

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**

**ESTUDO COMPARATIVO ENTRE LESÕES  
CARIOSAS ARTIFICIAIS E NATURAIS DE  
ESMALTE COM RELAÇÃO À PERMEABILIDADE  
DA CAMADA SUPERFICIAL**

**Danilo Augusto de Holanda Ferreira**

**2014**

**DANILO AUGUSTO DE HOLANDA FERREIRA**

**ESTUDO COMPARATIVO ENTRE LESÕES CARIOSAS ARTIFICIAIS E  
NATURAIS DE ESMALTE COM RELAÇÃO À PERMEABILIDADE DA CAMADA  
SUPERFICIAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia – Área de Concentração em Odontologia Preventiva e Infantil.

Orientador: Prof. Dr. Frederico Barbosa de Sousa

Coorientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Carolina Patrícia Aires

João Pessoa

2014

F383e Ferreira, Danilo Augusto de Holanda.  
Estudo comparativo entre lesões cáries artificiais e naturais de esmalte com relação à permeabilidade da camada superficial / Danilo Augusto de Holanda Ferreira.-- João Pessoa, 2014.  
34f. : il.  
Orientador: Frederico Barbosa de Sousa  
Coorientadora: Carolina Patrícia Aires  
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS  
1. Odontologia preventiva. 2. Histopatologia. 3. Cárie artificial em esmalte. 4. Volumes bioquímicos. 5. Permeabilidade.

UFPB/BC

CDU: 616.314-084(043)

**DANILO AUGUSTO DE HOLANDA FERREIRA**

**ESTUDO COMPARATIVO ENTRE LESÕES CARIOSAS  
ARTIFICIAIS E NATURAIS DE ESMALTE COM RELAÇÃO À  
PERMEABILIDADE DA CAMADA SUPERFICIAL**

Banca Examinadora

---

Prof. Dr. Frederico Barbosa de Sousa  
Orientador - UFPB

---

Profª Drª Andressa Feitosa Bezerra de Oliveira  
Examinador - UFPB

---

Profª Drª Aline de Almeida Neves Coutinho  
Examinador – UNIGRANRIO

## RESUMO

O objetivo deste estudo foi comparar lesões cariosas artificiais de esmalte induzidas com gel ácido contendo grande quantidade de matéria orgânica e lesões cariosas artificiais induzidas com solução ácida com pouco constituinte orgânico, quanto ao volume orgânico e à permeabilidade ( $\alpha_d$ ). Trinta dentes (vinte terceiros molares inclusos e dez molares com lesão de mancha branca inativa) foram distribuídos em três grupos. Com o intuito de se induzir cárie artificial, dez dentes inclusos foram expostos a um gel ácido de hidroxietilcelulose 2% e ácido láctico 50 mM com pH 4,5 (Gel; n=10) e os outros dez a uma solução desmineralizante (0,1 mM de ácido láctico, 11,7 mM de cálcio, clorofórmio 0,5% v/v e 6 mM de fosfato, com pH 4,5) (Solução; n=10). Como grupo controle, os dentes contendo lesões de mancha branca também foram analisados (Cárie Natural; n=10). De cada amostra analisou-se três pontos da camada superficial da lesão, em intervalos de 50  $\mu$ m. Os pontos analisados em cada um dos três grupos foram comparados com valores teóricos estabelecidos matematicamente na literatura, como forma de padronizar as comparações. E, por fim, as variações de volume orgânico (Razão  $\beta$ ) e permeabilidade (Razão  $\alpha_d$ ) em relação a valores previstos foram comparadas entre os grupos. Para a variável Razão  $\beta$ , houve diferença significativa entre os grupos Gel e Solução [ $p < 0,0001$ , ANOVA; Magnitude do efeito (ME)=1,84] e entre Solução e Cárie Natural ( $p = 0,001$ ; ME=0,46; ANOVA). Da mesma forma, os valores da Razão  $\alpha_d$  do cruzamento Gel/Solução ( $p < 0,0001$ , Mann-Whitney; ME=0,96) e Solução/Cárie Natural ( $p < 0,0001$ , Mann-Whitney; ME=1,15) diferiram de maneira significativa. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos Gel e Cárie Natural para a Razão  $\beta$  ( $p = 0,585$ ; ANOVA; ME=0,30) e a Razão  $\alpha_d$  ( $p = 0,940$ ; Mann-Whitney; ME=0,01). Concluiu-se que, semelhantemente à cárie natural, a camada superficial das lesões cariosas artificiais de esmalte criadas com gel ácido apresentaram maior volume orgânico e menor permeabilidade, comparadas às induzidas em solução ácida.

**Palavras-chave:** Histopatologia, Cárie artificial em esmalte, Volumes bioquímicos, Permeabilidade.

## ABSTRACT

The aim of this study was to compare artificial carious enamel lesions induced with an acid gel containing large amounts of organic matter and artificial carious lesions induced by an acidic solution (with little organic constituent) regarding organic volume and permeability ( $\alpha_d$ ). Thirty teeth (twenty third molar and ten molars with inactive white spot lesions) were divided into three groups. In order to induce artificial caries, ten teeth were exposed to an acid gel containing hydroxyethylcellulose 2% and 50 mM lactic acid at pH 4.5 (Gel; n = 10) while the other ten teeth a demineralizing solution (0,1 mM lactic acid, 11.7 mM of calcium, chloroform 0.5% v/v, 6 mM phosphate, pH 4.5) (Solution; n = 10). As a control group, the teeth containing white spot lesions were also analyzed (Natural Caries, n = 10). Three points were analyzed in each sample at the surface layer in each lesion at 50 $\mu$ m intervals. The results obtained in each of the three groups were compared with theoretical mathematical found values in the literature as a way to standardize the comparison. Finally, variations in organic volume (Ratio  $\beta$ ) and permeability (Ratio  $\alpha_d$ ) in relation to predicted values were compared between groups. For variable Ratio  $\beta$ , there was a significant difference between the gel and solution [ $p < 0.0001$ , ANOVA; Effect Size (ES)=1.84] and between solution and the natural caries ( $p = 0.001$ , ANOVA; ME=0.46). Similarly, the values of Ratio  $\alpha_d$  between Gel/Solution ( $p < 0.0001$ , Mann-Whitney, ES=0.96) and Solution/Natural caries ( $p < 0.0001$ ; Mann-Whitney; ME=1.15) differed significantly. There was no statistically significant difference between the groups Gel and Natural Caries for Ratio  $\beta$  ( $p = 0.585$ , ANOVA, ES=0.30) and the Ratio  $\alpha_d$  ( $p = 0.940$ , Mann-Whitney, ES=0.01). It was concluded that, as in natural decay, the surface layer of artificial carious enamel lesions created with organic acid gel showed higher organic matter and lower permeability compared to those induced in acidic solution.

**Keywords:** Histopathology, Artificial enamel caries, Biochemical volumes, Permeability.

## SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO.....	1
2- REVISÃO DA LITERATURA.....	3
3- PROPOSIÇÃO.....	7
4- MATERIAL E MÉTODOS.....	8
4.1- Questões éticas.....	8
4.2- Local de realização do estudo.....	8
4.3- Amostra.....	8
4.4- Procedimentos da pesquisa.....	8
4.4.1- Indução das lesões cáries artificiais.....	8
4.4.2- Seleção das amostras de cárie natural.....	9
4.4.3- Preparação de cortes por desgaste.....	10
4.4.4- Análise do volume mineral.....	10
4.4.5- Análises dos conteúdos de matéria orgânica e água.....	12
4.4.6- Análise de $\alpha_d$ .....	15
4.4.7- Análise estatística.....	16
5- RESULTADOS.....	18
6- DISCUSSÃO.....	26
7- CONCLUSÃO.....	29
REFERÊNCIAS.....	30
ANEXO.....	32
APÊNDICE.....	33

## 1. INTRODUÇÃO

A cárie dentária pode ser considerada uma desmineralização dos tecidos dentais duros decorrente da produção de ácido na placa bacteriana a partir de carboidratos fermentáveis<sup>10</sup>. A desmineralização é a principal consequência tecidual do processo carioso. É importante ressaltar os demais componentes bioquímicos presentes nos tecidos dentais duros. No caso do esmalte dental, que é o tecido mais mineralizado e mais duro do corpo humano, ele é composto de mineral (hidroxiapatita), água estrutural (firmemente aderida ao mineral), água adsorvida (removida com mais facilidade) e matéria orgânica.<sup>2,5</sup>

O componente mineral do esmalte encontra-se na forma de cristais alongados de hidroxiapatita que, em sua maioria, percorrem toda a espessura do esmalte, desde a junção amelodentinária (JAD) até a sua superfície. Esses cristais têm largura de 60-70 nm e espessura de 25-30 nm, e são compactados em colunas definidas como prismas.<sup>15,33</sup> O arranjo dos cristais no esmalte dá origem a duas categorias principais de poros, sendo eles: (i) aqueles que se encontram no interior dos prismas e no esmalte interprismático (entre os cristais de hidroxiapatita) com diâmetros de 1-2 nm; e (ii) aqueles que se encontram logo nos arredores de cada prisma (bainhas), com 4-6 nm de diâmetro. Todos os poros apresentam componentes orgânicos hidrofóbicos e hidrofílicos – que reduzem o seu diâmetro - representados por lipídios e proteínas, que provavelmente estão em contato direto com a hidroxiapatita.<sup>12,21,25,33</sup>

Através do ambiente heterogêneo dos poros do esmalte, é que ocorre todo o mecanismo de transporte de substâncias nesse tecido, incluindo o transporte do ácido (proveniente do biofilme bacteriano) causador da lesão cariosa, agentes remineralizadores (para reparar o conteúdo mineral perdido) e resinas infiltrantes (para paralisar as lesões).

Apesar de estudos sobre o efeito dos agentes remineralizantes ou infiltrantes sobre lesões de cárie não diferenciarem lesões naturais e artificiais, há evidências indicando que somente as variações no conteúdo mineral podem não explicar completamente a permeabilidade das lesões cariosas de esmalte<sup>4</sup>. Além disso, já foi relatado que a permeabilidade de lesões cariosas naturais é menor do que em lesões artificiais com conteúdos minerais supostamente semelhantes, sugerindo um papel da matéria orgânica na permeabilidade do esmalte cariado.<sup>20</sup>



Consistente com isto, evidências mais recentes revelaram que lesões cariosas naturais apresentam maior quantidade de matéria orgânica que o esmalte normal e que o volume de matéria orgânica decresce da superfície para o esmalte mais interno.<sup>4,19</sup> Também foi mostrado que lesões cariosas de esmalte artificiais apresentam menos matéria orgânica e melhores condições de permeabilidade que as lesões naturais<sup>4</sup>. O aumento de matéria orgânica reduz o volume de poros disponível para remineralização e infiltração de resina, sendo um aspecto muito importante das lesões cariosas de esmalte. Há evidências de que o uso de solventes de proteínas em lesões cariosas naturais de esmalte aumenta a permeabilidade a íons de cálcio.<sup>24</sup> Essas diferenças entre lesões naturais e artificiais são mais um fator indicativo de que os resultados de estudos com lesões artificiais devem ser cuidadosamente ponderados, antes de serem extrapolados para a situação *in vivo*.

Uma questão em aberto na literatura é sobre a diferença entre lesões artificiais induzidas por substâncias que contenha pouca quantidade de matéria orgânica e aquelas induzidas com outras fontes mais ricas de componente orgânico. O gel ácido, rico em matéria orgânica, e as soluções desmineralizadoras, com pouca quantidade de componente orgânico, são os agentes ácidos comumente usados para induzir lesões cariosas artificiais de esmalte. O presente estudo visa, portanto, estudar as características histopatológicas das lesões artificiais produzidas por diferentes agentes, comparadas às lesões naturais.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

O tecido mais mineralizado do corpo humano, o esmalte, recobre a coroa do elemento dental e é ele quem sofre os primeiros efeitos do biofilme cariogênico em indivíduos jovens. Cerca de 90% de sua constituição é formada por minerais, sendo o remanescente constituído por matéria orgânica e água.<sup>9,13,30</sup> A hidroxiapatita representa o principal constituinte do volume mineral do esmalte, se apresentando na forma de cristais alongados que, em sua maioria, percorrem toda a espessura do esmalte, da JAD à superfície do esmalte externa. Esses cristais possuem largura de 60-70 nm e espessura de 25-30 nm, e se compactam em colunas denominadas de prismas.<sup>15,33</sup>

Devido a forma como esses cristais se organizam, temos a formação de poros no esmalte. Eles são de dois tipos principais: os que se localizam no interior dos prismas e do esmalte interprismático (entre os cristais de hidroxiapatita), com cerca de 1-2 nm de diâmetro; e os que estão ao redor de cada prisma (bainhas), possuindo 4-6 nm de diâmetro. Em sua constituição, esses poros apresentam componentes orgânicos hidrofóbicos e hidrofílicos representados por lipídios e proteínas, que provavelmente estão contato direto com a hidroxiapatita.<sup>12,21,25,33</sup>

Além do conteúdo mineral e orgânico, um outro componente faz parte do esmalte: a água livre. Ela pode estar presente de duas maneiras, fracamente e fortemente aderidas, sendo a primeira mais facilmente removida.<sup>5,9</sup>

O esmalte pode ser entendido como sendo uma membrana semipermeável contendo porosidades que funcionam como um pequeno sistema de “túbulos/cilindros” interligados, sendo a água, por eles, levada. Ela é deslocada em direção ao interior do tecido devido a uma pressão osmótica, podendo haver, em certos casos, movimentação de solutos em direção contrária.<sup>27</sup>

Esse sistema de transporte através do esmalte é importante em várias de suas propriedades físico-químicas como elasticidade, permeabilidade, reatividade, trocas iônicas, transporte de drogas (como por exemplo, agentes clareadores), produtos bacterianos e materiais restauradores. *In vivo*, esse transporte pode acontecer através da difusão, que é um processo que ocorre sob influência de uma pressão osmótica gerada pela matéria orgânica do esmalte.<sup>3</sup>

O poro é reduzido pela presença da proteína, sendo que sua hidratação pode reduzir ainda mais a mobilidade da água dentro dos poros e,

consequentemente, a difusão de solutos. Esta pode ser alterada por interações com a carga da proteína, ou com o componente lipídico de acordo com sua hidrofobicidade.<sup>27</sup>

A densidade de cristais/prismas ao longo do esmalte, que determina o seu conteúdo mineral, não é uniforme. Em geral, este diminui a partir da superfície externa em direção à dentina, enquanto que a porosidade, presença de fluidos e matéria orgânica aumentam significativamente nessa direção.<sup>23</sup>

Assim, o transporte de ácido proveniente do biofilme dental se dá por difusão através do ambiente heterogêneo dos poros do esmalte. Durante o deslocamento, o ácido penetra no tecido e interage com seus componentes químicos. De acordo com Shellis (1996), a formação da lesão cariosa resulta de dois processos parcialmente independentes: penetração do ácido e desmineralização. A penetração, definida como o processo de dissolução do material nas bainhas dos prismas pela difusão rápida do ácido, ocorre com pouca perda mineral, mas com um aumento significativo dos poros das bainhas. A desmineralização, perda mineral principalmente no interior dos prismas, é resultado de uma difusão lenta do ácido nos poros intraprismáticos. Ressalta o autor que a penetração não ocorre totalmente sem desmineralização. Assim, a dissolução cariosa do esmalte é grandemente influenciada pela distribuição anatômica e largura das bainhas dos prismas.<sup>26</sup>

Pelo papel crucial da difusão na patogênese da lesão cariosa do esmalte, fica claro que as características histopatológicas da lesão tem sido descritas com base nas variações da permeabilidade do esmalte cariado.

Uma vez que a birrefringência requer uma interpretação matemática, um modelo simplificado, mas que se mostrou bastante razoável na época de sua introdução, foi aquele proposto por Darling (1956). Neste modelo, os poros do esmalte não contêm matéria orgânica e se considera que toda a água livre é facilmente removida pela desidratação à temperatura ambiente (cerca de 20° C). Apesar de não ser consistente com a real composição do esmalte, esse modelo permitiu separar zonas na lesão cariosa do esmalte relacionadas a diferentes porosidades. Consequentemente, diferentes permeabilidades estão a elas implicadas.

Devido a birrefringência do esmalte ser muito sensível a variações nos volumes e nos índices de refração do mineral e de poros, e estes poros serem

permeáveis a líquidos com diferentes índices de refração, a microscopia de luz polarizada se tornou uma ferramenta muito importante no estudo da distribuição de poros na lesão cariada de esmalte.<sup>8,30</sup>

A primeira evidência macroscópica da lesão de cárie pode ser vista em um dente como uma pequena área branco opaca.<sup>29</sup> Nas lesões que se encontram neste estágio, foram descritos, com base nas imagens de microscopia de luz polarizada, quatro zonas histopatológicas de porosidade relacionadas com a lesão de cárie.<sup>7,8</sup>:

- **Zona Translúcida:** é a camada mais profunda da lesão, onde há a primeira mudança visível no esmalte cariado, apresentando uma perda de aproximadamente 1% de mineral e poros relativamente grandes.

- **Zona Escura:** fica adjacente à zona translúcida, apresentando uma mistura de poros grandes e pequenos, sendo o volume de poros de 2-4%.

-**Corpo da lesão:** é a zona com maior perda mineral, apresentando volume de poros de 25-50%, sendo a maior parte de poros grandes.

-**Camada superficial:** pouco depois do ataque inicial na zona translúcida, se desenvolve uma zona de superfície relativamente “intacta”. A porosidade da zona de superfície é de 1-2%. Esta zona frequentemente persiste até cavitação.<sup>7,18</sup>

Até recentemente, quantificar os volumes bioquímicos dos constituintes do esmalte requeria a aplicação de métodos destrutivos da amostra, de modo que estas não podiam ser mais utilizadas para estudos de transporte após análise bioquímica, já que era necessário realizar a sua descalcificação. Recentemente Sousa; Vianna; Santos-Magalhães (2006) propuseram uma abordagem para análise de volume de água e matéria orgânica a partir da quantificação da birrefringência. Isto representa uma aproximação da realidade melhor do que aquela representada pelo modelo de Darling (1956).

Muitas pesquisas em cariologia tem direcionado o foco para a utilização de métodos de controle da cárie dentária, como, por exemplo, através da infiltração das lesões cariosas com resina fluida e/ou utilização de agentes remineralizantes.

Os diferentes volumes/tamanhos de poros implicam em diferentes permeabilidades das lesões. Estudos com infiltração de resinas fluidas relataram que a remoção da camada superficial seria indispensável para uma adequada

infiltração da resina na lesão cariosa, devido a uma menor permeabilidade da camada superficial. Ainda em relação à infiltração de lesões cariosas, foi mostrado que a permeabilidade de lesões cariosas naturais é menor do que aquelas de lesões cariosas artificiais com conteúdos minerais supostamente semelhantes, sugerindo um possível papel da matéria orgânica na permeabilidade do esmalte cariado.<sup>20</sup>

Como condição preliminar para que trabalhos com infiltrantes e remineralizantes sejam desenvolvidos *in vitro*, deve-se induzir a formação de lesões artificiais de cárie na superfície do esmalte, para que nela sejam analisados os efeitos desses agentes. Porém, diferentes substâncias tem sido utilizadas para provocar essa perda mineral, incluindo algumas com quantidades consideráveis de matéria orgânica e outras apresentando porções desprezíveis desse componente em sua constituição. Portanto, se em lesões naturais o volume orgânico presente na camada superficial afeta a sua permeabilidade, é de se questionar se a utilização de determinado agente desmineralizante, com abundância ou não de matéria orgânica, pode incorporar maior ou menor volume orgânico na lesão artificial, variando, dessa forma, o grau de permeabilidade na camada da lesão e tornando-se um viés na realização do estudo.

Para elucidar o questionamento com relação às diferenças entre as permeabilidades das lesões artificiais induzidas com desmineralizantes com diferentes quantidades de matéria orgânica, faz-se necessário realizar análises quantitativas volumétricas da infiltração dos poros do esmalte. O estudo de Medeiros; Soares, Sousa (2012), aplicando a interpretação da birrefringência do esmalte segundo Sousa; Vianna; Santos-Magalhães (2006), revelou a possibilidade de realizar uma análise desse tipo ao demonstrar uma metodologia de quantificação de volumes mineral, de água e matéria orgânica em lesões cariosas naturais de esmalte. Com esta quantificação, é possível prever o volume de poros mais disponível para difusão (relacionado com a permeabilidade) e testar esta previsão experimentalmente. Considera-se que o papel da matéria orgânica pode tanto reduzir o tamanho efetivo dos poros, como a mobilidade da água neles.

### **3. PROPOSIÇÃO**

O objetivo do presente estudo é comparar o volume orgânico e a permeabilidade de lesões de cárie artificiais produzidas com diferentes formas de apresentação de ácido (gel e solução), tomando-se como controle lesões naturais de cárie.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 QUESTÕES ÉTICAS**

Os procedimentos para a realização desta pesquisa respeitaram as diretrizes e normas que regulamentam as pesquisas envolvendo seres humanos (Resolução nº 466, de 13 de junho de 2013, do Conselho Nacional de Saúde). O trabalho foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Hospital Lauro Wanderley do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba.

### **4.2 LOCAL DE REALIZAÇÃO DO ESTUDO**

Todas as etapas do estudo foram realizadas no Laboratório de Microscopia e Imagem Biológica do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba.

### **4.3 AMOSTRA**

Foram utilizados elementos dentários humanos (n=30), sendo vinte terceiros molares inclusos e dez elementos apresentando lesão inativa e não cavitada de cárie em esmalte. Eles foram obtidos por doação de pacientes maiores de 18 anos de idade. Os dentes doados foram extraídos por razões de saúde identificadas pelo cirurgião-dentista responsável. As doações foram realizadas após o paciente ser esclarecido sobre os objetivos do estudo e este assinar um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (APÊNDICE).

### **4.4 PROCEDIMENTOS DA PESQUISA**

#### **4.4.1 Indução das lesões cáries artificiais**

Os elementos dentários tiveram as coberturas orgânicas removidas suavemente com uma pelota de algodão embebida em solução de hipoclorito de sódio (1%) durante 30 segundos, e em seguida foram enxaguados com o jato de

água da seringa tríplice durante 10 segundos, e finalmente secos com o jato de ar por 10 segundos. Posteriormente, foram acondicionados em solução de azida sódica 0,02%.

A superfície da coroa de cada elemento dental foi protegida com esmalte de unha (Colorama, Brasil), exceto numa área de 3 mm x 3 mm que ficou em contato com a substância usada para criar lesão cáriosa artificial de esmalte. A área selecionada, na região média coronal, foi delimitada usando o esmalte de unha aplicado em duas camadas.

Os vinte terceiros molares inclusos foram distribuídos igualmente em dois grupos com o intuito de se induzir cárie artificial, sendo um grupo exposto a um gel ácido contendo hidroxietilcelulose 2% e ácido láctico 50 mM com pH 4,5 (Gel; n=10), e o outro a uma solução desmineralizante 0,1 mM de ácido láctico, 11,7 mM de cálcio, clorofórmio 0,5% v/v e 6 mmol/L de fosfato, com pH 4,5 (Solução; n=10), da seguinte forma:

**-Gel:** Os dentes foram imersos em 18 mL do gel ácido (2 mL de gel/mm<sup>2</sup> de esmalte exposto) por 4 dias. Foi seguido um protocolo previamente relatado como eficaz para induzir cárie artificial em esmalte.<sup>32</sup>

**-Solução:** Os dentes foram imersos em 54 mL da solução ácida (6 mL de solução/mm<sup>2</sup> de esmalte exposto) durante 4 dias, realizando-se uma renovação da solução no final das primeiras 48 horas.<sup>17</sup>

Após a indução das lesões, os dentes foram lavados com água deionizada e guardados em solução aquosa de azida sódica até a realização dos cortes histológicos.

#### 4.4.2 Seleção das amostras de cárie natural

Como grupo controle, os dez dentes com lesão de macha branca inativa foram selecionadas e classificadas de acordo com a presença de lesão e a sua respectiva atividade, através de um escore pré-definido. Dois examinadores participaram da avaliação, realizando uma calibração intra e inter examinador, com o objetivo de determinar a confiabilidade, através do teste de Kappa, na detecção da atividade de tais lesões.

Avaliando a presença de manchas brancas e o brilho da superfície através de uma fonte de iluminação externa, as regiões foram classificadas em:



hígida, lesão ativa, inativa ou cavitada. Cada examinador avaliou as amostras 3 vezes, comparando a seus próprios resultados, e aos do segundo avaliador.

Como resultado final, após análise de todas as amostras, foi encontrada a concordância intra examinador de 0,856 e interexaminador de 0,812, ambas consideradas concordância quase perfeita.<sup>16</sup> Nos casos em que houve discordância, um consenso foi alcançado em conjunto.

#### 4.4.3 Realização de cortes por desgaste

Após indução da lesão cariiosa artificial ou a seleção das lesão natural, cada dente foi cortado longitudinalmente ao longo eixo do dente e cruzando a área lesão com auxílio de disco diamantado montado em motor de baixa rotação sob irrigação com água. Os cortes iniciais foram submetidos a desgaste com jig de lapidação e lixas d'água (granulação de 240 a 1200) até uma espessura final de aproximadamente 0,1 mm. A verificação da espessura da amostra foi realizada através da realização de fotomicrografias digitais da amostra, em posição perpendicular a lâmina, em um microscópio óptico e com objetiva de 20x. Em seguida uma reticula foi também fotografada nas mesmas condições e com o freeware de análise de imagens Image J (ImageJ, NIH, USA) foi estabelecida uma relação pixel-micrômetro ( $\mu\text{m}$ ).

#### 4.4.4 Análise do volume mineral

O conteúdo mineral foi determinado através de análises em radiomicrografia transversal digital, que foram realizadas utilizando o equipamento Phoenix Pcba Inspector (General Eletric, Alemanha) com ânodo de tungstênio. Os parâmetros utilizados na realização das radiomicrografias foram: 40 kV, 0.25 mA, por 25 minutos. As amostras foram radiomicrografadas juntamente com uma escala de alumínio (10 placas com 20  $\mu\text{m}$  cada formando uma escala em batentes com espessuras entre 20 e 200  $\mu\text{m}$ ). Os resultados foram obtidos em arquivos de imagens digitais.

Os pontos histológicos analisados se encontravam distribuídos ao longo da camada superficial da lesão artificial/natural. Em cada lesão, foram coletados três pontos histológicos consecutivos na camada superficial com

distâncias de 50µm de um ponto ao seguinte, perfazendo um total de 90 pontos histológicos (30 pontos em cada grupo).

Um software livre (ImageJ, NIH, EUA) foi usado para determinar a média dos valores dos níveis de cinza (interpretados como a densidade óptica média) de cada uma das 10 referências de alumínio e dos pontos histológicos de interesse nas secções de esmalte. Uma correlação matemática entre densidade óptica média e espessura do alumínio foi determinada por um polinômio de quarta ordem. A partir desta correlação matemática, foi possível determinar à qual espessura de alumínio correspondente a densidade óptica de cada ponto histológico analisado.

O volume mineral (%) foi determinado usando a fórmula de Angmar; Carlstrom; Glas (1963):

$$V = \frac{\mu_{Al} \cdot t_{Al}}{\mu_m \cdot t_s} \cdot 100 \quad (1)$$

onde o coeficiente de absorção linear do alumínio ( $\mu_{Al}$ ) é 109,210 e o coeficiente de absorção linear do conteúdo mineral ( $\mu_m$ ) é 205,042  $t_{Al}$  é a espessura da placa de alumínio que apresenta a mesma densidade óptica do ponto histológico analisado na amostra e  $t_s$  é a espessura da amostra.<sup>1</sup>

Já foi relatado que o volume mineral determinado a partir dos níveis de cinza por software tem uma boa concordância com o volume mineral determinado pela densidade óptica obtida por densitômetro.

Para o cálculo do coeficiente de absorção linear do conteúdo mineral ( $\mu_m$ ), foi considerada a seguinte fórmula para a célula unitária da hidroxiapatita:  $Ca_{8.856}Mg_{0.088}Na_{0.292}K_{0.010}(PO_4)_{5.312}(HPO_4)_{0.280}(CO_3)_{0.407}(OH)_{0.702}Cl_{0.078}(CO_3)_{0.050}$ , possuindo a hidroxiapatita então uma densidade é de 2.99 g cm<sup>-3</sup>.

Este item da metodologia foi, então, realizado em duas etapas: uma curta, que envolve a realização das radiomicrografias e outra longa, que envolve a análise no microscópio óptico, realização de fotomicrografias, análises de níveis de cinza no software adequado e cálculo do volume mineral.

#### 4.4.5 Análises dos conteúdos de matéria orgânica e água

Cada amostra teve sua birrefringência em água medida por meio de uma técnica de microscopia de luz polarizada que independente da orientação da amostra e usa apenas um cristal líquido, conhecida como “single polscope”. Este sistema é composto por um filtro monocromático verde, dois polarizadores, um cristal líquido, e dois filtros de retardo de fase de um quarto de lambda. Desde a saída da luz da base do microscópio até a ocular, a seqüência dos itens (com as especificações usadas neste trabalho) é a seguinte: filtro verde de interferência de 546 nm (largura de banda de 10 nm; Edmund Optics, EUA), primeiro polarizador, cristal líquido coberto por filtro de um quarto de lambda acromático para 545 nm (liquid crystal polarization rotator, Meadowlark, EUA), amostra, segundo polarizador e o segundo filtro de retardo de um quarto de lambda acromático para 545 nm (Meadowlark, EUA). Todos os itens foram montados num microscópio óptico composto vertical de luz transmitida (modelo BA320, Motic, Canadá). Um gerador de funções (modelo AFG 2021-BR, Tektronix, EUA) foi acoplado ao cristal líquido através de um cabo elétrico para aplicar tensão e permitir rotação do eixo de polarização da luz. Uma câmera digital (Nikon D7000, Japão), no modo monocromático, acoplada ao microscópio completava o sistema. Todas as imagens foram obtidas com objetiva de 5X plana, de tubo infinito, fluorita e de luz polarizada (Carl Zeiss, Alemanha).

No arranjo inicial padrão, os dois polarizadores e o eixo lento do cristal líquido ficam paralelos entre si e os dois filtros de um quarto de lambda ficam paralelos entre si e a 45 graus dos polarizadores. O ângulo entre o primeiro polarizador e o eixo lento do primeiro filtro de um quarto de lambda, conhecido como ângulo beta (Shribak, 2011) e pode variar de 0 a 90 graus, determina o retardo de fase máximo mensurável pelo sistema. O retardo de fase máximo mensurável é dado pela razão entre o comprimento de onda de luz usado e o ângulo máximo (180 graus) entre o eixo lento do cristal líquido e um dos polarizadores. O ângulo máximo entre o eixo lento do cristal líquido e um dos polarizadores capaz de permitir medida de retardo de fase neste sistema é de 90 graus, de modo que o retardo de fase máximo mensurável pelo single polscope é de metade do comprimento de onda (273 nm). Para essa pesquisa, foi usado um ângulo beta de 87,4 graus, permitindo medir um retardo de fase máximo de 265

nm. O retardo de fase dividido pela espessura da amostra (em nm) e multiplicado pelo sinal da birrefringência resulta na birrefringência observada.

Neste sistema, a amostra fica numa dada posição e o retardo de fase de toda a área histológica incluída no campo de visão é medido ao mesmo tempo enquanto quatro estados de polarização da luz são transmitidos para a amostra. Estes quatro estados de polarização da luz são criados pelo gerador de estados de polarização (composto pelo primeiro polarizador e o cristal líquido coberto por filtro de um quarto de onda acromático) acionado por quatro tensões elétricas aplicadas. A aplicação dos estados de polarização dura cerca de 30 segundos, sendo este o parâmetro de resolução temporal. As tensões elétricas foram aplicadas ao cristal líquido através de um cabo elétrico ligando um gerador de funções operando com as seguintes configurações:

- onda quadrada;
- frequência de 2,0 kHz;
- unidade de voltagem de raiz quadrada da média dos quadrados (“*root mean square*”;  $V_{rms}$ );
- modo contínuo;
- 0  $V_{rms}$  (volts em “*root mean square*”) de corrente direta;
- voltagens sequenciais de 1,48, 1,79, 2,1 e 2,54  $V_{rms}$ , correspondendo aos ângulos 0, 45, 90, e 135 graus, respectivamente, da luz polarizada que ilumina a amostra, e sendo relacionadas ao algoritmo de quatro enquadramentos descrito por Shribak (2011).

A relação entre as voltagens e os ângulos de rotação da luz polarizada foi fornecida pelo fabricante do cristal líquido. As voltagens aplicadas foram aquelas necessárias para obter os estados de polarização requeridos para o algoritmo de quatro enquadramento descrito por Shribak (2011). As variações na intensidade de luz da amostra foram processadas por um algoritmo de quatro enquadramentos que resulta no retardo de fase e no azimute (ângulo de orientação) das estruturas birrefringentes (equação 25 de Shribak, 2011). O resultado é apresentado numa imagem digital. Neste projeto, a aplicação do algoritmo de quatro enquadramentos para obter a imagem final com os retardos de fase foi realizada com um aplicativo java especialmente desenvolvido por nossa equipe. Os valores dos retardos de fase em cada ponto histológico de

interesse foram coletados com auxílio de um software livre de análise de imagem (ImageJ, NIH, EUA).

A birrefringência do esmalte vista em microscopia de polarização, é a soma da birrefringência intrínseca (relacionada com a fase mineral e com índice de refração de 1,62) e da birrefringência forma (relacionada com a fase não mineral, teor de água e matéria orgânica, com índices de refração de 1,33 e 1,56, respectivamente).<sup>30</sup>

Para obtenção dos volumes de matéria orgânica e água a partir dos valores de birrefringência utilizamos o modelo proposto por Sousa; Vianna; Santos-Magalhães (2006), descrito a seguir.

A birrefringência observada ( $BR_{obs}$ ) experimental do esmalte dental será interpretada com base no seu ajuste como  $BR_{obs}$  teórica. Esta última é dada pela equação:

$$BR_{obs} = -0.0065AV_1 + \frac{V_1V_2(1-V_1)(n_1^2 - n_2^2)^2}{2(V_1n_1 + V_2n_2)[(1+V_1)n_2^2 + V_2n_1^2]} \quad (2)$$

onde  $V_1$  é o volume mineral,  $V_2$  é o volume não mineral,  $n_1$  é o índice de refração da fase mineral e  $n_2$  é o índice de refração da fase não mineral.<sup>28</sup>  $A$  é um fator de alinhamento dos cristalitos, cujo valor é 0,85. Segundo Sousa; Vianna, Magalhães (2006), o valor de  $n_2$  para o esmalte com matéria orgânica é dado por:

$$n_2 = 1.33 \frac{\alpha_1}{V_2} + n_i \frac{\alpha_2}{V_2} + 1.56 \frac{\beta}{V_2} \quad (3)$$

onde  $\alpha_1$  é a fração de volume de água remanescente no esmalte após secagem em ar à temperatura ambiente (25°C),  $\alpha_2$  é a fração de volume de água no esmalte removida por esse processo de secagem e  $\beta$  é a fração de volume de matéria orgânica. Esta equação é inserida na equação 3 para se obter a  $BR_{obs}$  teórica.

Para se obter o valor de  $V_2$  será aplicada a equação do volume não mineral:

$$V_2 = \alpha_1 + \alpha_2 + \beta \quad (4)$$

O valor de  $V_1$  foi obtido através da quantificação prévia em radiomicrografia. Como  $V_2 = 1 - V_1$ , é possível escrever todos os volumes parciais da fase não mineral ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  e  $\beta$ ) em função de  $V_1$ , quando obtidos os valores da  $B_{obs}$  em água e em ar. Pois no caso do ajuste da  $BR_{obs}$  teórica com a  $BR_{obs}$  experimental do esmalte imerso em água, tem-se duas incógnitas, " $\alpha = \alpha_1 + \alpha_2$ " e  $\beta$ , e duas equações ( $V_2 = \alpha + \beta$  e  $BR_{obs}$  teórica =  $BR_{obs}$  experimental). Dessa situação pode-se obter os volumes de matéria orgânica ( $\beta$ ) e água ( $\alpha = \alpha_1 + \alpha_2$ ) pelo modelo matemático. A partir da birrefringência experimental do esmalte imerso em ar, têm-se duas incógnitas,  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$ , e duas equações ( $BR_{obs}$  teórica =  $BR_{obs}$  experimental e  $\alpha = \alpha_1 + \alpha_2$ ). Dessa situação pode-se obter  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$ , completando a composição bioquímica do esmalte. O ajuste matemático é feito de modo que o conjunto de equações 3-6 tenha uma única solução (com a precisão de  $10^{-5}$  para  $BR_{obs}$  e de  $10^{-3}$  para  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  e  $\beta$ ).

#### 4.4.6 Análise de $\alpha_d$

O parâmetro de permeabilidade  $\alpha_d$  foi determinado pela equação:

$$\alpha_d = \left( \frac{\alpha}{V_2} \right) \cdot \alpha \quad (5)$$

onde alfa é multiplicado pela fração do volume não mineral preenchido por água.  $\alpha_d$  varia de 0 ( $V_2 = \alpha = \beta = 0$ ) a 1 ( $V_1 = 0$  e  $\beta = 0$ ).

Os dados obtidos experimentalmente nos grupos Gel, Solução e Cárie Natural foram comparados com valores teóricos estabelecidos.<sup>31</sup> Os volumes teóricos de água e matéria orgânica foram obtidos em função do volume mineral (Gráfico 1):

$$\alpha_1 = 0,1988 - 0,1652 \times V_1 \quad (6a)$$

$$\alpha_2 = 0,6987 - 1,2487 \times V_1 + 0,544 \times (V_1)^2 \quad (6b)$$

$$\beta = 0,086054 + 0,46808 \times V_1 - 0,584 \times (V_1)^2 \quad (6c)$$

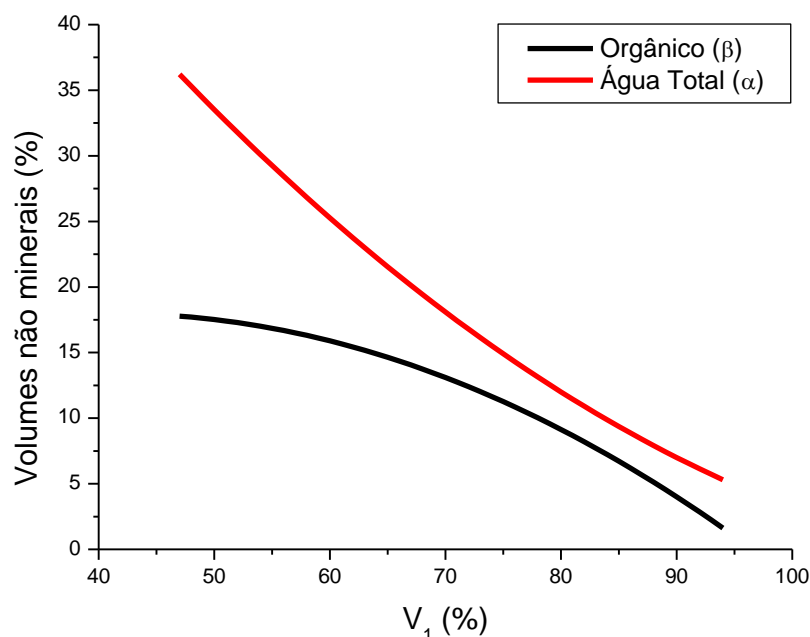


Gráfico 1. Representação gráfica das equações (6a-6c) para obtenção dos volumes não minerais teóricos com base no percentual de volume mineral ( $45\% < V_1 < 95\%$ ), de acordo com Sousa (2009).

Como critério de comparação entre os valores experimentais e teóricos para os volumes bioquímicos de cada grupo, utilizou-se o seguinte cálculo:

$$\text{Razão } \beta = \frac{\beta_{\text{EXPERIMENTAL}} - \beta_{\text{TEÓRICO}}}{\beta_{\text{TEÓRICO}}} \times 100 \quad (7a)$$

$$\text{Razão } \alpha_d = \frac{\alpha_d_{\text{EXPERIMENTAL}} - \alpha_d_{\text{TEÓRICO}}}{\alpha_d_{\text{TEÓRICO}}} \times 100 \quad (7b)$$

#### 4.4.7 Análise estatística

Os dados de volumes bioquímicos  $V_1$ ,  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\alpha_d$ , bem como a Razão  $\beta$  e Razão  $\alpha_d$  foram analisados no tocante à normalidade usando o teste de Shapiro-Wilk. Foi confirmada a distribuição normal para Razão  $\beta$  nos três grupos, portanto o teste de comparação utilizado foi o ANOVA fator único com pós-teste de Dunnett. Já para a Razão  $\alpha_d$ , a distribuição foi não normal para um dos grupos, o que implicou na realização do teste de Mann-Whitney. A magnitude do efeito (ME)

de cada cruzamento entre os três grupos para a Razão  $\beta$  e Razão  $\alpha_d$  foi determinada, segundo Grisson (2012), pelas equações:

$$ME = \frac{X_1 - X_2}{DP_{\text{médio}}} \quad (7)$$

para ANOVA (ME tipo “d” de Cohen, Grissom, 2012) onde  $X_1$  e  $X_2$  são as médias e  $DP_{\text{médio}}$  o desvio-padrão médio; e

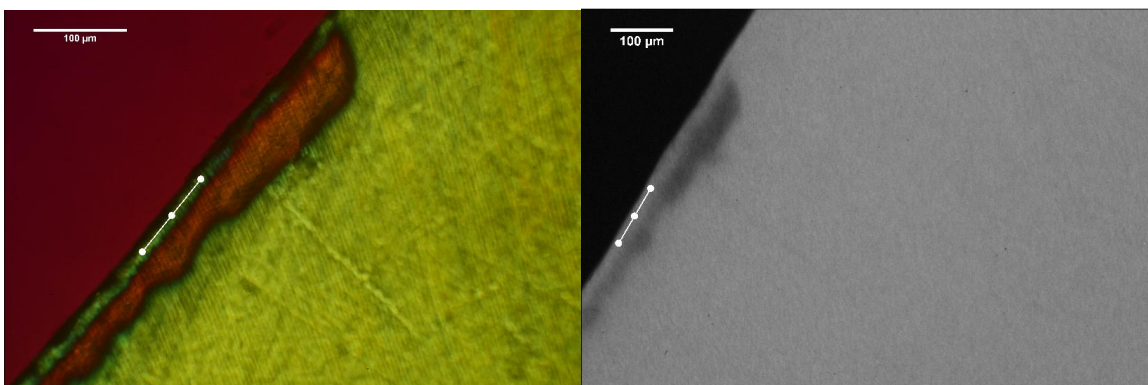
$$ME_{MW} = \frac{\text{Mediana}_1 - \text{Mediana}_2}{0,75 \times DIQ_{\text{médio}}} \quad (8)$$

para Mann-Whitney, onde  $DIQ_{\text{médio}}$  é a distância interquartil. O nível de significância utilizado nesse estudo foi de 5% e o intervalo de confiança de 95%. O teste de concordância de Bland & Altman foi usado para testar a concordância entre os experimentais e previstos dos valores volumes orgânicos e da permeabilidade para cada grupo.



## 5. RESULTADOS

Os três pontos escolhidos na camada superficial de cada lesão foram escolhidos de acordo com as imagens apresentadas em microscopia de luz polarizada e radiomicrografia (Figura 1).



**Figura 1.** Aspectos típicos de três pontos da camada superficial de lesão cariiosa artificial em microscopia de luz polarizada sob imersão em água (esquerda) e na radiomicrografia (direita). Barra de escala = 100 µm.

O maior percentual de volume mineral foi encontrado no grupo Solução, que apresentou média de  $81,85 \pm 2,27$  (Gráfico 2). Para o volume orgânico e de água total, no grupo Gel foram encontrados os maiores valores, sendo  $16,76 \pm 6,41$  e  $9,41 \pm 1,01$ , respectivamente. A maior permeabilidade ( $\alpha_d$ ) foi observada no grupo Solução ( $4,11 \pm 0,97$ ). A descrição estatística completa das medidas de tendência central, de dispersão e valores de normalidade dos volumes bioquímicos das lesões artificiais e naturais está representada na Tabela 1.

A diferença entre os valores experimental e teórico com relação aos volumes orgânico ( $\beta_{\text{EXPERIMENTAL}} - \beta_{\text{TEÓRICO}}$ ) e de permeabilidade  $\alpha_d$  ( $\alpha_{d \text{ EXPERIMENTAL}} - \alpha_{d \text{ TEÓRICO}}$ ) estão representados através de gráficos de Bland & Altman (Gráficos 3-8).

A Razão  $\beta$  de maior valor foi encontrada no grupo Gel ( $46,55 \pm 14,85$ ), já para a Razão  $\alpha_d$  o grupo Solução apresentou medidas mais elevadas ( $-36,06 \pm 25,89$ ), conforme mostra a Tabela 2.

Comparados os grupos entre si na variável Razão  $\beta$ , houve diferença significativa entre os grupos Gel/Solução ( $p < 0,0001$ ;  $ME = 1,84$ ) e Solução/Cárie Natural ( $p = 0,001$ ;  $ME = 0,46$ ). Da mesma forma, os valores da Razão  $\alpha_d$  do cruzamento Gel/Solução ( $p < 0,0001$ ;  $ME = 0,96$ ) e Solução/Cárie Natural

( $p < 0,0001$ ;  $ME = 1,15$ ) diferiram de maneira significativa. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos Gel e Cárie Natural para a Razão  $\beta$  ( $p = 0,585$ ;  $ME = 0,30$ ) e Razão  $\alpha_d$  ( $p = 0,940$ ;  $ME = 0,01$ ), conforme Tabela 3 e 4.

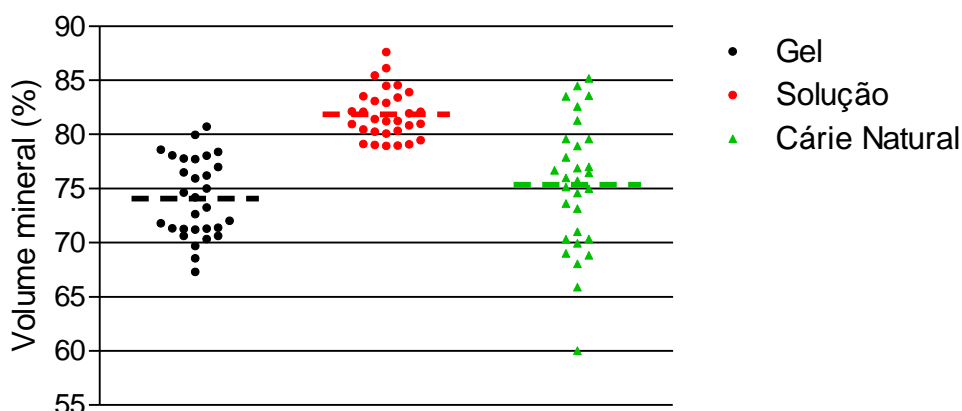


Gráfico 2. Volumes minerais dos pontos analisados separados por grupos. Média representada por linha tracejada.

Tabela 1. Estatística dos volumes bioquímicos da camada superficial de lesões artificiais (Gel e Solução) e naturais de cárie.

Volume	n	Média (%)	Desvio-Padrão	Mediana (%)	Distância Interquartil	Significância Estatística*
<b>Gel</b>						
Mineral	30	74,06	3,64	73,71	6,50	0,188
Orgânico	30	16,53	3,60	16,76	6,41	0,111
Água	30	9,41	1,01	9,53	1,35	0,150
$\alpha_d$	30	3,50	0,75	3,76	1,00	0,004
<b>Solução</b>						
Mineral	30	81,85	2,27	81,32	3,23	0,108
Orgânico	30	9,66	2,02	10,28	3,16	0,071
Água	30	8,49	0,59	8,44	0,85	0,380
$\alpha_d$	30	4,02	0,52	4,11	0,97	0,010
<b>Cárie Natural</b>						
Mineral	30	76,38	5,96	76,89	9,22	0,651
Orgânico	30	14,28	5,75	13,71	8,73	0,570
Água	30	9,34	1,16	9,41	1,32	0,859
$\alpha_d$	30	3,91	1,14	3,75	1,92	0,141
<b>Total</b>	<b>90</b>					

\*Valor p do teste de normalidade Shapiro-Wilk

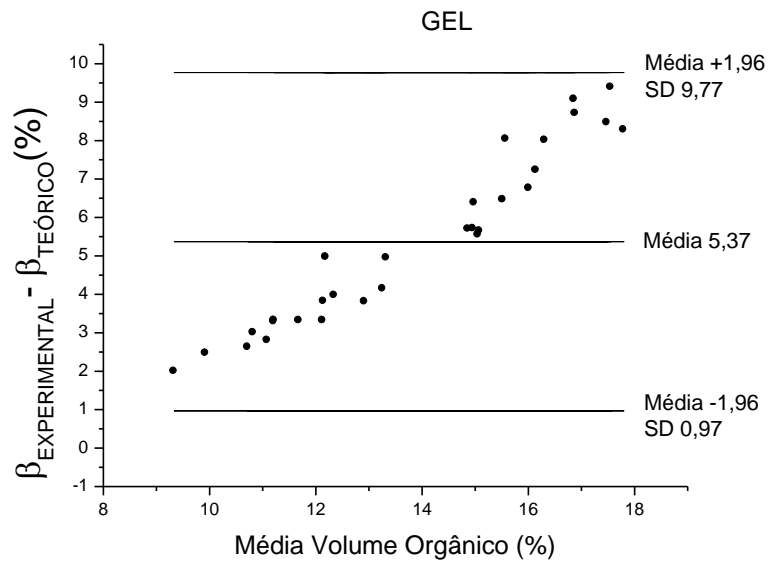


Gráfico 3. Gráfico de Bland & Altman mostrando uma comparação entre as diferenças dos volumes orgânicos experimental (Gel) e teórico e as suas respectivas médias.

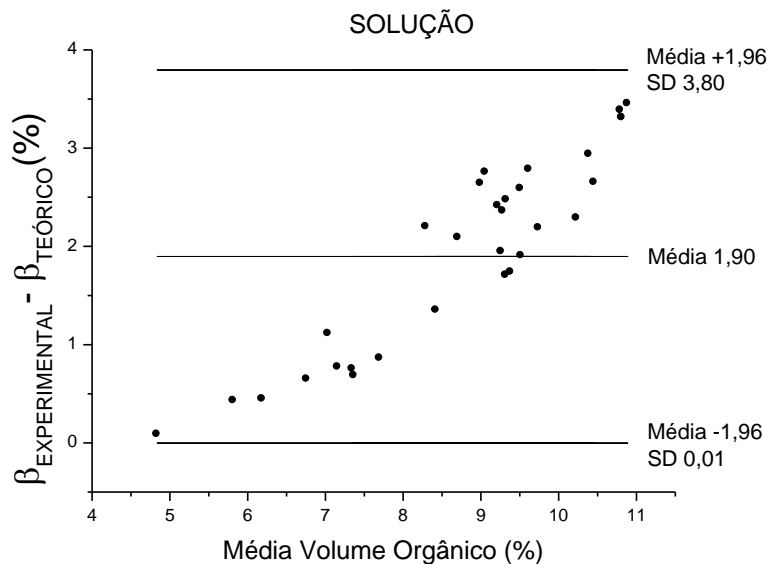


Gráfico 4. Gráfico de Bland & Altman mostrando uma comparação entre as diferenças dos volumes orgânicos experimental (Solução) e teórico e as suas respectivas médias.

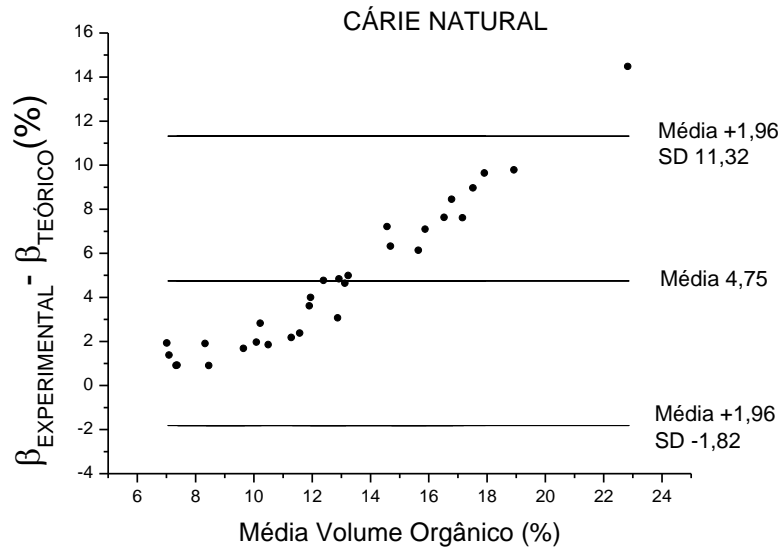


Gráfico 5. Gráfico de Bland & Altman mostrando uma comparação entre as diferenças dos volumes orgânicos experimental (Cárie Natural) e teórico e as suas respectivas médias.

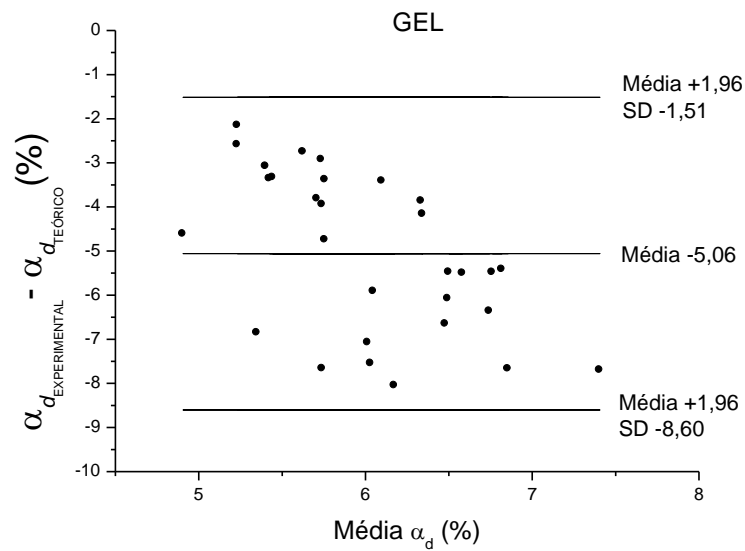


Gráfico 6. Gráfico de Bland & Altman mostrando uma comparação entre as diferenças de permeabilidade  $\alpha_d$  experimental (Gel) e teórico e as suas respectivas médias.

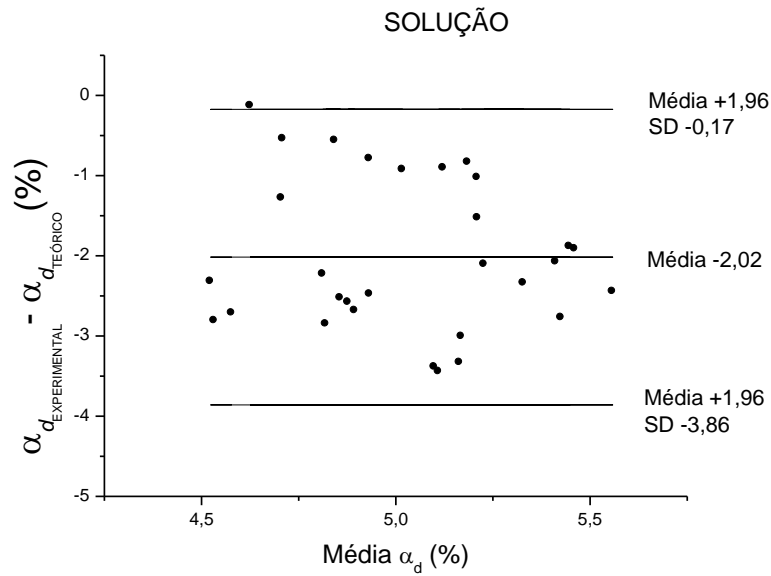


Gráfico 7. Gráfico de Bland & Altman mostrando uma comparação entre as diferenças de permeabilidade  $\alpha_d$  experimental (Solução) e teórico e as suas respectivas médias.

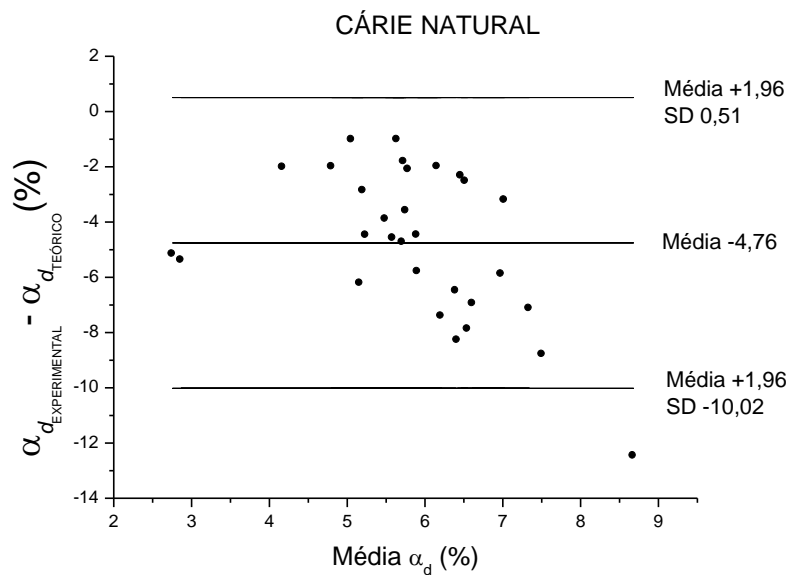


Gráfico 8. Gráfico de Bland & Altman mostrando uma comparação entre as diferenças de permeabilidade  $\alpha_d$  experimental (Cárie Natural) e teórico e as suas respectivas médias.

**Tabela 2. Estatística das Razões  $\beta$  e  $\alpha_d$  da camada superficial de lesões artificiais (Gel e Solução) e naturais de cárie.**

	<b>Gel</b>	<b>Solução</b>	<b>Cárie Natural</b>	
<b>Razão <math>\beta</math></b>	<b>Média (%)</b>	46,55	23,27	41,09
	<b>Desvio-Padrão</b>	14,85	10,5	21,47
	<b>Mediana (%)</b>	45,75	25,24	40,78
	<b>Distância Interquartil</b>	24,33	20,13	36,59
	<b>Mínimo (%)</b>	23,9	1,79	10,54
	<b>Máximo (%)</b>	73,54	37,65	92,16
	<b>Valor p*</b>	0,089	0,058	0,170
<b>Razão <math>\alpha_d</math></b>	<b>Média (%)</b>	-57,49	-32,37	-55,08
	<b>Desvio-Padrão</b>	13,33	13,68	22,17
	<b>Mediana (%)</b>	-58,08	-36,06	-58,47
	<b>Distância Interquartil</b>	21,54	25,89	40,03
	<b>Mínimo (%)</b>	-80,1	-50,43	-96,93
	<b>Máximo (%)</b>	-34,16	-2,82	-16,63
	<b>Valor p*</b>	0,244	0,035	0,425

\*Valor p do teste de normalidade Shapiro-Wilk

**Tabela 3. Comparação estatística (Diferença entre as médias, Intervalo de Confiança 95%, Valor p e Magnitude de Efeito) entre os três grupos quanto à Razão  $\beta$ .**

<b>Razão <math>\beta</math></b>		<b>Gel</b>	<b>Solução</b>	<b>Cárie Natural</b>
<b>Gel</b>	<b>Diferença</b>	-	23,29 $\pm$ 3,32	5,46 $\pm$ 4,77
	<b>IC 95%</b>	-	(15,11 ; 31,47)	(-6,29 ; 17,21)
	<b>Valor p*</b>	-	<0,0001	0,585
	<b>ME</b>	-	1,84	0,30
<b>Solução</b>	<b>Diferença</b>	-23,29 $\pm$ 3,32	-	-17,83 $\pm$ 4,36
	<b>IC 95%</b>	(-31,47 ; -15,11)	-	(-28,66 ; -6,99)
	<b>Valor p*</b>	<0,0001	-	0,001
	<b>ME</b>	1,84	-	0,46
<b>Cárie Natural</b>	<b>Diferença</b>	-5,46 $\pm$ 4,77	17,83 $\pm$ 4,36	-
	<b>IC 95%</b>	(-17,21 ; 6,29)	(6,99 ; 28,66)	-
	<b>Valor p*</b>	0,585	0,001	-
	<b>ME</b>	0,30	0,46	-

\*ANOVA fator único e pós-teste de Dunnett

**Tabela 4. Comparação estatística (Diferença entre as médias, Intervalo de Confiança 95%, Valor p e Magnitude de Efeito) entre os três grupos quanto à Razão  $\alpha_d$ .**

Razão $\alpha_d$		Gel	Solução	Cárie Natural
Gel	Diferença	-	-25,12 ± 3,49	-2,40 ± 4,72
	IC 95%	-	(-33,68 ; -16,56)	(-14,08 ; 9,27)
	Valor p*	-	<0,0001	0,940
	ME	-	0,96	0,01
Solução	Diferença	25,12 ± 3,49	-	22,71 ± 4,76
	IC 95%	(16,56 ; 33,68)	-	(10,97 ; 34,46)
	Valor p*	<0,0001	-	<0,0001
	ME	0,96	-	1,15
Cárie Natural	Diferença	2,40 ± 4,72	-22,71 ± 4,76	-
	IC 95%	(-9,27 ; 14,08)	(-34,46 ; -10,97)	-
	Valor p*	0,940	<0,0001	-
	ME	0,01	1,15	-

\*Teste de Mann-Whitney

A representação em forma de diagrama de caixa dos valores obtidos para a Razão  $\beta$  e Razão  $\alpha_d$  nos três grupos estão mostrados nos Gráficos 9 e 10.

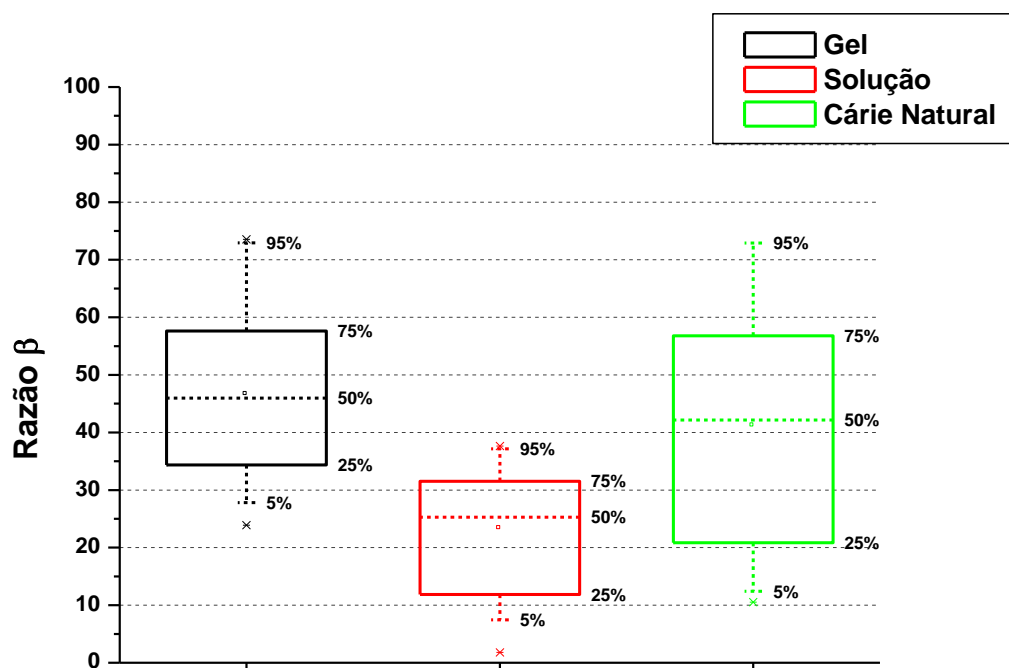


Gráfico 9. Diagrama de caixa mostrando a distribuição dos valores de Razão  $\beta$  para os três grupos analisados, mostrando média (ponto central), mediana (tracejado horizontal), DIQ (altura da caixa) e valores máximo e mínimo.

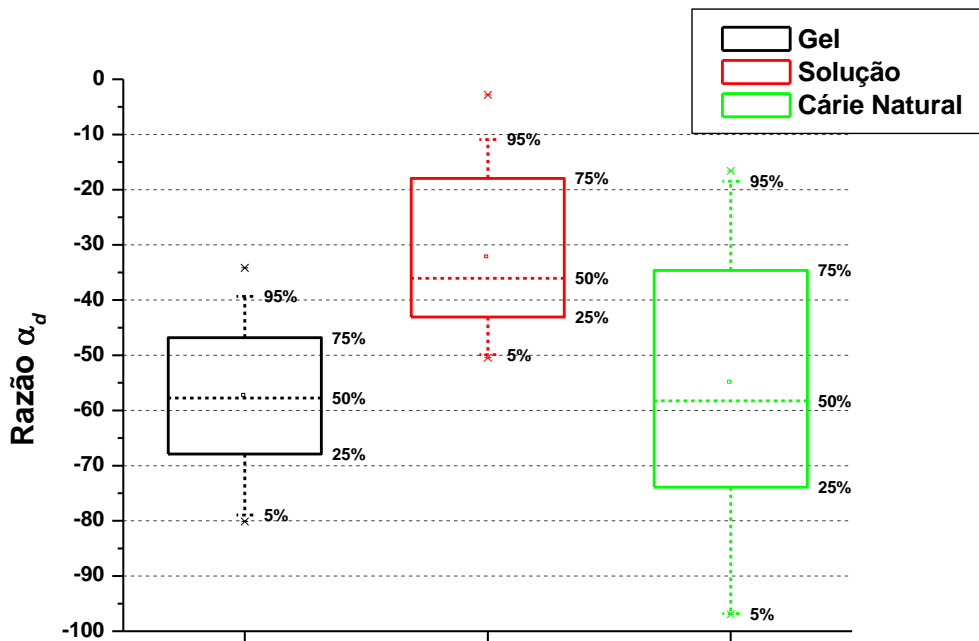


Gráfico 10. Diagrama de caixa mostrando a distribuição dos valores de Razão  $\alpha_d$  para os três grupos analisados, mostrando média (ponto central), mediana (tracejado horizontal), DIQ (altura da caixa) e valores máximo e mínimo.



## 6. DISCUSSÃO

A produção de lesões cariosas artificiais de esmalte é um procedimento bastante utilizado na literatura com o intuito de mimetizar o que ocorre naturalmente e, assim, estudar a patogênese do processo carioso e testar novos procedimentos e produtos visando remineralizar e infiltrar as lesões com resinas de baixa viscosidade. É extremamente importante saber o quão próximo da situação natural estão as lesões artificiais.

O grupo experimental que apresentou valores mais próximos do grupo Cárie Natural foi o Gel. Para as variáveis estudadas, não houve diferença significativa entre eles.

Os volumes minerais encontrados variaram significativamente entre os grupos Gel e Solução, sugerindo um menor poder de desmineralização por parte da solução ácida, já que o tempo utilizado foi o mesmo para ambos os grupos. É possível que esses valores se aproximem, caso um aumento no tempo de indução no grupo Solução seja proporcionado. No presente estudo, o fato dos volumes minerais não estarem exatamente na mesma faixa nos grupos comparados pode ser um fator a influenciar a comparação feita com matéria orgânica e permeabilidade. No entanto, esse ponto foi solucionado no nosso estudo a partir do momento em que os valores experimentais (de matéria orgânica e permeabilidade) de cada grupo foram relacionados aos seus respectivos valores teóricos previstos (obtidos matematicamente em função do volume mineral).<sup>31</sup>

Foi observado que as lesões artificiais criadas com gel apresentaram mais matéria orgânica que o esmalte normal, cujo volume orgânico é em média 2%.<sup>4</sup> A explicação mais provável é que o excesso de matéria orgânica tenha vindo de uma fonte externa, no caso, o gel ácido.

No grupo Solução, esperava-se inicialmente que o volume desmineralizado fosse preenchido predominantemente por água. Entretanto, quando observados os valores brutos dos volumes orgânico e de água, verificou-se que, mesmo a solução não tendo um componente fortemente orgânico como a hidroxietilcelulose, um percentual razoável de matéria orgânica ( $9,66 \pm 2,02$ ) foi obtido. Isso sugere uma participação de componentes orgânicos presentes na

própria composição da solução ácida, como é o caso do ácido lático (ácido orgânico) e do clorofórmio.

Realizada a padronização do volume orgânico por meio da utilização da variável Razão  $\beta$ , foram encontrados percentuais de  $46,55 \pm 14,85$  (Gel),  $23,27 \pm 10,50$  (Solução) e  $41,09 \pm 21,47$  (Cárie Natural), demonstrando que o gel se aproximou mais do que ocorre naturalmente na cárie, o que não foi observado na solução. A diferença entre o teor orgânico que é encontrado nas lesões naturais de cárie e aquele quantificado em lesões artificiais deve ser tomada em consideração, principalmente quando se analisam determinados métodos utilizados em experimentos laboratoriais que objetivem extrapolar seus achados para a prática clínica.

O aumento de matéria orgânica traz importantes implicações para a difusão de materiais nos poros do esmalte. A água livre do esmalte é dividida em água fortemente aderida e água fracamente aderida, sendo esta última removida com mais energia que a primeira<sup>27</sup>. A maior parte da água fracamente aderida está localizada nas bainhas dos prismas, onde os poros são maiores e onde a taxa de difusão é maior.<sup>9,27</sup> Uma vez que o volume orgânico é relacionado ao volume de água fracamente aderida<sup>30</sup>, é provável que a difusão seja alterada quando há um aumento de matéria orgânica.

Aqui testamos um parâmetro de permeabilidade por meio da Razão  $\alpha_d$ , cujos percentuais encontrados foram de  $-57,49 \pm 13,33$  (Gel),  $-32,37 \pm 13,68$  (Solução) e  $-55,08 \pm 22,17$  (Cárie Natural). Portanto, os pontos analisados do grupo Solução apresentaram maior permeabilidade que o da Cárie Natural, o que pode indicar uma diferença na penetração de agentes remineralizantes e resinas fluidas em lesões artificiais induzidas por substâncias com pouca substância orgânica, comparadas com as lesões naturais.<sup>6</sup>

Estes resultados ressaltam, mais uma vez, a importância de se considerar a quantidade de matéria orgânica como fator determinante na indução de cárie artificial, além de um pH capaz de desmineralizar.

A quantidade de matéria orgânica na camada superficial tem sido tema debatido em estudos envolvendo remineralização e infiltração.<sup>6,20</sup> Atualmente, percebe-se uma maior atenção para a infiltração dos poros do esmalte cariado com materiais resinosos objetivando bloquear a progressão da lesão.<sup>20,22</sup> Um método eficaz para aumentar a porosidade interprismática da camada superficial

da lesão, sem que seja feito o condicionamento ácido, seria a utilização de agentes desproteinizantes.<sup>6</sup>

A preocupação para com a análise do volume orgânico e da permeabilidade constitui um fator que deve ser considerado. Em estudos que avaliem a penetrabilidade de materiais e/ou substâncias nos poros do esmalte, a escolha apropriada do agente desmineralizador deve ser condição necessária para que pesquisas com cárie induzida artificialmente sejam válidas e representem, com a maior fidedignidade possível, o que acontece clinicamente no esmalte dentário.

## **7. CONCLUSÃO**

Pode-se concluir que, semelhantemente à cárie natural, a camada superficial das lesões cariosas artificiais de esmalte criadas com gel ácido apresentaram maior volume orgânico e menor permeabilidade, comparadas às induzidas em solução ácida com pouco constituinte orgânico.

## REFERÊNCIAS

1. Angmar B, Carlstrom D, Glas JE . Studies on the ultrastructure of dental enamel. IV. The mineralization of normal human enamel. J Ultrastruct 1963; 8: 12-23.
2. Angmar-Mansson B. A polarization microscopic and micro X-ray diffraction study on the organic matrix of developing human enamel. Arch Oral Biol 1971; 16(12): 2147-156.
3. Atkinson HF. An investigation into the permeability of human enamel using osmotic methods. Br Dent J 1947; 83: 205–214.
4. Barbosa de Sousa F, Dias Soares J, Sampaio Viana S. Natural Enamel Caries: A Comparative Histological Study on Biochemical Volumes. Caries Res. 2013; 47:183–192.
5. Carlström D, Glas JE, Angmar B. Studies on the ultrastructure of dental enamel IV. The state of water in human enamel. J Ultrastruct Res 1963; 8: 24-29.
6. Cochrane NJ, Cai F, Huq NL, Burrow MF, Reynolds EC. New approaches to enhance remineralization of tooth enamel. J Dent Res 2010; 89: 1187-1197.
7. Darling AI. The selective attack of caries on the dental enamel. Ann R Coll Surg Engl 1961; 29: 354–369.
8. Darling AI. Studies of the early lesion of enamel caries of transmitted light, polarized light and radiography. Br Dent J 1956; 101: 289-297.
9. Dibdin GH. The water in human dental enamel and its diffusional exchange measured by clearance of tritiated water from enamel slabs of varying thickness. Caries Res. 1993; 27(2): 81-86.
10. Fejerskov O, Kidd E. Cárie: A doença e seu tratamento clínico. 2 ed. São Paulo: Santos; 2011.
11. Grissom RJ. Effect sizes for research: univariate and multivariate applications New York: Taylor & Francis; 2012.
12. He LH, Swain MV. A functionally graded natural coating. Journal of Dentistry 2009; 37: 596-603.
13. He LH, Swain MV. Understanding the mechanical behavior of human enamel from its structural and compositional characteristics. J Mech Behav of Biomed. Mater 2008; 1(1): 18-29.
14. He LH. Mechanical Behaviour Of Human Enamel And The Relationship To Its Structural And Compositional Characteristics. Sydney. Thesis. Faculty of Dentistry, Sydney University, 2008.
15. Kerebel B, Daculsi G, Kerebel LM. Ultrastructural studies of enamel crystallites. J Dent Res 1979; 57: 306-312.
16. Landis JR, Koch GG. The Measurement of Observer Agreement for Categorical Data. Biometrics 1977; 33(1): 159-174.
17. Margolis, H.C.; Moreno, E.C.; Murphy, B.J. Effect of low levels of fluoride in solution on enamel demineralization *in vitro*. J Dent Res 1986; 65: 23-29.
18. Margolis HC, Zhang YP, Lee CY, Kent RL, Moreno EC. Kinetics of enamel demineralization *in vitro*. J Dent Res 1999; 78: 1326-1335.
19. Medeiros RCG, Soares JD, Sousa FB. Natural enamel caries in polarized light microscopy: differences in histopathological features derived from a qualitative versus a quantitative approach to interpret enamel birefringence. Journal of Microscopy 2012; 246(2): 177-189.

20. Meyer-Lueckel H, Paris S. Improved resin infiltration of natural caries lesions. *J Dent Res* 2008; 87: 1112-1116.
21. Moreno EC, Zahradnik RT. The pore structure of human dental enamel. *Arch Oral Biol* 1973; 18(8): 1063-1068.
22. Paris S, Meyer-Lueckel H. Inhibition of caries progression by resin infiltration in situ. *Caries Res* 2010; 44: 47–54.
23. Robinson C, Weatherell JA, Hallsworth AS. Variations in the composition of dental enamel within thin ground sections. *Caries Res* 1971; 5: 44-57.
24. Robinson C, Hallsworth AS, Shore RC, Kirkham J. Effect of surface zone deproteinisation on the access of mineral ions into subsurface carious lesions of human enamel. *Caries Res* 1990; 24: 226-230.
25. Sakae T, Suzuki K, Kozawa Y. *Tooth Enamel Microstructure: A short review of studies on chemical and physical properties of enamel crystallites*. Rotterdam: Balkema; 1997.
26. Shellis RP. A scanning electron-microscopic study of solubility variations in human enamel and dentine. *Arch Oral Biol* 1996; 41: 473–484.
27. Shellis RP, Dibdin GH. Enamel microporosity and its functional implications; In: Teaford MF, Smith MM, Ferguson MWJ (eds): *Development, Function and Evolution of Teeth*. New York, Cambridge University Press, 2000, 242–251.
28. Shirbak M. Complete polarization state generator with one variable retarder and its application for fast and sensitive measuring of two dimensional birefringence distribution. *Journal of the Optical Society of America A* 2011; 28(3): 410-419.
29. Silverstone LM. Structure of Carious Enamel, Including the Early Lesion. *Oral. Sci. Rev.* 1973; 3: 100-160.
30. Sousa FB, Vianna SS, Santos-Magalhães NS. A new approach for improving the birefringence analysis of dental enamel mineral content from polarizing microscopy. *J Microsc* 2006; 221(2): 79-83.
31. Sousa FB, Vianna SS, Santos-Magalhães NS. Dental enamel birefringence for a wide mineral content range and for different immersion media's refractive indexes: an improved mathematical interpretation. *J Microsc* 2009; 23(1): 69-75.
32. Theuns HM, Shellis RP, Groeneveld A, Van Dijk JWE, Polle DFG. Relationships between birefringence and mineral content in artificial caries lesion of enamel. *Caries Res* 1993; 27: 9-14.
33. Zahradnik RT, Moreno EC. Structural features of human dental enamel as revealed by isothermal water vapour sorption. *Arch Oral Biol* 1975; 20(5-6): 317-325.

## ANEXO

**Tabela 5. Descrição detalhada dos volumes bioquímicos e permeabilidade  $\alpha_d$  para os três grupos analisados.**

Pontos	Gel				Solução				Cárie Natural			
	$V_1$	$\beta$	$\alpha$	$\alpha_d$	$V_1$	$\beta$	$\alpha$	$\alpha_d$	$V_1$	$\beta$	$\alpha$	$\alpha_d$
1	71,79	17,82	10,39	3,83	80,98	10,80	8,22	3,55	72,06	18,54	9,41	3,17
2	72,03	17,72	10,25	3,76	81,23	10,57	8,20	3,59	76,19	14,85	8,97	3,38
3	70,33	19,39	10,28	3,56	81,21	10,46	8,33	3,69	78,06	13,06	8,88	3,59
4	76,99	13,34	9,67	4,07	83,89	7,55	8,56	4,55	77,72	12,82	9,46	4,02
5	77,76	12,49	9,75	4,27	84,54	7,09	8,37	4,54	76,75	14,45	8,80	3,33
6	78,39	12,03	9,58	4,25	85,44	6,41	8,15	4,56	76,02	14,55	9,42	3,70
7	69,68	22,25	8,07	2,15	86,12	6,03	7,85	4,44	78,93	10,54	10,54	5,27
8	71,25	20,31	8,44	2,48	87,60	4,88	7,52	4,56	82,33	8,02	9,66	5,27
9	70,62	21,24	8,14	2,26	84,46	7,59	7,95	4,07	84,61	5,97	9,42	5,76
10	73,23	19,60	7,17	1,92	79,07	12,49	8,44	3,41	79,97	10,19	9,85	4,84
11	77,72	14,67	7,61	2,60	78,95	12,47	8,58	3,50	69,09	20,08	10,83	3,80
12	71,19	21,40	7,41	1,91	78,94	12,61	8,45	3,39	71,37	17,83	10,80	4,07
13	78,06	12,88	9,06	3,74	80,23	10,47	9,30	4,37	77,49	11,49	11,03	5,40
14	76,20	14,33	9,47	3,77	79,11	11,37	9,52	4,33	77,03	11,88	11,09	5,35
15	76,49	14,05	9,46	3,80	80,34	10,25	9,41	4,50	74,67	13,52	11,81	5,50
16	67,28	21,93	10,79	3,56	80,82	10,23	8,95	4,17	70,97	19,46	9,56	3,15
17	71,37	17,90	10,73	4,02	79,01	11,78	9,21	4,04	66,92	22,93	10,15	3,12
18	71,31	17,83	10,86	4,11	81,94	9,10	8,96	4,45	61,09	29,19	9,73	2,43
19	80,72	10,33	8,95	4,16	80,95	11,01	8,04	3,39	74,20	16,96	8,84	3,03
20	79,96	11,16	8,88	3,94	81,40	10,42	8,18	3,59	71,40	20,13	8,47	2,51
21	78,58	12,32	9,10	3,86	82,12	9,75	8,13	3,70	77,93	13,89	8,18	3,03
22	68,54	21,72	9,74	3,02	83,50	7,72	8,78	4,67	84,54	6,94	8,52	4,69
23	71,29	18,75	9,96	3,45	83,39	7,71	8,90	4,77	80,62	9,60	9,78	4,93
24	70,62	19,76	9,62	3,15	82,91	8,13	8,96	4,70	85,52	5,13	9,35	6,04
25	72,63	18,17	9,20	3,09	80,44	10,17	9,39	4,50	86,20	7,09	6,70	3,26
26	78,04	12,85	9,11	3,78	79,47	11,86	8,67	3,66	80,62	10,75	8,63	3,84
27	75,00	15,80	9,20	3,38	80,06	10,84	9,10	4,16	83,61	8,39	7,99	3,90
28	75,93	13,79	10,28	4,39	82,08	10,43	7,49	3,13	75,63	17,29	7,08	2,06
29	74,18	15,33	10,49	4,26	83,06	9,39	7,55	3,36	70,04	21,11	8,84	2,61
30	74,61	14,82	10,57	4,40	82,09	10,32	7,59	3,22	69,88	21,85	8,27	2,27

## APÊNDICE

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**LAMIB/DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA**

*Termo de consentimento livre e esclarecido*

Prezado voluntário, esta pesquisa tem como título **“INFLUÊNCIA DO TIPO DE AGENTE DESMINERALIZADOR (GEL E SOLUÇÃO) NO VOLUME ORGÂNICO E NA PERMEABILIDADE DE LESÕES CARIOSAS ARTIFICIAIS DE ESMALTE”** e está sendo desenvolvido pelo cirurgião-dentista **DANILO AUGUSTO DE HOLANDA FERREIRA**, mestrando em Odontologia da Universidade Federal da Paraíba, sob orientação de **FREDERICO BARBOSA DE SOUSA**, professor doutor do Departamento de Morfologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba.

O objetivo deste estudo laboratorial é o de analisar se tipo substância utilizada para induzir cárie artificial influencia na quantidade de matéria orgânica e na permeabilidade dessas lesões.

A finalidade deste trabalho é aprimorar o conhecimento sobre o transporte de substâncias químicas dentro da cárie, visando melhorar o conhecimento sobre a cárie e como melhorar o tratamento com medicamentos e sem uso de broca.

A sua participação na pesquisa consistirá em doar um dente extraído por razões de saúde identificadas pelo cirurgião-dentista que lhe prestou assistência odontológica. Todas as partes moles (que contêm células, sangue e material genético) dos dentes serão descartadas e não serão usadas. O dente doado ficará guardado com o pesquisador até 3 anos a contar da data de assinatura deste documento. Solicitamos sua autorização para usar, durante o período de 3 (três) anos, o material doado em outros estudos que sejam importantes para desenvolver o tratamento mencionado acima. Após este período de 3 anos, o dente será aquecido a 900° C por duas horas, em seguida triturado até formar um pó e desprezado no sistema de esgotamento sanitário da cidade.

Sua participação 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 (quando for o caso).

Nesta pesquisa, o(a) senhor(a) não poderá se certificar pessoalmente de todas as análises a serem feitas nos laboratórios com o material doado.



Solicito sua permissão para apresentar os resultados deste estudo em eventos da área de saúde e publicar em revista científica. Por ocasião da publicação dos resultados, seu nome será mantido em sigilo.

O(s) pesquisador(es) estará(ão) à sua disposição para qualquer esclarecimento que considere necessário em qualquer etapa da pesquisa, inclusive para informar as conclusões finais.

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

\_\_\_\_\_  
Assinatura do(a) Pesquisador(a) Responsável

\_\_\_\_\_  
Assinatura do(a) Pesquisador(a) Participante

OBS: (em caso de analfabeto - acrescentar)

\_\_\_\_\_  
Assinatura da Testemunha

Local: \_\_\_\_\_, data \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_

Endereço (Setor de Trabalho) do Pesquisador Responsável:

Frederico Barbosa de Sousa (matrícula UFPB/Siape 2196437), Departamento de Morfologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, Campus I, João Pessoa, Paraíba.

Telefone para contato: (0xx83) 32167254 (Depto de Morfologia/CCS/UFPB).

Qualquer dúvida, entre em contato com o CEP/HULW no 4º andar do Hospital Universitário Lauro Wanderley da Universidade Federal da Paraíba, cidade universitária, João Pessoa, fone 3216-7964