

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO – ODONTOLOGIA PREVENTIVA INFANTIL

***Análise da Progressão e da Reversão de  
Lesões Artificiais de Cárie através de  
Espectroscopia Raman e Tomografia de  
Coerência Óptica***

**Dissertação de Mestrado**

**Rosa Virginia Dutra de Oliveira**

***João Pessoa-PB***

***2011***

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO – ODONTOLOGIA PREVENTIVA INFANTIL

***Análise da Progressão e da Reversão de  
Lesões Artificiais de Cárie através de  
Espectroscopia Raman e Tomografia de  
Coerência Óptica***

**Rosa Virginia Dutra de Oliveira**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do grau de mestre em Odontologia Preventiva Infantil.

**Orientador: Prof. Dr. Hugo Lemes Carlo**

***João Pessoa-PB***

***2011***

**Rosa Virginia Dutra de Oliveira**

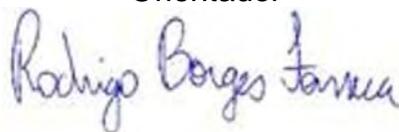
***Análise da Progressão e da Reversão de Lesões Artificiais de Cárie através de Espectroscopia Raman e Tomografia de Coerência Óptica***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do grau de mestre em Odontologia Preventiva Infantil.

***Dissertação Aprovada em \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_***

---

Prof. Dr. Hugo Lemes Carlo – UFPB  
Orientador



---

Prof. Dr. Rodrigo Borges Fonseca – UFG  
Examinador Externo

---

Prof. Dr. Franklin Delano Forte – UFPB  
Examinador Interno

O48a *Oliveira, Rosa Virginia Dutra de.*

*Análise da progressão e da reversão de lesões artificiais de cárie através de espectroscopia Raman e tomografia de coerência óptica / Rosa Virginia Dutra de Oliveira.-- João Pessoa, 2011.*

*62f. : il.*

*Orientador: Hugo Lemes Carlo*

*Dissertação (Mestrado) – UFPB/CCS*

*1. Odontologia preventiva. 2. Desmineralização dentária. 3. Remineralização dentária. 4. Lesões artificiais – cáries. 5. Esmalte dentário.*

UFPB/BC

CDU: 616.314-084(043)

## *Dedicatória*

*Dedico este trabalho,*

*Aos meus pais Jair e Alzir Rosa,  
que merecem reconhecimento especial em gratidão  
pelo apoio e encorajamento caloroso e inabalável.  
Por todos os esforços que dispensaram em prol da minha educação.  
Agradeço às oportunidades dadas para que eu pudesse percorrer este  
longo caminho, abrindo mão de seus sonhos para realizarem os meus.  
Por isso, sonhei com esse momento e hoje vocês compartilham isso comigo,  
não como mero espectadores, mas também como “doutores” que são!*

*À minha irmã, Dayse,  
pelo incentivo incondicional e por  
estar presente mesmo distante.*

*Vocês são inspirações para  
tudo que há de nobre em  
minha vida. Amo vocês.*

## *Agradecimentos Especiais*

*Obrigada Senhor por ter me iluminado e mostrado que esse era o caminho e por ter colocado nele pessoas tão queridas e situações tão engrandecedoras.*

## *Agradecimentos Especiais*

*Ao meu orientador Prof. Dr. Hugo Lemes Carlo,  
que de maneira insubstituível me orientou na realização deste trabalho,  
contribuiu para o meu crescimento científico e humano com sua sabedoria,  
amizade e dedicação. Obrigada por tudo.*

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal da Paraíba, nas pessoas do Magnífico Reitor Prof. **Rômulo Soares Polari** e vice-reitora Prof<sup>a</sup>. **Maria Yara Campos Matos**.

À Pró-Reitoria de Pós-graduação e Pesquisa na pessoa do Professor **Isac Almeida de Medeiros**.

Ao Professor **Newton Costa**, Coordenador Geral de Pós-graduação – PRPG/UFPB.

Ao Prof. Dr. **Fabiano Gonzaga Rodrigues**, coordenador do programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Ao Prof. Dr. **Anderson Stevens Leônidas Gomes**, pela co-orientação deste trabalho.

Ao Prof. Dr. **Franklin Delano Forte** por ter participado desde o início, quando da apresentação do projeto, da banca de qualificação e agora da banca de defesa, contribuindo significativamente para o engrandecimento desta pesquisa.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. **Fabíola Galbiatti Carvalho**, minha “co-orientadora por tabela”, pelas contribuições relativas não só ao desenvolvimento deste trabalho, mas também pelo incentivo durante o mestrado.

Ao Prof. Dr. **Rodrigo Borges Fonseca**, por ter prontamente aceitado participar da banca de defesa desta dissertação.

Ao Prof. Dr. **Cid Bartolomeu de Araujo** e aos doutorandos **Cláudia Brainer** e **Jamil Saade** por colaborarem com a realização desta pesquisa.

Ao Prof. Dr. **Fábio Correia Sampaio**, pelos brilhantes apontamentos.

Ao Prof. **Pablo Queiroz Lopes**, pelo seu cuidadoso trabalho na manipulação das soluções.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. **Heloísa Helena Veloso**, minha orientadora no trabalho de conclusão da especialização em Endodontia, que sempre acreditou no meu potencial.

A **todos os professores** que contribuíram para minha formação, seja pessoal ou profissional.

À colega de especialização **Andrea Sarmiento Queiroga**, por sempre ter me incentivado a seguir carreira acadêmica.

Aos colegas do mestrado, **Camila, Priscila, Gislayne, Luciana, Rosa Helena, Kaline, Consuelo, Rubênia, Vilson Junior, Bruna, Manuella, Antônio Carlos, Ana Carolina, Laura, Eduardo, Rachel, Viviane, Isabela Arrais e Diogo** e do doutorado **Stela, Roberta, Dayanne, Daniela, Iolanda e Marcos** pela troca de experiências, pelos momentos de leveza e diversão, pelos papos cabeça e por compartilharem as angústias diante das dificuldades.

Ao laboratório de Microscopia e Imagem Biológica, na pessoa do Prof. Dr. **Frederico Barbosa**, pelo suporte durante o desenvolvimento da pesquisa.

Ao laboratório de Óptica Não Linear e Optoeletrônica, do Departamento de Física – CCEN/UFPE e ao Núcleo de Pesquisa Clínica em Biomateriais, do Departamento de Prótese e Cirurgia Buco Facial – CCS/UFPE

À **Márcia, Mércia, Mônica, Márcio** e **tia Marlene**, que me receberam em Recife de braços abertos.

Aos ex-colegas de trabalho de Campina Grande e Serra Branca, que me encorajaram a correr atrás do meu sonho.

A **Thiago Fontana**, por compreender minha ausência e me apoiar nos meus projetos.

A todos os meus amigos, por me dirigirem sempre palavras de conforto e otimismo.

## RESUMO

Existem vários protocolos para o desenvolvimento de lesões artificiais de cárie, no entanto, modelos de ciclagem de pH, envolvendo a exposição de substratos dentários à combinação de desmineralização e remineralização são os mais utilizados, por mimetizar melhor a dinâmica de perda e ganho de minerais. As metodologias empregadas para analisar as lesões obtidas costumam basear-se em análise da superfície, não fornecendo informações sobre alterações ocorridas nas camadas mais profundas. O objetivo do presente estudo foi analisar características de progressão e reversão de lesões artificiais de cárie em esmalte humano. Para tanto, utilizou-se 50 terceiros molares inclusos, dos quais se obteve cem blocos de esmalte. O tratamento desmineralizador consistiu em ciclagem de pH por diferentes períodos de tempo: G1(1 dia), G2(3 dias), G3(5 dias), G4(7 dias), G5(9 dias) e G6(11dias). E o tratamento remineralizador em aplicações de flúor gel neutro a 2%, em dias alternados, concomitante a ciclagem de pH, durante 7 dias. As amostras foram analisadas antes e após os tratamentos, utilizando Espectroscopia Raman (ER) para análise de conteúdo de fosfato de cálcio e Tomografia de Coerência Óptica (TCO) para análise das características morfológicas. Após tratamento desmineralizador observou-se perda de fosfato de cálcio menor em G1 do que nos demais grupos. Os resultados mostraram que em G1 e G2 a superfície apresentou-se inalterada após tratamento desmineralizador; em G3 e G4 observaram-se irregularidades, denotando erosão inicial da superfície do esmalte, as quais progrediram, resultando em exposição da dentina subjacente em G6. Abaixo da superfície houve progressão da desmineralização, de acordo com os períodos crescentes de tempo, sendo que a região cervical apresentou maior desmineralização do que a oclusal. Quantificando perda e ganho de fosfato de cálcio, observou-se para G1 e G2 perda mineral após o tratamento remineralizador, enquanto G3, G4, G5 e G6 apresentaram ganho. Com relação à análise morfológica após remineralização, observou-se reversão do processo apenas para G5. Períodos maiores de armazenamento apresentaram efeito gradativo na desmineralização da superfície e da subsuperfície do esmalte. A região cervical apresentou-se mais sensível à desmineralização e exposição dentinária do que a oclusal. Períodos menores de armazenamento não apresentaram resposta ao tratamento remineralizador.

**DESCRITORES** – Desmineralização dentária; Remineralização Dentária; Esmalte Dentário; Cárie Dentária

## **ABSTRACT**

There are several protocols for the development of artificial carious lesions, and pH-cycling models, involving the exposure of substrates to the combination of demineralization and remineralization, are the most used. Usually, the methodologies analysis of the lesions obtained based on surface changes, and no information is obtained for deeper layers. The aim of this study was to analyze the progression and the reversal of artificial carious lesions in human enamel. Fifty third molars were used to obtain one hundred enamel blocks. Treatment consisted of a demineralizer pH cycling for different periods of time: G1 (1 day), G2 (3 days), G3 (5 days), G4 (7 days), G5 (9 days) and G6 (11 days). The remineralizing treatment used pH cycling for 7 days and neutral 2% fluoride gel applications, on alternate days. The samples were analyzed before and after treatments using Raman Spectroscopy (RS) for the analysis of the content of calcium phosphate and Optical Coherence Tomography (OCT) for the analysis of morphological characteristics. After the demineralization treatment it was observed greater loss of calcium phosphate for G1 compared to the other groups. The results showed that G1 and G2 presented an unchanged surface after demineralization treatment; in G3 and G4 it was observed surface irregularities, indicating initial erosion of the enamel surface, which progressed, resulting in exposure of the underlying dentin (G6). Beneath of the surface there was a progressive demineralization, according to increasing periods of time, and the cervical region showed greater demineralization than the occlusal region. In respect to the loss and gain of calcium phosphate, it was observed mineral loss for G1 and G2 after the remineralization treatment, while G3, G4, G5 and G6 showed gain of calcium phosphate. The morphological analysis after remineralization showed that there were reversals of the process only for G5. Longer storage periods showed a gradual demineralization effect on the surface and subsurface of the enamel. The cervical region of the specimens was more sensitive to demineralization than did the occlusal region. Shorter periods of storage showed no response to remineralization treatment.

**KEYWORDS** – Tooth Demineralization; Tooth Remineralization; Dental Enamel; Dental Caries

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	12
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b>	15
<b>3 OBJETIVOS</b>	23
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b>	24
4.1 Análise Inicial das amostras	27
4.2 Seleção das Amostras	29
4.3 Tratamento Desmineralizador	29
4.4 Análise Pós- tratamento demineralizador	32
4.5 Tratamento Remineralizador	32
4.6 Análise Pós- tratamento remineralizador	32
4.7 Análise Estatística	33
<b>5 RESULTADOS</b>	34
<b>6 DISCUSSÃO</b>	48
<b>7 CONCLUSÕES</b>	54
<b>8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	55
<b>9 ANEXOS</b>	60
<b>10 APÊNDICES</b>	61

## 1 INTRODUÇÃO

Apesar da grande quantidade de análises *in situ* e ensaios clínicos, modelos *in vitro* ainda são comumente empregados em estudos de Cariologia. Os conhecimentos atuais sobre os mecanismos de desenvolvimento da cárie dentária, flúor e efeito de medidas preventivas devem-se principalmente a esses tipos de estudo, os quais possuem alto nível de controle científico, menor variabilidade intrínseca e menor tamanho da amostra como importantes vantagens (WHITE, 1995; ARGENTA, TABCHOURY e CURY, 2003). Deste modo, o papel dos modelos *in vitro* é facilitar a geração de dados quantitativos a fim de proporcionar confiança aos investigadores no momento de projetar ensaios clínicos.

No entanto, com relação à produção de lesões artificiais de cárie, a grande variedade de protocolos e composições de soluções tendem a confundir o pesquisador (ten CATE e DUIJSTER, 1982; FEATHERSTONE et al., 1983; WHITE, 1987; ARGENTA TABCHOURY e CURY, 2003; VIEIRA et al., 2005). E a depender da origem do substrato dentário a ser empregado (bovino ou humano) e do objetivo do estudo, fatores como composição, pH, saturação da solução em relação à apatita, volume, viscosidade e tempo de utilização da solução, podem ter impacto sobre a desmineralização e afetar posterior remineralização. Estes fatores interagem uns aos outros, tornando difícil o estabelecimento de um modelo ideal (BUZALAF et al., 2010).

O que ocorre no esmalte, na presença de soluções desmineralizantes, inicialmente, é a dissolução da superfície seguida pela precipitação de minerais menos solúveis, como o flúor, nela mesma. Posteriormente, a solução se difunde para regiões mais profundas, resultando na dissolução da camada subjacente. Em seguida, componentes minerais difusos, voltam para a camada superficial e se precipitam na região. Ao mesmo tempo, uma parte dos íons dissolvidos difunde-se para o meio ambiente regenerando a superfície, o que a faz parecer inalterada (MARGOLIS e MORENO, 1990). Porém, à medida que a desmineralização avança, essa camada superficial é erodida e o esmalte torna-se mais poroso. Dado este relevante, já que foi demonstrado que a porosidade e

a profundidade das lesões podem interferir numa posterior remineralização (STRANG et al., 1987).

Lesões mais porosas foram apontadas como sendo mais facilmente remineralizadas do que as menos porosas, uma vez que, durante a difusão, o mineral dissolvido passaria por um processo de reprecipitação nas camadas mais profundas das mesmas (SCHÄFER, HAVEN e PARR, 1992). Lesões rasas foram definidas como mais apropriadas quando se faz necessário uma distribuição mineral mais próxima do processo natural *in vivo*, enquanto lesões profundas proporcionariam melhor discriminação entre os tratamentos em estudo, sendo mais adequadas quando da comparação da eficiência de sistemas remineralizantes (ten CATE et al., 2008).

Para analisar lesões artificiais de cárie em esmalte muitas metodologias podem ser empregadas, porém algumas delas são indiretas e baseiam-se na textura e aparência da superfície, não fornecendo informações sobre alterações ocorridas nas camadas mais profundas, outras ainda necessitam de destruição da amostra, dificultando o acompanhamento da progressão e/ou reversão das mesmas (JONES e FRIED, 2009).

Neste estudo utilizar-se-á os métodos de Espectroscopia Raman e de Tomografia de Coerência Óptica (TCO). Com a vantagem de serem, ambos, métodos não-destrutivos e com capacidade de detectar, respectivamente, variações no conteúdo mineral e alterações morfológicas dos tecidos dentários duros, pode-se assim, caracterizar lesões de cárie artificialmente desenvolvidas e proporcionar o acompanhamento de uma posterior remineralização das amostras.

A Espectroscopia Raman fornece uma série de picos, deslocados pela frequência vibracional característica de cada molécula. A intensidade desses picos está correlacionada à concentração das moléculas, permitindo não só a identificação destas, como também análises quantitativas. No caso de lesões de cárie, dependendo do estágio de desenvolvimento, alterações na concentração de fosfato de cálcio poderão ser acompanhadas com relação aos parâmetros espectrais de intensidade, posição e largura dos picos Raman, auxiliando no diagnóstico do processo des-re (BERGER, 2007).

A Tomografia de Coerência Óptica (TCO), por sua vez, é uma modalidade de diagnóstico por imagem apontada como adequada para a detecção de alterações na morfologia do esmalte, provocadas pela desmineralização, uma vez que modificações na dispersão óptica e nas propriedades de espalhamento da luz no tecido podem ser observadas e encontram boa correlação com imagens histológicas (POPESCU et al., 2008).

O objetivo do estudo foi avaliar, com o auxílio das metodologias descritas, a progressão de lesões artificiais de cárie em períodos crescentes de ciclagem de pH e a remineralização das mesmas. A hipótese nula a ser testada é a de que períodos crescentes de armazenamento resultarão em lesões com maior grau de desmineralização e que o comportamento destas, após a remineralização, dependerá do tratamento anterior.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

Experimentos *in vitro* são modelos de estudo que simulam fenômenos fora de organismos vivos, servindo como importantes fontes de informação para o pesquisador. Muito usados em pesquisas sobre cárie dentária, podem fornecer um meio valioso e eficaz de avaliação, tendo como vantagens o maior controle das variáveis envolvidas e o tamanho reduzido da amostra (REDHER NETO et al., 2009).

Muitos estudos *in vitro* (NEVES et al., 2002; MAGALHÃES et al., 2009; REYNOLDS et al., 2008) e *in situ* (CAI et al., 2009; HELLWIG et al., 2009) têm investigado os processos de desmineralização e remineralização e inúmeros são os modelos disponíveis para o preparo de lesões artificiais de cárie em esmalte.

Um dos protocolos mais usados para dentes humanos é aquele descrito por Featherstone et al. (1983). Neste a solução desmineralizante é composta por tampão ácido formado por 2 mM cálcio, 2 mM de fosfato e 75 mM de acetato em pH 4,3, durante 6 horas. Já a solução remineralizante baseia-se em 1,5 mM de cálcio, 0,9 mM de fosfato, 130-150 mM de cloreto de potássio e 100 mM de tampão TRIS ou 20 mM de cacodilato, em pH 7,0, durante 17 horas. O grau de saturação de cálcio e fosfato tem a função de mimetizar as propriedades remineralizantes da saliva. Alguns autores mudam o tempo de exposição às soluções de acordo com o foco do estudo. Quando o objetivo é a desmineralização, as amostras permanecem mais tempo na solução desmineralizante, a qual é preparada com maior concentração de ácido e íons, tornando o pH mais alto. Quando o objetivo é observar a remineralização, utilizam por mais tempo a solução remineralizante e a concentração de íons e o pH permanecem inalterados (ARGENTA, TABCHOURY e CURY, 2003; STEINER-OLIVEIRA et al., 2006). As soluções podem ser usadas separadamente (JONES e FRIED, 2009) ou em conjunto (ciclagem de pH) (CHONG, DARLING e FRIED, 2007), podendo ser modificadas pelo acréscimo de flúor (VIEIRA et al., 2005).

Quando o substrato escolhido é o esmalte bovino, o modelo mais comum é o recomendado por ten Cate (1993). Neste caso, a solução desmineralizante contém 1,5mM de cálcio, 0,9mM de fosfato, 0,050M de acetato em pH com valor entre 4,6 e 5,0. A solução remineralizante contém 1,5mM de cálcio, 0,9mM de fosfato, 130mM de cloreto de potássio e 20 mM de tampão HEPES ou cacodilato em pH 7,0. Os ciclos são mais freqüentes (6 x meia hora ao dia em solução Des e 6 x 2 horas e meia ao dia na solução Re) (QUEIROZ et al., 2008). Além disso, a adição de flúor (0,03-0,06ppm) em ambas as soluções também pode ser utilizada (ALVES et al., 2007). Para os dentes decíduos, recomenda-se adicionar maiores concentrações de flúor (0,25ppm ) (THAVEESANGPANICH et al., 2005).

A escolha da técnica de preparação das lesões artificiais de cárie é de suma importância, uma vez que o grau inicial de saturação do sistema desmineralizante e do esmalte, podem resultar em diferenças marcantes nas características físicas das mesmas, tais como distribuição mineral, composição química e aparência das lesões (MARGOLIS et al., 1999).

Achados de que a perda mineral integrada (produto da perda em volume vezes a perda em micrômetros) de lesões artificiais de cárie pode afetar seu comportamento subsequente, quando do estudo de processos de remineralização, têm sido estudados há décadas. De acordo com Carvalho, Godoy e Bastos (2002), remineralização pode ser definida como qualquer ganho de íons, pela estrutura dentária, que ocorra através da deposição de minerais em uma região desmineralizada dos tecidos duros. Ela não somente interrompe o processo de desmineralização, como também repara as lesões cariosas incipientes. Além disso, nas áreas remineralizadas o esmalte torna-se mais resistente a um subsequente ataque ácido quando comparado ao tecido original. Provavelmente porque a reposição de minerais ocorreria em maior medida junto à superfície do que no corpo da lesão subjacente (ten CATE, JONGEBLOED e ARENDS, 1980; ten CATE et al., 1981; IJIMA et al., 1999).

No entanto, Lippert, Parker e Jandt (2004) investigando uma possível remineralização da superfície do esmalte desmineralizado em diferentes experimentos *in vitro*, utilizando desmineralização fisiologicamente relevante,

tempos de remineralização diferentes e soluções remineralizantes com propriedades químicas semelhantes às da saliva humana, observaram que houve deposição mineral sobre o esmalte desmineralizado, porém não detectaram efeito protetor na camada depositada.

Expondo secções pouco espessas de esmalte humano a soluções subsaturadas de flúor em relação ao esmalte dentário e semelhantes ao fluido do biofilme após exposição à sacarose, Yamazaki, Litman e Margolis (2007) monitoraram as mudanças minerais durante 98 dias. Os autores observaram que concentrações a partir de 0,19ppm de flúor impediram desmineralização do esmalte *in vitro*; concentrações intermediárias (2,1-10,1ppm) induziram, simultaneamente, remineralização na porção externa da lesão, mas não preveniram desmineralização nas porções mais profundas. Apenas concentrações de 25,0ppm conseguiram evitar desmineralização adicional, o que demonstrou que o efeito do fluoreto na desmineralização não se encontra apenas em função das propriedades da solução, mas também do estado da superfície do esmalte.

Alguns autores alertaram sobre a influência das características das lesões de cárie em processos de des-remineralização posteriores, como espessura da camada superficial, porosidade e profundidade. De acordo com Jones e Fried (2006), a superfície pode ter espessura tal após a desmineralização que se considera a lesão como “presa”, devido à aparência intacta da zona superficial e semelhança ao esmalte sadio. Essa característica pode ocasionar menor permeabilidade, protegendo o esmalte subjacente da progressão e cavitação. Lesões mais porosas podem ser mais facilmente remineralizadas do que as menos porosas, porque neste tipo de lesão o mineral é rapidamente adsorvido na superfície e encontra condições mais favoráveis para a reprecipitação (STRANG et al., 1987, SCHÄFER, RAVEN e PARR, 1992; LYNCH e ten CATE, 2006). ten Cate, Exterkate e Buijs (2006), estudando lesões rasas e profundas, tratadas com cremes dentais sem flúor, como controle, e com quantidades crescentes de até 3000ppm de flúor, verificaram que o conteúdo mineral, em todas as lesões, foi significativamente maior na camada superficial do que no corpo da lesão subjacente. Do conteúdo mineral perdido no processo de

desmineralização, observou-se deposição de apenas 40% deste nas lesões superficiais e 30% nas profundas, demonstrando que a remineralização no corpo da lesão foi apenas parcial. Também foi observada a ocorrência de uma segunda lesão, desenvolvida além da lesão original, apresentando correlação inversa de gravidade com relação à concentração de flúor utilizado no tratamento.

A formação desta segunda lesão pode ser explicada pela difusão de substâncias ácidas através dos poros, os quais são relativamente grandes nas lesões de maior profundidade, dificultando sua neutralização, desmineralizando o tecido além da lesão original e limitando a restauração dos cristais parcialmente desmineralizados e o crescimento de cristais durante o tratamento remineralizador (JONES et al., 2006).

Achados de ten Cate et al. (2008) mostraram, também, que lesões com menor profundidade são mais apropriadas quando se faz necessário uma distribuição mineral mais próxima do processo *in vivo*, enquanto lesões mais profundas proporcionam melhor discriminação entre tratamentos, sendo mais adequadas para comparar a eficiência de sistemas remineralizantes.

Esta conclusão é interessante, uma vez que em estudos sobre os efeitos preventivos de produtos, realizados *in vitro*, normalmente se lida com lesões superficiais e o parâmetro do tamanho da lesão raramente é considerada (LYNCH, MONY e ten CATE, 2007).

Villena, Tenuta e Cury (2009) analisaram o efeito remineralizante do flúor, em 15 voluntários utilizando um dispositivo palatino com 4 blocos de esmalte. Os indivíduos foram submetidos a 3 grupos de tratamentos: não tratado (controle), pré-tratado com Flúor Fosfato Acidulado (FFA) gel por 1 minuto e 4 minutos. Observou-se que o tratamento com FFA reduziu a desmineralização do esmalte, independente do tempo de aplicação e que a concentração de fluoreto formado e retido no esmalte foi significativamente maior após a aplicação.

Segundo Reynolds (2009) são necessárias concentrações de flúor maiores *in vitro* do que *in vivo* para impedir a progressão da cárie, uma vez que a difusão de íons minerais que promovem a remineralização é uma taxa limitante. Para cada 2 íons de flúor, 10 íons de cálcio e 6 íons fosfato são necessários para

formar uma unidade de fluorapatita e o retorno aos níveis basais ocorre dentro de 24 horas após a aplicação (FEATHERSTONE, 2009).

Quando se realiza uma revisão da literatura à procura de metodologias empregadas na análise das superfícies do esmalte submetidas a desafio cariogênico observa-se uma grande quantidade de possibilidades: microrradiografia (IJIMA et al., 2004; YAMAZAKI, LITMAN e MARGOLIS, 2007; HELLWIG et al., 2009; CAI et al., 2009), microdureza de superfície (KARLINSEY, MACKEY e STOOKEY, 2009), microdureza cross-seccional, microdensitometria (WALKER et al., 2006), microscopia de força atômica (LIPPERT, PARKER e PARR, 2004), microscopia eletrônica de varredura (OSHIRO et al., 2007), microscopia de luz polarizada (PULIDO et al., 2008), perfilometria (MATHIAS, KAVITHA e MAHALAXMI, 2009), espectroscopia Raman (KO et al., 2008) e tomografia por coerência óptica (JONES e FRIED., 2006).

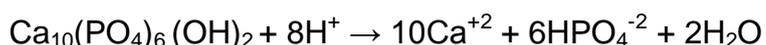
A Espectroscopia Raman fornece informações ao determinar quimicamente a estrutura molecular de células e tecidos. Com relação à análise da estrutura dentária, pode apontar dados como composição, cristalinidade e orientação da matriz mineral primária e, deste modo, o estado de desmineralização ou remineralização do dente, o que pode ser feito sem a necessidade de uso de corantes ou agentes extrínsecos (KO et al., 2008).

No aparelho, a amostra é posicionada e um feixe de luz incide sobre a mesma, excitando a amostra em nível molecular. A radiação interage com a matéria por processos de absorção e de espalhamento. Grande parte da luz espalhada pode ter a mesma frequência que a luz incidente (espalhamento Rayleigh – elástico) e uma pequena fração da luz incidente pode ter sua energia diminuída ou aumentada (espalhamento Raman – inelástico). O feixe espalhado é coletado por um espectrômetro, onde sua intensidade é mostrada em função de sua mudança de frequência (deslocamento Raman) (WANG, SPENCER E WALKER, 2007). Os dados, obtidos na forma de gráficos, consistem em uma série de picos, cada um deslocado pela frequência vibracional das moléculas que constituem a amostra. Visto que cada molécula possui seu próprio conjunto vibracional, de acordo com suas frequências próprias, teremos a identificação

destas através da análise do comprimento de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ). A intensidade desses picos está correlacionada à concentração das moléculas, permitindo não só a identificação destas, como análises quantitativas. No caso de lesões de cárie, dependendo do estágio de desenvolvimento, teremos diferentes concentrações das moléculas, resultando em mudanças de parâmetros espectrais de intensidade, posição e largura dos picos Raman, como também de fluorescência, auxiliando no diagnóstico dos processos des-re (BERGER, 2007).

De acordo com Tsuda e Arends (1997), por estar relacionado a vibrações de ligações moleculares, o espectro Raman consegue identificar os modos vibracionais de compostos como o fosfato, distinguindo-o pela posição e forma da banda, apresentando melhores resultados no estudo de componentes biomoleculares do esmalte e da dentina.

Estudo anterior de Tramini e colaboradores (2001) com tecidos dentários duros usou a banda característica do grupo fosfato de cálcio, localizada entre  $953,5$  e  $967\text{cm}^{-1}$ , a qual representa a energia vibracional associada com a ligação entre fosfato e oxigênio na molécula de hidroxiapatita, e não pode ser alterada. Desta forma, verifica-se que a mesma pode ser utilizada para analisar mudanças na concentração desse mineral dentro da molécula de hidroxiapatita, apresentando-se como um método preciso de comparação nos processos des-re, à medida que a dissolução do esmalte em ácido ocorre da seguinte forma:



Portanto, conclui-se que a análise da concentração de fosfato dentro do esmalte é um bom indicador do grau de mineralização (GILCHRIST et al, 2007).

A técnica Raman possui algumas vantagens (TSUDA e ARENDS, 1997): (1) os sinais Raman são emitidos sob a forma de luz dispersiva e podem ser observados em todas as direções; (2) os eixos de luz de excitação e de detecção podem ser escolhidos de forma independente, permitindo, portanto, considerável flexibilidade; (3) preparo das amostras de forma simples e não-destrutiva; e (4) resposta linear a concentrações químicas e fácil análise banda/espectro.

O sistema de Tomografia por Coerência Óptica (TCO) foi desenvolvido como um método de geração de imagens para estruturas transparentes e

semitransparentes. Em 1998 foi publicado o primeiro estudo aplicando TCO em Odontologia, avaliando tecidos moles e duros da cavidade bucal. Desde então, estudos *in vitro* e *in vivo* vêm sendo realizados, mas muitos ainda estão em fase de pesquisa, e a técnica ainda não se desenvolveu em equipamentos comercialmente disponíveis para uso clínico (FELDCHEIN et al., 1998).

O método apresenta-se como uma técnica de geração de imagens da microestrutura biológica. Nele, a amostra é posicionada e um feixe de luz incide sobre a mesma. Esse feixe proveniente da amostra passa através de um divisor de feixes e emite dois feixes coerentes de luz (comprimentos de onda altos e baixos ocorrendo ao mesmo tempo). Um feixe é chamado de feixe da amostra e o outro, feixe de referência. O feixe da amostra penetra no dente e é espalhado de acordo com a natureza do tecido (sabe-se que tecido cariado espalha luz em maior extensão do que tecido sadio). Alguns dos feixes da amostra se espalham e depois retornam na direção da qual foram emitidos (retroespalhamento), rumo ao divisor de feixes. O feixe de referência viaja até um espelho móvel, e é totalmente refletido, voltando em direção ao mesmo divisor de feixes. Os feixes são recombinados e focalizados para um fotodetector, onde qualquer grau de interferência entre eles pode ser observado – por exemplo, esmalte/dentina, região sadia/cariada – devido aos índices de refração diferentes de cada uma dessas estruturas. Uma sequência de A-scans é produzida. A-scans são a variação na medida de espalhamento em relação à profundidade de um único ponto na superfície do dente e quando obtidos ao longo de uma linha, geram o B-scan, uma coleção de informações de uma “fatia” da amostra, responsável pela formação do tomograma (MAIA, 2009).

A TCO é capaz de gerar imagens em pequena profundidade e de alta resolução, em uma ordem de magnitude maior que aquela obtida pelo ultrassom. Porém, enquanto o segundo atinge profundidades de até 10cm, a TCO penetra apenas alguns milímetros nos tecidos (1 a 4mm), dependendo do comprimento de onda usado (COLSTON JR et al., 1998).

As principais vantagens do sistema de TCO são o fato de ser uma técnica não invasiva, não destrutiva, livre da emissão de radiação ionizante e quase em tempo real. A TCO faz uso de luz e é o comprimento de onda desta que dita o

espalhamento e, portanto, a profundidade de penetração da técnica de imagem. Adicionalmente, o comprimento de onda também interfere na resolução da técnica (BAUMGARTNER et al., 2000).

Segundo Mota et al. (2010), por se tratar de um método digital, medidas quantitativas precisas podem ser obtidas, podendo se calcular a espessura dos tecidos através da multiplicação do atraso sofrido pela velocidade da luz ao passar neste tecido, a qual depende do índice de refração do tecido e da velocidade luminosa no vácuo.

De acordo com Jones e Fried (2006) a TCO é potencialmente útil para gerar imagem latente da remineralização do esmalte. Os autores utilizaram um sistema operacional à base de fibras de TCO com 1310nm para avaliar lesões desmineralizadas artificialmente e o efeito de fluoreto na remineralização. As imagens foram feitas antes e após a remineralização, comparando-se a perda mineral em relação à  $\Delta Z$  (% vol  $\times \mu\text{m}$ ), obtidas a partir de microradiografia digital de alta resolução (DM) e alterações na composição química utilizando-se espectroscopia no infravermelho. A lesão de cárie artificial mostrou um aumento significativo no eixo perpendicular da refletividade integrada após a remineralização. A microradiografia digital demonstrou novo conteúdo mineral na zona de superfície da lesão e recuperação significativa de volume mineral, ou seja, remineralização. Os autores concluíram que as técnicas foram capazes de detectar o processo des-re, mesmo em baixa profundidade nos tecidos.

Supondo que as flutuações no conteúdo mineral e alterações nas características morfológicas do esmalte podem ser mensuradas, respectivamente, pela Espectroscopia Raman e Tomografia de Coerência Óptica, o objetivo do presente estudo foi avaliar, através de um modelo de progressão de cárie, as características das lesões obtidas e a reversão das mesmas.

### **3 OBJETIVOS**

#### **Objetivo Geral**

Analisar as características de lesões artificiais de cárie em esmalte humano, obtidas através de um modelo de progressão, utilizando-se diferentes períodos de armazenamento e a reversão das mesmas, com auxílio dos métodos de Espectroscopia Raman e Tomografia de Coerência Óptica.

#### **Objetivos Específicos**

- Analisar a progressão de lesões artificiais de cárie obtidas através de tratamento desmineralizador, realizado com ciclagem de pH, durante os períodos de 1, 3, 5, 7, 9 e 11 dias;
- Analisar a reversão das lesões obtidas anteriormente, através de tratamento remineralizador, utilizando-se aplicações de flúor gel, pelo período de 7 dias, concomitante a ciclagem de pH.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com seres humanos do Hospital Universitário Lauro Wanderley-UFPB, sob o protocolo de nº 329/10 (Anexo A).

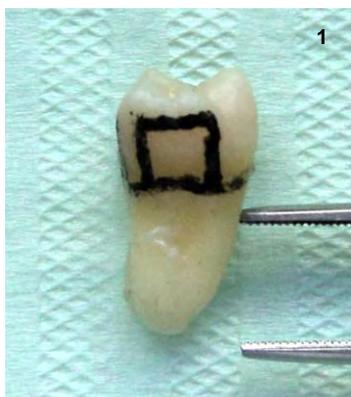
A obtenção de dentes humanos foi feita na forma de doação, após consentimento livre e esclarecido, dos usuários do serviço de Cirurgia I do Departamento de Clínica e Odontologia Social – CCS/UFPB (Apêndice A).

Cinquenta terceiros molares inclusos foram coletados, limpos com a ajuda de instrumentos periodontais e examinados em lupa estereoscópica JENA (Carl Zeiss, Hamburgo, Alemanha), com 10 vezes de aumento; com a finalidade de detectar possíveis trincas ou alterações estruturais que pudessem comprometer o desenvolvimento do experimento, e armazenados em solução fisiológica de cloreto de sódio a 0,9% adicionada de solução de timol a 0,1% (pH 7,0).

Inicialmente foi feita a delimitação da região para corte dos blocos de esmalte com o auxílio de um marcador permanente para retro projetor (Figura 1). Com um disco diamantado flexível dupla face (Discoflex, KG Sorensen), os dentes tiveram suas raízes removidas (Figura 2). As câmaras pulpares foram limpas e as faces mesiais e distais das coroas cortadas, proporcionando cerca de cem blocos com área de 5X5mm (Figura 3), cujas superfícies de esmalte foram regularizadas e polidas com lixas de carbetto de silício com diferentes granulações – 600, 800, 1200 e 2000 (3M, Sumaré, Brasil), a fim de produzir superfícies uniformes e homogêneas.

Um desenho esquemático foi feito e disposto sob uma placa de cera 7 (Newmax, Technew, Rio de Janeiro, Brasil), servindo de guia para o posicionamento dos blocos de esmalte, de modo que os mesmos estivessem localizados à mesma altura do foco de feixe laser do aparelho de Espectroscopia Raman, quando das amostras prontas. Para confecção das mesmas, moldes metálicos, com aplicação de uma camada de isolante para resina acrílica nas faces internas, foram posicionados ao redor dos blocos, cuja superfície do esmalte dentário estava voltada para baixo (Figura 4). Preencheu-se, então, os

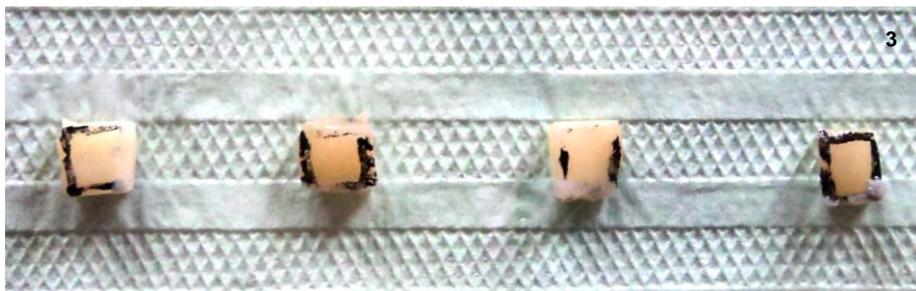
moldes com resina acrílica, aguardou-se o tempo de presa e procedeu-se a remoção das amostras, as quais foram posteriormente numeradas e receberam marcações para identificar a região cervical, a fim de serem dispostas nos aparelhos de análise de forma semelhante à encontrada na cavidade bucal. Um total de 100 espécimes foram produzidos e armazenados em água destilada até as análises iniciais.



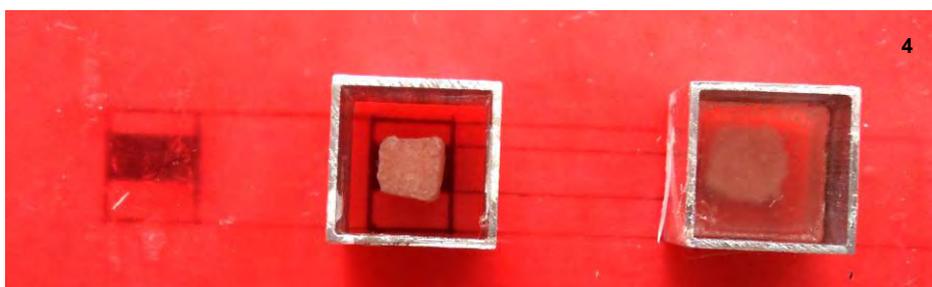
**Figura 1** – Delimitação da região para corte da estrutura dental e obtenção de blocos com área de 5x5mm.



**Figura 2** – Corte da estrutura dental utilizando disco diamantado dupla face.

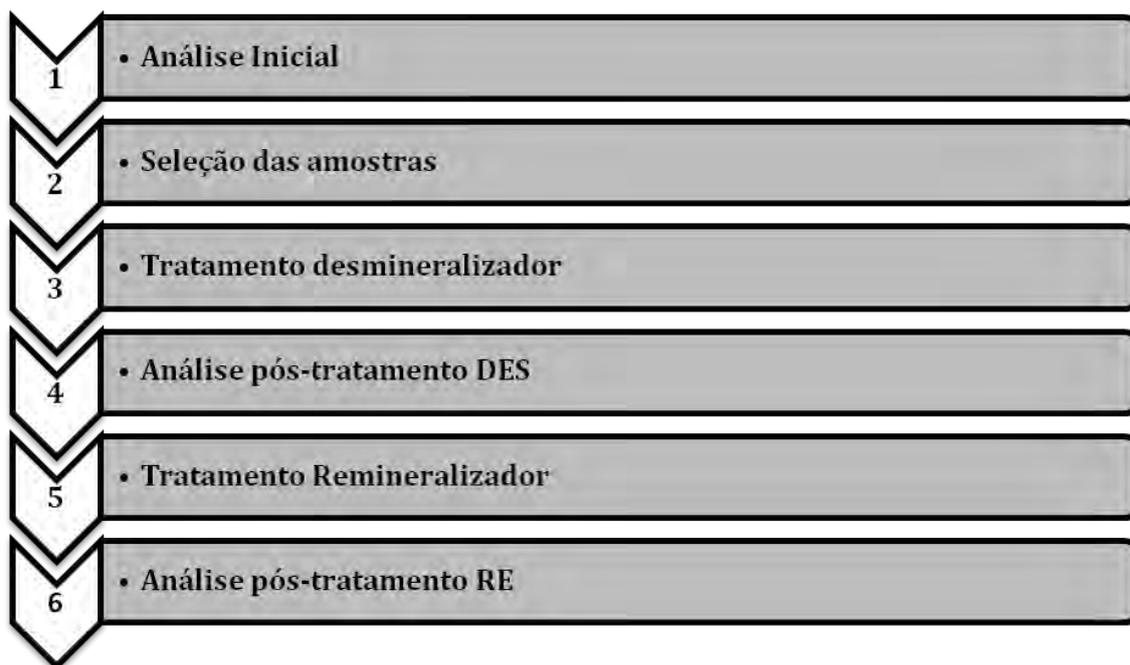


**Figura 3** – Blocos de esmalte com área de 5x5mm obtidos após corte com disco diamantado dupla face.



**Figura 4** – Posicionamento dos blocos de esmalte e dos moldes metálicos para preenchimento com resina acrílica.

Para a realização do experimento as amostras foram submetidas à análise inicial para critérios de inclusão e exclusão, a tratamento desmineralizador, por diferentes períodos, e a tratamento remineralizador por um único período. Após a realização de cada tratamento as mesmas foram submetidas à análise, pelos métodos experimentais, para determinação da quantidade de fosfato de cálcio e caracterização morfológica do esmalte. A Figura 5 apresenta modelo esquemático das etapas de realização do experimento.



**Figura 5** – Modelo esquemático das etapas de realização do experimento.

#### 4.1 Análise Inicial

Como relatado anteriormente, as marcações feitas nas amostras serviram para que as mesmas fossem dispostas nos instrumentos de análise, de forma semelhante a encontrada na boca, padronizando o posicionamento destas em todos os momentos do experimento. Para análise do conteúdo mineral dos dentes, utilizou-se Espectroscopia Raman (ER) e para obtenção de imagens da microestrutura do esmalte a Tomografia de Coerência Ótica (TCO), pertencentes, respectivamente, ao Laboratório de Óptica Não Linear e Optoeletrônica, do Departamento de Física – CCEN/UFPE e ao Núcleo de Pesquisa Clínica em Biomateriais, do Departamento de Prótese e Cirurgia Bucal Facial – CCS/UFPE.

O aparelho de Espectroscopia Raman (modelo R3000 CN Ocean Optics, EUA) trabalha utilizando um laser de diodo de 785nm e energia próxima à do infravermelho, resolução espectral em torno de  $7\text{cm}^{-1}$  e faixa de medida de  $140$  a  $1800\text{cm}^{-1}$ .

No aparelho, cada amostra foi devidamente posicionada para a incidência do feixe de laser, causando uma excitação em nível molecular. A potência

utilizada foi de 200mW, tempo de exposição ao detector de 10s, divididos em 5 frames de 2s cada. A radiação interagiu com a matéria por processos de absorção e de espalhamento. A luz Raman espalhada foi coletada por um espectrômetro, onde sua intensidade foi mostrada em função de sua mudança de frequência (deslocamento Raman). Visto que cada molécula possui seu próprio conjunto vibracional, de acordo com suas frequências próprias, analisaram-se as bandas do fosfato de cálcio através de seu comprimento de onda específico ( $956\text{cm}^{-1}$ ).

A partir daí procedeu-se à medição da altura do pico do fosfato de cálcio, obtendo-se uma leitura referente à quantidade do mesmo em cada bloco de esmalte. Com finalidade de padronização, as amostras foram agrupadas de acordo com a semelhança dos valores de fosfato de cálcio.

Para a análise por Tomografia de Coerência Óptica foi utilizado um aparelho 2D que operou com um Diodo Super Luminescente (Spectral Radar SR-OCT: OCP930SR/Thorlabs, New Jersey, EUA) de comprimento de onda central ( $\lambda_0$ ) de 930nm, largura de banda ( $\Delta\lambda$ ) de 49,9nm, potência de saída de 25mW e resolução axial de 6,2  $\mu\text{m}$ .

A amostra foi posicionada no aparelho e o feixe de luz incidiu sobre a mesma, de modo que a luz proveniente da fonte passava através de um divisor de feixes e emitia dois feixes coerentes de luz (ondas altas e baixas ocorrendo ao mesmo tempo). Um feixe foi chamado de feixe da amostra e o outro, feixe de referência. O feixe da amostra penetrou no dente e espalhou-se de acordo com a natureza do tecido (sabe-se que tecido cariado espalha luz em maior extensão do que tecido sadio). Alguns feixes da amostra se espalharam e depois retornaram na direção da qual foram emitidos (retroespalhamento), rumo ao divisor de feixes. O feixe de referência viajou até um espelho móvel, e foi totalmente refletido, voltando em direção ao mesmo divisor de feixes. Os feixes foram recombinaados e focalizados para um fotodetector, onde qualquer grau de interferência entre eles pode ser observado – por exemplo, esmalte/dentina, região sadia/cariada – devido aos índices de refração diferentes de cada uma dessas estruturas.

Foram realizadas varreduras transversais de 6mm, as quais eram compostas por 2000 colunas e 512 linhas, sendo as imagens capturadas com intervalo de 500 $\mu$ m, produzindo uma sequência de A-scans. A-scans são a variação na medida de espalhamento em relação à profundidade de um único ponto na superfície do dente. Quando obtidos ao longo de uma linha, geram o B-scan, uma coleção de informações de uma “fatia” da amostra, responsável pela formação do tomograma. Todo o processo foi controlado pelo programa “Hilbert”, desenvolvido no Laboratório de Optoeletrônica e Fotônica do Departamento de Física da Universidade Federal de Pernambuco, na linguagem de programação LabView (National Instruments Brasil Ltda, São Paulo, Brasil). As imagens obtidas foram registradas, salvas, e posteriormente analisadas pelo programa Image J (National Institute of Mental Health, Java, EUA). Para cada amostra foram obtidas cerca de 14 imagens (scans), com varreduras da região cervical para a oclusal, a fim de observar diferenças nas lesões de acordo com a região analisada.

#### 4.2 Seleção das Amostras

A análise Raman revelou diferenças marcantes na quantidade de fosfato de cálcio presente nas amostras. Além disso, imagens geradas pela Tomografia de Coerência Óptica apontaram que alguns blocos de esmalte apresentavam exposição dentinária ou estavam na iminência de expor a dentina subjacente. Nesta última situação, as amostras foram excluídas do estudo. Com relação aos valores de fosfato, para melhor desenvolvimento do experimento optou-se por agrupar as amostras, por similaridade de valores, de modo que dentro de cada grupo experimental houvesse a menor variação possível. Desta forma, 30 amostras foram selecionadas para utilização no estudo.

#### 4.3 Tratamento Desmineralizador

As amostras foram divididas em seis grupos experimentais, com cinco espécimes cada ( $n=5$ ) e submetidas a períodos crescentes de tratamento, a fim de observar se as lesões formadas apresentariam características diferentes, de acordo com o tempo (Tabela 1). Para o desenvolvimento do tratamento

desmineralizador, utilizou-se ciclagem de pH, conforme soluções constantes da Tabela 2.

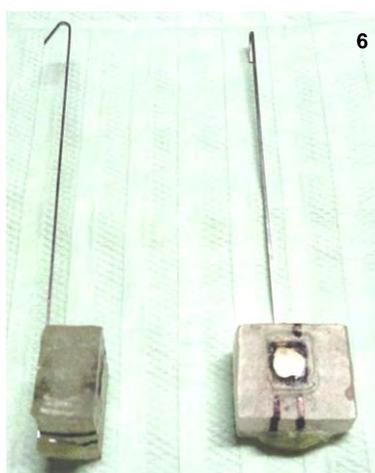
**Tabela 1 – Grupos experimentais**

Grupos	Período de tratamento
G1	1 dia
G2	3 dias
G3	5 dias
G4	7 dias
G5	9 dias
G6	11 dias

O tratamento desmineralizador foi realizado através da imersão das amostras durante 6 horas em 40 ml de solução desmineralizante e 18 horas em 20 ml de solução remineralizante, durante cada dia (Featherstone et al., 1983). Para tanto, os espécimes foram presos com fio ortodôntico, de modo a ficarem suspensos individualmente dentro de tubos Falcon (Figuras 5, 6 e 7)

**Tabela 2 – Composição dos materiais e soluções utilizados.**

<b>Materiais/Soluções</b>	<b>Composição</b>
<i>Solução desmineralizante</i> (Featherstone et al., 1983)	2,0mM de cálcio; 2,0mM de fosfato; em 75mM de ácido acético (pH 4,3)
<i>Solução remineralizante</i> (Featherstone et al., 1983)	1,5 mM de cálcio; 0,9mM de fosfato; 150Mm de KCL; em 20 mM de Cacodilato ou tampão TRIS (pH 7,4)
<i>Saliva artificial</i> (Redher Neto, 2009)	2g de Metil-p-hidroxibenzoato; 10g de carboximetilcelulose de sódio; 0,625 g de KCl; 0,059g de MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O; 0,166g de CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O; 0,804g de K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 0,326g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 6,75).
<i>Flúor gel neutro a 2%</i> (DFL, Rio de Janeiro, RJ, Brasil)	Fluoreto de sódio, sacarina sódica, cellosize qp 100, propilenogicol, glicerina, essência de menta, água deionizada.

**Figura 6 – Amostras presas com fio ortodôntico.**



**Figura 7** – Grade com tubos Falcon.



**Figura 8** – Imersão da amostra em solução desmineralizante ou remineralizante.

#### 4.4 Análise Pós- tratamento desmineralizador

Utilizando-se os métodos ER e TCO, nos padrões descritos anteriormente, determinou-se a perda mineral das amostras após desmineralização.

#### 4.5 Tratamento Remineralizador

Para desenvolvimento do tratamento remineralizador as amostras foram submetidas a 4 aplicações de fluoreto de sódio neutro a 2% (Tabela 2), por 1minuto, em dias alternados. Após a aplicação do flúor os espécimes foram lavados com água deionizada e imersos em 10ml de saliva artificial durante 30

minutos, a fim de simular a abstenção de ingestão de água ou alimentos, recomendada quando da realização do procedimento clínico.

As amostras foram então imersas em 40ml de solução desmineralizante, por 3h e, em seguida, em 20ml de solução remineralizante, por 21h, dando continuidade ao ciclo nesta ordem.

#### 4.6 Análise Pós- tratamento remineralizador

Para verificação da reversão das lesões cariosas criadas foi realizado, após o tratamento remineralizador, novas análises com os métodos ER e TCO.

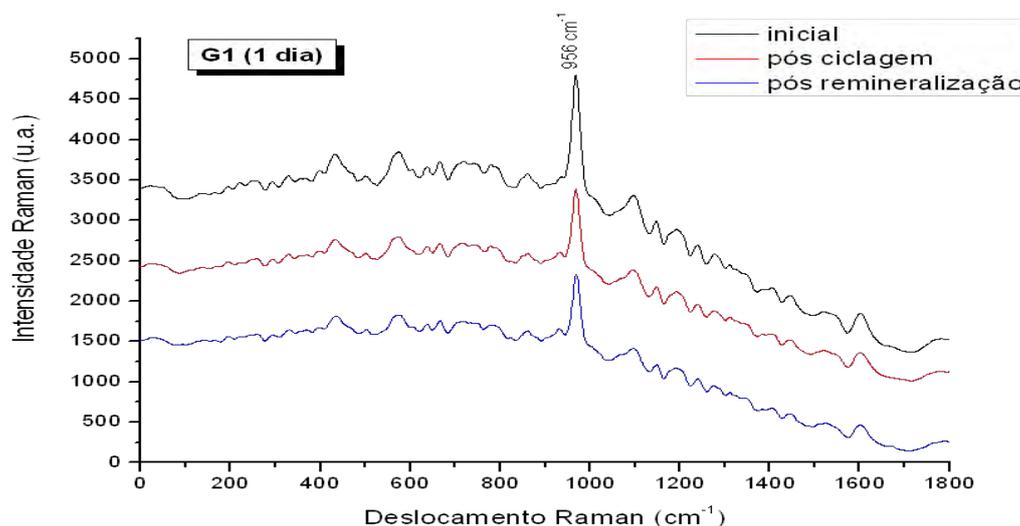
#### 4.7 Análise Estatística

Os dados referentes aos picos do fosfato de cálcio inicial, pós-desmineralização e pós-remineralização, assim como os valores das razões pós-desmineralização/inicial e pós-desmineralização/pós-remineralização foram obtidos e registrados na forma de banco de dados do programa de análise estatística SPSS (*Statistical Package for Social Sciences*) para *Windows*®, versão 15.0 (IBM, New York - EUA), e analisados por meio de estatística descritiva e inferencial. Para os procedimentos descritivos, serão apresentadas medidas de tendência central (média) e de variabilidade (desvio-padrão). Os procedimentos de inferência estatística, por sua vez, foram realizados com base em estatística paramétrica, por meio dos testes t de Student para medidas repetidas (comparação intragrupos) e Análise de Variância (ANOVA) para amostras independentes (comparação intergrupos), associada ao teste pos roc de Tukey, o qual permitiu identificar diferenças entre os dados. A escolha por esses testes foi pautada na observância da distribuição normal dos dados, pelo teste de normalidade de Komogorov-Smirnov ( $p>0,05$ ) e que, para a interpretação das informações, foi adotado um intervalo de confiança de 95%, e nível de significância de 5% ( $\alpha=0,05$ ).

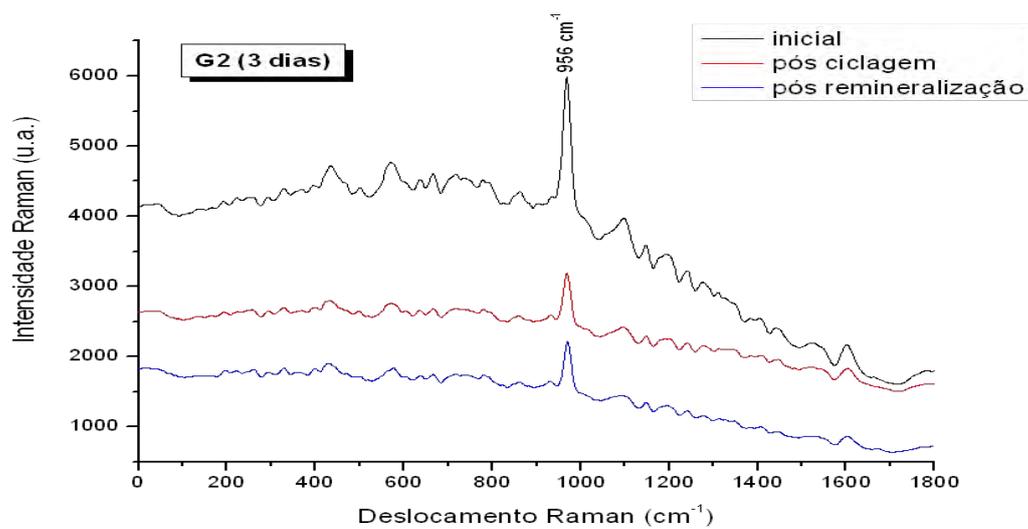
## 5 RESULTADOS

Os resultados de Espectroscopia Raman estão dispostos a seguir nas Figuras de 7 a 12 e nas Tabelas 3 e 4.

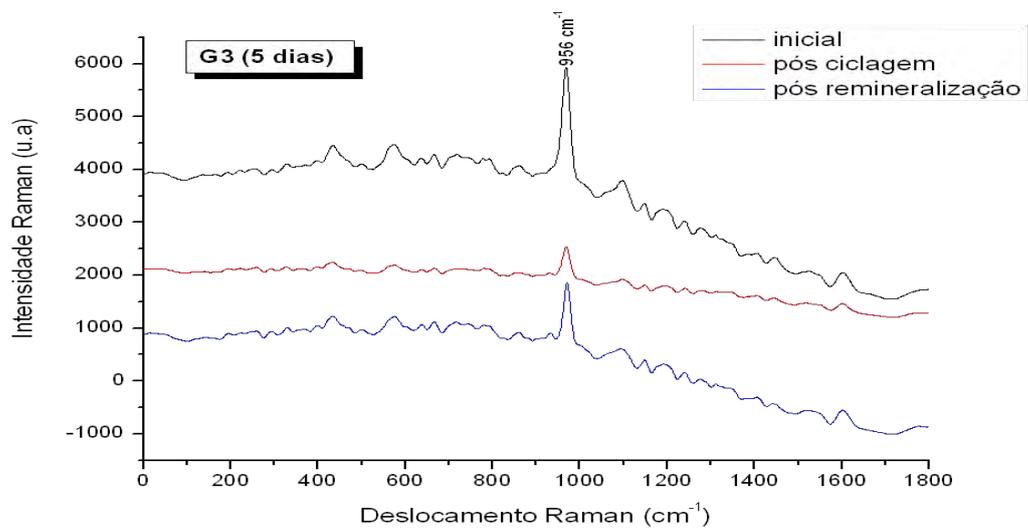
Estudo anterior identificou e nomeou várias bandas do grupo fosfato:  $\nu_1$  ( $953,5-967\text{cm}^{-1}$ ),  $\nu_2$  ( $430-450\text{cm}^{-1}$ ),  $\nu_4$  ( $585-612\text{cm}^{-1}$ ), e  $\nu_3$  ( $1.070\text{cm}^{-1}$ ). No presente estudo identificamos a banda  $\nu_1$ , correspondente ao fosfato de cálcio, a qual se apresentou de maneira mais marcante (STEINER-OLIVEIRA et al., 2006).



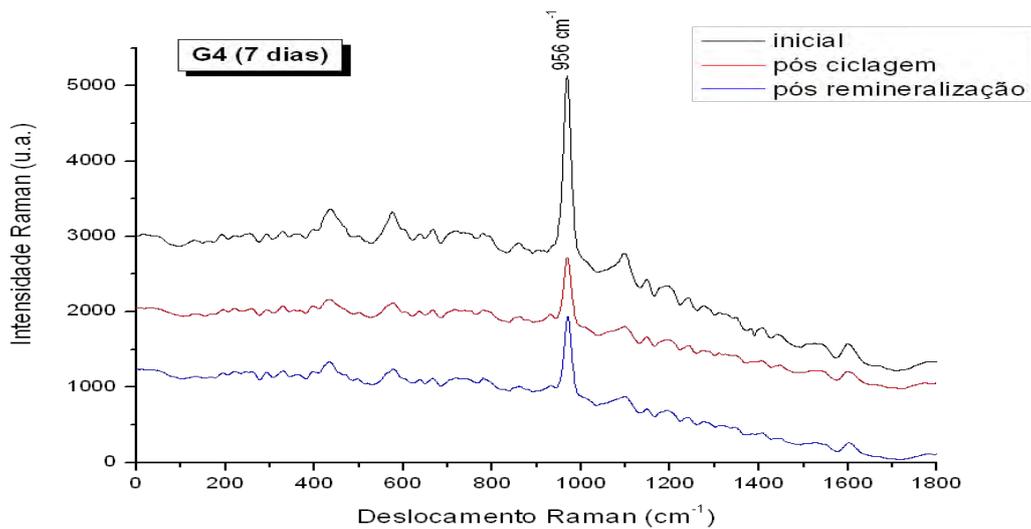
**Figura 9** – Espectros Raman representativo dos picos de fosfato de cálcio inicial, pós-desmineralização e pós-remineralização para G1.



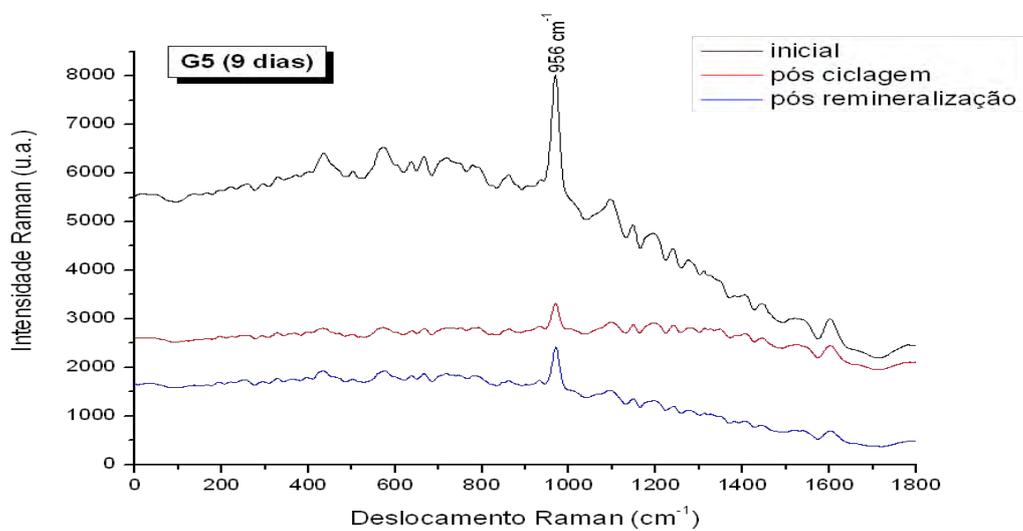
**Figura 10** – Espectros Raman representativos dos picos do fosfato de cálcio inicial, pós-desmineralização e pós-remineralização para G2.



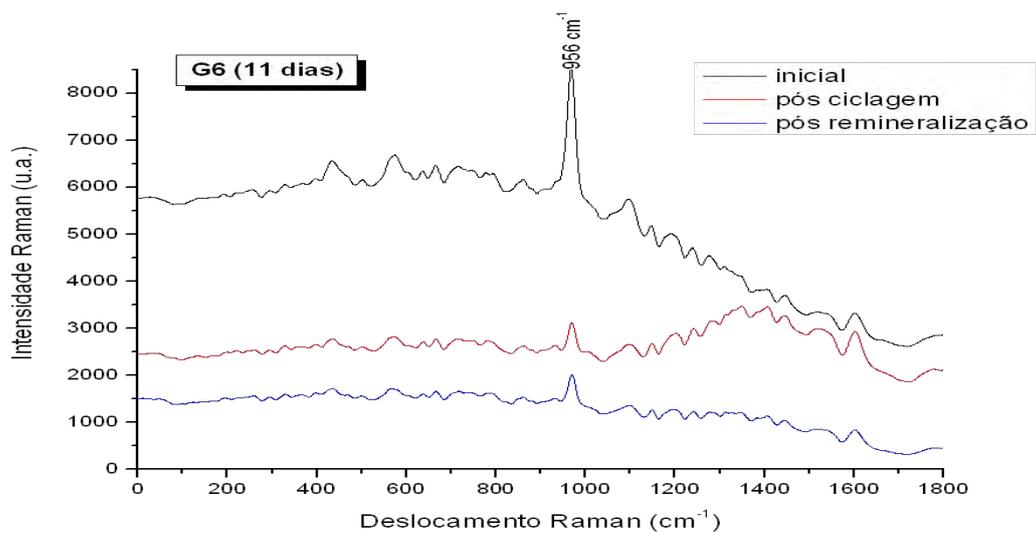
**Figura 11** – Espectros Raman representativos dos picos do fosfato de cálcio inicial, pós-desmineralização e pós-remineralização para G3.



**Figura 12** – Espectros Raman representativos dos picos do fosfato de cálcio inicial, pós-desmineralização e pós-remineralização para G4.



**Figura 13** – Espectros Raman representativos dos picos do fosfato de cálcio inicial, pós-desmineralização e pós-remineralização para G5.



**Figura 14** – Espectros Raman representativos dos picos do fosfato de cálcio inicial, pós-desmineralização e pós-remineralização para G6.

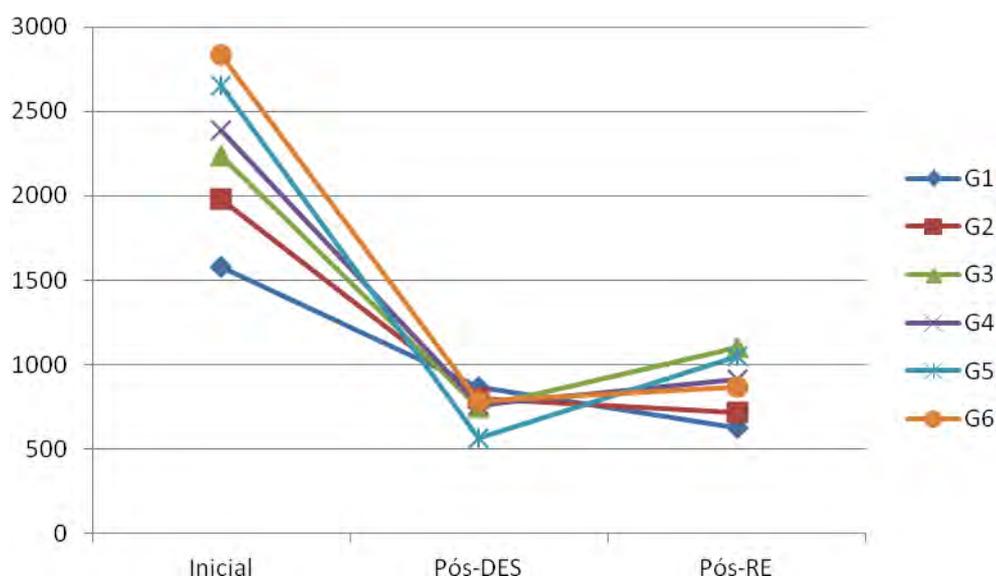
**Tabela 3** - Valores médios ( $\pm$  dp) dos picos do fosfato de cálcio ( $\text{cm}^{-1}$ ).

Grupos	Pós tratamento		Pós tratamento
	Inicial	DES	RE
	M $\pm$ dp	M $\pm$ dp	M $\pm$ dp
<b>G1</b>	1581,60 $\pm$ 155,19 <sup>D, a</sup>	865,80 $\pm$ 201,22 <sup>A, b</sup>	624,4 $\pm$ 195,50 <sup>C, c</sup>
<b>G2</b>	1977,20 $\pm$ 119,14 <sup>C, a</sup>	795,80 $\pm$ 176,27 <sup>A, b</sup>	717,00 $\pm$ 78,77 <sup>AB, b</sup>
<b>G3</b>	2239,20 $\pm$ 72,72 <sup>B, a</sup>	749,80 $\pm$ 199,18 <sup>A, b</sup>	1103,40 $\pm$ 352,04 <sup>AB, b</sup>
<b>G4</b>	2391,40 $\pm$ 51,25 <sup>B, a</sup>	760,60 $\pm$ 142,07 <sup>A, b</sup>	913,80 $\pm$ 143,71 <sup>AB, c</sup>
<b>G5</b>	2650,80 $\pm$ 97,04 <sup>A, a</sup>	566,20 $\pm$ 63,78 <sup>A, b</sup>	1051,00 $\pm$ 359,74 <sup>A, c</sup>
<b>G6</b>	2836,80 $\pm$ 27,60 <sup>A, a</sup>	784,80 $\pm$ 76,78 <sup>A, b</sup>	870,60 $\pm$ 132,26 <sup>AB, b</sup>

Letras maiúsculas iguais não diferem estatisticamente para comparação na vertical (teste T de Student).

Letras minúsculas iguais não diferem estatisticamente para comparação na horizontal (ANOVA e teste de Tukey, ( $p > 0,05$ )).

A partir da análise da Tabela 3 observam-se diferenças significativas entre os valores dos picos de fosfato de cálcio entre os grupos antes e após realização da ciclagem. Para os valores iniciais houve diferença significativa entre eles, com exceção dos pares G3 e G4, que se apresentaram semelhantes entre si, assim como os pares G5 e G6. Nenhuma diferença, porém, foi detectada após a desmineralização, sugerindo que as amostras passaram a apresentar a mesma quantidade de fosfato de cálcio após o tratamento. Com relação ao tratamento remineralizador, verifica-se diferenças significativas do ponto de vista estatístico apenas entre G5 e G1, enquanto os demais grupos apresentaram-se semelhantes entre si. Estas informações também podem ser visualizadas na Figura 13.



**Figura 15** – Valores médios dos picos de fosfato de cálcio inicial, pós-tratamento desmineralizador e pós-tratamento remineralizador nos seis grupos experimentais.

A análise dos resultados na forma como foram apresentadas até o momento não demonstraram de forma clara a quantidade de perda e ganho de fosfato de cálcio, entre os grupos experimentais, considerando-se os dias de tratamento. Isto decorre do fato de que alguns deles apresentam diferença

estatística para os valores iniciais de fosfato. Assim, para um melhor entendimento, achou-se por bem realizar uma nova análise, onde se considerou a razão (divisão) entre eles. A primeira razão foi realizada entre os valores pós-tratamento desmineralizador e os iniciais (representando se houve redução do fosfato de cálcio após o tratamento desmineralizador), e a segunda entre os valores pós-tratamento remineralizador e pós-tratamento desmineralizador (representando se houve ganho mineral após o tratamento remineralizador). Valores maiores do que um (1) representam ganho e valores menores do que um (1), representam perda. A Tabela 4 apresenta estes resultados e a análise estatística da comparação intergrupos (análise de variância (ANOVA) para amostras independentes e teste pos roc de Tukey).

**Tabela 4 – Razões entre os picos de fosfato de cálcio ( $\text{cm}^{-1}$ ).**

Grupos	Pós- tratamento	Pós-tratamento
	des/inicial	re/pós-tratamento des
	M $\pm$ dp	M $\pm$ dp
<b>G1</b>	0,55 $\pm$ 0,15 <sup>A</sup>	0,71 $\pm$ 0,11 <sup>C</sup>
<b>G2</b>	0,39 $\pm$ 0,07 <sup>B</sup>	0,91 $\pm$ 0,11 <sup>BC</sup>
<b>G3</b>	0,35 $\pm$ 0,08 <sup>B</sup>	1,58 $\pm$ 0,72 <sup>AB</sup>
<b>G4</b>	0,31 $\pm$ 0,06 <sup>B</sup>	1,21 $\pm$ 0,14 <sup>ABC</sup>
<b>G5</b>	0,20 $\pm$ 0,02 <sup>B</sup>	1,80 $\pm$ 0,46 <sup>A</sup>
<b>G6</b>	0,27 $\pm$ 0,02 <sup>B</sup>	1,11 $\pm$ 0,17 <sup>ABC</sup>

Comparação realizada em colunas: letras iguais significam resultados com diferença estatística ( $p > 0,05$ ) (ANOVA e teste de Tukey).

Quando da análise da razão de perda após o tratamento desmineralizador foi constatada diferença estatística significativa entre os grupos ( $F=10,290$ ;  $p < 0,001$ ). O teste post hoc de Tukey identificou que foi observada diferença estatística entre o grupo G1 (que apresentou menor redução, ou seja, foi o grupo que menos perdeu fosfato de cálcio) e os demais grupos (que perderam mais fosfato), mas estes não apresentaram diferença estatística entre si.

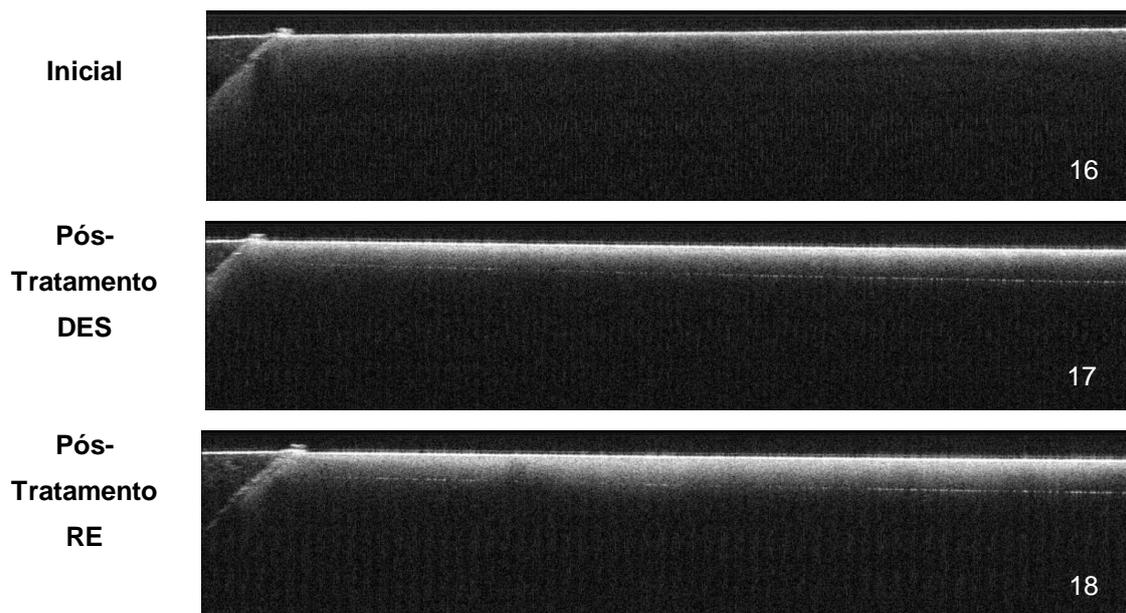
Em relação à razão de ganho de fosfato após o tratamento remineralizador também foi verificada diferença significativa entre os grupos ( $F=6,128$ ;  $p=0,001$ ).

O maior ganho foi observado no grupo G5, que diferiu significativamente de G1 e G2. O grupo G3 foi o segundo grupo que apresentou maior ganho de fosfato e embora não tenha diferido de G5, apresentou-se significativamente diferente de G1.

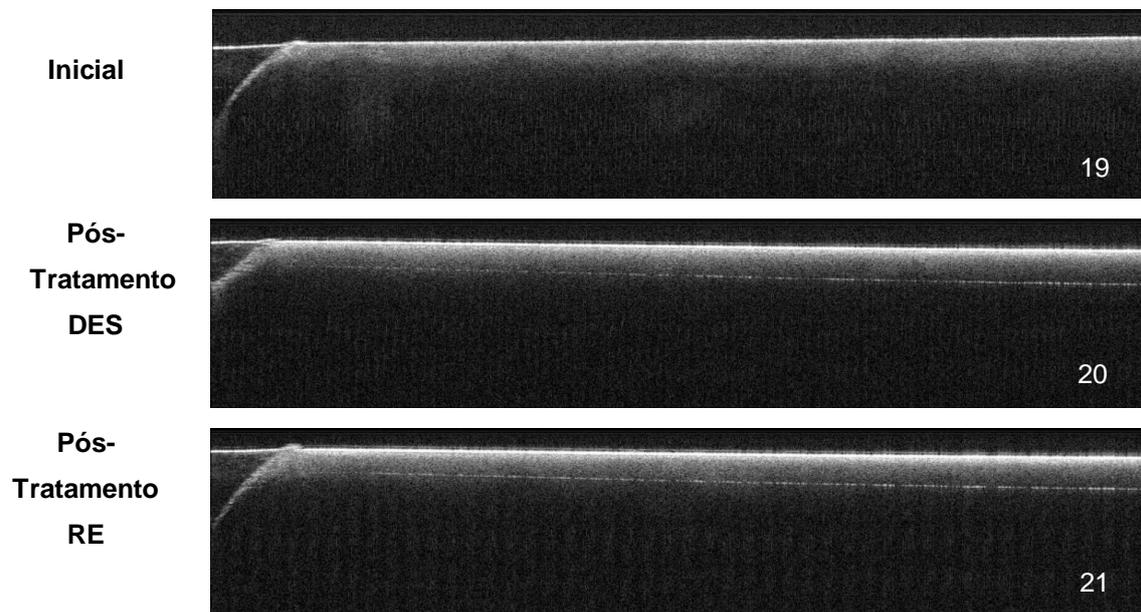
Os resultados das análises por Tomografia de Coerência Óptica estão dispostos a seguir nas figuras 16 a 51, mostrando imagens da porção cervical e oclusal. Áreas desmineralizadas foram visualizadas como imagens esbranquiçadas devido ao espalhamento da luz ser maior que no tecido sadio. Deste modo, observou-se que após um dia (G1- figuras 16, 17, 19 e 20) e três dias (G2 – figuras 22, 23, 25 e 26) de tratamento desmineralizador a superfície de ambas pareceu inalterada enquanto discretas alterações foram observadas na subsuperfície do esmalte, tanto na porção cervical, quanto na oclusal, quando comparada com as imagens iniciais. Esse espalhamento aumentou gradativamente de acordo com os tempos crescentes de tratamento desmineralizador, chegando a apresentar, a partir de 5 dias (G3 - figuras 28, 29, 31 e 32) e 7 dias (G4-figuras 34, 35, 37 e 38) irregularidades na superfície, que denotaram erosão inicial do esmalte, a qual progrediu em G5 (figuras 40, 41, 43 e 44) resultando em exposição da dentina subjacente em G6 (figuras 46, 47, 49 e 50).

Diminuição do espalhamento da luz, resultado do tratamento remineralizador do esmalte foi notada apenas em G5 (9 dias-figuras 42 e 45), enquanto nos demais grupos houve aumento desse espalhamento em relação ao tratamento desmineralizador.

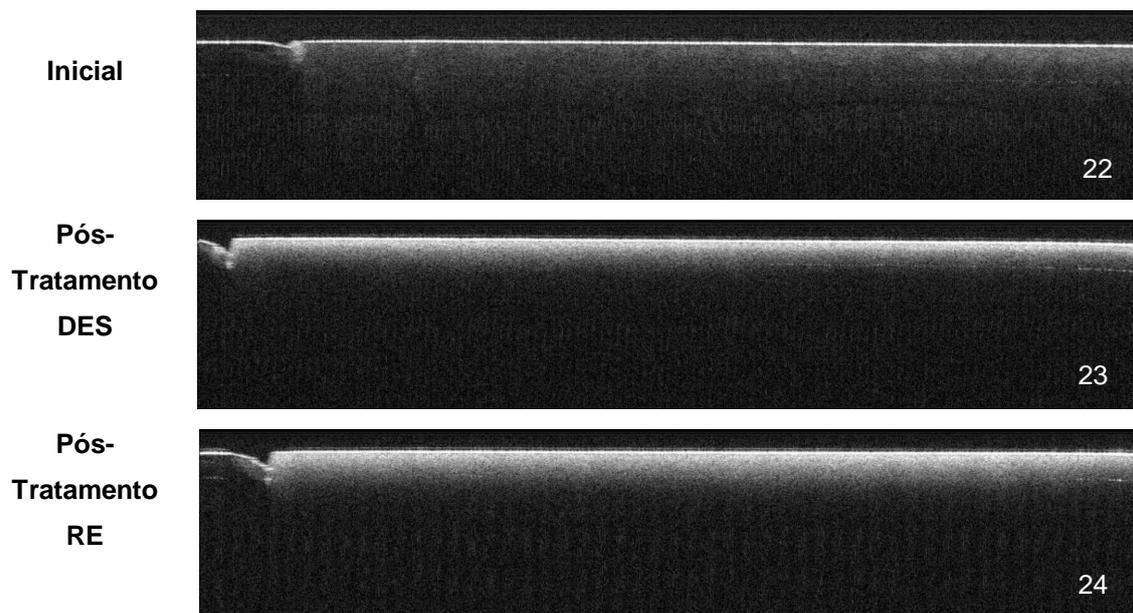
Além disso, a partir de 5 dias (G3), a região cervical (figuras 40, 41 e 42) mostrou maior espalhamento quando comparada à região oclusal (figuras 43, 44 e 45).



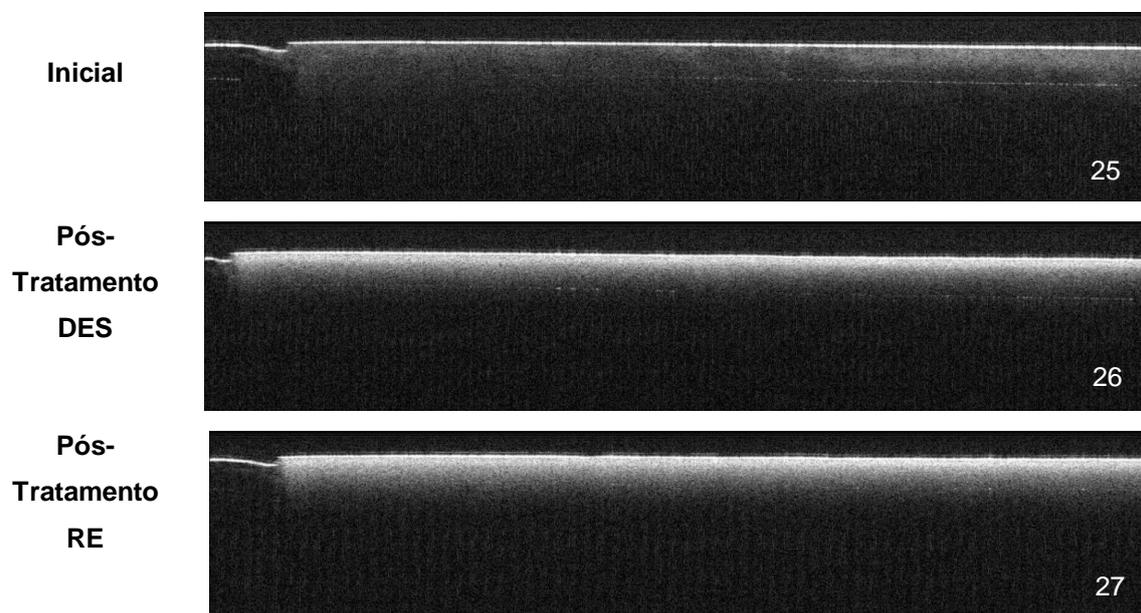
**Figuras 16, 17 e 18**, referentes à região cervical de G1.



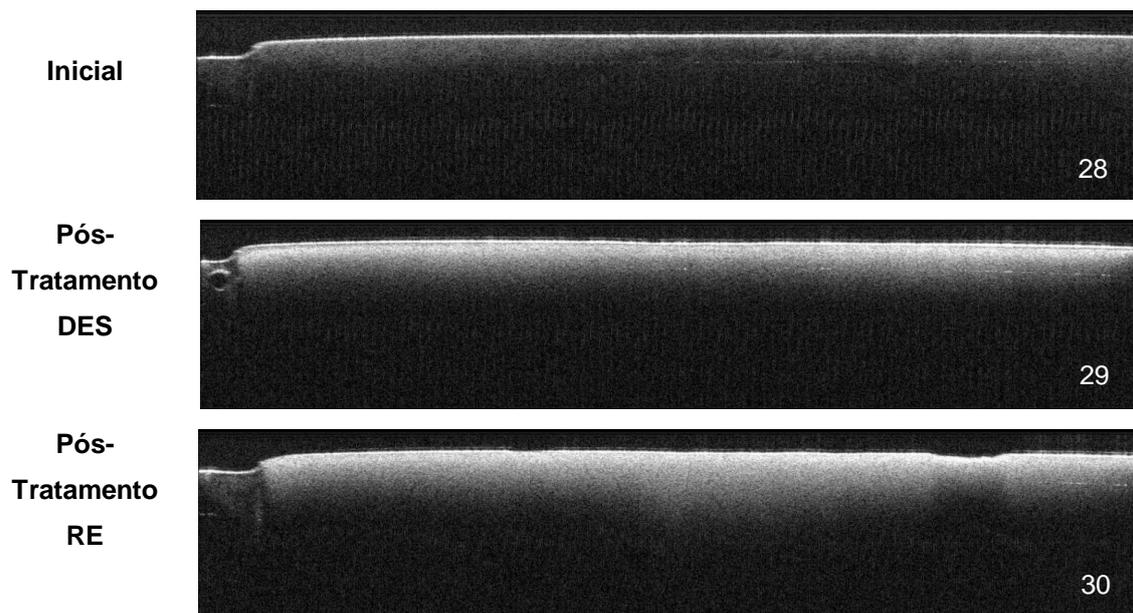
**Figuras 19, 20 e 21** , referentes à região oclusal de G1



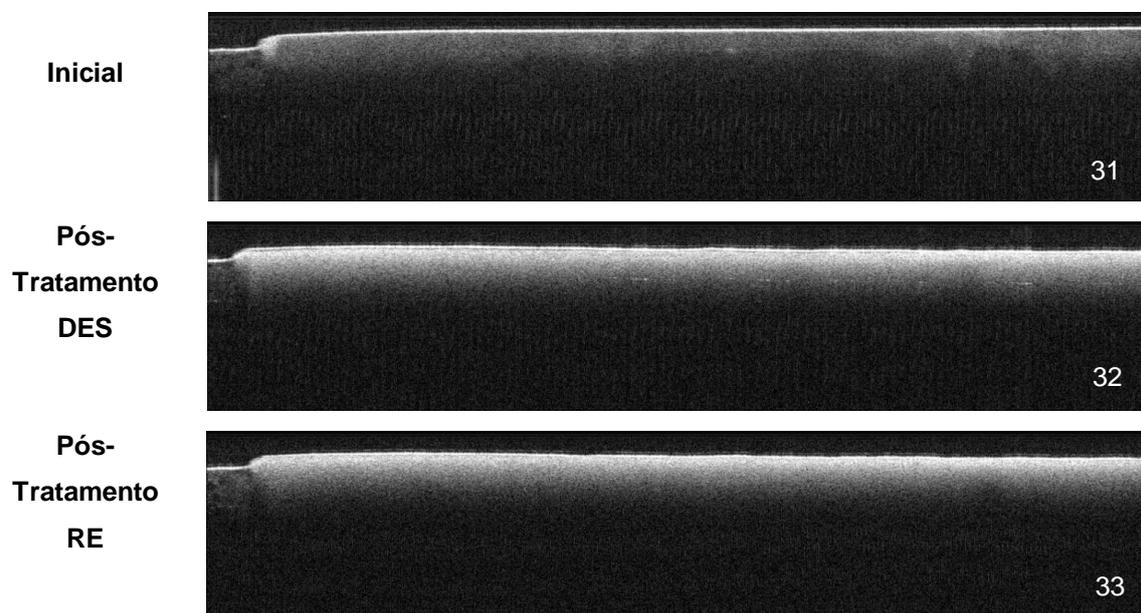
Figuras 22, 23 e 24 referentes à região cervical de G2.



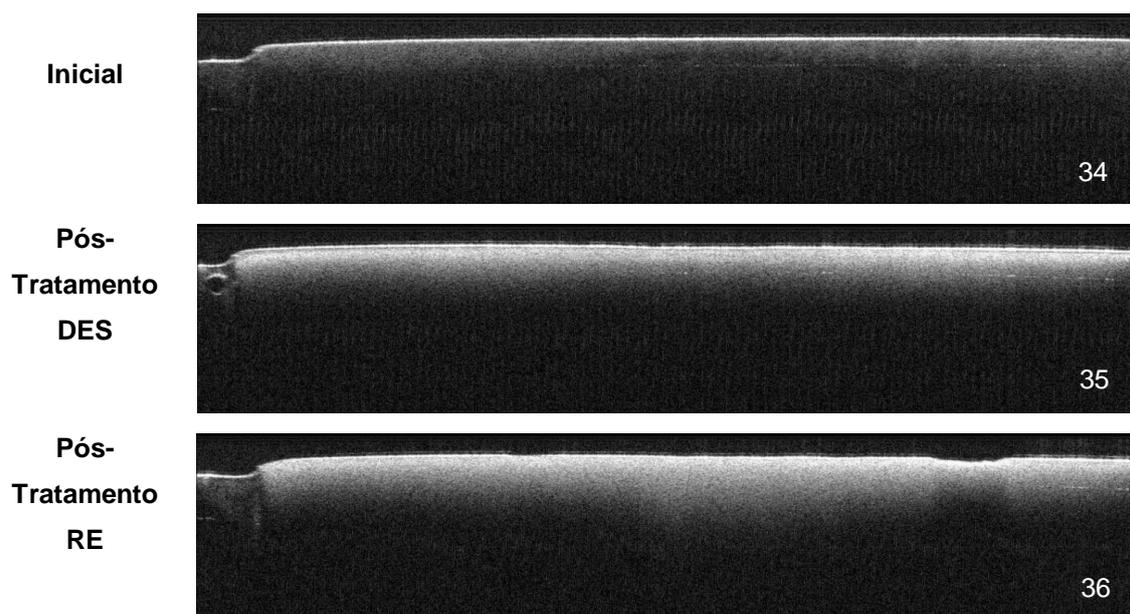
Figuras 25, 26 e 27, referentes à região oclusal de G2.



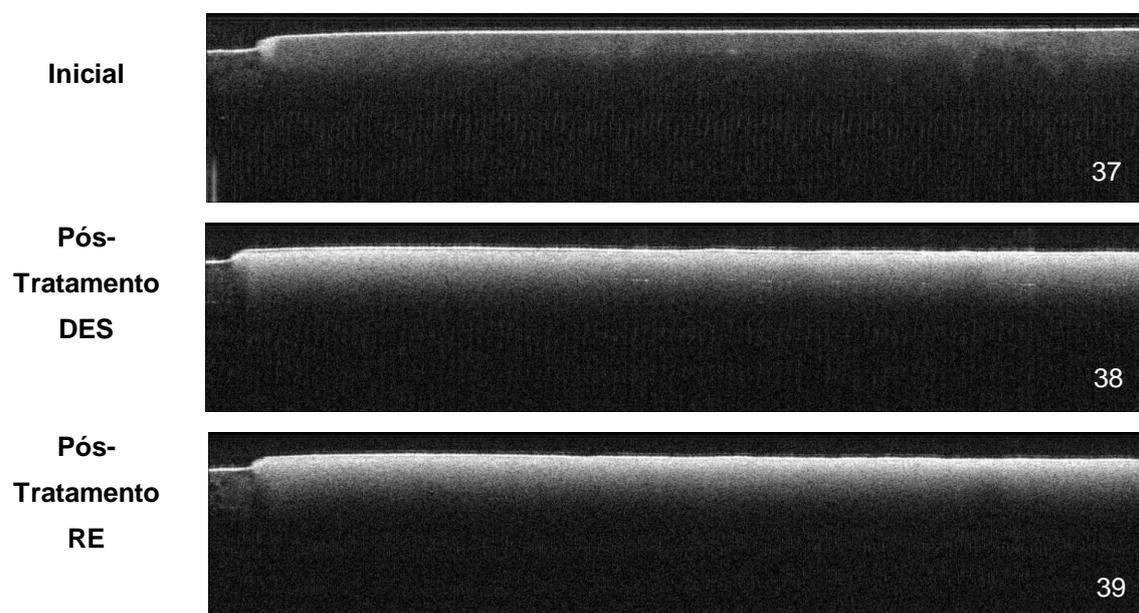
**Figuras 28, 29 e 30**, referentes à região cervical de G3.



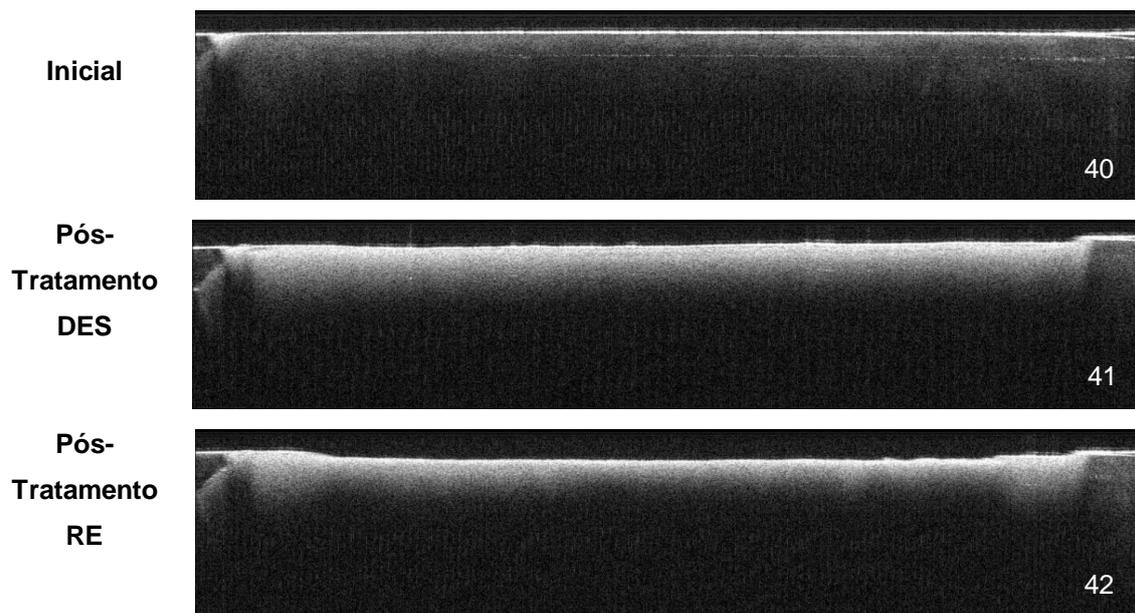
**Figuras 31, 32 e 33**, referentes à região oclusal de G3.



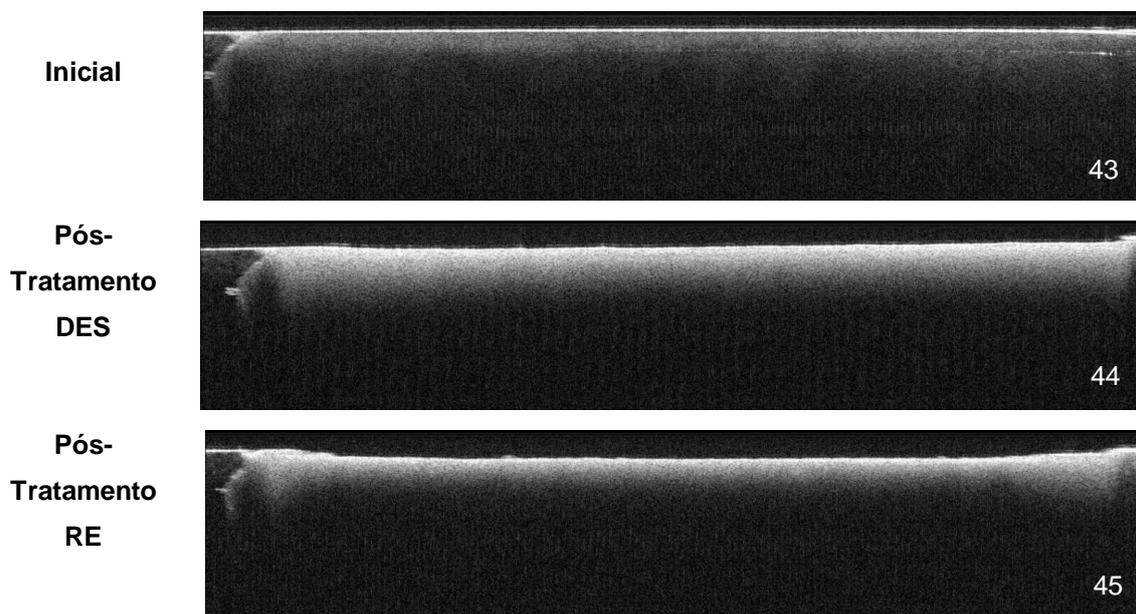
**Figuras 34, 35 e 36**, referentes à região cervical de G4.



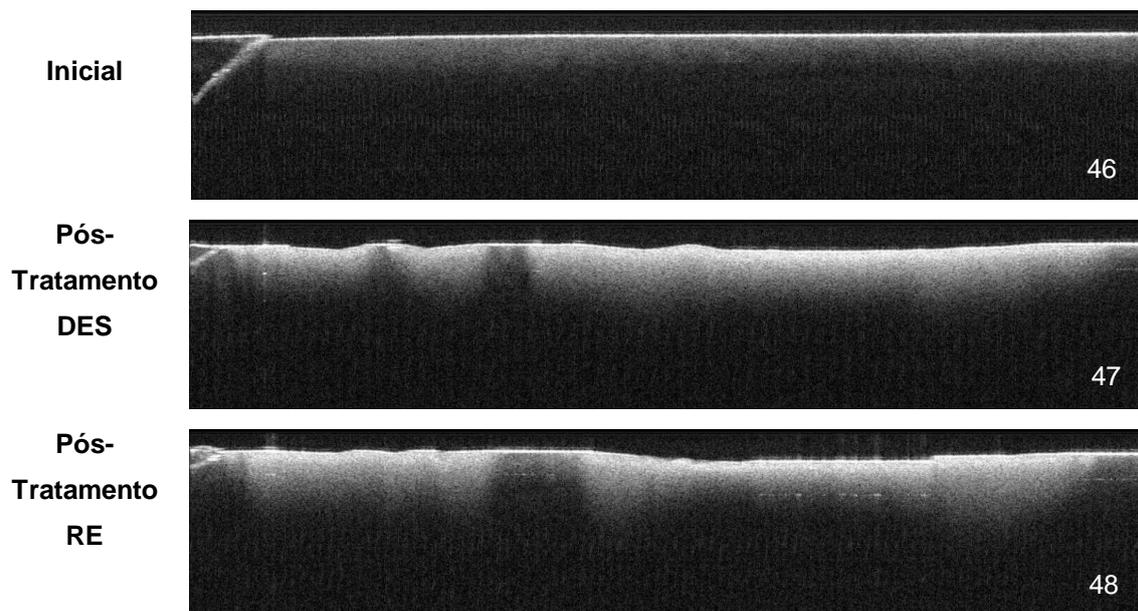
**Figuras 37, 38 e 39**, referentes à região oclusal de G4.



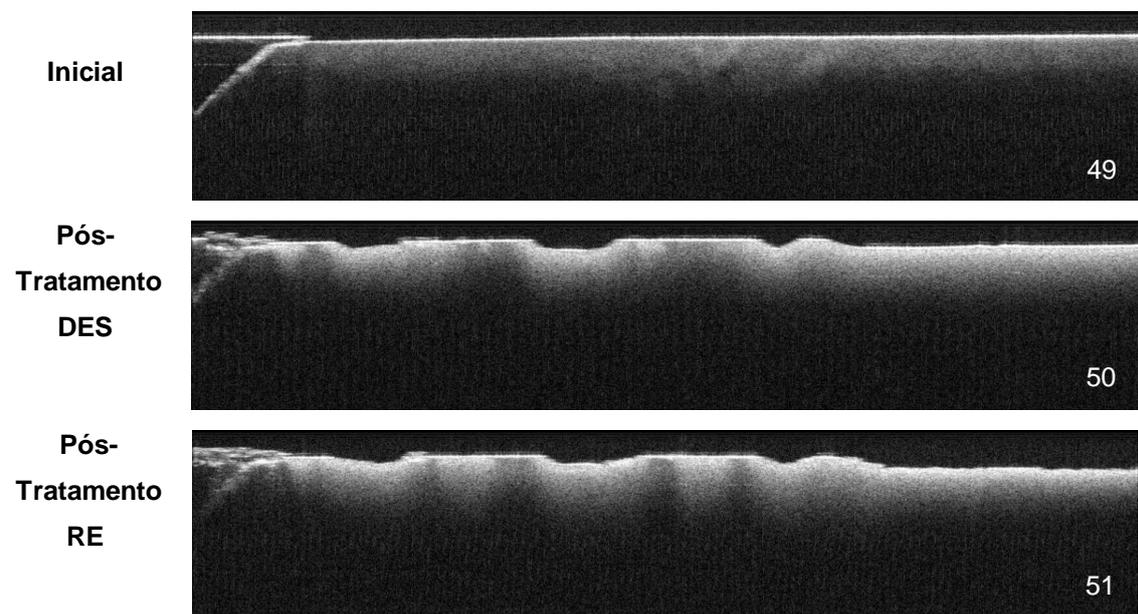
**Figuras 40, 41 e 42**, referentes à região cervical de G5.



**Figuras 43, 44 e 45**, referentes à região oclusal de G5.



**Figuras 46, 47 e 48**, referentes à região cervical de G6.



**Figuras 49, 50 e 51**, referentes à região oclusal de G6

## 6 DISCUSSÃO

O impacto do protocolo utilizado no desenvolvimento de lesões artificiais de cárie se dá tanto nas características das lesões obtidas, como também incide nas respostas destas a um posterior tratamento remineralizador (BUZALAF et al., 2010).

Estudos *in vitro*, sobre os efeitos preventivos de produtos remineralizantes comumente são realizados com lesões superficiais (LYNCH, MONY e ten CATE, 2007). Entretanto ten Cate et al. (2008) mostraram que lesões mais profundas proporcionam melhor discriminação entre tratamentos, sendo mais adequadas para comparar a eficiência de sistemas remineralizantes. Assim, optou-se neste estudo pelo desenvolvimento de lesões com diferentes características, obtidas através de tempos crescentes de ciclagem de pH.

Devido à dificuldade de avaliar essas mudanças nas camadas mais profundas e diante da limitação de medições indiretas, baseadas na textura e aparência da superfície ou mesmo da necessidade de destruição de amostras, procurou-se a utilização de métodos não-destrutivos capazes de detectar os processos de desmineralização e remineralização (JONES e FRIED, 2009).

Espectroscopia Raman e Tomografia de Coerência Óptica foram apontadas como alternativas eficientes, à medida que podem fornecer, respectivamente, informações bioquímicas e morfológicas específicas para a detecção e caracterização de lesões de cárie incipientes em dentes humanos extraídos (STEINER-OLIVEIRA et al., 2006; CHONG, DARLING e FRIED 2007; KO et al., 2010). A abordagem de combinação dos métodos visou observar junto à especificidade da bioquímica (ER), informações sobre as características estruturais do esmalte (TCO), melhorando a análise do desenvolvimento das lesões.

Com relação à Espectroscopia Raman foi possível observar, comparando-se resultados de esmalte sadio (análise inicial) e após tratamento desmineralizador, mudanças de parâmetros espectrais relativos à banda do fosfato de cálcio, denotando estados de desmineralização da estrutura. Assim

como descrito por Ko et al. (2008) que também verificaram diminuição na intensidade do pico do fosfato após tal tratamento.

Analisando a tabela 3 podemos observar que independente da quantidade de fosfato inicial (e a variabilidade entre os grupos apresentou-se de forma marcante), todos apresentaram a mesma quantidade de fosfato de cálcio após o tratamento desmineralizador. Na tabela 4 observamos que essa perda ocorreu de forma semelhante, do ponto de vista estatístico, para todos os grupos, com exceção de G1. No entanto, embora a perda do conteúdo mineral tenha sido parecida entre os grupos, imagens de TCO mostraram diferentes graus de espalhamento de luz entre os mesmos, levando a crer que as características de profundidade das lesões foram diferentes de acordo com o tempo de ciclagem.

Estes resultados concordam com Margolis et al. (1999), os quais apontaram que o protocolo escolhido desempenha papel importante nas características da lesão formada. O regime de desmineralização utilizado no presente estudo resultou em lesões artificiais de cárie com superfície de aparência intacta (G1 e G2), presença de pequenas irregularidades em G3 e G4, e presença de erosão na superfície de G5 e G6. Fato que se deve, provavelmente, ao aumento da dissolução dos cristais do esmalte, à medida que o processo de desmineralização progrediu, devido ao aumento do período de armazenamento nas soluções.

Na subsuperfície a desmineralização progrediu, havendo a formação de uma lesão secundária. ten Cate, Exterkate e Buijs (2006) atribuíram o desenvolvimento desta segunda lesão, que se desenvolveu além da superfície, à não neutralização dos ácidos, que difundiram-se através dos poros formados pelo desenvolvimento das lesões. Isto pôde ser visualizado através do maior espalhamento da luz, abaixo da superfície, caracterizado pelo aspecto esbranquiçado. Este espalhamento aumentou devido à contínua dissolução dos cristais, aumentando os espaços intercristalinos, os quais, preenchidos por ar, cujo índice de refração é diferente da hidroxiapatita, conferiram ao tecido maior translucidez, permitindo, conseqüentemente, maior penetração da luz, atingindo camadas mais profundas (POPESCU et al., 2008).

Com relação à reversão das lesões, após tratamento remineralizador, observou-se que as amostras submetidas à menor período de tratamento desmineralizador, mesmo quando submetidas ao mesmo regime remineralizador, ainda apresentaram diminuição de fosfato, como observado em G1(1 dia) e G2(3 dias). De acordo com ten Cate et al. (2008), o flúor pode reagir formando apatitafluoretada e ficar retido na lesão ou apenas ser adsorvido e lentamente lixiviado para o meio externo novamente. Associando estes resultados à visualização das imagens obtidas por TCO, acredita-se que o fato das superfícies em G1 e G2 terem permanecido aparentemente intactas pode ter dificultado a penetração de íons, os quais foram apenas adsorvidos na superfície e não penetraram nas camadas mais profundas das lesões, o que acarretou em mais desmineralização, ao invés de remineralização.

Com relação à análise dos dados da razão pós-tratamento remineralizador (pós-re/pós-des), observou-se que os grupos G3, G4, G5 e G6 apresentaram valores maiores que 1, indicando ganho mineral (Tabela 4). Embora diferenças significativas tenham sido observadas apenas de G5 para G1 e G2 e de G3 para G1.

Após realização do tratamento remineralizador esperava-se que os resultados de TCO apresentassem uma diminuição do espalhamento, o que denotaria remineralização das amostras. No entanto este efeito foi visualizado apenas no grupo G5 (9 dias). Segundo Strang et al. (1987) o aumento da dissolução do tecido leva à formação de erosão na superfície do esmalte, deixando-a mais porosa. Isto facilitaria a adsorção de íons flúor e a reprecipitação deste nas camadas profundas da lesão, facilitando uma posterior remineralização. Assim, lesões que passaram por maior período de tratamento desmineralizador poderiam ser mais facilmente remineralizadas (LIPPERT et al., 2011). Esses achados podem explicar a remineralização significativa de G5.

Possíveis explicações para a não observação de remineralização nos demais grupos foram apontadas. Darling et al. (2006) acreditam que mudanças na intensidade de espalhamento dependem do volume mineral dentro da lesão. Neste caso, o único grupo que mostrou ganho mineral significativo dentre os grupos foi G5. Chong, Darling e Fried (2007) também apontaram que o

espalhamento pode ser correlacionado com a profundidade no intuito de fornecer medidas de desmineralização ou remineralização de lesões. Para Jones e Fried (2009), uma vez que o espalhamento não diminuiu significativamente no corpo da lesão isso significa que a profundidade, em geral, também não foi alterada substancialmente pelo tratamento remineralizador. De acordo com Yamazaki, Litman e Margolis (2007) o corpo da lesão subjacente não é passível de remineralização no mesmo nível da zona de superfície, demonstrando que o efeito do fluoreto não se encontra apenas em função de suas propriedades, mas também do estado da superfície do esmalte.

De acordo com Lynch, Mony e ten Cate (2007), os poros presentes no esmalte podem sofrer redução global de seu volume no corpo da lesão, devido ao tratamento com fluoreto, mas ainda mantêm-se em número. Assim o mineral depositado dentro deles durante o processo de ciclagem pode ter limitado a difusão de íons, a restauração dos cristais parcialmente desmineralizados e o crescimento de cristais durante o tratamento com flúor (JONES et al., 2006).

Supõe-se que o mesmo fato não foi observado em G6 devido à extensa erosão criada na superfície, a qual gerou áreas de exposição da dentina subjacente, sendo o fato identificado de modo diferenciado, de acordo com as metodologias empregadas. Análises de dentina por técnica Raman apresentam um problema. Este tecido, quando irradiado com luz laser, devido à sua maior composição orgânica pode gerar espectros de fluorescência, os quais podem se sobrepor às demais bandas Raman, mascarando-as e dificultando a leitura dos dados (TSUDA e ARENDS, 1997). De acordo com Buzalaf et al. (2010) a dentina também desmineraliza mais rápido e remineraliza mais lentamente do que o esmalte (sob as mesmas condições experimentais), isto porque a área de contato da dentina com ácidos é maior do que a do esmalte sendo, portanto, muito mais permeável aos ácidos, com a desmineralização ocorrendo em profundidade relativamente maior. Por outro lado a deposição mineral é restrita às camadas mais externas necessitando de maior concentração de flúor para a ocorrência de remineralização. Além disso, a profundidade de penetração da luz, quando de uma análise TCO em dentina, é menor que no esmalte, devido à translucidez deste em relação à primeira, dificultando a visualização de detalhes

da estrutura do tecido (COLSTON et al, 1998). Outros fatores que podem ter influenciado os resultados relacionam-se ao protocolo remineralizador escolhido. O mesmo pode ter sido cronologicamente insuficiente ou a viscosidade do flúor gel pode ter dificultado a sua difusão no esmalte. Lippert, Parker e Jandt, (2004) sugeriram que a exposição ao flúor não necessariamente resultaria em proteção do esmalte contra uma possível desmineralização subsequente.

Outro dado importante mostrado nas imagens TCO foi observada com relação ao espalhamento diferenciado, de acordo com a região da amostra. Imagens de regiões cervicais apresentaram maior espalhamento do que regiões oclusais, sugerindo maior susceptibilidade da primeira à desmineralização. Schäfer, Raven e Parr (1992) atribuíram este fato à menor mineralização da região cervical em detrimento da oclusal.

Dentes humanos podem ser considerados como a fonte mais adequada do ponto de vista de relevância clínica para a realização de estudos *in vitro*, mas infelizmente, a comparação entre amostras de esmalte é dificultada pela variação biológica no tecido em si e, especialmente, pela heterogeneidade das lesões obtidas, mesmo quando preparadas sob condições padronizadas (STRANG et al., 1987). Embora tenham sido utilizados terceiros molares inclusos, visando a não exposição anterior do esmalte ao meio bucal, influências genéticas e condições ambientais (dieta e exposição ao flúor) podem ter alterado a composição mineral dos mesmos e assim, a susceptibilidade à desmineralização. A quantidade de fosfato de cálcio, utilizada como critério de inclusão das amostras nos grupos, embora tenha mostrado pouca variação dentro de um mesmo grupo, apresentou-se diferente entre os mesmos. Para solução deste fato e obtenção de grupos mais uniformes haveria a necessidade da coleta de um número muito maior de espécimes, o que talvez inviabilizasse sua realização.

Outra possível limitação foi apontada por Lippert, Parker e Jandt (2004) e está relacionada ao processo de preparo das amostras por lixamento da superfície. Tal processo talvez provoque a remoção da camada de esmalte aprismático, estrutura que, por ser mais altamente mineralizada que o esmalte da subsuperfície o tornaria mais susceptível à erosão. Entretanto, esse

procedimento é de suma importância na produção de superfícies planas e homogêneas, favorecendo a realização dos experimentos.

De modo geral pôde-se observar que ambos os métodos empregados nesse estudo foram eficazes na caracterização das lesões de cárie artificial, em esmalte humano, obtidas após a utilização do tratamento desmineralizador selecionado, como também na análise da reversão das mesmas após o tratamento remineralizador. Sendo assim, supõe-se que o período para desenvolvimento de lesões artificiais de cárie, por ciclagem de pH e com as soluções descritas neste estudo, não devem ser maiores do que nove dias por possível exposição de dentina subjacente. Com relação à remineralização, este mesmo período tempo mostrou-se mais propenso a responder ao tratamento devido às características da lesão anterior.

## 7 CONCLUSÕES

- Maiores períodos de armazenamento apresentaram efeito gradativo na desmineralização da superfície e da subsuperfície do esmalte. De acordo com a observação das imagens TCO, a região cervical apresentou-se mais sensível à desmineralização e exposição dentinária do que a oclusal;
- Períodos menores de armazenamento não apresentaram resposta ao tratamento remineralizador. A ocorrência de exposição dentinária acarretou em comportamento diferenciado quando da remineralização;

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, K.M. et al. *In vitro* evaluation of the effectiveness of acidic fluoride dentifrices. **Caries Res.**v.41, p. 263-7, 2007.

ARGENTA, R. M. O.; TABCHOURY, C. P. M.; CURY, J. A. A modified pH-cycling model to evaluate fluoride effect on enamel demineralization. **Pesqui. Odontol. Bras.** v. 17, n. 3, sept., 2003.

BAUMGARTNER, A. et al. Polarization-sensitive optical coherence tomography of dental structures. **Caries Research.** v.34, n.1,p. 59-69, jan-fev. 2000.

BERGER, S. B. **Efeitos de agentes clareadores de alta concentração para tratamento em consultório na microdureza, morfologia e composição química do esmalte humano.** Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba. 2007.

BUZALAF, M.A. R. et al. pH-cycling models for *in vitro* evaluation of the efficacy of fluoridated dentifrices for caries control: strengths and limitations. **J Appl Oral Sci.** v.18, n.4, p.316-34, 2010.

CAI, F. et al. Remineralization of enamel subsurface lesions by chewing gum with added calcium. **Journal of Dentistry** v. 37, p. 763–768, 2009.

CARVALHO, J. G.; GODOY, L. F.; BASTOS, M. T. A. A. Comparação de duas técnicas para remineralização do esmalte. **Pesqui Odontol Bras**, v. 16, n. 1, p. 89-92, jan./mar., 2002.

CHONG, S. L.; DARLING, C. L.; FRIED D. Nondestructive Measurement of the Inhibition of Demineralization on Smooth Surfaces Using Polarization-Sensitive Optical Coherence Tomography. **Lasers in Surgery and Medicine** v.39, p.422–427, 2007.

COLSTON JR, B. W. et al. Dental OCT. **Optics Express.** v.3, n. 6, p. 230-238, set. 1998.

FEATHERSTONE, J. D. B. Remineralization, the natural caries repair process—the need for new approaches. **Adv Dent Res** v. 21, p. 4-7, august, 2009.

FEATHERSTONE, J.D.B., et al. Comparison of artificial caries-like lesions by quantitative microradiography and microhardness profiles. **Caries Res.** v.17, p.385–391, 1983.

FELDCHEIN, F. I. et al. *In vivo* OCT imaging of hard and soft tissue of the oral cavity. **Optics Express.** v.3, n.6, p. 239-250, Set. 1998.

FERREIRA, M. A. F. e MENDES, N. S. Factors associated with active white enamel lesions. **Int. J. Paedia. Dent.** v.15, n.5, p.327-34, sep., 2005.

GILCHRIST, F. et al. The use of micro-Raman spectroscopy to differentiate between sound and eroded primary enamel. **International Journal of Paediatric Dentistry**, v. 17, p. 274–280, 2007.

HELLWIG, E. et al. Remineralization of initial carious lesions in deciduous enamel after application of dentifrices of different fluoride concentrations **Clin Oral Invest.**, v. 14, n. 3, June, 2010.

IJIMA, Y. et al. Acid resistance of enamel subsurface lesions remineralized by a sugar-free chewing gum containing casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate. **Caries Res.** v. 38, n. 6, 2004.

JONES, R. S.; FRIED, D. Remineralization of *in vitro* dental caries assessed with polarization-sensitive optical coherence tomography. **J. Biomed. Opt.**, v. 11, n.1, p. 1-9, 2006.

JONES R.S. et al. Imaging artificial caries on the occlusal surfaces with polarization sensitive optical coherence tomography. **Caries Res.** v.40, p.81–89, 2006.

JONES, R.S.; FRIED, D. Remineralization of enamel caries can decrease optical reflectivity. **J Dent Res** v.85, n.9, p.804-808, 2006.

KARLINSEY, R. L.; MACKEY, A. C.; STOOKEY, G. K. In vitro remineralization efficacy of NaF systems containing unique forms of calcium. **American Journal of Dentistry**, v. 22, n. 3, June, 2009.

KO, A. C. T. et al. Early dental caries detection using a fibre-optic coupled polarization-resolved Raman spectroscopic system **Optics Express** v. 16, n. 9, p. 6274-6284, april, 2008.

LIPPERT, F.; PARKER, D. M.; JANDET, K. D. In vitro demineralization/remineralization cycles at human tooth enamel surfaces investigated by AFM and nanoindentation **Journal of Colloid and Interface Science.** v. 280, n. 2, p. 442-448, 2004.

LOBO, M.M. et al. In vitro evaluation of caries inhibition promoted by self-etching adhesives systems containing antibacterial agents. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater.** v.75, n.1, p.122-7, 2005.

LYNCH, R.J.M.; MONY, U.; TEN CATE, J.M. Effect of lesion characteristics and mineralizing solution type on enamel remineralization *in vitro*. **Caries Res.**;v.41, n.4, p.257-62, 2007.

LYNCH, R.J.M.; TEN CATE J.M. The Effect of Lesion Characteristics at Baseline on Subsequent De- and Remineralisation Behaviour. **Caries Res.** v.40, p.530–535, 2006.

MAGALHÃES, A. C. et al. Comparison of cross-sectional hardness and transverse microradiography of artificial carious enamel lesions induced by different demineralising solutions and gels. **Caries Res** v. 43, p. 474–483, 2009.

MAIA, A. M. A. **Avaliação de técnicas diagnósticas de lesão de cárie proximal: raio x, transiluminação com radiação infravermelho próximo e tomografia por coerência óptica.** 2009. Dissertação (Mestrado em Odontologia). Faculdade de Odontologia de Pernambuco. Universidade de Pernambuco.

MATHIAS, J.; KAVITHA, S.; MAHALAXMI, S. A comparison of surface roughness after micro abrasion of enamel with and without using CPP-ACP: An *in vitro* study. **J Conserv Dent.** v.16, n.12, p. 22-5, 2009.

MARGOLIS, H.C.; MORENO, E.C. Physicochemical perspectives on the cariostatic mechanisms of systemic and topical fluorides. **J Dent Res.** v.69 (special issue), p.606-13, 1990.

MARGOLIS, H.C. et al. Kinetics of Enamel Demineralization *in vitro*. **J Dent Res** v.78, n.7, p. 1326-1335, July, 1999.

MOTA, C. C. B. O. et al. *In vivo* evaluation of enamel dental restoration interface by optical coherence tomography. **Revista Cubana de Física.** v. 27,n. 1, p.99-101, 2010.

NEVES, A. A. et al. Microstructural analysis of demineralized primary enamel after *in vitro* toothbrushing. **Pesqui Odontol Bras.** v. 16, n. 2, p. 137-143, 2002.

POPESCU, D. P. et al. Assessment of early demineralization in teeth using the signal attenuation in optical coherence tomography images. **J Biomed Opt.;** v. 13, n.5, 2008.

PULIDO, M.T. et al. The inhibitory effect of mi paste, fluoride and a combination of both on the progression of artificial caries-like lesions in enamel. **Operative Dentistry,** v.33, n.5, p. 550-5, 2008.

QUEIROZ, C.S. et al. pH-cycling models to evaluate the effect of low fluoride dentifrice on enamel de- and remineralization. **Braz Dent J.** v.19, p.21-7, 2008.

REHDER NETO, F. C. et al. Potential agents to control enamel caries-like lesions. **Journal of Dentistry** v.37, p. 786 – 790, 2009.

REYNOLDS, E. C. Calcium phosphate-based remineralization systems: scientific evidence? **Australian Dental Journal** v.53, p. 268–273, 2008.

SCHÄFER, F.; RAVEN, S.J.; PARR, T.A. The effect of lesion characteristic on remineralization and model sensitivity. **J Dent Res.** v. 71(special issue), p.811–813, 1992.

STEINER-OLIVEIRA, C. et al. Chemical, Morphological and Thermal Effects of 10.6- $\mu\text{m}$  CO<sub>2</sub> Laser on the Inhibition of Enamel Demineralization. **Dental Materials Journal** v.25, n.3, p.455–462, 2006.

STRANG, R. et al. The effect of baseline lesion mineral loss on in situ remineralization. **J Dent Res.** v. 66, p.1644–46, 1987.

THAVEESANGPANICH, P. et al. The effects of child formula toothpastes on enamel caries using two *in vitro* pH-cycling models. **Int Dent J.** v.55, p.217-23, 2005.

ten CATE, J.M. The caries preventive effect of a fluoride dentifrice containing Triclosan and zinc citrate, a compilation of *in vitro* and *in situ* studies. **Int Dent J.** v.43, p.407-13, 1993.

ten CATE, J.M., ARENDS, J. Remineralization of artificial enamel lesions in vitro. III. A study of the deposition mechanism. **Caries Res** v.14, p.351-358. 1980.

ten CATE, J.M.; JONGEBLOED, W.L.; ARENDS, J. Remineralization of artificial enamel lesions *in vitro*. IV. Influence of fluorides and diphosphonates on short- and long-term remineralization. **Caries Res.** v.15, p.60-9, 1981.

ten CATE J.M., DUIJSTERS, P.P. Alternating demineralization and remineralization of artificial enamel lesions. **Caries Res.** v.16, p.201-10, 1982.

ten CATE, J.M. et al. Elevated fluoride products enhance remineralization of advanced enamel lesions. **J Dent Res.** v.87, n.10, p.943-947, 2008.

ten CATE, J.M.; EXTERKATE, R.A.M.; BUIJS, M.J. The relative efficacy of fluoride toothpastes assessed with pH cycling. **Caries Res.** v.40, p.136–141, 2006.

TRAMINI, P., et al. A method of age estimation using Raman microspectrometry imaging of the human dentin. **Forensic Sci Int.** v. 118, p.1-9. 2001

TSUDA, H.; ARENDS, J. Raman spectroscopy in dental research: a short review of recent studies. **Adv Dent Res** v.2, n.4, p.539-547, November, 1997.

VIEIRA, A. E. M. et al. Fluoride dose response in pH-cycling models using bovine enamel. **Caries Res** v. 39, p. 514–520, 2005.

VILLENA, R. S.; TENUTA, L. M. A.; CURY, J.A. Effect of APF gel application time on enamel demineralization and fluoride uptake *in situ*. **Braz Dent J.** v. 20, n. 1, p. 37-41, 2009.

WALKER, G. et al. Increased remineralization of tooth enamel by milk containing added casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate. **Journal of Dairy Research** v.73, p. 74–78, 2006.

WANG, Y. SPENCER, P.; WALKER, M. P. Chemical profile of adhesive/caries-affected dentin interfaces using Raman microspectroscopy. **J Biomed Mater Res A.** v.81, n.2, p. 279–286, May, 2007.

WHITE, D.J. Use of synthetic-polymer gels for artificial carious lesion preparation. **Caries Res.** v. 21, p. 228–242, 1987.

WHITE, D.J. The application of *in vitro* models to research on demineralization and remineralization of the teeth. **Adv Dent Res.** v.9, p.175-93, 1995.

YAMAZAKI, H.; LITMAN, A.; MARGOLIS, H. C. Effect of fluoride on artificial caries lesion progression and repair in human enamel: regulation of mineral deposition and dissolution under *in vivo*-like conditions. **Arch Oral Biol.** v. 52, n. 2, p. 110–120, Feb., 2007.

## 9 Anexos

### Anexo A – Termos de Consentimento Livre e Esclarecido

Prezado (a) Senhor (a)

**Esta pesquisa trata do efeito de pastas remineralizantes e do flúor na remineralização de lesões iniciais de esmalte e está sendo desenvolvida por Rosa Virginia Dutra de Oliveira, aluna do Mestrado em Odontologia Preventiva Infantil da Universidade Federal da Paraíba, sob a orientação do Prof. Hugo Lemes Carlo.**

O objetivo do estudo é analisar os efeitos dos produtos na interrupção da progressão de lesões iniciais de cárie e promover a remineralização do tecido. A finalidade é contribuir para suprir a escassez de informações a respeito do efeito desses produtos sobre as lesões de cárie, de forma a determinar a capacidade remineralizante dos produtos e apontar a eficácia ou não de seu uso na prática clínica.

Solicitamos a doação do seu dente a ser extraído nas clínicas das disciplinas de Cirurgia I e II do Departamento de Clínica e Odontologia Social – CCS/UFPB, como também sua autorização para apresentar os resultados deste estudo em eventos da área de saúde e publicação em revista científica. Por ocasião da publicação dos resultados, seu nome será mantido em sigilo. Informamos que essa pesquisa não oferece riscos, previsíveis, para a sua saúde.

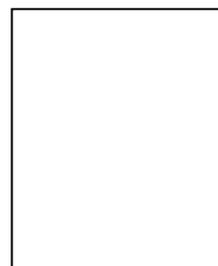
Esclarecemos que sua participação no estudo é voluntária e, portanto, o(a) senhor(a) não é obrigado(a) a fornecer as informações e/ou colaborar com as atividades solicitadas pelo Pesquisador(a). Caso decida não participar do estudo, ou resolver a qualquer momento desistir do mesmo, não sofrerá nenhum dano, nem haverá modificação na assistência que vem recebendo na Instituição.

Os pesquisadores estarão a sua disposição para qualquer esclarecimento que considere necessário em qualquer etapa da pesquisa.

Diante do exposto, declaro que fui devidamente esclarecido(a) e dou o meu consentimento para participar da pesquisa e para publicação dos resultados. Estou ciente que receberei uma cópia desse documento.

---

Assinatura do Participante da Pesquisa  
ou Responsável Legal



Espaço para  
impressão  
dactiloscópica

---

Assinatura da Testemunha

Caso necessite de maiores informações sobre o presente estudo, favor ligar para um dos pesquisadores participantes:

(83) 9982 0668 – Rosa Virginia Dutra de Oliveira

Endereço (Setor de Trabalho): Departamento de Odontologia Restauradora/ Centro de Ciências da Saúde/ Universidade Federal da Paraíba

Atenciosamente,

---

Assinatura do Pesquisador Responsável

---

Assinatura do Pesquisador Participante

---

Comitê de Ética em Pesquisa – Hospital Universitário Lauro Wanderley

Campus I UFPB - 4º andar – Cidade Universitária

João Pessoa – PB. CEP – 58059-900

Fone: (83) 3216-7302

## 10 Apêndices:

### Apêndice A – Certidão do Comitê de Ética em Pesquisa do HULW



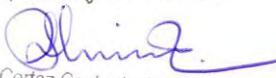
UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAIBA - UFPB  
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO LAURO WANDERLEY - HULW  
**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES  
HUMANOS - CEP**

### CERTIDÃO

Com base na Resolução nº 196/96 do CNS/MS que regulamenta a ética da pesquisa em seres humanos, o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Lauro Wanderley - CEP/HULW, da Universidade Federal da Paraíba, em sua sessão realizada no dia 27/07/2010, após análise do parecer do relator, resolveu considerar APROVADO o projeto de pesquisa intitulado AVALIAÇÃO DO EFEITO DE PASTAS REMINERALIZANTES E DO FLÚOR NA REMINERALIZAÇÃO DE LESÕES SUB-SUPERFICIAIS DE CÁRIE EM ESMALTE. Protocolo CEP/HULW nº. 392/10, da pesquisadora ROSA VIRGINIA DUTRA DE OLIVEIRA.

No final da pesquisa, solicitamos enviar ao CEP/HULW, uma cópia desta certidão e da pesquisa, em CD, para emissão da certidão para publicação científica.

João Pessoa, 28 de julho de 2010.

  
Iaponira Cortez Costa de Oliveira  
Coordenadora do Comitê de Ética  
em Pesquisa - CEP/HULW

**Profª Drª Iaponira Cortez Costa de Oliveira**  
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa-HULW

Endereço: Hospital Universitário Lauro Wanderley-HULW - 4º andar. Campus I - Cidade Universitária.  
Bairro: Castelo Branco - João Pessoa - PB. CEP: 58051-900 CNPJ: 24098477/007-05  
Fone: (83) 32167302 - Fone/fax: (083)32167522 E-mail - cepulw@hotmail.com