

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

CAROLINE SIMÃO SARTI

DESEMPENHO DO DIAGNODENT PEN NA DETECÇÃO E NO
MONITORAMENTO DE LESÕES ARTIFICIAIS DE CÁRIE NÃO
CAVITADAS EM SUPERFÍCIES LISAS

Porto Alegre
2013

CAROLINE SIMÃO SARTI

DESEMPENHO DO DIAGNODENT PEN NA DETECÇÃO E NO
MONITORAMENTO DE LESÕES ARTIFICIAIS DE CÁRIE NÃO
CAVITADAS EM SUPERFÍCIES LISAS

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação
em Odontologia da Faculdade de
Odontologia da Universidade Federal
do Rio Grande do Sul, como requisito
parcial para obtenção do título de
Cirurgião-Dentista.

Orientador: Jonas de Almeida
Rodrigues

Porto Alegre
2013

CIP – Catalogação na Publicação

Sarti, Caroline Simão

Desempenho do DIAGNODent Pen na detecção e no monitoramento de lesões artificiais de cárie não cavitadas em superfícies lisas / Caroline Simão Sarti. – 2013. 27 f.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Odontologia, Curso de Graduação em Odontologia, Porto Alegre, BR-RS, 2013.

Orientador: Jonas de Almeida Rodrigues

1. Cárie dentária. 2. Desmineralização de dente. 3. Fluorescência. I. Rodrigues, Jonas de Almeida. II. Título.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, pelo amor incondicional e por me ensinarem que o conhecimento é um bem precioso,

Às minhas irmãs, pela amizade e companheirismo de sempre,

Ao professor Jonas, pelo aprendizado, amizade, confiança, dedicação e empenho na orientação deste trabalho,

Ao professor Rodrigo pela paciência e importante contribuição,

À querida Luisa Mercado pela boa vontade e por sempre estar disponível,

Aos professores Fabrício e Vicente pela contribuição,

Aos amigos e colegas de graduação pela amizade,

A todos que colaboraram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

RESUMO

SARTI, Caroline S. **Desempenho do DIAGNOdent Pen na detecção e no monitoramento de lesões artificiais de cárie não cavitadas em superfícies lisas.** 2013. 27 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

Este trabalho teve como objetivo avaliar o desempenho da fluorescência a laser (DIAGNOdent pen, Kavo, Alemanha) na detecção e no monitoramento de lesões de cárie não cavitadas induzidas artificialmente. Foram utilizados 52 blocos de esmalte de dentes bovinos, os quais foram submetidos a dois ciclos de desmineralização utilizando cepas de *S. mutans*, *L. casei* e *A. naeslundii*. Cada espécie foi cultivada em ágar sangue por 48 horas. Recipientes com 30 ml de TSB com 0,5% de sacarose e 0,4 ppm de flúor receberam 10ml cada do inóculo multiespécie. Esses recipientes receberam os blocos e foram incubados por 48 horas. Após esta etapa os blocos foram adicionados individualmente a tubos contendo NaCl a 0,9% cada e agitados por 30 segundos. Após cada ciclo de desmineralização, os blocos tiveram suas superfícies submetidas ao sistema de espectroscopia RAMAN. Antes e após cada ciclo de desmineralização os blocos foram submetidos às medidas de microdureza superficial (Knoop) e de fluorescência a laser foram realizadas. Os valores médios de microdureza (\pm DP) foram $319,3 \pm 21,5$ (inicial), $80,5 \pm 31,9$ (1º ciclo) e $39,8 \pm 12,7$ (2º ciclo), com diferença estatisticamente significativa entre os três períodos. (teste t; $p < 0,01$). Os valores de fluorescência foram $4,3 \pm 1,5$ (inicial), $7,5 \pm 9,4$ (1º ciclo) e $7,1 \pm 7,1$ (2º ciclo), diferindo os períodos inicial e 1º ciclo (teste t; $p = 0,014$). Não foi observada correlação (Coeficiente de Pearson) entre as medidas de fluorescência e a variação da microdureza (Δ KHN) nos três períodos de avaliação. Pode-se concluir que a fluorescência a laser foi efetiva em detectar a primeira desmineralização dos blocos de esmalte, porém não foi efetiva em monitorar sua progressão após dois ciclos de desmineralização.

Palavras-Chave: Cárie dentária. Desmineralização do dente. Fluorescência.

ABSTRACT

SARTI, Caroline S. **Performance of DIAGNODent Pen in detecting and monitoring progression of non-cavitated artificial caries lesion on smooth surfaces.** 2013. 27 f. Final Paper (Graduation in Dentistry) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

The aim of this study was to evaluate the performance of a laser fluorescence device (DIAGNODent pen, Kavo, Germany) to detect and to monitor the progression of caries-like lesions on smooth surfaces. Fifty-two bovine enamel blocks were submitted to two cycles of caries lesion induction using *S. mutans*, *L. casei* and *A. naeslundii*. Before and after each cycle, enamel blocks were analyzed under RAMAN spectroscopy, knoop superficial microhardness and laser fluorescence. Average values of superficial microhardness (\pm SD) were $319,3 \pm 21,5$ (baseline), $80,5 \pm 31,9$ (1° cycle) e $39,8 \pm 12,7$ (2° cycle) and statistical significant difference was found among all periods (t test; $p < 0,01$). Fluorescence values were $4,3 \pm 1,5$ (baseline), $7,5 \pm 9,4$ (1° cycle) e $7,1 \pm 7,1$ (2° cycle), with difference between baseline and 1° cycle (t test; $p = 0,014$). Any correlation (Pearson) was observed between fluorescence and superficial microhardness values. It can be concluded that laser fluorescence was effective in detecting the first demineralization on the enamel blocks, however the method did not show any effect in monitoring lesions progression after two cycles of demineralization.

Keywords: Dental caries. Demineralization. Fluorescence.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Gráficos de dispersão dos valores de fluorescência e de microdureza nos três períodos de avaliação (inicial, após o 1º e 2º ciclos de indução de desmineralização) bem como comparando os três períodos 18
- Figura 2 - Espectro gerado pela espectroscopia por RAMAN após cada ciclo de desmineralização..... 19

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Médias da microdureza superficial do esmalte e das medidas de fluorescência a laser nos três períodos de avaliação	17
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	8
2	OBJETIVO	12
3	MATERIAIS E MÉTODOS	13
3.1	PREPARO DOS BLOCOS DE ESMALTE BOVINO – OBTENÇÃO DOS ESPÉCIMES	13
3.2	AVALIAÇÃO DA MICRODUREZA SUPERFICIAL INICIAL E SELEÇÃO DOS ESPÉCIMES	14
3.3	MEDIÇÃO DA FLUORESCÊNCIA INDUZIDA POR LASER	14
3.4	INDUÇÃO DE LESÃO DE CÁRIE ARTIFICIAL	14
3.5	ANÁLISE DA MICRODUREZA DE ESMALTE E ESPECTROSCOPIA POR RAMAN APÓS DESMINERALIZAÇÃO	15
3.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	16
4	RESULTADOS	17
5	DISCUSSÃO	20
6	CONCLUSÃO	23
	REFERÊNCIAS	24

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, alguns estudos têm apontado um declínio na prevalência da cárie dentária. O índice CPO no Brasil aos 12 anos de idade segundo o Projeto SB Brasil em 2003 foi de 2,8 e caiu para 2,1 segundo o Projeto SB Brasil de 2010. Entretanto, esta doença ainda constitui um grave problema de saúde bucal em vários lugares do mundo (PRETTY; MAUPOMÉ, 2004; BELTRAN-AGUILAR et al., 2005; TAGLIAFERRO et al., 2008).

A cárie dentária é uma doença resultante de constantes flutuações de pH na interface entre a superfície dentária e os depósitos microbianos, resultando em processos de desmineralização e remineralização. O primeiro sinal clínico indicativo da ocorrência do processo de dissolução do esmalte dental é a mancha branca (BARBAKOW et al., 1991). Esta alteração é mais facilmente visualizada após secagem devido à diferença no índice de refração do esmalte (1,62), da água (1,33) e do ar (1,0) (BARBAKOW et al., 1991; BASTING, SERRA, 1999). Neste estágio, a superfície do esmalte ainda não apresenta descontinuidade, uma vez que apenas as camadas subsuperficiais são afetadas e a lesão é passível de remineralização sem a necessidade de tratamento invasivo (BARBAKOW et al., 1991).

Os compostos fluoretados tem sido estudados com o intuito de reverter e paralisar o processo da doença cárie. No entanto, sua ampla utilização e disponibilidade têm contribuído para as mudanças no desenvolvimento e na progressão da doença (ANGMAR-MÅNSSON et al., 1998; CURY et al., 2004), uma vez que o flúor remineraliza a camada mais superficial do esmalte, enquanto a lesão progride na sua sub-superfície, caracterizando as lesões de cárie oculta. Assim, as lesões não-cavidades ou em estágios iniciais de desenvolvimento tornaram-se mais prevalentes do que as lesões cariosas cavidades (EKSTRAND et al., 1998; HEINRICH-WELTZIEN et al., 2003).

A lenta progressão da doença permite que as lesões de cárie sejam detectadas precocemente e controladas, possibilitando o correto manejo do paciente por meio de medidas preventivas, evitando muitas vezes a intervenção restauradora (PRETTY; MAUPOMÉ, 2004; BADER; SHUGARS, 2006). Entretanto, o diagnóstico e o estabelecimento do plano de tratamento é um grande desafio para os cirurgiões-dentistas (ZANDONÁ; ZERO, 2006; RODRIGUES et al., 2008). Assim, métodos mais precisos e que apresentem bom desempenho

diante de mínimas alterações minerais têm sido desenvolvidos para detecção e quantificação da lesão de cárie.

Tradicionalmente, o exame visual e o exame radiográfico constituem os métodos de diagnóstico mais empregados para detecção de cárie na clínica odontológica. Contudo, o exame visual baseia-se em critérios subjetivos como cor, translucidez e dureza da estrutura dentária, apresentando alta especificidade, baixa sensibilidade (LUSSI, 1991; PRETTY; MAUPOMÉ, 2004) e uma dificuldade em ser utilizado para o monitoramento dessas lesões, pois também envolve o conhecimento e a experiência clínica do examinador (DINIZ et al., 2009).

Muitos dos novos métodos de diagnóstico desenvolvidos com a finalidade de auxiliar os métodos convencionais têm sido recomendados para identificar e quantificar precocemente as lesões de cárie em superfícies oclusais e lisas, de dentes decíduos e permanentes (MENDES et al., 2006; RODRIGUES et al., 2008; RODRIGUES et al., 2009). Alguns desses métodos são baseados no fenômeno físico da fluorescência, uma vez que o tecido cariado emite fluorescência com intensidade diferente do tecido dentário sadio quando estimulados pela luz com comprimentos de onda específicos (HIBST et al., 2001; BADER; SHUGARS, 2004; BRAUN et al., 2005; THOMS, 2006; RODRIGUES et al., 2008).

Com base nesse princípio, em 1998, foi introduzido no mercado o primeiro aparelho baseado em fluorescência a laser, denominado DIAGNOdent 2095 (DD, KaVo, Biberach, Alemanha). Este aparelho emite um laser diodo (alumínio, gálio, índio e fósforo – AlGaInP) com comprimento de onda de 655 nm, situado no âmbito vermelho do espectro visível, e por meio de um fotodetector, é capaz de captar a fluorescência emitida pelas porfirinas endógenas (fluoróforos) produzidas pelas bactérias cariogênicas (HIBST et al., 2001; SHI et al., 2001).

O laser diodo chega à superfície dentária através de uma guia luminosa central contida em uma haste óptica flexível. A fluorescência emitida pelos componentes orgânicos do tecido cariado é captada por nove fibras arranjadas concentricamente à guia luminosa central e transformada em valores numéricos que variam de 0 a 99 (LUSSI et al., 1999; LUSSI; HELLWIG, 2006). O fabricante fornece dois tipos de pontas de fibra óptica, uma para superfície oclusal (ponta A) e outra para superfície lisa (ponta B). De acordo com a severidade da lesão observa-se um aumento na fluorescência emitida, que é quantificada e registrada na forma de valores numéricos, proporcionando uma relação direta dos valores registrados com a progressão da lesão.

Em 2005, foi lançado no mercado uma versão mais compacta desse aparelho, denominado DIAGNOdent 2190 ou DIAGNOdent *pen* (DD*pen*, KaVo, Biberach, Alemanha), com o objetivo de facilitar o manuseio pelo profissional e melhorar o desempenho para detecção de cárie. Para isso, o fabricante condensou os componentes do aparelho em uma única peça, modificou a estrutura das pontas por fibra de safira. Embora permaneça o mesmo princípio de funcionamento, para o DD*pen*, tanto o laser diodo quanto a fluorescência emitida pelos tecidos percorrem os mesmos feixes de fibras, mas em sentidos opostos e com comprimentos de onda diferentes (LUSSI; HELWIG, 2006; LUSSI et al., 2006, RODRIGUES et al., 2008).

Esse método baseado em indução de fluorescência parece contribuir de forma significativa como auxiliar no processo de detecção de lesões de cárie. No entanto, ainda existem muitas dúvidas a respeito do desempenho desses métodos quando utilizados em superfícies lisas. Poucos estudos têm avaliado o desempenho do DD, mas nenhum avaliou o DD*pen* na detecção de lesões de cárie em superfície lisa. No entanto, a avaliação da efetividade do aparelho em lesões de cárie artificiais, utilizando soluções ácidas, apresentou resultados divergentes. Alguns autores não observaram alteração na fluorescência antes e após a desmineralização (HIBST et al., 2001; DINIZ et al., 2009). Entretanto, outros descreveram altos valores de fluorescência (IJJIMA; TAKAGI, 2000; MENDES; NICOLAU, 2004). Em lesões de manchas brancas naturais observou-se boa correlação entre as medições obtidas com o DD e a profundidade da lesão (SHI et al., 2001; SHI et al., 2001; PINELLI et al., 2002; MENDES et al., 2005). Somente um estudo avaliou a efetividade do DD*pen* na detecção e quantificação de lesões de cárie natural em superfície lisa (ALJEHANI et al., 2007), onde observou-se que tanto o DD como o DD*pen* apresentaram reprodutibilidade e validade semelhantes.

Alguns estudos sugerem que o DD*pen* poderia ser útil no monitoramento do processo de cárie devido à excelente reprodutibilidade (LUSSI et al., 1999; HIBST et al., 2001; LUSSI et al., 2001; LUSSI; FRANCESCUT, 2003). Entretanto, alguns estudos mostraram que o aparelho não apresenta boa correlação com a perda mineral em lesões de cárie em superfícies lisas (SHI et al., 2001; SHI et al., 2001; MENDES et al., 2005; DINIZ et al., 2009), uma vez que os valores obtidos estão relacionados ao conteúdo orgânico, como a presença das porfirinas, ao invés do conteúdo inorgânico. Entretanto, a possibilidade de utilizar esse método para a detecção precoce e para monitorar a desmineralização em esmalte ainda permanece obscura. Além disso, nenhum

estudo avaliou a efetividade do *DDpen* para monitorar a progressão de lesões de cárie em superfícies lisas.

Dessa forma, frente à existência de poucas pesquisas, novos estudos são necessários para avaliar a real efetividade do *DDpen* em monitorar a progressão de lesões de cárie não cavitadas em superfícies lisas.

2 OBJETIVO

Avaliar o desempenho *in vitro* de um método baseado em indução de fluorescência (DIAGNOdent pen) para detectar e monitorar a progressão de lesões de cárie em esmalte de dentes bovinos induzidas artificialmente utilizando um modelo *in vitro* de biofilme microbiano.

3 MATERIAS E MÉTODOS

O presente estudo foi conduzido de acordo com a Lei de Procedimentos para o uso científico de animais - Lei nº 11.794 (08/10/2008) e com as normas da Comissão de Ética no uso de animais (CEUA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Os dentes bovinos empregados foram removidos de mandíbulas de animais abatidos por motivos não relacionados ao presente estudo.

3.1 PREPARO DOS BLOCOS DE ESMALTE BOVINO – OBTENÇÃO DOS ESPÉCIMES

Para o preparo dos blocos foram necessários discos de corte e caneta de baixa rotação montada em micromotor de baixa velocidade.

Foram utilizados para esta pesquisa 53 incisivos bovinos hígidos (*Bos taurus*) com ausência de trincas e defeitos estruturais provenientes da Casa de Carnes Schena, da cidade de Santa Cruz do Sul (Rio Grande do Sul). Os dentes foram transportados sob refrigeração e foram preparados, conforme descrito posteriormente. Os dentes foram congelados a -20°C e armazenados em freezer apropriado.

Os dentes foram descongelados por 3 horas e tanto cálculo como debris foram removidos utilizando um aparelho de ultra-som (Sonics Laxis Schuster). Em seguida, os dentes foram escovados em água corrente por 15 segundos. Durante o experimento, os dentes foram armazenados individualmente em ambiente com 100% de umidade relativa e congelados.

As coroas foram separadas da raiz utilizando máquina de corte de precisão com um disco diamantado sob refrigeração utilizando uma cortadora metalográfica (Isomet 1000, Buehler Ltda., Lake Bluff, II, EUA). Os cortes foram realizados com velocidade de 250 rpm no sentido cérvico-incisal e depois no sentido méso-distal, para obtenção de espécimes de esmalte de 4 x 4mm da porção mais plana da face vestibular da coroa. Ao final deste processo, foram obtidos aproximadamente 60 blocos, que foram identificados.

Os blocos de esmalte tiveram sua superfície polida em politriz elétrica rotativa (APL4, Arotec Indústria e Comércio S/A, Cotia, SP, Brasil), com sistema de polimento múltiplo. O aparelho foi acionado em baixa velocidade para remover irregularidades do esmalte, deixando uma superfície lisa e brilhante. Para o acabamento, lixas de carbureto de silício (Norton – Saint-Gobain Abrasivos Ltda., Guarulhos-SP, Brasil), sob refrigeração de água destilada e deionizada e de granulação 600 e 1200 foram utilizadas por 30 s e 1 min, respectivamente. O polimento foi

efetuado com disco de feltro umedecido com uma pasta de diamante (Metadi – II, Buehler Ltda., Lake Bluff, II, EUA) nas granulações de 6, 3 e 1 μm , durante 1 minuto, com o objetivo de planificar e remover ranhuras da superfície do esmalte.

3.2 AVALIAÇÃO DA MICRODUREZA SUPERFICIAL INICIAL E SELEÇÃO DOS ESPÉCIMES

A microdureza superficial inicial do esmalte foi avaliada em um microdurômetro digital (HMV-2T, Shimadzu, Kyoto, Japão) com penetrador tipo Knoop, com uma carga estática de 50 gramas por 5 segundos (Cury et al., 2000; Paes-Leme et al., 2003). Foram realizadas cinco endentações na área central da superfície do esmalte, distanciadas entre si em 100 μm .

Foram selecionados para este estudo somente os blocos que apresentarem um valor de microdureza situado entre a média e o desvio padrão da média dos valores obtidos, totalizando 52 blocos.

3.3 MEDIÇÃO DA FLUORESCÊNCIA INDUZIDA POR LASER

Em seguida, todos os blocos tiveram suas superfícies analisadas pelo DIAGNOdent 2190 (DDpen, KaVo, Biberach, Alemanha) utilizando a ponta cilíndrica, de fibra de safira, de acordo com as instruções do fabricante. Um examinador realizou 3 medidas, que foram registradas e a média destas foi calculada.

Para cada bloco de esmalte, o aparelho foi calibrado utilizando um padrão cerâmico cuja fluorescência é conhecida, de acordo com as instruções do fabricante. Após a calibração, o bloco de esmalte foi retirado do ambiente úmido, seco com papel absorvente e submetido à medição. A ponta do aparelho foi encostada na superfície do dente, e então, sem exercer pressão foi realizado o movimento de varredura de toda a superfície de esmalte e o valor de pico máximo (*peak*) foi anotado.

3.4 INDUÇÃO DE LESÃO DE CÁRIE ARTIFICIAL

Cada bloco de esmalte foi incluído em discos de acrílico. Os discos de acrílico foram perfurado para a transfixação de um fio de aço. Cada espécime recebeu aplicação de uma camada de verniz de unha em aproximadamente 1/3 da superfície de esmalte polido exposto, para que essa região não fosse submetida ao desenvolvimento artificial de cárie. Antes do processo de

indução de cárie as amostras foram esterilizadas com Plasmas de peróxido de hidrogênio no Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Neste experimento foram utilizadas cepas de *S. mutans*, *L. casei* e *A. naeslundii*

No primeiro ciclo de desmineralização, cada espécie foi cultivada em ágar contendo 0,5% de sangue de carneiro desfibrinado, por 48 horas. Duas alças de cada placa de ágar foram colocadas individualmente em meio Tryptic Soy Broth (TSB) enriquecido com 0,5% de sacarose por 18 horas a 37°C. 30 ml de cada amostra após crescimento de 18 horas foram adicionados a 70 ml de TSB/0,5% sacarose. Esses caldos foram incubados a 37°C até atingirem densidade óptica 550nm=0,5. Após isso, 90 ml de cada caldo (contendo cada uma das espécies em questão) foram adicionados a um único recipiente para formar o inóculo bacteriano multiespécie.

Recipientes plásticos estéreis receberam meio TSB enriquecido com 0,5% de sacarose e 0,4ppm de flúor. Em cada recipiente foi adicionado uma alíquota do inóculo. Esses recipientes receberam os blocos de esmalte bovino e foram incubados a 37°C por 48 horas. Nessa etapa, diariamente o pH do meio de cultura dentro de cada recipiente foi medido e o meio TSB/0,5% sacarose/0,4 ppm F foram substituídos após 24 horas.

Após 48 horas os blocos de esmalte foram retirados do caldo e adicionados individualmente a tubos contendo NaCl 0,9% e agitados por 30 segundos. A suspensão bacteriana obtida após agitação dos tubos foi seriadamente diluída em NaCl 0,9% 10, 100, 1000, 10.000 e 100.000 vezes. Alíquotas de cada diluição foram inoculadas em placas de ágar sangue que foram incubadas por 48 horas a 37°C. Após esse período as placas foram analisadas e ocorreu a contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) de cada espécie bacteriana.

No segundo ciclo de indução artificial de lesões de cárie todo o processo realizado no primeiro foi repetido, com a diferença do período de incubação dos blocos de esmalte bovino que nessa etapa se deu por 24 horas.

Após cada período de indução os blocos foram analisados com o DIAGNOdent pen, microdureza superficial e microscopia RAMAN. Após cada medida, os blocos e as placas foram novamente esterilizadas e dado continuidade ao processo de indução das lesões. Ao final dos experimentos, cada bloco foi submetido a um total de 2 ciclos de desmineralização.

3.5 ANALISE DA MICRODUREZA DE ESMALTE E ESPECTROSCOPIA POR MICRO-RAMAN APÓS DESMINERALIZAÇÃO

Em seguida à desmineralização, cada grupo de espécimes foi submetido a uma nova análise da microdureza superficial do esmalte, da mesma forma citada anteriormente.

Os blocos tiveram suas superfícies submetidas ao sistema de espectroscopia micro-Raman, por meio de um espectrofotômetro de infravermelho (Senterra RAMAN Microscope, Bruker Optics, Bileria, EUA). Essa espectroscopia foi utilizada para caracterizar longitudinalmente a camada desmineralizada de esmalte. Em condições de umidade os compostos químicos foram detectados e quantificados através dos espectros gerados por meio do pico do íon fosfato (PO_4^- - 960cm^{-1}) com 5s de integração e 2 co-adições do laser de 785nm com 100mW de potência. A interface esmalte hígido (previamente recoberta com verniz de unha) / desmineralizado foi avaliada em 20 pontos distribuídos em uma linha reta de 200 μm . Pela combinação da espectrometria com a microscopia, informações moleculares podem ser obtidas com uma ótima resolução espacial em nível microscópico. Além disso, os espécimes puderam ser analisados sem que houvesse a destruição da amostra, usando lentes de imersão.

Os valores de microdureza superficial inicial e final, os valores da espectroscopia RAMAN foram utilizados como padrão-ouro para a presença de lesões incipientes não cavitadas.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a avaliação da reprodutibilidade intra-examinador considerando as medidas de fluorescência realizadas foi calculada a correlação intra-classe (ICC) para os três períodos de avaliação (inicial e após o primeiro e segundo ciclos de desmineralização). O ICC é considerado “pobre” quando os valores estão abaixo de 0,40, “moderado” para valores entre 0,40 e 0,59, “bom” para valores entre 0,60 e 0,75 e “excelente” acima de 0,75 (Lin, 1989). Foi calculada a média e os respectivos desvio-padrão dos valores de fluorescência e de microdureza superficial nos três períodos de avaliação, sendo os períodos comparados através do teste t de Student. Além disso, o coeficiente de Pearson foi calculado para correlacionar os valores obtidos pelo DIAGNOdent nos diferentes períodos de desmineralização com a variação da microdureza superficial. Para todos os testes foi utilizado o software IBM SPSS Statistics for Mac versão 20.0 e o nível de significância adotado foi de 0,05.

4 RESULTADOS

A reprodutibilidade intra-examinador do método de fluorescência apresentou valores médios de ICC de 0,95 (inicial), 0,99 (após o 1º ciclo) e 0,95 (após o 2º ciclo), indicando excelente concordância entre os exames em cada período.

A Tabela 1 mostra os valores médios de fluorescência bem como os de microdureza obtidos nos diferentes períodos de avaliação.

Tabela 1- Médias da microdureza superficial do esmalte e das medidas de fluorescência a laser nos três períodos de avaliação.

Método	Inicial (\pm DP)	Após o 1º ciclo (\pm DP)	Após o 2º ciclo (\pm DP)
Fluorescência (DIagnodent)	4,3 (\pm 1,5) ^a	7,5 (\pm 9,4) ^b	7,1 (\pm 7,1) ^b
Microdureza Superficial (KHN)	319,3 (\pm 21,5) ^a	80,5 (\pm 31,9) ^b	39,8 (\pm 12,7) ^c

Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças estatisticamente significantes (teste t; $p < 0,05$)

O coeficiente de Pearson não mostrou correlação estatisticamente significativa entre as medidas de fluorescência e a variação da microdureza superficial (Δ KHN).

A Figura 1 ilustra através de gráficos de dispersão os valores de fluorescência de acordo com as microdureza superficial em cada período de avaliação (gráficos 1, 2 e 3) e comparando os três períodos (gráfico 4).

Figura 1- Gráficos de dispersão dos valores de fluorescência e de microdureza nos três períodos de avaliação (inicial, após o 1º e 2º ciclos de indução) bem como comparando os três períodos.

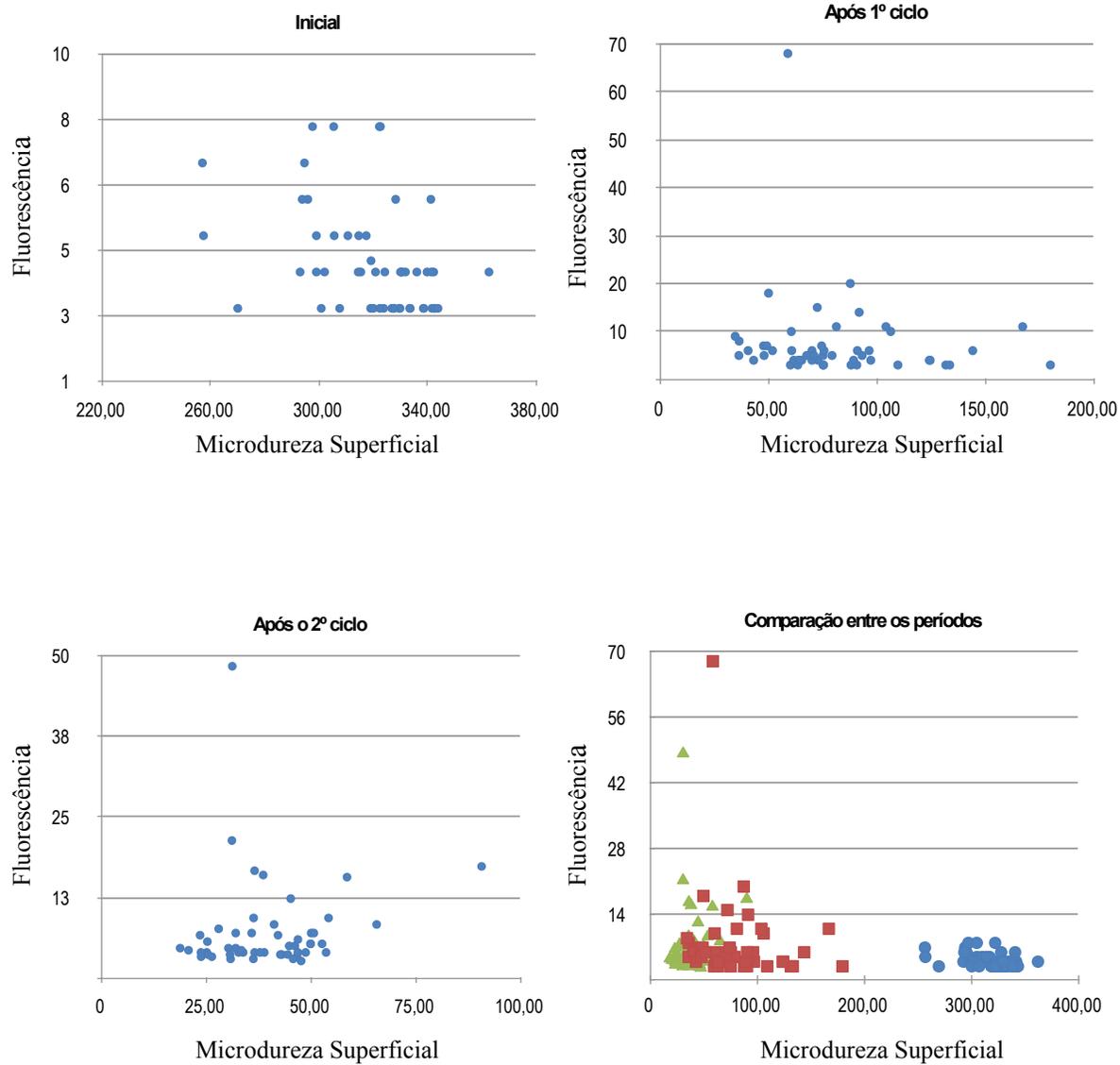
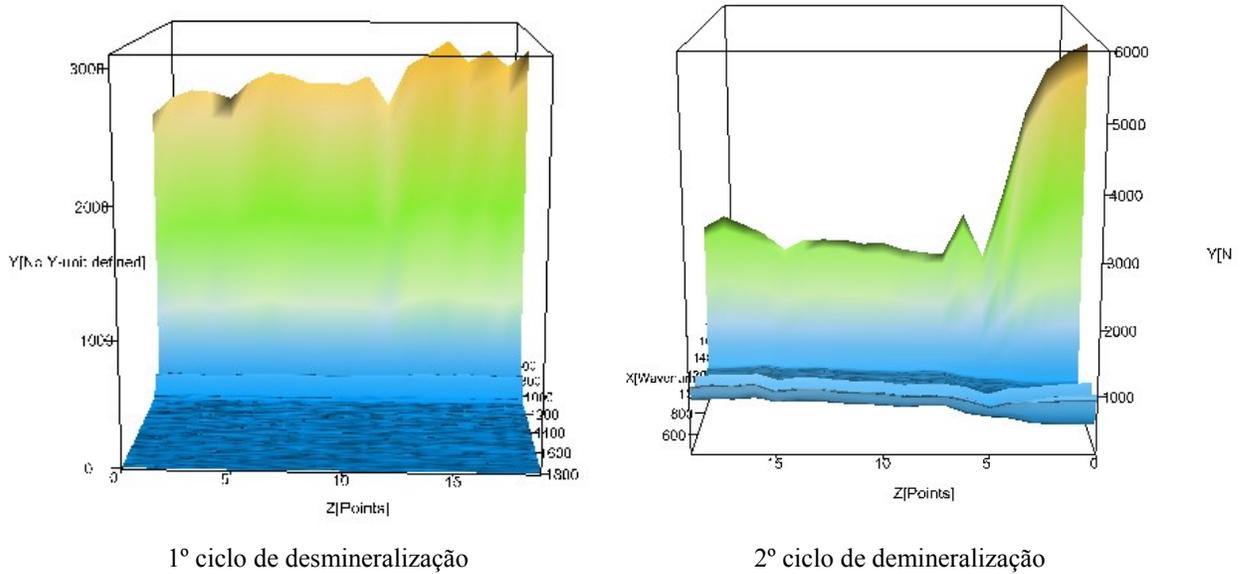


Figura 2- Espectro gerado pela espectroscopia por RAMAN após cada ciclo de desmineralização



Todos espectros gerados mostraram haver diminuição da intensidade do pico fosfato quando comparados o esmalte hígido e o esmalte desmineralizado. Na figura 2 observa-se a diminuição da intensidade do pico fosfato a partir da interface/limite entre o esmalte hígido ($Z=0$) e desmineralizado ($Z=20$)

5 DISCUSSÃO

A diminuição da prevalência das lesões de cárie cavitadas em grande parte da população mundial tem levado a comunidade científica a procurar por métodos auxiliares ao exame visual que possam ser utilizados precocemente para detectar e monitorar as lesões de cárie em seus estágios mais iniciais. Isso inclui as lesões não cavitadas frequentemente observadas em superfícies lisas livres. O método auxiliar para detecção de lesões de cárie mais indicado e utilizado na clínica ainda é o radiográfico. No entanto, sabe-se que este exame não apresenta boa sensibilidade para detectar lesões iniciais (não cavitadas) em esmalte, tanto em superfícies oclusais quanto proximais (LUSSI et al., 1999; LUSSI et al., 2001; LUSSI; HELLWIG, 2006; LUSSI et al., 2006; RODRIGUES 2008).

Quando se trata de lesões não cavitadas em superfícies lisas livres, como a vestibular, o exame radiográfico não apresenta nenhuma efetividade. Por isso, outros métodos já presentes no mercado odontológico, como a fluorescência a laser, tem sido testados. Porém, pelo pequeno número de estudos disponíveis, ainda existem muitas dúvidas quanto a sua efetividade para uso em superfícies lisas. Poucos estudos têm sido realizados focando o desempenho desse método para a detecção e monitoramento dessas lesões em superfícies lisas. A maioria deles objetivou avaliar o desempenho da fluorescência a laser na detecção da des/remineralização das lesões utilizando o primeiro modelo do DIAGNOdent, sem enfoque nenhum na progressão das lesões. O estudo de Pinelli (2002), realizado *in vivo*, mostrou que o DIAGNOdent foi um bom método auxiliar para detectar lesões iniciais de cárie em superfícies lisas livres. Já o estudo de Diniz et al. (2010), mostrou que o DIGANOdent não foi efetivo em monitorar a des/remineralização em superfícies lisas. Já Spiguel et al. (2009), realizaram avaliações *in vitro* e *in situ* e encontraram que a fluorescência a laser foi efetiva no monitoramento da des/remineralização apenas na condição *in situ*.

Diferentemente dos estudos *in vitro* acima mencionados, o presente estudo objetivou avaliar o desempenho da fluorescência a laser na detecção da desmineralização e no monitoramento da progressão dessas lesões, desenvolvidas artificialmente, utilizando um modelo do aparelho que utiliza uma ponta de fibra de safira (DIAGNOdent pen), mais recentemente desenvolvido.

Tanto Diniz et al. (2010) quanto Spiguel et al. (2009) utilizaram uma solução ácida com pH 5,0 para o desenvolvimento de lesões artificiais de cárie *in vitro*. No entanto, sabe-se que os

métodos baseados na captação da fluorescência induzida pela luz laser identificam e quantificam a desmineralização através da presença de metabólitos bacterianos envolvidos no processo da doença cárie, já identificados em 2001 como sendo porfirinas (HIBST et al., 2001). Por este motivo, os resultados obtidos nos estudos já realizados *in vitro* dificilmente poderiam ser aproximados ou extrapolados para uma situação clínica. Diante disso, o modelo de indução de lesões de cárie empregado neste estudo, por ter utilizado espécies bacterianas envolvidas no processo de evolução da doença, parece se aproximar mais da realidade clínica e pode permitir que o método fosse apropriadamente testado.

De acordo com Lussi e Hellwig, (2006), valores altos de reprodutibilidade significam que o método pode ser capaz de monitorar o processo cariioso. Esta afirmação parece ser verdadeira quando lesões de cárie em estágios mais avançados são avaliadas. No presente estudo, onde apenas lesões não cavitadas foram analisadas, os valores de ICC encontrados foram excelentes (0,95-0,99) em termos de concordância intra-examinador. Isso mostra que o método é reprodutível, mas não necessariamente válido.

Para a avaliação da validade, foi necessária a comparação dos valores de fluorescência obtidos em cada período de avaliação com os valores de microdureza superficial do esmalte. White (1987) e Paes Leme et al. (2003) citam a microdureza superficial como uma excelente técnica para avaliar a des/remineralização de lesões iniciais de cárie. Além disso é uma técnica não destrutiva que não altera a estrutura do esmalte. Por isso, esta técnica foi escolhida para este estudo de monitoramento.

Diante dos valores de microdureza superficial, pode-se observar que os valores diminuíram significativamente a partir do valor inicial (Tabela 1), mostrando que os ciclos de indução de lesão foram efetivos na desmineralização dos blocos. Observando os valores de fluorescência, nota-se um aumento significativo apenas após o primeiro ciclo, mostrando que o método foi efetivo em detectar e quantificar a primeira desmineralização dos blocos. No entanto, quando os blocos foram submetidos ao segundo ciclo, simulando a progressão das lesões, o método não foi efetivo para o monitoramento das lesões em estágio prévio à cavitação. Um aspecto positivo que pode ser depreendido deste resultado é o fato do método ser capaz de diferenciar o esmalte hígido do esmalte inicialmente desmineralizado. Gokalp and Baseren, em 2005, em um estudo *in vivo*, também observaram que o DIAGNOdent apresentou boa capacidade em detectar superfícies hígidas.

O mesmo pode ser afirmado quando se observa os espectros obtidos após os blocos terem sido submetidos à espectroscopia por RAMAN que, trata-se de uma técnica vibracional, não destrutiva que permite a caracterização simultânea da matéria orgânica e inorgânica (TORRES, 2008). Segundo Mohanty et al. (2013) a espectroscopia Raman é uma ferramenta poderosa que pode ser efetivamente usada para detectar o início de lesões de cárie dentária.

Observou-se que, de acordo com o aumento da desmineralização da superfície do esmalte, o espectro obtido do pico fosfato (por volta de 960cm^{-1}) da hidroxiapatita também diminuiu indicando que o seu teor de fosfato (conteúdo mineral) é significativamente menor do que o esmalte hígido, concordando com os estudos recentes que utilizaram essa metodologia para observar a desmineralização inicial de superfícies de esmalte (SPIZIRRI et al., 2012; MOHANTY et al., 2013).

Nos estudos *in vitro* acima mencionados (SPIGUEL et al., 2009 e DINIZ et al., 2010) o aumento dos valores de fluorescência foi explicado pelo aumento da porosidade do esmalte e pelo fenômeno do espalhamento da luz, após a utilização das soluções desmineralizadoras, no entanto sem a presença de bactérias cariogênicas. No presente estudo, o fato das porfirinas bacterianas estarem presentes no processo de indução e a desmineralização ter acontecido por indução bacteriana, a característica diferente da sub-superfície de esmalte pode ter sido a responsável pelos valores de fluorescência não terem aumentado significativamente após o segundo ciclo de desmineralização. Isso pode ser facilmente verificado quando os valores de microdureza são analisados. No presente estudo, após o primeiro e segundo ciclos, os valores médios de microdureza foram 80,5 e 39,8 Knoop (KHN). Diniz et al. (2010) obtiveram valor médio de 38,48 VHN após a desmineralização, valor este muito abaixo do observado no presente estudo após o primeiro ciclo. Da mesma forma, Spiguel et al. (2009) obtiveram valor médio de 57 KHN após a desmineralização. Isso enfatiza a observação de que, no presente estudo, o método foi capaz de identificar a desmineralização em um estágio mais precoce do que nos outros estudos, e que não diferiu do segundo período onde a microdureza apresentou valores semelhantes aos encontrados pelos autores acima mencionados.

Dessa forma pode-se sugerir que a fluorescência a laser, concordando com os estudos realizados em superfícies oclusais e proximais, seja pouco eficiente em monitorar a progressão de lesões de cárie nos seus estágios mais iniciais (lesões não cavitadas), sendo mais efetiva, provavelmente, na detecção e no monitoramento de lesões cavitadas mais avançadas.

6 CONCLUSÃO

Pode-se concluir que a fluorescência a laser foi efetiva em detectar a primeira desmineralização dos blocos de esmalte de dentes bovinos, porém não foi efetiva em monitorar sua progressão após dois ciclos de indução de desmineralização induzida artificialmente utilizando um modelo cariogênico bacteriano *in vitro*.

REFERÊNCIAS

- Aljehani A, Yang L, Shi XQ. In vitro quantification of smooth surface caries with DIAGNOdent and the DIAGNOdent pen. *Acta Odontol Scand.* 2007 Feb; 65(1):60-3.
- Angmar-Månsson BE, al-Khateeb S, Tranaeus S. Caries diagnosis. *J Dent Educ.* 1998 Oct;62(10):771-80.
- Bader JD, Shugars DA. A systematic review of the performance of a laser fluorescence device for detecting caries. *J Am Dent Assoc.* 2004 Oct;135(10):1413-26.
- Bader JD, Shugars DA. The evidence supporting alternative management strategies for early occlusal caries and suspected occlusal dentinal caries. *J Evid Based Dent Pract.* 2006 Mar;6(1):91-100.
- Barbakow F, Imfeld T, Lutz F. Enamel remineralization: how to explain it to patients. *Quintessence Int.* 1991 May;22(5):341-7.
- Basting RT, Serra MC. Occlusal caries: diagnosis and noninvasive treatments. *Quintessence Int.* 1999 Mar;30(3):174-8.
- Beltran-Aguilar ED et al. Surveillance for dental caries, dental sealants, tooth retention, edentulism, and enamel fluorosis--United States, 1988-1994 and 1999-2002. *MMWR Surveill Summ.* 2005 Aug 26;54(3):1-43.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Projeto SB Brasil 2003: condições de saúde bucal da população brasileira 2002-2003: resultados principais. Brasília: Ministério da Saúde, 2004. 68 p.: Série C. Projetos, Programas e Relatórios.
- Braun A, Krause F, Jepsen S. The influence of the calibration mode of a laser fluorescence device on caries detection. *Caries Res.* 2005 Mar-Apr;39(2):144-9.
- Clarkson BH, Wefel JS, Miller I. A model for producing caries-like lesions in enamel and dentin using oral bacteria in vitro. *J Dent Res.* 1984 Oct;63(10):1186-9.
- Cury JA et al. Biochemical composition and cariogenicity of dental plaque formed in the presence of sucrose or glucose and fructose. *Caries Res.* 2000 Nov-Dec;34(6):491-7.
- Cury JA et al. The importance of fluoride dentifrices to the current dental caries prevalence in Brazil. *Braz Dent J.* 2004;15(3):167-74
- Diniz MB et al. The influence of pit and fissure sealants on infrared fluorescence measurements. *Caries Research.* 2008;42(5):328-33.
- Diniz MB et al. The efficacy of laser fluorescence to detect in vitro demineralization and remineralization of smooth enamel surfaces. *Photomed Laser Surg.* 2009 Feb;27(1):57-61.

- Diniz MB et al. In vivo evaluation of laser fluorescence performance using different cut-off limits for occlusal caries detection. *Laser in Medical Sciences* 2009 May;24(3):295-300.
- Gokalp S, Baseren M. Use of laser fluorescence in monitoring the durability and cariostatic effects of fluoride and chlorhexidine varnishes on occlusal caries: A clinical study. *Quintessence Int.* 2005 Mar;36(3):183-9.
- Hibst R, Paulus R, Lussi A. Detection of occlusal caries by laser fluorescence: basic and clinical investigations. *Med Laser Appl.* 2001 Dec; 16:205-213.
- Iijima Y, Takagi O. In vitro detection of early caries process with KaVo DIAGNOdent. *Caries Res.* 2000; 34:323.
- Lin, I.K. A concordance correlation coefficient to evaluate reproducibility. *Biometrics* 45. 1989 Mar; 255-268.
- Lima LM et al. In vitro evaluation of probiotics microorganisms adhesion to an artificial caries model. *Eur J Clin Nutr.* 2005 Jul;59(7):884-6.
- Lussi A, Francescut P. Performance of conventional and new methods for the detection of occlusal caries in deciduous teeth. *Caries Res.* 2003 Jan-Feb;37(1):2-7.
- Lussi A, Hack A, Hug I, Heckenberg H, Megert B, Stich H. Detection of approximal caries with a new laser fluorescence device. *Caries Res* 2006; 40:97-103.
- Lussi A, Hellwig E. Performance of a new laser fluorescence device for the detection of occlusal caries in vitro. *J Dent.* 2006 Aug;34(7):467-71.
- Lussi A et al. Performance and reproducibility of a laser fluorescence system for detection of occlusal caries in vitro. *Caries Res.* 1999 Jul-Aug;33(4):261-6.
- Lussi A et al. Clinical performance of a laser fluorescence device for detection of occlusal caries lesions. *Eur J Oral Sci.* 2001 Feb;109(1):14-9.
- Lussi A. Validity of diagnostic and treatment decisions of fissure caries. *Caries Res.* 1991;25(4):296-303.
- Meller C et al. A new in vivo method for measuring caries activity using quantitative light-induced fluorescence. *Caries Res.* 2006;40(2):90-6.
- Mendes FM, Hissadomi M, Imparato JCP. Effects of drying time and the presence of plaque on the in vitro performance of laser fluorescence in occlusal caries of primary teeth. *Caries Res.* 2004 Mar-Apr;38(2):104-8.

Mendes FM et al. Ability of laser fluorescence device associated with fluorescent dyes in detecting and quantifying early smooth surface caries lesions. *J Biomed Opt.* 2006 Mar-Apr;11(2):024007.

Mendes FM et al. Performance of DIAGNOdent for detection and quantification of smooth-surface caries in primary teeth. *J Dent.* 2005 Jan;33(1):79-84.

Mohanty B et al. Characterizing and identifying incipient carious lesions in dental enamel using micro-Raman spectroscopy. *Caries Res.* 2013;47(1):27-33.

Motisuki C et al. The effectiveness of alumina powder on carious dentin removal. *Oper Dent.* 2006 May-Jun;31(3):371-6.

Paes-Leme AF, Tabchoury CP, Zero DT, Cury JA. Effect of fluoridated dentifrice and acidulated phosphate fluoride application on early artificial carious lesions. *Am J Dent.* 2003 Apr;16(2):91-5.

Pinelli C, Campos Serra M, de Castro Monteiro Loffredo L. Validity and reproducibility of a laser fluorescence system for detecting the activity of white-spot lesions on free smooth surfaces in vivo. *Caries Res.* 2002 Jan-Feb;36(1):19-24.

Pretty IA, Maupomé G. A closer look at diagnosis in clinical dental practice: Part 5. Emerging technologies for caries detection and diagnosis. *J Can Dent Assoc.* 2004 Sep;70(8):540, 540a-540i.

Rodrigues JA et al. Performance of fluorescence methods, radiographic examination and ICDAS II on occlusal surfaces in vitro. *Caries Res.* 2008;42(4):297-304.

Rodrigues JA, Vita TM, Cordeiro RCL. In vitro evaluation of the influence of air abrasion on detection of occlusal caries lesion in primary teeth. *Pediatric Dentistry.* 2008 Jan-Feb;30(1):15-8.

Rodrigues JA et al. A. The influence of zero-value subtraction on the performance of two laser fluorescence devices for detecting occlusal caries in vitro. *The Journal of the American Dental Association* 2008 Aug;139(8):1105-12.

Rodrigues JA et al. In vitro comparison of laser fluorescence performance with visual examination for detection of occlusal caries in permanent and primary molars. *Lasers in Medical Science* 2009 Jul;24(4):501-6.

Rodrigues JA et al. A. Relationship between DIAGNOdent values and sealant penetration depth on occlusal fissures. *Clinical Oral Investigations* 2010 Dec;14(6):707-11.

Rodrigues JA, Hug I, Lussi A. The influence of zero value subtraction on the performance of a new laser fluorescence device for approximal caries. *Laser in Medical Sciences* 2009 May;24(3):301-6.

Rodrigues JA, Hug I, Lussi A. The influence of PVC wrapping on the performance of two laser fluorescence devices on occlusal surfaces in vitro. *Protomedicine and Laser Surgery* 2009 Jun;27(3):435-9.

Sissons CH et al. Microbiota of plaque microcosm biofilms: effect of three times daily sucrose pulses in different simulated oral environments. *Caries Res.* 2007;41(5):413-22.

Shi XQ, Tranaeus S, Angmar-Mansson B. Validation of DIAGNOdent for quantification of smooth-surface caries: an in vitro study. *Acta Odontol Scand.* 2001 Apr;59(2):74-8.

Spizzirri PG et al. A comparative study of carbonate determination in human teeth using Raman spectroscopy. *Caries Res.* 2012;46(4):353-60.

Tagliaferro EP et al. Distribution and prevalence of dental caries in Bauru, Brazil, 1976-2006. *Int Dent J.* 2008 Apr;58(2):75-80.

Thoms M, Eberhart J, Frentzen M. Caries detection using a new fluorescence camera system [abstract]. *Caries Res.* 2007; 41:293.

Thoms M. Detection of intraoral lesions using a fluorescence camera. *Proc of SPIE Lasers in Dentistry XII* 2006; 6137:1-7.

Torres SRM. Caracterização comparativa do esmalte de dente decíduo e permanente por Espectroscopia Raman [dissertação]. Brasília (DF): Universidade de Brasília. Faculdade de Ciências da Saúde. 2008.

Van der Veen MH et al. Red autofluorescence of dental plaque bacteria. *Caries Res.* 2006;40(6):542-5.

White DJ. Reactivity of fluoride dentifrices with artificial caries I. Effect on early lesions: F uptake, surface hardening and remineralization. *Caries Res.* 1987;21(2):126-40.

Zandoná AF, Zero DT. Diagnostic tools for early caries detection. *J Am Dent Assoc.* 2006 Dec;137(12):1675-84; quiz 1730.