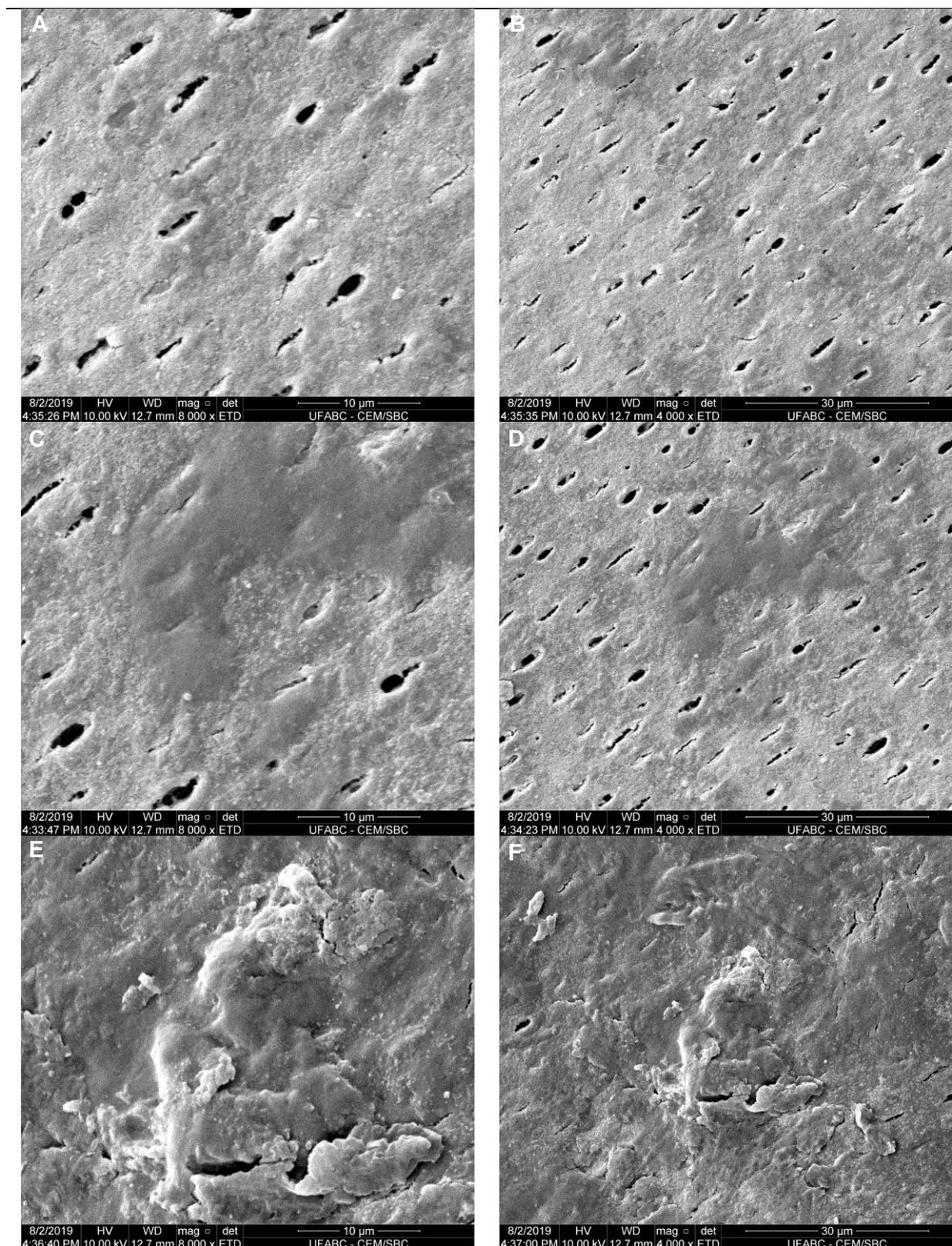
As Figuras 40E – F apresentam indícios do aquecimento do *laser* a temperaturas superiores a 1100 °C, uma vez que exibem aspectos morfológicos compatíveis com os descritos para derretimento e recristalização^{13,28,61}. Como consequência, é formada uma superfície uniforme, com irregularidades e sem a exposição de túbulos.

Assim como ocorreu com as amostras do grupo G1 e do G2 (Figuras 38 e 39), as amostras do grupo G3 exibem aspectos morfológicos heterogêneos que, neste caso, estão relacionados ao fato de que o *laser* de Nd:YAG utilizado neste estudo possui um feixe com provável perfil gaussiano. Deste modo, a energia do

feixe é maior no centro do pulso e é reduzida gradativamente conforme se aproxima das extremidades. É por este motivo que há regiões com superfície derretida e recristalizada, o que evidencia maior elevação de temperatura, que coexistem com outras onde há túbulos parcialmente obliterados (Figura 40), o que, por sua vez, é sugestivo de menor elevação de temperatura. As irregularidades provenientes das irradiações foram também evidenciadas em estudos anteriores^{62,143}, que mostram ablação em esmalte e dentina no centro do feixe (o que requer maior elevação de temperatura) e áreas de derretimento e recristalização nas bordas, o que resultou de uma menor elevação de temperatura.

É importante mencionar que não foi observada ablação do tecido em nenhuma das amostras avaliadas, tampouco outros efeitos deletérios, tais como trincas ou carbonizações, aspectos que não são desejados para o uso clínico da irradiação *laser* para prevenção da cárie¹⁴². Embora no estudo de Lizarelli *et al.*⁶² tenha sido empregado *laser* de Nd:YAG 1064 nm com taxa de repetição de 15 Hz, largura temporal de pulso de 6 ns, potência média de 200 mW e energia entregue por pulso, calculada por nós, de 130 mJ, a densidade de energia empregada, (também calculada por nós) foi de 173,33 J/cm², é muito superior à empregada no presente estudo (1,48 J/cm²) e, por isso, estamos trabalhando em densidades de energia muito inferiores para possibilitar a ablação da dentina. Outros estudos^{144,145} empregaram densidades de energia bem inferiores ao estudo supracitado (Nd:YAG 1064 nm, 6 ns, 5 Hz, 10 a 40 J/cm²) e também evidenciaram ausência de ablação, mas constataram áreas de fusão e recristalização, com modificação química e estrutural (aumento da relação Ca/P, desnaturação de conteúdo orgânico, perda de água e de fosfato, aumento da microdureza superficial Vickers) e aumento da resistência do tecido à imersão em ácido láctico.

Figura 40: Eletromicrografias representativas de duas amostras distintas pertencentes ao grupo G3 (irradiação com Nd:YAG). Magnificações originais: 8000x e 4000x.



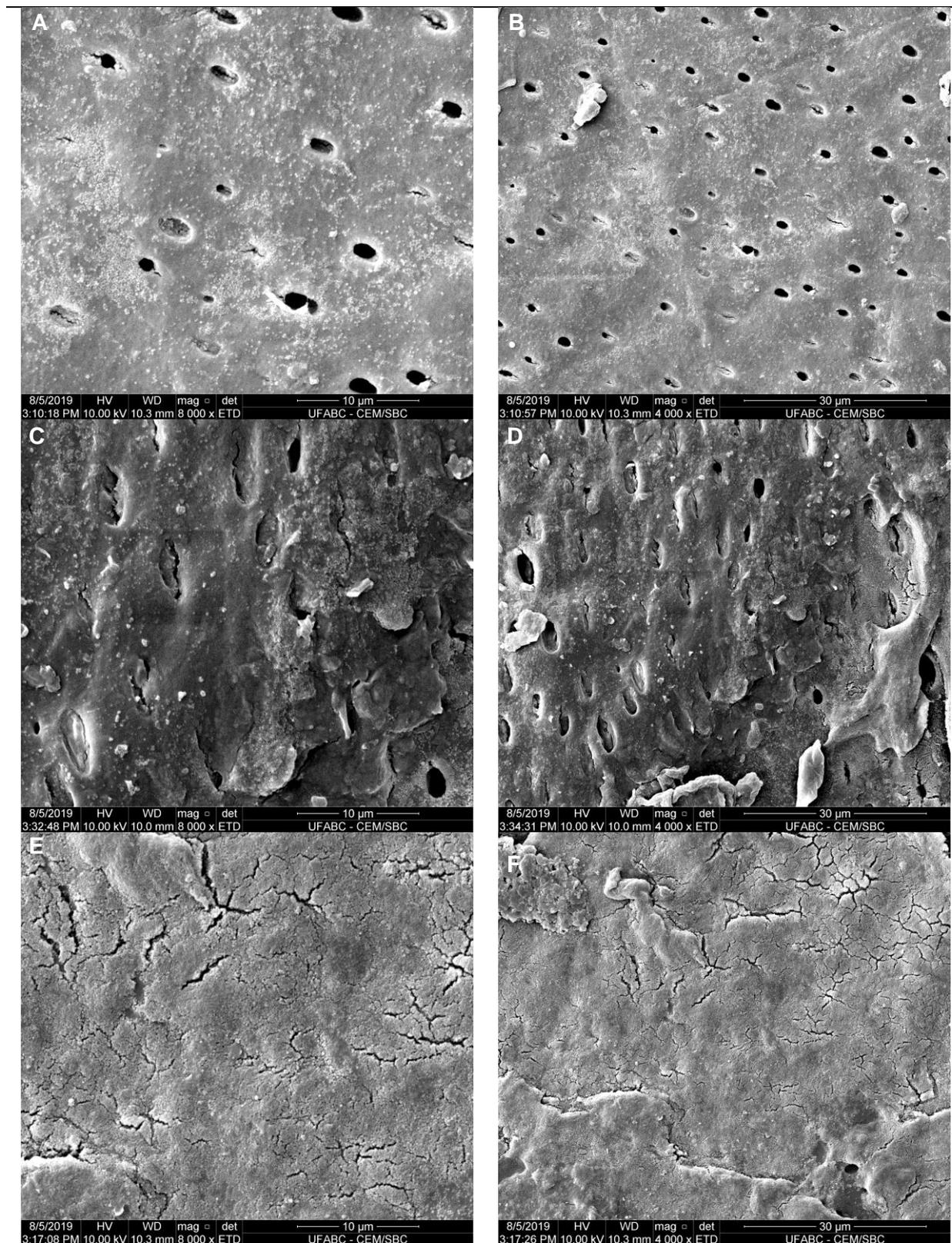
Fonte: Do próprio autor.

Os aspectos morfológicos encontrados no presente estudo assemelham-se aos reportados por Matos *et al*¹³, que relataram fusão da dentina empregando-se a mesma densidade de energia que a do presente estudo. Embora tenha sido empregada uma densidade de energia ligeiramente inferior à utilizada neste estudo (Nd:YAG 1064 nm, 1,05 J/cm², 200 mJ/pulso, 5 ns), Pereira DL observou ausência de derretimento, mas constatou alterações composicionais significativas na dentina irradiada, além de aumento da resistência do tecido à erosão. Desta maneira, a partir dos achados morfológicos e composicionais observados, os resultados obtidos no presente estudo indicam potencial uso clínico e seguro para paralisação da progressão de lesões de cárie.

A Figura 41 apresenta as imagens representativas do grupo G4 que foi tratado por meio da aplicação de FFA com posterior irradiação *laser*. A literatura reporta que a irradiação *laser*, neste caso, pode prolongar os efeitos de remineralização do flúor⁸⁴ de duas maneiras: (i) por meio do aumento da incorporação de íons fluoreto no tecido devido ao aquecimento ou (ii) mediante a maior formação de glóbulos de CaF₂, que é o principal produto formado pela aplicação tópica de agentes fluoretados, como o FFA, e o grande responsável pela ação cariostática do fluoreto, favorecida pelo aumento na rugosidade superficial do tecido pela irradiação *laser*.

De uma forma geral, as imagens na Figura 41 são semelhantes às aquelas na Figura 40, ou seja, há regiões onde se observa a existência de túbulos parcialmente obliterados (Figuras 41A e B); outras em que há traços sugestivos de derretimento e recristalização juntamente com a obliteração parcial de túbulos (Figuras 41C e D) e, por fim, regiões cujos túbulos estão totalmente obliterados pela formação de uma superfície derretida, recristalizada e uniforme, com poucas irregularidades e com microtrincas provavelmente ocasionadas pela desidratação para imageamento (Figuras 41E e F).

Figura 41: Eletromicrografias representativas de duas amostras distintas pertencentes ao grupo G4 (tratamento com FFA + Nd:YAG). Magnificações originais: 8000x e 4000x.



Fonte: Do próprio autor.

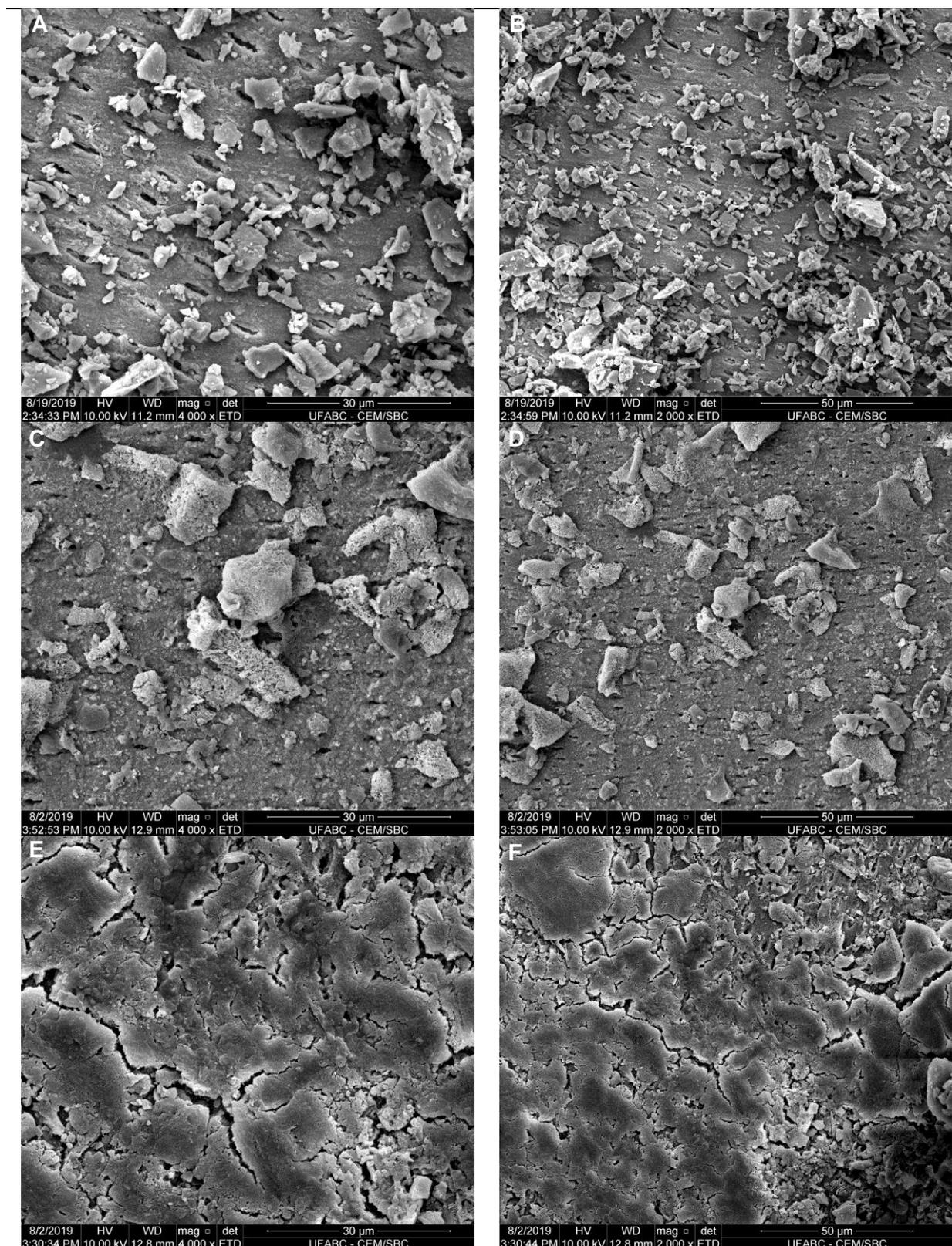
Salienta-se que nas Figuras 41A e 41D é possível notar a presença de pequenos glóbulos sobre a dentina intertubular. Uma vez que houve a combinação de dois tratamentos (FFA e *laser*), é possível que estes glóbulos estejam relacionados à formação de: (i) CaF_2 , por ação do FFA; (ii) de outras estruturas cristalinas de cálcio, por ação do *laser* ou (iii) pela formação de fluorapatita ou de hidroxiapatita fluoretada, pela ação combinada de FFA e *laser*⁸⁴. No entanto, como mencionado anteriormente, outros testes que não fazem parte do escopo deste estudo precisam ser realizados para validar (ou não) essas suposições.

Estudos anteriores realizados pelo nosso grupo com *laser* de Er,Cr:YSGG^{141,142} ou de Nd:YAG¹⁵ (de mesmo comprimento de onda que o empregado no presente estudo, mas com largura temporal de pulso de 120 μs) evidenciaram a maior formação de glóbulos de CaF_2 na superfície de esmalte e de dentina, e sugeriram que as maiores formação e retenção deste material têm relação direta com a rugosidade da superfície. Até o presente momento, não há outro estudo na literatura que avaliou a interação do *laser* de Nd:YAG de pulso curto com íons fluoreto, mas os achados obtidos aqui sugerem que a maior rugosidade superficial promovida pelas irradiações possa favorecer a formação e retenção de CaF_2 e, assim, ampliar o efeito cariostático deste agente.

A Figura 42 exhibe as imagens do grupo G5, que foi tratado com Biosilicato[®] (BS). Trata-se de um material bioativo, com aplicação clínica bem sucedida para hipersensibilidade dentinária^{17,22,67}, cujo mecanismo de ação, elucidado anteriormente, é baseado na formação de uma camada de hidroxiapatita carbonatada com tecidos biológicos^{17,18,19,20,21}.

É evidente, nas Figuras 42A - D, a presença de partículas de BS não dissolvidas sobre a superfície das amostras. Também é perceptível a existência de túbulos parcialmente obliterados com diâmetro de tamanho menor, sob as partículas não dissolvidas, quando comparado ao grupo G1 (Figura 38). Em contrapartida, as Figura 42E - Figura 42F exibem a formação de uma camada, relativamente homogênea, que recobre a maioria dos túbulos. As trincas existentes são decorrentes do processo de desidratação para aquisição de imagens. Possivelmente, tanto a obliteração parcial dos túbulos (Figuras 42A - D) quanto a formação dessa camada nas Figuras 42E - 42F estão relacionadas ao mecanismo de ação do BS.

Figura 42: Eletromicrografias representativas de duas amostras distintas pertencentes ao grupo G5 (tratamento com Biosilicato[®] (BS)). Magnificações originais: 4000x e 2000x.



Fonte: Do próprio autor.

Ressalta-se que o fato de haver partículas de BS não dissolvidas (Figuras 42A - 42D), mesmo após 24 horas de imersão em saliva artificial que é o tempo necessário para a formação da camada de hidroxiapatita carbonatada^{17,23,67}, não é um resultado exclusivo do nosso estudo. Em outra pesquisa, conduzida por Pinheiro *et al.* com um total de 280 amostras de dentina bovina, foi relatado que a aplicação de 0,6 g de BS em 2 mL de água destilada sobre a superfície da dentina, com auxílio de um microaplicador, e imersão em 10 mL de saliva artificial por 24 horas resultou em um “índice de dissolução de partículas” de $2,3 \pm 0,5$. Tal índice, proposto pelos pesquisadores, considerou uma pontuação de 1 a 3 com base em imagens de MEV, em que 1 significava que o BS havia sido completamente dissolvido; 2, parcialmente; e 3, não dissolvido. Logo, a média por eles encontrada reflete uma predominância de imagens cujas partículas sofreram parcial ou nenhuma dissolução¹³⁹.

Ainda a respeito da dissolução parcial das partículas de BS, alguns questionamentos, de ordem metodológica, poderiam ser feitos, tais como: (i) a quantidade de BS utilizada no estudo estava em excesso e, conseqüentemente, interferiu de maneira direta no processo de dissolução; (ii) a quantidade de saliva, bem como a sua estequiometria, disponível para cada amostra de dentina radicular tratada eram insuficientes para que houvesse dissolução total das partículas de BS.

Em relação à primeira questão, não há consenso na literatura a respeito da quantidade ideal de BS que deve ser usada para cada tipo de tratamento, como elucidado anteriormente. Os valores utilizados por diferentes pesquisadores, em estudos *in vitro* ou clínicos, variam desde 0,1 mg e chegam a até 100 mg^{22,23,24,25,26,72,73}. Além disso, não está claro se a quantidade especificada deve ser empregada para tratar apenas uma amostra ou um determinado grupo experimental^{22,23,72}, tampouco quais eram os tamanhos das amostras analisadas^{23,25,72} (o que permitiria que fosse feita uma comparação de quantidade por mm² de substrato exposto). A falta de consenso também abrange o procedimento posterior à aplicação do BS: alguns deixam a suspensão de BS permanecer por 5 minutos antes de removê-la com papel absorvente^{24,25,26,72}; outros não descrevem se há enxágue ou remoção por outro meio, ou simplesmente não removem o excedente^{22,23,73}. Por todos estes motivos, é difícil estabelecer uma conexão entre a quantidade aplicada de BS sobre a superfície da dentina e sua dissolução.

No que diz respeito à segunda questão, enfatiza-se que o protocolo de saliva artificial utilizado é bem estabelecido na literatura em estudos de Cariologia para avaliar a remineralização da dentina radicular bovina, pois apresenta composição iônica similar à saliva humana (sem a adição de enzimas) e apropriada para permitir a remineralização da dentina bovina (a qual possui maior solubilidade que a dentina humana)^{79,80}. O uso de saliva artificial é recomendado em estudos *in vitro*, pois mimetiza a situação clínica na qual os tratamentos estariam em contato constante com a saliva do paciente, além de apresentar vantagens, tais como o controle da composição, a validade de armazenamento, o controle de infecção¹⁴⁶ e o fornecimento de íons necessários para a atuação de biomateriais. Contudo, um estudo de Curtis *et al.*¹⁴⁷ demonstrou que ocorre a maior formação de cristais de hidroxiapatita carbonatada decorrente da aplicação de um vidro bioativo quando ele é associado à saliva humana. A mesma solução de saliva artificial foi empregada recentemente para avaliar a remineralização de dentina com o Biovidro 45S5[®], e foram obtidos resultados satisfatórios^{24,148}. Vale a pena ressaltar, no entanto, que a saliva artificial pode apresentar variações entre os estudos, e que alguns citam seu emprego²³, mas não descrevem sua composição, o que dificulta a comparação.

Em relação à quantidade de saliva artificial empregada em cada amostra, adotou-se uma proporção de 2 mL para cada unidade de área (mm²) da superfície da dentina exposta, a fim de se padronizar uma proporção equivalente em todas as amostras, como estabelecido na literatura de Cariologia^{79,80}. Para efeito de comparação, o bem sucedido estudo *in vitro* de BS para tratamento de hipersensibilidade dentinária menciona que as amostras de dentina, cujas dimensões foram omitidas, ficaram imersas em 1,5 mL de saliva artificial por 24 horas (inclusive, a composição desta saliva foi omitida também)²³. Como a quantidade de saliva utilizada no presente estudo é da ordem de 18 a 44 vezes maior do que a descrita no artigo supracitado para o mesmo período de tempo, é pouco provável que a solução de saliva tenha sido insuficiente para a dissolução das partículas de BS. Porém, mais estudos se fazem necessários para se confirmar esta hipótese.

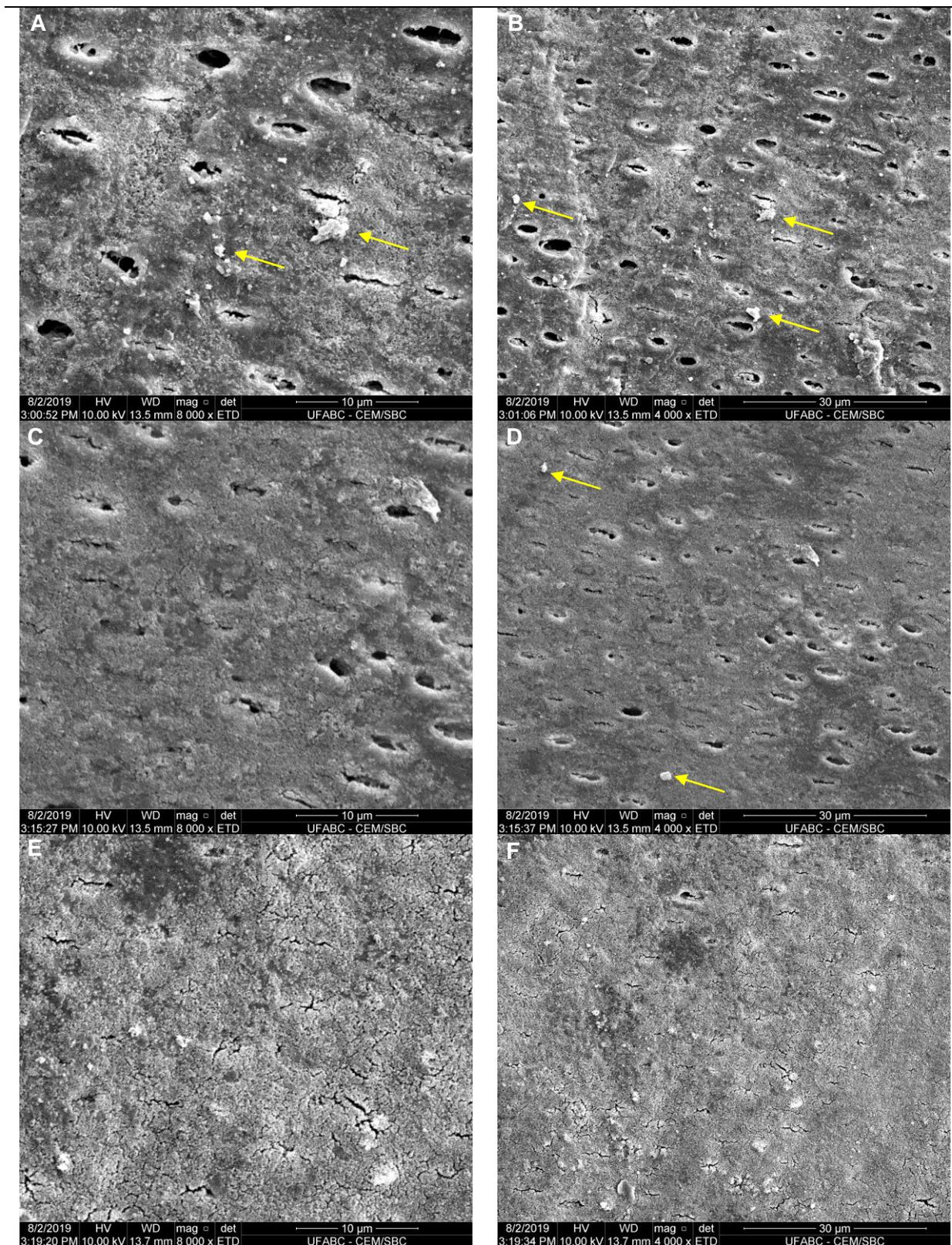
Assim, as variações entre os estudos ocasionam respostas diferentes, o que também pode ocorrer durante a aplicação clínica do tratamento proposto, uma vez que mesmo em indivíduos normorreativos pode haver variações de composição e de

fluxo salivar. Ao se considerar o principal objetivo deste estudo, isto é, a paralisação de lesões incipientes de cárie radicular oriundas de radioterapia, sabe-se que os pacientes podem apresentar redução de até 90%, em volume, da saliva produzida pelo indivíduo, bem como na sua capacidade de tamponamento^{4,5,7,42}, ou mesmo a ausência de saliva e, neste caso, diferentes estratégias de aplicação do biomaterial devem ser adaptadas a estes pacientes. Estudos posteriores fazem-se necessários para determinar também o comportamento do material perante situações de fluxo salivar diminuído.

E, por fim, características das próprias partículas de BS podem influenciar a sua taxa de dissolução. Como pode ser observado nas Figuras 42A - 42D, as partículas de BS possuem uma diversidade de tamanhos. A literatura reporta que existe uma relação inversamente proporcional entre o tamanho de partícula e sua taxa de dissolução para formação da camada de hidroxiapatita carbonatada. Em outras palavras, quanto menor o tamanho de partícula, maior a taxa de dissolução¹⁴⁹. Desta forma, as amostras do grupo G5 apresentam aspectos morfológicos heterogêneos com regiões onde há a obliteração parcial de túbulos que coexistem com partículas não dissolvidas de BS com outras em que os túbulos estão totalmente cobertos por meio da formação de uma camada resultante do processo de dissolução de BS em saliva artificial.

A Figura 43, por sua vez, exhibe as imagens representativas das amostras de dentina do grupo G6 que foram tratadas com Biosilicato[®] e posterior irradiação *laser*. Observa-se na Figuras 43A - 43D, a coexistência de túbulos parcialmente obliterados com partículas não dissolvidas de BS (das quais algumas estão indicadas por setas amarelas) juntamente com a formação de uma camada superficial, que é irregular nas Figuras 43A - B e se torna mais uniforme e homogênea nas Figuras 43C - D. Por sua vez, nas Figuras 43E - F, percebe-se a obliteração total da maioria dos túbulos que estão encobertos por uma camada regular e homogênea.

Figura 43: Eletromicrografias representativas de duas amostras distintas pertencentes ao grupo G6 (tratamento com BS+Nd:YAG). As setas amarelas indicam partículas remanescentes não dissolvidas de BS. Magnificações originais: 8000x e 4000x.



Fonte: Do próprio autor.

Em comparação às imagens na Figura 43A - D, as partículas de BS visíveis nas Figuras 43A - D aparentam ser menores e estão em quantidade reduzida. Esses dois fatos podem ser consequências do efeito da irradiação *laser*, pois seu feixe pode ter provocado a ejeção de parte das partículas na superfície das amostras ao incidir sobre elas. Além disso, as imagens sugerem que a energia fornecida pelo *laser* foi capaz de quebrar as partículas de BS, o que explicaria a redução nas suas dimensões. Tais achados foram similares ao reportado por Bakri *et al.*¹⁵⁰, em que a irradiação do Biovidro 45S5[®] com *laser* de CO₂ promoveu a formação de uma camada mais compacta e com estruturas cristalinas menores.

As imagens deste estudo (Figura 43) também sugerem que o aquecimento promovido pela irradiação *laser* pode ter amolecido o material e culminou na formação de uma camada mais regular e uniforme, com ausência de partículas com tamanhos tão irregulares como os evidenciados na Figura 42. De acordo com os achados morfológicos e com os resultados da avaliação composicional apresentados neste estudo, sugere-se que a irradiação *laser* tenha aquecido o tecido a temperaturas próximas da fusão da hidroxiapatita (a qual ocorre em 1200 °C)^{13,28,61}, que supera a temperatura de amolecimento do BS, que é de aproximadamente 1120 °C¹⁵¹, o que explicaria as alterações morfológicas aqui observadas.

É importante mencionar que as características morfológicas presentes nas Figuras 43D-E são compatíveis com as descritas por Bakry *et al.*¹⁵⁰, que propuseram o uso do Biovidro 45S5[®] em associação com o *laser* de CO₂ para tratamento de hipersensibilidade dentinária e constataram que a combinação desses dois métodos promoveu a formação de uma camada de hidroxiapatita carbonatada com melhores propriedades mecânicas. Um estudo realizado¹⁵² com *laser* de Nd:YAP ($\lambda = 1,34 \mu\text{m}$, 150 μs , 67 J/cm²) também evidenciou a formação de camada homogênea de derretimento e recristalização do Biovidro 45S5[®] sobre a dentina, e sugeriu melhor retenção do material devido ao melhor selamento em profundidade. Mais recentemente, Farmakis *et al.*⁷⁷ observaram que o *laser* de Nd:YAG (1064 nm, 1 W, 100 mJ/pulso) em associação com NovaMin[®] (dentifrício comercializado no exterior que contém partículas de Biovidro 45S5[®] em sua composição) aumentou significativamente a oclusão dos túbulos dentinários e sugerem maior retenção do

biomaterial (até 4 μm em profundidade)⁷⁶, uma vez que a associação de tratamentos resistiu ao armazenamento por 6 meses em solução salina estéril.

Com a finalidade de melhorar a retenção e o selamento de túbulos dentinários (importante indicativo de BM desempenho do material), um biomaterial do sistema $\text{SiO}_2\text{CaO-P}_2\text{O}_5$ foi associado à aplicação de ácido fosfórico 37% e irradiação com *laser* de Nd:YAG e CO_2 (ambos de largura temporal de pulso da ordem de microssegundos). Foi possível observar que, mesmo com a adição de ácido fosfórico, as amostras apresentaram precipitados e aglomerados de partículas, e que a posterior irradiação com *laser* de CO_2 foi a única forma de diminuir a formação de aglomerados e de partículas bem menores, achados muito similares aos observados no presente estudo. Com base nesta comparação, sugere-se que a temperatura atingida durante as irradiações é um fator importante a ser considerado para a modificação do material e sua melhor retenção, tendo em vista que, com base nos achados morfológicos do estudo supramencionado, o *laser* de CO_2 deve ter atingido temperaturas muito superiores as do *laser* de Nd:YAG, principalmente por ter largura temporal de pulso muito maior, assim como maior absorção pela hidroxiapatita e água quando comparado ao *laser* de Nd:YAG. Contudo, este feixe causa danos morfológicos e estéticos importantes decorrentes da elevação de temperatura e deve ser empregado com cautela. No presente estudo, embora empregado um *laser* de Nd:YAG, a proposta foi utilizar um feixe de pulso curto justamente para aumentar a temperatura do biomaterial sem causar efeitos deletérios devido à propagação de calor.

Com base na Figura 43, é possível afirmar que as amostras do grupo G6 apresentam morfologia heterogênea resultante da ação combinada de BS e *laser* de Nd:YAG. Em decorrência do perfil gaussiano do feixe do *laser*, percebe-se que os túbulos totalmente obliterados por uma camada regular e homogênea dão gradativamente espaço a túbulos com obliteração parcial acompanhados de uma camada cada vez mais irregular à medida que se afasta da região central de incidência do feixe.

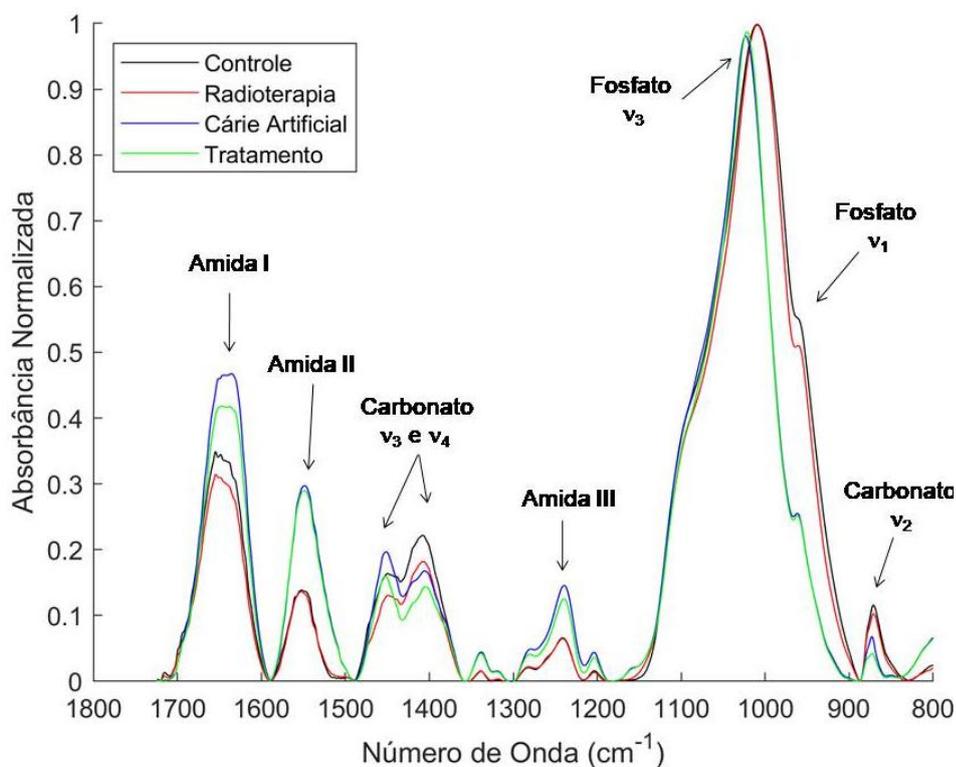
Algo comum a todos os grupos experimentais deste estudo, e que ficou evidente na análise das imagens nas Figuras 38 a 43, é o fato de todos os tratamentos terem resultado em morfologias heterogêneas, o que é esperado também em aplicações clínicas e é evidenciado em todos os trabalhos da literatura

mencionados ao longo dessa discussão. Além das explicações que já foram sugeridas ao longo dessa discussão para cada um dos grupos, deve-se enfatizar que a radioterapia promoveu mudanças na matriz orgânica da dentina, vide resultados da Fase II, que podem interferir na efetividade dos tratamentos propostos. Logo, esse fato também pode explicar a heterogeneidade morfológica.

5.3.2.2. Avaliação composicional por ATR-FTIR

A Figura 44 exibe os espectros de absorção médios das amostras do grupo G1 (sem tratamento, apenas com imersão em saliva artificial por 24 horas após a cárie artificial). Observa-se que as bandas não foram extintas ou que não houve a formação de novas bandas em comparação às demais etapas experimentais (hígidas (controle), após a radioterapia e após a cárie artificial). Salienta-se que é possível notar que as intensidades de todas as bandas de carbonato, bem como de amida I e III foram reduzidas após a imersão em saliva artificial por 24 horas (linha verde). Esta redução juntamente com a permanência das alterações na banda de fosfato ν_3 decorrentes da desmineralização por cárie artificial (isto é, o estreitamento e o deslocamento da banda para um número de onda maior) sugerem que houve uma perda adicional de mineral mesmo após a imersão em saliva artificial.

Figura 44: Média dos espectros de absorção no infravermelho, na região entre 1800 e 800 cm^{-1} , após normalização pela intensidade da banda ν_3 fosfato e traçado da linha de base, das amostras de dentina do grupo G1 em quatro etapas experimentais: controle, após a radioterapia, depois da desmineralização (cárie artificial) e após o tratamento (neste caso, imersão em saliva artificial por 24 horas).

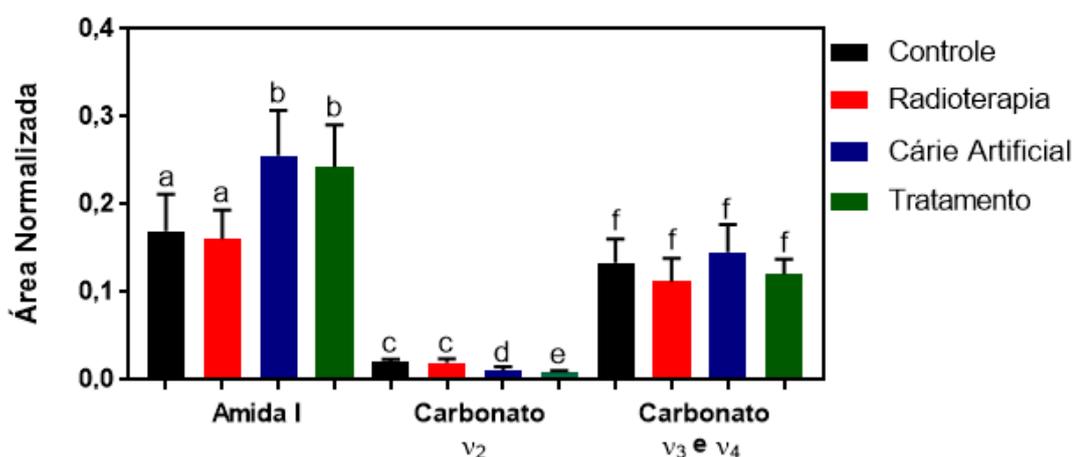


Fonte: Do próprio autor.

A análise estatística da comparação semiquantitativa das bandas de absorção, proporcionalmente em relação à banda de fosfato ν_3 , dos quatro grupos (controle, radioterapia, cárie artificial e tratamento) está ilustrada nas Figuras 45 e 46 e os valores de p, por sua vez, estão discriminados na Tabela 5.

Figura 45: Valores médios, com os respectivos desvios-padrão, das proporções das áreas normalizadas pela banda de fosfato ν_3 das bandas de amida I e de carbonato (nos modos de vibração ν_2 , ν_3 e ν_4) das amostras de dentina radicular sadias (controle), após radioterapia, depois da desmineralização (cárie artificial) e posterior imersão em saliva artificial (tratamento). Letras distintas, acima de cada barra, indicam que há diferenças estatísticas entre os grupos segundo o teste de ANOVA de uma via com pós-teste de Holm-Sidak para amostras dependentes, com $\alpha=0,05$.

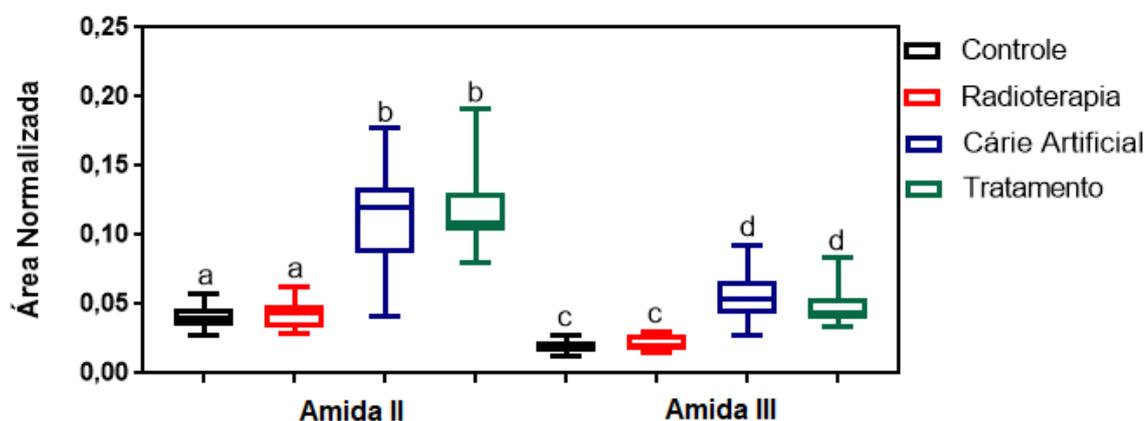
G1 - Sem tratamento



Fonte: Do próprio autor.

Figura 46: Distribuição dos valores médios, com os respectivos desvios-padrão e medianas, das proporções das áreas normalizadas pela banda de fosfato ν_3 das bandas de amida (II e III) das amostras de dentina radicular sadias (controle), após radioterapia, depois da desmineralização (cárie artificial) e posterior imersão em saliva artificial (tratamento). Letras distintas, acima de cada barra, indicam que há diferenças estatísticas entre os grupos segundo o teste de Friedman com pós-teste de Dunn para amostras dependentes, com $\alpha=0,05$.

Grupo G1 - Sem tratamento



Fonte: Do próprio autor.

Tabela 5: Valores de p resultantes da comparação intergrupos de G1 (controle, radioterapia, cárie artificial e tratamento) por meio do teste de ANOVA de uma via com pós-teste de Holm-Sidak (para as bandas de amida I e de carbonato ν_2, ν_3 e ν_4) ou de Friedman com pós-teste de Dunn (para as bandas de amida II e III). Ambos os testes consideraram amostras dependentes. Valores de p inferiores a 0,05 (em vermelho) são estatisticamente significantes.

	Valores de p				
	Amida I	Amida II	Amida III	Carbonato ν_2	Carbonato ν_3 e ν_4
Controle vs. Radioterapia	0,8992	>0,9999	>0,9999	0,1822	0,1043
Controle vs. Cárie Artificial	0,0187	0,0109	0,0008	<0,0001	0,435
Controle vs. Sem tratamento	0,0125	0,0017	0,0109	<0,0001	0,1804
Radioterapia vs. Cárie Artificial	0,0025	0,0194	0,0008	0,0004	0,1043
Radioterapia vs. Sem tratamento	0,0008	0,0032	0,0109	<0,0001	0,435
Cárie Artificial vs. Sem tratamento	0,631	>0,9999	>0,9999	0,0371	0,0677

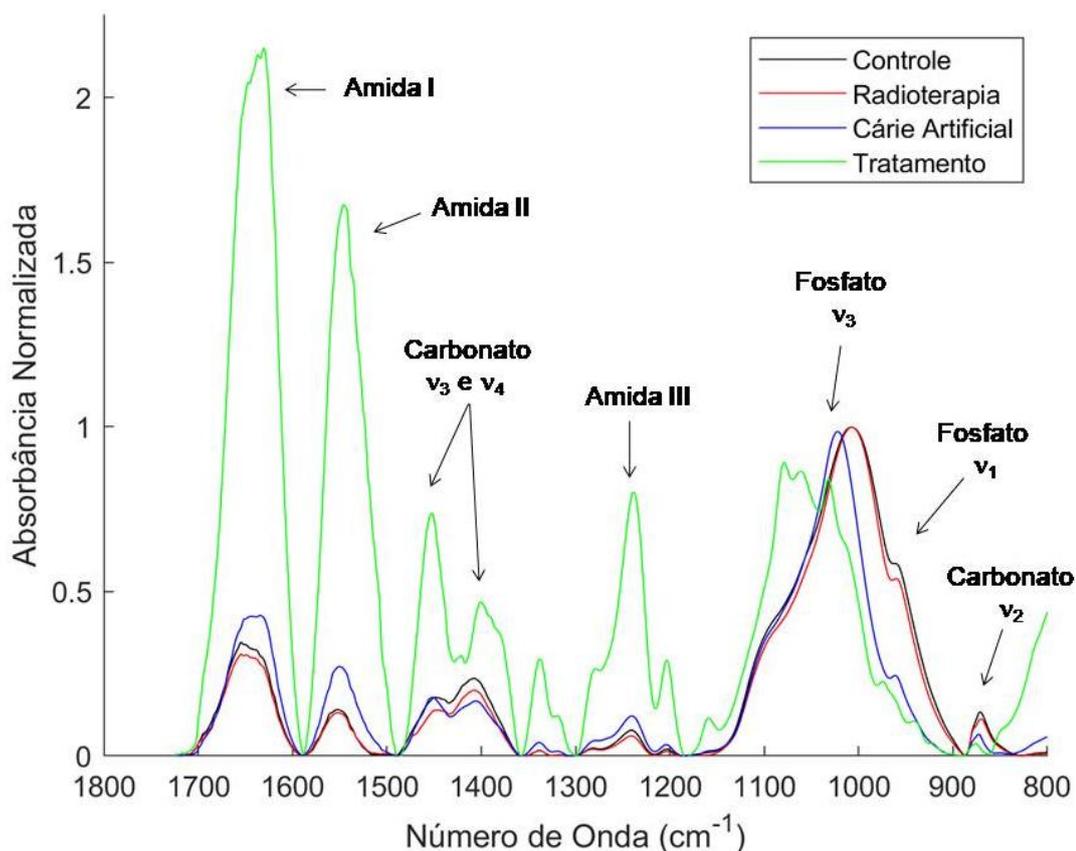
Fonte: Do próprio autor.

A partir das informações contidas nas Figuras 45 e 46, bem como na Tabela 5, é possível constatar que de fato houve uma redução significativa na banda do carbonato ν_2 , o que corrobora a hipótese de que a desmineralização continuou em curso mesmo após imersão em saliva artificial. É importante reiterar que esta banda de carbonato está relacionada à apatita carbonatada tipo B^{99,100,101}, que possui maior solubilidade em meios ácidos e, portanto, está mais propensa às alterações promovidas por processos de desmineralização. Ainda, salienta-se que as alterações composicionais aqui observadas estão em concordância com os achados morfológicos para o grupo G1 descritos anteriormente; isto é, a desmineralização remove a camada de *smear* e ocasiona a exposição de túbulos dentinários.

A Figura 47, por sua vez, apresenta os espectros de absorção médios do grupo G2 cujas amostras foram tratadas com uma formulação comercial de flúor fosfato acidulado (FFA). Nota-se que, após a aplicação de FFA, houve uma diminuição na intensidade das bandas de fosfato (ν_1 e ν_3) e de carbonato ν_2 acompanhada de um aumento nas intensidades das demais bandas. Houve, ainda, um alargamento da banda de fosfato ν_3 que se deslocou para um número de onda maior (de 1024 cm^{-1} para aproximadamente 1070 cm^{-1}). Além disso, uma nova banda surgiu na região entre 1100 e 1200 cm^{-1} e, provavelmente, está relacionada a resquícios de componentes presentes na formulação de FFA⁶¹. Todas essas alterações são compatíveis com o processo de desmineralização iniciado pela cárie

artificial que foi intensificado pela ação do ácido fosfórico presente na composição de FFA^{61,134}, cujo mecanismo já foi elucidado anteriormente.

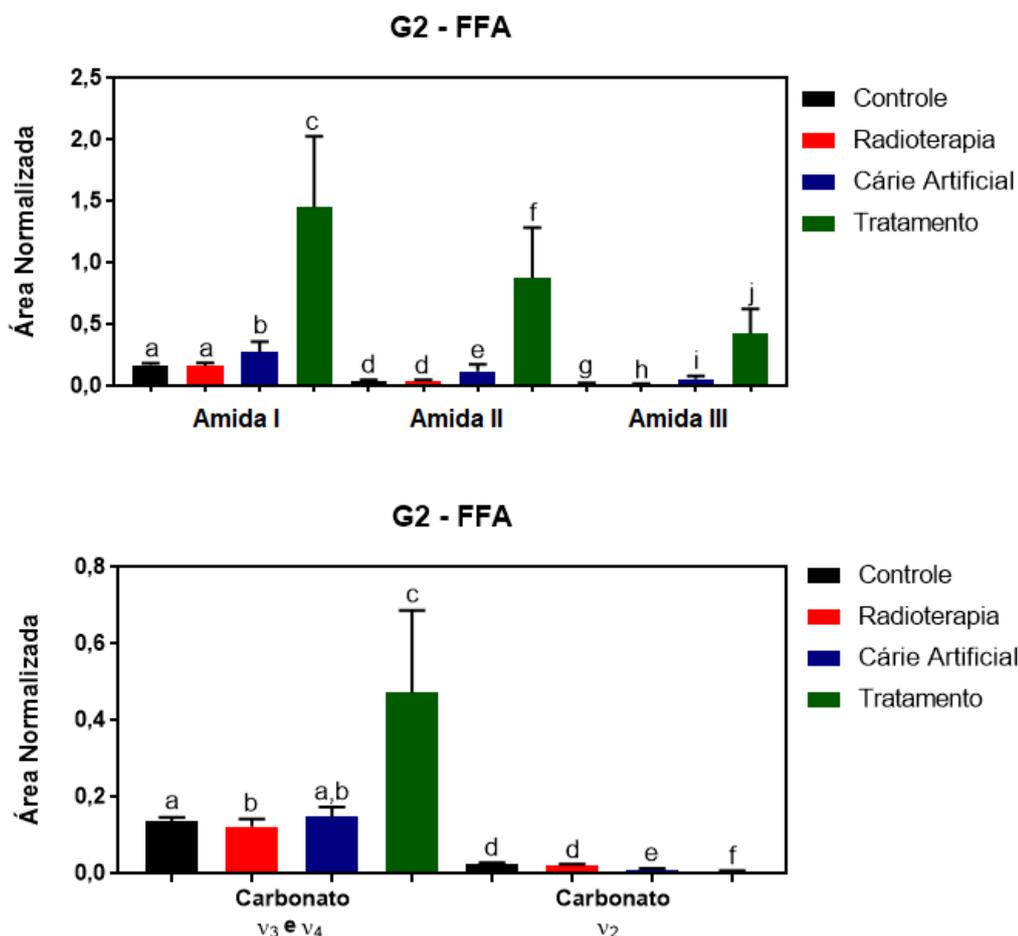
Figura 47: Média dos espectros de absorção no infravermelho, na região entre 1800 e 800 cm^{-1} , após normalização pela intensidade da banda ν_3 fosfato e traçado da linha de base, das amostras de dentina do grupo G2 em quatro etapas experimentais: controle, após a radioterapia, depois da desmineralização (cárie artificial) e após o tratamento com FFA.



Fonte: Do próprio autor.

A Figura 48 e a Tabela 6 apresentam a comparação estatística intergrupos das amostras de G2 e os valores de p resultantes desta, respectivamente.

Figura 48: Valores médios, com os respectivos desvios-padrão, das proporções das áreas normalizadas pela banda de fosfato ν_3 das principais bandas de absorção das amostras de dentina radicular sadias (controle), após radioterapia, depois da desmineralização (cárie artificial) e posterior tratamento com FFA. Letras distintas, acima de cada barra, indicam que há diferenças estatísticas entre os grupos segundo o teste de ANOVA de uma via com pós-teste de Holm-Sidak para amostras dependentes, com $\alpha=0,05$.



Fonte: Do próprio autor.

Tabela 6: Valores de p resultantes da comparação intergrupos de G2 (controle, radioterapia, cárie artificial e tratamento com FFA) das principais bandas de absorção da dentina por meio do teste de ANOVA de uma via com pós-teste de Holm-Sidak para amostras dependentes. Valores de p inferiores a 0,05 (em vermelho) são estatisticamente significantes.

	Valores de p				
	Amida I	Amida II	Amida III	Carbonato ν_2	Carbonato ν_3 e ν_4
Controle vs. Radioterapia	0,3677	0,7239	0,0225	0,1235	0,0224
Controle vs. Cárie Artificial	0,0035	0,0004	0,0001	<0,0001	0,2424
Controle vs. FFA	<0,0001	<0,0001	0,0001	<0,0001	0,0015
Radioterapia vs. Cárie Artificial	0,0035	0,0005	0,0001	<0,0001	0,0662
Radioterapia vs. FFA	<0,0001	<0,0001	0,0001	<0,0001	0,0015
Cárie Artificial vs. FFA	<0,0001	<0,0001	0,0001	0,0248	0,0015

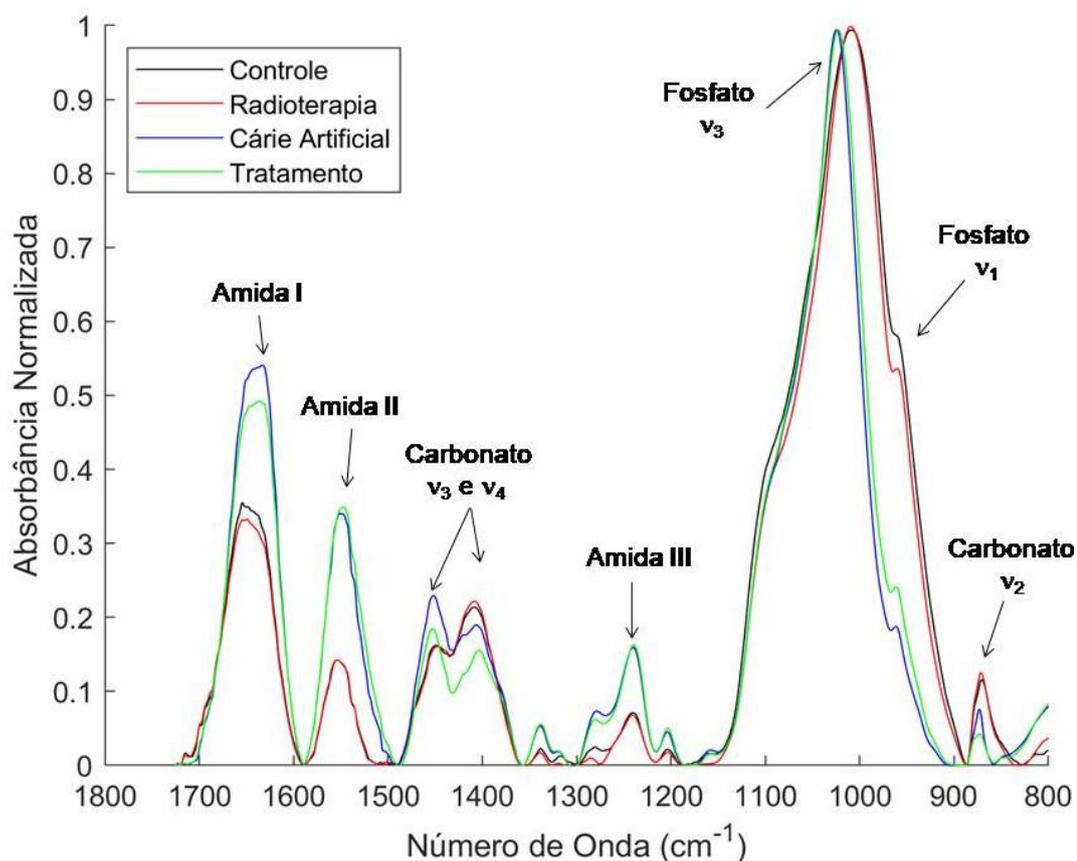
Fonte: Do próprio autor.

A comparação estatística apresentada na Figura 48 e na Tabela 6 confirmam as alterações observadas no espectro médio; ou seja, houve um aumento significativo nas bandas de amida (I, II e III), bem como de carbonato ν_3 e ν_4 que foi acompanhada de uma diminuição na banda de carbonato ν_2 . Reitera-se que a maior exposição de conteúdo orgânico, que ocasiona o aumento na intensidade da amida, deve-se à perda de fosfato^{133,134} que, neste caso, está relacionada ao mecanismo de ação do FFA^{134,140}. Outra possível (e mais provável) explicação para o aumento na intensidade das bandas correspondentes à matriz orgânica é a retenção de componentes presentes na formulação de FFA sobre a superfície das amostras tratadas que permaneceram mesmo após enxágue⁶¹. Além disso, o acréscimo na banda de carbonato ν_3 e ν_4 deve-se à interferência da banda de amida II²⁸. Por sua vez, a perda de carbonato, evidenciada pela redução significativa da banda correspondente no modo de vibração ν_2 , decorre também do mecanismo de ação do FFA, uma vez que o carbonato substitui íons fosfato no cristal de hidroxiapatita e, quando perdidos, seus sítios vacantes tornam-se propensos a substituição por fluoretos, o que permite a formação de estruturas cristalinas mais resistentes à ação de ácidos nos tecidos dentais^{27,33}.

É importante mencionar também que as bandas correspondentes aos glóbulos de CaF_2 , cuja presença foi constatada por meio das imagens de MEV do grupo G2, não foram detectadas por esta técnica de ATR-FTIR, pois coincidem com as bandas de absorção da dentina e são sobrepostas por estas⁶¹.

A Figura 49 exibe os espectros médios das amostras do grupo G3 cujo tratamento foi a irradiação com *laser* de Nd:YAG. É possível notar que não houve a extinção ou a formação de novas bandas após o tratamento, mas houve uma diminuição nas intensidades das bandas de amida I e de carbonato (nos modos de vibração ν_2 , ν_3 e ν_4). As demais bandas permaneceram praticamente inalteradas, quando se comparam os grupos cárie artificial e tratamento; com exceção apenas da banda do fosfato ν_1 , na qual houve um aumento após a irradiação *laser*. Todas essas alterações são compatíveis com as descritas na literatura decorrentes da ação térmica de *lasers* em alta intensidade sobre tecidos duros dentais^{15,28,61}.

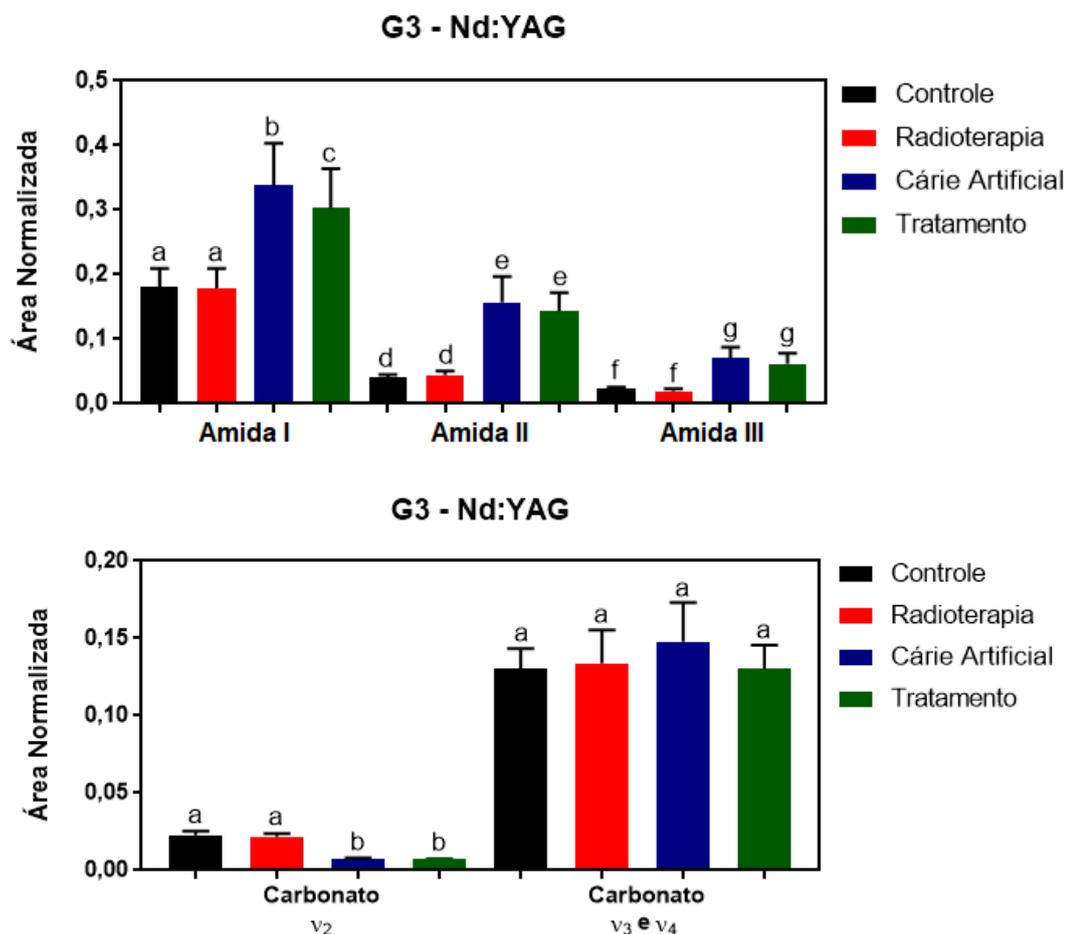
Figura 49: Média dos espectros de absorção no infravermelho, na região entre 1800 e 800 cm^{-1} , após normalização pela intensidade da banda ν_3 fosfato e traçado da linha de base, das amostras de dentina do grupo G3 em quatro etapas experimentais: controle, após a radioterapia, depois da desmineralização (cárie artificial) e após o tratamento com irradiação laser.



Fonte: Do próprio autor.

A Figura 50 e a Tabela 7 ilustram a comparação estatística intergrupos das amostras de G3 e os valores de p resultantes desta, respectivamente.

Figura 50: Valores médios, com os respectivos desvios-padrão, das proporções das áreas normalizadas pela banda de fosfato ν_3 das principais bandas de absorção das amostras de dentina radicular sadias (controle), após radioterapia, depois da desmineralização (cárie artificial) e posterior tratamento com irradiação *laser*. Letras distintas, acima de cada barra, indicam que há diferenças estatísticas entre os grupos segundo o teste de ANOVA de uma via com pós-teste de Holm-Sidak para amostras dependentes, com $\alpha=0,05$.



Fonte: Do próprio autor.

Tabela 7: Valores de p resultantes da comparação intergrupos de G3 (controle, radioterapia, cárie artificial e tratamento com irradiação *laser*) das principais bandas de absorção da dentina por meio do teste de ANOVA de uma via com pós-teste de Holm-Sidak para amostras dependentes. Valores de p inferiores a 0,05 (em vermelho) são estatisticamente significantes.

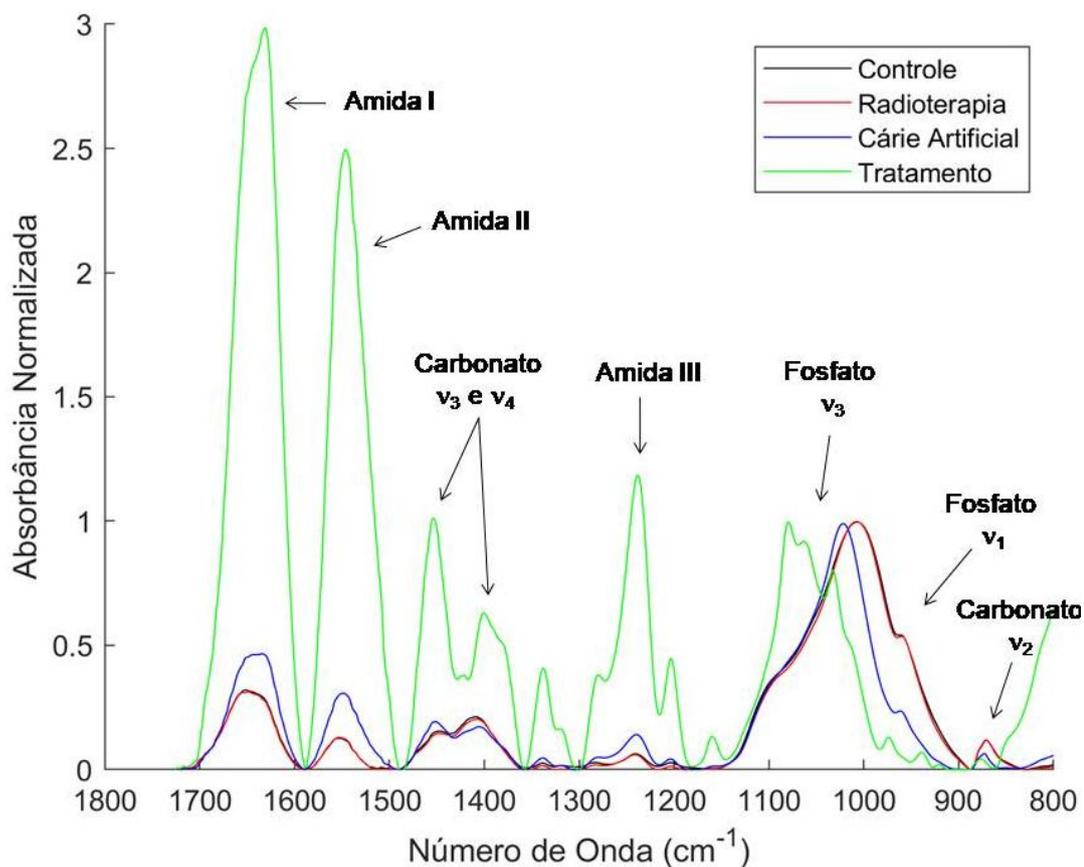
	Valores de p				
	Amida I	Amida II	Amida III	Carbonato ν_2	Carbonato ν_3 e ν_4
Controle vs. Radioterapia	0,7535	0,1449	0,0537	0,6109	0,8537
Controle vs. Cárie Artificial	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,2667
Controle vs. Nd:YAG	<0,0001	<0,0001	0,0001	<0,0001	0,9813
Radioterapia vs. Cárie Artificial	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,4765
Radioterapia vs. Nd:YAG	0,0002	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,8843
Cárie Artificial vs. Nd:YAG	0,0104	0,1449	0,0829	0,9703	0,06

Fonte: Do próprio autor.

Os dados apresentados na Figura 50 e na Tabela 7 confirmam as alterações observadas na Figura 49, ou seja, houve uma redução significativa nas bandas de amida I e de carbonato ν_2 após a irradiação *laser* e, portanto, estão relacionadas aos efeitos térmicos promovidos por esta. De modo mais específico, a perda de carbonato, além de conferir maior resistência à desmineralização pelos tecidos dentais^{61,84}, é um fenômeno que ocorre a 400 °C^{15,61}. Reitera-se, no entanto, que os aspectos morfológicos das amostras deste grupo são compatíveis com as de recristalização da hidroxiapatita que ocorre a 1100 °C^{14,28,61,84}. Em todo caso, sabe-se que a matriz orgânica é decomposta em temperaturas superiores a 350 °C⁶¹. Embora isso pudesse explicar a redução na intensidade da banda de amida I, parece pouco provável, haja vista que as demais bandas de amida não sofreram alteração alguma após a irradiação *laser*. Desta forma, é mais plausível que a diminuição na banda supracitada tenha relação com a vaporização de água causada pelo aquecimento superficial¹⁵, uma vez que esta banda coexiste com outra de água e são sobrepostas no espectro de ATR-FTIR^{28,81}.

A Figura 51 ilustra os espectros médios das amostras do grupo G4 que foram tratadas com a aplicação de FFA e posterior irradiação *laser*. É perceptível que o espectro médio pós-tratamento assemelha-se bastante ao correspondente no grupo G2. Desta forma, verifica-se que houve um aumento na intensidade das bandas da matriz orgânica (amidas I, II e III) e de carbonato ν_3 e ν_4 , bem como uma diminuição nas bandas de carbonato ν_2 e de fosfato (modos de vibração ν_1 e ν_3). Além disso, é perceptível que a banda de fosfato ν_3 sofreu alargamento e deslocamento para um número de onda maior (de 1024 para 1070 cm^{-1}). Houve, ainda, o surgimento de uma nova banda entre 1100 e 1200 cm^{-1} que é compatível com resquícios da formulação comercial de FFA utilizada neste estudo⁶¹. Todas essas alterações parecem ter sido decorrentes da ação do FFA que foi potencializada pela irradiação *laser*.

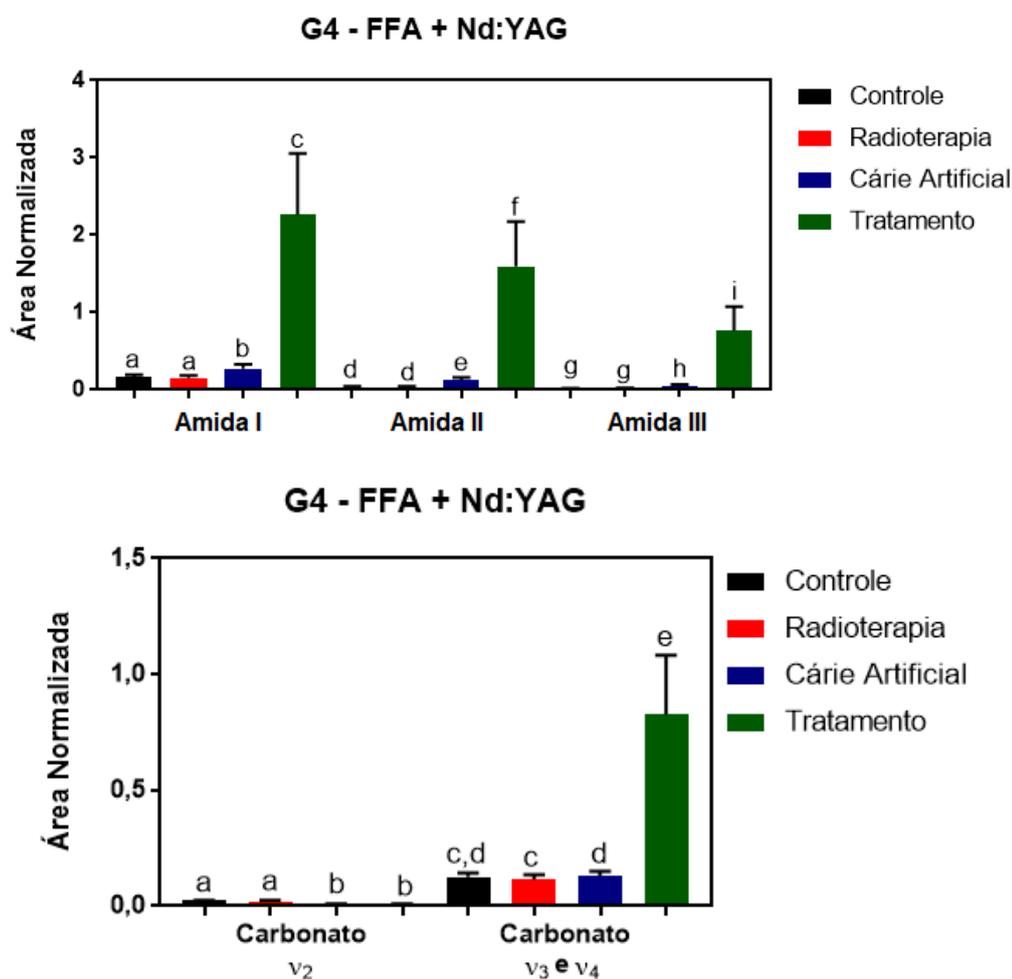
Figura 51: Média dos espectros de absorção no infravermelho, na região entre 1800 e 800 cm^{-1} , após normalização pela intensidade da banda ν_3 fosfato e traçado da linha de base, das amostras de dentina do grupo G4 em quatro etapas experimentais: controle, após a radioterapia, depois da desmineralização (cárie artificial) e após o tratamento com FFF+Nd:YAG.



Fonte: Do próprio autor.

A Figura 52 e a Tabela 8 apresentam a comparação estatística intergrupos para as amostras do grupo G4 e os valores de p resultantes de tal comparação.

Figura 52: Valores médios, com os respectivos desvios-padrão, das proporções das áreas normalizadas pela banda de fosfato ν_3 das principais bandas de absorção das amostras de dentina radicular sadias (controle), após radioterapia, depois da desmineralização (cárie artificial) e posterior tratamento com FFA+Nd:YAG. Letras distintas, acima de cada barra, indicam que há diferenças estatísticas entre os grupos segundo o teste de ANOVA de uma via com pós-teste de Holm-Sidak para amostras dependentes, com $\alpha=0,05$.



Fonte: Do próprio autor.

Tabela 8: Valores de p resultantes da comparação intergrupos de G4 (controle, radioterapia, cárie artificial e tratamento com FFA+Nd:YAG) das principais bandas de absorção da dentina por meio do teste de ANOVA de uma via com pós-teste de Holm-Sidak para amostras dependentes. Valores de p inferiores a 0,05 (em vermelho) são estatisticamente significantes.

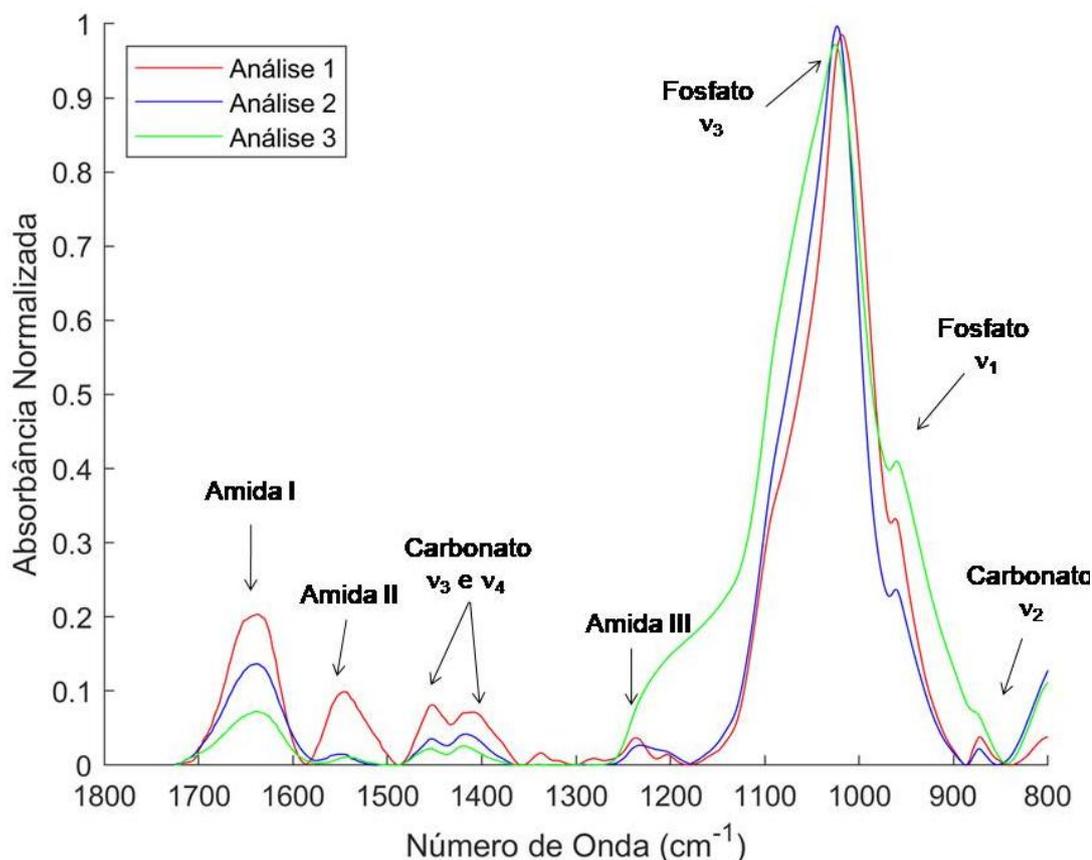
	Valores de p				
	Amida I	Amida II	Amida III	Carbonato ν_2	Carbonato ν_3 e ν_4
Controle vs. Radioterapia	0,5308	0,346	0,8036	0,0952	0,0676
Controle vs. Cárie Artificial	0,0006	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,336
Controle vs. FFA+Nd:YAG	<0,0001	<0,0001	0,0001	<0,0001	<0,0001
Radioterapia vs. Cárie Artificial	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0324
Radioterapia vs. FFA+Nd:YAG	<0,0001	<0,0001	0,0001	<0,0001	<0,0001
Cárie Artificial vs. FFA+Nd:YAG	<0,0001	<0,0001	0,0001	0,7324	<0,0001

Fonte: Do próprio autor.

As informações na Figura 52 e na Tabela 12 estão em concordância com as alterações qualitativas apresentadas na Figura 51; ou seja, houve aumentos estatisticamente significantes em todas as bandas da matriz orgânica, bem como na banda de carbonato ν_3 e ν_4 após o tratamento com FFA e irradiação *laser*, de forma que apenas a banda de carbonato ν_1 permaneceu inalterada. Os motivos que justificam tais alterações foram elucidados oportunamente nas considerações sobre o grupo G3. Contudo, é importante mencionar que a literatura é controversa a respeito dos efeitos da associação entre FFA e irradiação *laser*, que se deve, em parte, à ordem dos tratamentos⁶¹. Apesar disso, a maioria dos estudos em que há a aplicação de FFA com posterior irradiação *laser* indica que a combinação dos tratamentos não promove alterações composicionais diferentes daquelas provocadas por cada um individualmente, tal como as observadas neste presente estudo^{15,61,84}.

Em relação ao grupo G5, cujas amostras foram tratadas apenas com a aplicação de Biosilicato[®] (BS), houve uma variabilidade nos espectros pós-tratamento que dificultou a padronização de um método de normalização que permitisse a semiquantificação das áreas sob as bandas. Na Figura 53 são representadas as curvas médias dos três tipos de análises que foram desenvolvidas na tentativa de se estabelecer um padrão para normalização. A análise 1 (linha vermelha) considerou o mesmo método de normalização que os demais grupos, isto é, a área sob todas as bandas de absorção foram divididas pela área sob a banda de fosfato ν_3 , e depois, traçou-se a linha de base. Na análise 2 (linha azul), somaram-se às áreas sob as bandas da amida III e de fosfato ν_3 para normalização e posterior traçado da linha de base. E, por fim, na análise 3 (linha verde), somaram-se as áreas sob as bandas de amida III, fosfato ν_3 e carbonato ν_2 para normalização e, em seguida, realizar o traçado da linha de base. É importante mencionar que das 15 amostras deste grupo, 6 puderam ser analisadas pelo método 1; 3, pelo método 2 e outras 6 pelo método 3. Como o número de amostras analisadas por cada método foi muito reduzido e era impossível somar os resultados de diferentes métodos, optou-se por não fazer a análise semiquantitativa para o grupo G5 a fim de que não houvesse conclusões errôneas a respeito das características composicionais deste grupo.

Figura 53: Espectros médios resultantes dos três métodos de normalização utilizados na tentativa de padronização para análise semiquantitativa. Na análise 1 (linha vermelha), a normalização foi feita com base na área sob a banda de fosfato ν_3 ; na análise 2 (linha azul), somaram-se as áreas sob as bandas de amida III e fosfato ν_3 e, na análise 3 (linha verde), as áreas sob as bandas de amida III, fosfato ν_3 e carbonato ν_2 foram somadas.

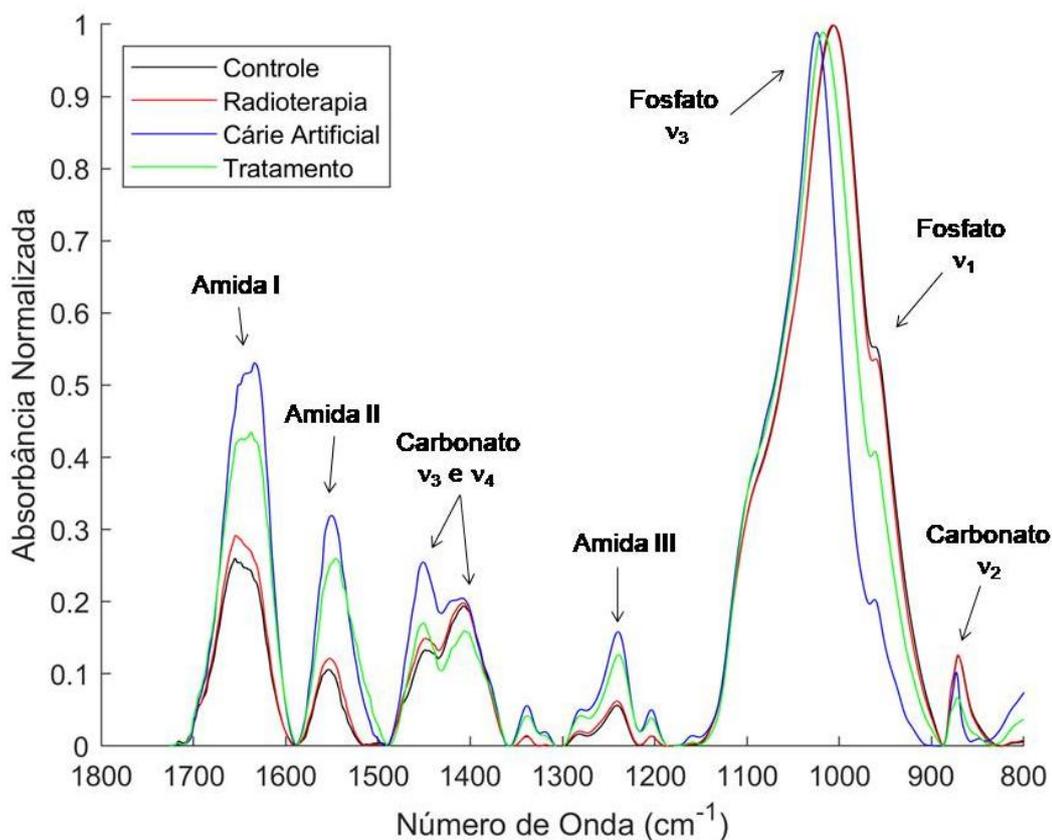


Fonte: Do próprio autor.

Ainda a respeito da Figura 53, é perceptível que os três espectros médios são bastante similares entre si. Observa-se, contudo, que os espectros das análises 2 e 3 apresentam intensidades reduzidas nas bandas correspondentes à matriz orgânica (amida I, II e III) e de carbonato ν_2 e ν_3 quando comparados com o espectro da análise 1. Além disso, é notável no espectro da análise 3, que há um alargamento da banda de fosfato ν_3 com o surgimento de um ombro na região entre 1100 e 1300 cm^{-1} que se sobrepõe à banda de amida III. Todas essas alterações verificadas nos três espectros são sugestivas de que o BS recobriu superficialmente a dentina de modo a diminuir a exposição de colágeno e aumentar a quantidade de minerais. Além disso, a variabilidade no formato dos espectros corrobora os achados morfológicos (Figura 42) que demonstraram que o tratamento não foi uniforme.

A Figura 54, por sua vez, apresenta os espectros médios das amostras do grupo G6 que foi tratado com a aplicação de Biosilicato[®] (BS) com posterior irradiação *laser*. É possível notar que houve uma diminuição na intensidade das bandas da matriz orgânica (amidas I, II e III), bem como das bandas de carbonato (ν_2 , ν_3 e ν_4). Contudo, verifica-se um aumento na intensidade da banda de fosfato ν_1 e um deslocamento da banda de fosfato ν_3 para um número de onda menor (de 1070 para aproximadamente 1050 cm^{-1}). Ainda, salienta-se que o espectro médio pós-tratamento é similar ao correspondente do grupo G3 (Figura 49), o que permite inferir, *a priori*, que as alterações observadas são decorrentes dos efeitos térmicos provenientes da irradiação *laser*.

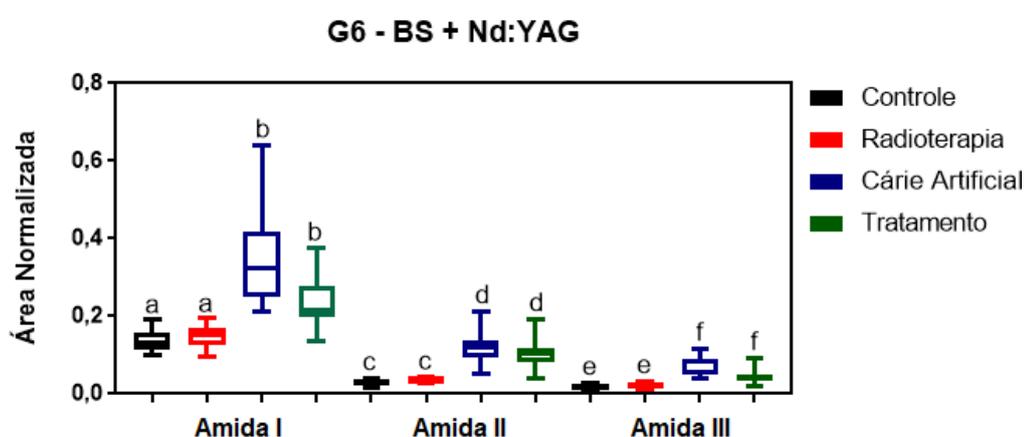
Figura 54: Média dos espectros de absorção no infravermelho, na região entre 1800 e 800 cm^{-1} , após normalização pela intensidade da banda ν_3 fosfato e traçado da linha de base, das amostras de dentina do grupo G6 em quatro etapas experimentais: controle, após a radioterapia, depois da desmineralização (cárie artificial) e após o tratamento com BS+Nd:YAG.



Fonte: Do próprio autor.

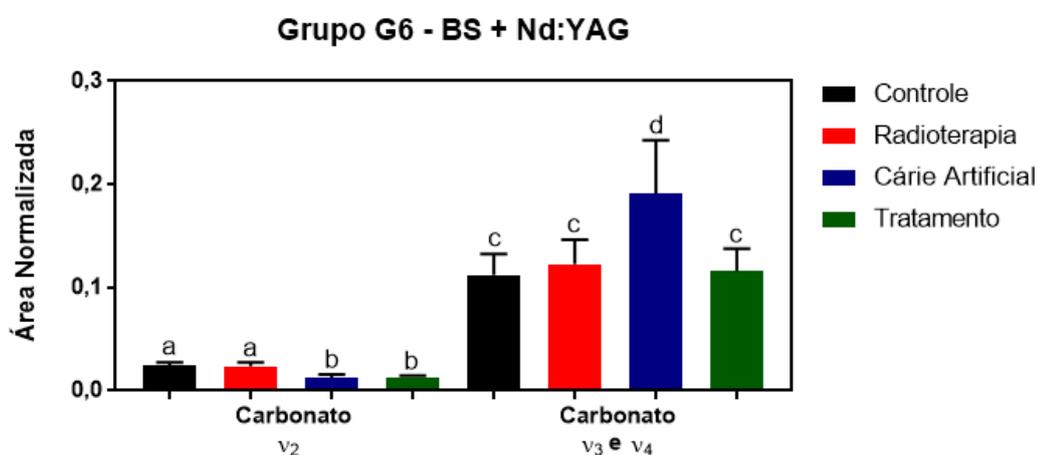
A análise estatística da comparação semiquantitativa das bandas de absorção, proporcionalmente em relação à banda de fosfato ν_3 , dos quatro grupos (controle, radioterapia, cárie artificial e tratamento) está ilustrada nas Figura 55 e Figura 56 e os valores de p, por sua vez, estão descritos na Tabela 9.

Figura 55: Distribuição dos valores médios, com os respectivos desvios-padrão e medianas, das proporções das áreas normalizadas pela banda de fosfato ν_3 das bandas da matriz orgânica (amidas I, II e III) das amostras de dentina radicular sadias (controle), após radioterapia e depois da desmineralização (cárie artificial) e tratamento com BS+Nd:YAG. Letras distintas, acima de cada barra, indicam que há diferenças estatísticas entre os grupos segundo o teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn para amostras independentes, com $\alpha=0,05$.



Fonte: Do próprio autor.

Figura 56: Valores médios, com os respectivos desvios-padrão, das proporções das áreas normalizadas pela banda de fosfato ν_3 das bandas da matriz inorgânica (nos modos de vibração ν_2 , ν_3 e ν_4) das amostras de dentina radicular sadias (controle), após radioterapia, depois da desmineralização (cárie artificial) e tratamento com BS+Nd:YAG. Letras distintas, acima de cada barra, indicam que há diferenças estatísticas entre os grupos segundo o teste de ANOVA de uma via com pós-teste de Holm-Sidak para amostras independentes, com $\alpha=0,05$.



Fonte: Do próprio autor.

Tabela 9: Valores de p resultantes da comparação intergrupos de G6 (controle, radioterapia, cárie artificial e tratamento) por meio do teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn para as bandas da matriz orgânica (amidas I, II e III) ou de ANOVA de uma via com pós-teste de Holm-Sidak para as bandas da matriz inorgânica (carbonato ν_2, ν_3 e ν_4). Ambos os testes consideraram amostras independentes. Valores de p inferiores a 0,05 (em vermelho) são estatisticamente significantes.

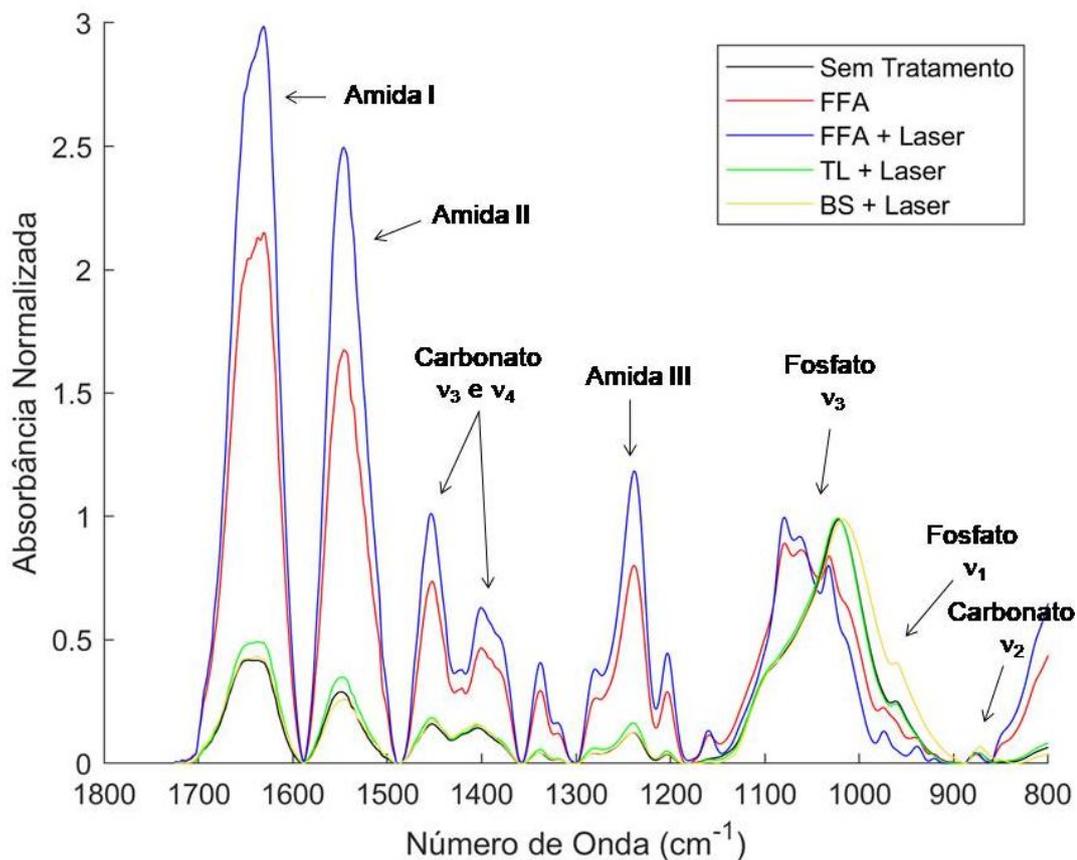
	Valores de p				
	Amida I	Amida II	Amida III	Carbonato ν_2	Carbonato ν_3 e ν_4
	Controle vs. Radioterapia	>0,9999	>0,9999	>0,9999	0,7632
Controle vs. Cárie Artificial	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Controle vs. BS+Nd:YAG	0,001	0,0002	0,0006	<0,0001	0,8314
Radioterapia vs. Cárie Artificial	<0,0001	0,0015	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Radioterapia vs. BS+Nd:YAG	0,0144	0,0178	0,008	<0,0001	0,8314
Cárie Artificial vs. BS+Nd:YAG	0,4932	>0,9999	>0,9999	0,7632	<0,0001

Fonte: Do próprio autor.

Diferentemente do que ocorreu nos demais grupos, a análise semiquantitativa não corroborou as alterações que foram observadas qualitativamente no espectro médio pós-tratamento em relação às demais etapas experimentais. Houve apenas uma redução estatisticamente significativa na banda de carbonato ν_3 e ν_4 , que é influenciada pela banda da amida II, e uma tendência de redução nas demais bandas referentes à matriz orgânica, o que sugere ser resultado do efeito térmico da irradiação *laser*.

E, por fim, a Figura 57 apresenta os espectros médios pós-tratamentos dos cinco grupos (G1, G2, G3, G4 e G6). Qualitativamente, é possível confirmar a similaridade entre os espectros dos grupos G2 e G4 (tratados com FFA e FFA com posterior irradiação *laser*, respectivamente), bem como entre os de G1, G3 e G6 (sem tratamento, irradiação com *laser* e aplicação de BS com posterior irradiação *laser*, respectivamente).

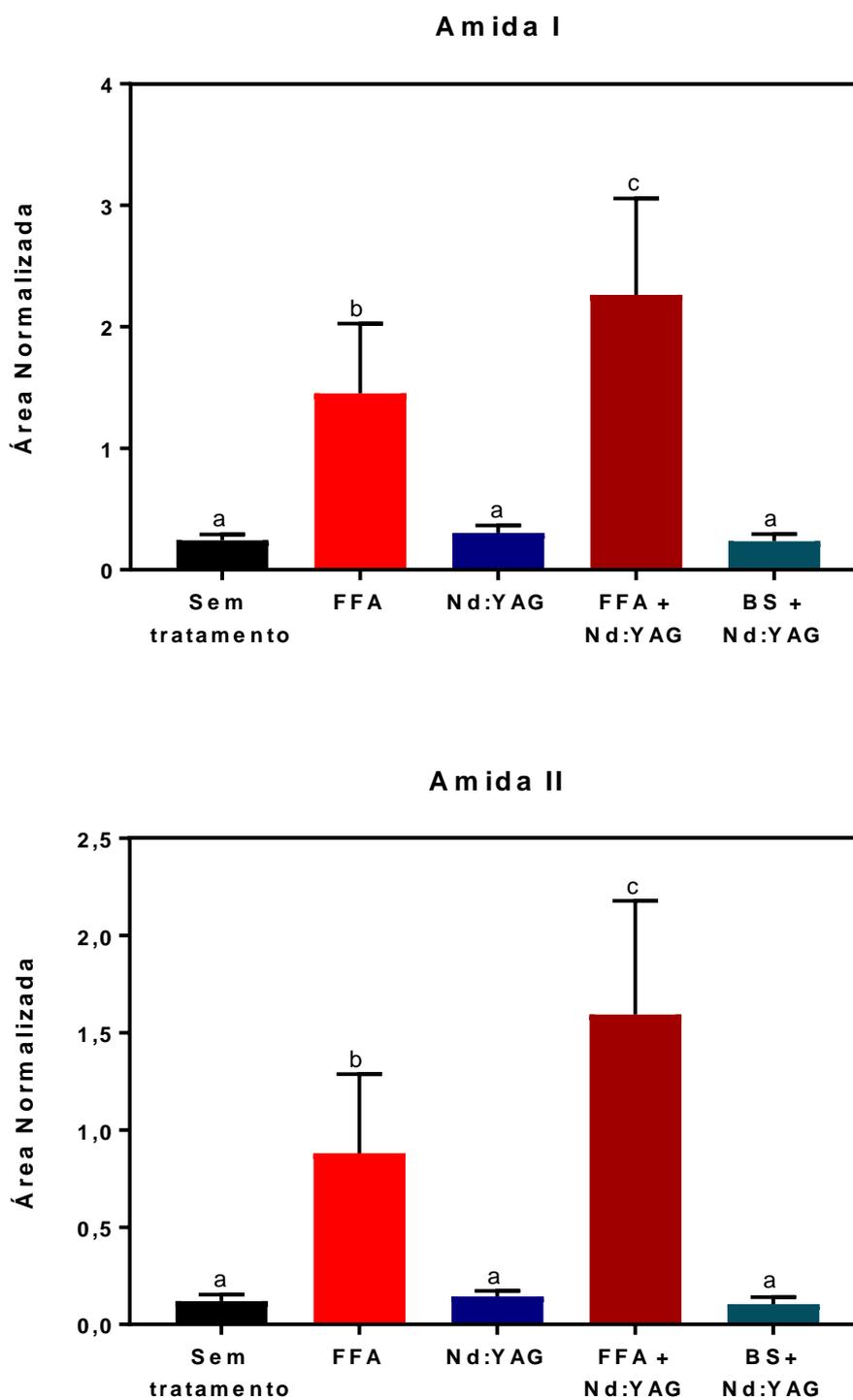
Figura 57: Média dos espectros de absorção no infravermelho, na região entre 1800 e 800 cm^{-1} , após normalização pela intensidade da banda ν_3 fosfato e traçado da linha de base, das amostras de dentina dos grupos G1 a G6, exceto G5. G1 – sem tratamento; G2 – FFA; G3 – Nd:YAG (TL+laser); G4 – FFA+Nd:YAG (FFA+Laser); G6 – BS+Nd:YAG (BS+Laser).



Fonte: Do próprio autor.

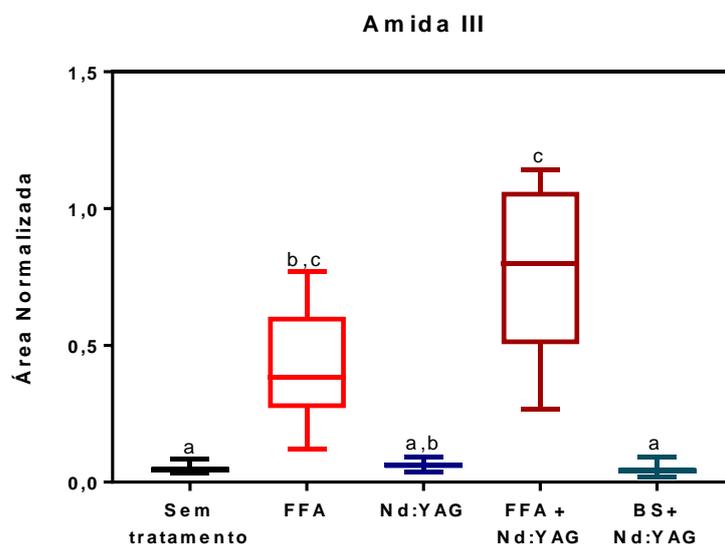
As Figuras 58, 59 e 60 apresentam a comparação estatística da análise semiquantitativa das bandas de absorção, proporcionalmente em relação à banda de fosfato ν_3 , de cinco dos seis grupos experimentais deste estudo (G1, G2, G3, G4 e G6). A Tabela 10, por sua vez, discrimina os valores de p resultantes de tal análise.

Figura 58: Valores médios, com os respectivos desvios-padrão, das proporções das áreas normalizadas pela banda de fosfato ν_3 das bandas de amida I e II dos grupos G1 (sem tratamento), G2 (FFA), G3 (Nd:YAG), G4 (FFA+Nd:YAG) e G6 (BS+Nd:YAG). Letras distintas, acima de cada barra, indicam que há diferenças estatísticas entre os grupos segundo o teste de ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey para amostras independentes, com $\alpha=0,05$.



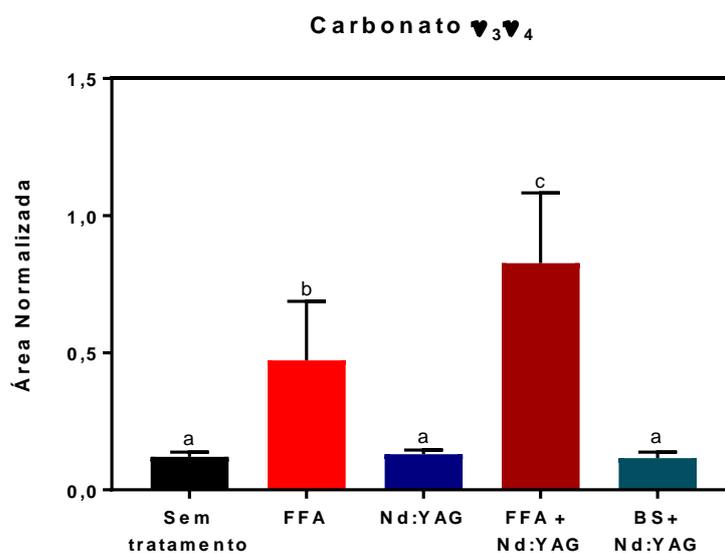
Fonte: Do próprio autor.

Figura 59: Distribuição dos valores médios, com os respectivos desvios-padrão e medianas, das proporções das áreas normalizadas pela banda de fosfato ν_3 da banda de amida III dos grupos G1 (sem tratamento), G2 (FFA), G3 (Nd:YAG), G4 (FFA+Nd:YAG) e G6 (BS+Nd:YAG). Letras distintas, acima de cada barra, indicam que há diferenças estatísticas entre os grupos segundo o teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn para amostras independentes, com $\alpha=0,05$.



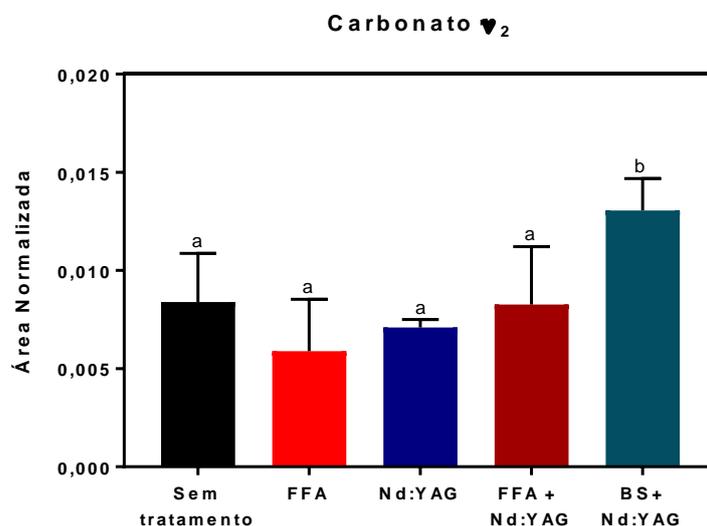
Fonte: Do próprio autor.

Figura 60: Valores médios, com os respectivos desvios-padrão, das proporções das áreas normalizadas pela banda de fosfato ν_3 das bandas de carbonato ν_2 , ν_3 e ν_4 dos grupos G1 (sem tratamento), G2 (FFA), G3 (Nd:YAG), G4 (FFA+Nd:YAG) e G6 (BS+Nd:YAG). Letras distintas, acima de cada barra, indicam que há diferenças estatísticas entre os grupos segundo o teste de ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey para amostras independentes, com $\alpha=0,05$.



Fonte: Do próprio autor.

Figura 60 (cont.): Valores médios, com os respectivos desvios-padrão, das proporções das áreas normalizadas pela banda de fosfato ν_3 das bandas de carbonato ν_2 , ν_3 e ν_4 dos grupos G1 (sem tratamento), G2 (FFA), G3 (Nd:YAG), G4 (FFA+Nd:YAG) e G6 (BS+Nd:YAG). Letras distintas, acima de cada barra, indicam que há diferenças estatísticas entre os grupos segundo o teste de ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey para amostras independentes, com $\alpha=0,05$.



Fonte: Do próprio autor.

Tabela 10: Valores de p resultantes da comparação intergrupos (G1, G2, G3, G4 e G6) por meio do teste de ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey para as bandas de amida (I e II) e de carbonato (ν_2, ν_3 e ν_4) ou de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn para a banda de amida III. Ambos os testes consideraram amostras independentes. Valores de p inferiores a 0,05 (em vermelho) são estatisticamente significantes.

	Valores de p				
	Amida I	Amida II	Amida III	Carbonato ν_2	Carbonato ν_3 e ν_4
Sem tratamento vs. FFA	<0,0001	<0,0001	0,0018	0,0737	<0,0001
Sem tratamento vs. Nd:YAG	0,9973	0,9999	>0,9999	0,7301	0,9998
Sem tratamento vs. FFA+Nd:YAG	<0,0001	<0,0001	<0,0001	>0,9999	<0,0001
Sem tratamento vs. BS+Nd:YAG	>0,9999	>0,9999	>0,9999	0,0002	>0,9999
FFA vs. Nd:YAG	<0,0001	<0,0001	0,0665	0,7777	<0,0001
FFA vs. FFA+Nd:YAG	0,0003	<0,0001	>0,9999	0,1291	<0,0001
FFA vs. BS+Nd:YAG	<0,0001	<0,0001	0,0001	<0,0001	<0,0001
Nd:YAG vs. FFA+Nd:YAG	<0,0001	<0,0001	0,0039	0,8202	<0,0001
Nd:YAG vs. BS+Nd:YAG	0,9938	0,9987	>0,9999	<0,0001	0,9993
FFA+Nd:YAG vs. BS+Nd:YAG	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0002	<0,0001

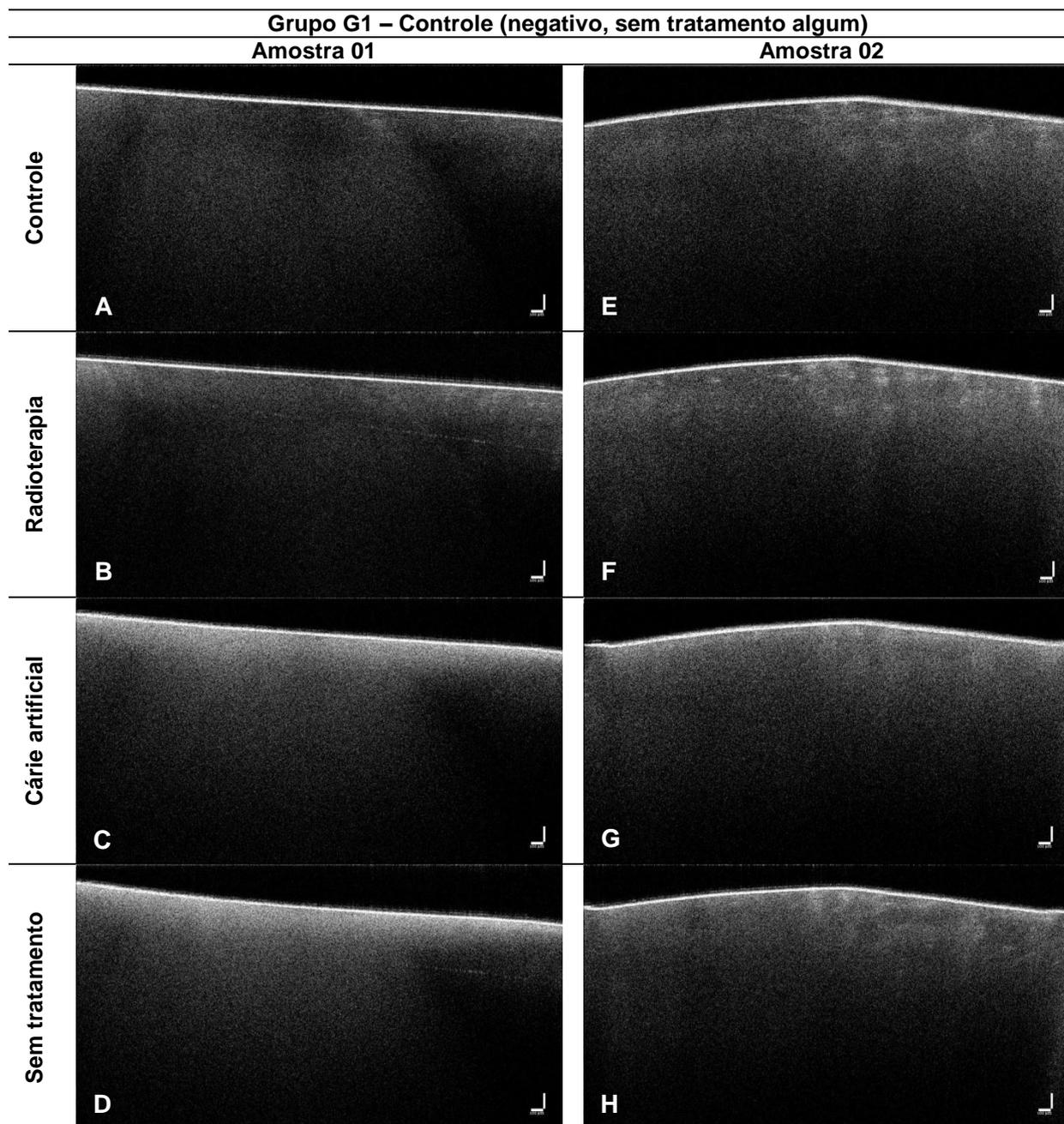
Fonte: Do próprio autor.

Como pode ser observado nas Figuras 58,59 e 60, bem como na Tabela 10, a comparação estatística intergrupos da análise semiquantitativa estão em concordância com a Figura 57. Salienta-se que, de fato, os grupos G2 e G4, que fizeram uso de FFA, possuem maior exposição de conteúdo orgânico em comparação com os demais. Além disso, a irradiação *laser* intensificou a ação do FFA, o que ocasionou um aumento significativo nas bandas da matriz orgânica e de carbonato ν_3 e ν_4 quando se comparam os grupos G4 e G2. É evidente também que o grupo G6, cujo tratamento foi uma combinação de BS com posterior irradiação *laser*, foi o único que promoveu um aumento na banda de carbonato ν_2 que pode ser justificado pela incorporação desse componente à dentina a partir da formação de hidroxiapatita carbonatada ocasionada pelo BS.

5.3.2.3. Avaliação de propriedades ópticas por OCT

A Figura 61 apresenta imagens de *B-scan* representativas do grupo G1, que corresponde ao controle negativo, isto é, sem tratamento algum.

Figura 61: Imagens de *B-scan* de dois blocos de dentina representativos do grupo G1. Escala: 100 μm .



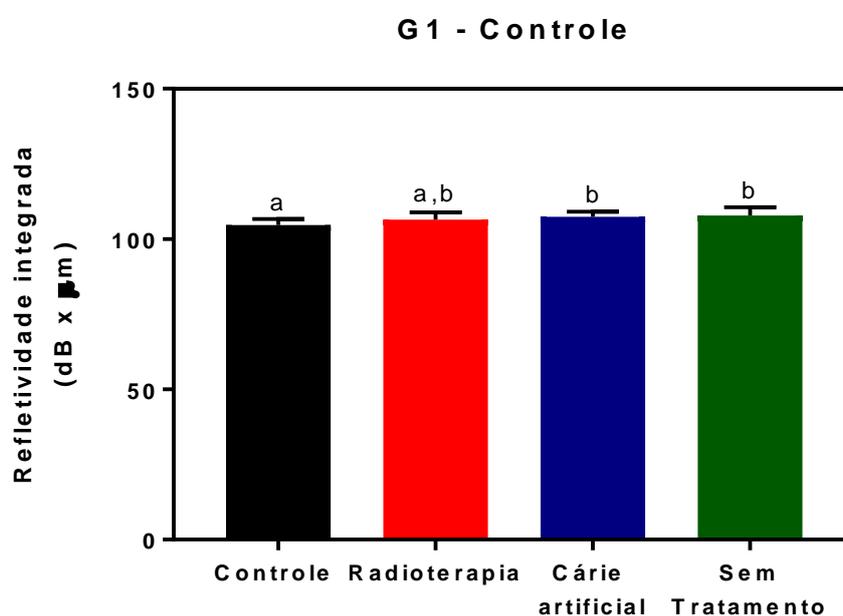
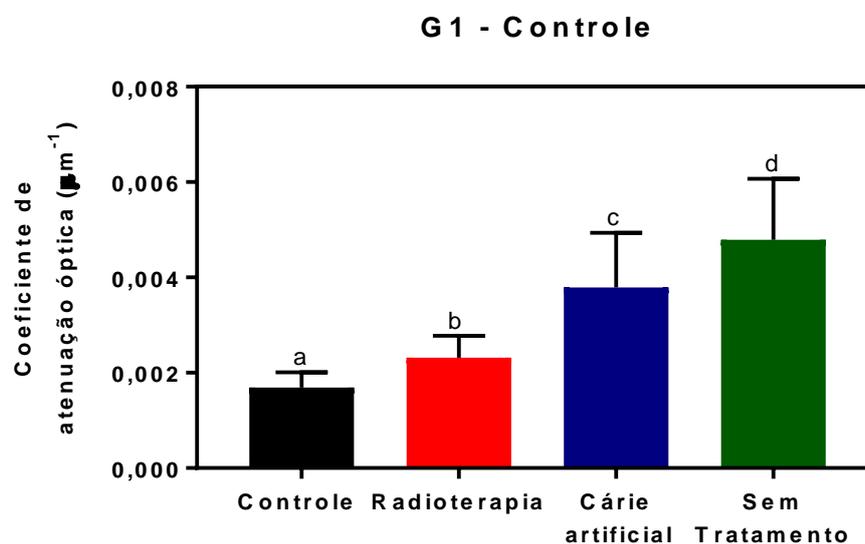
Fonte: Do próprio autor.

Como pode ser observado na sequência de *B-scan* apresentada nas Figuras 61A-D, a região analisada da amostra 1 adquire brilho mais intenso de maneira gradual conforme o processo de desmineralização intensifica-se, sobretudo em dois momentos: após a radioterapia (Figura 61B) e depois da indução de cárie artificial (Figura 61C). Apesar da imersão em saliva artificial, a imagem obtida após o tratamento (Figura 61D) aparenta ter mais brilho que a Figura 61C.

Algo semelhante acontece na sequência de imagens exibida nas Figuras 61E-H. Após a radioterapia (Figura 61F), observa-se a intensificação do sinal da OCT em pequenas regiões no interior da dentina, que é resultante da combinação de dois efeitos: a acentuação de poros preexistentes e o surgimento de novas porosidades por causa da perda de minerais^{113,114}. Com a progressão do processo de desmineralização após a cárie artificial (Figura 61G), o interior da dentina adquire tonalidade branca e torna impossível a distinção dos microporos. Entretanto, após a imersão em saliva artificial (Figura 61H), é possível observar novamente a presença de pequenas regiões com sinal mais intenso no interior da dentina, o que sugere que o processo de desmineralização continuou em andamento.

Assim como foi feito anteriormente, calcularam-se os valores médios do coeficiente de atenuação óptica total ($\bar{\mu}_t$) e de refletividade integrada (ΔR) (Figura 62) para quantificar as alterações ópticas promovidas pelos tratamentos propostos. A Tabela 11, por sua vez, discrimina os valores de p resultantes da análise estatística intergrupos.

Figura 62: Valores médios, com os respectivos desvios-padrão, dos coeficientes de atenuação óptica total (μ_t) e de refletividade integrada (ΔR) das amostras de dentina radicular do grupo G1 em quatro condições: hígidas (controle), radioterapia, cárie artificial e imersão em saliva artificial por 24 horas (sem tratamento algum). Letras distintas acima de cada barra denotam diferenças estatisticamente significantes ($\alpha=0,05$) de acordo com o teste de ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey para amostras dependentes.



Fonte: Do próprio autor.

Tabela 11: Valores de p resultantes da comparação intergrupos (controle, radioterapia, cárie artificial e tratamento) das médias dos coeficientes de atenuação óptica total ($\bar{\mu}_t$) e de refletividade integrada (ΔR) de G1 por meio do teste de ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey para amostras dependentes. Valores de p inferiores a 0,05 são estatisticamente significantes.

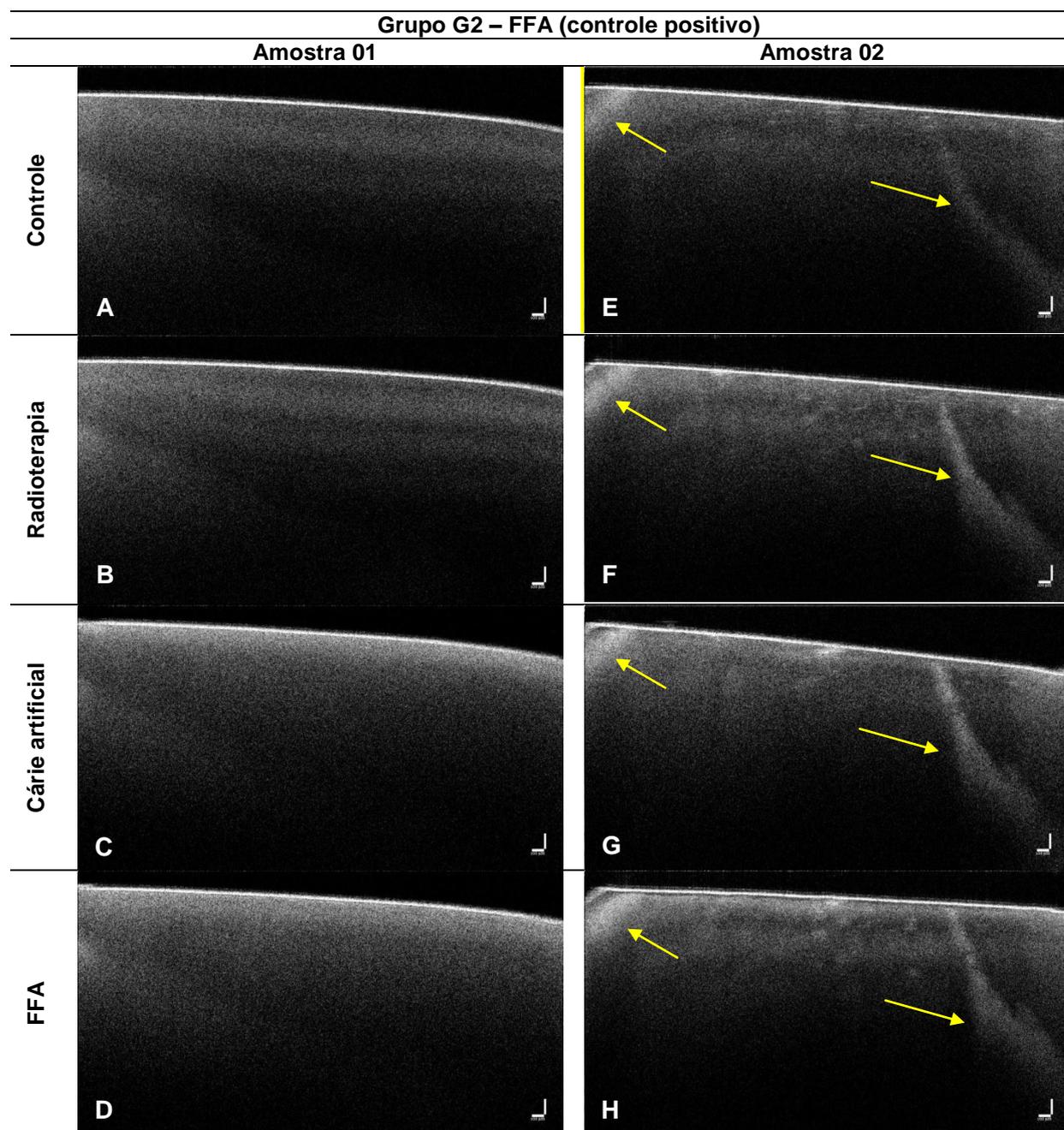
	Valores de p	
	$\bar{\mu}_t$	ΔR
Controle vs. Radioterapia	0,0168	0,0865
Controle vs. Cárie artificial	0,0012	0,0034
Controle vs. Imersão em saliva artificial – sem tratamento	<0,0001	0,0008
Radioterapia vs. Cárie artificial	0,0023	0,3605
Radioterapia vs. Imersão em saliva artificial – sem tratamento	0,0001	0,3898
Cárie artificial vs. Imersão em saliva artificial – sem tratamento	0,0228	0,7781

Fonte: Do próprio autor.

A partir da Figura 62 e Tabela 11, é possível constatar a progressão do processo de desmineralização, haja vista a existência de diferenças estatisticamente significantes entre os grupos analisados, mediante o aumento de $\bar{\mu}_t$. Apesar de ΔR não apresentar diferenças na comparação entre os grupos radioterapia, cárie artificial e sem tratamento (imersão em saliva), todos esses grupos (exceto radioterapia) são diferentes do controle, que possui o menor valor médio para esta propriedade. O aumento em $\bar{\mu}_t$, como mencionado anteriormente, é um indicativo de desmineralização^{87,112,113}, embora haja controvérsias entre os estudos.

A Figura 63, por sua vez, apresenta imagens de *B-scan* representativas do grupo G2, no qual as amostras foram tratadas com flúor fosfato acidulado (FFA).

Figura 63: Imagens de *B-scan* de dois blocos de dentina representativos do grupo G2 (tratamento com FFA). As setas indicam defeitos preexistentes. Escala: 100 μ m.



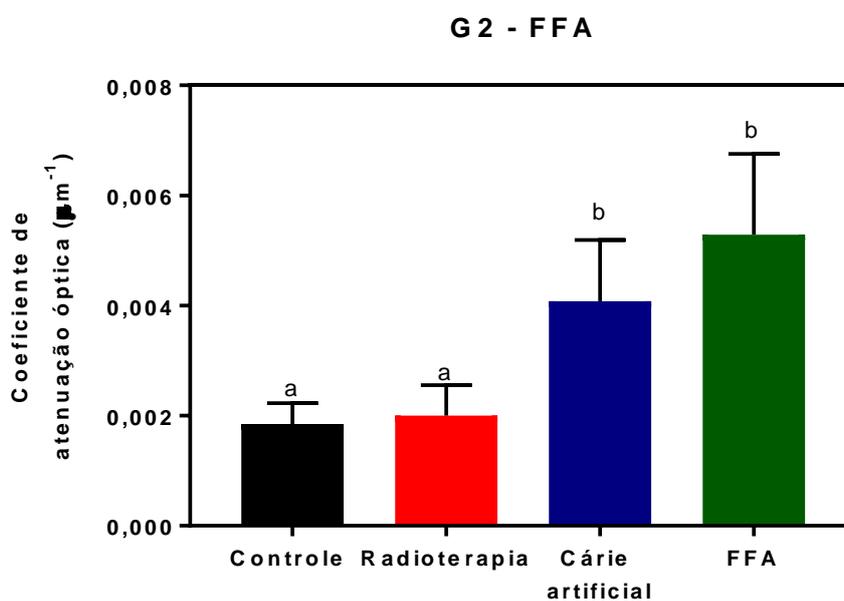
Fonte: Do próprio autor.

Observa-se na Figura 63 que, em ambas as amostras, há uma intensificação gradual da tonalidade branca desde o início do experimento (Figuras 63A e E) até o tratamento (Figuras 63D e H). De modo particular, na sequência de imagens nas Figuras 63E - H, constata-se uma progressão sucessiva na intensidade do sinal em

defeitos preexistentes na amostra de dentina. Como mencionado, esses padrões de imagem são indícios de processo de desmineralização.

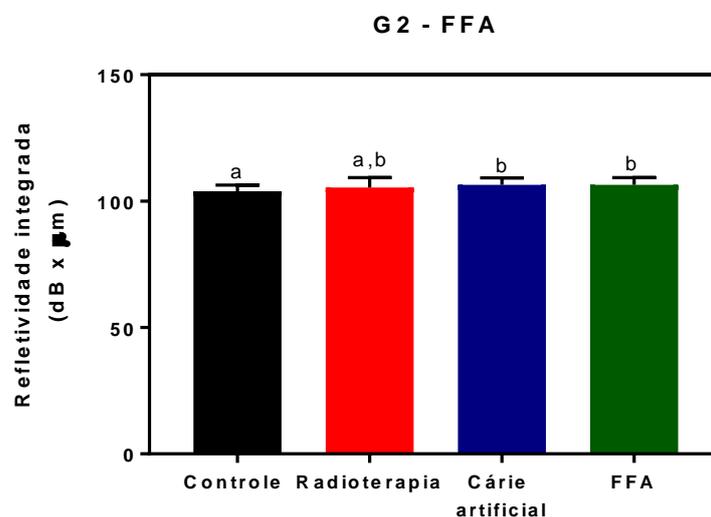
Os valores de $\bar{\mu}_t$ e de ΔR (Figura 64), por sua vez, sugerem que o tratamento com flúor não foi capaz de remineralizar as amostras, haja vista a inexistência de diferenças estatísticas entre os grupos cárie artificial e tratamento. Vale lembrar que as medidas de OCT feitas após o tratamento referem-se ao tratamento com posterior imersão em saliva artificial por 24 horas. Em contrapartida, o grupo tratamento exibe diferenças significantes em relação aos grupos controle e radioterapia, com aumento no valor médio de ambos os parâmetros.

Figura 64: Valores médios, com os respectivos desvios-padrão, dos coeficientes de atenuação óptica total ($\bar{\mu}_t$) e de refletividade integrada (ΔR) das amostras de dentina radicular do grupo G2 em quatro condições: hígidas (controle), radioterapia, cárie artificial e tratamento (FFA). Letras distintas acima de cada barra denotam diferenças estatisticamente significantes ($\alpha=0,05$) de acordo com o teste de ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey para amostras dependentes.



Fonte: Do próprio autor.

Figura 59 (cont.): Valores médios, com os respectivos desvios-padrão, dos coeficientes de atenuação óptica total ($\bar{\mu}_t$) e de refletividade integrada (ΔR) das amostras de dentina radicular do grupo G2 em quatro condições: hígidas (controle), radioterapia, cárie artificial e tratamento (FFA). Letras distintas acima de cada barra denotam diferenças estatisticamente significantes ($\alpha=0,05$) de acordo com o teste de ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey para amostras dependentes.



Fonte: Do próprio autor.

Tabela 12: Valores de p resultantes da comparação intergrupos (controle, radioterapia, cárie artificial e tratamento com FFA) das médias dos coeficientes de atenuação óptica total ($\bar{\mu}_t$) e de refletividade integrada (ΔR) de G2 por meio do teste de ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey para amostras dependentes. Valores de p inferiores a 0,05 são estatisticamente significantes.

	Valores de p	
	$\bar{\mu}_t$	ΔR
Controle vs. Radioterapia	0,4161	0,2892
Controle vs. Cárie artificial	0,0023	0,0029
Controle vs. Tratamento com FFA	<0,0001	0,0007
Radioterapia vs. Cárie artificial	0,0034	0,373
Radioterapia vs. Tratamento com FFA	0,0001	0,4598
Cárie artificial vs. Tratamento com FFA	0,2575	0,9999

Fonte: Do próprio autor.

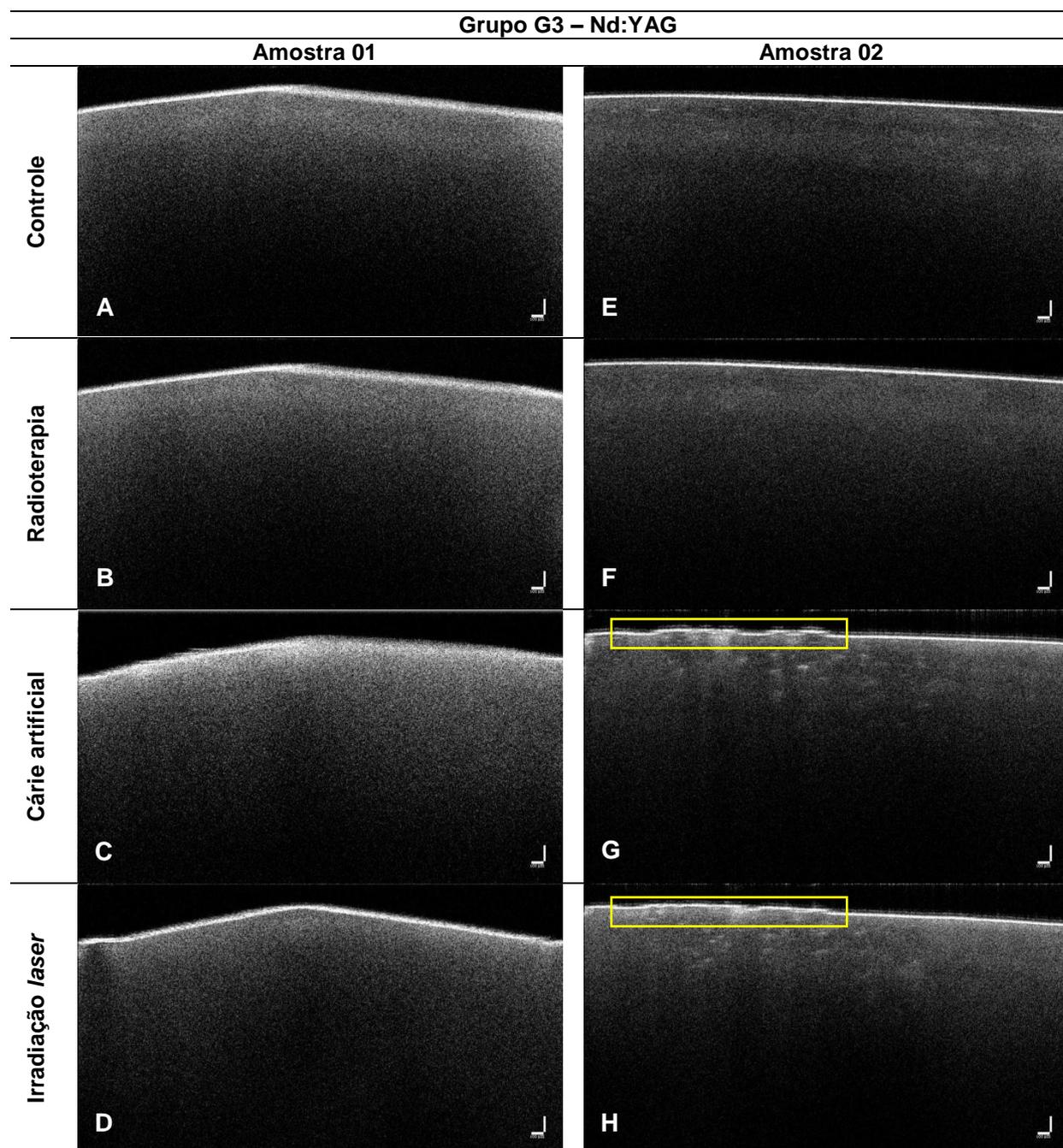
O padrão de imagens de *B-scan* (Figura 63) e os valores de $\bar{\mu}_t$ e de ΔR podem ser explicados com base no mecanismo de ação do FFA cujo ácido fosfórico presente na formulação comercial provoca uma desmineralização moderada na superfície da dentina para favorecer a formação de CaF_2 ¹⁴⁰. Em consequência disso,

há a abertura de túbulos que, de acordo com a análise morfológica (Figura 39), permaneceram expostos parcial ou totalmente, apesar da imersão em saliva artificial por 24 horas. Estes túbulos expostos servem como caminhos ópticos que causam a maior refletividade do sinal e acarretam um aumento nos valores de $\bar{\mu}_t$ e ΔR . Além disso, a pequena camada de gel (ou de CaF_2 retido na superfície da amostra) pode ter alguma influência no caminho óptico percorrido pelo *laser* da OCT.

As imagens de *B-scan* exibidas na Figura 65 são representativas da população amostral do grupo G3 cujo tratamento foi feito com irradiação *laser*. A sequência de imagens da amostra 01 (Figuras 65A - D) é a continuação da que foi apresentada nas Figuras 35D - F. Após o tratamento (Figura 65D), nota-se a presença de uma linha branca intensa na interface ar/tecido que, na Figura 65C, possui contornos menos definidos em decorrência da reflexão difusa do sinal como consequência do aumento da rugosidade ocasionado pela cárie artificial^{121,136,137}. Como evidenciado pelas imagens de MEV (Figura 40), a irradiação *laser*, em algumas regiões das amostras, promoveu a formação de uma camada recristalizada com poucas irregularidades que, ao interagir com o sinal, resulta em uma reflexão especular e dá origem a linha branca intensa e bem definida.

Algo semelhante ocorre na sequência das Figuras 65E - H. Depois do tratamento (Figura 65H), nota-se que a superfície apresenta menos descontinuidades e poros internos quando em comparação à imagem na Figura 65G. Novamente, essas características são compatíveis com a formação de uma camada superficial recristalizada (Figura 40).

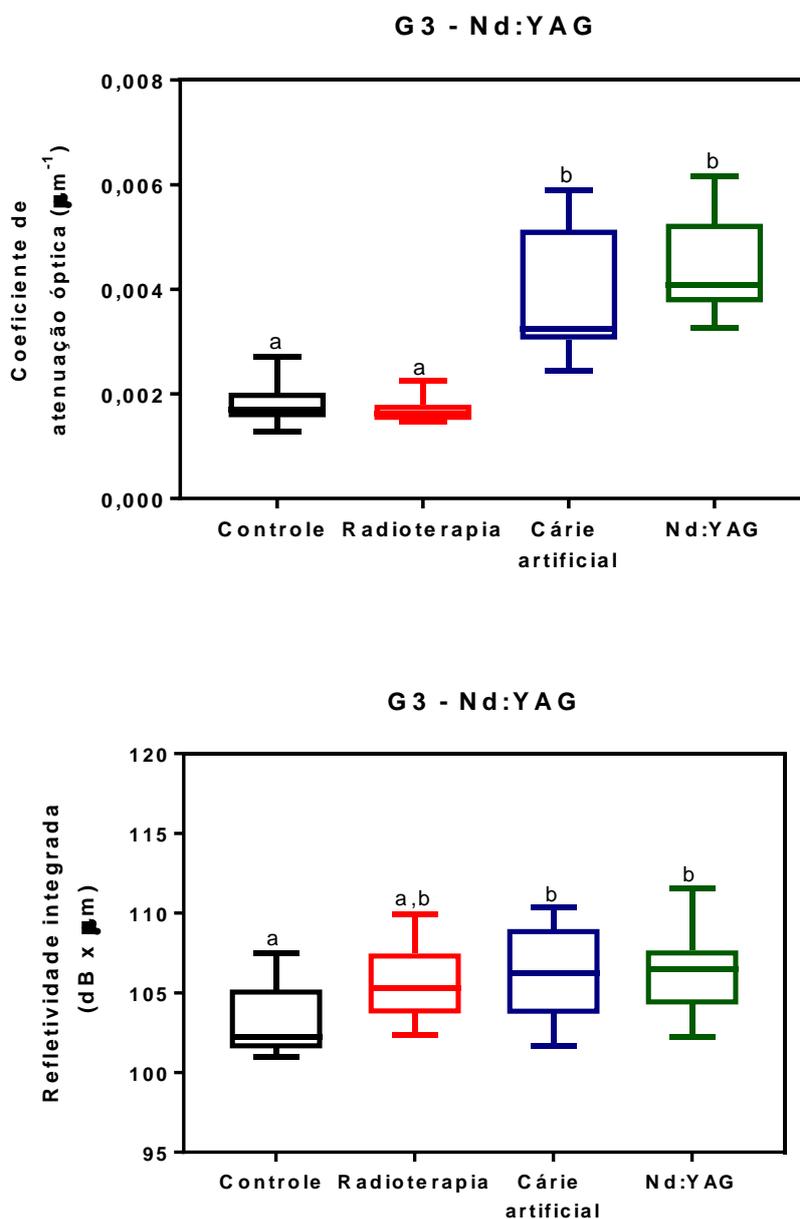
Figura 65: Imagens de *B-scan* de dois blocos de dentina representativos do grupo G3 (tratamento com irradiação *laser*). Escala: 100 μm .



Fonte: Do próprio autor.

Por sua vez, os valores de $\bar{\mu}_t$ e ΔR são exibidos na Figura 66 e os valores de p resultantes da comparação estatística intergrupos são discriminados na Tabela 13.

Figura 66: Distribuição dos valores médios, com os respectivos desvios-padrão e medianas, dos coeficientes de atenuação óptica total ($\bar{\mu}_t$) e de refletividade integrada (ΔR) das amostras de dentina radicular do grupo G3 em quatro condições: hígidas (controle), radioterapia, cárie artificial e tratamento com irradiação *laser*. Letras distintas acima de cada barra denotam diferenças estatisticamente significantes ($\alpha=0,05$) de acordo com o teste de Friedman com pós-teste de Dunn para amostras dependentes.



Fonte: Do próprio autor.

Tabela 13: Valores de p resultantes da comparação intergrupos (controle, radioterapia, cárie artificial e tratamento com irradiação *laser*) das médias dos coeficientes de atenuação óptica total ($\bar{\mu}_t$) e de refletividade integrada (ΔR) de G3 por meio do teste de Friedman com pós-teste de Dunn para amostras dependentes. Valores de p inferiores a 0,05 são estatisticamente significantes.

	Valores de p	
	$\bar{\mu}_t$	ΔR
Controle vs. Radioterapia	>0,9999	0,2863
Controle vs. Cárie artificial	0,0102	0,0179
Controle vs. Irradiação <i>laser</i>	0,0004	0,0008
Radioterapia vs. Cárie artificial	0,0057	>0,9999
Radioterapia vs. Irradiação <i>laser</i>	0,0002	0,3960
Cárie artificial vs. Irradiação <i>laser</i>	>0,9999	>0,9999

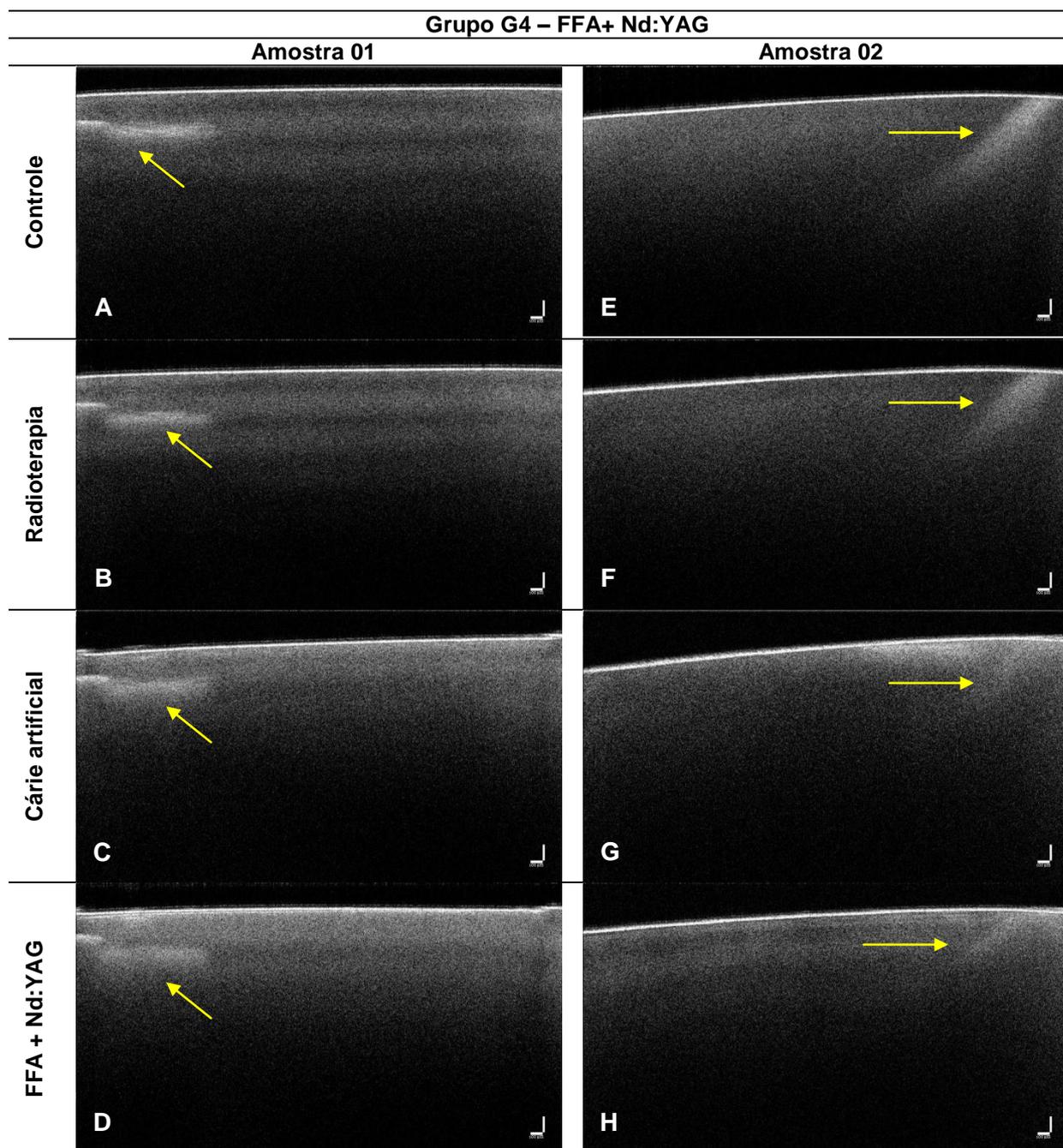
Fonte: Do próprio autor.

Apesar das imagens de *B-scan* do grupo G3 (Figura 65) terem sugerido que o tratamento possa ter provocado mudanças nas superfícies das amostras que favoreceriam a diminuição do número de microinterfaces que causam maior retroespalhamento do sinal, os parâmetros de $\bar{\mu}_t$ e de ΔR do grupo tratamento não apresentaram diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo cárie artificial. Embora a literatura ressalte que a irradiação da dentina com *lasers* em alta intensidade promova mudanças químicas no tecido, tais como evaporação de carbonato, água e desnaturação de constituintes orgânicos, bem como por mudanças cristalográficas da dentina, as alterações observadas na Figura 65 ocorreram em uma camada muito superficial (de poucos micrometros, principalmente porque um fotoabsorvedor foi utilizado) e, desta forma, não houve alterações ópticas em profundidade que traduziram-se em mudanças nos valores de $\bar{\mu}_t$ e de ΔR .

Por sua vez, a Figura 67 apresenta imagens representativas para o grupo G4, que foi tratado com uma combinação de FFA seguida da irradiação com *laser* de Nd:YAG. Tanto na sequência de imagens da amostra 1 (Figuras 67A - D) quanto da amostra 2 (Figuras 67E - H), percebe-se que o sinal no defeito preexistente torna-se gradativamente mais intenso de cima para baixo. No entanto, na amostra 2, o defeito torna-se menos definido (Figura 67H) e se confunde com a estrutura interna da dentina, ao passo que na amostra 1 (Figura 67D) continua bem evidente. Como

elucidado anteriormente, o aumento na intensidade do sinal pode estar relacionado ao processo de desmineralização do tecido^{111,115,116}.

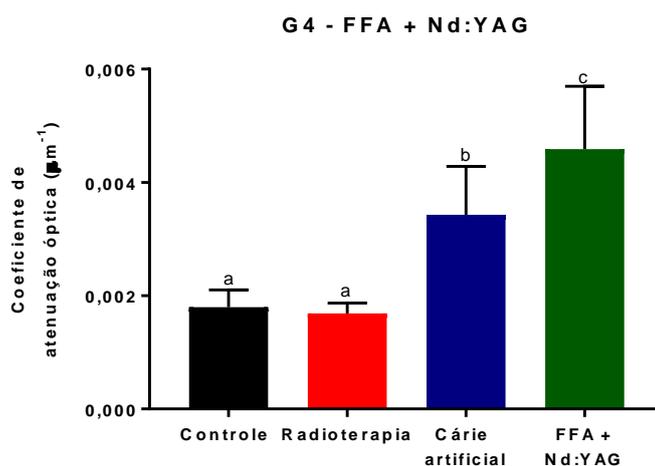
Figura 67: Imagens de B-scan de dois blocos de dentina representativos do grupo G4 (tratamento com FFA + Nd:YAG). As setas indicam defeitos preexistentes. Escala: 100 μ m.



Fonte: Do próprio autor.

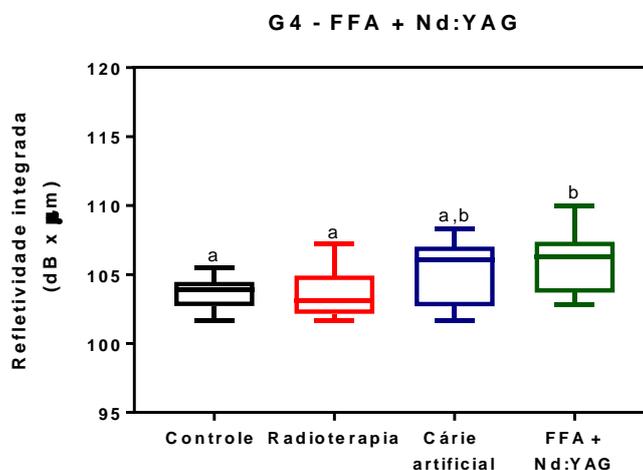
Os valores de $\bar{\mu}_t$ e de ΔR para o grupo G4 são apresentados nas Figuras 68 e Figura 69. Os valores de p resultantes da comparação estatística intergrupos, por sua vez, são descritos na Tabela 14.

Figura 68: Valores médios, com os respectivos desvios-padrão, dos coeficientes de atenuação óptica total ($\bar{\mu}_t$) das amostras de dentina radicular do grupo G4 em quatro condições: hígidas (controle), radioterapia, cárie artificial e tratamento (FFA + Nd:YAG). Letras distintas acima de cada barra denotam diferenças estatisticamente significantes ($\alpha=0,05$) de acordo com o teste de ANOVA de uma via com pós-teste de Holm-Sidak para amostras dependentes.



Fonte: Do próprio autor.

Figura 69: Distribuição dos valores médios, com os respectivos desvios-padrão e medianas, de refletividade integrada (ΔR) das amostras de dentina radicular do grupo G4 em quatro condições: hígidas (controle), radioterapia, cárie artificial e tratamento com FFA + Nd:YAG. Letras distintas acima de cada barra denotam diferenças estatisticamente significantes ($\alpha=0,05$) de acordo com o teste de Friedman com pós-teste de Dunn para amostras dependentes.



Fonte: Do próprio autor.

Tabela 14: Valores de p resultantes da comparação intergrupos (controle, radioterapia, cárie artificial e tratamento com FFA + Nd:YAG) das médias dos coeficientes de atenuação óptica total ($\bar{\mu}_t$) e de refletividade integrada (ΔR) de G4 por meio do teste de ANOVA de uma via com pós-teste de Holm-Sidak (para $\bar{\mu}_t$) ou por meio do teste de Friedman com pós-teste de Dunn (para ΔR) para amostras dependentes. Valores de p inferiores a 0,05 são estatisticamente significantes.

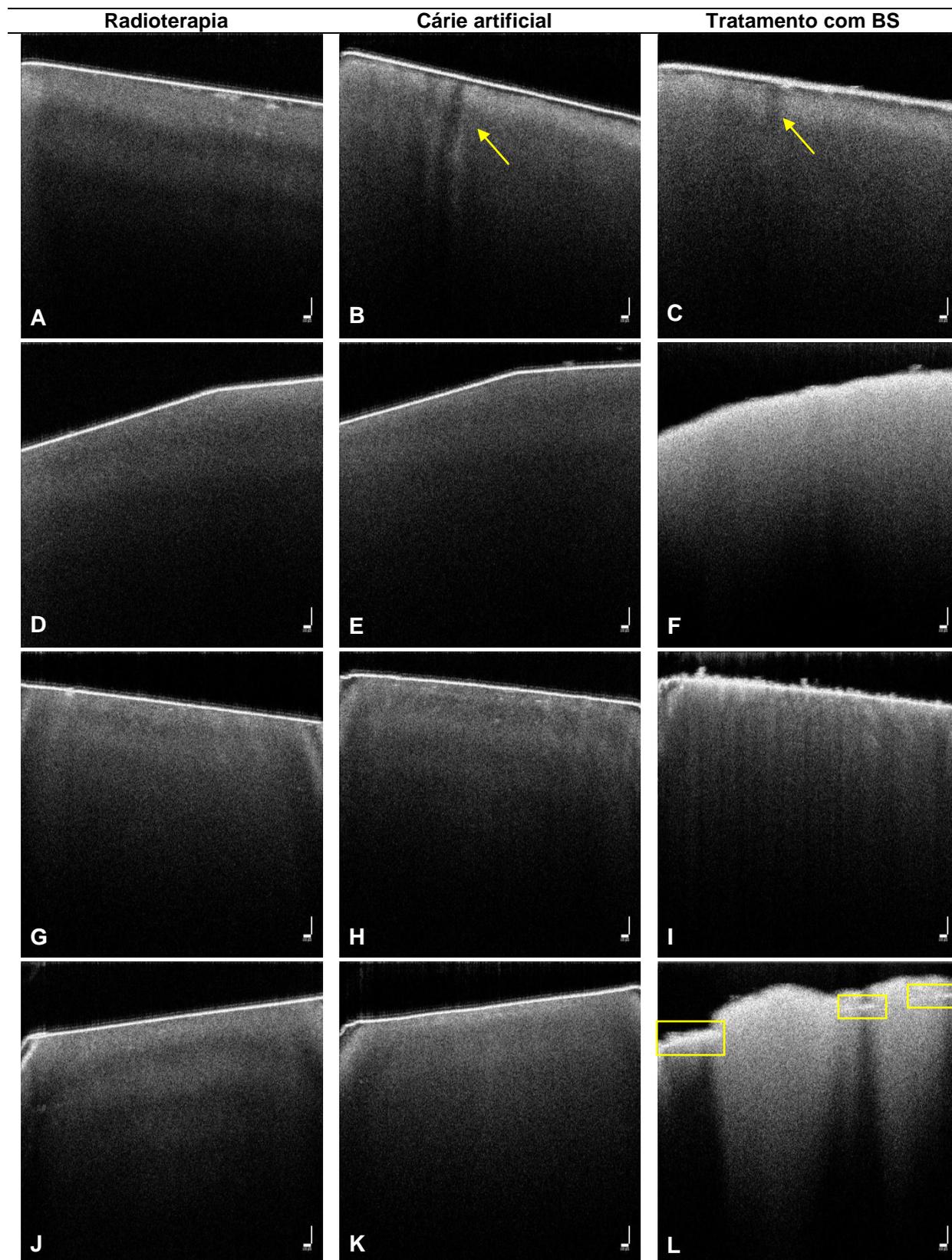
	Valores de p	
	$\bar{\mu}_t$	ΔR
Controle vs. Radioterapia	0,1981	> 0,9999
Controle vs. Cárie artificial	0,0003	> 0,9999
Controle vs. FFA + Nd:YAG	<0,0001	0,0143
Radioterapia vs. Cárie artificial	<0,0001	> 0,9999
Radioterapia vs. FFA + Nd:YAG	<0,0001	0,0029
Cárie artificial vs. FFA + Nd:YAG	0,0030	0,1361

Fonte: do próprio autor.

De acordo com os dados nas Figuras 68 e 69, bem como na Tabela 14, o tratamento com FFA e *laser* de Nd:YAG promoveu um aumento estatisticamente significativo em $\bar{\mu}_t$ em relação ao grupo cárie artificial. Esse resultado está em concordância com o padrão de imagens de *B-scan* do grupo G4 (Figura 67) em que há a intensificação do sinal mesmo após o tratamento e também com as características morfológicas do grupo (Figura 41), haja vista que as heterogeneidades presentes podem atuar como centros de espalhamento e de reflexão do sinal. Ainda, estes resultados corroboram a hipótese da literatura de que os efeitos térmicos oriundos da irradiação propiciaram a maior formação e/ou retenção de CaF_2 , ou mesmo a maior incorporação de flúor no tecido que, por sua vez, acarretaram as mudanças ópticas detectadas pelo OCT. Análises posteriores de flúor fracamente e fortemente ligado devem ser efetuadas para se confirmar tal hipótese.

Por sua vez, a Figura 70 apresenta as imagens de *B-scan* para o grupo G5 cujo tratamento de remineralização foi feito exclusivamente com partículas de Biosilicato[®] (BS). É importante mencionar que para os grupos tratados com BS, isto é, o G5 e o G6, utilizaram-se outras amostras de dentina. Por este motivo, não há *B-scan* do grupo controle e tampouco comparação estatística para amostras dependentes.

Figura 70: Imagens de *B-scan* de quatro blocos de dentina representativos do grupo G5 (tratamento com BS). Escala: 100 μm .



Fonte: Do próprio autor.

Na sequência de imagens nas Figuras 70A - C, observa-se que a sombra no interior da dentina, indicada por setas amarelas, torna-se menos visível na Figura 70C em comparação à Figura 70B. Isso ocorre devido à intensificação do sinal, que confere à imagem correspondente ao tratamento (Figura 70C) uma tonalidade mais branca e é indício de um aumento no retroespalhamento e refletividade na interação sinal/tecido^{111,115,116}. Tal aumento pode estar atrelado ao fato de que há muitas partículas remanescentes não dissolvidas de BS sobre a superfície das amostras deste grupo, conforme a análise morfológica demonstrou (Figura 42). Estas partículas, por sua vez, podem atuar como centros de espalhamento e de reflexão, o que explicaria o aumento na intensidade do sinal na imagem de *B-scan* após o tratamento (Figura 70C).

Esse mecanismo, inclusive, explicaria as demais sequências de *B-scan* na Figura 70. Por exemplo, na Figura 70F, nota-se que a interface ar/tecido possui contornos pouco definidos quando em comparação às Figuras 70D e E e se deve à reflexão difusa^{121,136,137} que, neste caso, está relacionada à presença de partículas de BS na superfície das amostras.

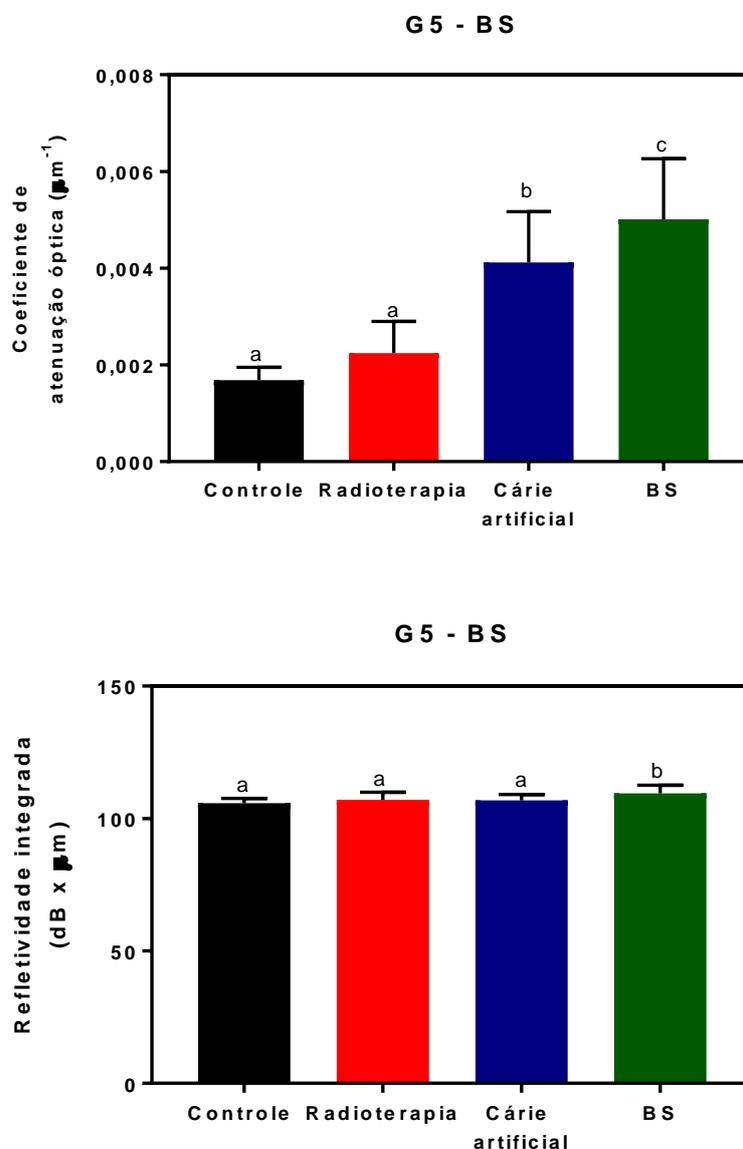
Outro exemplo do efeito da presença de partículas de BS na superfície das amostras é a imagem de *B-scan* representada na Figura 70I. Nela é possível perceber que a interface ar/tecido apresenta-se como uma linha mais espessa em comparação com as Figuras 70G e 70H. Além disso, na 70I, nota-se o surgimento de sombras no interior do tecido (linhas finas pretas) que possivelmente estão relacionadas à forma como as partículas de BS estão distribuídas pela superfície da amostra. Assim, quando o sinal incide nas partículas de BS, percebe-se a presença de tonalidade branca intensa na região imediatamente abaixo; em contrapartida, quando incide na superfície da dentina ou na camada de hidroxiapatita carbonatada formada pela dissolução de BS, o sinal é impedido de passar e forma a sombra.

A distribuição irregular das partículas não dissolvidas de BS é bem evidente na Figura 70L. Nas regiões onde há acúmulo de partículas, verifica-se que a linha branca na interface ar/tecido torna-se mais espessa e irregular e é acompanhada pela intensificação do sinal no interior da amostra (em comparação às Figuras 70J e K). Em contrapartida, regiões com poucas (ou nenhuma) partículas de BS apresentam a linha branca com contorno mais definido (regiões indicadas em

retângulos amarelos) acompanhada pelo decaimento rápido do sinal (tonalidade preta).

Por sua vez, os valores de $\bar{\mu}_t$ e de ΔR para o grupo G4 são exibidos na Figura 71. Os valores de p resultantes da comparação estatística intergrupos, por sua vez, são descritos na Tabela 15.

Figura 71: Valores médios, com os respectivos desvios-padrão, dos coeficientes de atenuação óptica total ($\bar{\mu}_t$) e de refletividade integrada (ΔR) das amostras de dentina radicular do grupo G5 em quatro condições: hígidas (controle), radioterapia, cárie artificial e tratamento com BS. Letras distintas acima de cada barra denotam diferenças estatisticamente significantes ($\alpha=0,05$) de acordo com o teste de ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey para grupos independentes.



Fonte: Do próprio autor.

Tabela 15: Valores de p resultantes da comparação intergrupos (controle, radioterapia, cárie artificial e tratamento com BS) das médias dos coeficientes de atenuação óptica total ($\bar{\mu}_t$) e de refletividade integrada (ΔR) de G5 por meio do teste de ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey para amostras independentes. Valores de p inferiores a 0,05 são estatisticamente significantes.

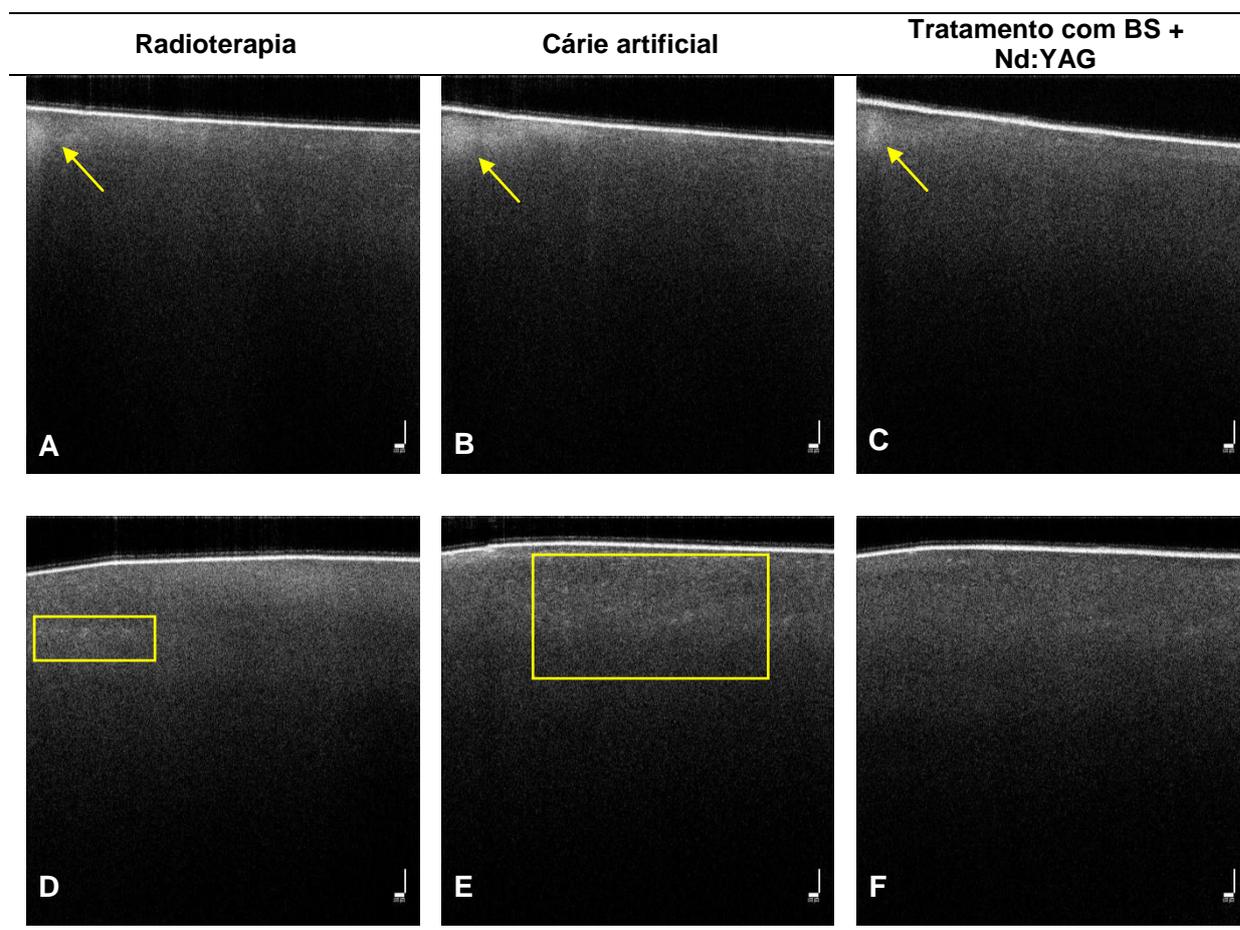
	Valores de p	
	$\bar{\mu}_t$	ΔR
Controle vs. Radioterapia	0,3776	0,4792
Controle vs. Cárie artificial	<0,0001	0,5909
Controle vs. BS	<0,0001	0,0008
Radioterapia vs. Cárie artificial	<0,0001	0,9979
Radioterapia vs. BS	<0,0001	0,0483
Cárie artificial vs. BS	0,0483	0,0311

Fonte: Do próprio autor.

Segundo as informações apresentadas na Figura 71 e Tabela 15, os valores de $\bar{\mu}_t$ e de ΔR aumentaram após o tratamento com BS e são estatisticamente significantes na comparação com o grupo cárie artificial. No entanto, esses aumentos estão relacionados à ocorrência de maiores espalhamento e refletividade do sinal que se devem à presença de partículas de BS na superfície das amostras deste grupo, como evidenciado pelas imagens de MEV (Figura 42). Portanto, os valores de $\bar{\mu}_t$ e de ΔR , para este grupo G5, assim como para os grupos G3 e G4, não podem ser considerados indicativos de desmineralização, pois refletem efeitos ópticos decorrentes dos tratamentos.

E, por fim, a Figura 72 apresenta imagens de *B-scan* representativas do grupo G6 que foi tratado primeiramente com a aplicação de BS e, posteriormente, foi irradiado com *laser* de Nd:YAG. Tanto nas imagens da sequência nas Figuras 72A – C quanto nas Figuras 72D – F, percebe-se que após o tratamento há uma diminuição na intensidade da coloração branca nas imagens, bem como em defeitos preexistentes. Isso pode ser relacionado às características morfológicas do grupo, no qual se verificou a formação de uma camada relativamente uniforme e homogênea sobre a superfície das amostras, com poucas partículas de BS não dissolvidas, em ação combinada do biomaterial e do *laser*. Assim, há menos microinterfaces nas quais o sinal sofre retroespalhamento e reflexão.

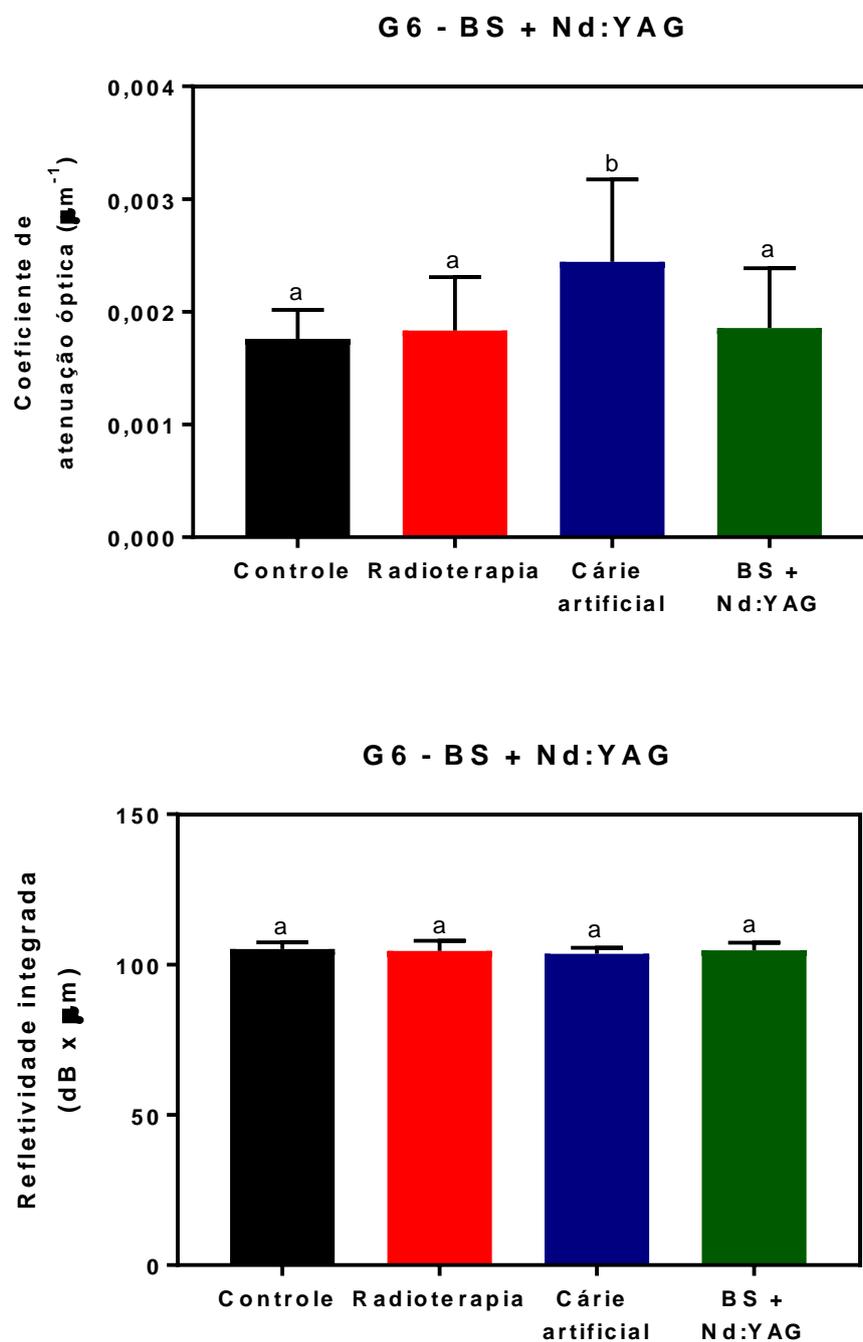
Figura 72: Imagens de *B-scan* de quatro blocos de dentina representativos do grupo G6 (tratamento com BS + Nd:YAG). Escala: 100 μm .



Fonte: Do próprio autor.

A Figura 73 apresenta os valores de $\bar{\mu}_t$ e de ΔR do grupo G6. Os valores de p resultantes da comparação estatística intergrupos, por sua vez, são descritos na Tabela 16.

Figura 73: Valores médios, com os respectivos desvios-padrão, dos coeficientes de atenuação óptica total ($\bar{\mu}_t$) e de refletividade integrada (ΔR) das amostras de dentina radicular do grupo G6 em quatro condições: hígidas (controle), radioterapia, cárie artificial e tratamento com BS+Nd: YAG. Letras distintas acima de cada barra denotam diferenças estatisticamente significantes ($\alpha=0,05$) de acordo com o teste de ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey para amostras independentes.



Fonte: Do próprio autor.

Tabela 16: Valores de p resultantes da comparação intergrupos (controle, radioterapia, cárie artificial e tratamento com BS+Nd:YAG) das médias dos coeficientes de atenuação óptica total ($\bar{\mu}_t$) e de refletividade integrada (ΔR) de G6 por meio do teste de ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey para amostras independentes. Valores de p inferiores a 0,05 são estatisticamente significantes.

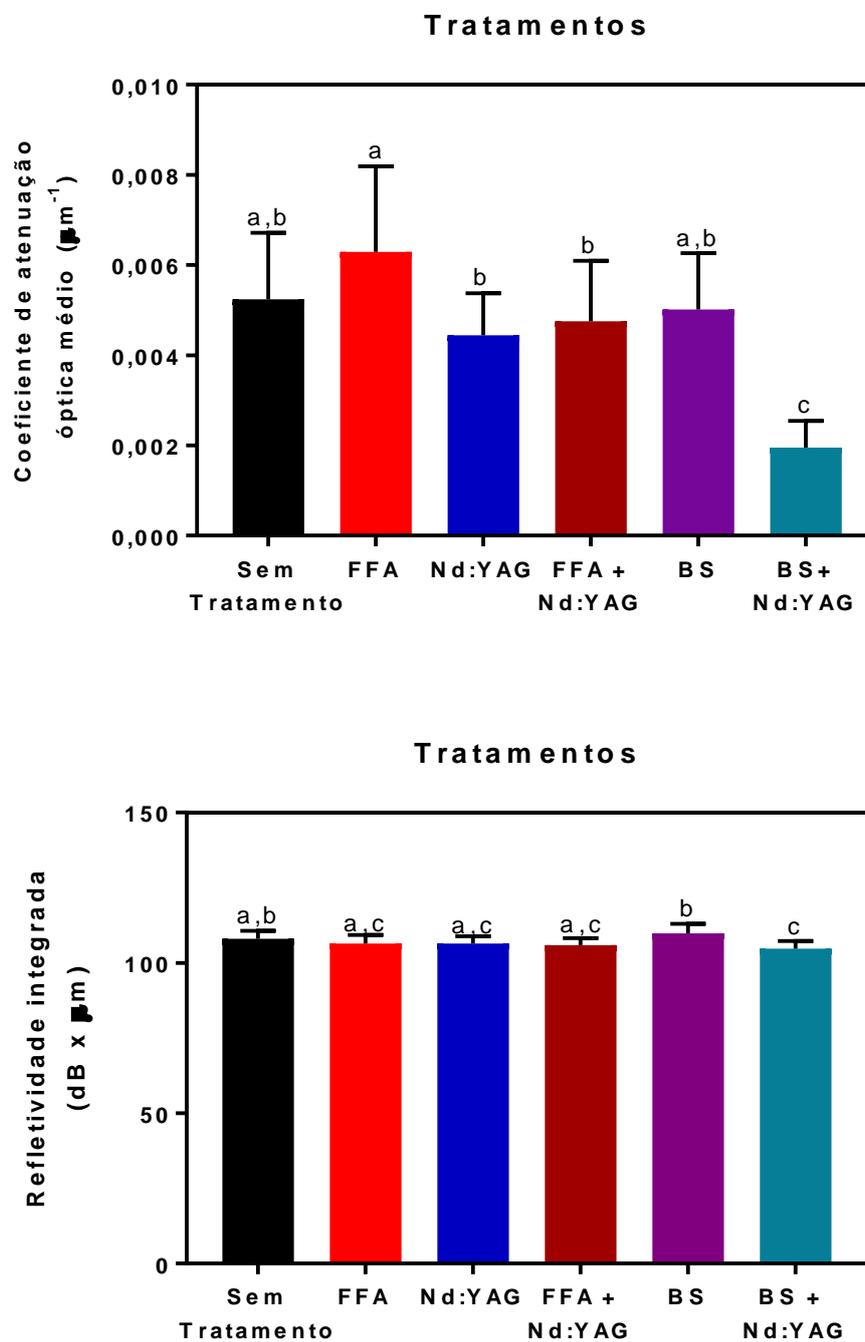
	Valores de p	
	$\bar{\mu}_t$	ΔR
Controle vs. Radioterapia	0,9826	0,9257
Controle vs. Cárie artificial	0,0059	0,3469
Controle vs. BS+Nd:YAG	0,9672	0,9675
Radioterapia vs. Cárie artificial	0,0258	0,7176
Radioterapia vs. BS+Nd:YAG	0,9996	0,9988
Cárie artificial vs. BS+Nd:YAG	0,0476	0,6383

Fonte: Do próprio autor.

De acordo com os dados nas Figuras 73 e Tabela 16, o valor de $\bar{\mu}_t$ foi reduzido após o tratamento e é semelhante à condição das dentinas híginas (grupo controle). Em contrapartida, o valor de ΔR não sofreu alterações em nenhum dos grupos comparados. Apesar do resultado inconclusivo de refletividade integrada, a redução no coeficiente de atenuação óptica total é um indicativo de que a associação de BS e *laser* é capaz de diminuir o espalhamento e a reflexão do sinal e é corroborado pelas imagens de *B-scan* (Figura 72) e de MEV (Figura 43), em que se observa a formação de uma camada superficial mais uniforme com ausência de partículas de BS de grandes dimensões.

E, por fim, a Figura 74 apresenta a comparação estatística entre os valores de $\bar{\mu}_t$ e de ΔR dos 6 grupos experimentais após os tratamento propostos neste estudo. A Tabela 17, por sua vez, discrimina os valores de p resultantes da comparação estatística.

Figura 74: Valores médios, com os respectivos desvios-padrão, dos coeficientes de atenuação óptica total (μ_t) e de refletividade integrada (ΔR) dos 6 grupos experimentais propostos neste estudo. Letras distintas acima de cada barra denotam diferenças estatisticamente significantes ($\alpha=0,05$) de acordo com o teste de ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey para amostras independentes.



Fonte: Do próprio autor.

Tabela 17: Valores de p resultantes da comparação intergrupos (sem tratamento, FFA, Nd:YAG, FFA+Nd:YAG, BS e BS+Nd:YAG) das médias dos coeficientes de atenuação óptica total ($\bar{\mu}_t$) e de refletividade integrada (ΔR) por meio do teste de ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey para amostras independentes. Valores de p inferiores a 0,05 são estatisticamente significantes.

	Valores de p	
	$\bar{\mu}_t$	ΔR
Sem tratamento vs. FFA	0,3069	0,5582
Sem tratamento vs. Nd:YAG	0,5903	0,5639
Sem tratamento vs. FFA+Nd:YAG	0,9135	0,2719
Sem tratamento vs. BS	0,9968	0,4273
Sem tratamento vs. BS+Nd:YAG	<0,0001	0,0139
FFA vs. Nd:YAG	0,007	>0,9999
FFA vs. FFA+Nd:YAG	0,0352	0,9966
FFA vs. BS	0,1241	0,0085
FFA vs. BS+Nd:YAG	<0,0001	0,5109
Nd:YAG vs. FFA+Nd:YAG	0,9889	0,9962
Nd:YAG vs. BS	0,8605	0,0087
Nd:YAG vs. BS+Nd:YAG	0,0002	0,5053
FFA+Nd:YAG vs. BS	0,9948	0,0017
FFA+Nd:YAG vs. BS+Nd:YAG	<0,0001	0,805
BS vs. BS+Nd:YAG	<0,0001	<0,0001

Fonte: Do próprio autor.

Segundo as informações exibidas na Figura 74 e na Tabela 17, apenas o grupo G6, no qual se utilizou BS em associação ao laser de Nd:YAG, foi o único tratamento que apresentou redução em ambos os valores de $\bar{\mu}_t$ e de ΔR em comparação ao grupo G1 (controle negativo). Esse resultado está em concordância com os resultados apresentados nessa discussão, bem como com as características morfológicas demonstradas por MEV.

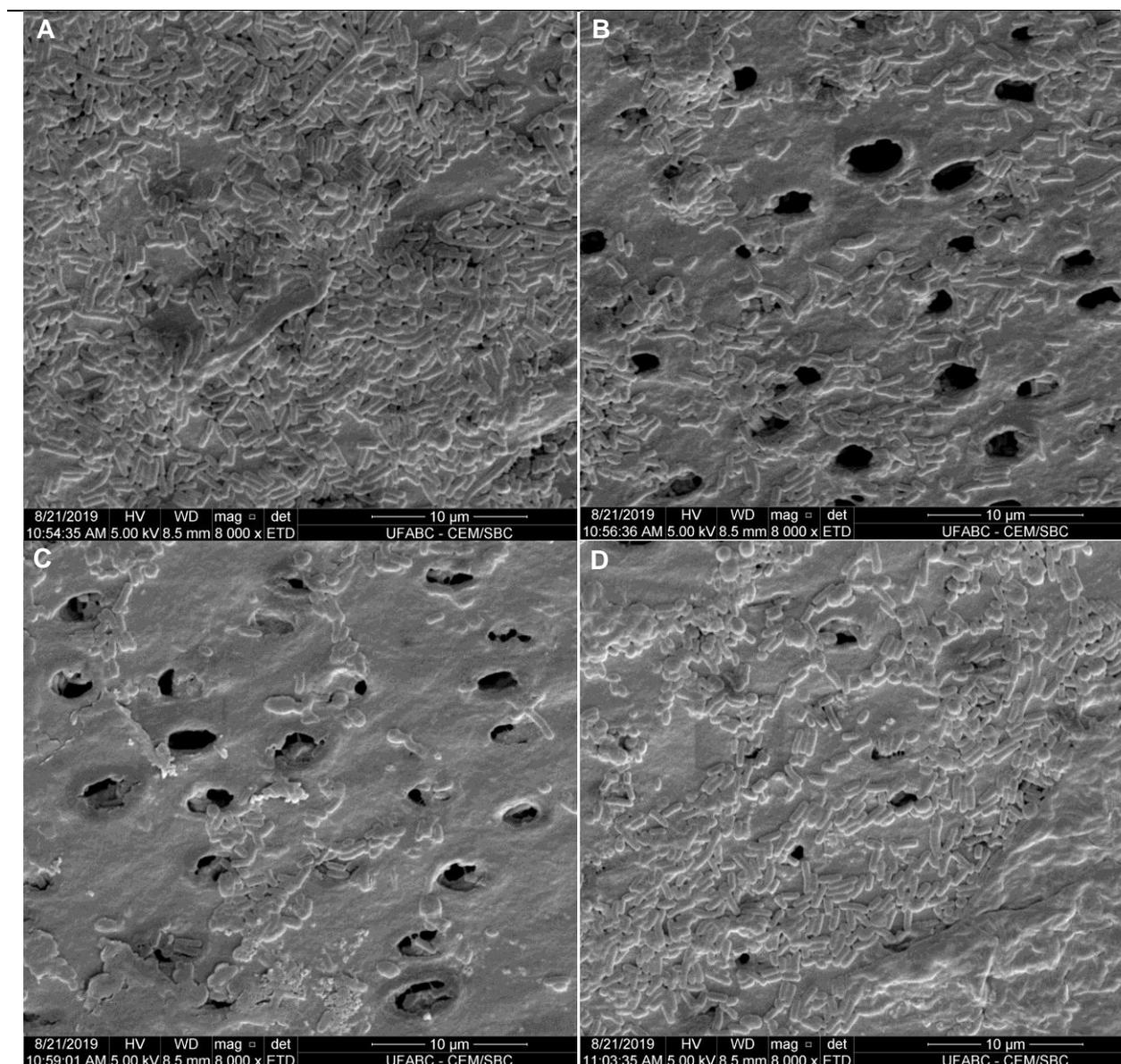
5.3.3. Desafio cariogênico com *Streptococcus mutans*

5.3.3.1. Avaliação morfológica por MEV

As Figuras 75 a 80 exibem 4 eletromicrografias de varredura representativas de uma mesma amostra de dentina radicular dos grupos G1 a G6, respectivamente. A Figura 75 exhibe imagens do grupo G1, correspondente ao controle. É possível observar a presença de uma grande densidade de células bacterianas de *S. mutans* e de outros bacilos que compõem a microbiota oral. Estes micro-organismos distribuem-se por toda a superfície da amostra e parecem se aglomerar

preferencialmente na dentina peritubular, formando colônias em suas proximidades. Em algumas regiões, cobrem totalmente os túbulos devido à formação de um biofilme contínuo e uniforme. Além disso, esses túbulos possuem tamanho maior de diâmetro em comparação às imagens pós-tratamento (Figura 38). Essas características morfológicas estão em concordância com outros estudos similares^{153,154,155} e indicam que houve progressão da lesão de cárie inicialmente criada, com maior desmineralização promovida pelo biofilme.

Figura 75: Eletromicrografias de quatro regiões distintas de uma mesma amostra do grupo G1 (controle, sem tratamento). Magnificação original: 8000x.



Fonte: Do próprio autor.

É importante enfatizar que a penetração de bactérias dentro dos túbulos dentinários é um indicativo de progressão rápida da cárie e, como consequência, pode acarretar danos à polpa e levar ao desenvolvimento de outras patologias, tais como infecções endodônticas (infecções nos canais radiculares), pulpíte (inflamação da polpa) e outras doenças periapicais^{156,157}. Em um paciente oncológico, essas complicações são ainda mais indesejáveis, uma vez que estes são mais suscetíveis ao desenvolvimento de infecções oportunistas e osteorradionecrose^{5,11,48}.

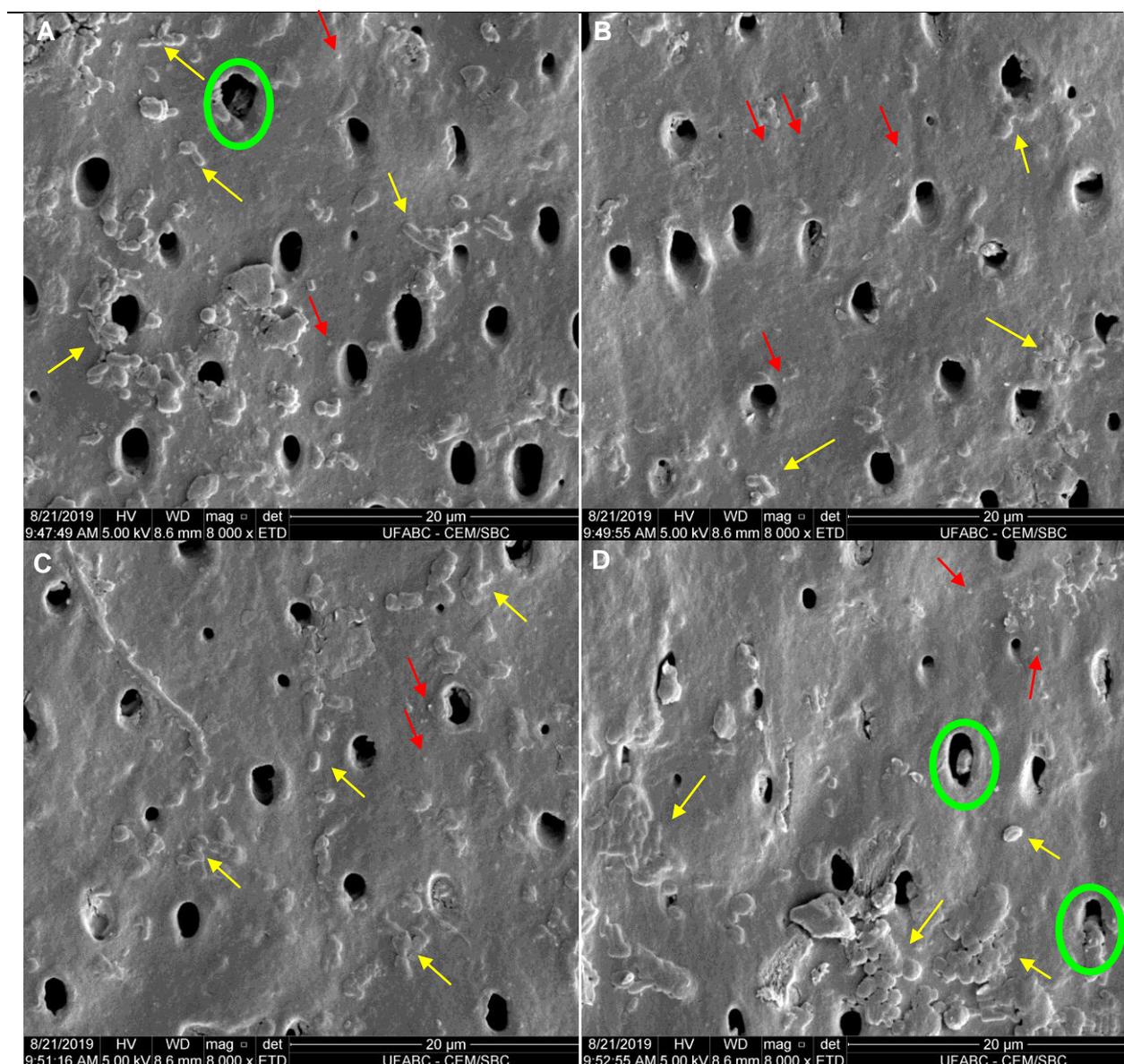
A Figura 76, por sua vez, exhibe imagens de uma amostra do grupo G2 cujo tratamento foi a aplicação tópica de flúor fosfato acidulado (FFA). É perceptível que há uma menor quantidade de bactérias na superfície da dentina, que parecem ocorrer isoladamente (embora haja poucas regiões com presença de colônias, setas amarelas), em comparação ao grupo G1 (Figura 75). Ainda, há poucos túbulos nos quais se nota a invasão por bactérias (círculos verdes).

Essas características morfológicas presentes na Figura 76 são decorrentes da combinação de dois efeitos provocados pelo flúor: (i) a inibição de atividade bacteriana e (ii) a formação de estruturas globulares cristalinas (CaF_2) de efeito cariostático que promovem maior resistência do tecido à dissolução em meios ácidos¹⁴⁰.

Em relação ao primeiro efeito, de forma muito simplificada, o flúor é capaz de interferir diretamente na atividade bacteriana mediante a inibição de enzimas celulares e pelo aumento da permeabilidade da membrana celular a prótons, o que confere menor aciduricidade a esses micro-organismos¹⁴⁰.

O segundo efeito, por sua vez, relaciona-se aos glóbulos de CaF_2 formados a partir da aplicação de FFA sobre a dentina e que são capazes de liberar íons de flúor e de cálcio em meios ácidos, tal como o ambiente do desafio cariogênico. Uma vez liberados, os íons fluoreto adsorvem-se sobre a superfície parcialmente desmineralizada e atraem íons de cálcio, o que resulta na formação de hidroxiapatita fluoretada ou de fluorapatita. Estas estruturas cristalinas são menos solúveis em meios ácidos e, conseqüentemente, mais resistentes à ação de bactérias como o *S. mutans*. Portanto, os glóbulos de CaF_2 atuam como reservas de íons fluoreto que são liberados quando é necessário reduzir a desmineralização e, conseqüentemente, permitem a remineralização de lesões incipientes¹⁴⁰.

Figura 76: Eletromicrografias de quatro regiões distintas de uma mesma amostra do grupo G2 (tratamento com FFA, controle positivo). As setas amarelas exemplificam locais com bactérias e as vermelhas indicam formações sugestivas de glóbulos de CaF_2 . Os círculos verdes, por sua vez, indicam túbulos invadidos por bactérias. Magnificação original: 8000x.



Fonte: Do próprio autor.

Há estudos que demonstram a combinação desses dois efeitos sobre o biofilme. Vale *et al.*, por exemplo, constataram a presença de flúor, que foi liberado a partir de depósitos de CaF_2 originados da aplicação tópica de FFA, em biofilmes removidos de amostras de dentina radicular bovina, 7 dias após a aplicação de dose única de FFA⁸⁹. Inclusive, a literatura indica que há uma relação dose-dependente

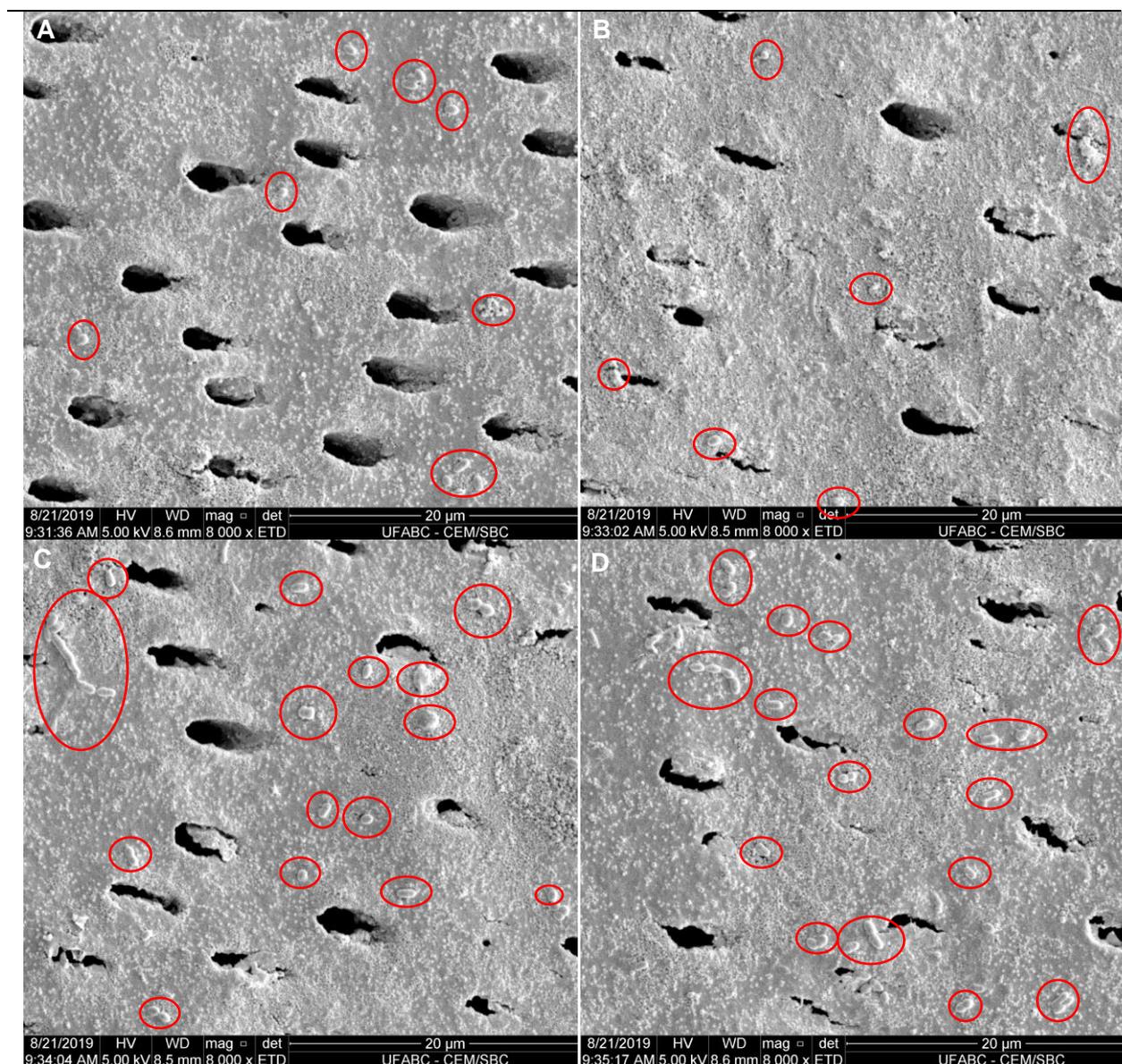
entre flúor e a formação de biofilme: à medida que se aumenta a quantidade de flúor aplicada sobre os tecidos dentais, menor a quantidade de biofilme formado¹⁵⁵.

Uma vez que as imagens de MEV pós-tratamentos para o grupo G2 (Figura 39) revelaram a formação de pequenas partículas que podem ser CaF_2 , é plausível que a ação conjunta desses dois efeitos do flúor tenha regido a redução na colonização bacteriana das amostras deste grupo após desafio cariogênico, com uma única aplicação de FFA (Figura 76), o que corrobora os dados da literatura.

As imagens apresentadas na Figura 77 correspondem ao grupo G3, que foi tratado com irradiação com *laser* de Nd:YAG. Embora não tenha sido realizada a contagem bacteriana, é possível observar que há uma quantidade muito reduzida de bactérias em relação aos grupos G1 e G2. Além disso, nota-se que essas bactérias aparecem de forma isolada e quando aglomeradas, constituem-se de poucas células. Ainda, é perceptível a presença de pequenas formações globulares que, provavelmente, são diferentes estruturas cristalinas de cálcio formadas por efeitos térmicos da irradiação *laser*, como já foi mencionado na análise morfológica pós-tratamento (Figura 40).

A redução da quantidade de micro-organismos sobre a superfície da amostra do grupo G3, em relação às amostras dos grupos G1 e G2, sugere que houve menor adesão bacteriana na superfície irradiada, modificada termicamente pela ação do *laser*.

Figura 77: Eletromicrografias de quatro regiões distintas de uma mesma amostra do grupo G3 (irradiação com Nd:YAG). Os círculos vermelhos exemplificam locais com bactérias. Magnificação original: 8000x.

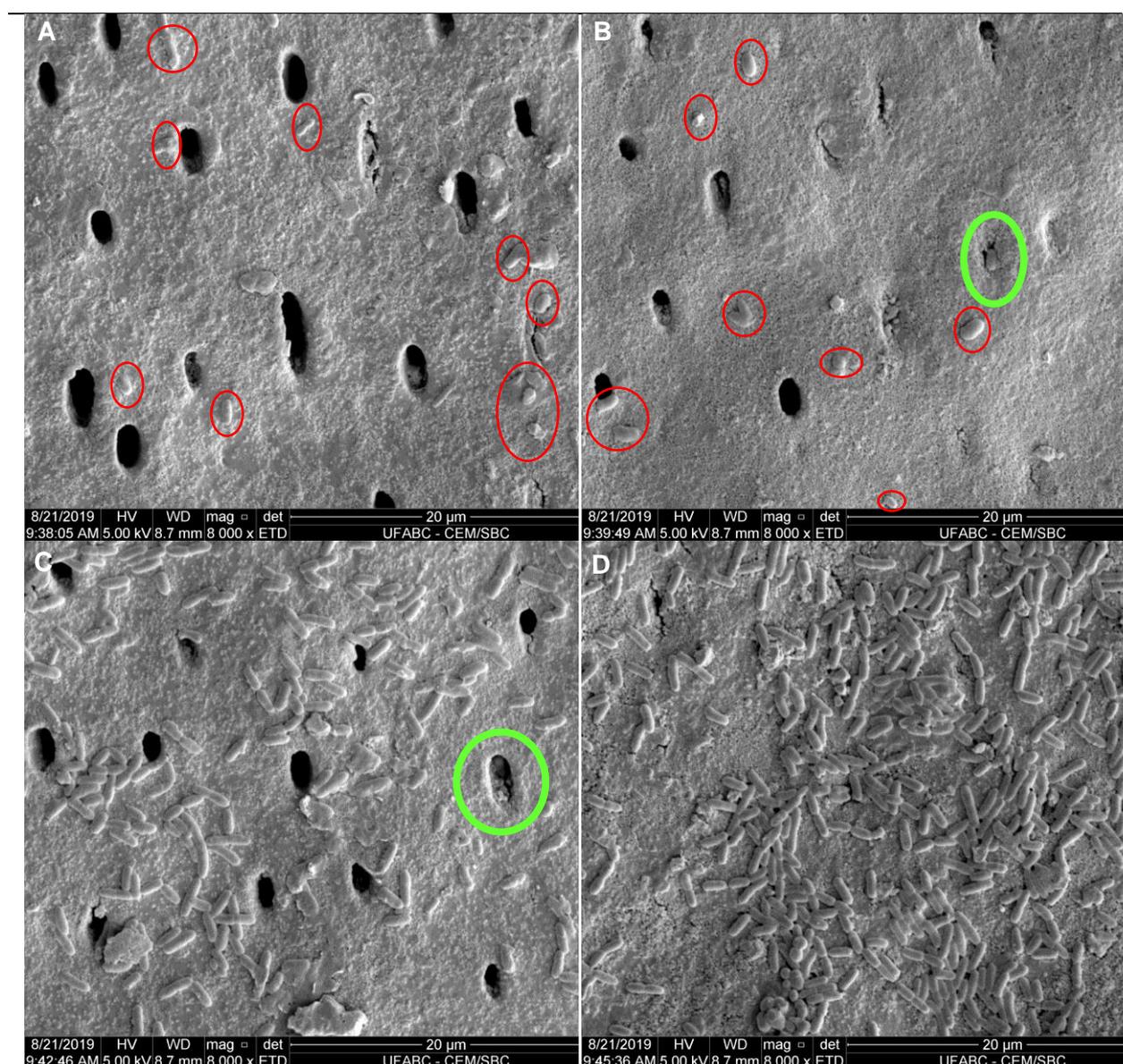


Fonte: Do próprio autor.

A Figura 78 apresenta as imagens de MEV do grupo G4 cujo tratamento consistiu na aplicação tópica de FFA com posterior irradiação *laser*. Em específico, observa-se, nas Figuras 78A e B, a presença de poucas bactérias isoladas na superfície da amostra de dentina. Em contrapartida, nas Figuras 78C e D, é perceptível que há uma densidade maior de células bacterianas concentradas nas proximidades e sobre a dentina peritubular, de maneira semelhante ao que foi verificado para o grupo G1. Também é importante mencionar que, em todas as

imagens, se nota a existência de pequenas formações globulares que podem ser CaF_2 ⁶¹, outras estruturas cristalinas de cálcio^{14,28,61,84} ou, ainda, fluorapatita ou hidroxiapatita fluoretada⁸⁴, como elucidado anteriormente.

Figura 78: Eletromicrografias de quatro regiões distintas de uma mesma amostra do grupo G4 (tratamento com FFA e posterior irradiação Nd:YAG). Os círculos vermelhos exemplificam locais com bactérias e os verdes, túbulos invadidos por estas mesmas bactérias. Magnificação original: 8000x.



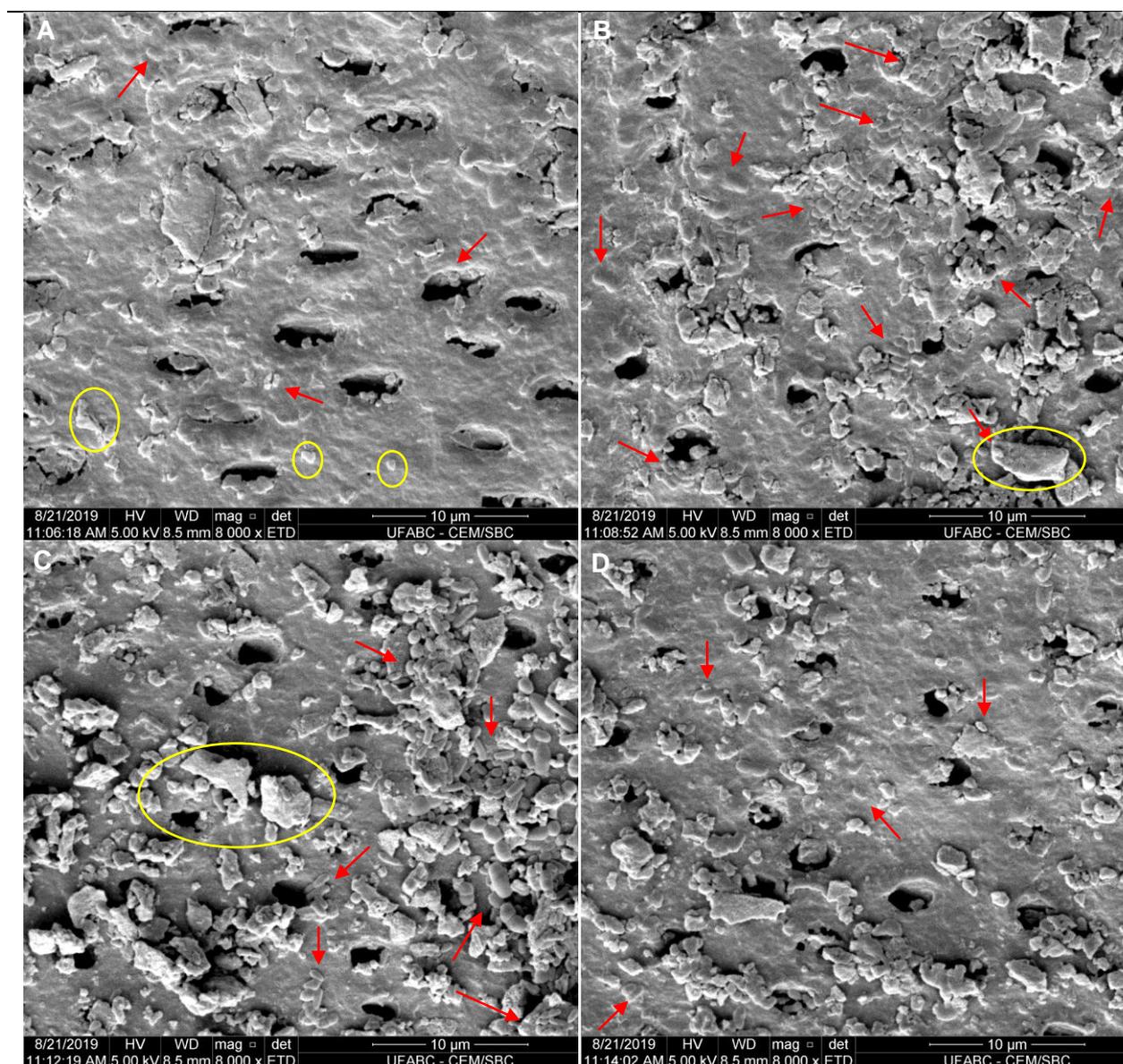
Fonte: Do próprio autor.

A pouca quantidade de bactérias que existe nas Figuras 78A e B pode ser decorrente de alguns fatores, tais como: (i) a irradiação *laser* é capaz reter os glóbulos de CaF_2 , oriundos da aplicação tópica de flúor, de modo a prolongar seus efeitos cariostáticos^{14,57,84,141}; (ii) a irradiação *laser* promove a formação de microespaços na dentina e, assim, facilita a incorporação de íons fluoreto^{14,15,57}; (iii) a recristalização da matriz inorgânica da dentina, por ação do *laser*, provoca a incorporação de íons fluoreto na hidroxiapatita e, conseqüentemente, acarreta a formação de hidroxiapatita fluoretada ou fluorapatita^{14,57,84}. Todas essas alterações podem fazer com que a dentina seja mais resistente à ação de *S. mutans*. Contudo, estudos adicionais de avaliação da superfície por difração de raio-X rasantes e análise de flúor fracamente e fortemente ligado são necessários para se confirmar estas hipóteses.

O aumento na quantidade de bactérias nas Figuras 78C e D, por sua vez, pode estar relacionado às diferenças na efetividade dos tratamentos em regiões distintas das amostras, haja vista que as imagens de MEV pós-tratamento (Figura 41), para este grupo, revelaram características morfológicas heterogêneas. Além disso, o tratamento foi feito uma única vez e, conforme discutido, pode haver uma relação dose-dependente, principalmente o que diz respeito à aplicação tópica de flúor¹⁵⁵.

As imagens na Figura 79, por sua vez, correspondem ao grupo G5 cujas amostras foram tratadas apenas com Biosilicato[®] (BS). É possível perceber a existência de uma quantidade expressiva de bactérias (aparentemente em menor quantidade do que a do grupo G1) cuja identificação é dificultada pela formação de uma camada de um subproduto resultante da dissolução do BS. Além disso, nota-se a presença de uma grande quantidade de partículas remanescentes de BS que não foram dissolvidas ou que sofreram dissolução parcial, mesmo após o desafio cariogênico.

Figura 79: Eletromicrografias de quatro regiões distintas de uma mesma amostra do grupo G5 (tratamento com BS). As setas vermelhas exemplificam locais com bactérias e os círculos amarelos, partículas parcialmente dissolvidas de BS. Magnificação original: 8000x.

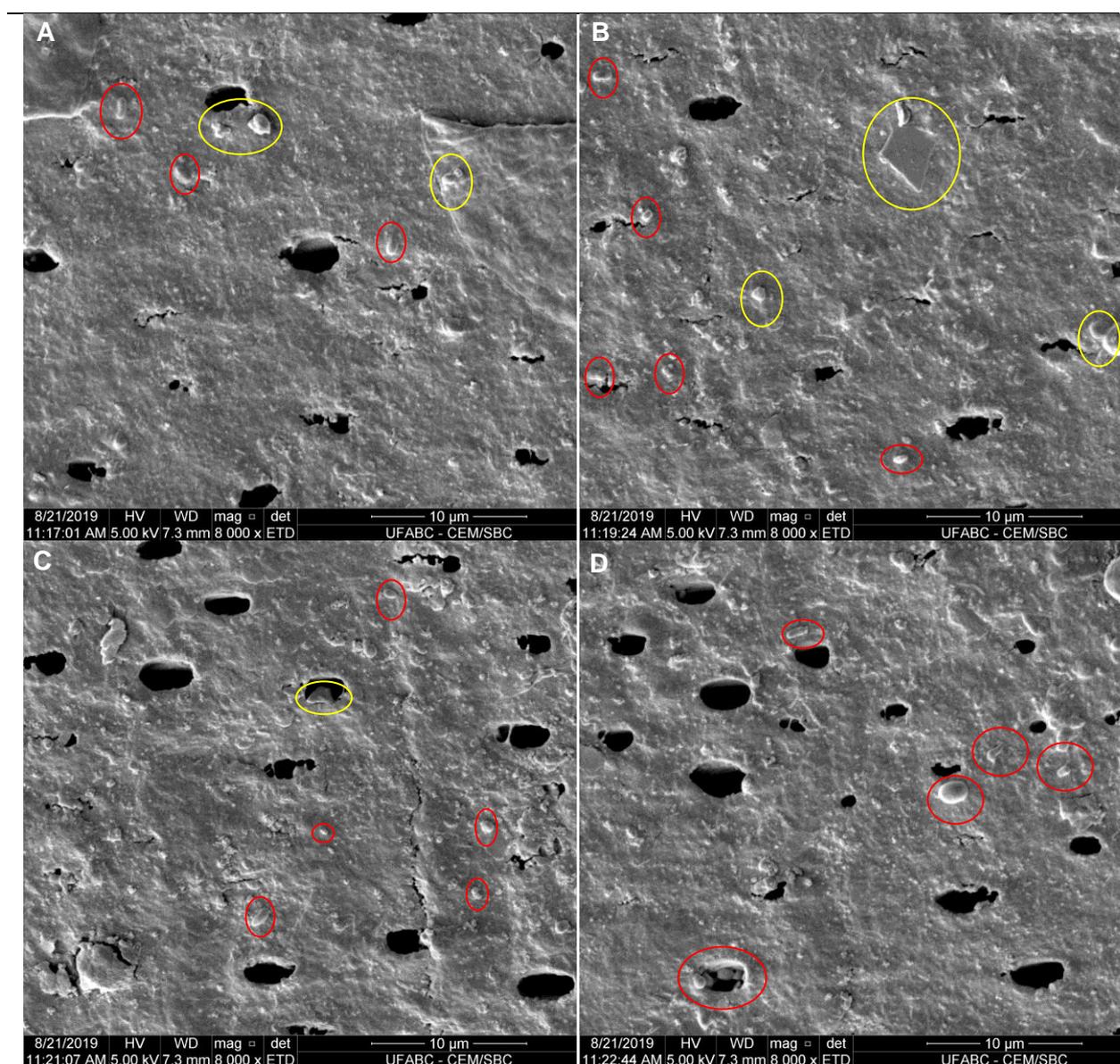


Fonte: Do próprio autor.

E, por fim, a Figura 80 apresenta imagens do grupo G6 cujas amostras foram tratadas com BS e posterior irradiação *laser*. Nota-se que há poucas partículas de BS não dissolvidas, bem como de poucas bactérias. Essas poucas bactérias, por sua vez, estão distantes umas das outras e não parecem formar colônias. Além disso, há poucos túbulos dentinários invadidos por bactérias. Provavelmente, a redução na quantidade de bactérias no grupo G6 é consequência da ação combinada do Biosilicato[®] e da irradiação *laser* cujos mecanismos de ação

já foram elucidados. Além disso, conforme a análise morfológica pós-tratamento (Figura 43) evidenciou, a combinação de BS e de *laser* foi capaz de promover a formação de uma camada homogênea e regular que, provavelmente, deve ter contribuído para que houvesse menor adesão de células bacterianas e dificultou a formação de biofilme.

Figura 80: Eletromicrografias de quatro regiões distintas de uma mesma amostra do grupo G6 tratamento com BS e posterior irradiação com Nd:YAG). Os círculos vermelhos exemplificam locais com bactérias e os amarelos, partículas remanescentes de BS. Magnificação original: 8000x.

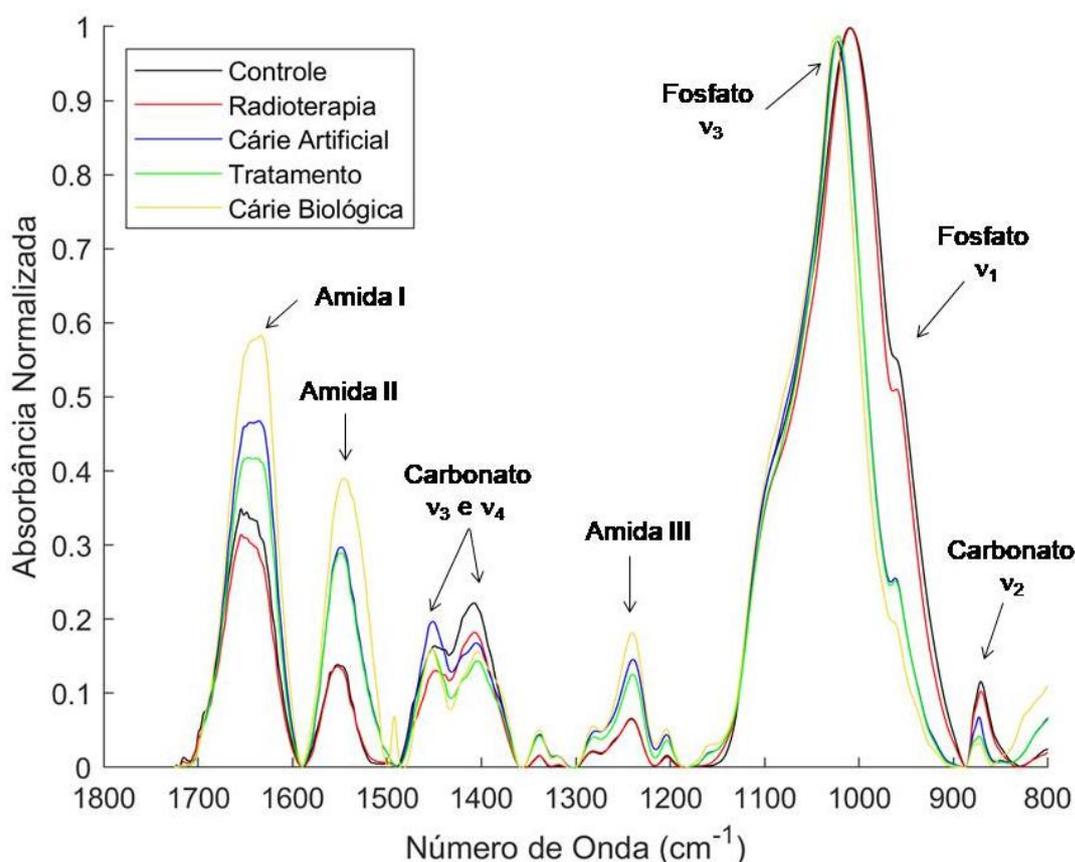


Fonte: Do próprio autor.

5.3.3.2. Avaliação composicional por ATR-FTIR

A Figura 81 exibe os espectros de absorção médios das amostras do grupo G1 (sem tratamento, apenas com imersão em saliva artificial por 24 horas após a cárie artificial). Observa-se que, após a indução de cárie biológica, houve a manutenção das principais bandas de absorção da dentina juntamente com o surgimento de uma nova banda na região de 1500 cm^{-1} que é atribuída a proteínas do biofilme do *S. mutans*¹⁵⁸. Ainda, nota-se um aumento na intensidade de todas as bandas da matriz orgânica (amidas I, II e III) juntamente com uma redução nas bandas de carbonato (modos de vibração ν_2 , ν_3 e ν_4) e de fosfato ν_1 . Todas essas alterações qualitativas são indícios de que houve progressão da lesão de cárie criada artificialmente, com maior desmineralização promovida pelo biofilme.

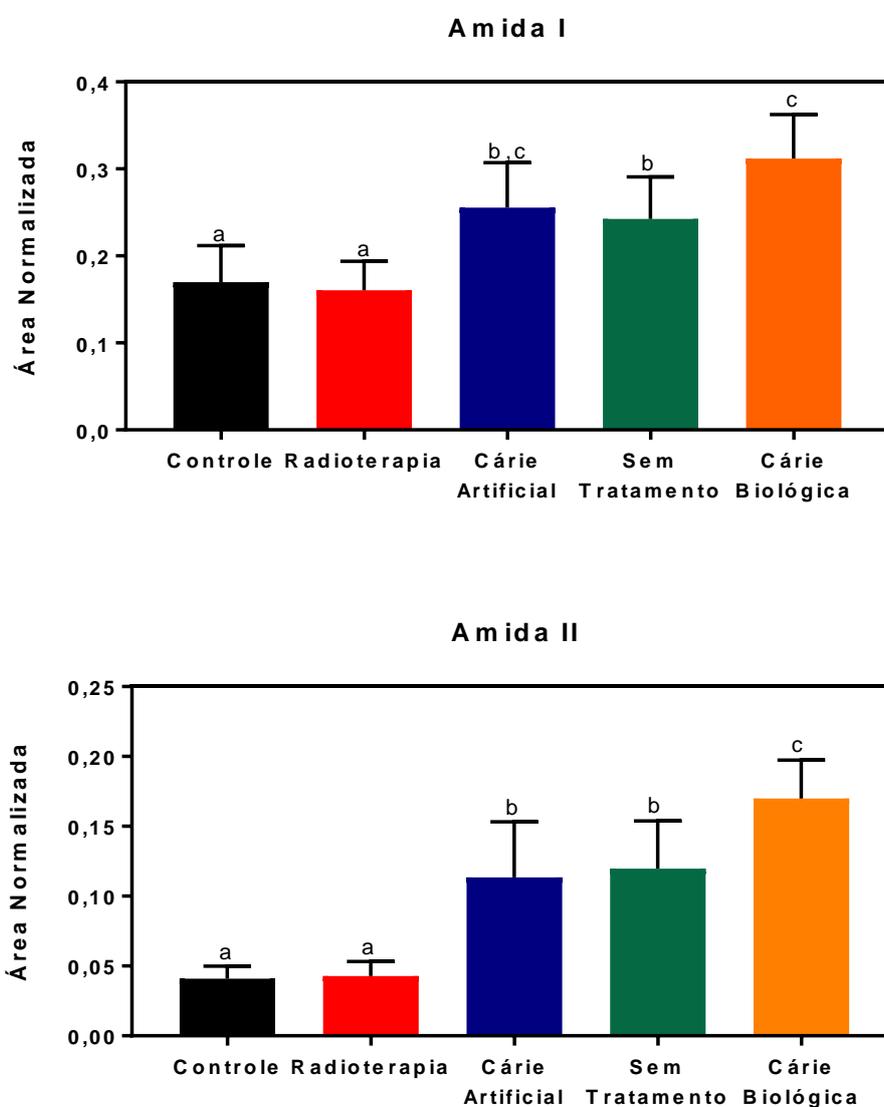
Figura 81: Média dos espectros de absorção no infravermelho, na região entre 1800 e 800 cm^{-1} , após normalização pela intensidade da banda ν_3 fosfato e traçado da linha de base, das amostras de dentina do grupo G1 em cinco etapas experimentais: controle, após a radioterapia, depois da desmineralização (cárie artificial), após o tratamento (sem tratamento, apenas imersão em saliva artificial por 24 horas) e depois do desafio com cárie biológica.



Fonte: Do próprio autor.

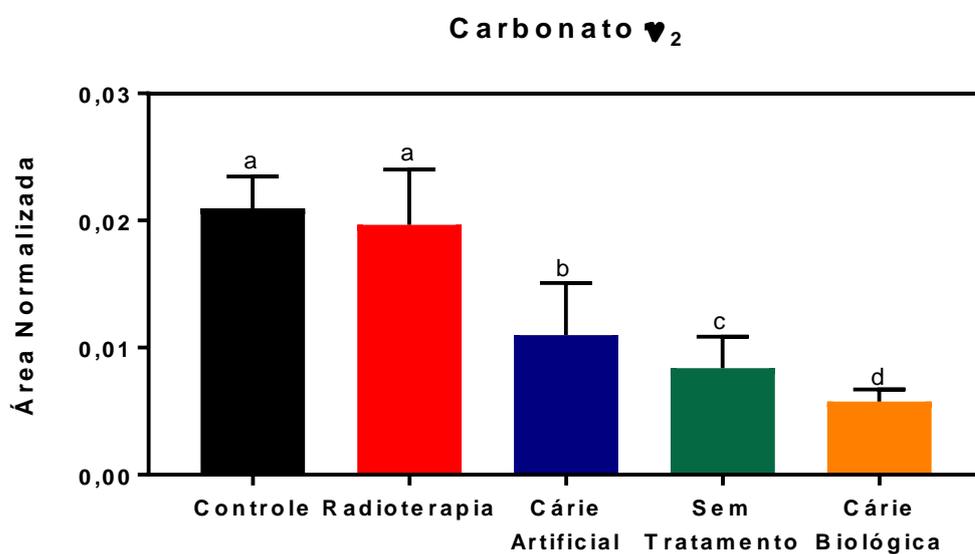
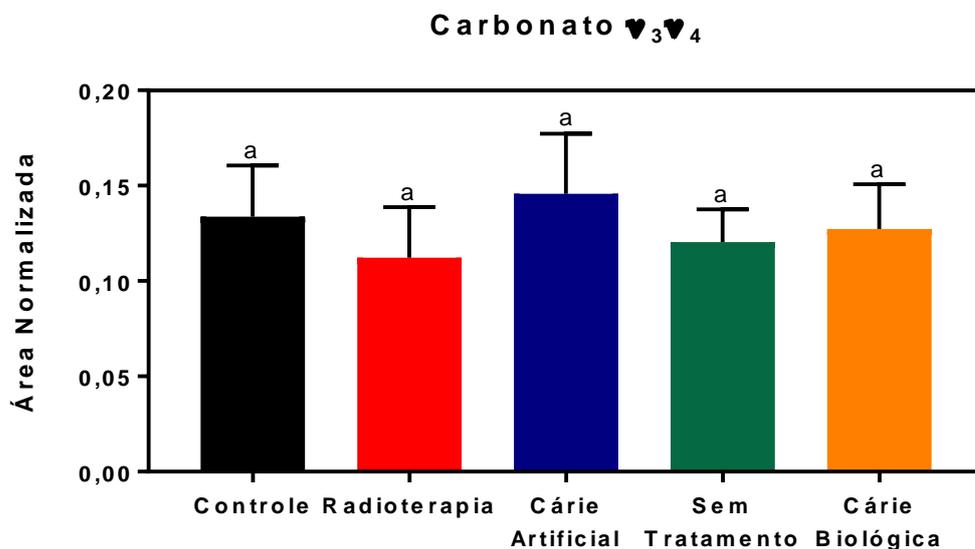
As Figuras 82 e 83 apresentam a comparação estatística da análise semiquantitativa das bandas de absorção, proporcionalmente em relação à banda de fosfato ν_3 , das amostras do grupo G1 em diferentes etapas experimentais. A Tabela 18, por sua vez, discrimina os valores de p resultantes de tal análise.

Figura 82: Valores médios, com os respectivos desvios-padrão, das proporções das áreas normalizadas pela banda de fosfato ν_3 das bandas de amida (I e II) e de carbonato (ν_2 , ν_3 e ν_4) das amostras de dentina radicular sadias (controle), após radioterapia, depois da desmineralização (cárie artificial), posterior imersão em saliva artificial (sem tratamento) e após desafio cariogênico (cárie biológica). Letras distintas, acima de cada barra, indicam que há diferenças estatísticas entre os grupos segundo o teste de ANOVA de uma via com pós-teste de Holm-Sidak para amostras dependentes, com $\alpha=0,05$.



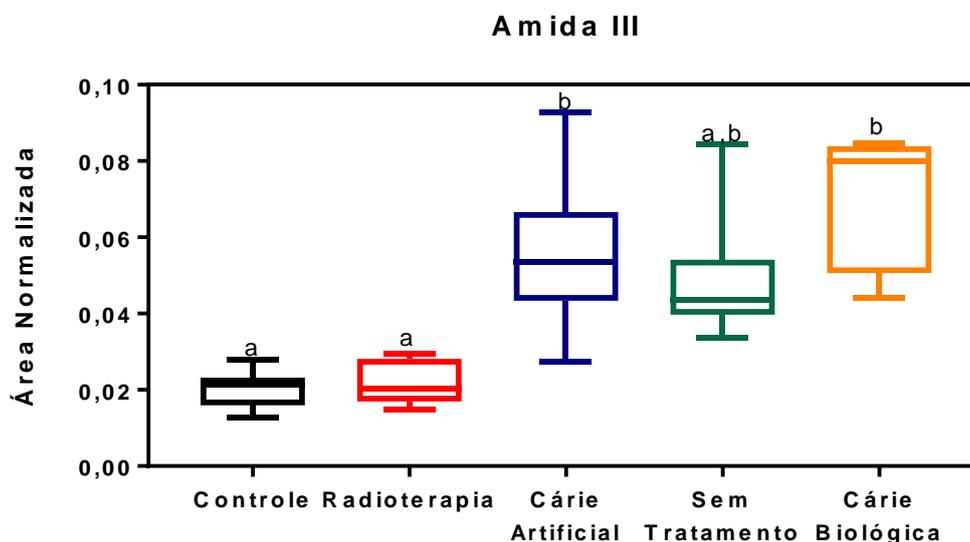
Fonte: Do próprio autor.

Figura 82 (cont.): Valores médios, com os respectivos desvios-padrão, das proporções das áreas normalizadas pela banda de fosfato v_3 das bandas de amida (I e II) e de carbonato (v_2 , v_3 e v_4) das amostras de dentina radicular sadias (controle), após radioterapia, depois da desmineralização (cárie artificial), posterior imersão em saliva artificial (sem tratamento) e após desafio cariogênico (cárie biológica). Letras distintas, acima de cada barra, indicam que há diferenças estatísticas entre os grupos segundo o teste de ANOVA de uma via com pós-teste de Holm-Sidak para amostras dependentes, com $\alpha=0,05$.



Fonte: Do próprio autor.

Figura 83: Distribuição dos valores médios, com os respectivos desvios-padrão e medianas, das proporções das áreas normalizadas pela banda de fosfato v_3 da banda de amida III das amostras de dentina radicular sadias (controle), após radioterapia, depois da desmineralização (cárie artificial), posterior imersão em saliva artificial (tratamento) e depois do desafio cariogênico (cárie biológica). Letras distintas, acima de cada barra, indicam que há diferenças estatísticas entre os grupos segundo o teste de Friedman com pós-teste de Dunn para amostras dependentes, com $\alpha=0,05$.



Fonte: Do próprio autor.

Tabela 18: Valores de p resultantes da comparação intergrupos de G1 (controle, radioterapia, cárie artificial, sem tratamento e cárie biológica) por meio do teste de ANOVA de uma via com pós-teste de Holm-Sidak (para as bandas de amida I e II, bem como de carbonato v_2, v_3 e v_4) ou de Friedman com pós-teste de Dunn (para a banda de amida III). Ambos os testes consideraram amostras dependentes. Valores de p inferiores a 0,05 (em vermelho) são estatisticamente significantes.

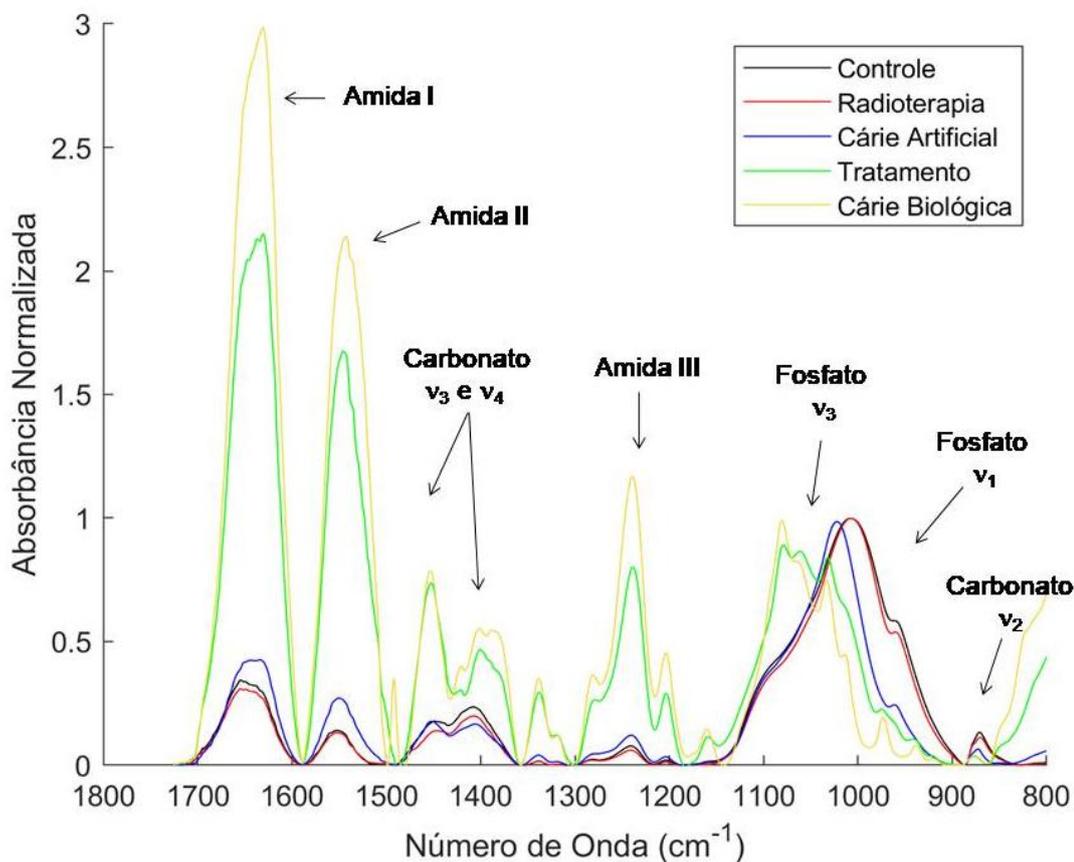
	Amida I	Amida II	Amida III	Carbonato	Carbonato
				v_2	v_3 e v_4
Controle vs. Radioterapia	0,9543	0,6232	>0,9999	0,1822	0,1799
Controle vs. Cárie Artificial	0,0272	0,0018	0,0024	<0,0001	0,6165
Controle vs. Sem Tratamento	0,0183	0,0004	0,0721	<0,0001	0,3713
Controle vs. Cárie Biológica	<0,0001	<0,0001	0,0002	<0,0001	0,6165
Radioterapia vs. Cárie Artificial	0,0038	0,0007	0,0024	0,0007	0,1799
Radioterapia vs. Sem Tratamento	0,0012	<0,0001	0,0721	<0,0001	0,6165
Radioterapia vs. Cárie Biológica	<0,0001	<0,0001	0,0002	<0,0001	0,4949
Cárie Artificial vs. Sem Tratamento	0,7417	0,6232	>0,9999	0,0371	0,1103
Cárie Artificial vs. Cárie Biológica	0,0976	0,0157	>0,9999	0,0034	0,3713
Sem Tratamento vs. Cárie Biológica	0,0156	0,0157	>0,9999	0,0098	0,6165

Fonte: Do próprio autor.

Os dados apresentados nas Figuras 82 e 83, bem como na Tabela 18, confirmam as alterações qualitativas observadas na Figura 81, haja vista que, após a cárie biológica, houve um aumento nas bandas de amida I e II proporcional ao fosfato ν_3 e uma redução na banda de carbonato ν_2 (também proporcionalmente ao fosfato ν_3) em comparação ao espectro pós-tratamento. Desta forma, infere-se houve maior exposição de colágeno juntamente com uma redução no conteúdo mineral. Estas características são compatíveis com a progressão de cárie por ação de *S. mutans*.

A Figura 84 apresenta os espectros médios das amostras do grupo G2 que foram tratadas com a aplicação tópica de flúor fosfato acidulado (FFA). Observa-se que o espectro após o desafio cariogênico com *S. mutans* (cárie biológica, linha laranja) é muito semelhante àquele obtido após o tratamento com FFA (tratamento, linha verde). No entanto, após a indução de cárie biológica é perceptível que houve um aumento na intensidade de todas as bandas da matriz orgânica, bem como na de carbonato ν_3 e ν_4 . Além disso, percebe-se que também houve o surgimento da banda relacionada às proteínas do biofilme¹⁵⁸ na região de 1500 cm^{-1} , bem como a manutenção da banda entre 1100 e 1200 cm^{-1} , que surgiu após o tratamento com FFA, e corresponde a resquícios da formulação comercial de flúor utilizada⁶¹. As bandas de fosfato ν_1 e ν_3 , bem como a de carbonato ν_2 parecem ter permanecido inalteradas quando comparados os grupos cárie biológica e tratamento. Todas essas alterações serem compatíveis com uma intensificação da desmineralização por ação do *S. mutans*.

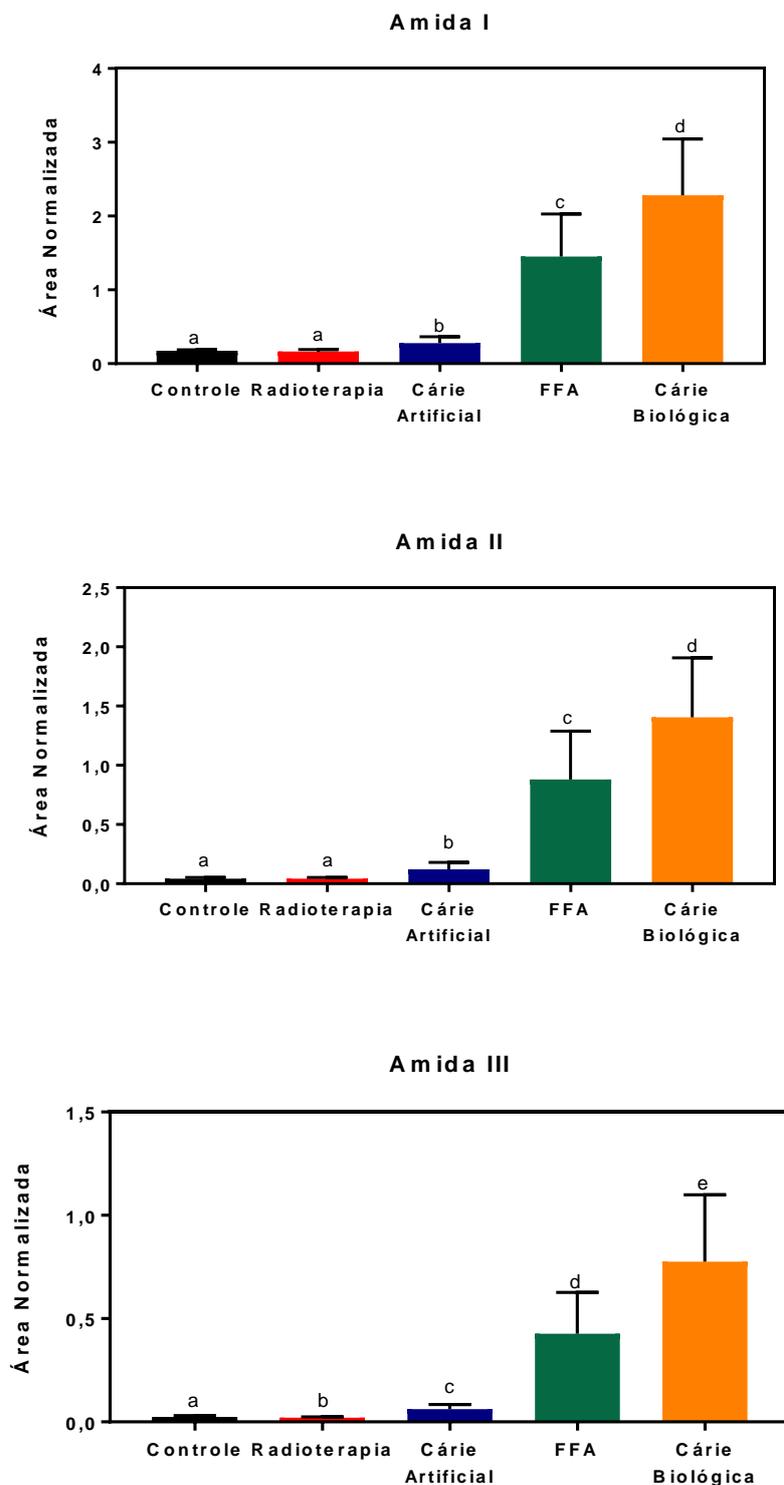
Figura 84: Média dos espectros de absorção no infravermelho, na região entre 1800 e 800 cm^{-1} , após normalização pela intensidade da banda ν_3 fosfato e traçado da linha de base, das amostras de dentina do grupo G2 em cinco etapas experimentais: controle, após a radioterapia, depois da desmineralização (cárie artificial), após o tratamento com FFA e depois desafio com cárie biológica.



Fonte: Do próprio autor.

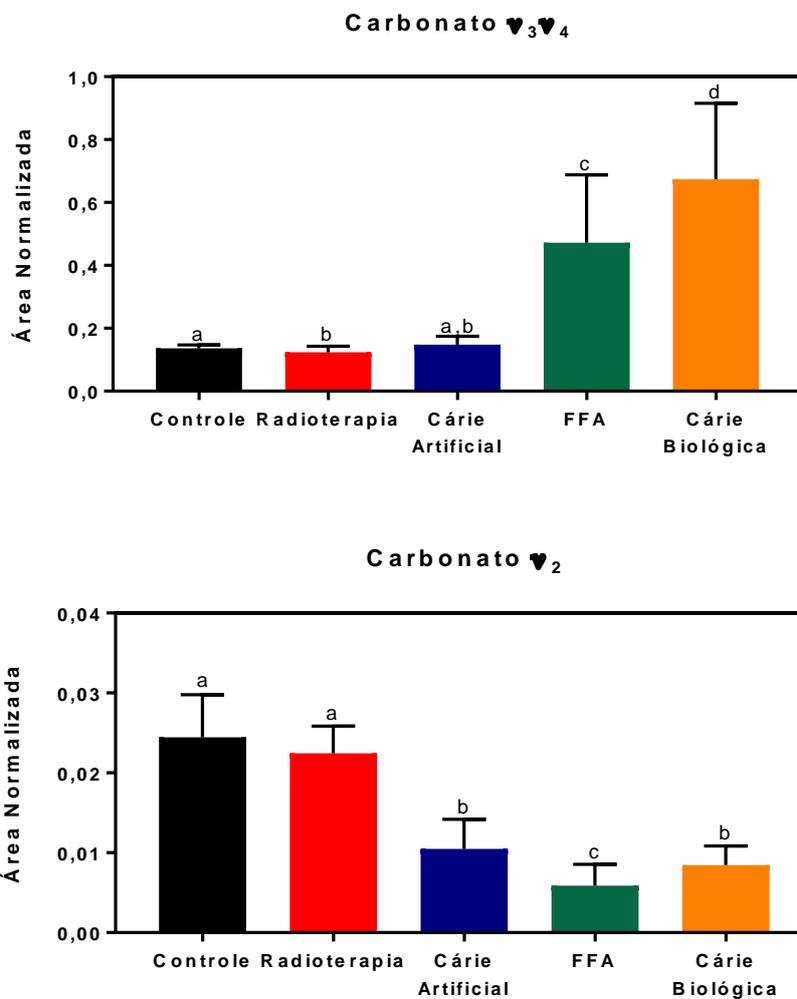
A comparação estatística resultante da análise semiquantitativa é apresentada na Figura 85 e os valores de p são descritos na Tabela 19.

Figura 85: Valores médios, com os respectivos desvios-padrão, das proporções das áreas normalizadas pela banda de fosfato ν_3 das principais bandas de absorção das amostras de dentina radicular sadias (controle), após radioterapia, depois da desmineralização (cárie artificial), posterior tratamento com FFA e após desafio cariogênico (cárie biológica). Letras distintas, acima de cada barra, indicam que há diferenças estatísticas entre os grupos segundo o teste de ANOVA de uma via com pós-teste de Holm-Sidak para amostras dependentes, com $\alpha=0,05$.



Fonte: Do próprio autor.

Figura 85 (cont.): Valores médios, com os respectivos desvios-padrão, das proporções das áreas normalizadas pela banda de fosfato ν_3 das principais bandas de absorção das amostras de dentina radicular sadias (controle), após radioterapia, depois da desmineralização (cárie artificial), posterior tratamento com FFA e após desafio cariogênico (cárie biológica). Letras distintas, acima de cada barra, indicam que há diferenças estatísticas entre os grupos segundo o teste de ANOVA de uma via com pós-teste de Holm-Sidak para amostras dependentes, com $\alpha=0,05$.



Fonte: Do próprio autor.

Tabela 19: Valores de p resultantes da comparação intergrupos de G2 (controle, radioterapia, cárie artificial, FFA e cárie biológica) por meio do teste de ANOVA de uma via com pós-teste de Holm-Sidak para amostras dependentes. Valores de p inferiores a 0,05 (em vermelho) são estatisticamente significantes.

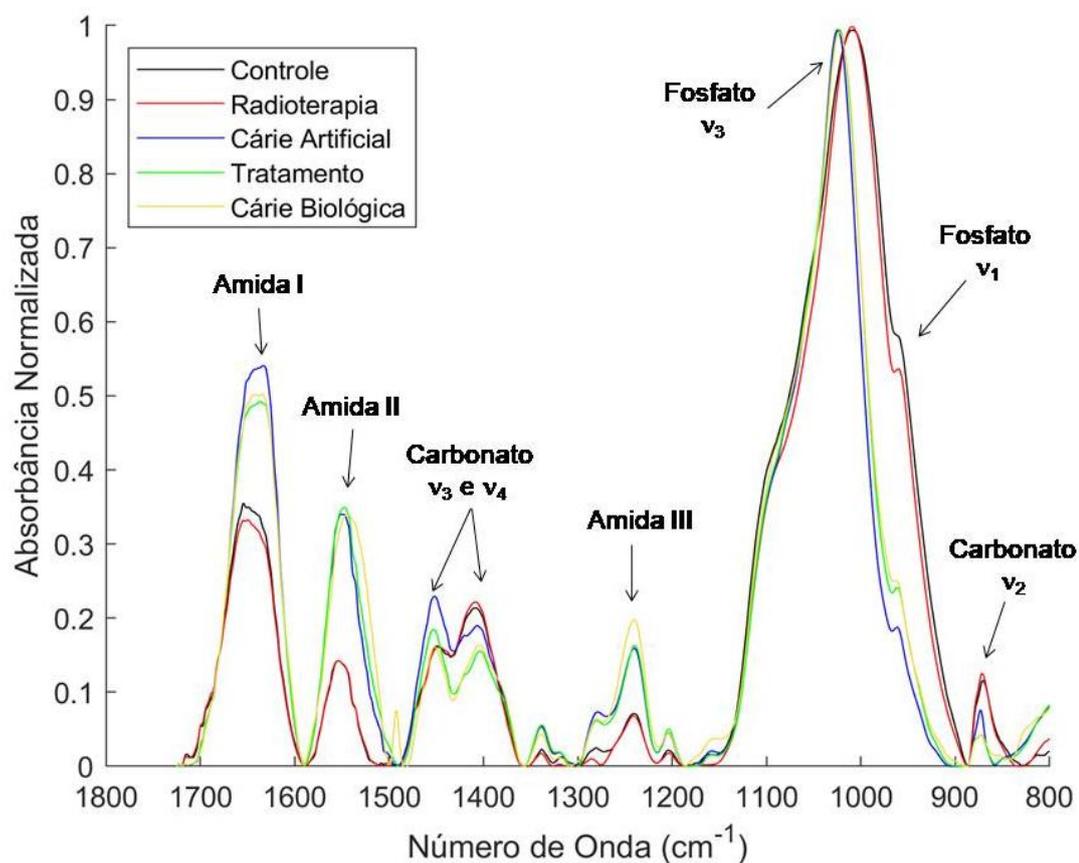
	Valores de p				
	Amida I	Amida II	Amida III	Carbonato	Carbonato
				v ₂	v ₃ e v ₄
Controle vs. Radioterapia	0,3677	0,7239	0,0225	0,2318	0,0224
Controle vs. Cárie Artificial	0,0035	0,0005	0,0002	<0,0001	0,2424
Controle vs. FFA	<0,0001	<0,0001	0,0002	<0,0001	0,0018
Controle vs. Cárie Biológica	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Radioterapia vs. Cárie Artificial	0,0035	0,0008	0,0002	<0,0001	0,0662
Radioterapia vs. FFA	<0,0001	<0,0001	0,0002	<0,0001	0,0018
Radioterapia vs. Cárie Biológica	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Cárie Artificial vs. FFA	<0,0001	<0,0001	0,0002	0,037	0,0018
Cárie Artificial vs. Cárie Biológica	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,2318	0,0001
FFA vs. Cárie Biológica	0,0021	0,0028	0,0009	0,0288	0,0145

Fonte: Do próprio autor.

Os dados apresentados na Figura 85 e na Tabela 19 confirmam as observações qualitativas feitas a respeito do espectro pós-cárie biológica (Figura 84), haja vista que houve aumentos estatisticamente significativos em todas as bandas da matriz orgânica (amidas I, II e III), bem como na de carbonato v₃ e v₄, que sofre interferência da banda de amida II²⁸, em comparação aos demais grupos. Reitera-se que essas alterações podem estar relacionadas tanto à progressão de cárie como ao efeito do espessante contido na formulação comercial de FFA gel utilizada e que remanesceu mesmo após enxague⁶¹.

A Figura 86 exhibe os espectros médios para o grupo G3, cujas amostras foram tratadas com irradiação *laser*. Nota-se que após a cárie biológica, as bandas das matrizes orgânica e inorgânica parecem ter permanecido inalteradas em relação ao espectro pós-tratamento. A única exceção é a banda de amida III que aparenta ter sofrido uma pequena redução após o desafio cariogênico. Ainda, assim como ocorreu com os demais grupos, verifica-se o surgimento de uma banda na região de 1500 cm⁻¹ relacionada ao biofilme. Todas essas observações qualitativas podem ser evidências de que o tratamento com *laser* promoveu ao tecido dentinário maior resistência à ação do *S. mutans*, por mecanismos já elucidados anteriormente.

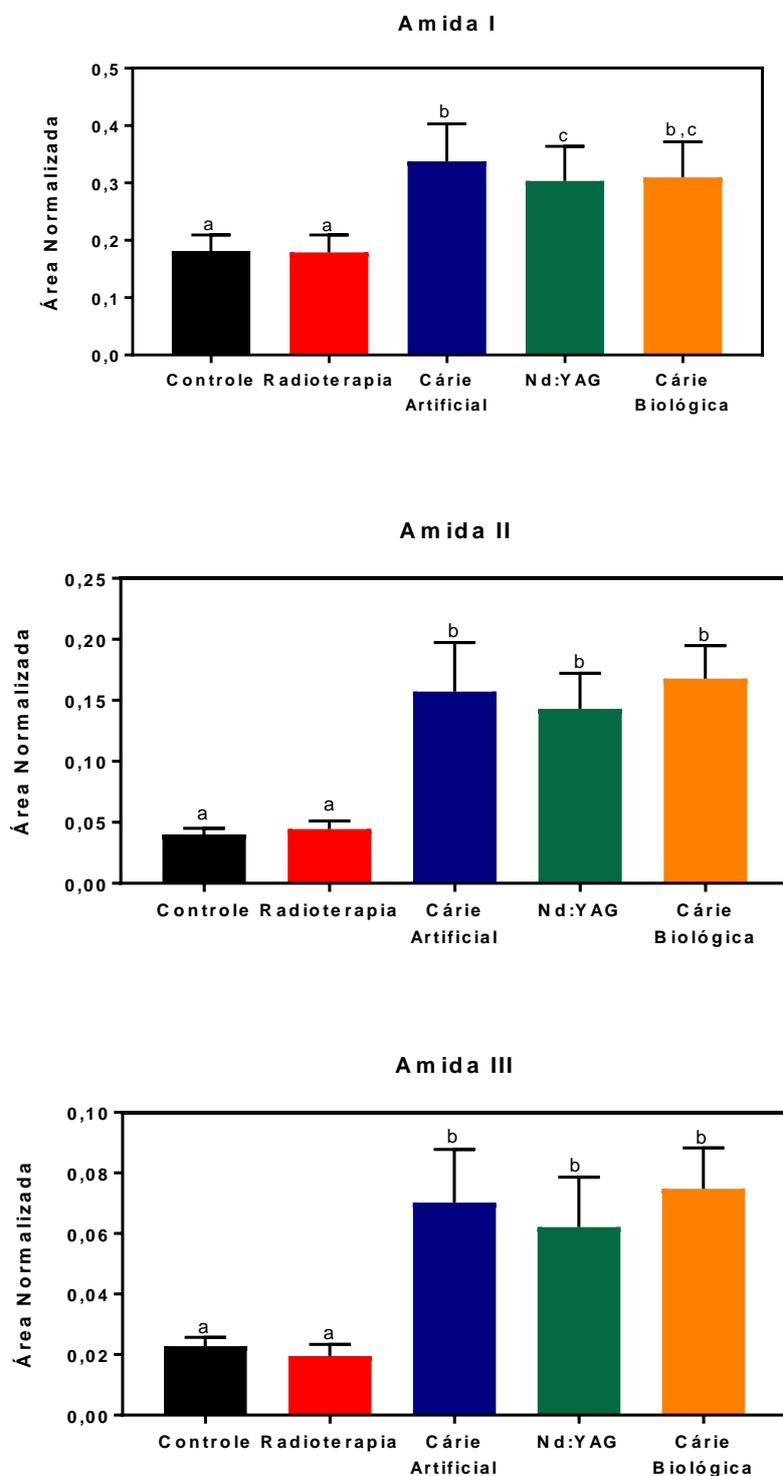
Figura 86: Média dos espectros de absorção no infravermelho, na região entre 1800 e 800 cm^{-1} , após normalização pela intensidade da banda ν_3 fosfato e traçado da linha de base, das amostras de dentina do grupo G3 em cinco etapas experimentais: controle, após a radioterapia, depois da desmineralização (cárie artificial), após o tratamento com Nd:YAG e depois do desafio com cárie biológica.



Fonte: Do próprio autor.

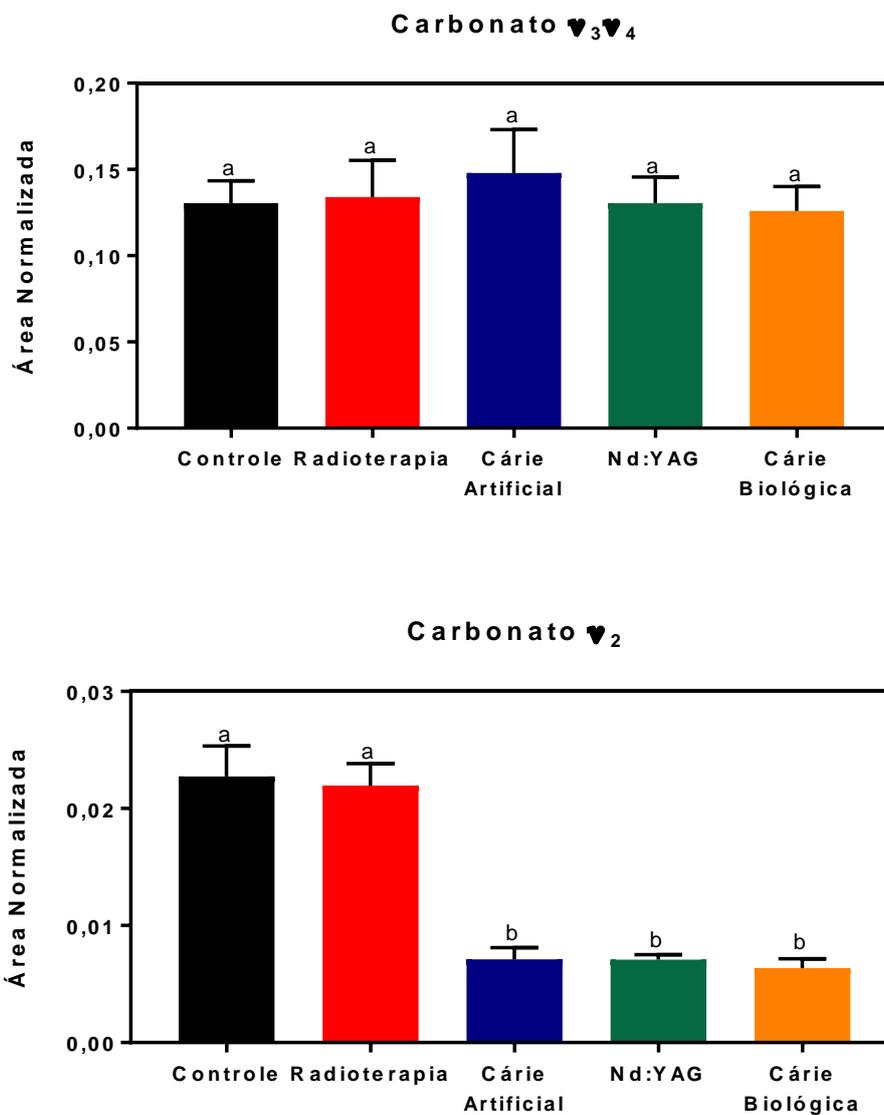
A Figura 87 apresenta a comparação estatística da análise semiquantitativa das amostras do grupo G3. Os valores de p resultantes desta comparação estatística, por sua vez, estão discriminados na Tabela 20.

Figura 87: Valores médios, com os respectivos desvios-padrão, das proporções das áreas normalizadas pela banda de fosfato ν_3 das principais bandas de absorção das amostras de dentina radicular sadias (controle), após radioterapia, depois da desmineralização (cárie artificial), posterior tratamento com irradiação *laser* e após desafio cariogênico (cárie biológica). Letras distintas, acima de cada barra, indicam que há diferenças estatísticas entre os grupos segundo o teste de ANOVA de uma via com pós-teste de Holm-Sidak para amostras dependentes, com $\alpha=0,05$.



Fonte: Do próprio autor.

Figura 87 (cont.): Valores médios, com os respectivos desvios-padrão, das proporções das áreas normalizadas pela banda de fosfato ν_3 das principais bandas de absorção das amostras de dentina radicular sadias (controle), após radioterapia, depois da desmineralização (cárie artificial), posterior tratamento com irradiação laser e após desafio cariogênico (cárie biológica). Letras distintas, acima de cada barra, indicam que há diferenças estatísticas entre os grupos segundo o teste de ANOVA de uma via com pós-teste de Holm-Sidak para amostras dependentes, com $\alpha=0,05$.



Fonte: Do próprio autor.

Tabela 20: Valores de p resultantes da comparação intergrupos de G3 (controle, radioterapia, cárie artificial, irradiação *laser* e cárie biológica) por meio do teste de ANOVA de uma via com pós-teste de Holm-Sidak para amostras dependentes. Valores de p inferiores a 0,05 (em vermelho) são estatisticamente significantes.

	Valores de p				
	Amida I	Amida II	Amida III	Carbonato ν_2	Carbonato ν_3 e ν_4
	Controle vs. Radioterapia	0,9392	0,2688	0,1045	0,6109
Controle vs. Cárie Artificial	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,3912
Controle vs. Nd:YAG	<0,0001	<0,0001	0,0002	<0,0001	0,9813
Controle vs. Cárie Biológica	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,8805
Radioterapia vs. Cárie Artificial	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,6779
Radioterapia vs. Nd:YAG	0,0003	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,8843
Radioterapia vs. Cárie Biológica	0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,8491
Cárie Artificial vs. Nd:YAG	0,0206	0,2688	0,1589	0,9703	0,0981
Cárie Artificial vs. Cárie Biológica	0,6068	0,5124	0,4208	0,4858	0,2576
Nd:YAG vs. Cárie Biológica	0,9392	0,2688	0,1045	0,09	0,8805

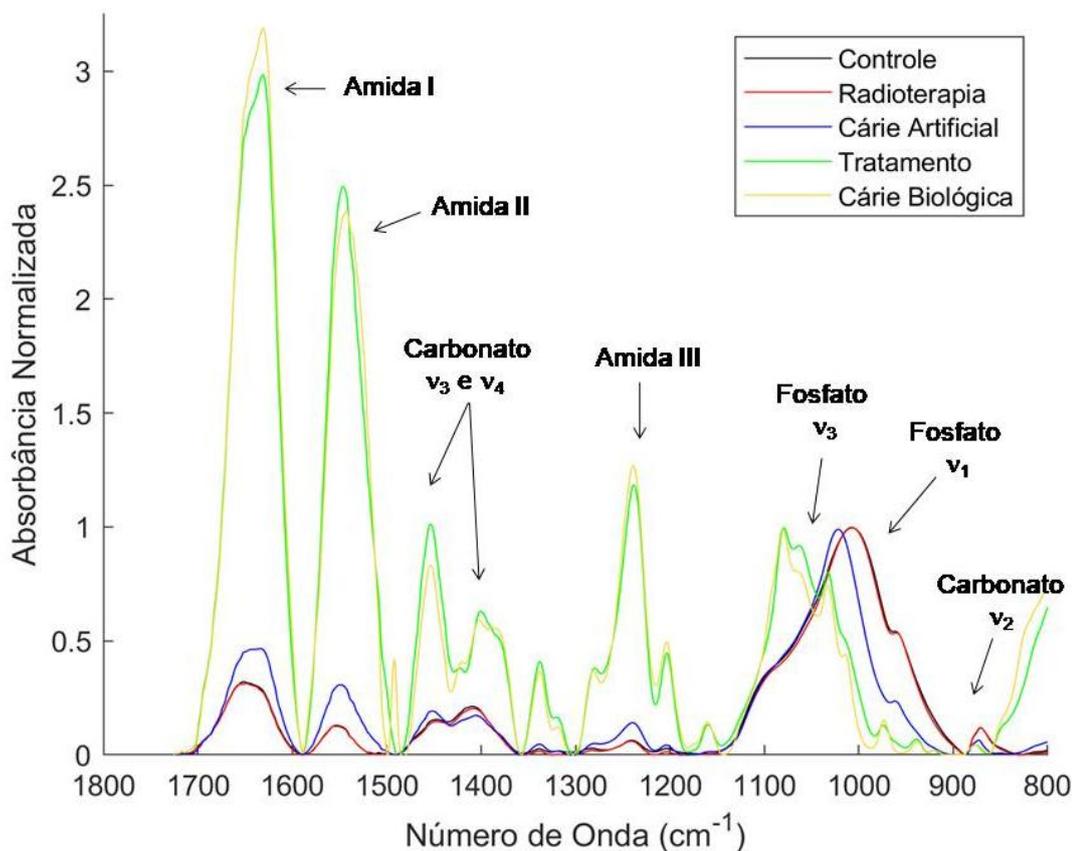
Fonte: Do próprio autor.

As informações contidas na Figura 87 e na Tabela 20 corroboram as alterações qualitativas descritas para as amostras do grupo G3 após o desafio cariogênico, haja vista que não houve alterações nas bandas das matrizes orgânica e inorgânica em comparação aos grupos cárie artificial e tratamento. Portanto, é possível inferir que o tratamento com irradiação *laser* conferiu maior resistência à desmineralização ao tecido dentinário por mecanismos que já foram elucidados.

A Figura 88 ilustra os espectros das amostras do Grupo G4, cujo tratamento consistiu na combinação da aplicação tópica de FFA com posterior irradiação *laser*. Verifica-se, no espectro após a indução de cárie biológica, que houve o surgimento da banda em 1500 cm^{-1} relacionada ao biofilme¹⁵⁸, bem como a permanência da banda na região entre 1100 e 1200 cm^{-1} , que corresponde a resquícios da formulação comercial de flúor utilizada⁶¹. Salienta-se que apesar do espectro ser semelhante ao do grupo G2 (Figura 84), é notável que as bandas da matriz orgânica e inorgânica permaneceram praticamente inalteradas quando comparados os grupos tratamento e cárie biológica. Excetuam-se apenas as bandas de amida I e de carbonato ν_3 e ν_4 que sofreram aumento e redução, respectivamente. Todas essas alterações qualitativas sugerem que pode ter havido uma combinação entre os

tratamentos que proporcionou maior resistência ao tecido dentinário perante a ação da cárie biológica.

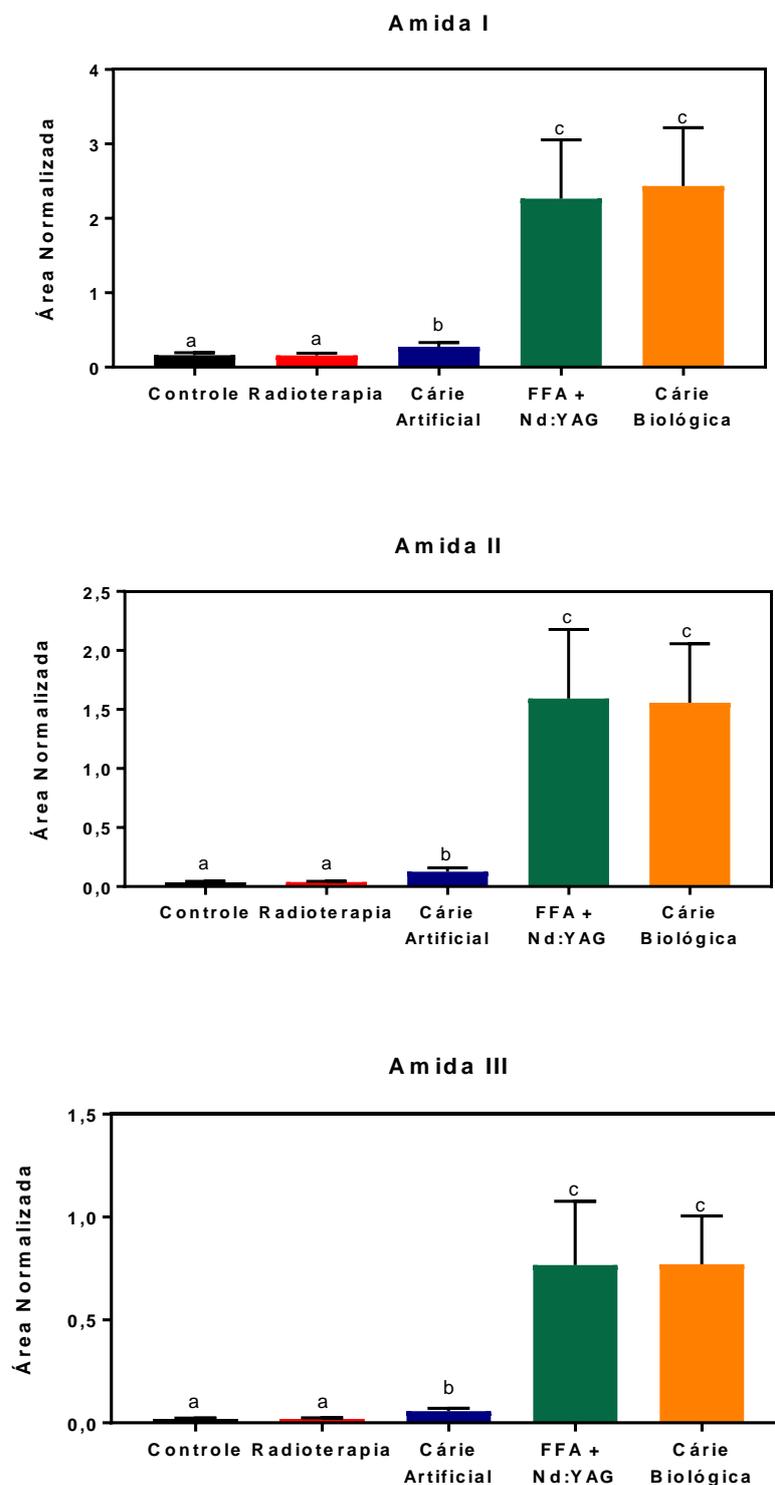
Figura 88: Média dos espectros de absorção no infravermelho, na região entre 1800 e 800 cm^{-1} , após normalização pela intensidade da banda ν_3 fosfato e traçado da linha de base, das amostras de dentina do grupo G4 em cinco etapas experimentais: controle, após a radioterapia, depois da desmineralização (cárie artificial), após o tratamento com FFA+Nd:YAG e depois do desafio com cárie biológica.



Fonte: Do próprio autor.

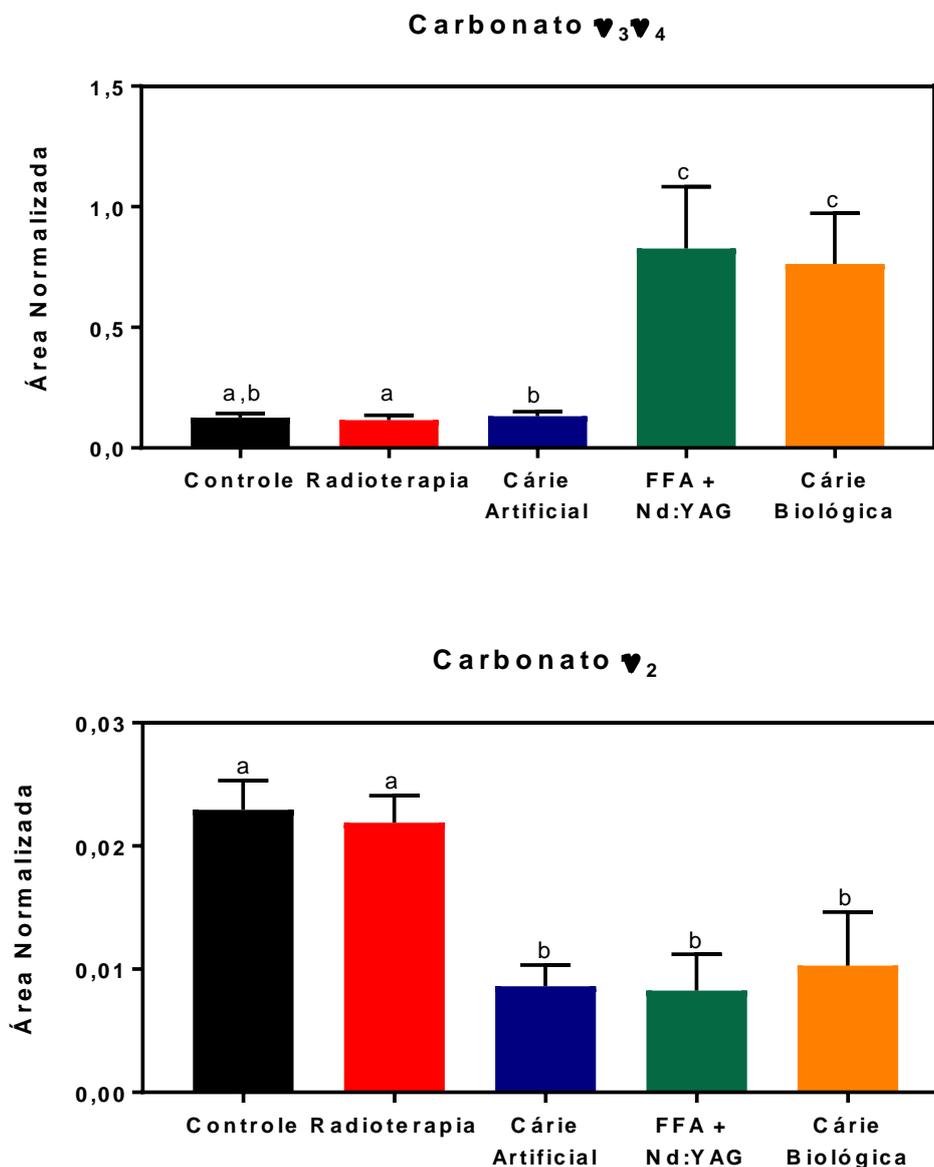
A comparação estatística da análise semiquantitativa das amostras do grupo G4 em diferentes etapas experimentais é exibida na Figura 89. Os valores de p resultantes de tal comparação são descritos na Tabela 21.

Figura 89: Valores médios, com os respectivos desvios-padrão, das proporções das áreas normalizadas pela banda de fosfato ν_3 das principais bandas de absorção das amostras de dentina radicular sadias (controle), após radioterapia, depois da desmineralização (cárie artificial), posterior tratamento com FFA+Nd:YAG e após desafio cariogênico (cárie biológica). Letras distintas, acima de cada barra, indicam que há diferenças estatísticas entre os grupos segundo o teste de ANOVA de uma via com pós-teste de Holm-Sidak para amostras dependentes, com $\alpha=0,05$.



Fonte: Do próprio autor.

Figura 89 (cont.): Valores médios, com os respectivos desvios-padrão, das proporções das áreas normalizadas pela banda de fosfato ν_3 das principais bandas de absorção das amostras de dentina radicular sadias (controle), após radioterapia, depois da desmineralização (cárie artificial), posterior tratamento com FFA+Nd:YAG e após desafio cariogênico (cárie biológica). Letras distintas, acima de cada barra, indicam que há diferenças estatísticas entre os grupos segundo o teste de ANOVA de uma via com pós-teste de Holm-Sidak para amostras dependentes, com $\alpha=0,05$.



Fonte: Do próprio autor.

Tabela 21: Valores de p resultantes da comparação intergrupos de G4 (controle, radioterapia, cárie artificial, FFA+Nd:YAG e cárie biológica) por meio do teste de ANOVA de uma via com pós-teste de Holm-Sidak para amostras dependentes. Valores de p inferiores a 0,05 (em vermelho) são estatisticamente significantes.

	Valores de p				
	Amida I	Amida II	Amida III	Carbonato ν_2	Carbonato ν_3 e ν_4
	Controle vs. Radioterapia	0,7275	0,5723	0,9614	0,1814
Controle vs. Cárie Artificial	0,0009	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,559
Controle vs. FFA+Nd:YAG	<0,0001	<0,0001	0,0002	<0,0001	<0,0001
Controle vs. Cárie Biológica	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Radioterapia vs. Cárie Artificial	0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,043
Radioterapia vs. FFA+Nd:YAG	<0,0001	<0,0001	0,0002	<0,0001	<0,0001
Radioterapia vs. Cárie Biológica	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Cárie Artificial vs. FFA+Nd:YAG	<0,0001	<0,0001	0,0002	0,7324	<0,0001
Cárie Artificial vs. Cárie Biológica	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,5552	<0,0001
FFA+Nd:YAG vs. Cárie Biológica	0,7275	0,8405	0,9673	0,4503	0,559

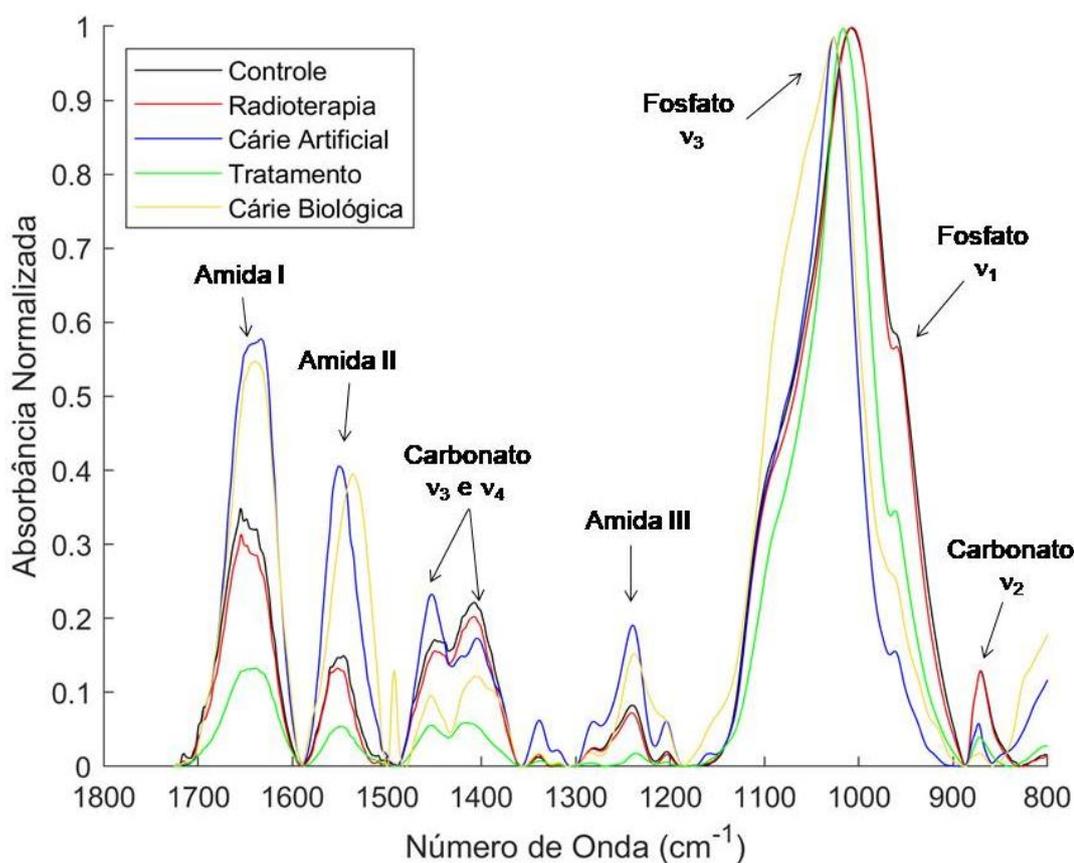
Fonte: Do próprio autor.

Os dados na Figura 89 e na Tabela 21 demonstram que não houve alterações nas bandas correspondentes às matrizes orgânica e inorgânica quando comparados os grupos cárie biológica e tratamento. Esse resultado é uma evidência de que a associação de FFA com irradiação *laser* promove maior resistência à desmineralização à dentina.

Como foi mencionado na discussão da análise composicional por ATR-FTIR pós-tratamentos, a dificuldade em padronizar um método para realizar a normalização para posterior análise semiquantitativa das amostras do grupo G5, tratadas exclusivamente com Biosilicato[®] (BS), fez com que nós optássemos por descartar tal análise para este grupo, uma vez que os resultados poderiam nos levar a conclusões errôneas. No entanto, foi possível fazer algumas inferências qualitativas a respeito do efeito do BS, em algumas amostras, perante o desafio cariogênico com base nas informações da Figura 90, que considera o método de normalização 1 elucidado anteriormente. Nota-se que, após o desafio cariogênico, houve o surgimento de uma banda em 1500 cm^{-1} (atribuída ao biofilme)¹⁵⁸, uma diminuição nas bandas da matriz orgânica (amida I, II e III) e nas de carbonato ν_2 , ν_3 e ν_4 . Ainda, houve um deslocamento para um número de onda menor nas bandas de

amida II e III, além do alargamento da banda de fosfato ν_3 (que está centrado em 1024 cm^{-1}) e do surgimento de um ombro nesta mesma banda na região entre 1100 e 1200 cm^{-1} . Todas essas alterações, *a priori*, são indícios de remineralização, apesar da indução de cárie biológica. Isso significa que o subproduto da dissolução do BS conferiu maior resistência à ação do *S. mutans*.

Figura 90: Média dos espectros de absorção no infravermelho, na região entre 1800 e 800 cm^{-1} , após normalização pela intensidade da banda ν_3 fosfato e traçado da linha de base, das amostras de dentina do grupo G5 em cinco etapas experimentais: controle, após a radioterapia, depois da desmineralização (cárie artificial), após o tratamento com BS e depois do desafio com cárie biológica.

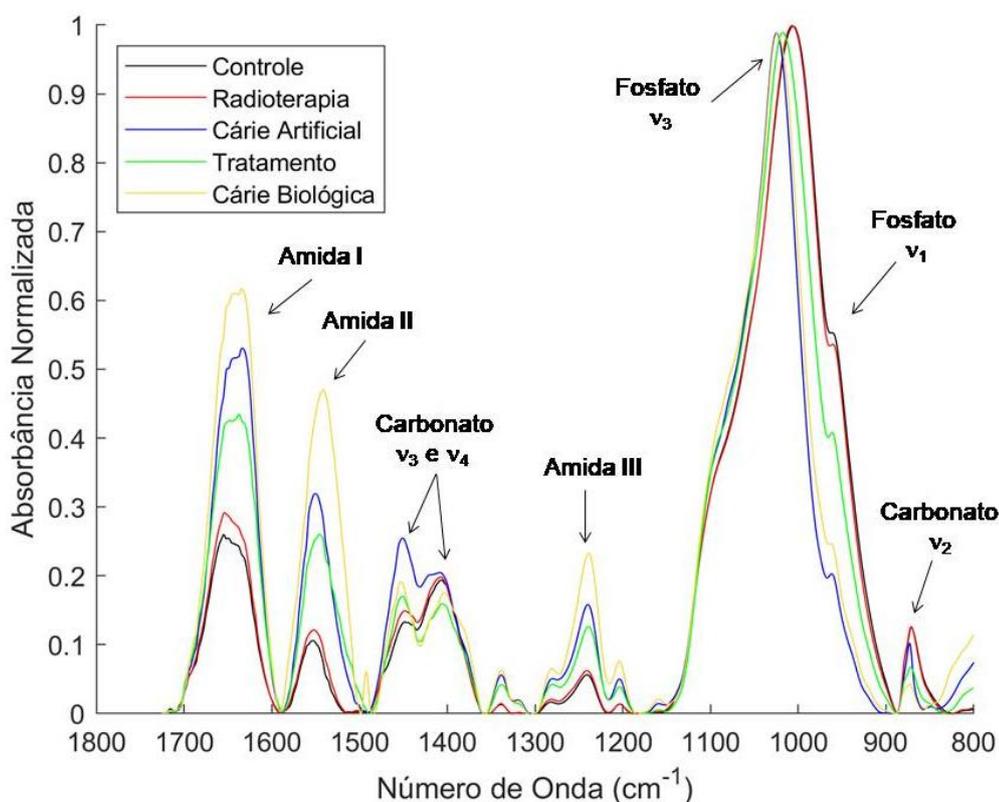


Fonte: Do próprio autor.

A Figura 91, por sua vez, apresenta os espectros das amostras do grupo G6 que foram tratadas com a aplicação de BS com posterior irradiação *laser*. Assim como ocorreu com os demais grupos, observa-se, no espectro pós-cárie biológica, o surgimento da banda na região de 1500 cm^{-1} e que está relacionada ao biofilme. Ainda, nota-se um aumento na intensidade de todas as bandas da matriz orgânica

(amida I, II e III), bem como uma redução nas bandas da matriz inorgânica (fosfato ν_1 e ν_3 e carbonato ν_2 , ν_3 e ν_4). Todas essas alterações podem ser indícios de que a camada superficial formada pela associação de BS com irradiação *laser* sofreu dissolução parcial, protegendo a dentina da ação do *S. mutans*.

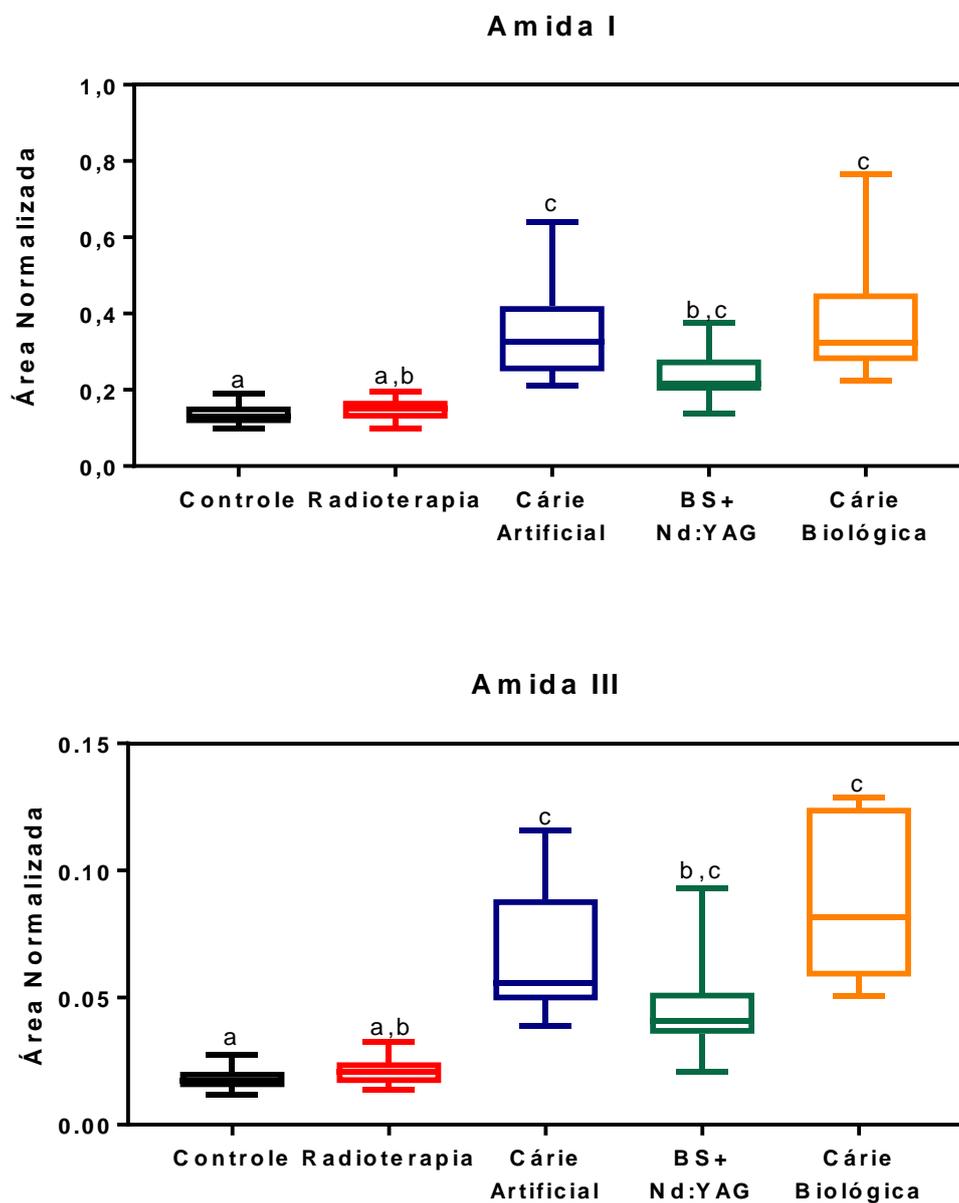
Figura 91: Média dos espectros de absorção no infravermelho, na região entre 1800 e 800 cm^{-1} , após normalização pela intensidade da banda ν_3 fosfato e traçado da linha de base, das amostras de dentina do grupo G6 em cinco etapas experimentais: controle, após a radioterapia, depois da desmineralização (cárie artificial), após o tratamento com BS+Nd:YAG e depois do desafio com cárie biológica.



Fonte: Do próprio autor.

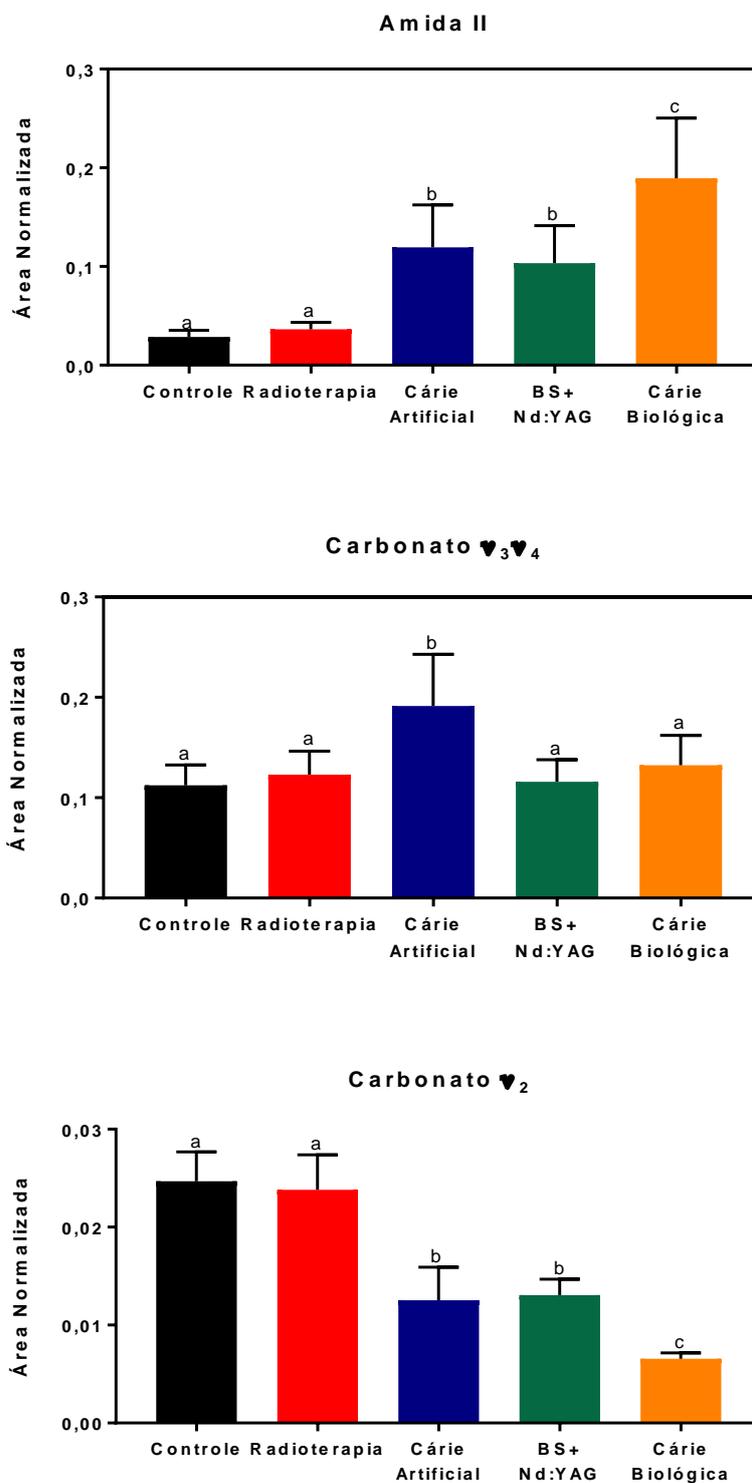
As Figuras 92 e 93 apresentam a comparação estatística para as amostras do grupo G6. A Tabela 22, por sua vez, discrimina os valores de p resultantes desta comparação.

Figura 92: Distribuição dos valores médios, com os respectivos desvios-padrão e medianas, das proporções das áreas normalizadas pela banda de fosfato ν_3 das bandas de amida I e III das amostras de dentina radicular sadias (controle), após radioterapia, depois da desmineralização (cárie artificial), posterior tratamento com BS+Nd:YAG (tratamento) e após desafio cariogênico (cárie biológica). Letras distintas, acima de cada barra, indicam que há diferenças estatísticas entre os grupos segundo o teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn para amostras independentes, com $\alpha=0,05$.



Fonte: Do próprio autor.

Figura 93: Valores médios, com os respectivos desvios-padrão, das proporções das áreas normalizadas pela banda de fosfato ν_3 das bandas de amida II e de carbonato (ν_2, ν_3 e ν_4) das amostras de dentina radicular sadias (controle), após radioterapia, depois da desmineralização (cárie artificial), posterior tratamento com BS+Nd:YAG e após desafio cariogênico (cárie biológica). Letras distintas, acima de cada barra, indicam que há diferenças estatísticas entre os grupos segundo o teste de ANOVA de uma via com pós-teste de Holm-Sidak para amostras independentes, com $\alpha=0,05$.



Fonte: Do próprio autor.

Tabela 22: Valores de p resultantes da comparação intergrupos de G6 (controle, radioterapia, cárie artificial, BS+Nd:YAG e cárie biológica) por meio do teste de ANOVA de uma via com pós-teste de Holm-Sidak (para as bandas de amida III, bem como de carbonato ν_2, ν_3 e ν_4) ou de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn (para a banda de amida III). Ambos os testes consideraram amostras independentes. Valores de p inferiores a 0,05 (em vermelho) são estatisticamente significantes.

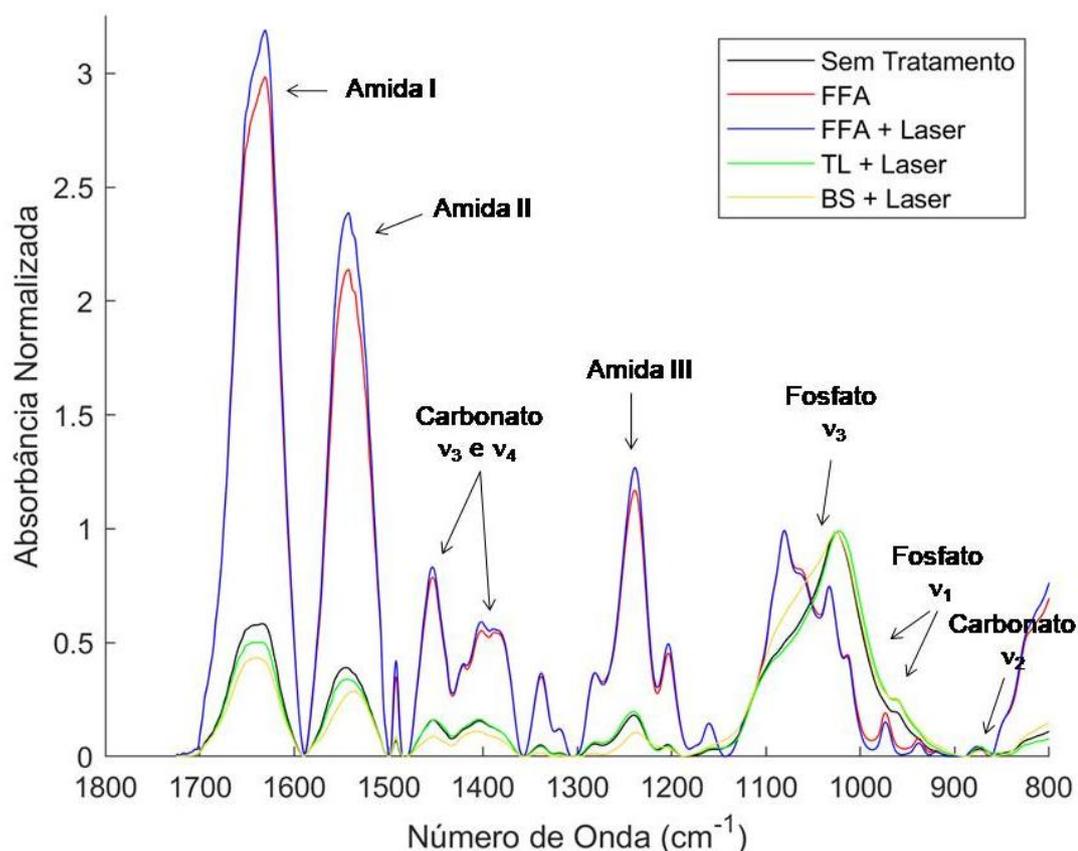
	Valores de p				
	Amida I	Amida II	Amida III	Carbonato ν_2	Carbonato ν_3 e ν_4
	Controle vs. Radioterapia	>0,9999	0,6265	>0,9999	0,7205
Controle vs. Cárie Artificial	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Controle vs. BS+Nd:YAG	0,0098	<0,0001	0,0091	<0,0001	0,883
Controle vs. Cárie Biológica	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,5768
Radioterapia vs. Cárie Artificial	<0,0001	<0,0001	0,0003	<0,0001	<0,0001
Radioterapia vs. BS+Nd:YAG	0,0684	0,0003	0,0577	<0,0001	0,883
Radioterapia vs. Cárie Biológica	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,883
Cárie Artificial vs. BS+Nd:YAG	0,5845	0,5281	>0,9999	0,7205	<0,0001
Cárie Artificial vs. Cárie Biológica	>0,9999	0,0003	>0,9999	<0,0001	0,0003
BS+Nd:YAG vs. Cárie Biológica	0,269	<0,0001	0,1792	<0,0001	0,6987

Fonte: Do próprio autor.

As informações contidas nas Figuras 92 e 93, bem como as na Tabela 22, demonstram que houve aumento na intensidade da banda de amida II e redução na banda de carbonato ν_3 e ν_4 quando comparados os espectros cárie biológica e tratamento. Reitera-se que estes resultados sugerem que a camada uniforme formada pela associação de tratamentos sofreu dissolução parcial, protegendo a dentina da ação do *S. mutans*.

E, por fim, a Figura 94 apresenta todos os espectros pós-cárie biológica dos cinco grupos considerados G1, G2, G3, G4 e G5. De maneira qualitativa, percebe-se uma semelhança entre os espectros dos grupos G2 e G4 (tratados com FFA e FFA com posterior irradiação *laser*, respectivamente), bem como entre os de G1, G3 e G6 (sem tratamento, irradiação com *laser* e aplicação de BS com posterior irradiação *laser*, respectivamente). Além disso, nota-se que, em relação ao conteúdo orgânico, houve: (i) maiores intensidades nas bandas correspondentes em G2 e G4 e (ii) menores intensidades nos demais grupos. Em relação ao conteúdo inorgânico chama a atenção o alargamento da banda de fosfato ν_3 no grupo G6 em comparação aos demais.

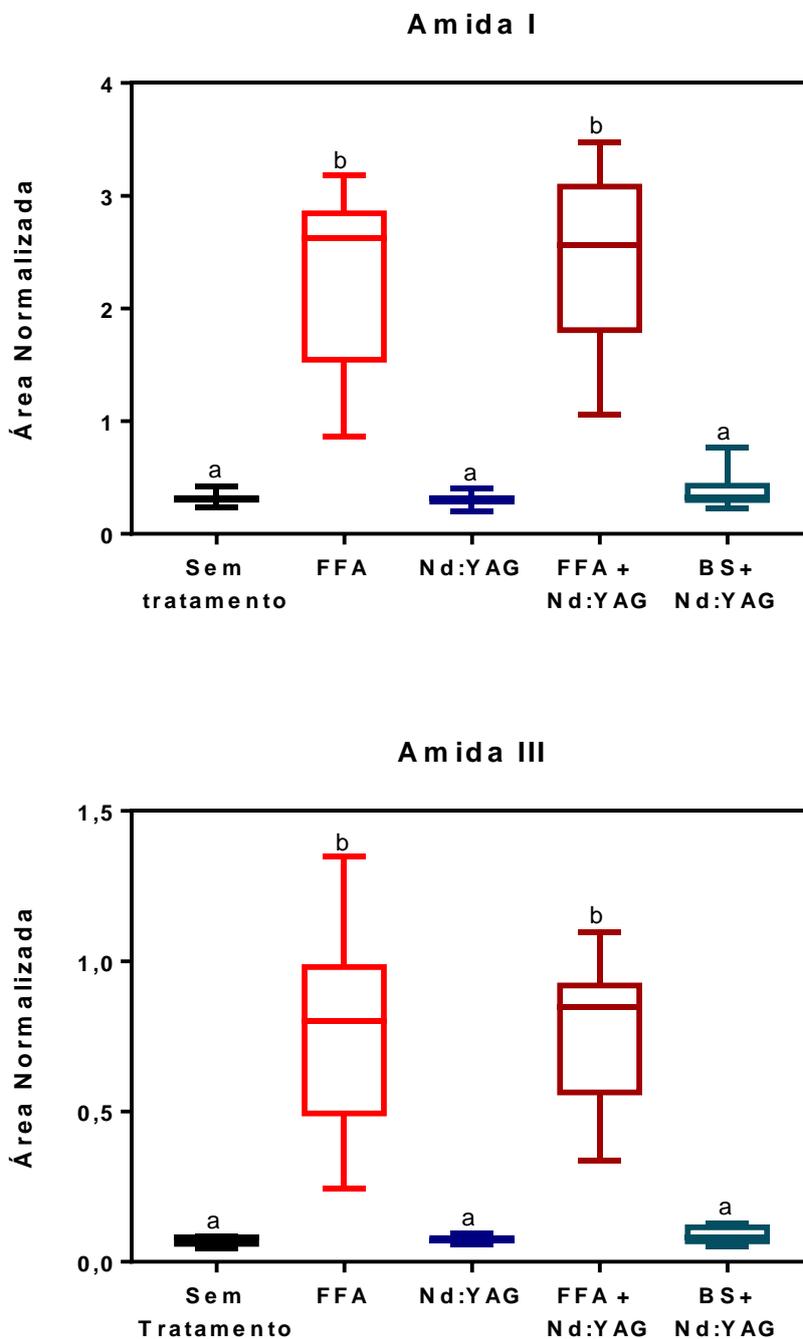
Figura 94: Média dos espectros de absorção no infravermelho, na região entre 1800 e 800 cm^{-1} , após normalização pela intensidade da banda ν_3 fosfato e traçado da linha de base, das amostras de dentina dos grupos G1 a G6, exceto G5. G1 – sem tratamento; G2 – FFA; G3 – Nd:YAG (TL+laser); G4 – FFA+Nd:YAG (FFA+Laser); G6 – BS+Nd:YAG (BS+Laser).



Fonte: Do próprio autor.

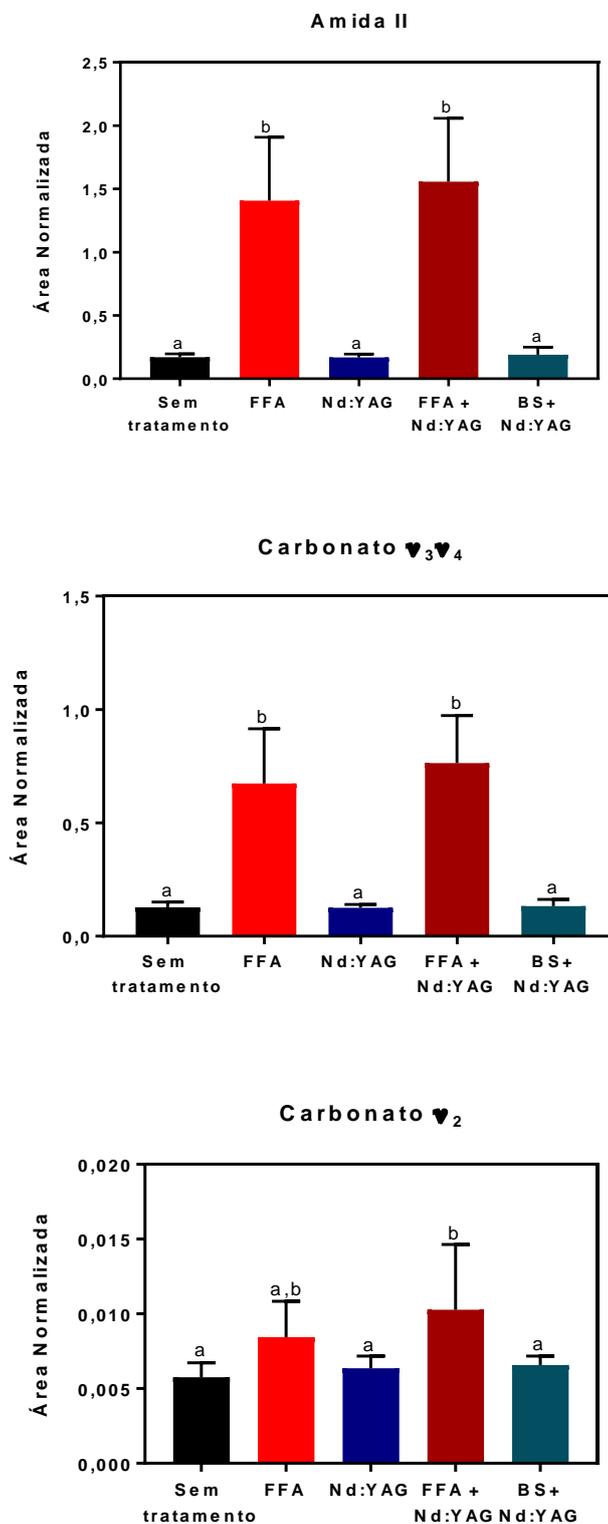
A comparação estatística da análise semiquantitativa entre cinco dos seis diferentes tratamentos propostos neste presente estudo (sem tratamento, FFA, Nd:YAG, FFA+Nd:YAG e BS+Nd:YAG) é ilustrada na Figura 95 e na Figura 96. Os valores de p são discriminados na Tabela 23.

Figura 95: Distribuição dos valores médios, com os respectivos desvios-padrão e medianas, das proporções das áreas normalizadas pela banda de fosfato ν_3 das bandas de amida I e III dos grupos G1 (sem tratamento), G2 (FFA), G3 (Nd:YAG), G4 (FFA+Nd:YAG) e G6 (BS+Nd:YAG). Letras distintas, acima de cada barra, indicam que há diferenças estatísticas entre os grupos segundo o teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn para amostras independentes, com $\alpha=0,05$



Fonte: Do próprio autor.

Figura 96: Valores médios, com os respectivos desvios-padrão, das proporções das áreas normalizadas pela banda de fosfato ν_3 das bandas de amida II e de carbonato (ν_1 , ν_2 e ν_3) dos grupos G1 (sem tratamento), G2 (FFA), G3 (Nd:YAG), G4 (FFA+Nd:YAG) e G6 (BS+Nd:YAG). Letras distintas, acima de cada barra, indicam que há diferenças estatísticas entre os grupos segundo o teste de ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey para amostras independentes, com $\alpha=0,05$.



Fonte: Do próprio autor.

Tabela 23: Valores de p resultantes da comparação intergrupos (G1, G2, G3, G4 e G6) por meio do teste de ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey para as bandas de amida II e de carbonato (ν_2, ν_3 e ν_4) ou de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn para as bandas de amida I e III. Ambos os testes consideraram amostras independentes. Valores de p inferiores a 0,05 (em vermelho) são estatisticamente significantes.

	Valores de p				
	Amida I	Amida II	Amida III	Carbonato ν_2	Carbonato ν_3 e ν_4
Sem tratamento vs. FFA	0,0004	<0,0001	0,0001	0,0541	<0,0001
Sem tratamento vs. Nd:YAG	>0,9999	>0,9999	>0,9999	0,9784	>0,9999
Sem tratamento vs. FFA+Nd:YAG	0,0002	<0,0001	0,0003	0,0004	<0,0001
Sem tratamento vs. BS+Nd:YAG	>0,9999	>0,9999	>0,9999	0,9325	>0,9999
FFA vs. Nd:YAG	0,0002	<0,0001	0,0006	0,313	<0,0001
FFA vs. FFA+Nd:YAG	>0,9999	0,8081	>0,9999	0,3664	0,603
FFA vs. BS+Nd:YAG	0,0025	<0,0001	0,0015	0,3811	<0,0001
Nd:YAG vs. FFA+Nd:YAG	<0,0001	<0,0001	0,0014	0,0083	<0,0001
Nd:YAG vs. BS+Nd:YAG	>0,9999	>0,9999	>0,9999	0,9998	>0,9999
FFA+Nd:YAG vs. BS+Nd:YAG	0,0013	<0,0001	0,0032	0,0103	<0,0001

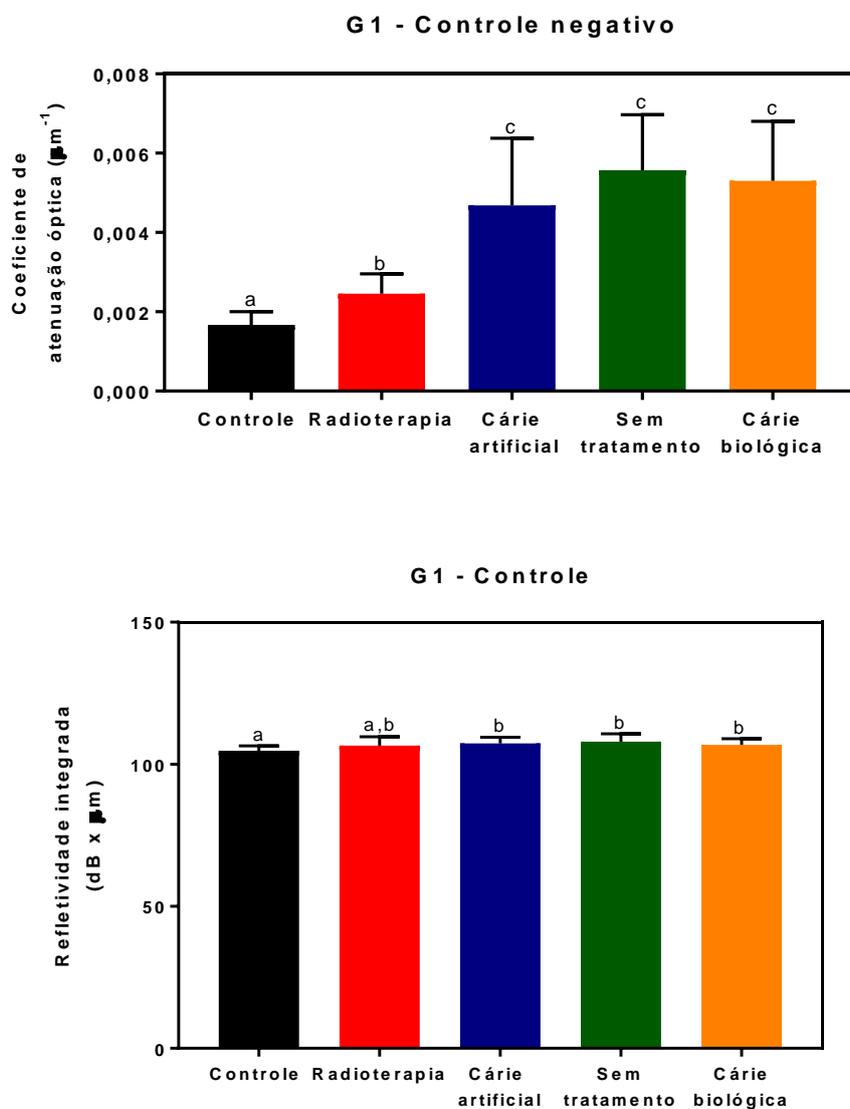
Fonte: Do próprio autor.

A partir dos dados apresentados nas Figuras 95 e 96, bem como os na Tabela 23, confirma-se a similaridade entre os espectros pós-cárie biológica entre os grupos G2 (FFA) e G4 (FFA+Nd:YAG), bem como entre G1 (sem tratamento), G3 (Nd:YAG) e G6 (FFA+Nd:YAG). Apesar desta comparação estatística não ter fornecido informações que pudessem demonstrar, do ponto de vista composicional, qual o tratamento, dentre os propostos neste estudo, foi mais resistente à ação de *S. mutans*, as comparações feitas para as mesmas amostras grupo a grupo em diferentes etapas experimentais permitem inferir que todos os tratamentos conferiram às amostras de dentina menor solubilidade em ácidos.

5.3.3.3. Avaliação de propriedades ópticas por OCT

A Figura 97 exhibe os valores do coeficiente de atenuação óptica total ($\bar{\mu}_t$) e de refletividade integrada (ΔR) para as amostras do grupo G1, que não receberam tratamento algum, após desafio cariogênico com *S. mutans*. A Tabela 24, por sua vez, discrimina os valores de p resultantes da comparação intergrupos.

Figura 97: Valores médios, com os respectivos desvios-padrão, dos coeficientes de atenuação óptica total ($\bar{\mu}_t$) e de refletividade integrada (ΔR) das amostras de dentina radicular do grupo G1 em cinco condições: hígidas (controle), radioterapia, cárie artificial, sem tratamento e cárie biológica. Letras distintas acima de cada barra denotam diferenças estatisticamente significantes ($p=0,05$) de acordo com o teste de ANOVA de uma via com pós-teste de Holm-Sidak (para $\bar{\mu}_t$) e de Tukey (para ΔR) para amostras dependentes.



Fonte: Do próprio autor.

Tabela 24: Valores de p resultantes da comparação intergrupos (controle, radioterapia, cárie artificial, sem tratamento e cárie biológica) das médias dos coeficientes de atenuação óptica total ($\bar{\mu}_t$) e de refletividade integrada (ΔR) de G1 por meio do teste de ANOVA de uma via com pós-teste de Holm-Sidak (para $\bar{\mu}_t$) ou de Tukey (para ΔR) para amostras dependentes. Valores de p inferiores a 0,05 são estatisticamente significantes.

	Valores de p	
	$\bar{\mu}_t$	ΔR
Controle vs. Radioterapia	0,0207	0,2775
Controle vs. Cárie artificial	0,002	0,021
Controle vs. Sem tratamento	<0,0001	0,0057
Controle vs. Cárie biológica	0,0001	0,0292
Radioterapia vs. Cárie artificial	0,0046	0,7043
Radioterapia vs. Sem tratamento	<0,0001	0,5995
Radioterapia vs. Cárie biológica	0,0009	0,9984
Cárie artificial vs. Sem tratamento	0,0933	0,7847
Cárie artificial vs. Cárie biológica	0,5756	0,933
Sem tratamento vs. Cárie biológica	0,5756	0,697

Fonte: Do próprio autor.

A partir dos dados apresentados na Figura 97 e na Tabela 24, é possível verificar que não há diferenças estatisticamente significantes entre os valores de $\bar{\mu}_t$ e de ΔR quando se comparam os grupos cárie biológica e sem tratamento. Possivelmente, a inexistência de diferenças entre esses grupos é indício de que o desafio cariogênico com *S. mutans* pode ter promovido alterações muito superficiais (inferiores a 7 μm em profundidade), a ponto de não ocasionar mudanças que impactassem essas propriedades ópticas, haja vista que o desafio cariogênico realizado neste estudo foi muito curto (apenas 48 horas); porém isso deve ser verificado por outras técnicas. Embora muitos trabalhos^{114,159} demonstrem a viabilidade e a eficácia da OCT no diagnóstico precoce de lesões de cárie e no monitoramento da remineralização, ainda não foram encontrados estudos clínicos que comprovem que o método possa ser utilizado isoladamente¹⁶⁰. Portanto, a associação da OCT com outros métodos tradicionais mostra-se uma estratégia muito mais eficiente. A literatura¹¹¹ relata que a OCT apresenta valores de sensibilidade e especificidade de aproximadamente 90% (quando empregado comprimento de onda de 850 nm), muito próximo ao empregado no presente estudo ($\lambda = 930$ nm). Desta forma, a análise de microdureza seccional ou de microrradiografia transversal (TMR) são as técnicas mais utilizadas para quantificação de lesões cariosas incipientes, a última inclusive é considerada padrão-ouro, e deverão ser feitas em estudos futuros,

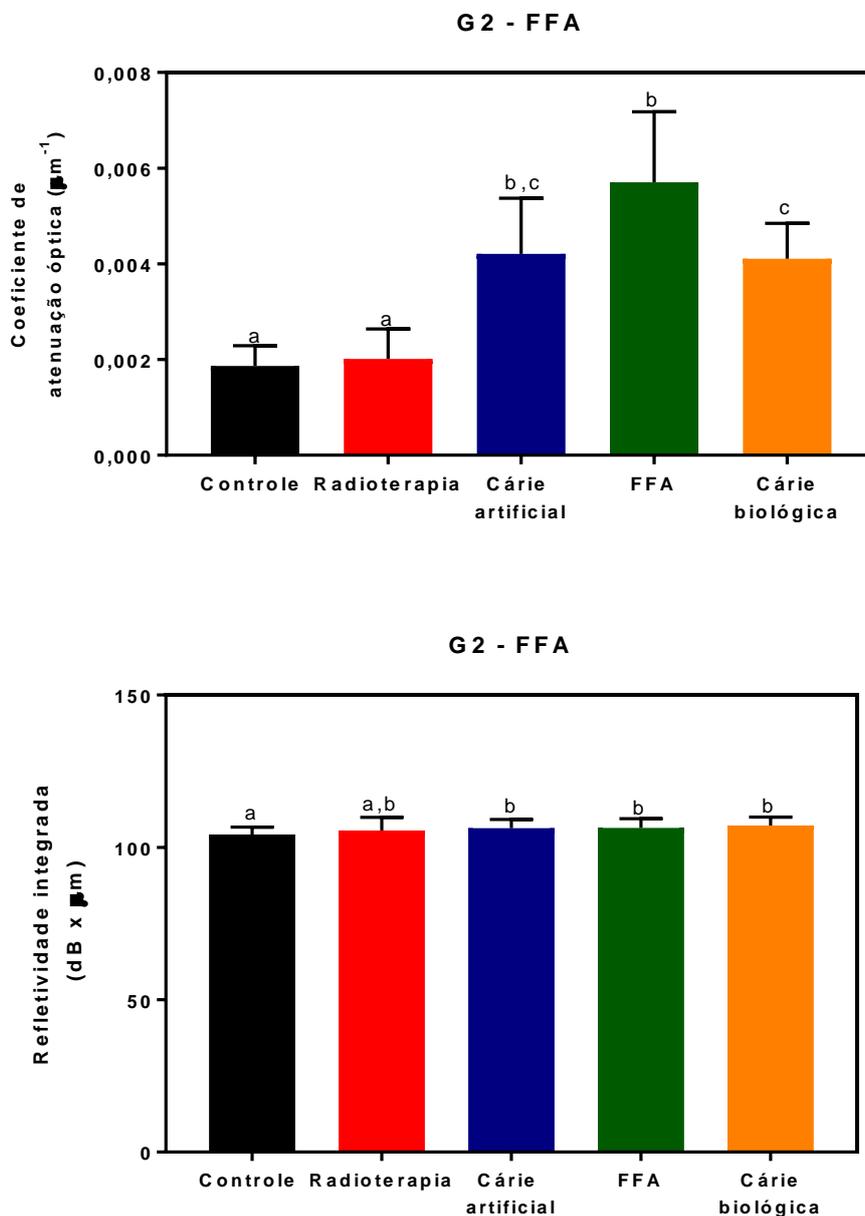
assim como a análise da profundidade das lesões efetuada por microscopia de luz polarizada.

Por sua vez, a Figura 98 apresenta os valores de $\bar{\mu}_t$ e ΔR , cujos valores de p resultantes da comparação estatística intergrupos são descritos na Tabela 25, para as amostras do grupo G2, que foram tratadas com flúor fosfato acidulado (FFA). Nota-se que houve uma diminuição no $\bar{\mu}_t$ após a cárie biológica em comparação ao grupo FFA. Contudo, não se observam alterações nos valores de ΔR .

É provável que a redução em $\bar{\mu}_t$ esteja relacionada ao mecanismo de ação do FFA. Sabe-se que os glóbulos de CaF_2 , formados pelo FFA, liberam íons cálcio e fosfato em meios ácidos, tal como o meio em que o desafio cariogênico com *S. mutans* foi realizado, e, assim, possibilitam a formação de fluorapatita e hidroxapatita fluoretada, que são mais resistentes à dissolução em ácidos¹⁴⁰. Este é o principal mecanismo de ação do fluoreto, ou seja, favorecer a formação de estruturas que remineralizem os tecidos duros dentais. Desta forma, os achados de $\bar{\mu}_t$ estão de acordo com a literatura que sugere que o aumento nestes valores são indicativos da remineralização da dentina. Como consequência, essas novas estruturas cristalinas podem interferir no caminho óptico percorrido pelo *laser* da OCT.

Além disso, a inexistência de diferenças entre os grupos cárie artificial e biológica (em relação a $\bar{\mu}_t$) pode indicar que o tratamento com FFA, aplicado antes do desafio cariogênico, impediu a progressão da desmineralização por *S. mutans*.

Figura 98: Valores médios, com os respectivos desvios-padrão, dos coeficientes de atenuação óptica total ($\bar{\mu}_t$) e de refletividade integrada (ΔR) das amostras de dentina radicular do grupo G2 em cinco condições: hígidas (controle), radioterapia, cárie artificial, tratamento com FFA e cárie biológica. Letras distintas acima de cada barra denotam diferenças estatisticamente significantes ($\alpha=0,05$) de acordo com o teste de ANOVA de uma via com pós-teste de Holm-Sidak (para $\bar{\mu}_t$) e de Tukey (para ΔR) para amostras dependentes.



Fonte: Do próprio autor.

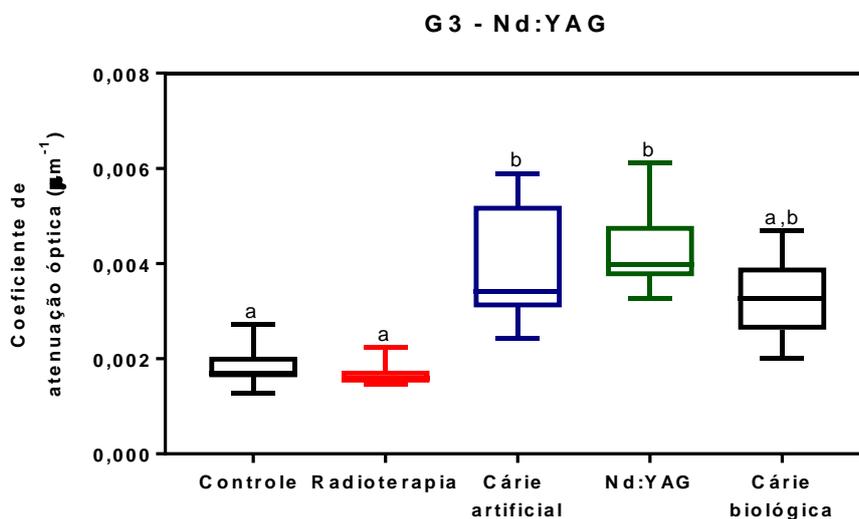
Tabela 25: Valores de p resultantes da comparação intergrupos (controle, radioterapia, cárie artificial, tratamento com FFA e cárie biológica) das médias dos coeficientes de atenuação óptica total ($\bar{\mu}_t$) e de refletividade integrada (ΔR) de G2 por meio do teste de ANOVA de uma via com pós-teste de Holm-Sidak (para $\bar{\mu}_t$) ou de Tukey (para ΔR) para amostras dependentes. Valores de p inferiores a 0,05 são estatisticamente significantes.

	Valores de p	
	$\bar{\mu}_t$	ΔR
Controle vs. Radioterapia	0,3941	0,6036
Controle vs. Cárie artificial	0,0102	0,0159
Controle vs. FFA	0,0004	0,0053
Controle vs. Cárie biológica	<0,0001	0,0192
Radioterapia vs. Cárie artificial	0,0141	0,8133
Radioterapia vs. FFA	0,0009	0,7996
Radioterapia vs. Cárie biológica	0,0002	0,6883
Cárie artificial vs. FFA	0,1198	0,999
Cárie artificial vs. Cárie biológica	0,84	0,8776
FFA vs. Cárie biológica	0,023	0,9295

Fonte: Do próprio autor.

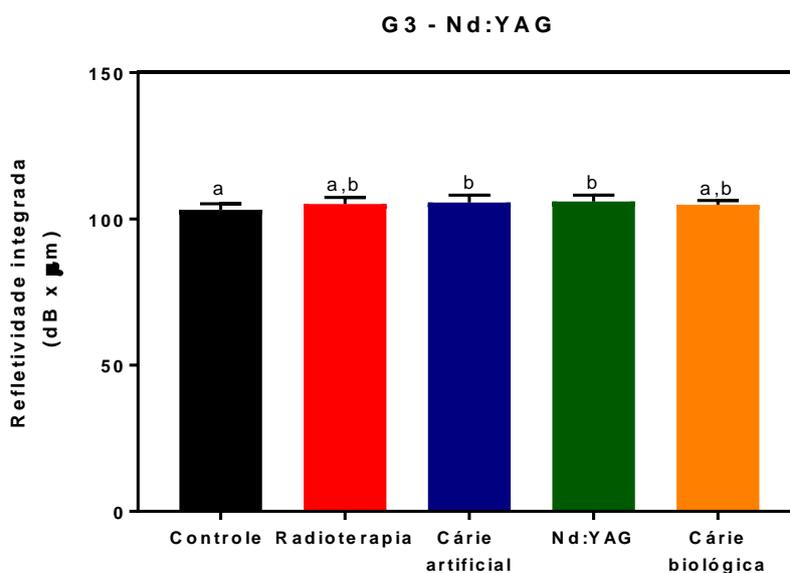
A Figura 99 e a Figura 100 exibem, respectivamente, os valores de $\bar{\mu}_t$ e de ΔR , para o grupo G3 cujo tratamento foi a irradiação com *laser* de Nd:YAG. Por sua vez, a Tabela 26 apresenta os valores de p resultantes da comparação estatística intergrupos. É perceptível que houve uma tendência de diminuição no valor de $\bar{\mu}_t$ após a progressão da cárie, porém sem diferenças estatísticas. Tal resultado pode ser indício de que o tratamento com irradiação *laser* tenha dificultado a desmineralização por *S. mutans* por mecanismos já explicados anteriormente e reforça a hipótese de que o desafio cariogênico empregado foi muito curto para evidenciar a ação de remineralização por irradiação *laser*, cuja ação ocorre em longo prazo⁶¹.

Figura 99: Distribuição dos valores médios, com os respectivos desvios-padrão e medianas, dos coeficientes de atenuação óptica total (μ_t) das amostras de dentina radicular do grupo G3 em cinco condições: hígidas (controle), radioterapia, cárie artificial, tratamento com irradiação *laser* e cárie biológica. Letras distintas acima de cada barra denotam diferenças estatisticamente significantes ($\alpha=0,05$) de acordo com o teste de Friedman com pós-teste de Dunn para amostras dependentes.



Fonte: Do próprio autor.

Figura 100: Valores médios, com os respectivos desvios-padrão, de refletividade integrada (ΔR) das amostras de dentina radicular do grupo G3 em cinco condições: hígidas (controle), radioterapia, cárie artificial, tratamento com irradiação *laser* e cárie biológica. Letras distintas acima de cada barra denotam diferenças estatisticamente significantes ($\alpha=0,05$) de acordo com o teste de ANOVA de uma via com pós-teste de Holm-Sidak para amostras dependentes.



Fonte: Do próprio autor.

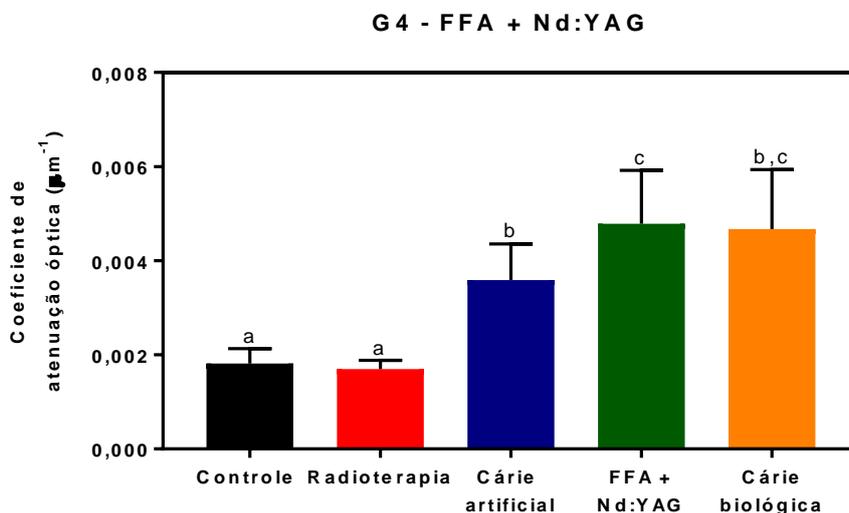
Tabela 26: Valores de p resultantes da comparação intergrupos (controle, radioterapia, cárie artificial, tratamento com irradiação *laser* e cárie biológica) das médias dos coeficientes de atenuação óptica total ($\bar{\mu}_t$) e de refletividade integrada (ΔR) de G3 por meio do teste de Friedman com pós-teste de Dunn (para $\bar{\mu}_t$) ou de ANOVA de uma via com pós-teste de Holm-Sidak para amostras dependentes. Valores de p inferiores a 0,05 são estatisticamente significantes.

	Valores de p	
	$\bar{\mu}_t$	ΔR
Controle vs. Radioterapia	>0,9999	0,2077
Controle vs. Cárie artificial	0,0041	0,0387
Controle vs. Nd:YAG	0,0002	0,0486
Controle vs. Cárie biológica	0,1621	0,1639
Radioterapia vs. Cárie artificial	0,0013	0,8768
Radioterapia vs. Nd:YAG	<0,0001	0,479
Radioterapia vs. Cárie biológica	0,0721	0,8768
Cárie artificial vs. Nd:YAG	>0,9999	0,8768
Cárie artificial vs. Cárie biológica	>0,9999	0,6933
Nd:YAG vs. Cárie biológica	0,6599	0,2579

Fonte: do próprio autor.

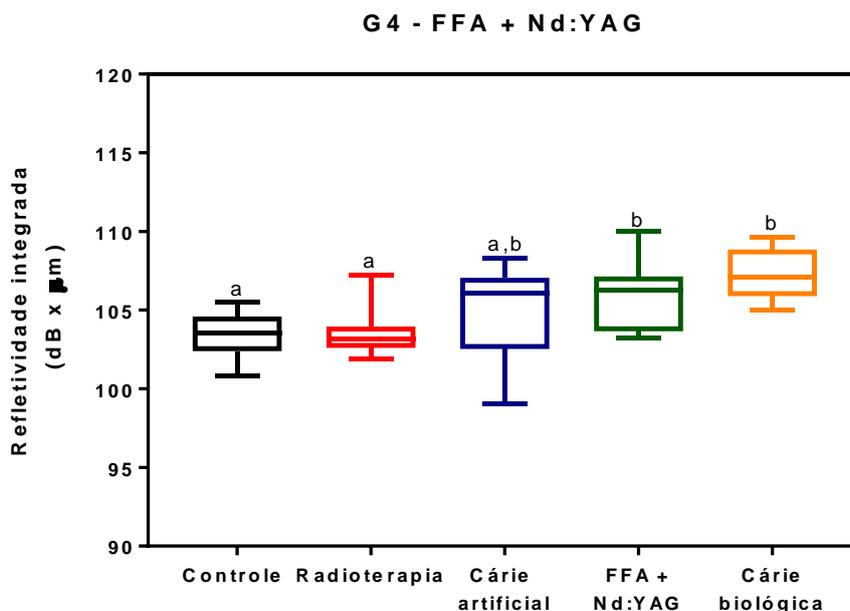
As Figura 101 e Figura 102 apresentam os valores de $\bar{\mu}_t$ e de ΔR para as amostra do grupo G4, tratadas com FFA com posterior irradiação *laser*. A Tabela 27, por sua vez, discrimina os valores de p resultantes da comparação estatística. Assim como ocorreu em G3, não há diferenças entre os grupos cárie artificial, FFA+Nd:YAG e cárie biológica em ambas as propriedades, mas há uma tendência de diminuição de $\bar{\mu}_t$, o que sugere remineralização. Esses resultados podem indicar que a associação entre FFA e irradiação *laser* é capaz de conferir maior resistência à dentina em relação à ação do *S.mutans* e concorda com a literatura⁵⁷.

Figura 101: Valores médios, com os respectivos desvios-padrão, dos coeficientes de atenuação óptica total ($\bar{\mu}_t$) das amostras de dentina radicular do grupo G4 em cinco condições: hígidas (controle), radioterapia, cárie artificial, tratamento com FFA+Nd:YAG e cárie biológica. Letras distintas acima de cada barra denotam diferenças estatisticamente significantes ($\alpha=0,05$) de acordo com o teste de ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey para amostras dependentes.



Fonte: Do próprio autor.

Figura 102: Distribuição dos valores médios, com os respectivos desvios-padrão e medianas, de refletividade integrada das amostras de dentina radicular do grupo G4 em cinco condições: hígidas (controle), radioterapia, cárie artificial, tratamento com FFA+Nd:YAG e cárie biológica. Letras distintas acima de cada barra denotam diferenças estatisticamente significantes ($\alpha=0,05$) de acordo com o teste de Friedman com pós-teste de Dunn para amostras dependentes.



Fonte: Do próprio autor.

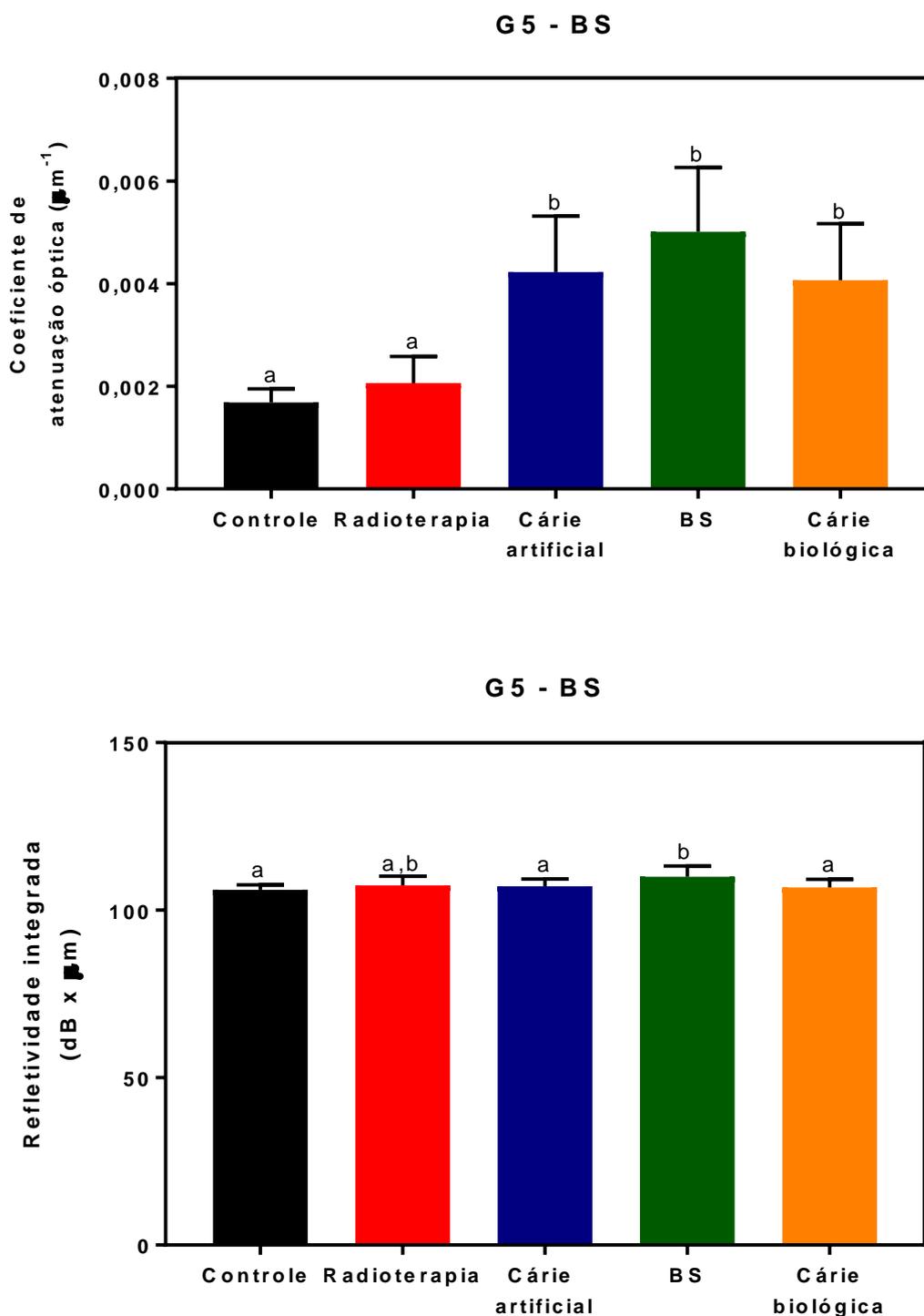
Tabela 27: Valores de p resultantes da comparação intergrupos (controle, radioterapia, cárie artificial, tratamento com FFA+Nd:YAG e cárie biológica) das médias dos coeficientes de atenuação óptica total ($\bar{\mu}_t$) e de refletividade integrada (ΔR) de G4 por meio do teste de ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey (para $\bar{\mu}_t$) ou de Friedman com pós-teste de Dunn (para ΔR) para amostras dependentes. Valores de p inferiores a 0,05 são estatisticamente significantes.

	Valores de p	
	$\bar{\mu}_t$	ΔR
Controle vs. Radioterapia	0,7754	>0,9999
Controle vs. Cárie artificial	0,0013	>0,9999
Controle vs. FFA+Nd:YAG	0,0002	0,0075
Controle vs. Cárie biológica	0,0002	0,0046
Radioterapia vs. Cárie artificial	0,0001	>0,9999
Radioterapia vs. FFA+Nd:YAG	<0,0001	0,0121
Radioterapia vs. Cárie biológica	0,0004	0,0075
Cárie artificial vs. FFA+Nd:YAG	0,049	0,2189
Cárie artificial vs. Cárie biológica	0,2411	0,1522
FFA+Nd:YAG vs. Cárie biológica	0,9991	>0,9999

Fonte: Do próprio autor.

Por sua vez, a Figura 103 mostra os valores de $\bar{\mu}_t$ e de ΔR para o grupo G5 que foi tratado apenas com Biosilicato[®] (BS). A Tabela 28 exibe os valores de resultantes da comparação estatística. Assim como ocorreu com os grupos G3 e G4, observa-se que os valores de $\bar{\mu}_t$ não apresentam diferenças estatísticas entre os grupos cárie artificial, BS e cárie biológica; no entanto, há uma tendência de redução nos valores de $\bar{\mu}_t$, o que sugere remineralização. Novamente, parece que o tratamento aplicado conferiu maior resistência à desmineralização produzida por *S. mutans*.

Figura 103: Valores médios, com os respectivos desvios-padrão, dos coeficientes de atenuação óptica total ($\bar{\mu}_t$) e de refletividade integrada (ΔR) das amostras de dentina radicular do grupo G5 em cinco condições: hígidas (controle), radioterapia, cárie artificial, tratamento com BS e cárie biológica. Letras distintas acima de cada barra denotam diferenças estatisticamente significantes ($\alpha=0,05$) de acordo com o teste de ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey para amostras independentes.



Fonte: Do próprio autor.

Tabela 28: Valores de p resultantes da comparação intergrupos (controle, radioterapia, cárie artificial, tratamento com BS e cárie biológica) das médias dos coeficientes de atenuação óptica total ($\bar{\mu}_t$) e de refletividade integrada (ΔR) de G5 por meio do teste de ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey para amostras independentes. Valores de p inferiores a 0,05 são estatisticamente significantes.

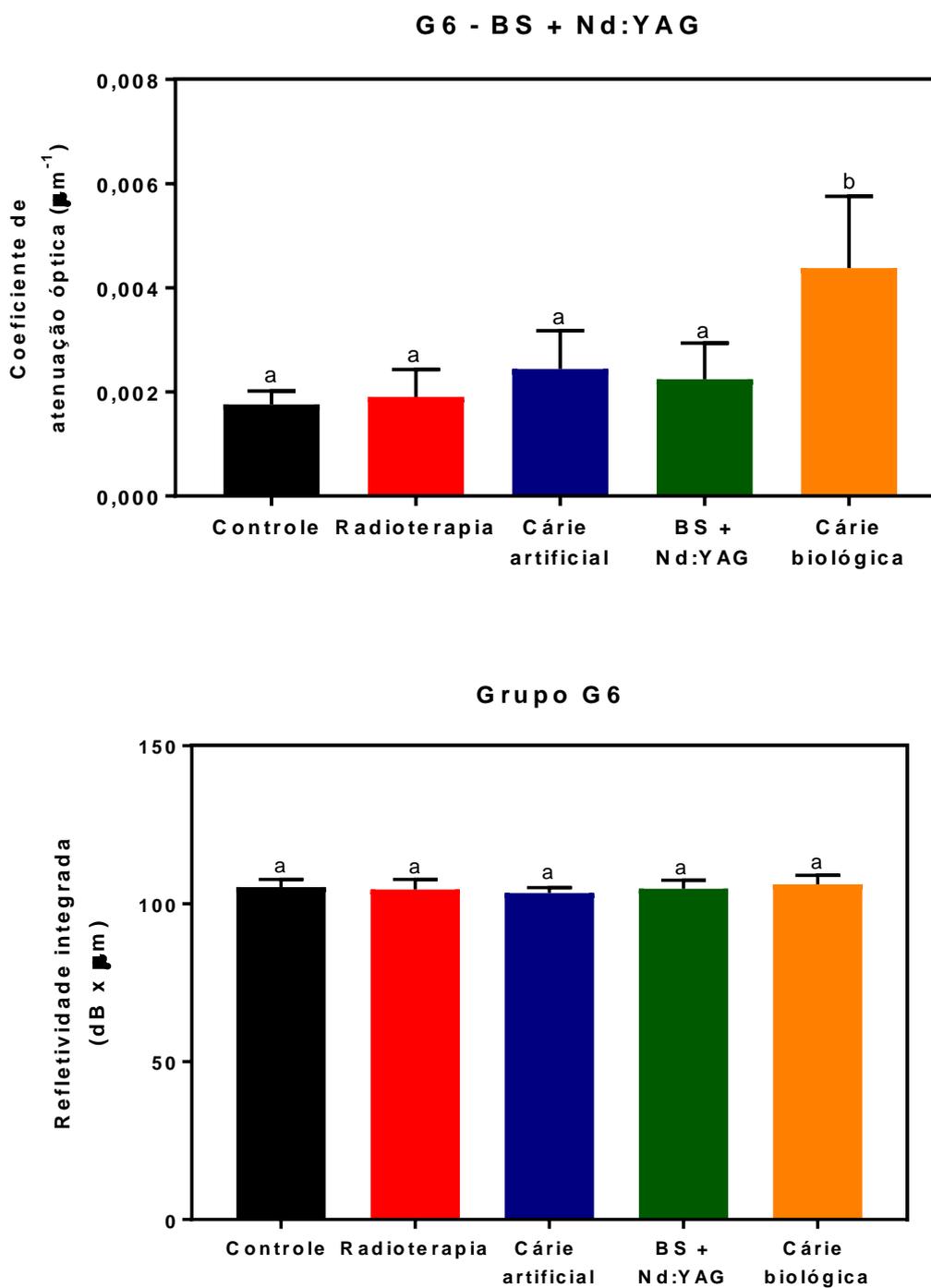
	Valores de p	
	$\bar{\mu}_t$	ΔR
Controle vs. Radioterapia	0,8325	0,6391
Controle vs. Cárie artificial	<0,0001	0,8182
Controle vs. BS	<0,0001	0,0008
Controle vs. Cárie biológica	<0,0001	0,9473
Radioterapia vs. Cárie artificial	<0,0001	0,998
Radioterapia vs. BS	<0,0001	0,0523
Radioterapia vs. Cárie biológica	<0,0001	0,9707
Cárie artificial vs. BS	0,1593	0,0233
Cárie artificial vs. Cárie biológica	0,992	0,9977
BS vs. Cárie biológica	0,0725	0,0111

Fonte: Do próprio autor.

A Figura 104 apresenta os valores de $\bar{\mu}_t$ e de ΔR para o grupo G6 cujo tratamento foi a aplicação de BS com posterior irradiação *laser*. A Tabela 29, por sua vez, descreve os valores de p resultantes da comparação intergrupos. Diferentemente do que foi observado para os demais grupos, os valores de $\bar{\mu}_t$ aumentaram após a cárie biológica em comparação aos demais grupos. Em contrapartida, os valores de ΔR não apresentaram diferenças entre nenhum dos grupos comparados.

O aumento no valor de $\bar{\mu}_t$ após a cárie biológica pode ser sugerir que: (i) o tratamento de BS com posterior irradiação *laser* não foi capaz de conferir à dentina maior resistência à desmineralização na presença de *S. mutans* ou (ii) a camada superficial formada impediu que o *laser* da OCT penetrasse nas amostras e, por isso, a atenuação do sinal foi aumentada. Mais uma vez, isso reforça a necessidade da realização de análises complementares (TMR ou microdureza seccional) para avaliar a formação das lesões de cárie em profundidade de forma independente à camada superficial decorrente dos tratamentos.

Figura 104: Valores médios, com os respectivos desvios-padrão, dos coeficientes de atenuação óptica total ($\bar{\mu}_t$) e de refletividade integrada (ΔR) das amostras de dentina radicular do grupo G6 em cinco condições: hígidas (controle), radioterapia, cárie artificial, tratamento com BS+Nd:YAG e cárie biológica. Letras distintas acima de cada barra denotam diferenças estatisticamente significantes ($\alpha=0,05$) de acordo com o teste de ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey para amostras independentes.



Fonte: Do próprio autor.

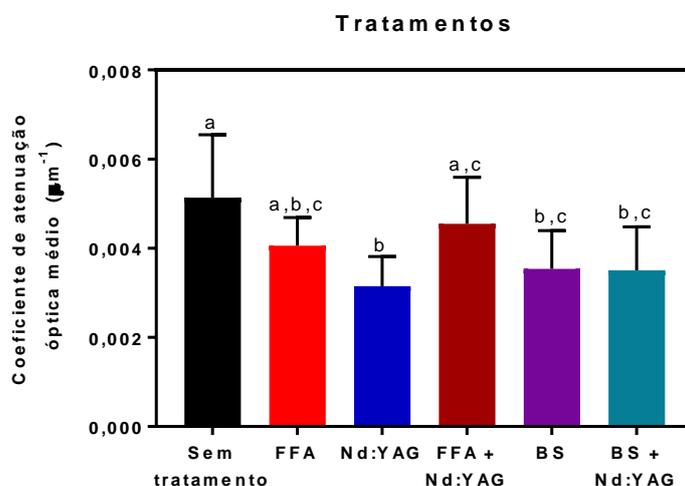
Tabela 29: Valores de p resultantes da comparação intergrupos (controle, radioterapia, cárie artificial, tratamento com BS+Nd:YAG e cárie biológica) das médias dos coeficientes de atenuação óptica total ($\bar{\mu}_t$) e de refletividade integrada (ΔR) de G6 por meio do teste de ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey para amostras independentes. Valores de p inferiores a 0,05 são estatisticamente significantes.

	Valores de p	
	$\bar{\mu}_t$	ΔR
Controle vs. Radioterapia	0,9867	0,9334
Controle vs. Cárie artificial	0,1449	0,3775
Controle vs. BS+Nd:YAG	0,4847	0,9841
Controle vs. Cárie biológica	<0,0001	0,9107
Radioterapia vs. Cárie artificial	0,3944	0,8438
Radioterapia vs. BS+Nd:YAG	0,8058	0,999
Radioterapia vs. Cárie biológica	<0,0001	0,4748
Cárie artificial vs. BS+Nd:YAG	0,967	0,7033
Cárie artificial vs. Cárie biológica	<0,0001	0,0708
BS+Nd:YAG vs. Cárie biológica	<0,0001	0,6383

Fonte: Do próprio autor.

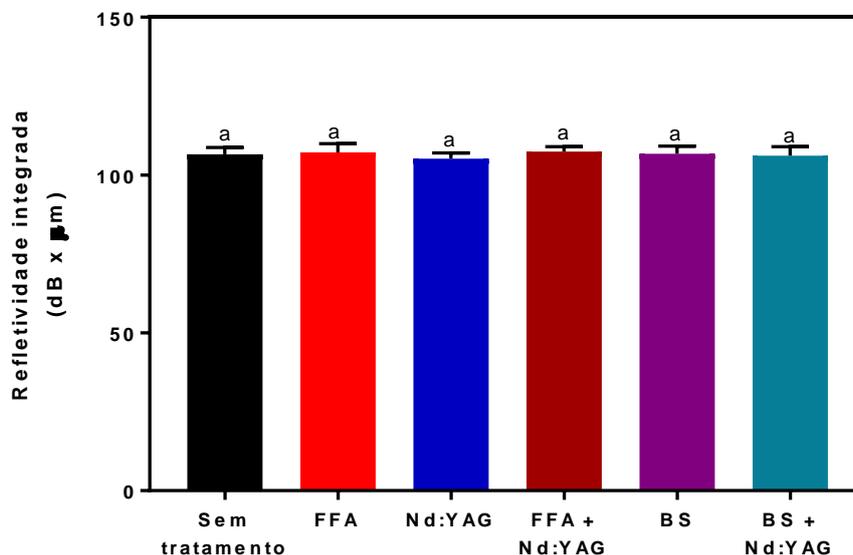
A Figura 105 apresenta a comparação estatística entre os valores de $\bar{\mu}_t$ e de ΔR dos 6 grupos experimentais propostos neste estudo após a cárie biológica. A Tabela 30, por sua vez, discrimina os valores de p resultantes da comparação estatística.

Figura 105: Valores médios, com os respectivos desvios-padrão, dos coeficientes de atenuação óptica total ($\bar{\mu}_t$) e de refletividade integrada (ΔR) dos 6 experimentais propostos neste estudo. Letras distintas acima de cada barra denotam diferenças estatisticamente significantes ($\alpha=0,05$) de acordo com o teste de ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey para amostras independentes.



Fonte: Do próprio autor.

Figura 105 (cont.): Valores médios, com os respectivos desvios-padrão, dos coeficientes de atenuação óptica total ($\bar{\mu}_t$) e de refletividade integrada (ΔR) dos 6 experimentais propostos neste estudo. Letras distintas acima de cada barra denotam diferenças estatisticamente significantes ($\alpha=0,05$) de acordo com o teste de ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey para amostras independentes.



Fonte: Do próprio autor.

Tabela 30: Valores de p resultantes da comparação intergrupos (sem tratamento, FFA, Nd:YAG, FFA+Nd:YAG, BS e BS+Nd:YAG), após a cárie biológica, das médias dos coeficientes de atenuação óptica total ($\bar{\mu}_t$) e de refletividade integrada (ΔR) por meio do teste de ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey para amostras independentes. Valores de p inferiores a 0,05 são estatisticamente significantes.

	Valores de p	
	$\bar{\mu}_t$	ΔR
Sem tratamento vs. FFA	0,141	0,9816
Sem tratamento vs. Nd:YAG	0,0002	0,6432
Sem tratamento vs. FFA+Nd:YAG	0,7455	0,947
Sem tratamento vs. BS	0,0082	>0,9999
Sem tratamento vs. BS+Nd:YAG	0,0065	0,9972
FFA vs. Nd:YAG	0,2723	0,2106
FFA vs. FFA+Nd:YAG	0,8636	>0,9999
FFA vs. BS	0,8433	0,9964
FFA vs. BS+Nd:YAG	0,8061	0,8417
Nd:YAG vs. FFA+Nd:YAG	0,0189	0,1623
Nd:YAG vs. BS	0,9463	0,4757
Nd:YAG vs. BS+Nd:YAG	0,9632	0,8858
FFA+Nd:YAG vs. BS	0,2167	0,9818
FFA+Nd:YAG vs. BS+Nd:YAG	0,1875	0,7482
BS vs. BS+Nd:YAG	>0,9999	0,9817

Fonte: Do próprio autor.

A partir dos dados apresentados na Figura 105 e na Tabela 30 é possível constatar que os diferentes tratamentos, após o desafio cariogênico com *S. mutans*, não acarretaram alterações significativas, na comparação entre os diferentes grupos experimentais, no que diz respeito à refletividade integrada (ΔR), ou seja, esta não é a melhor forma de avaliar a remineralização da dentina por OCT. Em contrapartida, praticamente todos os tratamentos propostos, com exceção dos tratamentos de FFA e FFA+Nd:YAG, diminuíram o valor do coeficiente de atenuação óptica total ($\bar{\mu}_t$). Tal resultado indica que os tratamentos supracitados foram os que menos sofreram desmineralização por ação da cárie biológica e, ainda, que a associação de tratamentos não conferiu maior efeito de remineralização no desafio cariogênico proposto. É necessária uma maior investigação destas amostras por testes adicionais, conforme mencionado anteriormente. Ainda assim, ao se considerar que a literatura mostra que ambos os tratamentos propostos (BS e Nd:YAG) têm ação em longo prazo, sugere-se que um desafio de maior duração seja feito em estudos futuros.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Resumidamente, os principais resultados deste estudo foram:

Fase I:

- As imagens de MEV indicaram que a água deionizada foi o veículo mais adequado, dentre os avaliados, para a aplicação de Biosilicato[®] sobre as amostras de dentina radicular, haja vista a obliteração dos túbulos dentinários.

Fase II:

- Os resultados da análise semiquantitativa dos espectros de ATR-FTIR evidenciaram que, após o tratamento radioterápico *in vitro*, houve uma diminuição nas bandas atribuídas ao carbonato (modos de vibração ν_2 , ν_3 e ν_4) em relação ao fosfato, o que sugere a ocorrência de desmineralização que, possivelmente, foi consequência dos efeitos da radiólise promovida pela radioterapia.
- Analogamente, os resultados da análise semiquantitativa dos espectros de FT-Raman demonstraram que as intensidades das bandas de amida I, amida III, carbonato ν_1 e fosfato (modos de vibração ν_1 , ν_2 e ν_4) aumentaram após a radioterapia. Além disso, houve um aumento no índice de cristalinidade. Novamente, tais alterações podem ser decorrentes dos efeitos da radiólise promovida pela radioterapia.
- Alterações no padrão de imagem de *B-scan*, bem como o aumento nos valores do coeficiente de atenuação óptica total ($\bar{\mu}_t$) e de refletividade integrada (ΔR) após a radioterapia são compatíveis com o processo de desmineralização das amostras de dentina radicular. Além disso, a técnica de tomografia por coerência óptica (OCT) pode ser útil no diagnóstico precoce de lesões incipientes de cárie em detrimento dos métodos de radiologia convencionais.
- A microdureza superficial Knoop sofreu redução de $32,99 \pm 8,859$ Kgf/mm² para $20,56 \pm 4,673$ Kgf/mm² após a radioterapia e pode ser indício de desmineralização, rearranjo do colágeno e das estruturas cristalinas da hidroxiapatita.
- Após o tratamento radioterápico, verificou-se que as amostras de dentina apresentavam morfologia com túbulos obliterados por uma camada de *smear* de

modo que a dentina peritubular e intertubular eram indistinguíveis. Tais aspectos morfológicos são compatíveis com os efeitos da radioterapia sobre a dentina.

Fase III

- Os resultados da análise semiquantitativa dos espectros de ATR-FTIR após a desmineralização (cárie artificial) demonstraram que houve um aumento na intensidade das bandas de amida I, II e III, bem como de carbonato ν_2 e ν_3 e uma diminuição de carbonato ν_2 em relação ao fosfato. Tais alterações são compatíveis com o processo de desmineralização e podem indicar que o protocolo de cárie artificial utilizado neste estudo foi eficiente em simular lesões incipientes de cárie em dentina radicular.
- Embora a análise semiquantitativa do FT-Raman tenha evidenciado que as bandas de fosfato ν_4 e de carbonato ν_1 tenham sofrido redução após a indução de cárie artificial, a técnica não foi eficiente em detectar outras alterações decorrentes da desmineralização devido a efeito de *bulk*.
- As imagens de *B-scan* e o aumento no coeficiente de atenuação óptica total após a indução de cárie artificial são compatíveis com o processo de desmineralização com formação de lesões incipientes sem cavitação superficial e corroboram os resultados de ATR-FTIR.
- Todos os tratamentos empregados neste estudo resultaram em amostras com morfologia superficial heterogênea e não uniforme com túbulos parcialmente obliterados, conforme demonstrado pelas imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV). Ressalta-se que os grupos tratados com flúor fosfato acidulado (G2 e G4) apresentavam formações globulares típicas de fluoreto de cálcio (CaF_2), ao passo que os grupos tratados com irradiação *laser* (G3, G4 e G6) exibiram glóbulos e áreas com derretimento superficial em decorrência dos efeitos térmicos do *laser*. Por sua vez, o grupo tratado exclusivamente com Biosilicato[®] (G5) apresentou partículas remanescentes não dissolvidas deste biomaterial, apesar da imersão durante 24 horas em saliva artificial. Em contrapartida, a associação da irradiação *laser* de Nd:YAG ao Biosilicato[®] (G6) promoveu a formação de uma camada homogênea com uma redução significativa na quantidade de partículas não dissolvidas deste biomaterial sobre a superfície de dentina radicular.

- O tratamento com flúor fosfato acidulado resultou na diminuição da intensidade da banda de fosfato ν_3 que pode ter sido consequência da intensificação da desmineralização pelo ácido fosfórico presente na composição do FFA ou, ainda, por resquícios da formulação de FFA, mesmo após enxágue, que permaneceram sobre a superfície das dentinas tratadas.
- O tratamento com Biosilicato[®] (G5) resultou em uma variabilidade nos espectros pós-tratamento que impossibilitaram a realização de uma análise semiquantitativa. No entanto, qualitativamente foi possível inferir que o biomaterial recobriu superficialmente a dentina de modo a diminuir a exposição de colágeno e aumentar a quantidade de minerais.
- O grupo G6, que foi tratado com Biosilicato[®] com posterior irradiação *laser*, foi o único que apresentou uma redução no valor do coeficiente de atenuação óptica total após o tratamento ($\bar{\mu}_t$) e é compatível como processo de remineralização. Os demais grupos experimentais, sem exceção, apresentaram um aumento nesta propriedade, o que pode ser indício de que houve uma intensificação no processo de desmineralização ou, mais provável, que as características morfológicas heterogêneas e não uniformes resultantes dos tratamentos favoreceram o espalhamento do sinal do tomógrafo, o que contribuiu para o aumento do valor de $\bar{\mu}_t$.
- A análise morfológica por imagens de MEV após o desafio cariogênico com *S. mutans* demonstrou que todos os tratamentos propostos reduziram a quantidade de biofilme formado na superfície da dentina em comparação ao grupo controle negativo (G1).
- O desafio cariogênico com *S. mutans* por 48 horas pode ter sido curto para avaliar os efeitos dos tratamentos sobre a paralisação da progressão de lesão incipiente de cárie conforme resultados de ATR-FTIR e de OCT. No entanto, os dados sugerem que todos os tratamentos parecem ter oferecido alguma resistência à ação do *S. mutans*, embora não seja possível identificar qual deles foi o mais eficiente.
- Análises complementares (microrradiografia transversal ou microdureza seccional) são necessárias para avaliar a formação das lesões de cárie em profundidade de forma independente à camada superficial decorrente dos tratamentos e, assim, fornecer informações que permitam chegar a conclusões a respeito da efetividade de cada um dos tratamentos propostos neste estudo na

paralisação da progressão da lesão incipiente de cárie de radiação em dentina radicular.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 INCA. Estimativa 2018 - Incidência de Câncer no Brasil. 2018.
- 2 RAY-CHAUDHURI, A.; SHAH, K.; PORTER, R. J. Radiotherapy: Oral management of patients who have received radiotherapy to the head and neck region. **Vital**, v. 10, n. 2, p. 30-36, 2013.
- 3 JHAM, B. C. et al. Oral health status of 207 head and neck cancer patients before, during and after radiotherapy. **Clinical Oral Investigations**, v. 12, n. 1, p. 19-24, 2008.
- 4 ROLIM, A. E. H.; COSTA, L. J. D.; RAMALHO, L. M. P. Repercussões da radioterapia na região orofacial e seu tratamento. **Radiologia Brasileira**, v. 44, p. 388-395, 2011.
- 5 KIELBASSA, A. M. et al. Radiation-related damage to dentition. **The Lancet Oncology**, v. 7, n. 4, p. 326-335, 2006.
- 6 SILVA, A. R. S. et al. Patterns of Demineralization and Dentin Reactions in Radiation-Related Caries. **Caries Research**, v. 43, n. 1, p. 43-49, 2009.
- 7 AGUIAR, G. P. et al. A review of the biological and clinical aspects of radiation caries. **The Journal of Contemporary Dental Practice**, v. 10, n. 4, p. 1-11, 2009.
- 8 SROUSSI, H. Y. et al. Common oral complications of head and neck cancer radiation therapy: mucositis, infections, saliva change, fibrosis, sensory dysfunctions, dental caries, periodontal disease, and osteoradionecrosis. **Cancer Medicine**, v. 6, n. 12, p. 2918-2931, 2017.
- 9 CAMPOS VELO, M. M. D. A. et al. Gamma radiation increases the risk of radiation-related root dental caries. **Oral Oncology**, v. 71, p. 184-185, 2017.
- 10 GALVÃO-MOREIRA, L. V.; DA CRUZ, M. C. F. N. Dental demineralization, radiation caries and oral microbiota in patients with head and neck cancer. **Oral Oncology**, v. 51, n. 12, p. e89-e90, 2015.
- 11 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.
- 12 TENUTA, L. M. A. et al. Fluoride Release from CaF₂ and Enamel Demineralization. **Journal of Dental Research**, v. 87, n. 11, p. 1032-1036, 2008.
- 13 MATOS, A. B. et al. Laser Technology for Caries Removal. **Contemporary Approach to Dental Caries**, p. 309-330, 2012.

- 14 ANA, P. A.; BACHMANN, L.; ZECELL, D. M. Lasers effects on enamel for caries prevention. **Laser Physics**, v. 16, n. 5, p. 865, 2006.
- 15 ZECELL, D. M. et al. **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. PWB p.
- 16 RECHMANN, P. et al. Caries inhibition in vital teeth using 9.6- μ m CO laser irradiation. **Journal of biomedical optics**, v. 16, n. 7, p. 1-7, 7, 2011.
- 17 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.
- 18 BAINO, F. Bioactive glasses – When glass science and technology meet regenerative medicine. **Ceramics International**, v. 44, n. 13, p. 14953-14966, 2018.
- 19 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.
- 20 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.
- 21 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.
- 22 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.
- 23 _____. A novel bioactive glass-ceramic for treating dentin hypersensitivity. **Brazilian Oral Research**, v. 24, p. 381-387, 2010.
- 24 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.
- 25 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.
- 26 _____. 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.

- 27 NANJI, A. **Ten Cate's Oral Histology**. Elsevier, 2013. 1-13 p.
- 28 BACHMANN, L.; ZECELL, D. M. **Estrutura e composição do Esmalte e da Dentina**. Editora Livraria da Física, 2005. 1; 4-6; 50-51 p.
- 29 PITTS, N. B. et al. Dental caries. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, p. 17030, 2017.
- 30 PURK, J. H. 8 - Morphologic and structural analysis of material-tissue interfaces relevant to dental reconstruction. In: SPENCER, P. e MISRA, A. (Ed.). **Material-Tissue Interfacial Phenomena**: Woodhead Publishing, 2017. p.205-229.
- 31 CAMPI, L. B. et al. Effect of radiotherapy on the chemical composition of root dentin. **Head & Neck**, v. 41, n. 1, p. 162-169, 2019.
- 32 SELWITZ, R. H.; ISMAIL, A. I.; PITTS, N. B. Dental caries. **The Lancet**, v. 369, n. 9555, p. 51-59, 2007.
- 33 FEATHERSTONE, J. Dental caries: a dynamic disease process. **Australian Dental Journal**, v. 53, n. 3, p. 286-291, 2008.
- 34 GIACAMAN, R. Sugars and beyond. The role of sugars and the other nutrients and their potential impact on caries. **Oral Diseases**, v. 24, n. 7, p. 1185-1197, 2018.
- 35 DENG, J. et al. Dental demineralization and caries in patients with head and neck cancer. **Oral Oncology**, v. 51, n. 9, p. 824-831, 2015.
- 36 YIP, K.; SMALES, R. Oral diagnosis and treatment planning: part 5. Preventive and treatment planning for dental caries. **British Dental Journal**, v. 213, p. 211, 2012.
- 37 COSTA, S. M. et al. A systematic review of socioeconomic indicators and dental caries in adults. **International journal of environmental research and public health**, v. 9, n. 10, p. 3540-3574, 2012.
- 38 PERES, M. A. et al. The Influence of Family Income Trajectories From Birth to Adulthood on Adult Oral Health: Findings From the 1982 Pelotas Birth Cohort. **American Journal of Public Health**, v. 101, n. 4, p. 730-736, 2011.
- 39 _____. Oral diseases: a global public health challenge. **The Lancet**, v. 394, n. 10194, p. 249-260, 2019.
- 40 MATSUZAKI, H. et al. The role of dentistry other than oral care in patients undergoing radiotherapy for head and neck cancer. **The Japanese dental science review**, v. 53, n. 2, p. 46-52, 2017.

- 41 LEXOMBOON, D. et al. Consumption and direct costs of dental care for patients with head and neck cancer: A 16-year cohort study. **PLoS One**, v. 12, n. 8, p. e0182877, 2017.
- 42 FREITAS, D. A. et al. Sequelas bucais da radioterapia de cabeça e pescoço. **Revista CEFAC**, v. 13, p. 1103-1108, 2011.
- 43 Locally advanced squamous carcinoma of the head and neck. **2014 Review of Cancer Medicines on the WHO List of Essential Medicines**, p. 1-8, 2014.
- 44 FRYDRYCH, A.; SLACK-SMITH, L.; PARSONS, R. Compliance of post-radiation therapy head and neck cancer patients with caries preventive protocols. **Australian Dental Journal**, v. 62, n. 2, p. 192-199, 2017.
- 45 GRIMALDI, N. et al. Condução do cirurgião-dentista na prevenção e no tratamento da osteorradionecrose: revisão de literatura. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 51, n. 4, p. 319-324, 2005.
- 46 MISHRA, S. Orthodontic Therapy for Paediatric Cancer Survivors: A Review. **Journal of clinical and diagnostic research:JCDR**, v. 11, n. 3, p. ZE01-ZE04, 2017.
- 47 ESCODA-FRANCOLI, J. et al. Dental implications in oral cancer patients. **Oral Medicine and Pathology**, v. 16, n. 4, p. 508-513, 2011.
- 48 MICHELET, M. Caries and periodontal disease in cancer survivors. **Evidence Based Dentistry**, v. 13, p. 70, 2012.
- 49 PARKER, S. Introduction, history of lasers and laser light production. **British Dental Journal**, v. 202, p. 21, 2007.
- 50 NAZEMISALMAN, B.; FARSADEGHI, M.; SOKHANSANJ, M. Types of Lasers and Their Applications in Pediatric Dentistry. **Journal of lasers in medical sciences**, v. 6, n. 3, p. 96-101, 2015.
- 51 MONTEDORI, A. et al. Lasers for caries removal in deciduous and permanent teeth. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 9, 2016.
- 52 NEVES, L. S. et al. A utilização do laser em Ortodontia. **Revista Dental Press de Ortodontia e Ortopedia Facial**, v. 10, p. 149-156, 2005.
- 53 ENGINEERING, N. A. O. **Lasers: Invention to Application**. Washington, DC: The National Academies Press, 1987. 12 p.
- 54 AFSHEEN, S. et al. Morphological, structural and hardness changes of human dental enamel irradiated with a Nd:YAG laser. **Laser Physics**, v. 28, n. 12, p. 126004, 2018.

- 55 PARKER, S. Surgical lasers and hard dental tissue. **British Dental Journal**, v. 202, p. 445, 2007.
- 56 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.
- 57 ZECELL, D. M. et al. Nd:YAG laser in caries prevention: A clinical trial. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 41, n. 1, p. 31-35, 2009.
- 58 PARKER, S. Laser-tissue interaction. **British Dental Journal**, v. 202, p. 73, 2007.
- 59 SUN, M.; WU, N.; CHEN, H. Laser-assisted Rapid Mineralization of Human Tooth Enamel. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 9611-9611, 2017.
- 60 NIEMZ, M. H. **Laser-Tissue Interactions: Fundamentals and Applications**. Springer Berlin Heidelberg, 2004.
- 61 PEREIRA, D. L. et al. Variation on Molecular Structure, Crystallinity, and Optical Properties of Dentin Due to Nd:YAG Laser and Fluoride Aimed at Tooth Erosion Prevention. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 2, p. 433, 2018.
- 62 LIZARELLI, R. F. Z. et al. A Comparative Study of Nanosecond and Picosecond Laser Ablation in Enamel: Morphological Aspects. **Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery**, v. 18, n. 3, p. 151-157, 2000.
- 63 ZECELL, D. M. et al. FTIR Spectroscopy Revealing the Effects of Laser and Ionizing Radiation on Biological Hard Tissues. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 26, p. 2571-2582, 2015.
- 64 BRAGA, S. R. M.; DE OLIVEIRA, E.; SOBRAL, M. A. P. Effect of neodymium:yttrium–aluminum–garnet laser and fluoride on the acid demineralization of enamel. **Journal of Investigative and Clinical Dentistry**, v. 8, n. 1, p. e12185, 2017.
- 65 HENCH, L. L.; THOMPSON, I. Twenty-first century challenges for biomaterials. **Journal of The Royal Society Interface**, v. 7, n. suppl_4, p. S379-S391, 2010.
- 66 HENCH, L. L.; JONES, J. R. Bioactive Glasses: Frontiers and Challenges. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 3, n. 194, 2015.
- 67 SIQUEIRA, R. L.; ZANOTTO, E. D. Biosilicato®: histórico de uma vitrocerâmica brasileira de elevada bioatividade. **Química Nova**, v. 34, p. 1231-1241, 2011.
- 68 HENCH, L. L. The future of bioactive ceramics. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 26, n. 2, p. 86, 2015.

- 69 HOPPE, A.; GÜLDAL, N. S.; BOCCACCINI, A. R. A review of the biological response to ionic dissolution products from bioactive glasses and glass-ceramics. **Biomaterials**, v. 32, n. 11, p. 2757-2774, 2011.
- 70 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.
- 71 MONTAZERIAN, M.; ZANOTTO, E. D. Bioactive and inert dental glass-ceramics. **J Biomed Mater Res A**, 2016.
- 72 CHINELATTI, M. A. et al. Effect of Methods of Biosilicate Microparticle Application on Dentin Adhesion. **Dentistry Journal**, v. 7, n. 2, p. 35, 2019.
- 73 PINTADO-PALOMINO, K. et al. Clinical, double blind, randomized controlled trial of experimental adhesive protocols in caries-affected dentin. **Clinical Oral Investigations**, v. 23, n. 4, p. 1855-1864, 2019.
- 74 COMESAÑA, R. et al. Laser cladding of bioactive glass coatings. **Acta Biomaterialia**, v. 6, n. 3, p. 953-961, 2010.
- 75 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.
- 76 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.
- 77 _____. 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.
- 78 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.
- 79 QUEIROZ, C. S. et al. pH-cycling models to evaluate the effect of low fluoride dentifrice on enamel de- and remineralization. **Brazilian Dental Journal**, v. 19, p. 21-27, 2008.
- 80 HARA, A. T. et al. Influence of the mineral content and morphological pattern of artificial root caries lesion on composite resin bond strength. **European Journal of Oral Sciences**, v. 112, n. 1, p. 67-72, 2004.
- 81 BENETTI, C. et al. Mid-Infrared Spectroscopy Analysis of the Effects of Erbium, Chromium:Yttrium-Scandium-Gallium-Garnet (Er,Cr:YSGG) Laser Irradiation on Bone Mineral and Organic Components. **Applied Spectroscopy**, v. 69, n. 12, p. 1496-1504, 2015.

- 82 RAMAKRISHNAIAH, R. et al. Applications of Raman Spectroscopy in Dentistry: Analysis of Tooth Structure. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 50, n. 4, p. 332-350, 2015.
- 83 REED, R. et al. Radiotherapy effect on nano-mechanical properties and chemical composition of enamel and dentine. **Archives of Oral Biology**, v. 60, n. 5, p. 690-697, 2015.
- 84 ANA, P. A. et al. FT-Raman spectroscopic analysis of Nd:YAG and Er,Cr:YSGG laser irradiated enamel for preventive purposes. **Laser Physics**, v. 24, n. 3, p. 035603, 2014.
- 85 DEL-VALLE, M.; LINS, E.; ANA, P. Assessment of simulated osteoporosis in alveolar bone using optical coherence tomography. **Journal of Biophotonics**, v. 0, n. ja, p. e201900171,
- 86 MENG, Z. et al. **Measurement of the refractive index of human teeth by optical coherence tomography**. SPIE, 2009.
- 87 MAIA, A. M. A. et al. Evaluation of dental enamel caries assessment using Quantitative Light Induced Fluorescence and Optical Coherence Tomography. **Journal of Biophotonics**, v. 9, n. 6, p. 596-602, 2016.
- 88 DARLING, C. L. et al. Remineralization of Root Caries Monitored Using Cross-Polarization Optical Coherence Tomography. **Proceedings of SPIE--the International Society for Optical Engineering**, v. 8208, p. 82080V, 2012.
- 89 VALE, G. C. et al. APF and Dentifrice Effect on Root Dentin Demineralization and Biofilm. **Journal of Dental Research**, v. 90, n. 1, p. 77-81, 2011.
- 90 RODRIGUES, R. B. et al. Influence of radiotherapy on the dentin properties and bond strength. **Clinical Oral Investigations**, v. 22, n. 2, p. 875-883, 2018.
- 91 LIESHOUT, H. F. J.; BOTS, C. P. The effect of radiotherapy on dental hard tissue—a systematic review. **Clinical Oral Investigations**, v. 18, n. 1, p. 17-24, 2014.
- 92 DE MIRANDA, R. R. et al. Chemical analysis of in vivo-irradiated dentine of head and neck cancer patients by ATR-FTIR and Raman spectroscopy. **Clinical Oral Investigations**, v. 23, n. 8, p. 3351-3358, 2019.
- 93 QING, P. et al. Effect of gamma irradiation on the wear behavior of human tooth dentin. **Clinical Oral Investigations**, v. 20, n. 9, p. 2379-2386, 2016.
- 94 WU, L.; GENG, K.; GAO, Q. Effects of different anti-caries agents on microhardness and superficial microstructure of irradiated permanent dentin: an in vitro study. **BMC Oral Health**, v. 19, n. 1, p. 113, 2019.

- 95 MARANGONI-LOPES, L. et al. Radiotherapy Reduces Microhardness and Mineral and Organic Composition, and Changes the Morphology of Primary Teeth: An in vitro Study. **Caries Research**, v. 53, n. 3, p. 296-304, 2019.
- 96 QUEIROZ, A. M. et al. Radiotherapy Activates and Protease Inhibitors Inactivate Matrix Metalloproteinases in the Dentinoenamel Junction of Permanent Teeth. **Caries Research**, v. 53, n. 3, p. 253-259, 2019.
- 97 VELO, M. M. D. A. C. et al. Radiotherapy alters the composition, structural and mechanical properties of root dentin in vitro. **Clinical Oral Investigations**, v. 22, n. 8, p. 2871-2878, 2018.
- 98 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.
- 99 BACHMANN, L. et al. Infrared Absorption Bands of Enamel and Dentin Tissues from Human and Bovine Teeth. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 38, n. 1, p. 1-14, 2003.
- 100 LOPES, C. D. C. A. et al. Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) application chemical characterization of enamel, dentin and bone. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 53, n. 9, p. 747-769, 2018.
- 101 ORTIZ-RUIZ, A. J. et al. Structural differences in enamel and dentin in human, bovine, porcine, and ovine teeth. **Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger**, v. 218, p. 7-17, 2018.
- 102 MORRIS, M. D.; MANDAIR, G. S. Raman Assessment of Bone Quality. **Clinical Orthopaedics and Related Research®**, v. 469, n. 8, p. 2160-2169, 2011.
- 103 KUBISZ, L.; POŁOMSKA, M. FT NIR Raman studies on gamma-irradiated bone. **Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy**, v. 66, n. 3, p. 616-625, 2007.
- 104 GONG, B.; MORRIS, M. D. Raman spectroscopy monitors adverse bone sequelae of cancer radiotherapy. **Chinese Chemical Letters**, v. 26, n. 4, p. 401-406, 2015.
- 105 SA, Y. et al. Are different crystallinity-index-calculating methods of hydroxyapatite efficient and consistent? **New Journal of Chemistry**, v. 41, n. 13, p. 5723-5731, 2017.
- 106 QUERIDO, W. et al. Validated Approaches for Quantification of Bone Mineral Crystallinity Using Transmission Fourier Transform Infrared (FT-IR), Attenuated Total Reflection (ATR) FT-IR, and Raman Spectroscopy. **Applied Spectroscopy**, v. 72, n. 11, p. 1581-1593, 2018.

- 107 PUCÉAT, E.; REYNARD, B.; LÉCUYER, C. Can crystallinity be used to determine the degree of chemical alteration of biogenic apatites? **Chemical Geology**, v. 205, n. 1, p. 83-97, 2004.
- 108 LU, H. et al. Direct radiation-induced effects on dental hard tissue. **Radiation Oncology**, v. 14, n. 1, p. 5, 2019.
- 109 MOTA, C. C. B. D. O. et al. Optical Coherence Tomography as an Auxiliary Tool for the Screening of Radiation-Related Caries. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 31, n. 7, p. 301-306, 2013.
- 110 AZEVEDO, C. S. D. et al. Evaluation of caries-affected dentin with optical coherence tomography. **Brazilian Oral Research**, v. 25, p. 407-413, 2011.
- 111 POPESCU, D. P. et al. Assessment of early demineralization in teeth using the signal attenuation in optical coherence tomography images. **Journal of biomedical optics**, v. 13, n. 5, p. 054053-054053, 2008.
- 112 CARA, A. C. B. et al. Evaluation of two quantitative analysis methods of optical coherence tomography for detection of enamel demineralization and comparison with microhardness. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 46, n. 9, p. 666-671, 2014.
- 113 UENO, T. et al. Optical analysis of enamel and dentin caries in relation to mineral density using swept-source optical coherence tomography. **Journal of Medical Imaging**, v. 3, n. 3, p. 1-9, 9, 2016.
- 114 MANDURAH, M. et al. Monitoring remineralization of enamel subsurface lesions by optical coherence tomography. **Journal of biomedical optics**, v. 18, n. 4, p. 1-8, 8, 2013.
- 115 SHIMADA, Y. et al. Application of Optical Coherence Tomography (OCT) for Diagnosis of Caries, Cracks, and Defects of Restorations. **Current Oral Health Reports**, v. 2, n. 2, p. 73-80, 2015.
- 116 NAKAGAWA, H. et al. Validation of swept source optical coherence tomography (SS-OCT) for the diagnosis of smooth surface caries in vitro. **Journal of Dentistry**, v. 41, n. 1, p. 80-89, 2013.
- 117 ZHOU, Y. et al. Assessment of root caries under wet and dry conditions using swept-source optical coherence tomography (SS-OCT). **Dental Materials Journal**, v. 37, n. 6, p. 880-888, 2018.
- 118 DIAS-MORAES, M. C. et al. Using Optical Attenuation Coefficient to Monitor the Efficacy of Fluoride and Nd:YAG Laser to Control Dentine Erosion. **Applied Sciences**, v. 9, n. 7, p. 1485, 2019.

- 119 LE, M. H.; DARLING, C. L.; FRIED, D. **Methods for calculating the severity of demineralization on tooth surfaces from PS-OCT scans.** SPIE, 2009. PWB p.
- 120 CHAN, K. H. et al. Use of 2D images of depth and integrated reflectivity to represent the severity of demineralization in cross-polarization optical coherence tomography. **Journal of Biophotonics**, v. 8, n. 1-2, p. 36-45, 2015.
- 121 JONES, R. S. et al. **Remineralization of in vitro dental caries assessed with polarization-sensitive optical coherence tomography.** SPIE, 2006.
- 122 NATSUME, Y. et al. **Estimation of lesion progress in artificial root caries by swept source optical coherence tomography in comparison to transverse microradiography.** SPIE, 2011.
- 123 GONÇALVES, L. M. N. et al. Radiation therapy alters microhardness and microstructure of enamel and dentin of permanent human teeth. **Journal of Dentistry**, v. 42, n. 8, p. 986-992, 2014.
- 124 ARID, J. et al. Radiotherapy impairs adhesive bonding in permanent teeth. **Supportive Care in Cancer**, 2019.
- 125 MORAIS-FARIA, K. et al. The wolf in sheep's clothing: Microtomographic aspects of clinically incipient radiation-related caries. **Medicina oral, patologia oral y cirugia bucal**, v. 21, n. 3, p. e299-e304, 2016.
- 126 KIELBASSA, A. M. et al. Irradiation effects on microhardness of fluoridated and non-fluoridated bovine dentin. **European Journal of Oral Sciences**, v. 105, n. 5P1, p. 444-447, 1997.
- 127 FEATHERSTONE, J. D. B. et al. Comparison of Artificial Caries-Like Lesions by Quantitative Microradiography and Microhardness Profiles. **Caries Research**, v. 17, n. 5, p. 385-391, 1983.
- 128 KIELBASSA, A. M. et al. Correlation of transversal microradiography and microhardness on in situ-induced demineralization in irradiated and nonirradiated human dental enamel. **Archives of Oral Biology**, v. 44, n. 3, p. 243-251, 1999.
- 129 ZHANG, Y.-R. et al. Review of research on the mechanical properties of the human tooth. **International Journal Of Oral Science**, v. 6, p. 61, 2014.
- 130 HEGDE, M. et al. Techniques to analyze the effect of Radiation on Enamel and Dentin - A review. **Nitte University Journal of Health Sciences.**, v. 6, n. 4, p. 71-78, 2016.
- 131 DE SIQUEIRA MELLARA, T. et al. The effect of radiation therapy on the mechanical and morphological properties of the enamel and dentin of

- deciduous teeth—an in vitro study. **Radiation Oncology**, v. 9, n. 1, p. 30, 2014.
- 132 SOARES, C. J. et al. Effect of Gamma Irradiation on Ultimate Tensile Strength of Enamel and Dentin. **Journal of Dental Research**, v. 89, n. 2, p. 159-164, 2010.
- 133 TARTARI, T. et al. Analysis of the effects of several decalcifying agents alone and in combination with sodium hypochlorite on the chemical composition of dentine. **International Endodontic Journal**, v. 51, n. S1, p. e42-e54, 2018.
- 134 ANA, P. A. et al. Characterization of caries progression on dentin after irradiation with Nd:YAG laser by FTIR spectroscopy and fluorescence imaging. In: KURACHI, C.;SVANBERG, K., et al (Ed.). **Biophotonics South America**. Bellingham: Spie-Int Soc Optical Engineering, v.9531, 2015. (Proceedings of SPIE).
- 135 GANDOLFI, M. G. et al. Demineralization, Collagen Modification and Remineralization Degree of Human Dentin after EDTA and Citric Acid Treatments. **Materials**, v. 12, n. 1, p. 25, 2018.
- 136 HABIB, M. et al. Assessing surface characteristics of eroded dentine with optical coherence tomography: a preliminary in vitro validation study. **Applied Optics**, v. 57, n. 29, p. 8673-8679, 2018.
- 137 RAKHMATULLINA, E. et al. Application of the specular and diffuse reflection analysis for *in vitro* diagnostics of dental erosion: correlation with enamel softening, roughness, and calcium release. **Journal of biomedical optics**, v. 16, n. 10, p. 1-13, 13, 2011.
- 138 PERDIGÃO, J. et al. Morphological field emission-SEM study of the effect of six phosphoric acid etching agents on human dentin. **Dental Materials**, v. 12, n. 4, p. 262-271, 1996.
- 139 PINHEIRO, M. C. et al. In vitro evaluation of Biosilicate® dissolution on dentin surface: a SEM analysis. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 42, p. 251-258, 2013.
- 140 BUZALAF, M. A. R. et al. Mechanisms of Action of Fluoride for Caries Control. **Monographs in Oral Science**, v. 22, p. 97-114, 2011.
- 141 ZAMATARO, C. B. et al. Influence of Er,Cr:YSGG Laser on CaF₂-like products formation because of professional acidulated fluoride or to domestic dentifrice application. **Microscopy Research and Technique**, v. 76, n. 7, p. 704-713, 2013.
- 142 ANA, P. A. et al. Effect of Er,Cr:YSGG Laser and Professional Fluoride Application on Enamel Demineralization and on Fluoride Retention. **Caries Research**, v. 46, n. 5, p. 441-451, 2012.

- 143 LIZARELLI, R. D. F. Z.; MORIYAMA, L. T.; BAGNATO, V. S. Ablation rate and micromorphological aspects with Nd:YAG picosecond pulsed laser on primary teeth. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 31, n. 3, p. 177-185, 2002.
- 144 ANTUNES, A. et al. Nanosecond Nd:YAG laser on dental enamel: compositional analysis by X-ray fluorescence. **Laser Physics Letters**, v. 2, n. 6, p. 318-323, 2005.
- 145 _____. Surface morphology, elemental distribution, and spectroscopic changes subsequent the application of nanosecond pulsed Nd:YAG laser on dental enamel surface. **Laser Physics Letters**, v. 2, n. 3, p. 141-147, 2005.
- 146 HARA, A. T. et al. Interplay between fluoride and abrasivity of dentifrices on dental erosion–abrasion. **Journal of Dentistry**, v. 37, n. 10, p. 781-785, 2009.
- 147 CURTIS, A. R.; WEST, N. X.; SU, B. Synthesis of nanobioglass and formation of apatite rods to occlude exposed dentine tubules and eliminate hypersensitivity. **Acta Biomaterialia**, v. 6, n. 9, p. 3740-3746, 2010.
- 148 ZHANG, Y. et al. Biomimetic regulation of dentine remineralization by amino acid in vitro. **Dental Materials**, v. 35, n. 2, p. 298-309, 2019.
- 149 SEPULVEDA, P.; JONES, J. R.; HENCH, L. L. In vitro dissolution of melt-derived 45S5 and sol-gel derived 58S bioactive glasses. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 61, n. 2, p. 301-311, 2002.
- 150 BAKRY, A. S. et al. CO2 Laser Improves 45S5 Bioglass Interaction with Dentin. **Journal of Dental Research**, v. 90, n. 2, p. 246-250, 2011.
- 151 DESIMONE, D. et al. Biosilicate®–gelatine bone scaffolds by the foam replica technique: development and characterization. **Science and Technology of Advanced Materials**, v. 14, n. 4, p. 045008, 2013.
- 152 LEE, B.-S. et al. In vitro study of dentin hypersensitivity treated by Nd:YAP laser and bioglass. **Dental Materials**, v. 21, n. 6, p. 511-519, 2005.
- 153 CHU, C. H. et al. Effects of silver diamine fluoride on dentine carious lesions induced by *Streptococcus mutans* and *Actinomyces naeslundii* biofilms. **International Journal of Paediatric Dentistry**, v. 22, n. 1, p. 2-10, 2012.
- 154 ESTEVES-OLIVEIRA, M. et al. Impact of combined CO2 laser irradiation and fluoride on enamel and dentin biofilm-induced mineral loss. **Clinical Oral Investigations**, v. 21, n. 4, p. 1243-1250, 2017.
- 155 SIRIN KARAARSLAN, E. et al. Evaluation of the effects of different remineralizing agents on *Streptococcus mutans* biofilm adhesion. **Journal of Adhesion Science and Technology**, v. 32, n. 23, p. 2617-2630, 2018.

- 156 RUBY, J. D. et al. The Caries Phenomenon: A Timeline from Witchcraft and Superstition to Opinions of the 1500s to Today's Science. **International Journal of Dentistry**, v. 2010, 2010.
- 157 LOVE, R. M.; JENKINSON, H. F. Invasion of Dentinal Tubules by Oral Bacteria. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, v. 13, n. 2, p. 171-183, 2002.
- 158 NAJAR, E. et al. Surface characterization of Streptococcus mutans biofilms grown on polyethylene and beta-titanium. **Journal of applied biomaterials & biomechanics : JABB**, v. 4, p. 120-4, 2006.
- 159 NATSUME, Y. et al. **Estimation of lesion progress in artificial root caries by swept source optical coherence tomography in comparison to transverse microradiography**. SPIE, 2011. 1-9 p.
- 160 SUGIURA, M. et al. White spot lesion remineralization by sugar-free chewing gum containing bio-available calcium and fluoride: A double-blind randomized controlled trial. **Journal of Dentistry**, v. 54, p. 86-91, 2016.

ANEXO

ANEXO A – Parecer da Comissão de Ética em Uso de Animais da UFABC



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Fundação Universidade Federal do ABC
Comissão de Ética em Uso de Animais



Santo André, 08 de novembro de 2017
CEUAX N 9614190917

Ilmo(a). Sr(a).
Responsável: Juliana Kelmy Macário Barboza Daguano
Área: Centro De Engenharia, Modelagem E Ciências Sociais Aplicadas - Ceacs

Título do projeto: "Efeitos da associação do Biosilicato® e laser em alta intensidade na paralisação da cárie de radiação".

Parecer Consubstanciado da CEUA UFABC

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Fundação Universidade Federal do ABC, na reunião de 06/11/2017, **ANALISOU** e **APROVOU** o protocolo de estudo acima referenciado. A partir desta data, é dever do pesquisador:

1. Comunicar toda e qualquer alteração do protocolo.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do protocolo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.

Valéria Lima Fabrício Borghesi
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Fundação Universidade Federal do ABC

Profa. Dra. Renata Simões
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Fundação Universidade Federal do ABC