



**Kateline Marisa Dias**

Licenciada em Ciências de Engenharia Biomédica

## **Determinação da distribuição de flúor em esmalte dentário**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
Engenharia Biomédica

Orientador: Prof. Dra. Maria Micaela Leal da Fonseca, Prof.  
Auxiliar Convidada, FCT-UNL

Coorientador: Prof. Dra. Sofia Pessanha, Investigadora do DF,  
FCT-UNL

Júri:

Presidente: Prof. Dr. Ricardo Nuno Pereira Verga e Afonso Vigário, Prof.  
Associado, FCT-UNL

Arguente: Dr. Hélio Fernandes Luís, Investigador IST-Instituto de Fusão e  
Plasma Nuclear

Vogal: Prof. Dra. Maria Micaela Leal da Fonseca, Prof. Auxiliar Convidada,  
FCT-UNL



FACULDADE DE  
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

**Março, 2020**



### **Determinação da distribuição do flúor em esmalte dentário**

Copyright ©2020- Todos os direitos reservados. Kateline Marisa Dias, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.



*À minha mãe!*



# Agradecimentos

Às minhas orientadoras, Professora Doutora Sofia Pessanha e Professora Doutora Micaela Fonseca, por todo apoio concedido, pela disponibilidade em esclarecer as dúvidas, por me incentivarem a não desistir, mas sim, ir até ao fim deste trabalho e por toda orientação prestada.

À Professora Doutora Adelaide Jesus, pela disponibilidade em esclarecer dúvidas e pelo engenho para encontrar soluções para os problemas encontradas.

Ao Professor Doutor João Silveira, por toda ajuda prestada na Faculdade de Medicina Dentária da Universidade de Lisboa.

Ao professor Hélio Luís, Jorge Rocha, Hugo Silva e João Cruz, pelo auxílio prestado no Centro Tecnológico Nuclear.

Ao Vasco Manteigas pelo apoio dado na utilização do *software* ERYA BULK.

Ao Iulian Otel pelo acompanhamento durante a preparação das amostras e medições de Raman e EDXRF.

Ao meu colega Manuel Silva, por todo apoio dado na utilização do *software* solidworks.

À minha família, por me motivar a não desistir e acreditar que sou capaz. Em especial, à minha irmã que sempre esteve do meu lado nos momentos mais difíceis.

Aos meus amigos que me incentivarem e estarem sempre preocupados com este trabalho: Edna Barros, Sara Martins, Conceição Andrade, José Fernandes, João Lopes, Odair Monteiro, Ronildo e Aldina Ramos.

A todos os que direta ou indiretamente fizeram parte do meu percurso académico.



# Resumo

---

Os agentes tópicos de flúor são considerados como principais mecanismos de combate a cárie e a erosão dentária. Os vernizes tópicos de flúor permitem a incorporação de flúor no esmalte por um período mais alargado, proporcionando menor solubilidade da hidroxiapatite e resultando em maior inibição da desmineralização. Apesar de existirem estudos relacionados com a ação de agentes fluoretados nos tecidos dentários, ainda não está detalhada a eficácia de aplicação de flúor, a concentração ótima de agente e estratégia de distribuição para evitar a perda mineral. Para tal, este estudo tem como objetivos quantificar a incorporação de flúor no esmalte pela técnica de emissão gama induzida por partículas (PIGE); avaliar o efeito protetor do flúor no esmalte exposto ao ataque ácido pela análise da alteração da estrutura cristalina da hidroxiapatite, considerando os resultados da razão de despolarização da banda associada ao alongamento simétrico do fosfato nos espectros de Raman; avaliar a alteração do conteúdo mineral e elementar do esmalte por ação de verniz de flúor pela técnica de espectroscopia de fluorescência de raios-X dispersiva em energia (EDXRF).

Estudaram-se 20 amostras, divididas em dois grupos: grupo A - amostras sujeitas a tratamento com verniz de flúor (Profluorid®); grupo B – grupo de controlo. Após este tratamento, todas as amostras, foram sujeitas a um ciclo erosivo, utilizando solução de ácido cítrico de pH=2. O ciclo erosivo consistiu em alternar imersão das amostras em saliva humana (2 horas) e solução ácida (5 minutos).

Os resultados obtidos revelaram uma incorporação de flúor nas amostras tratadas com verniz bem como, um pequeno aumento do conteúdo mineral (1%). O ácido cítrico, conforme o ciclo erosivo implementado, mostrou contribuir para a perda mineral e promoção de alterações morfológicas na superfície do esmalte. Por outro lado, o verniz revelou um mínimo efeito protetor das amostras do grupo A.

**Palavras-chave:** Esmalte; Verniz de flúor; Erosão dentária; PIGE; EDXRF; Espectroscopia de Raman.

---



# Abstract

---

Topical fluoride agents are considered as the main mechanisms for preventing caries and dental erosion. Topical fluoride varnishes allow for permanent fluoride's incorporation into the enamel, providing less solubility of the hydroxyapatite matrix and resulting in greater inhibition of the demineralization process. Although there are studies concerning the action of fluoride agents in dental tissues, the effectiveness of fluoride application, the optimal agent concentration and distribution strategy to prevent mineral loss are not yet detailed. To implement this study aims to quantify the incorporation of fluoride in the enamel through particle induced gamma-ray emission's technique (PIGE); to evaluate fluoride's protective effect on enamel exposed to acidic attack by analysing the alteration of the crystalline structure of hydroxyapatite, considering the results of the depolarization ratio of the band associated with the symmetric stretching of phosphate in Raman spectra; to evaluate the alteration of the mineral and elemental content of the enamel by the action of fluoride varnish by the energy dispersive X-ray fluorescence spectroscopy (EDXRF).

Twenty enamel samples were studied, divided into two groups: group A - samples subjected to treatment with fluoride varnish (Profluorid®) and group B - fluoride control group. After this treatment, all samples, were subjected to an erosive cycle, using citric acid solution of pH = 2. The erosive cycle consisted of alternating immersion of the samples in human saliva (2 hours) and acid solution (5 minutes).

The obtained results revealed fluoride's incorporation in the samples treated with varnish as well as a small increase in mineral content (1%). Citric acid, according to the erosive cycle implemented, has been shown to contribute to mineral loss and promote morphological changes on the enamel surface. On the other hand, the varnish revealed a minimal protective effect of the samples of group A.

**Keywords:** Enamel, Fluoride varnish, Dental erosion, PIGE, EDXRF, Raman spectroscopy.

---



# Conteúdo

Agradecimentos .....	v
Resumo .....	vii
Abstract .....	ix
Conteúdo .....	xi
Índice de figuras .....	xv
Índice de tabelas .....	xix
Lista de Siglas e Acrónimos .....	xxi
Lista de símbolos .....	xxiii
<b>1 Introdução .....</b>	<b>1</b>
<b>2 Dente humano .....</b>	<b>3</b>
<b>2.1 Esmalte dentário .....</b>	<b>4</b>
2.1.1 Formação do esmalte .....	4
2.1.2 Estrutura do esmalte .....	4
2.2 O processo de remineralização e desmineralização do esmalte .....	5
2.3 Aplicação tópica de vernizes de flúor no esmalte dentário .....	10
<b>3 Técnicas analíticas .....</b>	<b>13</b>
<b>3.1 Emissão de raios gama induzida por partículas – PIGE .....</b>	<b>13</b>
3.1.1 Reações nucleares e emissão de raios gama .....	13
3.1.2 Princípio físico da técnica de PIGE .....	17
3.1.3 ERYA .....	18
3.1.4 Aplicação da técnica de PIGE no estudo da análise do esmalte dentário – Estado da arte	21
<b>3.2 Espectroscopia Raman .....</b>	<b>23</b>
3.2.1 Princípio físico da espectroscopia Raman .....	23
3.2.2 Vibrações Moleculares .....	25
3.2.3 Fenómeno de fluorescência .....	26
3.2.4 Instrumentação da Espectroscopia Raman .....	26
<b>3.3 Espectroscopia por fluorescência de raios-X .....</b>	<b>28</b>

3.3.1	Princípio físico .....	28
3.3.2	Interação de raios-X com a matéria.....	29
3.3.3	Espectro de raios-X .....	31
3.4	Espectroscopia Raman e EDXRF - Estado da arte .....	32
3.5	Vantagens e limitações das técnicas analíticas.....	34
4	Desenvolvimento da Gaiola de Faraday .....	35
4.1	Gaiola de Faraday .....	35
4.2	Canhão de eletrões.....	37
5	Materiais e Métodos .....	39
5.1	Preparação das amostras .....	40
5.2	Análise por PIGE.....	41
5.2.1	Equipamento.....	41
5.2.2	Condições experimentais.....	44
5.2.3	Simulações.....	45
5.2.4	Análise dos dados.....	45
5.3	Análise por espectroscopia Raman .....	48
5.3.1	Equipamentos .....	49
5.3.2	Condições experimentais.....	49
5.4	Análise por EDXRF.....	51
5.4.1	Equipamento.....	51
5.4.2	Condições experimentais.....	52
5.5	Protocolo de verniz de flúor .....	52
5.6	Protocolo de ciclos erosivos .....	53
5.6.1	Preparação da solução de ácido cítrico mono-hidratado.....	53
5.6.2	Modelo <i>in vitro</i> de ciclos erosivos .....	54
5.7	Análise Estatística.....	55
5.7.1	Teste t-student.....	55
6	Resultados e Discussão .....	57
6.1	Resultados do estudo de PIGE .....	57

<b>6.2</b>	<b>Resultados do estudo de EDXRF .....</b>	<b>65</b>
<b>6.3</b>	<b>Resultados do estudo de Raman.....</b>	<b>72</b>
<b>7</b>	<b>Conclusões e Perspetivas Futuras .....</b>	<b>79</b>
<b>7.1</b>	<b>Conclusões.....</b>	<b>79</b>
<b>7.2</b>	<b>Perspetivas Futuras.....</b>	<b>80</b>
	<b>Bibliografia .....</b>	<b>81</b>
	<b>Apêndice A.....</b>	<b>91</b>
	<b>Apêndice B.....</b>	<b>98</b>
	<b>Apêndice C.....</b>	<b>99</b>



# Índice de figuras

Figura 2.1 - Ilustração da estrutura do dente. Adaptado de [16].	3
Figura 2.2 - Representação esquemática do papel do flúor em várias zonas do meio intraoral. Adaptado de [6].	9
Figura 3.1 - Gráfico de seção eficaz do $^{19}\text{F}$ de $E_{\gamma}=197$ keV em função da energia do feixe de partículas, após a reação $^{19}\text{F}(p, p'\gamma)^{19}\text{F}$ . Função de excitação retirada de [45].	16
Figura 3.2 - Gráfico de seção eficaz do $^{31}\text{P}$ de $E_{\gamma}=1266$ keV em função da energia do feixe de partículas, após a reação $^{31}\text{P}(p, p'\gamma)^{31}\text{P}$ . Função de excitação retirada de [45].	16
Figura 3.3 - Espectro de raios gama obtido através da técnica PIGE da amostra do esmalte dentário. Foi adquirida a uma energia de 3200 keV.	18
Figura 3.4 - Representação das subcamadas da amostra e da divisão de energia (x- espessura da amostra e R- o alcance das partículas). Adaptado de [46].	19
Figura 3.5- Fotografia da base de dados do programa ERYA-BULK.	20
Figura 3.6 - Interface do software ERYA.	21
Figura 3.7 - Diagrama representativo dos níveis de energias e das transições referente a dispersão de Rayleigh (a) e dispersão Raman Stokes (b) e Anti-Stokes (c). Adaptado de [63].	24
Figura 3.8 - Representação dos modos normais de vibração numa molécula triatómica: alongamento (simétrico).	25
Figura 3.9 - Espectro Raman obtido da matriz da hidroxiapatite da amostra de esmalte.	26
Figura 3.10-Ilustração de $\mu$ -Espectroscopia Raman Confocal. Adaptado de [68].	28
Figura 3.11 - Ilustração do fenómeno de fluorescência de raios-X. Adaptado de [70].	29
Figura 3.12- Ilustração dos fenómenos de dispersão da interação de raios-X com a matéria. Adaptado de [71].	31
Figura 3.13-Espectro de raios-X obtido de uma amostra do esmalte dentário.	32
Figura 4.1 - Desenho 3D da nova gaiola. Colocada no interior da câmara.	36
Figura 4.2 - Fotografia de porta-amostras manual. Retirado de [78].	36
Figura 4.3- Fotografia da gaiola de Faraday antigo e câmara. A- Interior da câmara.; B- Gaiola de Faraday. Adaptado de [78].	37
Figura 5.1-Fluxograma do procedimento experimental.	40
Figura 5.2 - Esquema ilustrativo do procedimento do corte do dente molar (removeu a parte oclusal (O) e a parte radical (R)). Adaptado de [80].	41
Figura 5.3 - Fotografia do equipamento utilizado para cortar dentes.	41
Figura 5.4 - Fotografia da chapa de Ta e os 3 orifícios. Retirada de [82].	42
Figura 5.5 - Esquema representativo das linhas de reações nucleares do acelerador Tandem. Adaptado de [44].	42

Figura 5.7- Fotografia da chapa de níquel incluindo a parte da chapa de ouro do colimador da câmara de reações nucleares. Retirado de [41].	43
Figura 5.6- Fotografia da chapa de níquel que protege o colimador da câmara de reações nucleares. Retirado de [41].	43
Figura 5.8 - Interior da câmara de reações nucleares e os componentes associados. A- Sistema de colimadores; B- Detector gama; C- Detectores PIPS; D-Beam stopper. Adaptado de [82].	44
Figura 5.9- Fotografia da montagem das amostras no porta-amostra.	44
Figura 5.10 - Simulação do alcance do feixe de prótons de 3200 keV numa matriz de hidroxiapatite.	45
Figura 5.11 - Reta de calibração da energia da radiação em função do canal.	46
Figura 5.12 - Espectro com representação das emissões gama do F a 197 keV, Na a 440 keV e P a 1266 keV.	46
Figura 5.13- Exemplo de uma simulação no programa ERYA-BULK.	47
Figura 5.14 - Fotografia do espectrómetro confocal $\mu$ -Raman da Xplora utilizado na análise por Raman.	49
Figura 5.15- Comparação dos espectros obtidos de uma amostra do esmalte dentário com os polarizadores e paralelos e perpendiculares entre si.	50
Figura 5.16 - Fotografia do M4-Tornado da Bruker.	51
Figura 5.17 - Pasta dentífrica sem flúor (COUTO) [86].	52
Figura 5.18 - Verniz dentário VOCO Profluorid Varnish [85].	53
Figura 5.19 - Fotografia da aplicação de saliva artificial na amostra tratada com verniz.	53
Figura 5.20 - Fotografia do produto ácido cítrico mono-hidratado [88].	54
Figura 5.21 - Representação esquemática do ciclo erosivo aplicado neste estudo.	55
Figura 6.1- Concentração de flúor em $\mu\text{g/g}$ obtidas nas amostras do grupo A antes do tratamento.	57
Figura 6.2- Concentração de flúor em $\mu\text{g/g}$ obtidas nas amostras do grupo B antes da lavagem com pasta dentífrica.	58
Figura 6.3- Comparação da concentração de flúor em $\mu\text{g/g}$ entre diferentes fases do tratamento das amostras do grupo A.	60
Figura 6.4-Comparação da concentração de sódio em $\mu\text{g/g}$ entre diferentes fases do tratamento das amostras do grupo A.	62
Figura 6.5- Comparação da concentração de fósforo em $\mu\text{g/g}$ entre diferentes fases do tratamento das amostras do grupo A.	64
Figura 6.6- Comparação da concentração elementar do Ca em diferentes fases do tratamento das amostras do grupo A.	65
Figura 6.7- Comparação da concentração elementar do P em diferentes fases do tratamento das amostras do grupo A.	66

Figura 6.8- Comparação da concentração elementar do Ca em diferentes fases do tratamento das amostras do grupo B.....	67
Figura 6.9- Comparação da concentração elementar do P em diferentes fases do tratamento das amostras do grupo B.....	68
Figura 6.10- Espectro EDXRF obtida da pasta dentífrica couto. ....	69
Figura 6.11- Resultados da razão de despolarização das amostras do grupo A em pré e pós tratamento. ....	72
Figura 6.12- Resultados da razão de despolarização das amostras do grupo B em pré e pós tratamento. ....	73
Figura 6.13- Comparação dos espectros obtidos com a amostra A3 com o polarizador paralelo antes do tratamento e após o tratamento.....	75
Figura 6.14- Comparação dos espectros obtidos com a amostra A3 com o polarizador paralelo antes do tratamento e após o tratamento.....	75
Figura A.1- Desenho em 3D da gaiola de Faraday. ....	91
Figura A.2- Desenho em 3D do conjunto gaiola de Faraday e canhão de elétrões. ....	91
Figura A.3- Desenho do corpo da gaiola de Faraday. ....	92
Figura A.4- Desenho da base da gaiola de Faraday. ....	93
Figura A.5- Desenho da tampa 2 da gaiola de Faraday.....	94
Figura A.6- Desenho da tampa 1 da gaiola de Faraday.....	95
Figura A.7- Desenho do suporte para a gaiola de Faraday.....	96
Figura A.8- Desenho do canhão de elétrões.....	97
Figura B.1- Comparação da concentração de sódio em $\mu\text{g/g}$ entre diferentes fases do tratamento das amostras do grupo B.....	98
Figura B.2 - Comparação da concentração de fósforo em $\mu\text{g/g}$ entre diferentes fases do tratamento das amostras do grupo B.....	98
Figura C.1- Poster apresentado no XXXIX Congresso Anual da SPEMD-2019.....	99
Figura C.2- Poster apresentado na conferencia Colloquium Spectroscopicum Internationale XLI no México.....	100



# Índice de tabelas

Tabela 3.1- Vantagens e limitações das técnicas analíticas (PIGE, Espectroscopia Raman e EDXRF) [14], [77].....	34
Tabela 5.1-Composição do ácido cítrico.....	54
Tabela 6.1- Resumo dos resultados da concentração de flúor e respetiva incerteza absoluta obtidos nas amostras do grupo A e B em pré-tratamento.....	58
Tabela 6.2-Resumo dos resultados da concentração de flúor e respetiva incerteza obtidos nas amostras do grupo A todas as fases de tratamento. ....	60
Tabela 6.3-Percentagem do aumento de flúor nas amostras do grupo A após tratamento com verniz e lavagem com pasta dentífrica. ....	61
Tabela 6.4- Resumo dos resultados da concentração de sódio e respetiva incerteza obtidos nas amostras do grupo A todas as fases de tratamento. ....	63
Tabela 6.5- Resumo dos resultados da concentração de fósforo e respetiva incerteza obtidos nas amostras do grupo A todas as fases de tratamento. ....	64



# Lista de Siglas e Acrónimos

<b>μ-CT</b>	Do inglês, <i>Micro-Computed Tomography</i>
<b>μ-Raman</b>	Micro-Raman
<b>ACP</b>	Do inglês, <i>Amorphous Calcium Phosphate</i>
<b>APF</b>	Do inglês, <i>Acidulated Phosphate Fluoride</i>
<b>BGO</b>	Do inglês, <i>Bismuth Germanium Oxide</i>
<b>CCD</b>	Do inglês, <i>Charge Coupled Devices</i>
<b>CTN</b>	Centro Tecnológico e Nuclear
<b>EDS</b>	Do inglês, <i>Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy</i>
<b>EDXRF</b>	Do inglês, <i>Energy Dispersive X-Ray Fluorescence</i>
<b>EPMA</b>	Do inglês, <i>Electron Probe Micro-Analyzer</i>
<b>ERYA</b>	Do inglês, <i>Emitted Radiation Yield Analysis</i>
<b>FCM</b>	Do inglês, <i>Fluoride Containing Materials</i>
<b>FMDUL</b>	Faculdade de Medicina Dentária da Universidade de Lisboa
<b>GIBBO</b>	Grupo de Investigação de Biologia e Bioquímica Oral
<b>HPGe</b>	Do inglês, <i>High Purity Germanium</i>
<b>IBA</b>	Do inglês, <i>Ion Beam Analysis</i>
<b>IST</b>	Instituto Superior Técnico
<b>IV</b>	Infravermelho
<b>LibPhys</b>	Laboratório de Instrumentação, Engenharia Biomédica e Físicas das Radiações
<b>NRA</b>	Do inglês, <i>Nuclear Reaction Analysis</i>
<b>MEV</b>	Microscopia Eletrónica de Varrimento
<b>pH</b>	Potencial de hidrogénio
<b>PIGE</b>	Do inglês, <i>Particle Induced Gamma-ray Emission</i>
<b>PIXE</b>	Do inglês, <i>Particle Induced X-ray Emission</i>
<b>PIPS</b>	Do inglês, <i>Passivated Implanted Planar Silicon</i>
<b>ROI</b>	Do inglês, <i>Region of Interest</i>
<b>SDF</b>	Do inglês, <i>Silver Diamine Fluoride</i>
<b>SRIM</b>	Do inglês, <i>Stopping and Range of Ions in Matter</i>
<b>SSD</b>	Do inglês, <i>Silicon Drift Detector</i>
<b>TM</b>	Tempo Morto
<b>TMR</b>	Do inglês, <i>Transverse MicroRadiography</i>
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>XRF</b>	Do inglês, <i>X-Ray Fluorescence</i>



# Lista de símbolos

<b>a</b>	Partícula projétil
<b>A</b>	Núcleo alvo
<b>b</b>	Partícula projétil após colisão com rearranjo
<b>B</b>	Núcleo alvo após colisão com rearranjo ou captura radiativa
<b>d</b>	Espessura de um material
<b>e</b>	Carga do eletrão
<b>E</b>	Campo elétrico
<b>E<sub>0</sub></b>	Amplitude máxima do campo elétrico
<b>f<sub>i</sub></b>	Fração isotópica
<b>f<sub>m</sub></b>	Fração mássica
<b>I</b>	Intensidade de radiação
<b>I<sub>0</sub></b>	Intensidade de radiação inicial
<b>K<sub>α</sub></b>	Riscas mais intensas da série K do espectro descontínuo de raio-X
<b>N</b>	Número de partículas alvo por unidade de área
<b>N<sub>Av</sub></b>	Número de Avogadro
<b>p</b>	Protão
<b>Q</b>	Carga coletada
<b>R</b>	Alcance
<b>S</b>	Poder de paragem
<b>Se</b>	Poder de paragem eletrónico
<b>Sn</b>	Poder de paragem nuclear
<b>W</b>	Distribuição angular
<b>Y</b>	Rendimento
<b>X</b>	Distância percorrida num material
<b>Z</b>	Número atómico
<b>ε</b>	Seção eficaz de paragem
<b>φ</b>	Ângulo de dispersão de partículas
<b>Ω</b>	Ângulo sólido
<b>ρ</b>	Razão de despolarização
<b>σ</b>	Seção eficaz
<b>θ</b>	Ângulo de dispersão de partículas
<b>μ</b>	Coefficiente de atenuação linear
<b>Γ</b>	Espessura de um filme



# 1 Introdução

Os dentes humanos são fundamentais para uma fala adequada, mas a sua principal função é a mastigação. Diariamente, os dentes estão constantemente em contato com vários agentes responsáveis pelo aparecimento de algumas doenças odontológicas. Estes agentes advêm de diversos fatores relacionados com o ambiente, o estilo de vida, os medicamentos e a alimentação. Os agentes são constituídos por elementos que não são apenas ácidos, mas também que contêm elevada percentagem de açúcar que podem causar a desmineralização dos tecidos duros dos dentes (esmalte e dentina) levando deste modo, ao aparecimento da cárie e da erosão dentária [1], [2], [3].

A cárie dentária é uma doença odontológica crónica resultante da desmineralização provocada pela ação bacteriana e afeta principalmente as crianças e os adultos. Enquanto que a erosão dentária é definida como uma perda progressiva do mineral dentário sem envolver a ação bacteriana. No entanto, com a incidência de bebidas ácidas (refrigerantes, energéticos e sucos de frutas industrializados) nos hábitos alimentares, a prevalência desta doença demonstrou se aumentar cada vez mais [3], [4].

Sendo assim, com a introdução dos agentes de flúor no tratamento dentário em 1930, a cárie dentária tem vindo a diminuir significativamente [5]. Os agentes de flúor demonstraram uma enorme eficácia no combate à ocorrência do processo da desmineralização do dente. Atualmente existe uma variedade de agentes de flúor vendidos no mercado, que podem ser aplicados através de diferentes métodos, nomeadamente, métodos de aplicação profissional (aplicação de gel, vernizes e espumas), método de autoaplicação (pastas de dentes, bochechos fluoretados, comprimidos, pastilhas e gomas de mastigar) e método coletivo ou baseado na comunidade (água fluoretada, leite e sal) [6].

O verniz de flúor é atualmente o agente tópico de flúor mais recomendado para a prevenção da cárie, isto porque, a sua aderência num prazo alargado na superfície dentária permite-lhe funcionar como um depósito libertador de flúor. Este produto, ao interagir com a saliva forma compostos de fluoreto de cálcio ( $CaF_2$ ) que ao estarem num meio de pH ácido libertam iões de flúor ( $F^-$ ) no qual, contribui para diminuição da desmineralização e assim, evitando o desenvolvimento da cárie [7], [8]. O flúor é

caracterizado pela sua rápida incorporação nos cristais da hidroxiapatite dos tecidos duros dos dentes, dando origem a fluorapatite que é muito mais resistente às soluções ácidas quando comparada com a hidroxiapatite [9].

Estudos realizados demonstraram que o flúor para além de ser o principal agente de prevenção da cárie dentária também apresenta um efeito protetor no combate à erosão dentária [10], [11].

Tendo em conta o efeito protetor do flúor no combate à cárie e à erosão dentária, vários estudos foram realizados de forma a compreender o metabolismo deste elemento químico quando aplicado nos dentes humanos. No entanto, verifica-se também que o flúor quando ingerido em excesso pode apresentar efeitos colaterais como a fluorose dentária que ocorre durante a formação dos dentes [12].

Técnicas analíticas como a espectroscopia Raman e a fluorescência de raios-X dispersiva em energia (EDXRF), foram utilizadas nos estudos da desmineralização dos dentes e mostraram capazes de oferecer informações relevantes acerca da composição elementar e estrutural dos tecidos duros dos dentes quando expostos aos agentes ácidos. Outra técnica que se provou ser bastante eficaz nos estudos de aplicação odontológica é a espectroscopia de emissão de raios gama induzida por partículas (PIGE) pois, permite fazer a quantificação do flúor ao longo dos tecidos dentários. No entanto, apesar de existirem muitos estudos sobre os diferentes modos de aplicação dos agentes de flúor no tratamento dentário, ainda não está detalhado o modo mais eficaz da sua aplicação à interação dentária e as melhores concentrações e distribuições no esmalte e na dentina necessárias para evitar a perda mineral. Neste sentido, pretende-se com esta dissertação fazer uma análise da distribuição do flúor no esmalte, ajustando as técnicas analíticas, de modo a obter resultados conclusivos [13], [14], [15].

Para tal, pretende-se cumprir os seguintes objetivos:

- Desenvolver uma gaiola de Faraday para a medição correta do número de prótons que incidem na amostra na técnica PIGE;
- Analisar a concentração de flúor no esmalte após a aplicação tópica de vernizes de flúor em esmalte dentário, através da técnica PIGE;
- Avaliar a alteração do conteúdo mineral e elementar do esmalte por ação destes vernizes considerando o potencial protetor da adição do flúor, através das técnicas de espectroscopia Raman e espectroscopia por EDXRF.

## 2 Dente humano

Cerca de 20% da área da superfície da boca é constituída pelos dentes. Estes têm como principal função a mastigação dos alimentos [1].

A propriedade do dente consiste em quatro estruturas: o esmalte, a dentina, o cemento e a polpa (figura 2.1) [16]. O esmalte é uma estrutura dura e inerte que reveste a parte externa da superfície dentária. É responsável pela proteção da coroa anatômica. A dentina é uma estrutura menos mineralizada que o esmalte, compõe o maior volume da porção interna do dente e é suportada pela polpa, um tecido conjuntivo macio. O cemento é uma estrutura externa da raiz do dente e é tão duro quanto ao osso. O dente é dividido ainda em três partes: a coroa (com uma ou mais cúspides) que é totalmente coberta pelo esmalte e fica exposta na cavidade ora, a raiz que encontra no interior do osso e coberto pelo cemento e o colo que situa entre a coroa e a raiz [1], [17].



Figura 2.1 - Ilustração da estrutura do dente. Adaptado de [16].

## 2.1 Esmalte dentário

### 2.1.1 Formação do esmalte

O esmalte resulta de um processo designado amelogenese e difere significativamente de outros tecidos mineralizados por ter um conteúdo orgânico de origem epitelial. Na fase inicial da formação, o esmalte é compreendido por quatro camadas: epitélio interno, retículo estrelado, estrato intermédio e epitélio externo. Sendo o epitélio interno confrontado posteriormente por várias alterações morfológicas que pode ser dividido em cinco fases. Na fase de **pré-secreção** da matriz do esmalte, as células do epitélio interno apresentam uma forma cada vez mais colunar, ocorre uma inversão de polaridade, tendo o movimento do núcleo na direção à extremidade do estrato intermédio. Nesta fase, as células do epitélio interno são designadas de pré-ameloblastos. Na fase de **secreção**, o conteúdo das vesículas é depositado no espaço extracelular e os cristais da hidroxiapatite aparecem na matriz com uma forma muito fina, semelhante a uma agulha. Nesta fase, as células são designadas de ameloblastos e se encontram poucas mineralizadas. Na fase de **transição**, ocorre uma redução de até 50% dos ameloblastos devido a apoptose (morte celular programada). Já na fase de **maturação**, o esmalte deixa de ser rico em conteúdo orgânico e pouco mineralizado, passa a ser totalmente mineralizado devido a entrada dos iões do cálcio no seu interior. A fase de **pós-maturação** é caracterizada pelas alterações morfológicas referentes às funções do esmalte. Nesta fase, os ameloblastos são separados da parte superficial do esmalte por uma cutícula [1], [18].

### 2.1.2 Estrutura do esmalte

O esmalte é dos tecidos dentários mais resistente, não se deforma facilmente, apresenta baixa resistência à tração e é pouco poroso (apenas 5% do volume). Este tecido não possui uma capacidade generativa pelo que, não consegue recuperar após uma perda mineral. Existem vários processos que contribuem para a sua perda nomeadamente erosão e abrasão dentário, atrito e a cárie dentária [18].

É constituído por 96% mineral que corresponde aos cristais de hidroxiapatite incluindo algumas impurezas e 4% não mineral, sendo 3% corresponde a água e 1% a matéria orgânica (matriz do esmalte). A combinação dos componentes orgânicos e inorgânicos fornece uma boa dureza e resistência para que o esmalte desempenhe bem a sua função [18].

Os cristais da molécula da hidroxiapatite de fórmula química  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  são hexagonais com aproximadamente 70 nm de largura e 25 nm de espessura, concentrados em estruturas prismáticas e inter-prismáticas. Uma das características do esmalte é sua solubilidade em meio ácido, permitindo alguma substituição dos iões da hidroxiapatite. O catião  $\text{Ca}^{2+}$  pode ser substituído por  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ , ou  $\text{Zn}^{2+}$ , e o grupo  $\text{OH}^-$ , e  $\text{PO}_4^{3-}$  por  $\text{CO}_3^{2-}$ ,  $\text{SO}_4^{4-}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{Cl}^-$  ou  $\text{F}^-$ . A substituição do ião  $\text{OH}^-$  por ião  $\text{F}^-$  tem grande importância do ponto de vista clínico sendo que, dessa substituição o mineral resultante é fluorapatite  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$  que é muito resistente à dissolução por ácido

[1], [18]. No entanto, devido a algumas ações diárias no meio oral que conseqüentemente podem induzir as substituições dos iões referidas anteriormente, a hidroxiapatite do dente, não se encontra na sua composição pura, pois apresenta uma deficiência do elemento cálcio. A esta hidroxiapatite deficiente em cálcio é designada de hidroxiapatite carbonatada [19]. Outras alterações que podem surgir nas propriedades da hidroxiapatite é a inibição do crescimento dos cristais provocada pela substituição do ião magnésio e o aumento e diminuição da solubilidade provocada pela substituição do ião de carbono e flúor, respetivamente [20].

No espaço entre os cristais da hidroxiapatite, encontram-se os poros que tem presente as proteínas, os lípidos e a água. A maior quantidade da água presente no esmalte está associada aos poros, a restante contribui para a formação de uma camada hidratante que reveste os cristais. A presença desses compostos orgânicos no esmalte facilita a passagem de pequenas moléculas (ácido láctico) e alguns iões (hidrogénio e cálcio) [18], [21].

A unidade estrutural do esmalte é o prisma, inicia-se desde a junção dentina-esmalte até a superfície do dente. Os prismas têm cerca de 5-6 µm de diâmetro e podem chegar a 3 mm de comprimento. O esmalte prismático é predominante na zona interna, próximo da dentina e à medida que avança para zona superficial, torna-se menos solúvel, ocorrendo uma diminuição de poros, dando origem a um esmalte aprismático. Nesta zona, os cristais estão paralelos entre si e numa direção perpendicular à superfície do esmalte. Trata-se de uma zona muito rica em alguns oligoelementos como o flúor que é essencial no processo de remineralização do esmalte [18], [9].

## **2.2 O processo de remineralização e desmineralização do esmalte**

A desmineralização é um processo de perda de iões minerais dos cristais da hidroxiapatite dos tecidos duros do dente (esmalte, dentina e cimento). Este processo é causado pelo ataque ácido proveniente de dois mecanismos principais: ácido dietético que advém da alimentação diária e ataque ácido microbiano das bactérias presentes na boca. O esmalte apresenta maior solubilidade num meio ácido e a água presente na sua constituição facilita a difusão ácida e do conteúdo mineral no dente. No entanto, a ocorrência de um ataque ácido resulta facilmente numa dissolução química dos conteúdos orgânicos e inorgânicos do esmalte [20].

Os fatores que estão na origem da ação ácida no processo de desmineralização são classificados como extrínsecos e intrínsecos ao organismo humano. Os fatores extrínsecos estão associados a dieta e os medicamentos enquanto que, os extrínsecos associam-se a vômitos e doença de refluxo gástrico [20], [22].

Diariamente as pessoas consomem alimentos que contém carboidratos que podem ser metabolizados pelas bactérias presentes na placa dentária, produzindo ácidos que contribuem para o processo da desmineralização do esmalte. A ação desses ácidos permite dissolver o fosfato de cálcio e posteriormente levará a formação de uma cavidade no esmalte caso esta ação não for impedida. Como

exemplos dos carboidratos consumidos no dia-a-dia tem-se: glicose, sacarose e frutose ou amido cozido [4], [20].

A medida que os ácidos atravessam a placa bacteriana para entrarem na zona porosa do esmalte, dissociam-se e produzem iões de hidrogénio capazes de dissolver o mineral do esmalte através da perda do fosfato de cálcio para o exterior do dente. A contribuição desses iões na diminuição do pH na placa bacteriana facilita a difusão dos ácidos ao longo do seu percurso no esmalte. O ataque ácido por esses iões é predominante nas regiões do esmalte em que a hidroxiapatite se encontra rica em carbono e fraca em cálcio, isto é, regiões de maior solubilidade. A solubilidade variável nas diferentes regiões do esmalte permite que o processo de desmineralização tenha uma característica seletiva [4], [23].

A erosão e a cárie dentária são duas lesões dentárias bastante ameaçadoras para a saúde oral que resultam do processo de desmineralização [20]. A erosão dentária consiste numa perda crónica localizada dos tecidos duros do dente por dissolução ácida por ação não bacteriana. Normalmente, esta lesão ocorre a um pH da cavidade oral bastante baixo de aproximadamente 1 a 3, quando se trata dos ácidos resultante dos fluidos gástricos. Esta lesão associa-se com maior prevalência às pessoas que consomem frequentemente bebidas carbonatadas como refrigerantes [24], [25]. Enquanto que, a cárie corresponde a perda do conteúdo não orgânico dos tecidos duros do dente devido à ação dos ácidos produzidos pelas bactérias. As bactérias que envolvem no processo da cárie são tipicamente *Streptococcus mutans* e *sobrinus*. O processo desta doença inicia-se na placa dentária e posteriormente pode ser observada na zona da coroa (cárie coronal) e raiz (cárie radicular) do dente. O percurso inicial do processo da cárie tem uma característica reversível sendo possível remover os componentes ácidos da placa dentária [26], [27].

A desmineralização é um processo reversível sendo que, os cristais da hidroxiapatite parcialmente desmineralizados podem ser reparados e chegam a ter novamente o seu tamanho original. A este processo de reparação é designado por remineralização. O pH, a saliva e o flúor são três componentes fundamentais no controle de desmineralização, inibindo desta forma a erosão e cárie dentária. Estes são também designados de agentes de remineralização [20].

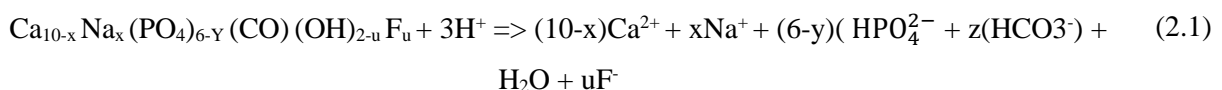
- **pH**

A cavidade oral está constantemente num conflito entre processos de desmineralização e remineralização. A fronteira entre estes dois processos relaciona-se com o nível de pH da boca no qual, abaixo do valor de 5,5, aproximadamente, pode ocorrer o processo de desmineralização do esmalte e, o processo inverso, pode ocorrer se este mesmo valor for ultrapassado [23], [28]. Se o valor de pH for inferior ou igual a 5,5, o mesmo pode tornar-se crítico, a partir do qual pode ocorrer uma troca iónica na mesma proporção entre uma solução e uma estrutura sólida. Na determinação do valor de pH crítico também é considerada a solubilidade da estrutura sólida e a ação de certos constituintes minerais da solução. A concentração de fosfato de cálcio apresenta característica variáveis no fluido da placa

dentária consoante o indivíduo, pelo que para ocorrer uma cárie, o pH crítico deve situar-se em média entre os 5,5 e os 5,7. Em relação a erosão, como não está associada à placa dentária, não se estabelece nenhum pH crítico [29].

Assim, em condições fisiológicas normais, o pH no meio bucal é de aproximadamente 7,4 sendo que, durante o sono sofre uma ligeira diminuição [29].

Algumas frutas têm presente o ácido cítrico, cuja fórmula química é  $C_6H_8O_7$ , que é considerado prejudicial para os dentes devido ao seu pH de aproximadamente 3,8-5. Este ácido contribui para a perda do mineral dentário através da sua dupla ação. O contacto deste com cada molécula da água leva à formação de três iões de hidrogénio,  $H^+$ . No entanto, o ião  $H^+$  é capaz de atacar diretamente a superfície dos cristais minerais, possibilitando a remoção do cálcio quando este liga-se aos iões negativos da solução ácida. Para além disto, os iões  $PO_4^{3-}$  e  $CO_3^{2-}$  são removidos para o exterior do esmalte por ação dos três iões de  $H^+$ . A equação 2.1 abaixo representada, corresponde ao processo da ação do ácido cítrico no esmalte dentário [19].



- **Saliva**

A saliva é um fluido claro, ligeiramente ácido (valor de pH normal entre 6-7), indispensável para a proteção da saúde oral. Este trata-se de uma secreção exócrina, que pode ser classificada como serosa, mucosa ou mista. Quanto às secreções serosas, estas são produzidas a partir da glândula parótida, enquanto que as secreções mucosas são produzidas pelas glândulas menores. Quando as secreções serosas e mucosas são mistas, estas são produzidas pelas glândulas sublinguais e submandibulares [30].

Nos conteúdos da saliva estão presentes alguns eletrólitos nomeadamente sódio, potássio, magnésio, bicarbonatos e fosfatos. Além destes, encontram-se proteínas, enzimas, mucinas, imunoglobulinas e produtos que contêm nitrogénios como a amónia e a ureia. As proteínas (estatinas, histatinas, cistatinas) contribuem para a formação de uma película semipermanente na superfície do dente. Esta película funciona como uma barreira protetora da superfície dentária, quando esta entra em contacto com o conteúdo ácido. O tamanho das proteínas é grande suficiente para não penetrarem no poro do esmalte, sendo capazes de ligar a hidroxiapatite, ajudando no controle do crescimento dos cristais e na estabilidade da hidroxiapatite do esmalte dentário. Sendo assim, as proteínas facilitam a penetração dos minerais que favorecem o processo de remineralização e evitam a saída dos mesmos [29], [30].

Para além da película protetora, a saliva possui inúmeras outras funções nomeadamente na sua ação tampão ou neutralizante, atuando como fonte constante de cálcio e fosfato e na sua ação antibacteriana e de limpeza dos carboidratos e ácidos da placa [20].

A ação tampão da saliva é mais eficiente perante uma alta taxa de fluxo salivar estimulado quando comparada com condições de baixo fluxo salivar não estimulado [30]. Esta ação influencia o pH intraoral, mantendo-o numa faixa fisiológica saudável entre 6-7. Além disso, forma um complexo de fosfato de cálcio e glicoproteína com capacidade de se incorporar no esmalte dentário, designado de precipitina salivar. A alta solubilidade do fosfato de cálcio nas proteínas salivares, permite a formação de um mineral, no qual a sua dissolução antecede a dos minerais dentários. Contudo, desfavorece o processo de desmineralização [20], [29].

Em relação à cárie, o pH da placa bacteriana, modificado pela saliva, tem um efeito neutralizante muito mais eficiente do que o próprio pH da saliva. Este efeito neutralizante também é influenciado pela espessura e o número de bactérias na placa. A erosão também está relacionada com a capacidade tampão e secreção salivar [20], [30].

A saliva é supersaturada com cálcio e fosfato, tendo concentrações superiores à solubilidade de fosfato de cálcio no esmalte. Estes elementos presentes na saliva são fundamentais para o processo de remineralização, no sentido em que se precipitam durante as condições de repouso, de forma a compensar as perdas dos minerais durante um ataque ácido [23], [30].

A película protetora contém substâncias antibacterianas e tampões que neutralizam os ácidos produzidos pelo metabolismo bacteriano na placa. No entanto, permitem uma redistribuição do cálcio e fosfato na zona da lesão, provocada pelo processo de desmineralização, permitindo ainda, uma regeneração de novas superfícies nos cristais não afetados (cristais remanescentes) por este processo [4].

- **Flúor**

O flúor é conhecido como um elemento fundamental na inibição do processo de desmineralização evitando assim, a formação da cárie e da erosão dentária.

Ao aplicar substâncias que contém flúor no dente, o ião fluoreto pode substituir o ião  $\text{OH}^-$  na hidroxiapatite, dando origem a molécula de fluorapatite que é muito mais resistente ao processo de desmineralização quando comparada com a hidroxiapatite do esmalte. Isto porque, o valor do pH associada a fluorapatite (pH=4,5) é ligeiramente menor que o da hidroxiapatite (pH=5,5) contribuindo para a diminuição da fraqueza da hidroxiapatite perante o ácido. O fluoreto de cálcio ( $\text{CaF}_2$ ) presente nessas substâncias, atua como um reservatório de flúor permitindo a inibição da desmineralização por um período prolongado, chegando até meses [23], [31]. Acredita-se que este efeito num período prolongado advém da resistência de  $\text{CaF}_2$  no ambiente oral a pH neutro e da libertação de iões de flúor em pH ácido [6].

O flúor pode estar presente em diferentes zonas do meio intraoral e consoante estas zonas, pode desempenhar diversas funções. Na figura 2.2 encontra-se o esquema do flúor presente em diferentes zonas do meio intraoral. Este, pode estar tanto no exterior do esmalte (A) nomeadamente na saliva e no

biofilme, como firmemente ligado a estrutura do esmalte (**B-E**). O flúor pode ser encontrado também no líquido interprismático (**B**), fracamente ligado aos cristais da hidroxiapatite (**C e D**) e ainda pode estar na forma de fluoreto de cálcio que é depositado na superfície do esmalte. Esta deposição é influenciada pelo pH ácido e pela concentração e exposição ao flúor. Em pH ácido,  $\text{CaF}_2$  se dissocia em iões de  $\text{F}^-$  e  $\text{Ca}^{2+}$ , libertando-os para o meio oral. Estes iões contribuem para que haja um nível adequado de flúor adsorvido nos cristais. A fração de flúor adsorvido tem um maior efeito protetor no esmalte [6]. No entanto, tendo uma quantidade suficiente dos iões de cálcio e do fósforo na saliva ou na placa dentária, os iões de flúor podem induzir a remineralização do esmalte parcialmente desmineralizado [32].

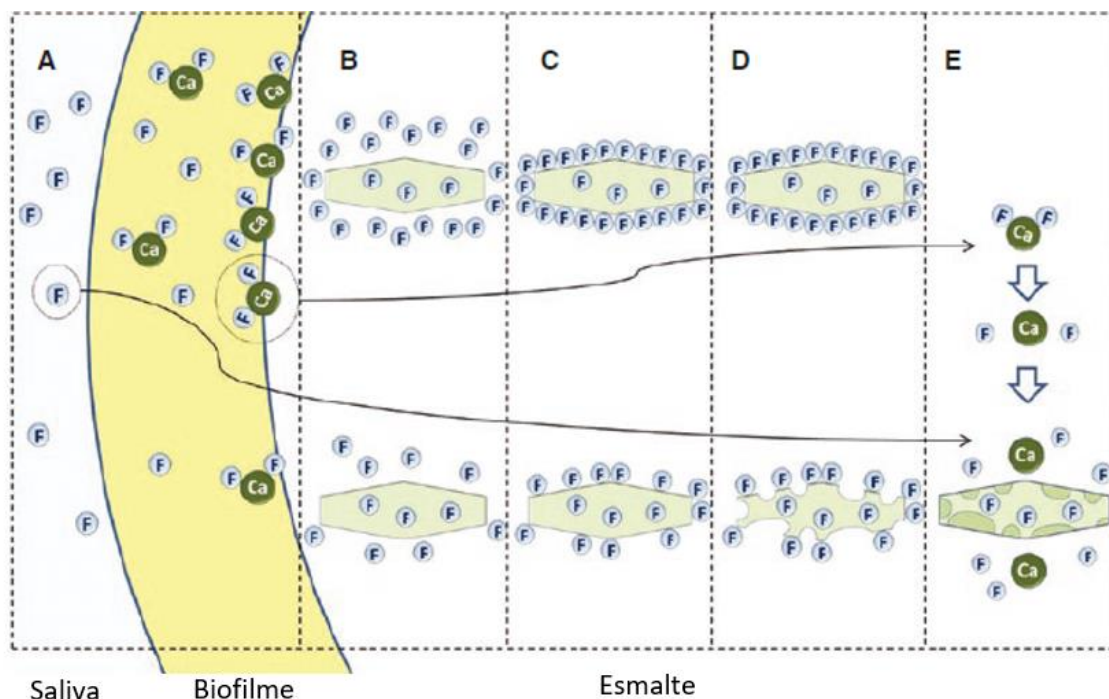


Figura 2.2 - Representação esquemática do papel do flúor em várias zonas do meio intraoral. Adaptado de [6].

O flúor também participa na inibição da atividade bacteriana. Atividade esta, que está na origem da formação da cárie dentária. O ião  $\text{F}^-$  associado ao ião  $\text{H}^+$  forma o fluoreto de hidrogénio (HF) que possui uma característica lipofílica, o que facilita a sua penetração nas membranas bacterianas. Ao entrar nas membranas bacterianas, este se dissocia em ião  $\text{F}^-$  e ião  $\text{H}^+$  devido a característica alcalino do citoplasma da bactéria. Sendo assim, o ião  $\text{F}^-$  consegue inibir várias enzimas celulares como a enolase e a ATPase, que são responsáveis pelo metabolismo do açúcar [28].

Assim, pode-se distinguir três principais mecanismos de ação tópica do flúor, perante um pH ácido no meio oral [4]:

- a) Inibir o metabolismo bacteriano;

- b) Inibir a desmineralização;
- c) Promover a remineralização.

Apesar do flúor apresentar várias funções que contribuem no tratamento dentário, é de salientar que a aplicação ou o consumo excessivo de flúor pode resultar numa fluorose dentária, tratando de um defeito da mineralização do esmalte [20], [33].

## 2.3 Aplicação tópica de vernizes de flúor no esmalte dentário

Dos vários mecanismos de ação do flúor no tratamento dentário, o efeito da aplicação tópica (como pastas de dentes, géis, espumas, enxaguadouros bucais e vernizes) de produtos que contém flúor demonstrou-se ser mais eficaz comparada com o efeito da aplicação sistémica (como água, sal, açúcar, leite e suplementos). Os métodos de aplicação tópica pode ser aplicado tanto em crianças como em adultos [6], [4].

Os vernizes são os principais agentes recomendados nos consultórios e atualmente existem mais de 30 produtos desses no mercado. Estes produtos, contém fluoreto de sódio (NaF) e foram desenvolvidos na década de 1960 com o objetivo de aumentar a propriedade de aderência de flúor nas superfícies dentárias por um período prolongado. Podem ser considerados mais seguros quando comparadas com outros agentes por apresentarem riscos de ingestão reduzidos e pelos seus efeitos mesmo quando a aplicação feita é de pequena quantidade [6], [34].

Muitos estudos sobre a aplicação tópica de vernizes de flúor no esmalte dentário foram feitos. Num estudo realizado por Perrini *et al.* [35], avaliaram *in vivo*, a eficácia de um tipo de verniz de flúor da marca Duraphat® na prevenção da desmineralização do esmalte na forma de lesões da mancha branca, em indivíduos com aparelhos dentários fixos. Estas lesões de manchas brancas, correspondem a uma porosidade nas áreas da subsuperfície do esmalte, induzidas pela desmineralização cariosa e aparecem frequentemente em indivíduos que usam aparelhos dentários fixos. Uma das causas dessas manchas é não manter uma higiene bucal adequada. Os meios de aplicação tópica de flúor são muitos utilizados para colmatar este tipo de lesão. Neste estudo, o verniz de flúor foi aplicado em vinte e quatro pacientes com idade média de 14 anos e 1 mês. O verniz foi aplicado nos quadrantes 1 e 2 (maxilar esquerda e direita), tendo os quadrantes 3 e 4 (mandibular esquerda e direita) como controle. Os pacientes foram divididos aleatoriamente em 2 grupos no qual, num dos grupos o verniz foi aplicado a cada 3 meses e no outro em cada 6 meses, num período de 12 meses. Os resultados obtidos demonstraram que não houve diferença estatisticamente significativa em aplicar o verniz 2 ou 4 vezes por ano e que a houve efeito protetor na utilização do verniz de flúor contra o aparecimento das manchas brancas, mas não de forma significativa em pacientes com uma boa higiene bucal.

Chandak *et al.* [36], realizaram um estudo *in vivo* onde, comparam a eficácia da aplicação de verniz de flúor (Ivoclar Vivadent, Alemanha) e do material Fosfoeptídeos de Caseína - Fosfato de Cálcio Amorfo (CPP-ACP) na proteção da cárie dentária. O produto CPP-ACP quando incorporado na película

salivar permite uma redução da adesão das bactérias *Streptococcus mutans* que são os principais organismos produtores da cárie dentária. Neste estudo, foram selecionadas 280 crianças com cárie inativa e com dentição primária completa. Destas 280 crianças, 120 apresentaram risco de cárie moderado e alto após uma avaliação microbiológica. As crianças foram divididas em quatro grupos (I, II, III e IV) sendo, nos grupos I, II e III (grupos de testes) foram aplicadas o complexo CPP-ACP, verniz de flúor e uma mistura do complexo CPP-ACP e verniz de flúor, respetivamente e no grupo IV (grupo de controle) não foi aplicado nenhum dos produtos de tratamento. As crianças foram indicadas a fazerem uma higiene bucal habitual. Coletaram amostras de placas dentárias antes e após o tratamento para analisarem a presença das bactérias *Streptococcus mutans* no biofilme. Estas amostras foram incubadas em condições aeróbias por um período de 24 horas. As informações quantitativas dessas bactérias presentes nas placas dentárias são essenciais para a avaliação da eficácia dos produtos aplicados nos dentes. Os resultados obtidos permitiram concluir que, o verniz de flúor aplicado em conjunto com a CPP-ACP é muito mais eficaz no combate a cárie dentária do que quando é aplicado sozinho pois, a aplicação desses produtos condiciona a disponibilidade simultânea de cálcio, fosfato e fluoreto no esmalte. Foram encontrados menos quantidades das bactérias *Streptococcus mutans* após o tratamento do que antes do tratamento.

Alguns estudos da aplicação de verniz de flúor foram feitos em dentes bovinos, isto porque, estudos revelaram que os dentes humanos apresentam características semelhantes ao dos bovinos, nomeadamente a microestrutura, a composição e a orientação da hidroxiapatite do esmalte. As amostras de dentes extraídos de humanos estão cada vez mais difíceis de adquirir graças ao avanço na odontologia preventiva [37]. Num estudo realizado por Han Na *et al.* [38] em amostras de esmalte de bovinos, compararam os efeitos do verniz de flúor na remineralização do esmalte desmineralizado quando a sua aplicação é feita de modo direta (na superfície contaminada pela cárie dentária) e indireta (ao redor da superfície contaminada pela cárie). Foram utilizados cento e vinte seis amostras de esmalte, divididas em quatro grupos de testes (n=28 cada) e um grupo de controle (n=14). Em cada grupo de testes foi dividida em dois subgrupos no qual, foi feita a aplicação direta e indireta do verniz de flúor, respetivamente. Foi aplicado quatro marcas diferentes de verniz de flúor (Duraphat<sup>®</sup>, Enamel Pro<sup>®</sup>, MI<sup>™</sup> e Clinpro<sup>™</sup>) nesses quatro grupos de testes, respetivamente. Todos esses produtos contêm 5% de NaF. Após o tratamento com verniz, as amostras de testes e controle foram submersas em saliva artificial por um período de 72 horas, sendo removido o verniz nos primeiros 24h e trocada a saliva em cada 24 horas. As amostras também foram testadas quanto à resistência ao ataque ácido no qual, foram imersas em suco de laranja com 2,3 de pH, por um período de 2h. Foram feitos testes de microdureza em todas e os resultados obtidos constataram-se que a remineralização variou para todos os tipos de vernizes e foram significativamente maiores nos grupos em que foram feitas uma aplicação direta do verniz. No entanto, verificou-se que a taxa de remineralização variou consoante o tipo de verniz de flúor e o método de aplicação.

Godoi *et al.* [39] também utilizaram verniz de flúor num estudo onde investigaram o seu efeito na remineralização *in vitro* em esmaltes afetados por lesões de cárie artificial e analisaram a concentração de flúor solúvel e insolúvel dos vernizes. Neste estudo, foram utilizadas quarenta amostras de esmalte bovinos em que, de modo a proporcionar um ataque ácido, foram imersas numa solução de pH= 5,0 com 1,3 mmol/L de nitrato de cálcio tetra-hidratado e 0,78 mol/L de fosfato monosódico monohidratado. Estas amostras foram divididas em quatro grupos: grupo CON correspondente ao grupo controle, grupo ENA em que, foi aplicado o verniz da marca Enamelast, grupo DUR em que, foi aplicado o verniz da marca Duraphat e por último, grupo CLI em que, foi aplicado o verniz da marca Clinpro White Varnish. As amostras foram submetidas a um ciclo de pH com duração de seis dias, de modo a induzir a remineralização. Os resultados de teste de microdureza mostraram valores superiores após o tratamento com verniz de flúor. No que diz respeito à concentração de flúor dos vernizes, a maior concentração de flúor solúvel e insolúvel foi encontrado no verniz da marca Enamelast em comparação com as demais marcas. Contudo, verificou-se que o verniz de flúor teve efeito eficaz na remineralização da superfície do esmalte, mas não se verificou efeito eficaz na remineralização da lesão subsuperficial do esmalte.

## 3 Técnicas analíticas

### 3.1 Emissão de raios gama induzida por partículas – PIGE

A técnica de emissão de raios gama induzida por partículas é uma das técnicas de feixe de iões (IBA - *Ion Beam Analysis*), não destrutiva e dependente de processos inelásticos, utilizada na análise quantitativa de elementos mais leves que o silício (exemplos: Lítio (Li), Berílio (Be), Boro (B), Flúor (F), Sódio (Na), Alumínio (Al), etc.) presentes nas amostras. O número atómico desses elementos leves encontra-se entre  $3 < Z < 20$ . Esta técnica tem sido utilizada frequentemente para análise quantitativa, desde 1960 em que, a disponibilidade de detectores semicondutores permitiu um melhoramento significativa na resolução da detecção de raios gama. Baseia-se na detecção dos raios gama emitidos por reações nucleares de ressonância entre o feixe de partículas carregadas incidentes e o núcleo alvo. Para feixe de partículas carregadas com uma energia fixa, a concentração média dos elementos presentes na amostra pode ser deduzida através do rendimento total de raios gama emitidos a uma dada reação nuclear. Os raios gama emitidos são medidos através dos detectores de radiação gama como por exemplo, detectores de cintilação e detector HPGe. Sendo este último arrefecido à temperatura do azoto líquido (77 K). A análise de reação nuclear com a emissão de raios gama por esta técnica é feita principalmente quando a composição química da amostra é qualitativamente desconhecida [40], [41].

A técnica PIGE tem sido aplicada em diferentes campos de estudos nomeadamente arqueologia, meio ambiente, geologia e biomedicina devido a sua capacidade em determinar a concentração e perfil de profundidade dos elementos leves numa ampla variedade de amostras [42], [43].

#### 3.1.1 Reações nucleares e emissão de raios gama

A reação nuclear trata-se de interação entre núcleos, mas também pode ocorrer através da interação entre núcleos e outras partículas fundamentais como eletrões e fotões. No presente estudo, as amostras

foram bombardeadas por feixe de prótons. A expressão geral de uma reação nuclear encontra-se representada na equação 3.1 [40], [41].



Em que, o núcleo alvo  $A$  é atingido pela partícula  $a$  levando a emissão de  $b$  e transformando o núcleo alvo em  $B$ . O conjunto  $(a + A)$  representa o canal de entrada e  $(b + B)$  representa o canal de saída. Às vezes ocorrem reações nucleares em que, a partícula incidente interage com a superfície do alvo atingindo apenas alguns núcleos periféricos, a este processo é designado de reação direta. Outras vezes, a partícula incidente interage com um dos núcleos do alvo, resultando na formação de um núcleo composto que pode estar num estado excitado, em que a desexcitação deste núcleo composto provoca a emissão da radiação, este processo é designado de reações nucleares de núcleo composto [41]. Durante o processo de desexcitação, a radiação emitida pode estar associada aos raios gama. Neste caso, o canal de saída tem associado a emissão gama. Esta emissão gama pode ser conduzida através de três tipos de reações nucleares de ressonância (captura radiativa, dispersão inelástica e colisões com rearranjo). Nas reações de ressonâncias por captura radiativa, a partícula incidente é capturada pelo núcleo  $A$  levando à formação de um núcleo composto em que, caso fique num estado excitado,  $B^*$ , ao decair para o estado fundamental  $B$  ocorre a emissão de raios gama. Exemplos típicos deste processo são as reações  $(p, \gamma)$  [44]. A equação 3.2 é representativo para este tipo de reação.



Num processo de reação nuclear em que parte da energia cinética das partículas incidentes é utilizada na excitação do núcleo alvo designa-se por dispersão inelástica. Neste processo, o projétil é disperso em diferentes energias e a emissão da radiação ocorre pelo processo da desexcitação do núcleo. Na análise de partículas gama em que está associada a dispersão inelástica, as reações típicas são do tipo  $(p, p'\gamma)$ . A equação 3.3 é representativo para este tipo de reação.



Neste estudo, será analisada através da técnica de PIGE, este tipo de reação inelástica induzida por prótons sobre o flúor e fósforo presentes nas amostras de esmalte dentário. Será dada especial atenção às emissões gama de energia 197 keV da reação  $^{19}\text{F}(p, p'\gamma)^{19}\text{F}$  e 1266 keV da reação  $^{31}\text{P}(p, p'\gamma)^{31}\text{P}$ .

Um outro tipo de reação nuclear de ressonância é a de colisões com rearranjo em que, são emitidas partículas diferentes dos incidentes. A equação 3.4 representa este tipo de reação. Exemplos típicos deste processo são as reações  $(p, \alpha\gamma)$ .



- **Secção eficaz**

Na interação das partículas com os núcleos alvo existe uma probabilidade de ocorrer um dado tipo de reação, designada por secção eficaz ( $\sigma$ ). Esta probabilidade depende da energia das partículas e do

parâmetro de impacto relativo ao núcleo alvo [41]. A secção eficaz tem dimensão de área e é dada pela seguinte expressão:

$$\sigma = \frac{R_b}{I_a N} \quad (3.5)$$

Em que,  $I_a$  corresponde a corrente das partículas incidentes por unidade de tempo,  $N$  representa os núcleos alvo por unidade de área e  $R_b$  representa a taxa de produção das partículas  $b$  do canal de saída. As partículas emitidas durante o processo de reação nuclear, numa direção  $(\theta, \phi)$  em relação a posição do feixe incidente, são coletadas por um detector com um ângulo sólido pequeno,  $d\Omega$ . Devido ao ângulo sólido ser muito pequeno, nem todas as partículas do canal de saída são detetadas pelo que, somente uma pequena fração  $dR_b$  é detetada. A distribuição angular  $W(\theta, \phi)$  dessas partículas emitidas é representada por:

$$dR_b = W(\theta, \phi) \frac{d\Omega}{4\pi} \quad (3.6)$$

Resultando em,

$$\frac{d\sigma}{d\Omega} = \frac{W(\theta, \phi)}{4\pi I_a N} \quad (3.7)$$

Onde, a porção  $\frac{d\sigma}{d\Omega}$  representa a secção eficaz diferencial.

Fazendo a integração da secção eficaz diferencial para todos os ângulos e tendo em conta a que  $d\Omega = \sin(\theta)d\theta d\phi$ , a secção eficaz resultante é dada por:

$$\sigma = \int \frac{d\sigma}{d\Omega} d\Omega = \int_0^\pi \sin(\theta)d\theta \int_0^{2\pi} d\phi \frac{d\sigma}{d\Omega} \quad (3.8)$$

Devido a geometria axial das reações,  $\frac{d\sigma}{d\Omega}$  é independente de  $\phi$ , logo:

$$\sigma = 4\pi \frac{d\sigma}{d\Omega} \quad (3.9)$$

Nas figuras 3.1 e 3.2 encontram-se os gráficos das secções eficazes de emissão gama de energia 197 keV da reação  $^{19}\text{F}(p, p'\gamma)^{19}\text{F}$  e 1266 keV da reação  $^{31}\text{P}(p, p'\gamma)^{31}\text{P}$  [45].

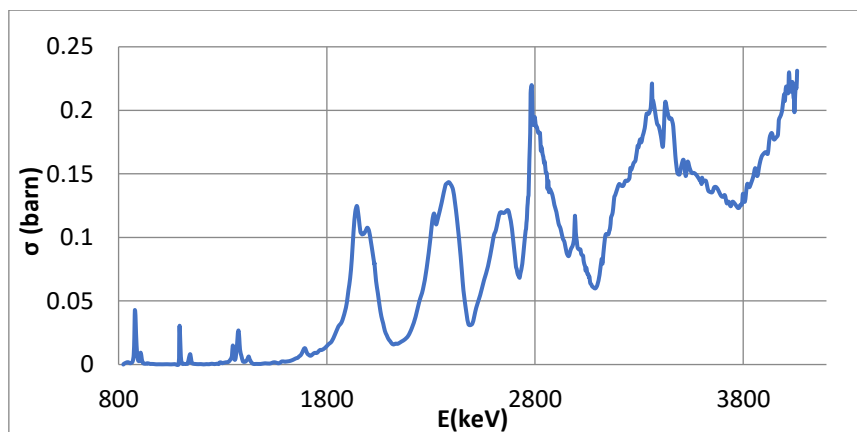


Figura 3.1 - Gráfico de seção eficaz do  $^{19}\text{F}$  de  $E_\gamma=197\text{ keV}$  em função da energia do feixe de partículas, após a reação  $^{19}\text{F}(p, p'\gamma)^{19}\text{F}$ . Função de excitação retirada de [45].

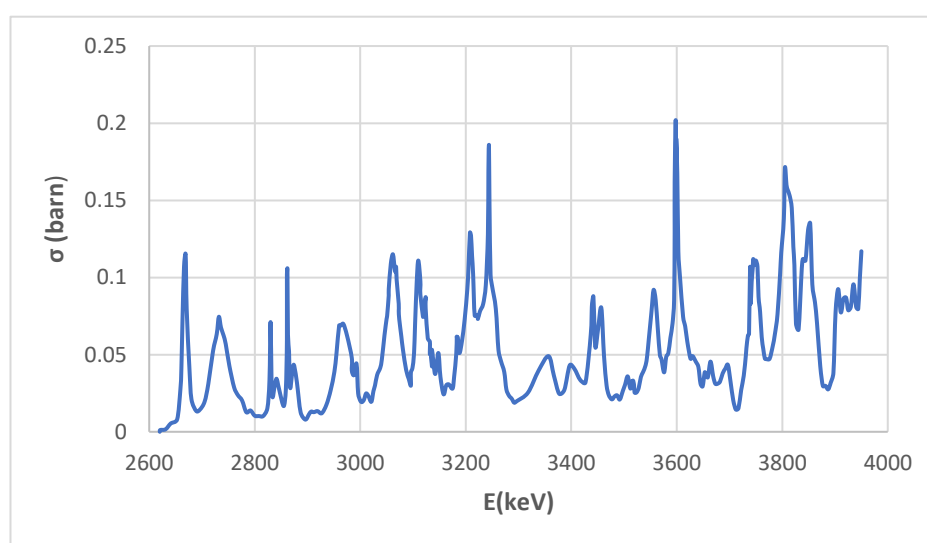


Figura 3.2 - Gráfico de seção eficaz do  $^{31}\text{P}$  de  $E_\gamma=1266\text{ keV}$  em função da energia do feixe de partículas, após a reação  $^{31}\text{P}(p, p'\gamma)^{31}\text{P}$ . Função de excitação retirada de [45].

Os dados da seção eficaz são fundamentais para a aplicação da técnica PIGE, sendo que tendo valores exatos das secções eficazes, não é necessário recorrer a padrões. A agência internacional da energia atômica tem realizado uma compilação de dados de seções eficazes atualizados para a análise de PIGE [46].

- **Poder de Paragem**

As partículas incidem no alvo com uma certa energia e vão perdê-la ao longo da sua trajetória. A este processo de perda de energia é designada por poder de paragem (S).

O poder de paragem total é a soma do poder de paragem eletrónico,  $S_e$ , devido ao processo de interação Coulombiano entre a partícula incidente e os eletrões ligados ou livres, e do poder de paragem nuclear,  $S_n$ , devido ao processo de interação com os núcleos blindados ou não-blindados dos átomos do alvo [41], [47]. Logo:

$$S = S_e + S_n \quad (3.10)$$

A velocidade das partículas incidentes vai diminuindo devido a essa perda de energia (-dE) por unidade de comprimento (dx) na interação com o alvo:

$$S = -\frac{dE}{dx} \quad (3.11)$$

A espessura  $d$  do alvo influencia na perda de energia das partículas incidentes pelo que, torna-se necessário utilizar a secção eficaz de paragem, dada por:

$$\varepsilon(E) = \frac{S}{d} \quad (3.12)$$

### 3.1.2 Princípio físico da técnica de PIGE

A técnica PIGE é uma técnica que permite a detecção de raios gama emitidos como consequência de reação nuclear entre feixe de partículas carregadas e núcleos alvos. As partículas são aceleradas e ao colidirem com o núcleo alvo, ocorrem os processos de reações nucleares. Nesta técnica, as reações nucleares são do tipo inelástica. Nesta reação ocorre a formação de núcleos compostos num estado excitado que, ao decaírem para o estado fundamental emitem os raios gama com uma determinada energia através do qual permite determinar a composição elementar da amostra [48]. A energia dos raios gama é característica de um isótopo específico do elemento presente na amostra e a concentração deste dado elemento pode ser determinada através da intensidade dos raios gama [49]. Os raios gama são detetados por um detector de raios gama (no estudo desta dissertação foi utilizado um detector de germânio ultrapuro) e representados num espectro de emissão gama (figura 3.3) no qual, fornece informações da energia e intensidades relativas dos raios gama emitidos.

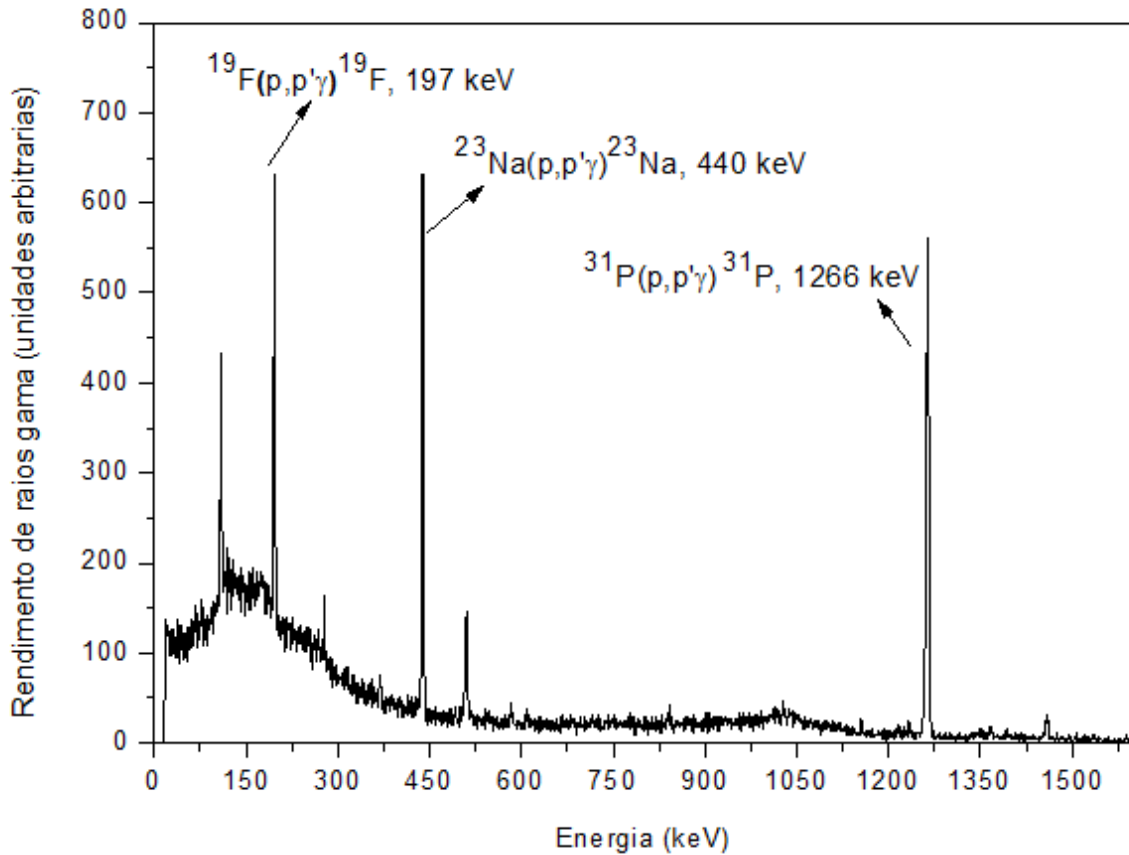


Figura 3.3 - Espectro de raios gama obtido através da técnica PIGE da amostra do esmalte dentário. Foi adquirido a uma energia de 3200 keV.

### 3.1.3 ERYA

O software ERYA BULK (*Emitted Radiation Yield Analysis*) é um programa de apoio à análise quantitativa dos espectros de PIGE, sem recurso a padrões. O programa foi inicialmente desenvolvido em linguagem C, seguidamente foi criada uma versão em Labview [41] e atualmente a nova versão foi desenvolvida em linguagem C++ [50]. Este programa permite a análise das amostras homogêneas como também das não homogêneas.

#### 3.1.3.1 Princípio físico do programa ERYA BULK

Este programa permite determinar as frações mássicas dos elementos leves presentes numa amostra, através dos respetivos rendimentos das emissões gama obtidos experimentalmente a uma dada energia,  $E$  [41].

Para uma amostra fina, o rendimento diferencial,  $dY$ , de um dado isótopo  $i$  de um determinado elemento  $e$  presente numa amostra é representado pela expressão:

$$dY = \varepsilon_{abs}(E_\gamma) \cdot n_p \cdot \sigma(E) \cdot f_m \cdot f_i \cdot N_{Av} \cdot A^{-1} \cdot d\Gamma \quad (3.13)$$

No qual,  $\varepsilon_{abs}$  é a eficiência do detector para a energia do fóton emitido,  $E_\gamma$ ,  $n_p (= \frac{Q}{p})$  representa o número de prótons incidentes na amostra (Q - carga coletada e p- carga do próton),  $f_m$  e  $f_i$  são as frações mássicas e isotópicas respetivamente,  $\sigma(E)$  representa a secção eficaz da reação nuclear à energia E,  $N_{Av}$  o número de avogadro,  $A^{-1}$  o inverso do número de massa e  $d\Gamma$  a espessura do filme.

Para amostra espessa (espessura superior ao alcance das partículas incidentes), o rendimento é obtido integrando a expressão anterior:

$$dY = \varepsilon_{abs} \cdot (E_\gamma) \cdot n_p \cdot \sigma(E) \cdot f_m \cdot f_i \cdot N_{Av} \cdot A^{-1} \cdot \int_0^{E_0} \frac{\sigma(E)}{S_m(E)} dE \quad (3.14)$$

Em que,  $S_m(E)$  é o poder de paragem em massa e  $E_0$  a energia do feixe incidente.

Na determinação da composição da amostra, considera-se que cada amostra está dividida em n subcamadas paralelas à superfície da mesma, dividindo a energia das partículas incidentes em vários intervalos de energia,  $dE$  e garantindo que a secção eficaz de paragem nesse intervalo permanece constante (figura 3.4)[46]. Deste modo, a parte integral da expressão anterior pode ser representado por:

$$\int_0^{E_0} \frac{\sigma(E)}{\varepsilon(E)} dE = \sum_n \left[ \left( \frac{1}{\varepsilon_n} \right) \cdot \int_{E_n}^{E_{n+1}} \frac{\sigma(E)}{\varepsilon(E)} dE \right] \quad (3.15)$$

Logo, a expressão do rendimento calculado pelo ERYA fica representada na seguinte forma:

$$dY = \varepsilon_{abs} \cdot (E_\gamma) \cdot \left( \frac{Q}{e} \right) \cdot \sigma(E) \cdot f_m \cdot f_i \cdot N_{Av} \cdot A^{-1} \cdot \sum_n \left[ \left( \frac{1}{\varepsilon_n} \right) \cdot \int_{E_n}^{E_{n+1}} \frac{\sigma(E)}{\varepsilon(E)} dE \right] \quad (3.16)$$

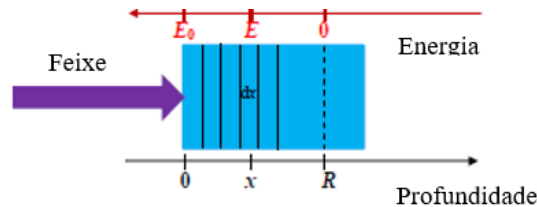


Figura 3.4 - Representação das subcamadas da amostra e da divisão de energia (x- espessura da amostra e R- o alcance das partículas). Adaptado de [46].

### 3.1.3.2 Análise PIGE

O programa ERYA permite simular simultaneamente a concentração mássica dos vários elementos presentes na amostra, a partir das emissões gama representadas no espectro obtido experimentalmente. Contém uma base de dados com as informações que contribuem para a análise quantitativa dos espectros, nomeadamente os parâmetros de Ziegler, eficiência absoluta do detector, seção eficaz dos isótopos, abundância e número de massa de todos os elementos da tabela periódica (figura 3.5) [51].

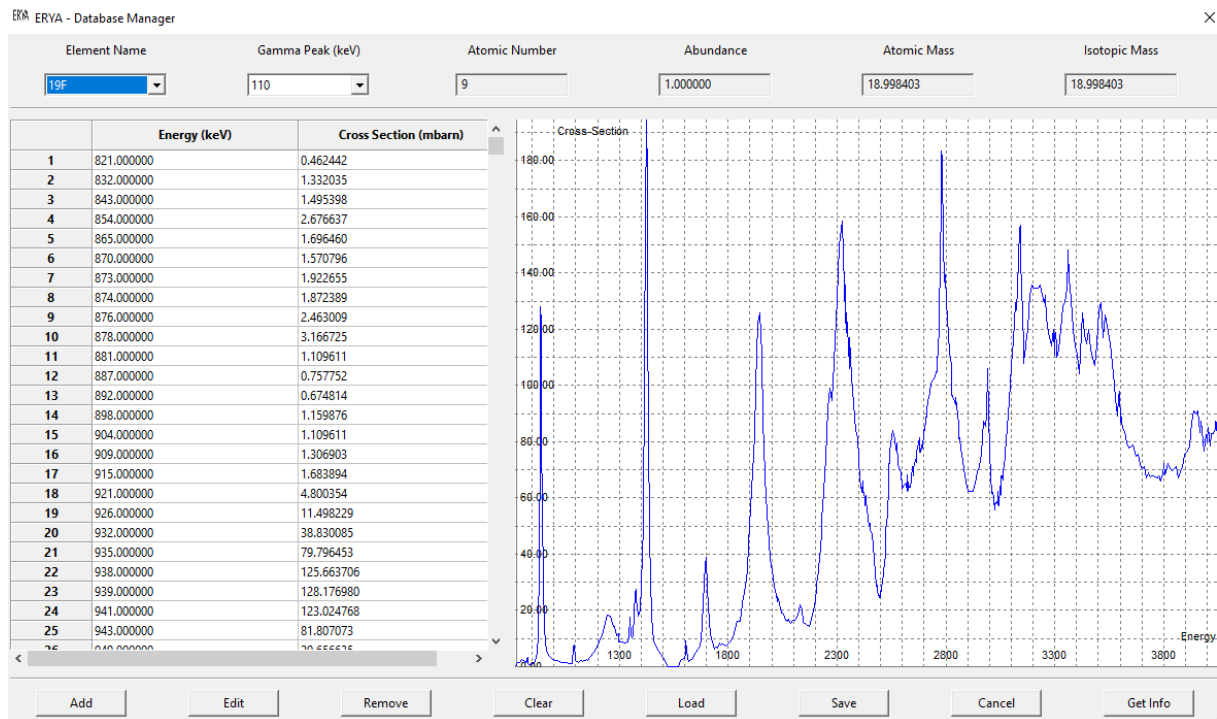


Figura 3.5- Fotografia da base de dados do programa ERYA-BULK.

Para fazer a análise PIGE, o utilizador deve preencher todas as informações referentes à amostra, considerando uma composição inicial. Algumas informações são fornecidas pelo programa, mas outras são inseridas pelo utilizador (figura 3.6). O procedimento para a análise é descrito da seguinte forma:

1. Selecionar o número dos elementos presentes na amostra e os respetivos isótopos;
2. Selecionar a emissão gama desses isótopos;
3. Inserir os dados estequiométricos dos elementos selecionados;
4. Inserir os rendimentos experimentais das emissões gama de cada isótopo;
5. Inserir a energia máxima do feixe de prótons incidente na amostra;
6. Inserir a carga acumulada na amostra;
7. Escolher os elementos que são necessários fazer o ajuste das suas concentrações mássicas;
8. Carregar no botão **Run** para obter os rendimentos teóricos.

O procedimento do ajuste das concentrações mássicas referentes a cada elemento é feito com base num algoritmo de Levenberg-Marquart, tendo em conta a estequiometria da amostra inserida inicialmente [50].

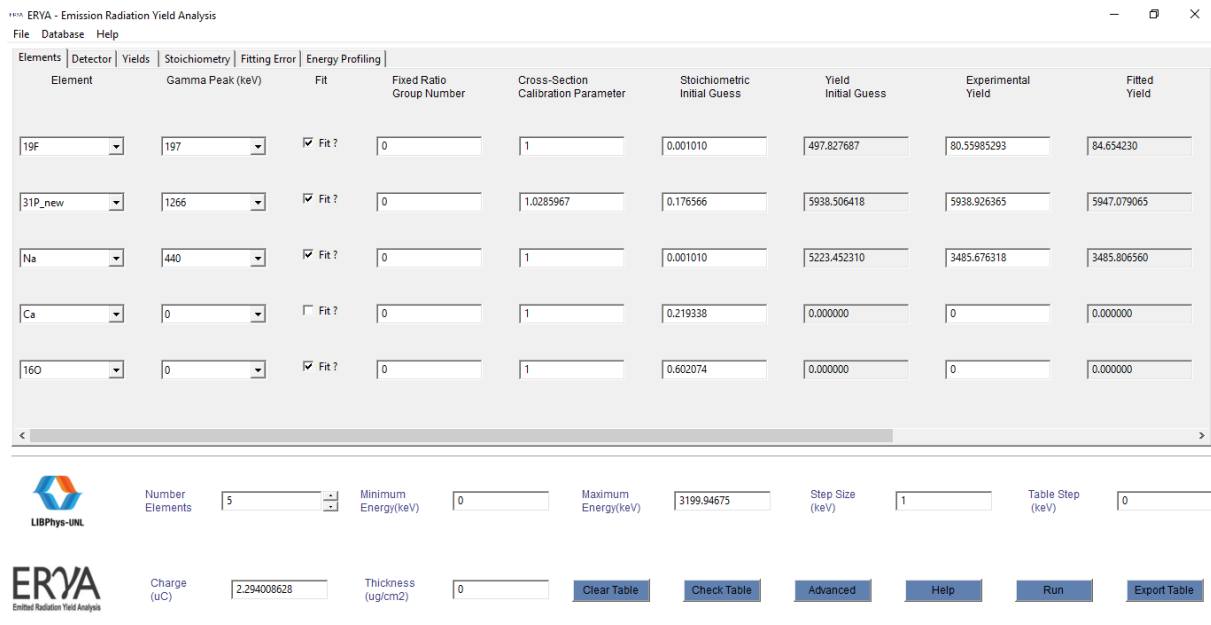


Figura 3.6 - Interface do software ERYA.

### 3.1.4 Aplicação da técnica de PIGE no estudo da análise do esmalte dentário – Estado da arte

Apesar do flúor apresentar um papel protetor na prevenção da carie, este por sua vez, pode provocar vários danos no tecido ósseo e dentário, geralmente fluorose dentária, quando o flúor é ingerido ou aplicado inadequadamente [52]. Vários métodos analíticos foram utilizados para a análise da distribuição e concentração do flúor no dente. Alguns desses métodos demonstraram poucos eficientes, caso da microanálise por sonda de eletrões (EPMA) e da espectroscopia de dispersão em energia (EDS) que são geralmente destrutivos e requerem um pré-tratamento das amostras. Já o PIGE e emissão de raios-x induzida por partículas (PIXE) ao contrário dos métodos referidos anteriormente, são não destrutivos de medição multi-elementar de forma a permitir uma análise quantitativa do flúor no esmalte dentário [53], [54].

Torresi and Foti [53] analisaram a distribuição de flúor em profundidade no esmalte dentário, através da reação  $^{19}\text{F}(p, \alpha_0)^{16}\text{O}$ . Seis incisivos (4 ricos em flúor e 2 saudáveis) e dois molares (1 saudável e 1 com cárie) foram examinados. O composto  $\text{CrF}_3$  foi utilizado como material padrão por possuir, uma concentração uniforme de flúor e por apresentar a perda de energia de prótons ou partículas alfas aproximadamente igual ao do esmalte dentário. Foi utilizado um feixe de prótons provenientes de um *Van de Graaff Accelerator* (V.d.G), com 1,35 MeV de energia e uma corrente de 50 nA. Os resultados

obtidos do perfil de profundidade do flúor indicaram que seu conteúdo se encontra mais concentrado na superfície (dentro de uma fração de micrómetros) em dentes saudáveis e muito mais altas em dentes ricos em flúor, diminuindo lentamente com a profundidade.

Demortier *et al.* [55] recorreram a técnica PIGE para analisar a concentração do flúor no esmalte dentário, quando irradiado por um laser de árgon após uma aplicação do gel fluoretado. Utilizaram 240 amostras, obtidos por corte ao meio de 120 dentes humanos extraídos. Essas amostras foram divididas em dois grupos no qual, o gel fluoretado foi aplicado em ambos e apenas num dos grupos foi irradiado com laser. Foi utilizado um feixe de prótons com uma corrente de 30 nA e uma energia de 2,7 MeV. Fez-se uma análise em profundidade de até 20  $\mu\text{m}$ . De forma a obter um valor de referência, foi medida a concentração de flúor nas amostras antes de qualquer tratamento, tendo assim registado uma média de 3009 ppm. Após o tratamento, não se verificaram diferenças estatisticamente significativas em relação a concentração de flúor e acredita-se que essa pequena diferença é devido a incorporação do flúor numa região mais profunda que 20  $\mu\text{m}$ , registada pela técnica PIGE.

Yagi *et al.* [54] utilizaram a técnica PIGE e PIXE para análise qualitativa e quantitativa da absorção do flúor no dente. Foi utilizado nove terceiros molares livres de cáries extraídos, em que foram divididas em 2 grupos, um grupo controlo sem aplicação do material contendo flúor (FCM) e um grupo no qual foi aplicado o FCM. Foi utilizado um feixe de prótons com 2,5 MeV de energia, uma corrente de aproximadamente 50 pA e o ponto de feixe inferior a 10  $\mu\text{m}$ . A reação nuclear  $^{19}\text{F}(p, \alpha_0)^{16}\text{O}$  foi utilizada para medir a concentração de  $^{19}\text{F}$  e os raios gama foram detetados por um detector *Bismuth Germanium Oxide* (3" BGO). A concentração do flúor nos grupos de material contendo flúor após a desmineralização não teve muita diferença, mas a sua penetração foi consideravelmente maior, sugerindo assim, que o  $^{19}\text{F}$  foi capaz de penetrar na parte mais profunda da dentina. A profundidade de penetração de  $^{19}\text{F}$  foi determinada a partir da distância mais externa da superfície até o ponto que a concentração de  $^{19}\text{F}$  deixou de ser detetável.

Funato *et al.* [56] desenvolveram um novo sistema de medidas micro-PIGE e micro-PIXE para a análise do flúor no dente. Utilizaram a reação nuclear  $^{19}\text{F}(p, \alpha_0)^{16}\text{O}$  para o método PIGE. Como espécime, foi utilizado dentes humanos extraídos no qual, foram revestidos por esmaltes após serem perfurados e preenchidos por um material libertador de flúor. Foi utilizado um feixe de prótons de 3 MeV de energia, uma corrente de 100 pA e um detector de iodeto de sódio para detetar os raios gama. Os resultados obtidos permitiram analisar que a concentração de flúor no dente é menor comparado com a sua concentração no material libertador de flúor utilizado. A distribuição de flúor teve uma variação de até 118  $\mu\text{m}$  de profundidade.

Salah and Arab [57] utilizaram o método PIGE para determinar a concentração de flúor em dentes humanos coletados em diferentes regiões da Argélia. Como amostras, foram utilizados cerca de 20 dentes saudáveis, seccionados ao longo do plano vertical de forma a permitir uma análise do esmalte e da dentina. Para detetar os raios gama de energia 6,13 MeV recorreram a um detector de germânio e

utilizaram um feixe de prótons com energia de 1375 keV. Os resultados obtidos permitiram concluir que a concentração do flúor é maior em dentes dos indivíduos da região do Sul quando comparada com os da região do Norte da Argélia devido ao elevado consumo do chá rico em flúor.

Num estudo realizado por Luís *et al.* [14] a técnica PIGE foi aplicada com sucesso tanto na quantificação da distribuição de flúor como na determinação da captação do mesmo em dentes humanos sujeitos a materiais à base de flúor, nomeadamente os agentes gustativos de secreção salivar XEROS<sup>TM</sup> e SS<sup>®</sup>. O trabalho experimental foi realizado num acelerador Tandem 3MV usando prótons de 2720 keV. Os raios gama de flúor com energia de 197 keV provenientes da reação  $^{19}\text{F}(p, p'\gamma)^{19}\text{F}$  foram detetados por um detector semiconductor de HPGe. Os resultados obtidos permitiram observar uma homogeneidade considerável de flúor em todas as amostras tendo também, uma variação das concentrações de flúor de  $470 \pm 50$  a  $900 \pm 100$   $\mu\text{g/g}$ .

## 3.2 Espectroscopia Raman

As principais técnicas de espectroscopia utilizadas para a detecção da radiação emitida por vibrações moleculares estão relacionadas com os processos de absorção de radiação infravermelha e de dispersão de Raman [58], [59].

A espectroscopia Raman é uma técnica de dispersão baseada principalmente na dispersão inelástica resultante da interação da radiação incidente com as moléculas resultando na indução de modos vibracionais [60].

Em 1928, Chandrasekhara Venkata Raman observou experimentalmente o fenómeno de dispersão da radiação e junto com Krishnan publicaram o primeiro artigo sobre a técnica de espectroscopia Raman. Uma técnica que, com o avanço na tecnologia de instrumentação, permitiu resolver várias limitações das outras técnicas de espectroscopia e problemas em relação a degradação da amostra e da fluorescência [61], [60].

### 3.2.1 Princípio físico da espectroscopia Raman

Quando radiação monocromática de uma certa energia incide na amostra, ocorrem diferentes fenómenos, nomeadamente a dispersão ou a absorção da radiação. Na espectroscopia Raman é utilizado um feixe de radiação monocromática (laser) que ao incidir na amostra difunde-se em todas as direções sendo que, grande parte desta radiação dispersa corresponde a dispersão de Rayleigh e apenas uma pequena parte representa a dispersão de Raman pois o fenómeno de Rayleigh apresenta uma secção eficaz muito superior [58], [62]. Na figura 3.7 estão representados os diferentes tipos de dispersão, onde se assume que o sistema molecular tem dois estados de energia vibracional, o estado fundamental e o estado excitado. Quando uma molécula da amostra irradiada interage com o campo elétrico de um fóton, fica num estado excitado virtual (não ocorre transição eletrónica, mas sim uma deformação na nuvem de eletrões) e seguidamente transita para um estado vibracional fundamental e é emitido um fóton com

um comprimento de onda igual ao do fóton inicial, a este fenómeno designa-se por dispersão de Rayleigh. Se a molécula transitar para um estado vibracional em vez de fundamental e é emitido um fóton com um comprimento de onda ligeiramente superior ao fóton inicial, este fenómeno é designado de dispersão Stokes. Pode ainda ocorrer dispersão Anti-Stokes, se a molécula em questão estiver num estado vibracional excitado (provocado pelas energias térmicas) e da interação resultar uma transição para o estado fundamental. A diferença de frequência entre o fóton absorvido e o fóton disperso que ocorre na dispersão de Raman representa o nível de energia vibracional da molécula (modo preciso de vibração molecular da amostra em estudo). À medida que a temperatura aumenta, a intensidade de Anti-Stokes aumenta, mas tipicamente Stokes é mais provável a temperatura ambiente. No entanto, a temperatura pode ser medida a partir da diferença nas intensidades das bandas desses dois tipos de dispersão de Raman [58], [63].

A maioria das moléculas encontram-se no estado de nível de energia mais baixo quando estão à temperatura ambiente. O estado virtual de energia resulta da polarização da nuvem eletrónica que ocorre quando o laser interage com os eletrões. A sua energia é determinada tendo em conta a frequência da radiação incidente [58].

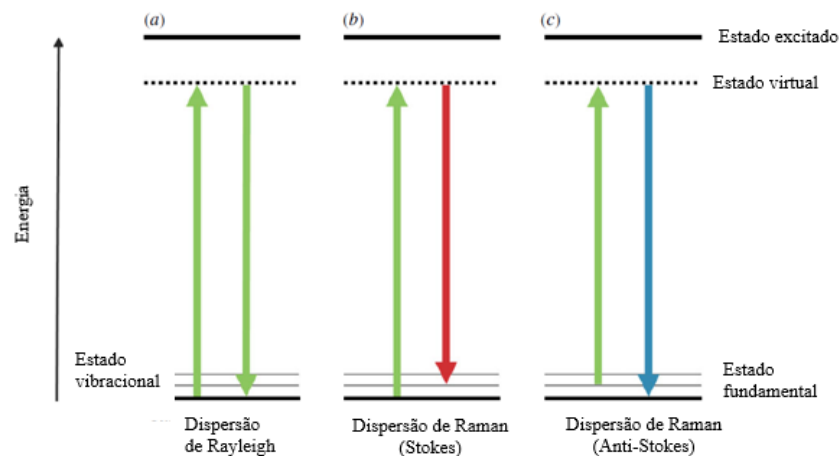


Figura 3.7 - Diagrama representativo dos níveis de energias e das transições referente a dispersão de Rayleigh (a) e dispersão Raman Stokes (b) e Anti-Stokes (c). Adaptado de [63].

### 3.2.2 Vibrações Moleculares

A energia total de uma molécula no seu estado fundamental é definida como a soma da sua energia eletrônica, vibracional e rotacional, sendo estas energias designadas por graus de liberdade. A maioria das moléculas possuem 3 graus de liberdade associadas ao movimento de translação e 3 graus de liberdade associadas ao movimento rotacional, com exceção das moléculas lineares que possuem apenas 2 graus de liberdade associados ao movimento rotacional. Considerando  $N$ , o número de átomos existente numa molécula, para uma molécula não linear, o número de graus de liberdade ou modos vibrações possíveis é dado por  $3N-6$  e  $3N-5$  para moléculas lineares. Cada uma dessas frequências vibracionais correspondem a um nível de vibração representada por  $\nu$ . No primeiro nível ( $\nu_0$ ), correspondente ao estado fundamental de energia, não ocorre a vibração molecular. No segundo nível ( $\nu_1$ ) ocorre a vibração molecular devido a absorção de um quantum de energia. Para os restantes níveis ( $\nu_2$ ,  $\nu_3$  e  $\nu_4$ ) também ocorre a vibração molecular, mas não tem de ser necessariamente devido a absorção de 2, 3 ou 4 vezes o quantum de energia. Os modos normais de vibração podem ser classificados em dois tipos (figura 3.8): modo de alongamento, dividida em simétrico e antissimétrico e modo de deformação angular, dividida em balanço, tesoura, ondulação e torção. A dispersão de Raman apresenta uma maior intensidade para o modo de vibração simétrica, isto porque, o movimento simétrico provoca grandes alterações na polarizabilidade da nuvem eletrônica principalmente nas moléculas triatómicas. A regra básica da seleção de dispersão de Raman tem que ver com a alteração da polarizabilidade da nuvem eletrônica, serão os modos vibracionais que alterem a polarizabilidade da molécula que serão ativos em espectroscopia Raman [59], [64].

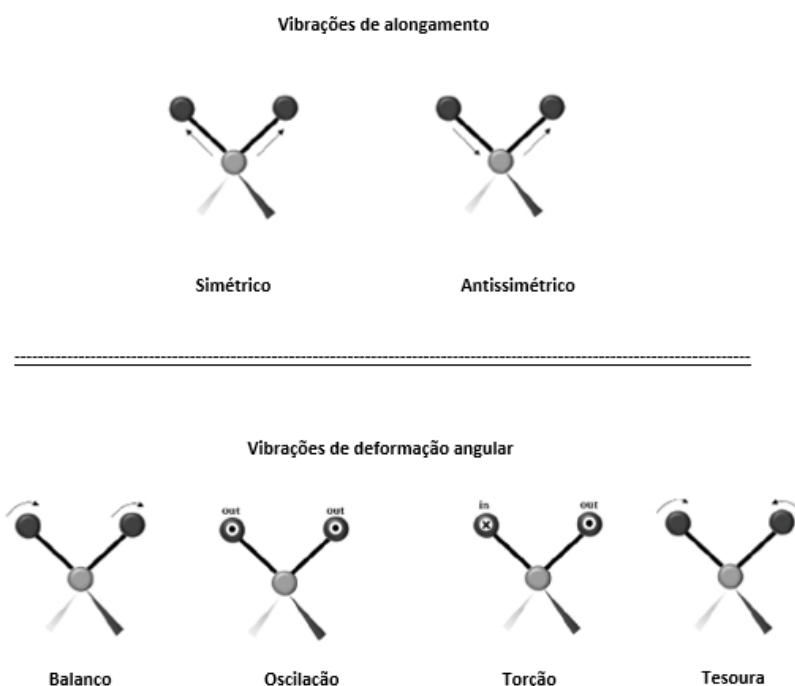


Figura 3.8 - Representação dos modos normais de vibração numa molécula triatómica: alongamento (simétrico e antissimétrico) e deformação angular (tesoura, balanço, oscilação e torção). Adaptado de [59].

No espectro Raman normalmente observa-se as bandas  $\nu_1 PO_4^{3-}$  a  $959\text{ cm}^{-1}$ ,  $\nu_2 PO_4^{3-}$  a partir de  $390\text{ cm}^{-1}$  a  $490\text{ cm}^{-1}$ ,  $\nu_4 PO_4^{3-}$  a partir de  $560\text{ cm}^{-1}$  a  $625\text{ cm}^{-1}$  e  $\nu_3 PO_4^{3-}$  a partir de  $1010\text{ cm}^{-1}$  a  $1060\text{ cm}^{-1}$  [65]. No entanto, na aplicação desta técnica no presente estudo, será analisada apenas um modo vibracional, o alongamento simétrico (banda  $\nu_1$ ) do íon  $PO_4^{3-}$  presente no esmalte dentário, os restantes são de deformação angular (simétrica-banda  $\nu_2$  e assimétrica- banda  $\nu_4$ ) e alongamento antissimétrico (banda  $\nu_3$ ).

Na figura 3.9 está apresentada um espectro Raman em que, a intensidade de dispersão vem em função de número de onda e representados os principais modos de vibração.

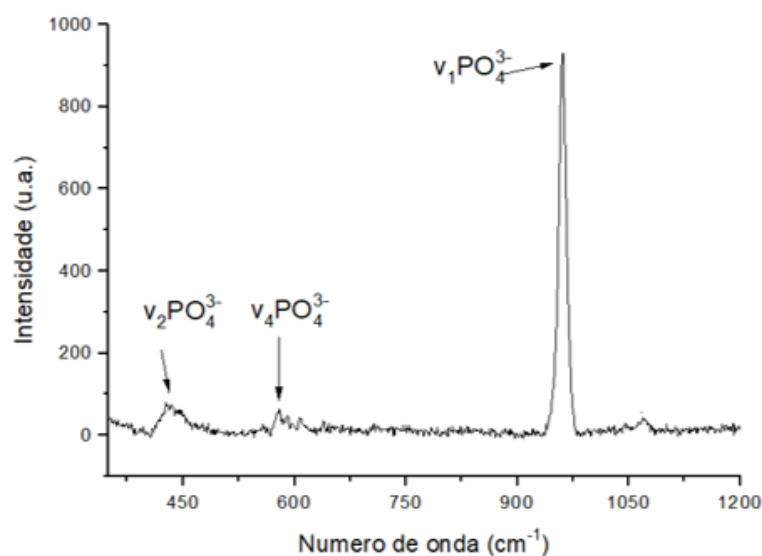


Figura 3.9 - Espectro Raman obtido da matriz da hidroxiapatite da amostra de esmalte.

### 3.2.3 Fenómeno de fluorescência

Uma das principais dificuldades da aquisição de um bom espectro Raman, boa razão pico-fundo está associada ao elevado fundo dos espectros causado por fenômenos de fluorescência – tipicamente em amostras biológicas podendo ser até  $10^8$  vezes mais intenso que o sinal Raman. Vários métodos baseados em *hardware* e *software* foram implementados para a redução desse problema, nomeadamente a excitação com infravermelho-próximo pois a energia do fóton incidente é insuficiente para provocar excitações eletrônicas nos átomos e emitir a fluorescência [64], [66].

### 3.2.4 Instrumentação da Espectroscopia Raman

A intensidade do sinal Raman é também muito fraca quando comparada com a dispersão de Rayleigh. No entanto, numa análise utilizando a técnica de espectroscopia Raman é necessário que a instrumentação tenha uma capacidade que permita eliminar a dispersão de Rayleigh. Para além disso, também é necessário que a instrumentação utilizada consiga diminuir o fenômeno de fluorescência que

na maioria das vezes está presente no espectro Raman. Este fenômeno pode ter uma intensidade de até  $10^8$  vezes superior á dispersão de Raman [64], [67].

O equipamento Raman tem associado quatro componentes: uma fonte de excitação a laser (UV, visível, IV próximo) que normalmente é um laser contínuo, ótica de coleção, um monocromador e um detector [67].

O desenvolvimento de novos sistemas de instrumentação permitiu que os lasers de díodo sejam atualmente as fontes de excitações mais utilizadas. O seu comprimento de onda específico obtém-se da região azul para a região de IV próximo. A intensidade da dispersão de Raman e de Rayleigh são proporcionais a frequência da radiação do laser de excitação. No entanto, para amostras que apresentam características bastante fluorescente, a escolha de um laser vermelho (633 nm) ou IV próximo (785 nm) por um lado permite diminuir a fluorescência mas por outro lado, á medida que se aumenta o comprimento de onda ocorre uma diminuição da eficiência da dispersão de Raman sendo necessário utilizar um laser de maior potência [62], [67].

A detecção de dispersão de Raman é normalmente obtida pelos dispositivos de detectores multicanais, sendo os dispositivos de carga acoplada (CCD) um dos mais comuns. Um CCD é um semiconductor baseado em silício, em forma de matriz de fotodiodos sensíveis á luz, conectado a um capacitor. Essa matriz pode ser unidimensional ou bidimensional, contendo milhares ou mesmo milhões de elementos detectores de fótons que são designados por pixéis. Cada fóton detetado, cria um par de elétrons que posteriormente serão armazenados num capacitor. As vantagens deste detector consiste na sua eficiência quântica (percentagem de número de fótons detetados pelo número total de fótons recebidos) e na sua capacidade em detetar simultaneamente uma ampla faixa espectral [62], [64].

#### **3.2.4.1 Espectroscopia $\mu$ -Raman Confocal**

Um dos problemas encontrado nos estudos  $\mu$ -Raman é a obtenção de uma boa resolução espacial. No entanto, uma forma de resolver este problema é a utilização de geometria confocal [68].

Na microscopia confocal são utilizados dois orifícios *pinhole*: um por onde passa a luz incidente e o outro que permite isolar a luz proveniente de uma pequena região da amostra, eliminando as contribuições das regiões fora do foco. Somente a radiação dispersa pela região focada na amostra é focada no orifício pinhole e depois é encaminhada para o detector, passando por uma fenda de entrada do monocromador e por um espectralmetro. Na figura 3.10 está representado o equipamento utilizado na espectroscopia  $\mu$ -Raman Confocal [68].

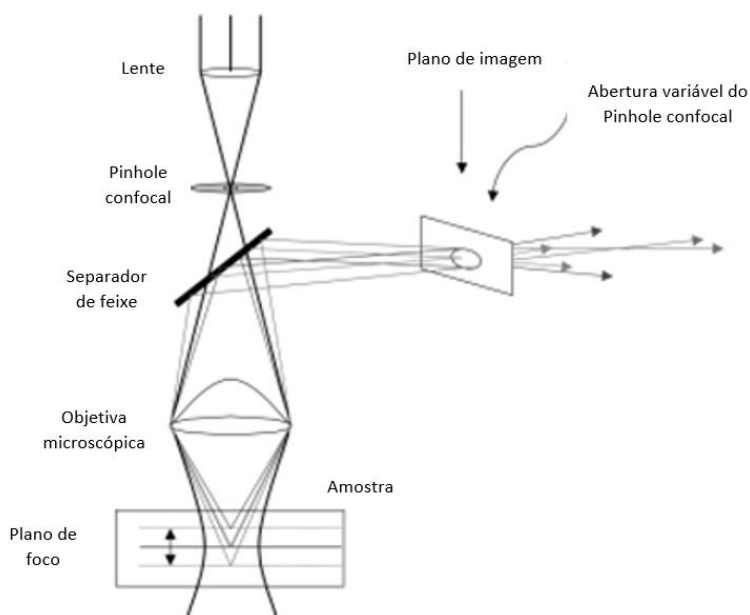


Figura 3.10-Ilustração de  $\mu$ -Espectroscopia Raman Confocal. Adaptado de [68].

### 3.3 Espectroscopia por fluorescência de raios-X

#### 3.3.1 Princípio físico

Os raios-X são ondas eletromagnéticas de comprimento de onda entre 0,005-10 nm, descobertos por Wilhelm Conrad Röntgen em 1895 [69].

Quando um material é exposto a raios-X de energia suficientemente elevada, um fóton pode ser absorvido por um átomo dos elementos presentes no material, levando a ejeção de um elétron da camada interna do átomo. Esta ejeção provoca uma lacuna na camada interna do átomo que é então preenchida por um outro elétron de uma camada externa. Durante este processo de transição, é libertado um raio-X com uma energia fixa, que é característico de um determinado elemento. Este fenómeno é designado por fluorescência de raios-X. O raio-X emitido será detetado por um detector de raios-X [70].

A figura 3.11 encontra-se a representação do fenómeno de fluorescência de raios-X.

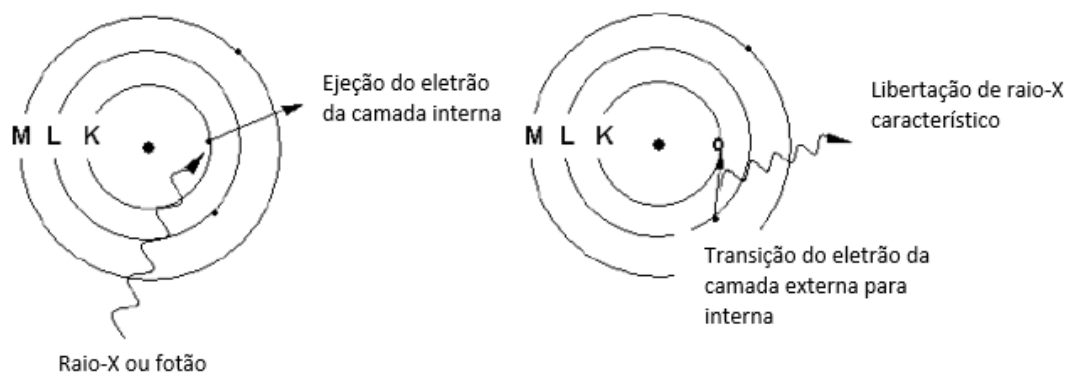


Figura 3.11 - Ilustração do fenômeno de fluorescência de raios-X. Adaptado de [70].

A análise por XRF baseia-se na medição do comprimento de onda ou energia e intensidade dos raios-X (ou fótons) característicos emitidos da amostra. O espectrômetro EDXRF, como o utilizado nesta dissertação, utiliza detectores de raios-X que convertem os raios-X característicos em sinais elétricos e permite a análise simultânea de vários elementos presentes numa amostra. Nesta análise obtém-se um espectro de energia em função da intensidade de raios-X [71].

### 3.3.2 Interação de raios-X com a matéria

Para a energia utilizada no estudo nesta dissertação (<50 keV), existem três fenômenos importantes que ocorrem na interação de raios-X com a matéria, nomeadamente efeito fotoelétrico, dispersão de Rayleigh e dispersão de Compton[72].

- **Efeito fotoelétrico**

O efeito fotoelétrico é um fenômeno que consiste na ejeção de um elétron da camada interna do átomo ao interagir com um fóton de energia igual ou superior a energia de ligação do elétron. Neste processo, ocorre a aniquilação do fóton primário e um fóton secundário é emitido após o rearranjo eletrônico com ocorrência de fluorescência de raios-X [30].

- **Dispersão de Rayleigh**

A dispersão de Rayleigh (dispersão coerente) é uma dispersão elástica que ocorre quando um fóton é disperso ao interagir com um elétron ligado ao átomo sem perder a sua energia, ou seja, a energia do fóton é a mesma tanto antes como depois da dispersão. Na maioria das vezes o ângulo da dispersão do fóton é muito pequeno. Este fenômeno é mais provável para baixas energias e nos materiais de elevado Z. Neste processo, o átomo não sofre nem o processo de ionização nem o de excitação [30].

- **Dispersão de Compton**

A dispersão de Compton (dispersão incoerente) é uma dispersão inelástica que ocorre quando parte da energia ( $E$ ) de um fóton é perdida ao interagir com um elétron fracamente ligada ao átomo de um material. Este fenómeno é mais provável para amostras de baixo  $Z$ . O fóton é disperso por um ângulo  $\phi$  em relação á direção incidente e com uma energia  $E'$ , determinada pela seguinte equação de Compton:

$$E' = \frac{E}{1 + \frac{E}{m_0 c^2} (1 - \cos(\phi))} \quad (3.17)$$

Em que,  $m_0$  é massa do elétron em repouso e  $c$  é a velocidade da luz [71].

### 3.3.2.1 Seção eficaz total de colisão e Coeficiente mássico de atenuação

Os três fenómenos de interação de raios-X com a matéria apresentam uma certa probabilidade de ocorrer que é expresso na forma de seção eficaz de colisão. O produto de seção eficaz colisional total ( $\sigma_{tot}$ ) com o número total de átomos por centímetro cúbico no material corresponde ao coeficiente linear de atenuação,  $\mu^*$ , por centímetro percorrido no material. O cálculo da seção eficaz é obtido recorrendo a expressão:

$$\sigma_{tot} = \tau + \sigma_R + \sigma_C + \dots \quad (3.18)$$

Onde,  $\tau$  é a seção eficaz total do efeito fotoelétrico ( $\tau = \tau_K + \tau_L + \dots$ ),  $\sigma_R$  e  $\sigma_C$  representam seções eficazes de dispersão de Rayleigh e Compton, respetivamente. O coeficiente linear de atenuação é dado pela expressão:

$$\mu^* = \sigma_{tot} \left( \frac{cm^2}{\text{átomo}} \right) \rho \left( \frac{g}{cm^3} \right) \frac{N_{Av}}{A} \left( \frac{\text{átomos}}{g} \right) \quad (3.19)$$

Onde,  $\rho$  é a densidade do meio e  $N_{Av}$  é o número de *Avogadro*. A razão entre coeficiente linear de atenuação e densidade do material corresponde ao coeficiente mássico de atenuação,  $\mu$  ( $cm^2/g$ ).

Tendo em conta os feixes finos, paralelos e monocromáticos, a atenuação da intensidade (de fótons) com uma determinada energia,  $I_0$ , num material é descrita pela lei de Lambert-Beer:

$$I = I_0 e^{-\mu \rho d} \quad (3.20)$$

Em que,  $I$  e  $I_0$  são intensidades transmitida e incidente, respetivamente e  $d$  corresponde a espessura do material. Para um composto químico absorvedor ou uma mistura, o coeficiente mássico de atenuação pode ser avaliado através dos coeficientes  $\mu_i$  de cada elemento presente na amostra, considerando a média ponderada:

$$\mu = \sum_{i=1}^n W_i \mu_i \quad (3.21)$$

Onde,  $W_i$  corresponde a fração mássica do  $i$ -ésimo elemento e  $n$ , o número de elementos no material. O coeficiente linear de atenuação tem um papel importante na análise por XRF pelo que, precisa ser

incluída na quantificação ao avaliar a concentração dos elementos presentes numa amostra em relação a variação da intensidade da fluorescência [73].

Na figura 3.12 estão representados os diferentes fenómenos de dispersão que ocorrem na interação de raios-X com a matéria.

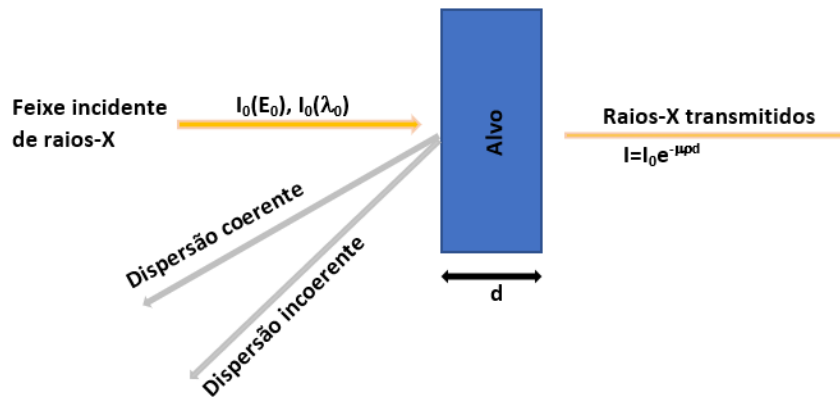


Figura 3.12- Ilustração dos fenómenos de dispersão da interação de raios-X com a matéria. Adaptado de [71].

### 3.3.3 Espectro de raios-X

Na avaliação de um espectro de raios-X é necessário compreender algumas características fundamentais nomeadamente linhas características e contínuo dos elementos presentes num material e alguns artefactos espectrais. O objetivo de avaliação do espectro é conseguir extrair informações analíticas relevantes adquiridas experimentalmente [73].

O contínuo que aparece nos espectros de raios-X é consequência de vários processos nomeadamente o efeito de *bremsstrahlung* (desaceleração dos eletrões primários), para o caso de espectros de raios-X induzidos por eletrões. Na fluorescência de raios-X, o aparecimento do contínuo é devido á dispersão coerente e incoerente da radiação de excitação da amostra. A complexidade da forma do espectro pode depender da composição da amostra [73].

No espectro obtido na análise das amostras do esmalte no espetrómetro M4-Tornado da Bruker (equipamento utilizado no estudo nesta dissertação), é possível observar os picos referentes a dispersão de Compton e Rayleigh (riscas  $K_{\alpha}$  e  $K_{\beta}$ ) dos raios-X do elemento ródio do material do ânodo numa zona de energias altas no espectro. Um exemplo do espectro de raios-X da amostra de esmalte encontra representado 3.13.

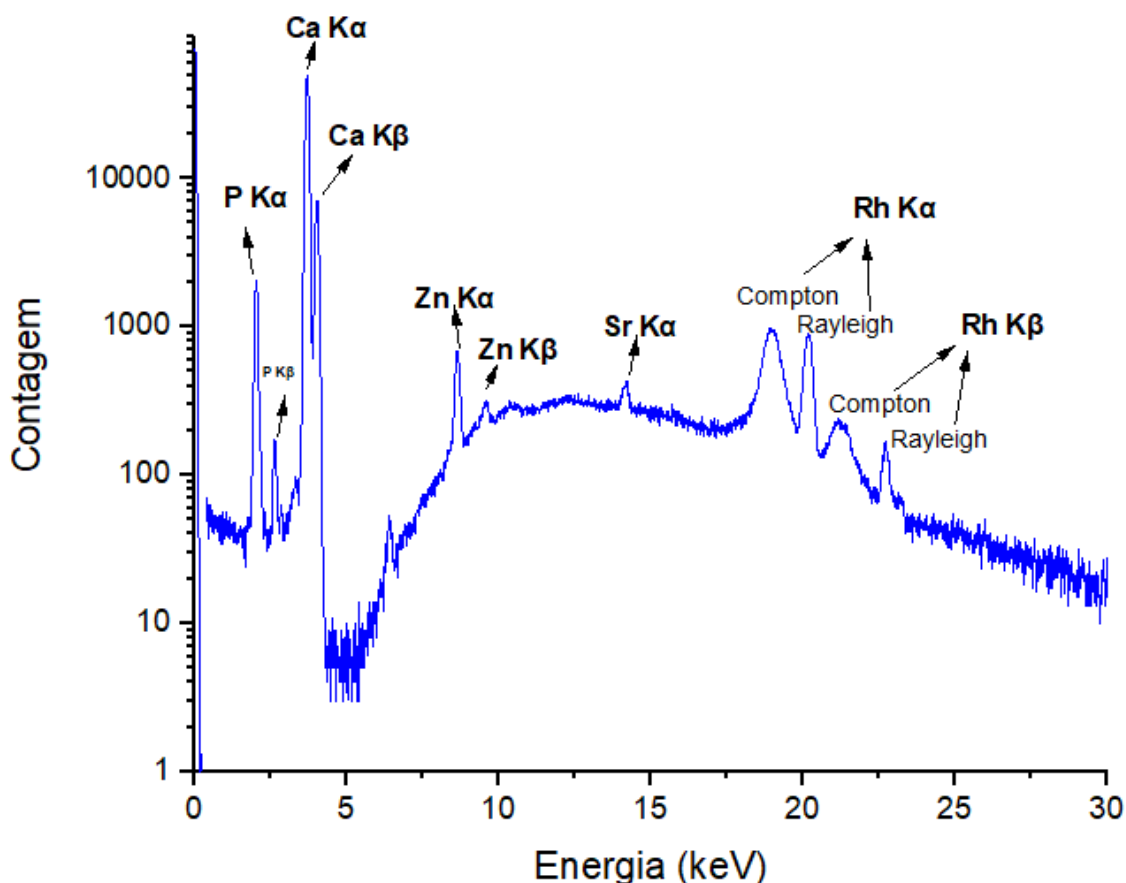


Figura 3.13-Espectro de raios-X obtido de uma amostra do esmalte dentário.

### 3.4 Espectroscopia Raman e EDXRF - Estado da arte

Sabendo que os dentes humanos estão constantemente expostos a fontes externas e internas de agressão e a agentes de desmineralização, afetando principalmente o esmalte e a sua estrutura cristalina [14], muitos estudos foram feitos através de vários métodos analíticos por forma a avaliar a alteração do conteúdo mineral e elementar assim como, quantificar a desmineralização de esmalte.

As técnicas microrradiografia transversal (TMR) e micro-tomografia computadorizada ( $\mu$ -CT) tem sido frequentemente utilizada na avaliação da desmineralização e remineralização dos dentes afetados pela doença cárie [54] mas, os seus resultados demonstraram apenas os fenómenos da alterações minerais, não conseguindo explicar os mecanismos da desmineralização e remineralização á nível atómico provocada pela cárie. Já a espectroscopia Raman e a EDXRF apresentam várias vantagens perante as técnicas mencionadas anteriormente por serem não destrutivos e por apresentarem uma elevada sensibilidade na avaliação da alteração da estrutura cristalina do esmalte.

Cândido *et al.* [13] aplicaram as técnicas EDXRF e Espectroscopia Raman para estudar a desmineralização do esmalte humano provocada por bebida ácida, neste caso a Coca-Cola® de pH 2,5. Foi utilizada a razão de despolarização da banda de alongamento simétrico de fosfato (P) nos espectros Raman para avaliar a perda de mineralização da matriz de hidroxiapatite e o EDXRF para avaliar o

conteúdo elementar do esmalte. Vinte e seis dentes foram analisados tanto diretamente na superfície do esmalte como nas suas secções transversais. Para obter os espectros Raman das amostras, foi utilizado um microscópio confocal XploRA e um laser infravermelho próximo (785nm). Quanto ao método  $\mu$ -EDXRF, foi utilizado um tubo de raio-X ródio (Rh) de baixa potência e um detector de desvio de silício para detetar a radiação de fluorescência. Nos resultados obtidos observou uma diminuição das concentrações de Ca e P, e um aumento da desmineralização nos esmaltes sujeitos a erosão ácida.

Soares *et al.* [74] utilizaram as técnicas  $\mu$ -EDXRF e microscopia eletrónica de varrimento combinada com Espectroscopia por dispersão em energia (MEV-EDS) para estudar os efeitos dos vernizes e gel de flúor no tratamento do esmalte dentário do bovino submetido à erosão ácida. A análise elementar em profundidade do Ca e P foram obtidas através do método  $\mu$ -EDX 1300 equipado com um tubo de raio-X de ródio e um detector Si (Li) arrefecido por azoto líquido (N<sub>2</sub>) enquanto que, a morfologia e a avaliação dos danos no esmalte foram analisadas pela técnica de MEV. Os resultados obtidos permitiram concluir que perante uma erosão dentária sem o tratamento com o composto de flúor, a concentração do Ca e P sofrem um decréscimo, afirmando assim, que os vernizes e gel de flúor tem um efeito positivo na proteção da erosão ácida.

Luís *et al.* [14] recorreram a técnica Espectroscopia Raman para avaliar o efeito potencial de desmineralização do esmalte humano após aplicação de estimulantes de produção salivar. Foram utilizados doze dentes incisivos divididos em dois grupos no qual, num grupo foi aplicado um estimulante de produção salivar tradicional (SST<sup>®</sup>) que pode provocar a erosão dentária e no outro foi aplicado o estimulante XEROS<sup>™</sup> que apresenta menor potencial erosivo. Os espectros Raman das amostras foram obtidos usando um microscópio confocal Horiba XploRA e um laser infravermelho próximo (785 nm) com uma rede de difração de 1.200 linhas/mm. Os resultados obtidos mostraram que, não há alteração da estrutura cristalina nem um efeito erosivo significativo no esmalte, quando se utiliza qualquer desses dois estimulantes.

Castro *et al.* [75] através das técnicas  $\mu$ -EDXRF e Espectroscopia  $\mu$ -Raman estudaram as possíveis alterações no conteúdo elementar e molecular do esmalte, após sucessivas aplicações de produtos branqueadores dentários abusivos vendidos no mercado. Foi utilizado utilizados 12 dentes humanos saudáveis como amostras. O sistema  $\mu$ -EDXRF consistiu num M4 Tornado, o tubo de raio-X era o tubo Rh e a detecção da radiação fluorescência foi feita através do detector de dispersão de silício. Na análise com espectrometria Raman foi utilizado o espectrómetro Micro- Raman Confocal XploRA com uma fonte de laser e um comprimento de onda de 785 nm. Os resultados obtidos são sugestivos de que, o excesso de branqueamento pode resultar na perda de grupos fosfatos na superfície do esmalte e que levam a uma alta desmineralização dentária.

Num estudo realizado por Carvalho Filho *et al.* [76], o método  $\mu$ -EDXRF foi utilizado para avaliar os efeitos da aplicação de diferentes vernizes e gel de flúor na prevenção da erosão do esmalte, provocada por bebidas ácidas como sumo de laranja e refrigerantes. Este método permitiu obter

informações químicas quantitativas dos elementos Ca e P presentes no esmalte e forneceu informação da interação do flúor com o esmalte. Foi utilizado o modelo  $\mu$ -EDX1300 equipado com um tubo de raio-X de ródio e um detector Si (Li) resfriado por azoto líquido ( $N_2$ ). Os resultados obtidos permitiram concluir que, as percentagens do peso dos elementos Ca e P na presença das bebidas ácidas apresentam uma diminuição e que tanto o gel de flúor como os vernizes atuam positivamente na proteção da erosão dentária, tendo o gel um efeito muito mais eficaz.

### 3.5 Vantagens e limitações das técnicas analíticas

Na tabela 3.1 encontra-se algumas vantagens e limitações das técnicas que irão ser utilizadas na presente dissertação.

Tabela 3.1- Vantagens e limitações das técnicas analíticas (PIGE, Espectroscopia Raman e EDXRF) [14], [77].

Técnicas	Vantagens	Limitações
<b>PIGE</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Técnica não destrutiva</li> <li>• Fornece melhor informação do perfil de profundidade de alguns isótopos em comparação com outras técnicas de IBA;</li> <li>• Alta sensibilidade na detecção de muitos núclídeos;</li> <li>• Capacidade de utilizar feixe externo.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Maior sensibilidade para elementos com <math>Z &lt; 30</math>;</li> <li>• A sensibilidade varia de isótopo para isótopo;</li> <li>• Interferência de reações secundárias na matriz devido a radiações de fundo do efeito de Coulomb.</li> </ul>
<b>Espectroscopia Raman</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Técnica não destrutiva e com boa resolução espacial (<math>1\mu m</math>);</li> <li>• Fornece informações estruturais e composicional do material em análise.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fraqueza inerente do efeito Raman;</li> <li>• Existência de fluorescência;</li> <li>• Elevado custo dos equipamentos.</li> </ul>
<b>EDXRF</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Técnica não destrutiva, simples interpretação qualitativa;</li> <li>• Bons limites de detecção para <math>Z &gt; 14</math>.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Análise quantitativa complexa devido a efeitos de matriz;</li> <li>• Pouca sensibilidade aos elementos de <math>Z &lt; 12</math>;</li> <li>• Elevado custo dos equipamentos.</li> </ul>

# 4

## 4 Desenvolvimento da Gaiola de Faraday

Neste capítulo é descrita todo o procedimento do desenvolvimento da gaiola e do canhão de elétrons.

### 4.1 Gaiola de Faraday

O desenvolvimento da nova gaiola de Faraday foi baseado numa antiga gaiola desenvolvida durante a realização de uma tese de doutoramento (figura 4.3) [78]. A antiga gaiola envolvia o centro da câmara de reações nucleares (descrita no capítulo 5) e em ser polarizada e ligada ao porta-amostras permitia que os elétrons secundários (emitidos da amostra durante a experiência e a incidência do feixe de prótons) que incidiam nas suas paredes fossem contabilizados para a medida da carga referente a cada espectro coletado durante a experiência. Também era polarizada negativamente de modo que a trajetória dos elétrons no seu interior fosse constrangida. A fuga dos elétrons provoca certos constrangimentos durante uma experiência, provoca o erro por excesso da medida da carga acumulada na amostra como também, pode impedir a obtenção de um bom espectro de raio-X devido ao aparecimento de radiação de carácter contínuo no espectro [78].

Atualmente, devido à dimensão do sistema de detectores de partículas PIPS (*Passivated Implanted Planar Silicon*), o espaço no interior da câmara ficou reduzido, tornando impossível a continuidade da utilização da gaiola antiga. Consequentemente, a necessidade de desenvolver uma nova gaiola de Faraday tornou-se indispensável. Esta nova gaiola também envolve o centro da câmara e tem de estar eletricamente isolada dos restantes componentes no interior da câmara, de forma a não inibir a trajetória dos feixes de partículas e permitir o posicionamento dos detectores para a detecção de emissão gama e de radiação X (figura 4.1). De modo a não impedir o movimento dos detectores PIPS, foi necessário

posicionar a gaiola a uma altura de 50 mm em relação a base da câmara e construir 3 pés (cilindro de 20 mm de diâmetro e 56 mm de altura), servindo como suporte da gaiola. Todo o desenho da nova gaiola foi feito no *software Solid Works* [79]. A nova gaiola tem 110 mm de altura, 1 mm de espessura, 3 orifícios, um de 8,75 mm de raio por onde entra o feixe de prótons, um de 5 mm de raio onde fica o detector de raio-X e um na tampa da gaiola por onde passa as porta-amostras. Foi necessário fazer duas tampas para a gaiola, uma com 45 mm de diâmetro (tampa 1) compatível com o porta-amostra manual (figura 4.2) e outra de 50 mm de diâmetro (tampa 2) de modo que permita a entrada de um novo porta-amostras com movimentação automática que está a ser desenvolvido durante a realização de uma tese de mestrado. A gaiola está afastada 5 mm do detector gama, isto porque, quanto mais perto as amostras estiverem do detector melhor será o espectro obtido para a análise.

Nesta dissertação as experiências de PIGE foram realizadas sem a gaiola de Faraday. Os desenhos da gaiola de Faraday encontram-se no apêndice A.



Figura 4.2 - Fotografia de porta-amostras manual. Retirado de [78].

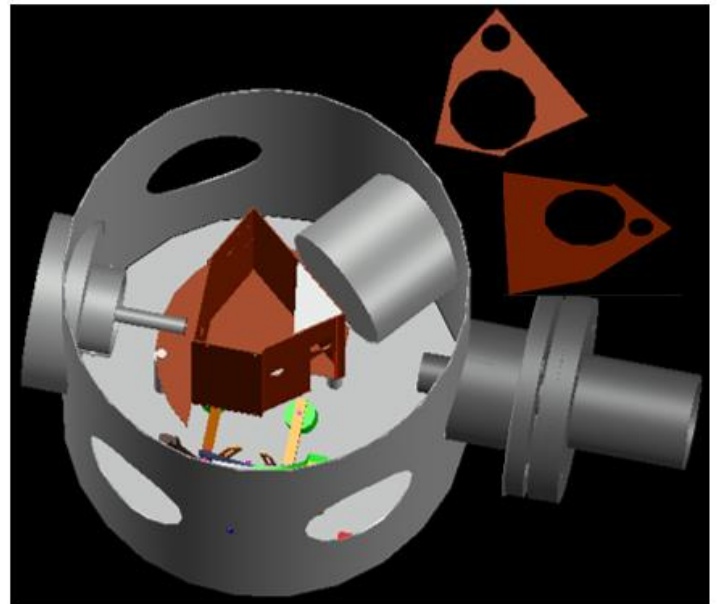


Figura 4.1 - Desenho 3D da nova gaiola. Colocada no interior da câmara.

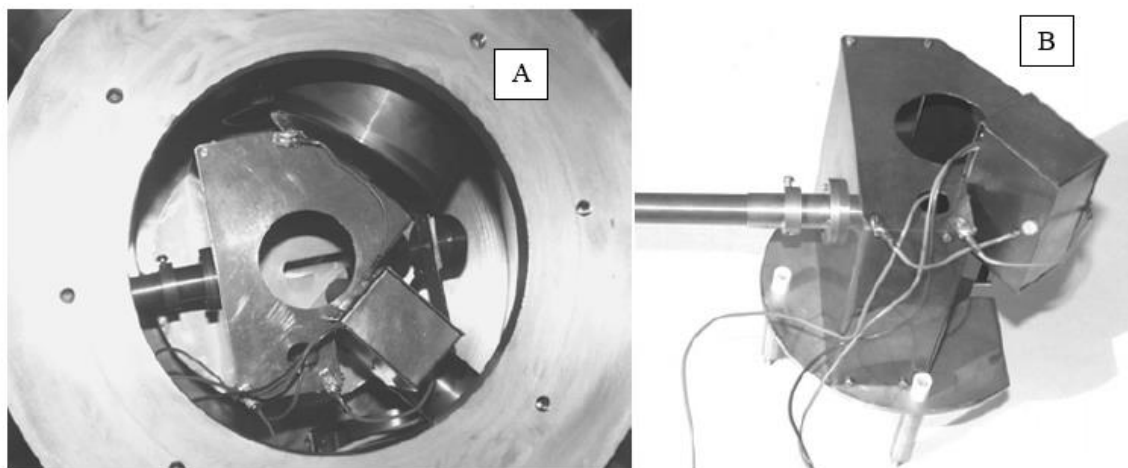


Figura 4.3- Fotografia da gaiola de Faraday antigo e câmara. A- Interior da câmara.; B- Gaiola de Faraday. Adaptado de [78].

## 4.2 Canhão de elétrons

Quando um feixe de partículas incide numa amostra isolante, mesmo com uma corrente de alguns nA, torna-se difícil ocorrer deslocamento da carga acumulada nessa amostra sem que haja emissão de faíscas. Essas faíscas são sempre direcionadas entre a região de impacto do feixe e o material condutor mais próximo, podendo dificultar o desempenho do integrador de carga e provocar emissão de elétrons secundários. Para evitar a ocorrência desse processo, torna-se importante a presença de um canhão de elétrons [78].

Além da antiga gaiola de Faraday desenvolvida durante a realização da tese de doutoramento também foi desenvolvido um canhão de elétrons, colocado no exterior da gaiola de Faraday [78]. Para a construção do canhão de elétrons foram necessários dois elementos: um filamento condutor feito de tungsténio, que emite elétrons por efeito termoelétrico ao ser percorrido por uma corrente elétrica, e uma grelha de extração, que ao estar positivamente polarizada e posicionada entre o filamento e o alvo, permite a aceleração dos feixes de elétrons em direção à superfície do alvo.

Nesta dissertação também se desenvolveu um canhão de elétrons, seguindo o mesmo procedimento. Mas, optou-se por colocar o canhão no interior da gaiola, ficando o canhão totalmente envolvido pela gaiola, devido à posição dos detectores de partículas e do detector de radiação gama (HPGe).

A produção de faíscas ocorre quando o campo elétrico na superfície da amostra bombardeada é irregular. Entretanto, se o número de elétrons produzidos pelo canhão for bastante elevado, ao serem direcionados para a superfície da amostra bombardeada, fazem com que esta superfície tenha um campo elétrico homogêneo em vez de irregular. Na presença de um campo homogêneo, o deslocamento da carga já não ocorre pela emissão de faíscas. A corrente fornecida ao filamento e o potencial para a polarização da grelha de extração serão de aproximadamente 300 mA e +300V respetivamente [78].

Os desenhos do canhão de elétrons encontram-se no apêndice A.



## 5 Materiais e Métodos

Neste capítulo encontrará a descrição dos materiais e métodos utilizados na análise das amostras bem como a descrição de todo o procedimento experimental.

O estudo foi feito com um total de 20 amostras do esmalte dentário nos quais foram inicialmente analisadas pelas técnicas de PIGE, Raman e XRF. Depois destas análises, as amostras foram divididas em 2 grupos, A e B, composto por 10 amostras cada. Nas amostras do grupo A, foi aplicado um protocolo de verniz do flúor enquanto que as do grupo B não sofreram nenhum tratamento inicialmente. Após a aplicação de verniz, todas as 20 amostras foram lavadas com uma pasta dentífrica sem flúor e analisadas novamente pelas três técnicas. No final foi aplicado um protocolo erosivo em ambos os grupos e analisadas pelas três técnicas.

O fluxograma do estudo realizado encontra-se na figura 5.1.

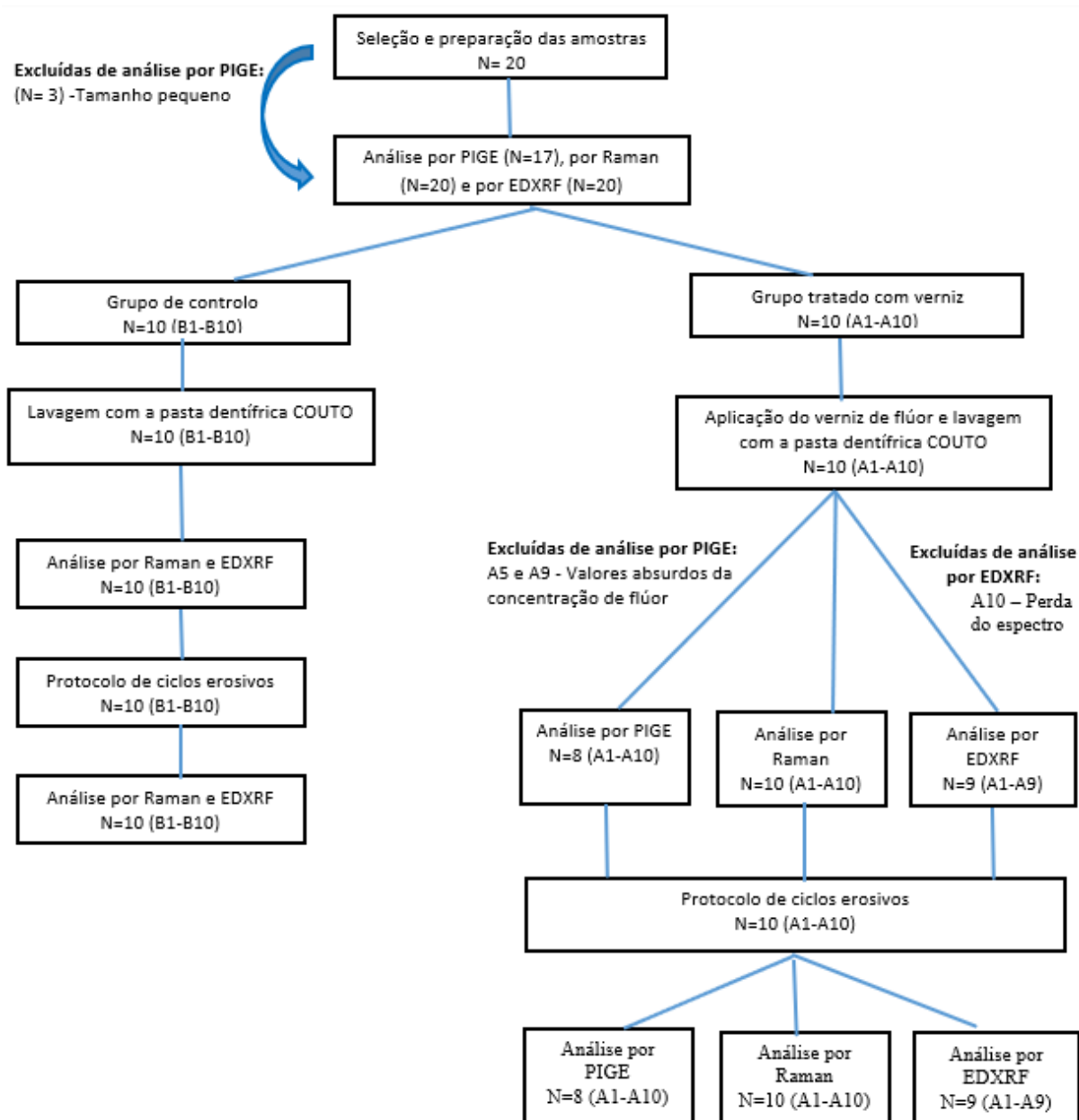


Figura 5.1-Fluxograma do procedimento experimental.

## 5.1 Preparação das amostras

As amostras utilizadas no estudo foram provenientes de um banco de dentes hígidos, extraídos por motivos ortodônticos ou periodontais. Este banco pertence a um grupo de Investigação em Biologia e Bioquímica Oral (GIBBO) da Unidade de Investigação em Ciências Orais e Biomédicas (UICOB) da Faculdade de Medicina Dentária da Universidade de Lisboa (FMDUL).

Foram selecionados dentes molares, incisivos e caninos que, antes de serem cortados com uma lâmina de precisão (Buehler Isomet 1000, EUA- ver figura 5.3), foram observados com uma lupa binocular (Meiji Techno EMZ 8RT, Japan) para verificar se nenhum apresentava irregularidades na superfície do

esmalte. A partir dos dentes molares foram obtidas amostras com 3 mm de espessura e aos caninos e incisivos foram obtidas amostras com 4 mm de espessura ( ver figura 5.2) [80].

As amostras foram colocadas individualmente num tubo de *falcon* devidamente identificado e foram conservados em 3 mL de cloramina T<sub>3</sub> – H<sub>2</sub>O (C<sub>7</sub>H<sub>7</sub>CINNaO<sub>2</sub>S (3H<sub>2</sub>O)) a 0,5 % a 4 °.



Figura 5.3 - Fotografia do equipamento utilizado para cortar dentes.

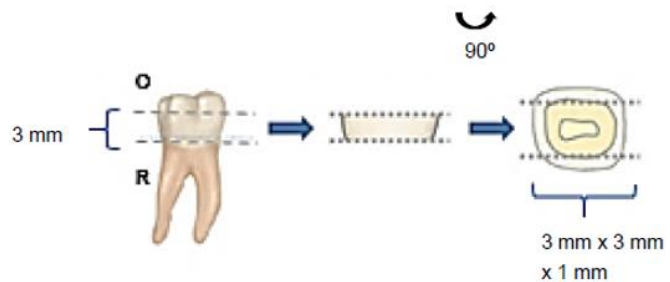


Figura 5.2 - Esquema ilustrativo do procedimento do corte do dente molar (removeu a parte oclusal (O) e a parte radical (R)). Adaptado de [80].

## 5.2 Análise por PIGE

Toda a experiência que envolve a análise por PIGE foi realizada no Campus Tecnológico e Nuclear do Instituto Superior Técnico (CTN-IST) no acelerador eletrostático Tandem de 3 MV. A descrição de todos os equipamentos, condições experimentais e metodologias utilizadas durante a análise será apresentada nesta etapa.

### 5.2.1 Equipamento

O acelerador Tandem trata-se de um acelerador do tipo eletrostático, isto é, acelerador que inicia com uma tensão baixa (centenas de volts) e é capaz de atingir alta tensão, na ordem dos megavolts (valores entre 500kV a 20 MV) consoante sistema e o tipo de análise [81]. Na figura 5.5 encontra-se o esquema representativo da estrutura do acelerador Tandem e os seus componentes. No acelerador Tandem do CTN-IST, feixe de iões de hidrogénio negativos é criado numa fonte de *duoplasmastron* sendo capaz de chegar a uma intensidade máxima de 30  $\mu$ A. O feixe será posteriormente confinado no interior do tubo de aceleração onde será acelerado, deflectido e focado até ao terminal de alta tensão. No interior do tanque de aceleração (terminal de alta tensão) de alta pressão (6 bar), encontra-se uma fonte de alta tensão Crockcroft-Walton de 3 MV e um canal *stripper* que é um alvo gasoso de Árgon. Neste tanque,

pode definir dois estágios de aceleração do feixe. No primeiro estágio, o feixe é acelerado até ao centro do tanque através de um elevado potencial positivo, criado pela fonte de alta tensão. O feixe ao atravessar o *stripper* que se encontra exatamente no centro do tanque, são removidos os eletrões externos dos iões, alterando assim o seu estado de carga negativo para positivo. Este processo também quebrará todas as ligações moleculares, produzindo um feixe de alta energia que consistirá apenas em iões monoatômicos, eliminando assim todas as interferências moleculares [41], [81].

A linha de reações nucleares, onde se realizou a experiência de PIGE no presente estudo, possui vários elementos, nomeadamente o sistema de colimadores feito em chapa de tântalo (Ta), permitindo a medição de corrente que passa pela chapa e possui 3 orifícios (figura 5.4) de 2 mm, 5 mm e 3 mm de diâmetros, respetivamente, um *Faraday cup* que permite medir a intensidade do feixe de partículas logo após o sistema de colimadores, um quadrupólo responsável pela focagem do feixe antes de atingir o colimador, os deflectores eletrostáticos que permitem que o feixe entre corretamente na câmara e por último a câmara de reações nucleares onde se coloca as amostras [82].

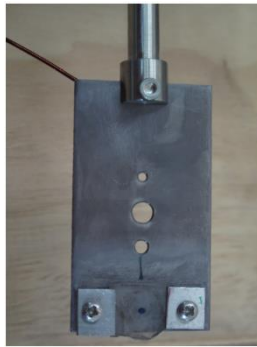


Figura 5.4 - Fotografia da chapa de Ta e os 3 orifícios. Retirada de [82].

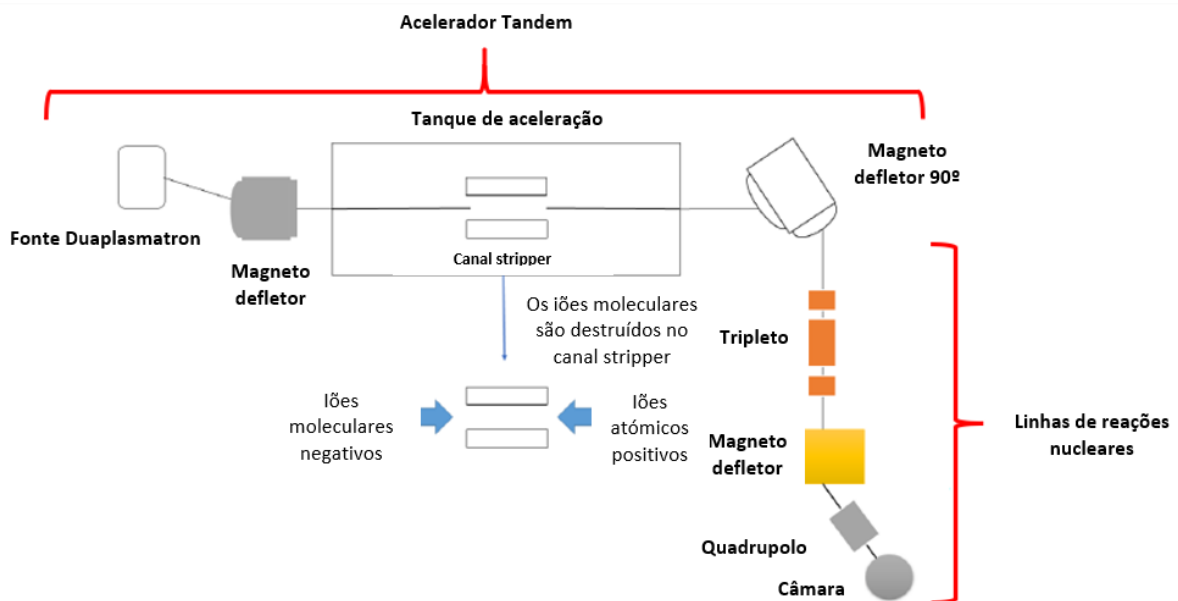


Figura 5.5 - Esquema representativo das linhas de reações nucleares do acelerador Tandem. Adaptado de [44].

### 5.2.1.1 Câmara de reações nucleares

A câmara de reações nucleares permite a análise das amostras através de várias técnicas nomeadamente de reação nucleares com emissão de partículas, de PIGE, de PIXE e NRA (*Nuclear Reaction Analysis*). Tem uma forma cilíndrica de 268 mm de diâmetro, 250 mm de altura e 4 mm de espessura e tem associado diversos componentes que são descritos em seguintes grupos (figura 5.8) [44]:

- **Detectores**

No interior da câmara podem ser colocados até quatro detectores: detector gama, detector de raio-X e dois detectores de partículas. O detector de raio-X não foi utilizado, nem colocado nesta experiência. O detector de radiação gama é um cristal de germânio hiper puro (HPGe) de 64 mm de diâmetro e 62,6 mm de comprimento, revestido com uma capa de alumínio de 1 mm de espessura. Este encontra-se localizada a uma distância de 55,5 mm do alvo e apresenta um ângulo de 130° graus em relação à direção do feixe. Para a detecção da linha de 1,332 MeV da fonte de  $^{60}\text{Co}$ , este detector tem uma resolução em energia de 1,76 keV e uma eficiência relativa de 45° graus. O detector de radiação gama é arrefecido a azoto líquido. Os detectores de partículas, designados por PIPS (*Pasivated Implanted Planar Silicon*) são móveis e o movimento pode ser controlado a partir do exterior da câmara. Tem uma resolução em energia de 12 keV para a detecção de partículas alfa de 5486 keV provenientes de uma fonte de  $^{241}\text{Am}$  e os ângulos de dispersão associados a estes podem variar entre 95° e 165° graus.

- **Sistema de colimadores**

O sistema de colimadores encontra-se à entrada da câmara, está completamente isolada da câmara de reações nucleares. Este sistema permite medir a corrente e a dimensão do feixe que passa por ela. A estrutura do colimador da câmara de reações nucleares tem associado uma chapa de ouro e uma chapa de níquel, conforme representado nas figuras 5.6 e 5.7 encontra-se a fotografia do colimador.



Figura 5.7- Fotografia da chapa de níquel que protege o colimador da câmara de reações nucleares. Retirado de [41].



Figura 5.6- Fotografia da chapa de níquel incluindo a parte da chapa de ouro do colimador da câmara de reações nucleares. Retirado de [41].

- **Beam stopper**

É feito de aço-inox AISI304, possui uma chapa de Ta e uma extensão que permite diminuir o número de partículas retro dispersadas do *beam stopper* que podem alcançar os detectores de partículas.

- **Porta-amostras**

Serve como suporte aos alvos e permite um movimento vertical ao longo de 48 mm. Atualmente é acionado manualmente. É colocada no centro da câmara e os alvos podem ser colocados a 0° ou 45° graus em relação à direção do feixe.

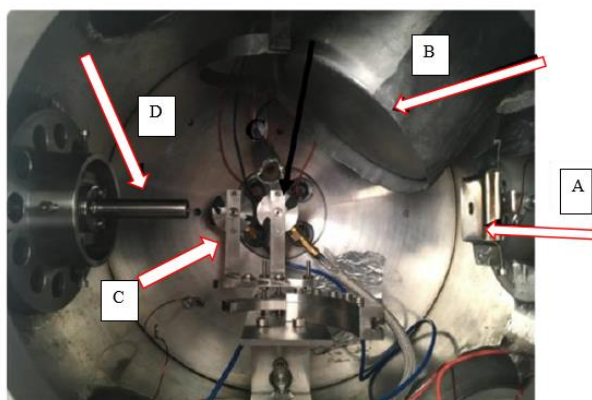


Figura 5.8 - Interior da câmara de reações nucleares e os componentes associados. A- Sistema de colimadores; B- Detector gama; C- Detectores PIPS; D-Beam stopper. Adaptado de [82].

## 5.2.2 Condições experimentais

As amostras foram bombardeadas com feixe de prótons de 3,2 MeV de energia, equivalente a aplicação de uma tensão de 1597,9 kV. A corrente do feixe incidente foi de 3-5 nA e a carga coletada durante as medições foi de 1-2  $\mu\text{C}$ . As amostras foram colocadas num porta-amostra e depois colocado num porta-alvos com capacidade de suportar 4 porta-amostras (figura 5.9) por cada experiência. A posição de cada amostra foi medida e foi tirada a fotografia do porta-amostra com amostras montadas para garantir que



Figura 5.9- Fotografia da montagem das amostras no porta-amostra.

o feixe estivesse a incidir na superfície da amostra. O porta-amostra foi colocado no interior da câmara de reações nucleares e foram adquiridos 1 a 3 espectros por cada amostra.

### 5.2.3 Simulações

No software SRIM (*The Stopping and Range of Ions in Matter*) realizou-se uma simulação do alcance do feixe de prótons de 3200 keV numa matriz de hidroxiapatite (figura 5.10) e foram inseridas a informação da estequiometria e considerando um alvo espesso. De acordo com o resultado da simulação, verificou-se que o feixe atingiu uma profundidade de 150  $\mu\text{m}$  e projeção lateral de 4,28  $\mu\text{m}$  na amostra do esmalte. O resultado obtido permitiu ter a certeza de que a utilização de feixe de prótons de 3200 keV consegue atingir uma profundidade de 150  $\mu\text{m}$  nas amostras do esmalte dentário, sendo que as amostras apresentam uma profundidade de aproximadamente 1 mm.

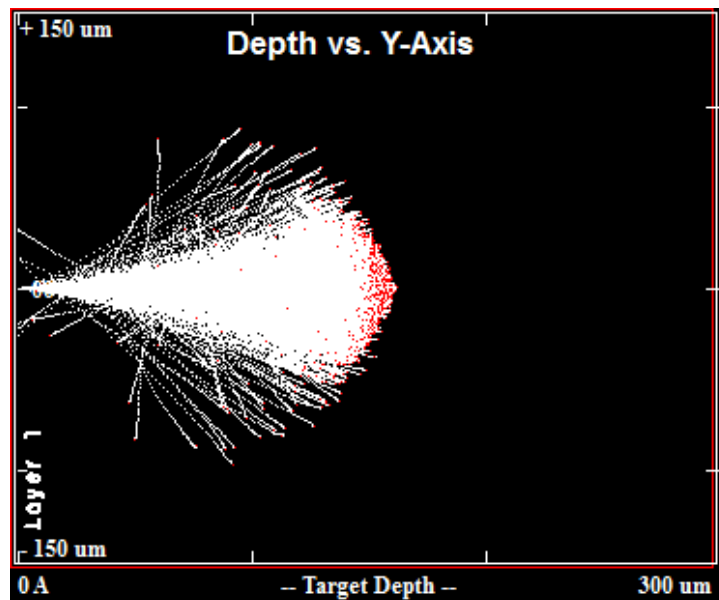


Figura 5.10 - Simulação do alcance do feixe de prótons de 3200 keV numa matriz de hidroxiapatite.

### 5.2.4 Análise dos dados

#### 5.2.4.1 Identificação de elementos

Os espectros do esmalte obtidos apresentavam o número de contagens por canal. No entanto, determinou-se uma reta de calibração (figura 5.11) em que associa a cada canal um valor de energia de modo a identificar cada pico fotoeléctrico. Nesta reta foi considerado a identificação de picos conhecidos (picos correspondentes às emissões gama de energias: 1173,2 keV, 1332 keV e 661 keV) no espectro de esmalte.

Determinou-se uma região de interesse (ROI) que engloba cada pico de interesse para a análise de forma a determinar a intensidade de cada pico. Isto foi feito através do *software OriginPro 8* nos quais foram retiradas as áreas correspondentes a cada pico, foi removido o fundo de base e também foi feito

um ajuste do pico associado a cada elemento por uma função gaussiana. Na figura 5.12 encontra representado um espectro obtido e os correspondentes picos de emissão gama de elementos como flúor, fósforo e sódio, presentes no esmalte.

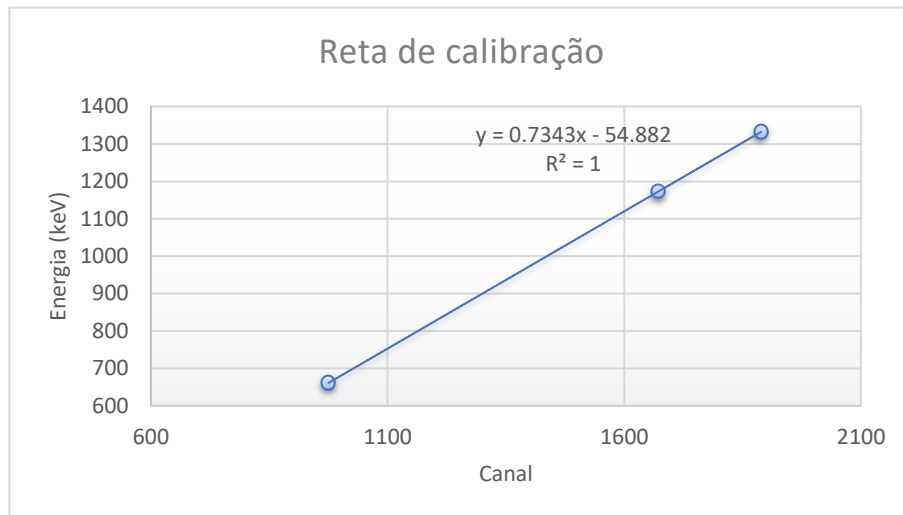


Figura 5.11 - Reta de calibração da energia da radiação em função do canal.

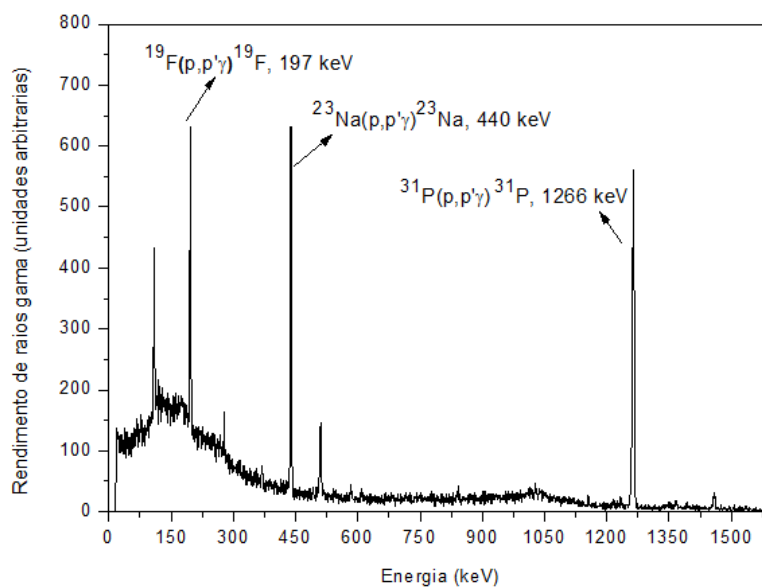


Figura 5.12 - Espectro com representação das emissões gama do F a 197 keV, Na a 440 keV e P a 1266 keV.

#### 5.2.4.2 Quantificação dos elementos

Através da intensidade dos picos procedeu-se com a quantificação dos elementos leves presentes no esmalte. Foi preciso fazer uma correção da área dos picos designado de rendimento gama (Y), através da normalização do resultado para uma carga de  $1 \mu\text{C}$  e pelo tempo morto do detector (TM). Esta correção foi feita de modo a ter uma dedução correta do rendimento da reação ( $Y_{\text{corrigido}}$ ):

$$Y_{\text{corrigido}} = TM \frac{Y}{\text{Carga}} \quad (5.1)$$

Devido a concentração uniforme do P foi possível utilizar este elemento como padrão interno para a análise de PIGE.

Contudo, procedeu-se com a análise quantitativa dos elementos presentes na amostra, tendo em conta os elementos da matriz da hidroxiapatite e as suas respetivas emissões gama. Foram colocados no programa ERYA-BULK (figura 5.13) os dados corretos de cada elemento, nomeadamente a fração atômica e o rendimento experimental ( $Y_{\text{corrigido}}$ ). Para o elemento cálcio (Ca), foi considerada a fração atômica obtida na análise por XRF. Também foi inserida a energia do feixe de prótons incidentes na amostra, tendo um valor de 3,2 MeV. De seguida, fez-se correr o programa fornecendo a matriz inicial considerando os resultados dos cálculos da concentração de cada elemento presente na amostra em análise.

Element	Gamma Peak (keV)	Fit	Fixed Ratio Group Number	Cross-Section Calibration Parameter	Composition Initial Guess	Theoretical Yield	Experimental Yield	Fitted Yield
31P	1266	<input checked="" type="checkbox"/> Fit ?	0	1	0.157380	29189.785754	29201.56669	29189.785754
19F	197	<input checked="" type="checkbox"/> Fit ?	0	1	0.001497	5454.728075	5454.970136	5454.728075
Na	441	<input checked="" type="checkbox"/> Fit ?	0	1	0.005591	12769.255796	12769.79212	12769.255796
16O	0	<input checked="" type="checkbox"/> Fit ?	0	1	0.681648	0.000000	0	0.000000
Ca	0	<input type="checkbox"/> Fit ?	0	1	0.153884	0.000000	0	0.000000

LIBPhys-UNL

Number Elements: 5, Minimum Energy(keV): 0, Maximum Energy(keV): 3199.94675, Step Size (keV): 1, Table Step (keV): 0

Charge (uC): 1, Thickness (ug/cm2): 0

Buttons: Clear Table, Check Table, Norm Table, Advanced, Run, Export Table

Figura 5.13- Exemplo de uma simulação no programa ERYA-BULK.

### 5.2.4.3 Incertezas na medição

Na determinação da concentração de F, a incerteza associada a cada medição foi calculada tendo em consideração a incerteza relativa e a incerteza absoluta. A incerteza absoluta ( $Inc_{\text{Absoluta}}$ ) foi calculada a partir da seguinte fórmula:

$$Inc_{\text{Absoluta}} = \sqrt{\left(\frac{\sqrt{\text{área}}}{\text{integral}}\right)^2 + (Rep)^2 + (Ap)^2 + (Carga)^2 + (Edect)^2} \quad (5.2)$$

Em que foram consideradas o seguinte:

- Incerteza associada a incerteza estatística do rendimento, definida por  $\frac{\sqrt{\text{área}}}{\text{integral}}$ ;
- Incerteza associada a reprodutibilidade (Rep) - 2%;
- Incerteza da área do pico da emissão gama (Ap) - 3%;
- Incerteza associada a carga (Carga) - 10%;
- Incerteza associada a eficiência do detector (Edect) - 5%.

Quanto à incerteza relativa foi feita o cálculo da incerteza dos resultados obtidos na fase após o tratamento com verniz de flúor relativamente aos resultados obtidos em pré-tratamento como também, foi calculado a incerteza relativa dos resultados obtidos na fase do ataque ácido relativamente à fase de tratamento com verniz. Os cálculos foram feitos através das seguintes fórmulas:

$$\frac{\Delta R_{1^{\circ}/2^{\circ}}}{R_{1^{\circ}/2^{\circ}}} = \sqrt{\left(\frac{\Delta F_{2^{\circ}}}{F_{2^{\circ}}}\right)^2 + \left(\frac{\Delta F_{1^{\circ}}}{F_{1^{\circ}}}\right)^2 + \left(\frac{\Delta P_{2^{\circ}}}{P_{2^{\circ}}}\right)^2 + \left(\frac{\Delta F_{1^{\circ}}}{F_{1^{\circ}}}\right)^2} \quad (5.3)$$

e,

$$\frac{\Delta R_{2^{\circ}/3^{\circ}}}{R_{2^{\circ}/3^{\circ}}} = \sqrt{\left(\frac{\Delta F_{3^{\circ}}}{F_{3^{\circ}}}\right)^2 + \left(\frac{\Delta F_{2^{\circ}}}{F_{2^{\circ}}}\right)^2 + \left(\frac{\Delta P_{3^{\circ}}}{P_{3^{\circ}}}\right)^2 + \left(\frac{\Delta F_{2^{\circ}}}{F_{2^{\circ}}}\right)^2} \quad (5.4)$$

Em que,  $\left(\frac{\Delta F_{1^{\circ}}}{F_{1^{\circ}}}\right)$ ,  $\left(\frac{\Delta F_{2^{\circ}}}{F_{2^{\circ}}}\right)$  e  $\left(\frac{\Delta F_{3^{\circ}}}{F_{3^{\circ}}}\right)$  correspondem a  $\frac{\sqrt{\text{área}}}{\text{integral}}$  do pico gama do elemento F na fase de pré-tratamento (1°), pós tratamento com verniz e pasta coute (2°) e pós ataque ácido (3°), respetivamente. Para os elementos P e Na, considerou-se a mesma metodologia. As razões  $\frac{\Delta R_{1^{\circ}/2^{\circ}}}{R_{1^{\circ}/2^{\circ}}}$  e  $\frac{\Delta R_{2^{\circ}/3^{\circ}}}{R_{2^{\circ}/3^{\circ}}}$  correspondem a comparação dos resultados dos rendimentos obtidos entre as três fases do tratamento das amostras do esmalte dentário.

### 5.3 Análise por espectroscopia Raman

O estudo por espectroscopia Raman foi realizado no Laboratório do LIBPhys-UNL. A descrição dos equipamentos, métodos e condições experimentais será apresentada nesta etapa.

### 5.3.1 Equipamentos

Utilizou-se o espectrômetro confocal  $\mu$ -Raman XploRA da Horiba (Horiba/Jobin-Yvon XploRA, França) que possui um microscópio *Olympus* com objetivas de 10x, 50x e 100x (figura 5.14), sendo as duas últimas utilizadas na análise das amostras.

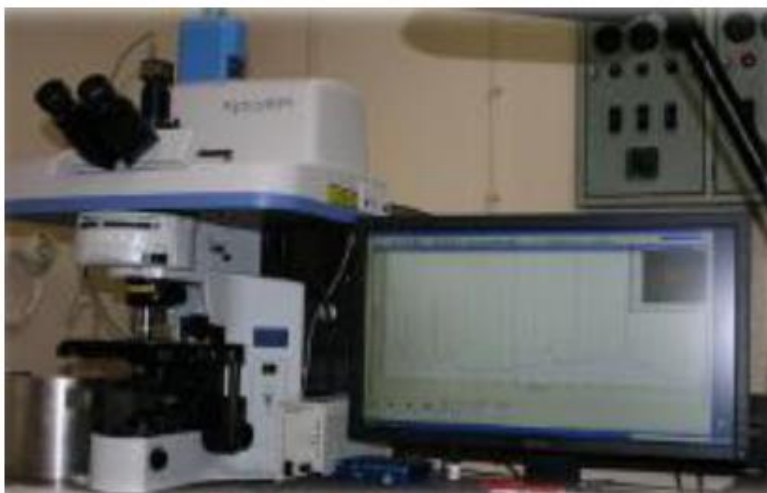


Figura 5.14 - Fotografia do espectrômetro confocal  $\mu$ -Raman da XploRA utilizado na análise por Raman.

### 5.3.2 Condições experimentais

Cada amostra foi colocada numa lamela sob o microscópio, focado com uma objetiva de 100x e foi utilizado uma fonte de laser díodo de 785 nm para adquirir espectros (gama de  $340\text{ cm}^{-1}$  a  $1500\text{ cm}^{-1}$ ) em 10 pontos diferentes por cada amostra. Foram feitos ajustes adequados de alguns parâmetros nomeadamente filtro de 50%, *hole* de  $300\text{ }\mu\text{m}$ , *slit* de  $200\text{ }\mu\text{m}$  e *grating* de  $1200\text{ grooves/mm}$ . A resolução em energia foi de  $10\text{ cm}^{-1}$  e a espacial foi de aproximadamente  $1\text{ }\mu\text{m}$ . Para cada ponto da amostra, foram obtidos dois espectros (um com polarização paralela e outro com polarização perpendicular) a um tempo de exposição de 20 segundos e 4 acumulações. Também foi feito o ajuste da banda  $\nu_1$  e alongamento simétrico do grupo fosfato  $\text{PO}_4^{3-}$  a  $960\text{ cm}^{-1}$  para o esmalte são. Antes do feixe incidir na amostra, passa-se por polarizador linear e após a interação com a amostra, os fótons resultantes vão passar pelo polarizador analisador. A variação do ângulo entre esses polarizadores permite obter informações relevantes da estrutura molecular das amostras, principalmente na análise da desmineralização do esmalte [83].

O esmalte dentário é composto por cristais de hidroxiapatite que estão ordenados numa única direção (perpendicular à superfície do esmalte) quando se trata de esmalte são. Para esmalte contaminado pela cárie, a direção dos cristais sofre alteração, apresentando uma estrutura desorganizada, diferente quando comparada com o esmalte são. No entanto, para este último, a razão de despolarização tem um valor pequeno enquanto que, para esmalte afetado pela cárie, este valor aumenta [65].

A análise experimental de modos de vibração simétricos do ião  $PO_4^{3-}$  foi feita através do cálculo da razão da despolarização ( $\rho$ ), considerando as intensidades dos picos presentes nos espectros adquiridos com polarização paralela e perpendicular. Essa razão de despolarização é fortemente influenciada pelo alinhamento molecular no caso das amostras sólidas como cristais, permitindo obter informações adicionais acerca da simetria vibracional e orientação das moléculas presentes numa amostra [83]. A expressão para o cálculo de  $\rho$  é o seguinte:

$$\rho_i = \frac{I_i \perp}{I_i \parallel} \quad (5.2)$$

Onde,  $\rho_i$  representa a razão de despolarização no ponto  $i$ ;  $I_i \perp$  representa a intensidade do pico  $\nu_1 PO_4^{3-}$  a  $960 \text{ cm}^{-1}$  com polarização perpendicular no ponto  $i$  e  $I_i \parallel$  representa a intensidade do pico  $\nu_1 PO_4^{3-}$  a  $960 \text{ cm}^{-1}$  com polarização paralela no ponto  $i$  [84]. Na figura 5.15 estão representados exemplos de espectros obtido com a polarização paralela e perpendicular.

A razão de despolarização ( $\rho$ ) de cada amostra foi obtida fazendo a razão da soma da razão de despolarização de cada ponto na amostra, no qual foi adquirido o espectro pelo número total de pontos, como encontra representada na seguinte equação:

$$\rho = \frac{\sum_1^{10} \rho_i}{10} \quad (5.3)$$

Com recurso ao *software* LabSpec (v5.58.25, Horiba, França) foram feitos a desconvolução espectral no qual, removeu-se o fundo dos espectros devido ao efeito de fluorescência e determinou-se as intensidades dos picos fazendo a integração da área sob as curvas.

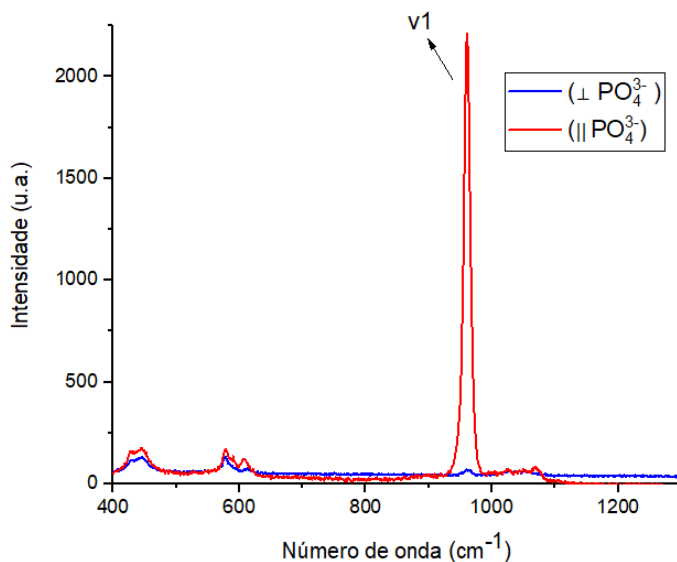


Figura 5.15- Comparação dos espectros obtidos de uma amostra do esmalte dentário com os polarizadores e paralelos e perpendiculares entre si.

## 5.4 Análise por EDXRF

A análise por EDXRF foi realizado no LIBPhys-UNL no espectrómetro de fluorescência de raios-X dispersiva em energia (M4-Tornado da Bruker). A descrição do equipamento, método e condições experimentais será encontrada nesta etapa.

### 5.4.1 Equipamento

O espectrómetro utilizado tem associado um tubo de raio-X de baixa potência e um detector de raio-X (figura 5.16). No tubo de raio-X encontra-se o filamento de tungstênio que ao ser alimentado por uma corrente, provoca a emissão de elétrons que são posteriormente acelerados no cátodo em direção ao ânodo. Esses elétrons, ao interagir com o ânodo são desacelerados, formando um espectro contínuo de raio-X.

O M4-Tornado possui 5 diferentes filtros primários nomeadamente Al - 12.5  $\mu\text{m}$ , Al -100  $\mu\text{m}$  (filtro para análise de elementos leves), Al - 630  $\mu\text{m}$ , Al/Ti - 100/25  $\mu\text{m}$  e Al/Ti/Cu - 100/50/25  $\mu\text{m}$  (filtro para análise de elementos pesados), posicionados entre o tubo de raio-X e a amostra. As utilizações destes filtros permitem uma redução da radiação de fundo dispersa na região de interesse e aumento da secção eficaz de ionização para elementos leves ou pesados. Este equipamento suporta uma tensão de até 50 kV, uma corrente até 600  $\mu\text{A}$  e uma potência máxima de 30 W.

O detector utilizado para a detecção da radiação de fluorescência é um detector semicondutor de silício SSD (do inglês silicon drift detector), tendo uma resolução em energia de 142 eV para Mn-  $K\alpha$  e uma área sensível de 30  $\text{mm}^2$ . Todas as medições foram realizadas sob um vácuo de 20 mbar. O tempo de aquisição para cada espectro foi de até 8 minutos. A desconvolução espectral e quantificação foi feita recorrendo a um software incorporado no M4-Tornado, *Mquant*, tendo como base uma matriz de  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  e uma amostra infinitamente espessa. Neste programa, a intensidade do pico de fósforo é obtida em função do ajuste feito ao pico do cálcio pelo que, a razão Ca/P é constante.

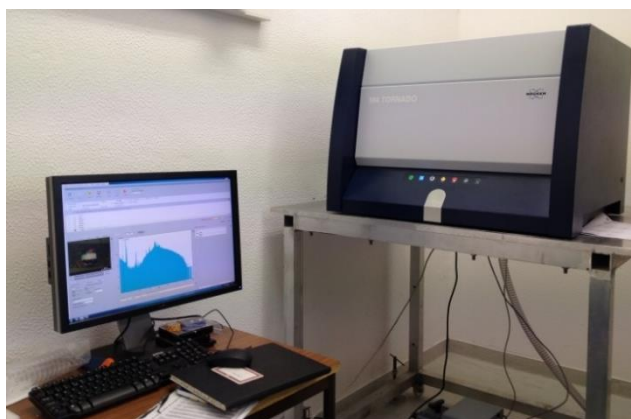


Figura 5.16 - Fotografia do M4-Tornado da Bruker.

## 5.4.2 Condições experimentais

As amostras foram colocadas numa lamela sob uma plataforma móvel de dimensão 600×350×260 mm. Foi feito o vácuo primário com uma pressão na ordem dos 20 mbar antes da qualquer aquisição do espectro de raio-X das amostras. As posições das amostras foram obtidas com o microscópio com amplificação de 10x e 100x, permitindo uma excelente visualização de superfícies das amostras. Para cada amostra, foram adquiridos 10 espectros em 5 áreas diferentes, ou seja, 2 espectros por cada área (um adquirido aplicando o filtro para elementos leves e o outro aplicando o filtro para elementos pesados). A área escolhida para obter cada espectro foi de 0,3 mm × 0,3 mm.

## 5.5 Protocolo de verniz de flúor

Foi utilizado o verniz dentário VOCO Profluorid Varnish [85] (figura 5.18) que trata de uma suspensão etanólica colofónia com aroma artificial e adoçante xilitol. Este verniz adere facilmente às superfícies húmidas por ser tolerante à humidade e à saliva. Em cada 1 mL desse verniz encontra-se 50 mg de fluoreto de sódio, o que corresponde a 22,6 mg de fluoreto.

O verniz foi aplicado num grupo de 10 amostras de esmalte são. Estas amostras estavam inicialmente imersas na solução de Cloramina T3-H<sub>2</sub>O (C<sub>7</sub>H<sub>7</sub>CINNaO<sub>2</sub>S(3H<sub>2</sub>O)). Posteriormente, foram retiradas da solução e colocadas num suporte para a aplicação do verniz. O verniz foi aplicado uniformemente de modo que cobrisse toda a superfície da amostra. Em seguida, para assegurar o endurecimento do verniz, foram aplicadas algumas gotas da saliva artificial na superfície das amostras (figura 5.19). Depois de todas as amostras serem tratadas com verniz, foram colocadas individualmente em novos *falcons* com 5 mL da saliva artificial durante 4 horas. Passado essas 4 horas, foram retiradas da saliva e lavadas com água da torneira e uma pasta sem flúor da marca COUTO [86] (figura 5.17). A escolha desta pasta sem flúor é para garantir que a variação da concentração do flúor analisada nessas amostras seja influenciada somente pelo verniz VOCO Profluorid Varnish e não pela pasta COUTO. Após a lavagem das amostras, estas foram deixadas a secar ao ar. De seguida foram colocadas novamente nos *falcons* sem qualquer substância.



Figura 5.17 - Pasta dentífrica sem flúor (COUTO) [86].



Figura 5.18 - Verniz dentário VOCO Profluorid Varnish [85].

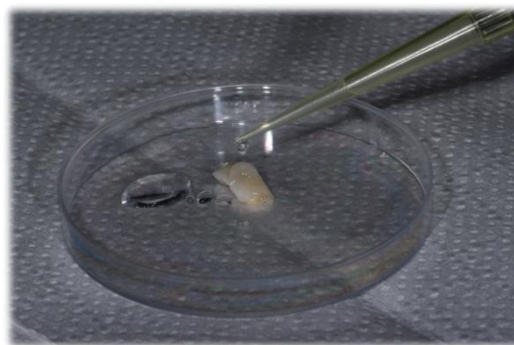


Figura 5.19 - Fotografia da aplicação de saliva artificial na amostra tratada com verniz.

## 5.6 Protocolo de ciclos erosivos

Zanatta *et al.* [87] realizaram um estudo de investigação do efeito de surfactantes associados ao fluoreto de sódio (NaF) na prevenção da erosão do esmalte, através de um modelo *in vitro* de erosão-remineralização. Aplicaram um ciclo erosivo em amostras (n=12) de esmalte dentário bovinos, no qual utilizaram uma solução de 0,3% de ácido cítrico com um pH de 2,6. Com base neste estudo, o GIBBO definiu um protocolo de ciclos erosivos que permite investigar o efeito de verniz de flúor no esmalte após a erosão ácida do esmalte provocada pela solução de ácido cítrico monohidratado no qual, foram imersas todas as amostras.

### 5.6.1 Preparação da solução de ácido cítrico monohidratado

Foi utilizado um sal tribásico de ácido cítrico monohidratado [88] (figura 5.20) no qual as características encontram-se na tabela 5.1.

A solução foi preparada diluindo 3,8 g de ácido cítrico monohidratado em 1 L de água destilada. Após a preparação da solução de ácido cítrico fez-se a medida do pH no qual registou um valor de 2. Este valor encontra-se próximo do valor (pH=2.6) utilizado no estudo referido anteriormente. A solução foi exposta a temperatura ambiente até o início do tratamento. Para a preparação foram utilizados os seguintes materiais: uma espátula, um agitador magnético, uma balança digital com 0,0001 g de incerteza, um balão volumétrico de 1 L e um medidor de pH.

Tabela 5.1-Composição do ácido cítrico.

Características	Ácido cítrico monohidratado
Fórmula química	$C_6H_5O_7Na_3 \cdot 2H_2O$
Massa molar (g/mol)	294,1
Densidade (kg/m <sup>3</sup> )	850 - 1050



Figura 5.20 - Fotografia do produto ácido cítrico monohidratado [88].

### 5.6.2 Modelo *in vitro* de ciclos erosivos

A simulação deste modelo, representado na figura 5.21 foi baseado no protocolo do estudo mencionado anteriormente [87]. Inicialmente todas as amostras (com e sem tratamento de verniz) foram imersas em 5 mL de saliva humana durante 2 h. De seguida foram mudadas para *falcons* com 5 mL da solução ácida em que, ficaram imersas durante 5 min. Passando os 5 min, as amostras foram novamente imersas em saliva humana durante 2 h. Este processo foi repetido 5 vezes e no final as amostras foram imersas na saliva humana durante 2 min. Após a aplicação deste protocolo, as amostras foram conservadas nos *falcons* sem qualquer substância até o início das medições pelas técnicas analíticas. Durante à noite, as amostras foram mantidas sob umidade relativa de 100%. A saliva humana, provinha de diferentes doadores que não apresentavam nenhuma doença. Foi congelada a uma temperatura de -80 °C até o momento da utilização. A imersão das amostras na saliva antes de serem submetidas ao ataque ácido tem como objetivo promover a formação da película protetora na superfície do esmalte evitando assim, o contacto direto do ácido.

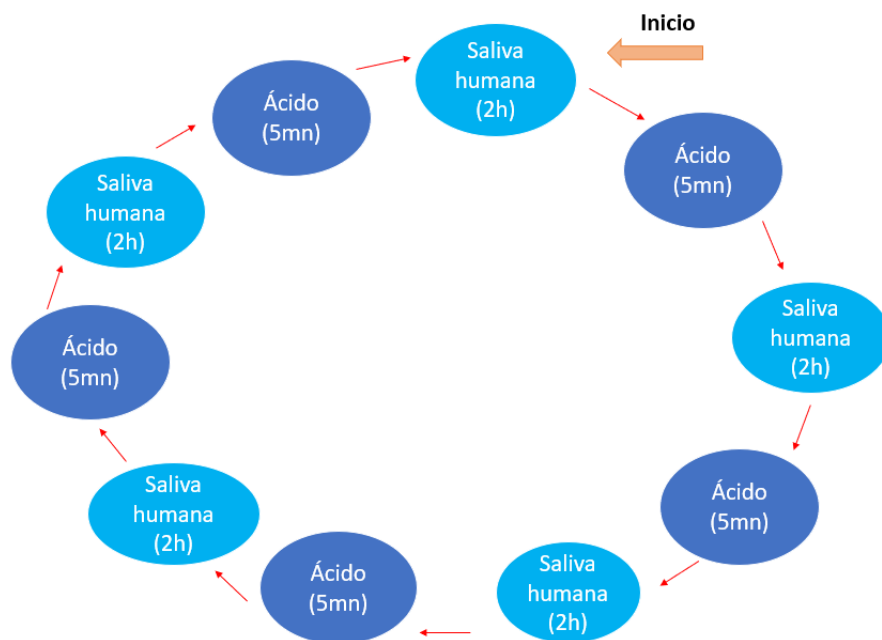


Figura 5.21 - Representação esquemática do ciclo erosivo aplicado neste estudo.

## 5.7 Análise Estatística

Os resultados obtidos pelas três técnicas analíticas foram analisados estatisticamente através do teste t-student, feito recorrendo ao excel.

### 5.7.1 Teste t-student

O teste t-student é um teste de hipótese que permite determinar as diferenças significativas entre as médias de dois conjuntos de dados que seguem uma distribuição Gaussiana. Pode ser utilizado dois tipos de teste consoante o tipo de dados: teste t-student independente ou emparelhados [89].

Nesta dissertação utilizou-se o teste t-student emparelhados, pois o teste foi feito para o mesmo grupo de amostras, mas em fases diferentes (pré-tratamento e pós-tratamento). Considerou-se uma significância estatística para  $p < 0,05$ . Neste tipo de teste, formula-se uma hipótese nula ( $H_0$ ) e uma alternativa ( $H_1$ ) em que, caso o valor obtido para o p for inferior ao 0,05, rejeita-se a hipótese nula com um nível de significância de 95%.

#### 5.7.1.1 Hipóteses de estudo

As hipóteses de estudo aplicados são:

- **Grupo A**

##### **PIGE**

Hipótese nula ( $H_0$ ): a concentração do flúor não é influenciada pelo verniz de flúor.

Hipótese alternativa (H<sub>1</sub>): a concentração do flúor é influenciada pelo verniz de flúor.

Hipótese nula (H<sub>0</sub>): a concentração do flúor não é influenciada pelo ataque ácido.

Hipótese alternativa (H<sub>1</sub>): a concentração do flúor é influenciada pelo ataque ácido.

#### **EDXRF**

Hipótese nula (H<sub>0</sub>): a concentração dos elementos Ca e P não é influenciada pelo verniz de flúor e pasta dentífrica.

Hipótese alternativa (H<sub>1</sub>): a concentração dos elementos Ca e P é influenciada pelo verniz de flúor e pasta dentífrica.

Hipótese nula (H<sub>0</sub>): a concentração dos elementos Ca e P não é influenciada pelo ataque ácido.

Hipótese alternativa (H<sub>1</sub>): a concentração dos elementos Ca e P é influenciada pelo ataque ácido.

#### **Raman**

Hipótese nula (H<sub>0</sub>): a mineralização do esmalte não é influenciada pelo verniz de flúor e pasta dentífrica.

Hipótese alternativa (H<sub>1</sub>): a mineralização do esmalte é influenciada pelo verniz de flúor e pasta dentífrica.

Hipótese nula (H<sub>0</sub>): a desmineralização do esmalte dentário não é influenciada pelo ataque ácido.

Hipótese alternativa (H<sub>1</sub>): a desmineralização do esmalte é influenciada pelo ataque ácido.

- **Grupo B**

#### **EDXRF**

Hipótese nula (H<sub>0</sub>): a concentração dos elementos Ca e P não é influenciada pela pasta dentífrica.

Hipótese alternativa (H<sub>1</sub>): a concentração dos elementos Ca e P é influenciada pela pasta dentífrica.

Hipótese nula (H<sub>0</sub>): a concentração dos elementos Ca e P não é influenciada pelo ataque ácido.

Hipótese alternativa (H<sub>1</sub>): a concentração dos elementos Ca e P é influenciada pelo ataque ácido.

#### **Raman**

Hipótese nula (H<sub>0</sub>): a mineralização do esmalte não é influenciada pela pasta dentífrica.

Hipótese alternativa (H<sub>1</sub>): a mineralização do esmalte é influenciada pela pasta dentífrica.

Hipótese nula (H<sub>0</sub>): a desmineralização do esmalte dentário não é influenciada pelo ataque ácido.

Hipótese alternativa (H<sub>1</sub>): a desmineralização do esmalte é influenciada pelo ataque ácido.

## 6 Resultados e Discussão

Neste capítulo serão apresentados e discutidos os resultados obtidos das medições efetuadas nas amostras do grupo A e B, pelas três técnicas analíticas.

### 6.1 Resultados do estudo de PIGE

Através da técnica PIGE determinou-se a concentração de flúor nas amostras do grupo A em pré e pós-tratamento enquanto que para o grupo B só se efetuaram medições em pré-tratamento.

Tendo em conta que o incremento da concentração de flúor para as amostras de controlo negativo de flúor não era expectável, conforme visto em trabalhos anteriores [84], [90] e como o tempo possível para a medição era reduzido, optou-se por não fazer medições de flúor após a lavagem com pasta dentífrica e após o ciclo erosiva para as amostras do grupo B.

Nas figuras 6.1 e 6.2 encontram-se representadas as concentrações de flúor e as respetivas incertezas absolutas obtidas para as amostras do grupo A e B, respetivamente.

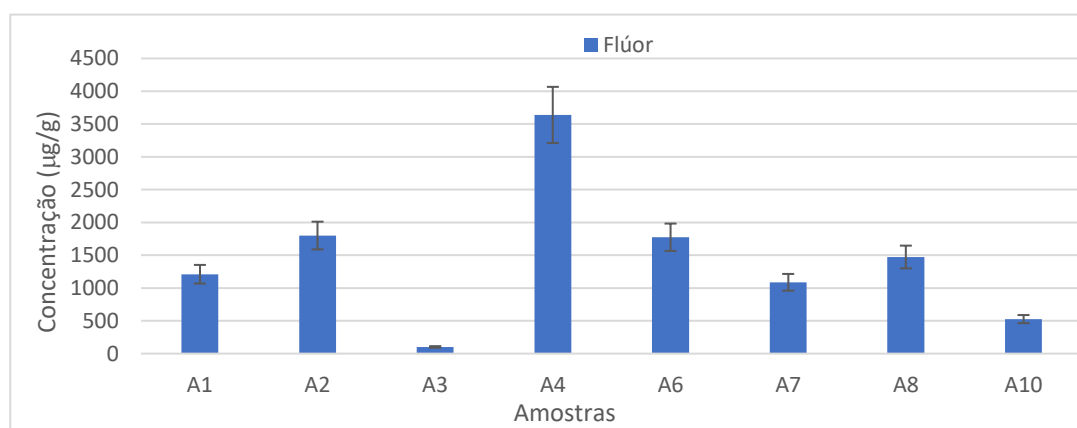


Figura 6.1- Concentração de flúor em µg/g obtidas nas amostras do grupo A antes do tratamento.

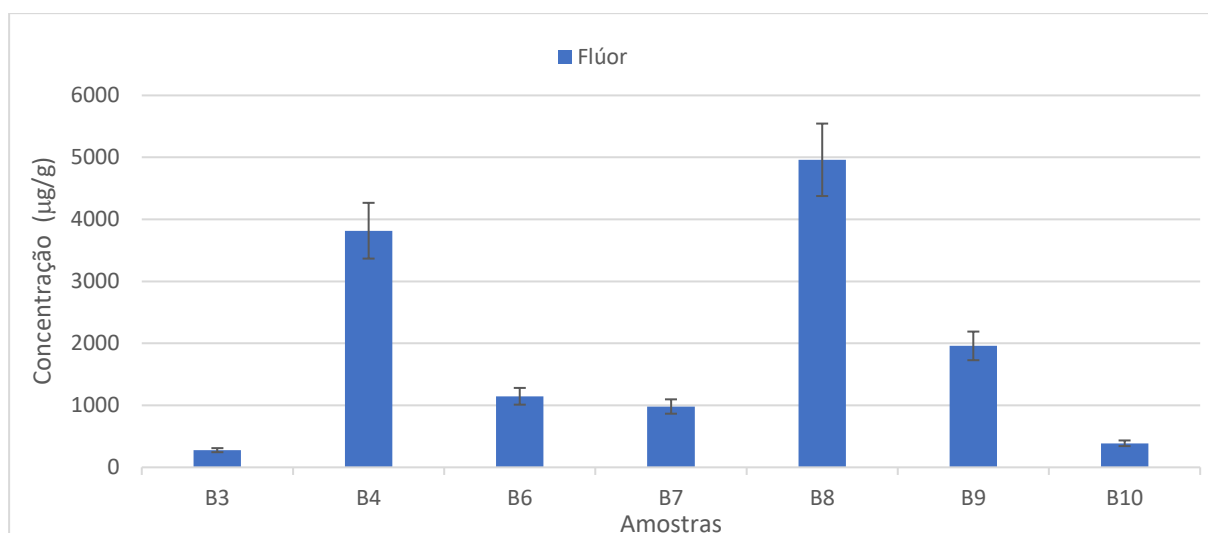


Figura 6.2- Concentração de flúor em µg/g obtidas nas amostras do grupo B antes da lavagem com pasta dentífrica.

Analisando os resultados observou-se que tanto nas amostras do grupo A como nas do grupo B a concentração de flúor é muito diferente. Este facto pode ser devido as amostras serem provenientes de doadores diferentes, tendo a influência de diversos fatores como: variabilidade biológica intrínseca, idade, género, região de habitação e hábito alimentar, como descrito adiante. O valor médio obtido para a concentração de flúor antes de qualquer tratamento foi de  $(16 \pm 2) \times 10^2$  µg/g sendo, mínima de  $(10 \pm 1) \times 10$  para A3 e máxima de  $(49 \pm 6) \times 10^2$  µg/g para B8. A incerteza absoluta associada a cada medida da concentração de flúor foi de 12%, como pode ser observado na tabela 6.1.

Tabela 6.1- Resumo dos resultados da concentração de flúor e respetiva incerteza absoluta obtidos nas amostras do grupo A e B em pré-tratamento.

Grupo A		Grupo B	
Amostras	Concentração de F e respetiva incerteza (µg/g)	Amostras	Concentração de F e respetiva incerteza (µg/g)
<b>A1</b>	$(12 \pm 2) \times 10^2$	<b>B3</b>	$(27 \pm 1) \times 10$
<b>A2</b>	$(18 \pm 3) \times 10^2$	<b>B4</b>	$(38 \pm 5) \times 10^2$
<b>A3</b>	$(10 \pm 1) \times 10$	<b>B6</b>	$(11 \pm 2) \times 10^2$
<b>A4</b>	$(36 \pm 5) \times 10^2$	<b>B7</b>	$(98 \pm 2) \times 10$
<b>A6</b>	$(17 \pm 3) \times 10^2$	<b>B8</b>	$(49 \pm 6) \times 10^2$
<b>A7</b>	$(10 \pm 2) \times 10^2$	<b>B9</b>	$(19 \pm 3) \times 10^2$
<b>A8</b>	$(14 \pm 2) \times 10^2$	<b>B10</b>	$(39 \pm 1) \times 10$
<b>A10</b>	$(50 \pm 1) \times 10$		

Alguns estudos realizados confirmaram a variação de flúor tendo em conta os fatores mencionados anteriormente. Salah and Arab [57] analisaram a concentração de flúor nos esmaltes dentários das populações da região Norte e Sul da Argélia considerando os seus hábitos alimentares. Verificaram altos níveis de ingestão de flúor nas populações do Sul em relação aos do Norte, com uma variação da concentração de 3700-4500  $\mu\text{g/g}$  para zonas externas dos dentes e 3090-3900  $\mu\text{g/g}$  para zonas internas. De facto, isto acontece devido ao consumo de água contendo flúor, pois o clima da região é muito quente. Além disso, o solo da região é muito rico em flúor, o que contribui para que alguns vegetais cultivados, como batatas, tomate, melancia e chá, sejam muito ricos em flúor. O chá em particular, é considerado a principal bebida da região.

Num estudo realizado por Brudevold *et al.* [91] relataram que a parte superficial do esmalte adquire maior concentração de flúor com a idade quando comparada com a zona sub-superficial. Além disso, sugeriram três fases diferentes referentes à deposição de flúor no dente durante o período de calcificação do esmalte, após a calcificação estar completa e após a erupção do dente. Nesta última, a adsorção de flúor continua durante toda a vida útil do dente, provindo da comida, água e saliva. Gedalia *et al.* [92] determinaram o teor de flúor das diferentes zonas de esmalte de terceiros molares provenientes de indivíduos habitantes de Jerusalém. A água potável desta região apresentou uma concentração de 0,5-0,6  $\mu\text{g/g}$  de flúor. Verificaram maior concentração de flúor nas camadas superficiais com raiz completamente desenvolvida relativamente ao esmalte com raiz incompleta. Não se verificaram diferenças significativas referente ao teor de flúor entre as faces vestibulares e palatinais, sendo encontrado menor teor nas faces mesiais e distais. Candeli *et al.* [93] e Li *et al.* [94] verificaram um valor médio de flúor significativamente menor para zona oclusal de esmalte de dentes permanentes quando comparada com as restantes zonas (zona oclusal -  $2055 \pm 291 \mu\text{g/g}$ , zona medial -  $3179 \pm 609 \mu\text{g/g}$  e zona cervical -  $3587 \pm 335 \mu\text{g/g}$ ). Sugere-se que a causa está relacionada com abrasão dentária nesta zona.

Sendo assim, fez-se a comparação dos resultados obtidos com os pesquisados na literatura. A concentração média de flúor registada por Retief *et al.* [95] na zona superficial (7,5  $\mu\text{m}$ ) das amostras de esmaltes de dentes caninos foi de  $1020 \pm 187 \mu\text{g/g}$ , sendo o valor mínimo de  $976 \pm 188 \mu\text{g/g}$  e máximo de  $1326 \pm 105 \mu\text{g/g}$ . Luís G. [84] registou um valor médio de  $600 \pm 2 \mu\text{g/g}$ , sendo o mínimo de  $470 \pm 7 \mu\text{g/g}$  e máximo de  $900 \pm 2 \mu\text{g/g}$ , em conjunto de amostras de controlo provenientes de dentes molares e pré-molares. Arshed *et al.* [96] verificou um valor médio de  $232 \pm 57 \mu\text{g/g}$ , sendo o mínimo de  $83 \pm 7 \mu\text{g/g}$  e máximo de  $800 \pm 252 \mu\text{g/g}$ , em conjunto de várias amostras de dentes diferentes. Zschau *et al.* [97] registaram valores entre 500-1400  $\mu\text{g/g}$  de flúor nas amostras de controlo provenientes de esmaltes de dentes pré-molares de indivíduos com idade compreendida entre 10 e 14 anos. No entanto, verificou-se que os dados obtidos no presente estudo, em algumas amostras nomeadamente A1, A3, A7, A8, A10, B3, B6, B7 e B10, estão em conformidade com os registados na literatura. Relativamente às amostras A2, A4, A6, B4, B8 e B9, registaram-se valores muito elevados ( $> 1500$

$\mu\text{g/g}$ ), estando dentro do limite da fluorose dentária [57], [98]. A fluorose está relacionada com o nível de flúor ingerida durante o desenvolvimento dentário [99]. Além disso, não foram identificadas lesões nem descolorações nessas amostras pelo que, sugere-se que o excesso de flúor pode não estar diretamente relacionada com a fluorose [57]. No entanto, não se encontrou nenhuma justificativa para tal situação.

Tendo os resultados das amostras em pré-tratamento, procedeu-se com o tratamento das amostras. Os dados e as respetivas incertezas relativas da concentração de flúor após tratamento estão representados na figura 6.3 e na tabela 6.2. As incertezas relativas foram calculadas tendo em conta, a incerteza dos resultados após o tratamento com verniz relativamente aos obtidos em pré-tratamento, e tendo em conta os resultados após o ataque ácido relativamente aos obtidos após o verniz. A incerteza absoluta de cada medida foi de 12%.

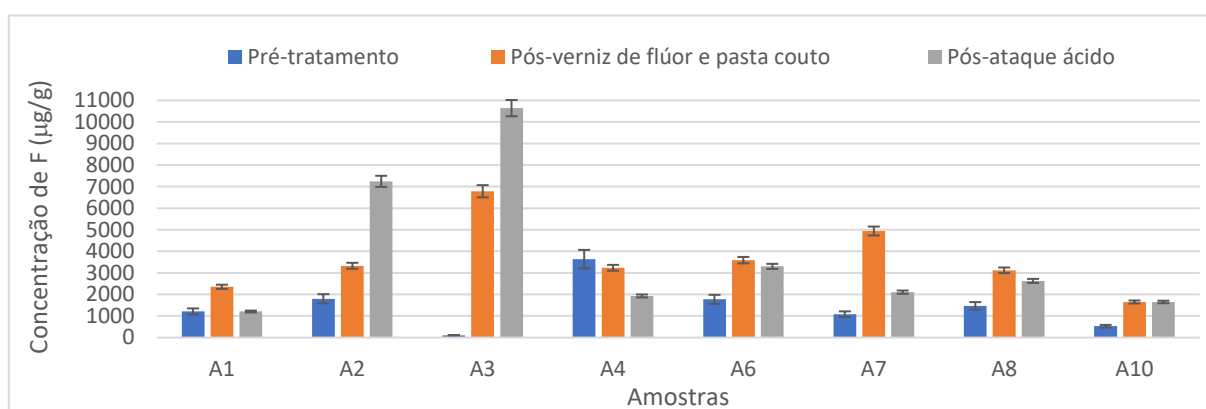


Figura 6.3- Comparação da concentração de flúor em  $\mu\text{g/g}$  entre diferentes fases do tratamento das amostras do grupo A.

Tabela 6.2- Resumo dos resultados da concentração de flúor e respetiva incerteza obtidos nas amostras do grupo A todas as fases de tratamento.

Concentração de flúor e respetiva incerteza ( $\mu\text{g/g}$ )			
Amostras	Pré-tratamento	Pós aplicação do verniz de F	Pós ataque ácido
<b>A1</b>	$(12 \pm 2) \times 10^2$	$(24 \pm 1) \times 10^2$	$(12 \pm 1) \times 10^2$
<b>A2</b>	$(18 \pm 3) \times 10^2$	$(33 \pm 2) \times 10^2$	$(72 \pm 3) \times 10^2$
<b>A3</b>	$(10 \pm 1) \times 10$	$(68 \pm 3) \times 10^2$	$(100 \pm 4) \times 10^2$
<b>A4</b>	$(36 \pm 5) \times 10^2$	$(32 \pm 2) \times 10^2$	$(19 \pm 1) \times 10^2$
<b>A6</b>	$(17 \pm 3) \times 10^2$	$(36 \pm 2) \times 10^2$	$(33 \pm 2) \times 10^2$
<b>A7</b>	$(10 \pm 2) \times 10^2$	$(49 \pm 2) \times 10^2$	$(21 \pm 1) \times 10^2$
<b>A8</b>	$(14 \pm 2) \times 10^2$	$(31 \pm 2) \times 10^2$	$(26 \pm 1) \times 10^2$
<b>A10</b>	$(50 \pm 1) \times 10$	$(17 \pm 2) \times 10^2$	$(17 \pm 1) \times 10^2$

Neste grupo verificou-se um aumento da concentração do flúor após o tratamento com verniz de flúor e lavagem com a pasta dentífrica, com exceção da amostra A4 em que, a concentração de flúor diminui. Após o ataque ácido, registou-se uma diminuição da concentração de flúor para as amostras A1, A4, A6, A7 e A8. Para a amostra A10, parece que a concentração se manteve constante enquanto que, nas amostras A2 e A3, aumentou. A concentração mínima e máxima de flúor registado foi de  $(10 \pm 1) \times 10 \mu\text{g/g}$  e  $(10 \pm 4) \times 10^3 \mu\text{g/g}$  respetivamente, ambas correspondem a amostra (A3). Na tabela 6.3 encontra-se as percentagens de flúor incorporado nas amostras após o tratamento com verniz.

Tabela 6.3- Percentagem do aumento de flúor nas amostras do grupo A após tratamento com verniz e lavagem com pasta dentífrica.

Amostras	A1	A2	A3	A6	A7	A8	A10
Aumento (%)	95	85	6553	102	355	112	214

O aumento da concentração de flúor após aplicação do verniz não se procedeu homogeneamente. Verifica-se que as amostras (A3, A7 e A10) que inicialmente registaram pouca concentração de flúor, apresentam um aumento superior na concentração de flúor, apresentando uma tendência. Esta tendência também foi verificada em outros estudos [84], [100].

No presente estudo, verificou-se que na maioria das amostras a incorporação de flúor após aplicação de verniz resultou numa diminuição da concentração após o ataque ácido. Sendo assim, a comparação destes resultados com os da literatura é fundamental. Estão no mercado diversos tipos de vernizes de flúor caracterizados pelas suas composições e concentrações em  $\mu\text{g/g}$  de flúor, os quais foram utilizados em muitos estudos odontológicos para a prevenção da erosão e cárie dentária [101], [38]. Os vernizes mais utilizados nos estudos são os da marca Fluor Protector® (8000  $\mu\text{g/g}$  de flúor) [102] e Duraphat® (22.600  $\mu\text{g/g}$  de flúor) [103],[12]. Sendo este último, com uma composição de NaF semelhante ao verniz da marca VOCO Profluorid (22.600  $\mu\text{g/g}$  de flúor) utilizado no presente estudo.

Num estudo realizado por Ögaard *et al.* [104] mediram a incorporação de flúor tanto em esmaltes saudáveis como em esmaltes desmineralizados após uma única aplicação de verniz de flúor da marca Duraphat®. O verniz foi aplicado nos dois tipos de tecidos por um período de 6 horas sem outra intervenção. Dos resultados obtidos, verificou-se um aumento significativo da concentração de flúor após aplicação do verniz em ambos os grupos sendo, mais pronunciada nos grupos desmineralizados devido à porosidade.

Zschau *et al.* [97] analisaram o efeito temporal da aplicação de dois vernizes de marcas diferentes (Duraphat® e Lawefluor®-22.600  $\mu\text{g/g}$  de flúor [105]) em amostras de esmalte de dentes pré-molares. 1 dia da aplicação dos vernizes verificaram uma incorporação do flúor no esmalte com valores de 4000 a 5000  $\mu\text{g/g}$ . Esta situação também se observou após três semanas da aplicação dos vernizes. Em

contraste, verificou-se uma diminuição de flúor após três meses pelo que se sugere que o intervalo entre aplicações de verniz seja superior a 3 meses.

Num estudo *in vitro* realizado por Lippert [101] a capacidade de vários tipos de vernizes incluindo VOCO Profluorid, em libertar flúor demonstrou ser maior perante uma solução de saliva artificial de pH=7 relativamente a uma solução de ácido cítrico de pH=2,27.

Além dos vernizes, também foi verificado o aumento da incorporação de flúor no esmalte dentário após aplicação de substâncias dentífricas contendo NaF [106].

Considerando os dados da literatura foi possível fazer uma análise comparativa dos resultados. Verificou-se que os estudos realizados sustentam a variação considerável de flúor consoante as condições do meio, havendo uma diminuição da capacidade de libertação de flúor pelos vernizes perante meios ácidos. O aumento da concentração de flúor após o ciclo erosivo nas amostras A2 e A3, pode estar relacionada com a variação da concentração de outros elementos presentes nas amostras.

As características dos diferentes tipos de vernizes que demonstraram influenciar a incorporação de flúor no esmalte estão relacionadas com a concentração de flúor e o tempo de exposição. Verificou-se maior incorporação no esmalte quando aplicado verniz com maior teor de flúor [95].

Contudo, fez-se também a análise da variação na concentração dos elementos Na e P nas diferentes fases de tratamento das amostras.

Na figura 6.4 e na tabela 6.4 encontram-se representados as concentrações de sódio e as respectivas incertezas relativas para amostras do grupo A. As incertezas relativas também foram calculadas tendo em conta, a incerteza dos resultados após o tratamento com verniz relativamente aos obtidos em pré-tratamento e tendo em conta os resultados após o ataque ácido relativamente aos obtidos após o verniz. A incerteza absoluta de cada medida foi de 11%.

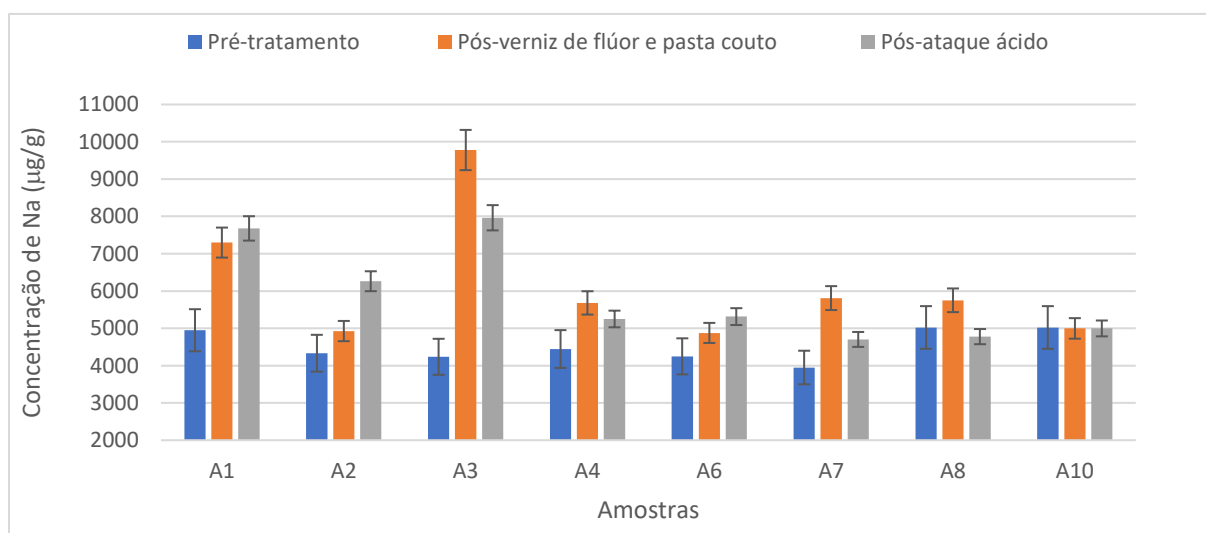


Figura 6.4-Comparação da concentração de sódio em µg/g entre diferentes fases do tratamento das amostras do grupo A.

Tabela 6.4- Resumo dos resultados da concentração de sódio e respetiva incerteza obtidos nas amostras do grupo A todas as fases de tratamento.

Concentração de sódio e respetiva incerteza ( $\mu\text{g/g}$ )			
Amostras	Pré-tratamento	Pós aplicação do verniz de F	Pós ataque ácido
A1	$(49 \pm 6) \times 10^2$	$(73 \pm 5) \times 10^2$	$(77 \pm 4) \times 10^2$
A2	$(43 \pm 5) \times 10^2$	$(49 \pm 3) \times 10^2$	$(63 \pm 3) \times 10^2$
A3	$(42 \pm 5) \times 10^2$	$(98 \pm 6) \times 10^2$	$(80 \pm 4) \times 10^2$
A4	$(44 \pm 5) \times 10^2$	$(57 \pm 4) \times 10^2$	$(53 \pm 3) \times 10^2$
A6	$(42 \pm 5) \times 10^2$	$(49 \pm 3) \times 10^2$	$(53 \pm 3) \times 10^2$
A7	$(50 \pm 6) \times 10^2$	$(58 \pm 4) \times 10^2$	$(47 \pm 2) \times 10^2$
A8	$(50 \pm 7) \times 10^2$	$(58 \pm 4) \times 10^2$	$(48 \pm 2) \times 10^2$
A10	$(50 \pm 7) \times 10^2$	$(50 \pm 3) \times 10^2$	$(50 \pm 3) \times 10^2$

Da análise dos dados verificou-se uma tendência da concentração de sódio em aumentar com a aplicação do verniz e lavagem das amostras com a pasta dentífrica, com exceção da amostra A10 em que, a concentração parece manter constante. Após o ciclo erosivo, a concentração parece diminuir nas amostras A3, A4, A7 e A8. Enquanto que, nas amostras A1, A2 e A6 parece aumentar. No entanto, para a amostra A10 a concentração manteve-se constante. O valor médio da concentração do sódio obtida em pré-tratamento, pós aplicação do verniz e pós ciclo erosivo é de  $(45 \pm 6) \times 10^2 \mu\text{g/g}$ ,  $(61 \pm 4) \times 10^2 \mu\text{g/g}$  e  $(58 \pm 3) \times 10^2 \mu\text{g/g}$ , respetivamente.

A incorporação do sódio após o tratamento com verniz de flúor e lavagem com pasta dentífrica ocorreu devido ao composto cloreto de sódio (NaF) presente no verniz. Também se pode verificar uma grande influência no facto da saliva artificial apresentar sódio na sua constituição, visto que, as amostras foram submersas nesta saliva logo após a aplicação do verniz. A saliva artificial é composta por várias substâncias que contêm sódio na sua constituição, nomeadamente NaCl,  $\text{NaHCO}_3$  e  $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ . Além disso, na fase de pré-tratamento, todas as amostras foram conservadas em solução de cloramina T3- $\text{H}_2\text{O}$  ( $\text{C}_7\text{H}_7\text{ClNNaO}_2\text{S}(3\text{H}_2\text{O})$ ), uma substância que também contém sódio na sua composição química. A incorporação do sódio no esmalte também foi verificada por Luis [84] num estudo em que se aplicou um produto estimulante gustativo de secreção salivar contendo NaF (Xeros<sup>TM</sup> [107]).

Após o ciclo erosivo, o aumento da concentração de sódio verificado nas amostras A1, A2 e A6 pode estar associado ao sódio presente na composição química do ácido cítrico (ver tabela 5.1) assim como, a possibilidade do sódio pode estar presente na saliva humana utilizada durante o ciclo erosivo.

Na figura 6.5 e na tabela 6.5 encontram-se os resultados da concentração de fósforo e as respetivas incertezas relativas obtidas nas amostras do grupo A em diferentes fases do tratamento.

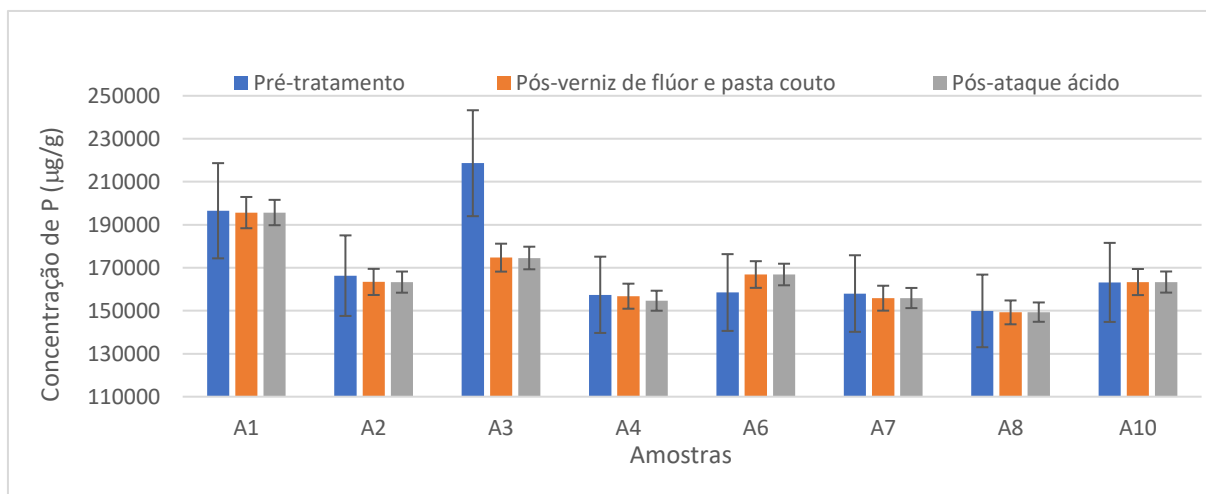


Figura 6.5- Comparação da concentração de fósforo em  $\mu\text{g/g}$  entre diferentes fases do tratamento das amostras do grupo A.

Tabela 6.5- Resumo dos resultados da concentração de fósforo e respetiva incerteza obtidos nas amostras do grupo A todas as fases de tratamento.

Concentração de fósforo e respetiva incerteza ( $\mu\text{g/g}$ )			
Amostras	Pré-tratamento	Pós aplicação do verniz de F	Pós ataque ácido
<b>A1</b>	$(19 \pm 3) \times 10^4$	$(20 \pm 7) \times 10^4$	$(20 \pm 6) \times 10^4$
<b>A2</b>	$(16 \pm 2) \times 10^4$	$(16 \pm 6) \times 10^4$	$(16 \pm 5) \times 10^4$
<b>A3</b>	$(22 \pm 3) \times 10^4$	$(17 \pm 7) \times 10^4$	$(17 \pm 6) \times 10^4$
<b>A4</b>	$(16 \pm 2) \times 10^4$	$(16 \pm 6) \times 10^4$	$(15 \pm 5) \times 10^4$
<b>A6</b>	$(16 \pm 2) \times 10^4$	$(17 \pm 7) \times 10^4$	$(17 \pm 6) \times 10^4$
<b>A7</b>	$(15 \pm 2) \times 10^4$	$(16 \pm 6) \times 10^4$	$(16 \pm 5) \times 10^4$
<b>A8</b>	$(16 \pm 2) \times 10^4$	$(15 \pm 6) \times 10^4$	$(15 \pm 5) \times 10^4$
<b>A10</b>	$(17 \pm 2) \times 10^4$	$(16 \pm 6) \times 10^4$	$(16 \pm 5) \times 10^4$

De acordo com os dados da figura 6.5, verifica-se uma tendência da concentração de fósforo em se manter inalterada tanto após a aplicação do verniz e lavagem das amostras com a pasta dentífrica como após o ciclo erosivo, com exceção das amostras A2, A3, A6 e A7. Para as amostras A2, A3 e A7 parece haver uma diminuição da concentração do fósforo após o tratamento com verniz enquanto que, na amostra A6, se verificou o inverso. O valor da média aritmética obtida em pré-tratamento, pós aplicação do verniz e pós ciclo erosivo são de  $(17 \pm 2) \times 10^4 \mu\text{g/g}$ ,  $(16 \pm 6) \times 10^4 \mu\text{g/g}$  e  $(16 \pm 5) \times 10^4 \mu\text{g/g}$ , respetivamente.

Na amostra A3, antes do tratamento, registou-se uma concentração elevada do fósforo enquanto que as concentrações de flúor e sódio eram baixas, mas após o tratamento registou-se o inverso. No entanto, sugere-se que nesta amostra, a variação na incorporação desses elementos parece ter uma dependência um do outro.

Tendo em conta que ocorreu incorporação do flúor no esmalte pela aplicação do verniz e que após o ciclo erosivo houve uma diminuição do mesmo, rejeita-se as seguintes hipóteses nulas: a concentração de flúor não é influenciada pelo verniz e a concentração de flúor não é influenciada pelo ataque ácido. Contudo, verificou-se uma variação considerável de flúor no esmalte ao longo das diferentes fases do tratamento das amostras.

## 6.2 Resultados do estudo de EDXRF

As concentrações mássicas foram obtidas antes e após o tratamento para os principais elementos da matriz hidroxiapatite, Ca e P.

- **Grupo A**

Nas figuras 6.6 e 6.7 encontram-se os resultados das concentrações elementares do Ca e P, respetivamente, das amostras do grupo A. A incerteza é calculada com base no desvio padrão. Além disso, também se encontram representados os resultados da análise estatística feita pelo teste t-student pareado para p-value menor ou igual a 0,05.

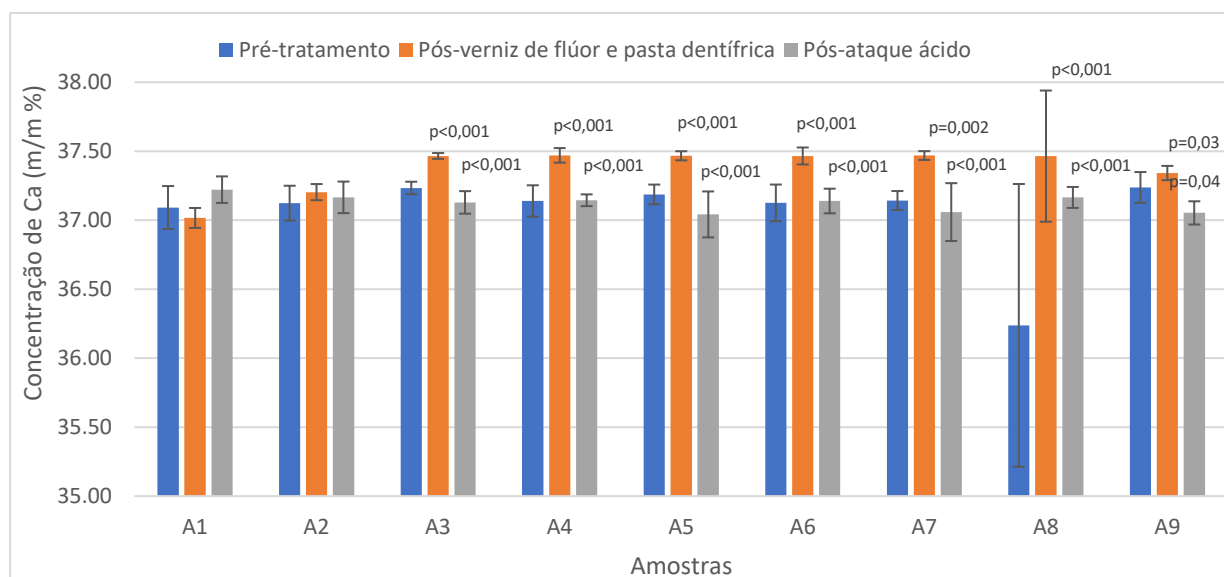


Figura 6.6- Comparação da concentração elementar do Ca em diferentes fases do tratamento das amostras do grupo A.

Analisando os dados representados no gráfico 6.6, verifica-se que em geral, a concentração elementar do Ca parece ter uma tendência em aumentar após a aplicação do verniz de flúor e lavagem com a pasta

dentífrica e diminuir após o ataque ácido. Nas amostras A1, A2 e A9, devido as barras de incertezas se intersetaram não se pode confirmar esta tendência. Entretanto, pela análise do teste t-student verifica-se que as médias não são estatisticamente significativas pelo que, pode se afirmar que não houve variação da concentração após o tratamento com verniz e pasta dentífrica. Para a análise após o ataque ácido, as amostras A1 e A2 foram as únicas nos quais, as médias não são estatisticamente significativas. No entanto, estas duas amostras não sofreram modificações significativas referente ao elemento Ca em nenhuma fase do tratamento. O valor médio da concentração elementar do Ca para este grupo foi de  $37,1 \pm 0,2$  antes do tratamento,  $37,4 \pm 0,2$  após o tratamento com o verniz de flúor e a lavagem com a pasta de dente e  $37,1 \pm 0,1$  após o ataque ácido. De modo geral, comparando estes resultados, constata-se que ocorreu um aumento do elemento Ca ao aplicar o verniz e lavar as amostras com pasta dentífrica e ocorreu uma diminuição da mesma após o ataque ácido.

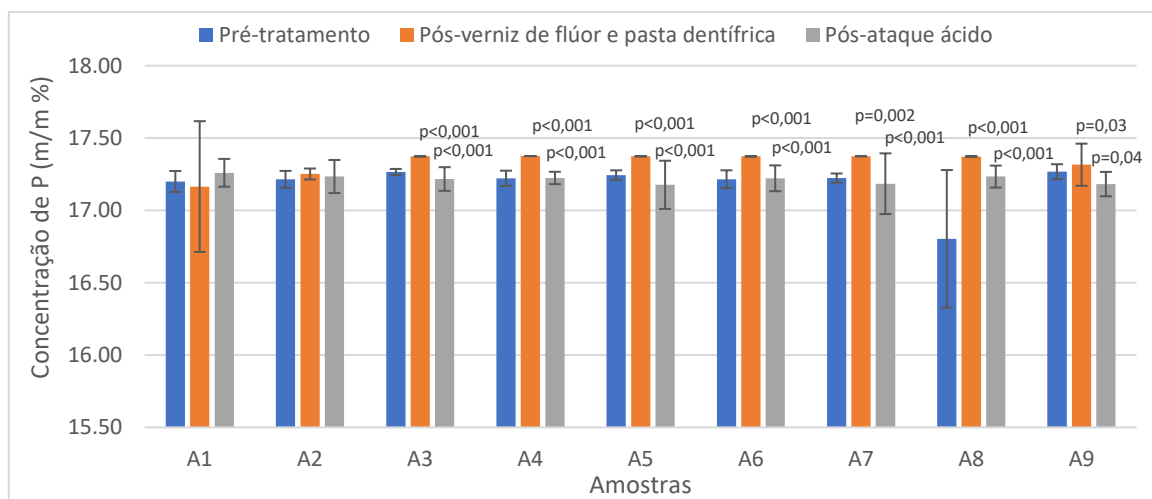


Figura 6.7- Comparação da concentração elementar do P em diferentes fases do tratamento das amostras do grupo A.

A quantificação do elemento P foi determinado através do elemento Ca tendo em conta a estequiometria da hidroxiapatite. Por isso, a sua variação segue a mesma tendência que a do Ca, em aumentar após o tratamento com verniz e diminuir após o ciclo erosivo.

De modo a verificar se houve perda do conteúdo mineral devido ao ciclo erosivo aplicado nas amostras do grupo A, fez-se a comparação das diferenças entre as médias da concentração do Ca e P entre as fases de pré-tratamento e pós-ataque ácido. No entanto, verificou-se que as únicas amostras nas quais registaram uma perda mineral para além do conteúdo ganho após aplicação do verniz de flúor foram A3 e A9. As restantes amostras só perderam o conteúdo mineral adquirido após aplicação do verniz de flúor.

- **Grupo B**

Nas figuras 6.8 e 6.9 encontram-se os resultados das concentrações elementares do Ca e P, respetivamente, das amostras do grupo B. A incerteza é calculada com base no desvio padrão. Além disso, também se encontram representados os resultados da análise estatística feita pelo teste t-student pareado para p-value menor ou igual a 0,05.

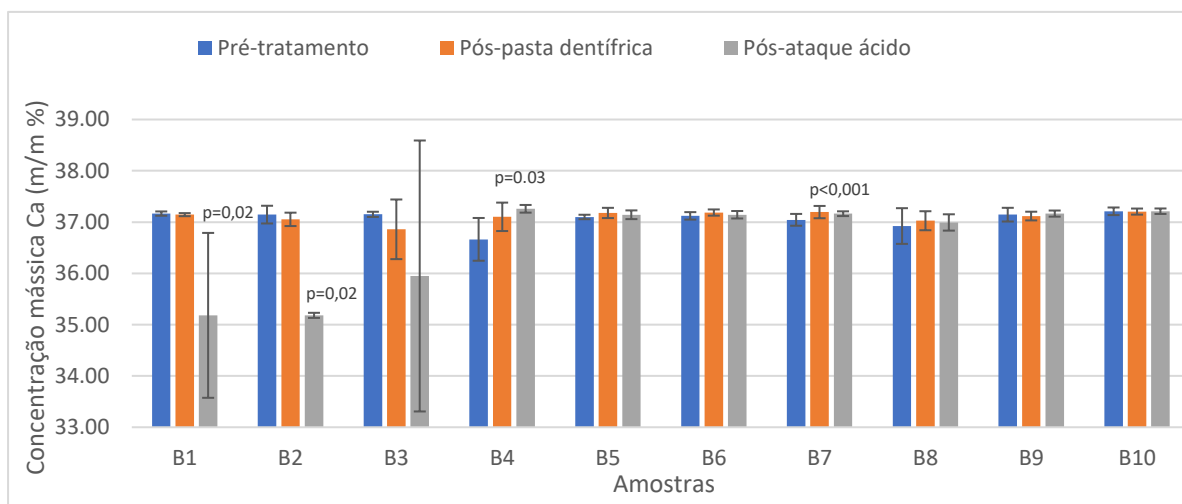


Figura 6.8- Comparação da concentração elementar do Ca em diferentes fases do tratamento das amostras do grupo B.

Neste grupo, parece que a concentração elementar do Ca tende a se manter constante tanto após a lavagem das amostras com pasta coutho como após a aplicação do ataque ácido, com exceção das amostras B1 e B2, em que a concentração tende a diminuir após o ataque ácido, pois as barras de incertezas não se intersestaram. Relativamente às amostras B1 e B2, pela análise estatística obtido pelo t-student, confirma-se que as variações das médias são estatisticamente significativas pelo que, ocorreu uma diminuição da concentração do elemento Ca após o ataque ácido. Para as amostras B4 e B7, houve um aumento estatisticamente significativa da concentração após a lavagem das amostras com a pasta dentífrica. Para as amostras em que, não se verificaram alterações estatisticamente significativas da concentração de Ca, obtiveram um valor de p-value superior a 0,05. O valor médio da concentração elementar do Ca para este grupo foi de  $37,1 \pm 0,2$  antes do tratamento,  $37,1 \pm 0,2$  após o tratamento com o verniz de flúor e a lavagem com a pasta coutho e  $36,6 \pm 0,5$  após o ataque ácido.

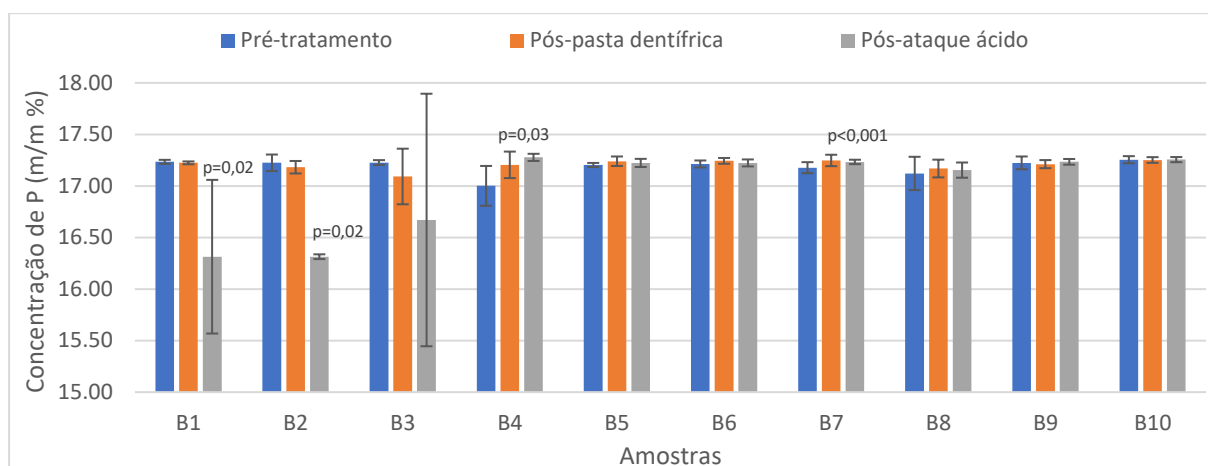


Figura 6.9- Comparação da concentração elementar do P em diferentes fases do tratamento das amostras do grupo B.

Neste grupo como era esperado, o comportamento do P foi igual ao do Ca. A impossibilidade de determinar o P de modo independente do Ca é uma desvantagem do método quantitativo utilizado.

Fez-se também a análise relativamente a perda do conteúdo mineral após o ataque ácido aplicado. Nos resultados obtido das diferenças nas médias da concentração do Ca e P entre as fases de pré-tratamento e pós-ataque ácido, verificou que as amostras B1 e B2 sofreram uma perda do conteúdo mineral relativamente ao registado na fase de pré-tratamento. As restantes amostras não registaram perda no conteúdo mineral perante o ataque ácido.

Como pode ser visto nos gráficos apresentados anteriormente, os valores iniciais das concentrações do Ca e P entre as amostras, tanto no grupo A como no B apresentaram valores diferentes, principalmente nas amostras A8 e B4. De facto, isto pode acontecer por amostras serem provenientes de dentes diferentes, sendo influenciada por diversos fatores como: variabilidade biológica intrínseca, idade, género e hábito alimentar. Vários estudos confirmaram a influência desses fatores. Num estudo realizado por Fisher *et al.* [108] verificaram diferenças na composição elementar entre os dentes decíduos e permanentes, obtendo concentrações dos elementos do tecido duro do esmalte nomeadamente Ca, Na e Mg muito superior nos dentes decíduos. Quanto à localização na cavidade oral, verificaram que os dentes da mandíbula, tanto os decíduos como os permanentes apresentaram maior concentrações de Ca, Mg e Na quando comparadas com os da maxila. Por outro lado, Arnold and Gaengler [109] relataram que o teor dos elementos Ca e P eram superior no esmalte do dente permanente em relação ao esmalte que ainda estava na fase de desenvolvimento.

Tendo em conta que os diferentes tipos de dentes, caninos, incisivos, molares e pré-molares apresentam um cronograma diferente de desenvolvimento, é de esperar que os conteúdos minerais do esmalte nesses dentes variam com a idade. Nos terceiros molares, a idade da calcificação inicial, da formação completa da coroa e parte radicular é bem determinada [110]. Além disso, possui um tamanho maior em relação aos outros tipos de dentes, o que é bastante apropriado na análise com a técnica PIGE.

Na utilização dos dentes decíduos como indicadores ambientais, alguns autores sugeriram restringir aos terceiros molares.

Nas amostras do grupo A, verifica-se que na maioria das amostras, as concentrações do Ca e P aumentaram com a aplicação do verniz e lavagem com a pasta coutho. No entanto, como a pasta coutho (figura 6.10) tem na sua composição elementos que também se encontram presente na matriz hidroxiapatite, nomeadamente Ca e P, é sugestivo que o aumento verificado nas amostras tenha influência da lavagem com a pasta. De modo a esclarecer se teve o efeito da pasta coutho, foram comparados os resultados do grupo A e B, visto que, no grupo B não foi tratado com verniz de flúor. Como as amostras B4 e B7, foram as únicas do grupo B que apresentaram um aumento da concentração do Ca e P após lavagem com a pasta, é sugestivo que o aumento obtido nas amostras do grupo A não teve a influência da pasta dentífrica coutho.

A técnica EDXRF fornece informações quantitativa dos conteúdos elementares do esmalte dentário, permitindo obter informações acerca da interação química do verniz de flúor com as amostras do esmalte. O verniz de flúor ao ser aplicado no esmalte pode formar o composto  $\text{CaF}_2$  que é depositado na superfície do esmalte. Este composto, pode transformar em fluorapatite que fornece um efeito protetor ao esmalte quando sujeito a um ataque ácido.

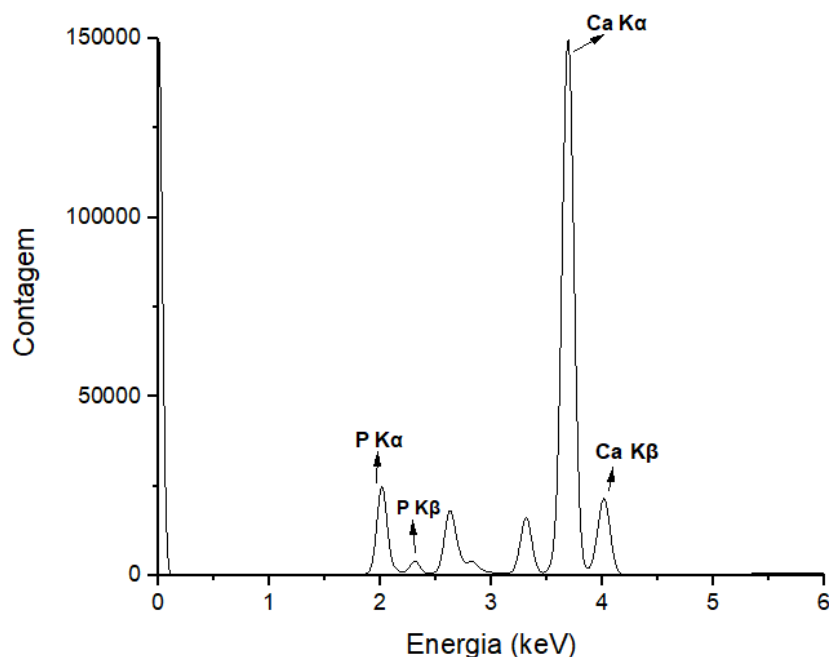


Figura 6.10- Espectro EDXRF obtida da pasta dentífrica coutho.

Carvalho Filho *et al.* [76] aplicaram gel e vernizes de flúor (Duraphat® e Duofluorid®) durante 4 minutos e 6 horas, respetivamente, em amostras de esmaltes bovinas. Em seguida, submeteram as amostras a um ataque ácido de 10 minutos e no final as amostras foram imersas em saliva artificial durante 1 hora. No entanto, verificaram através da técnica EDXRF que o teor de Ca e P nas amostras tratadas com vernizes não sofreu alteração após o ataque ácido. Por outro lado, verificaram um efeito

protetor superior no tratamento com gel em relação ao verniz Duofluorid<sup>®</sup>. Sugeriram que esta situação, acontece devido a influência do etanol na ligação química entre o Ca presente no CaF<sub>2</sub> do verniz e do Ca da hidroxiapatite do esmalte.

A aplicação do verniz de flúor no presente estudo parece ter apenas um efeito protetor mínimo perante o ataque ácido, visto que, num total de 9 amostras, 7 apresentaram uma perda do conteúdo mineral ganho após a aplicação do verniz e 2 amostras registaram perda do conteúdo mineral para além daquele que ganharam após aplicação do verniz de flúor. O ganho mineral de Ca e P verificado na maioria das amostras após o tratamento com verniz foi de 1%. Entretanto, parece que a formação de CaF<sub>2</sub> e/ou fluorapatite não foi o suficiente para inibir por completo o efeito do ácido cítrico no esmalte. Segundo Nelson et al. [111] o composto CaF<sub>2</sub> depositado na superfície do esmalte pode ser perdido consoante o tipo de verniz e as condições orais. Sugeriram também que o efeito protetor dos agentes tópicos de flúor pode estar relacionado com as alterações morfológica provocadas na superfície do esmalte. No entanto, como após a aplicação do verniz as amostras foram lavadas com pasta por uma escova, sugere-se que o efeito abrasivo da escova pode influenciar. Um outro fator além da concentração do flúor no verniz que eventualmente influencia na formação da fluorapatite é a temperatura que atua fortemente no processo químico responsável pela formação da fluorapatite [112].

Uma das características da erosão dentária é a dissolução dos iões Ca<sup>2+</sup> e PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>, o que contribui para a diminuição da concentração elementar do Ca e P no esmalte dentário [13]. No entanto, de acordo com a análise dos resultados obtidos das concentrações do Ca e P nas amostras do grupo B, pode-se dizer que o ataque ácido não originou erosão que resultasse numa diminuição significativa, com exceção das amostras B4 e B7 pois, pela análise do teste t-student apresentaram uma diminuição significativa nas concentrações dos elementos Ca e P. No entanto, foi verificado uma perda significativa do conteúdo mineral obtido em pré-tratamento nas amostras B1 e B2 após o ataque ácido. Sugere-se por um lado, que a profundidade do volume medido por XRF e a superficialidade da erosão podem dificultar a interpretação dos resultados. Por outro lado, sugere-se que pode ser o efeito protetor da saliva humana no qual, as amostras foram submersas durante o ciclo erosivo. Para além dos agentes tópicos de flúor, a saliva é um outro parâmetro muito importante no combate ao desgaste erosivo, sendo considerada o agente biológico mais importante na proteção dentária. As diversas funções protetoras desempenhadas pela saliva, sua capacidade de tamponamento, de diluição ácida e de fornecer os principais elementos (Ca, P e F) para a remineralização dos cristais da hidroxiapatite, oferece mais resistência ao esmalte perante uma solução ácida de modo que, anula o processo da desmineralização. Além disso, a saliva tem a capacidade de formar uma película protetora que contém proteínas salivares e lípidos específicos que ligam à superfície do esmalte impedido que ocorra um ataque ácido direto na superfície [113], [19].

Sendo assim, a saliva tem sido aplicada em muitos estudos referentes ao tratamento dentário, principalmente a saliva artificial. No entanto, é de salientar que a saliva artificial apresenta uma carência de proteínas em relação à saliva humana, o que pode dificultar na formação da película protetora [113]. Neste estudo, durante o ciclo erosivo aplicado, todas as amostras foram expostas à saliva humana por

2h antes de cada aplicação ácida. Este tempo de exposição está de acordo com o relato feito por Alencar *et al.* [114], num estudo realizado sobre o efeito de diferentes tempos de exposição salivar na remineralização de esmaltes afetados pela erosão. Foi verificado que a exposição em saliva por 2h, parece adequado para o fortalecimento das superfícies afetadas durante a exposição ácida.

Featherstone *et al.* [115] analisaram o efeito da saliva utilizada na fase de pré-tratamento dos esmaltes de dentes molares e pré-molares expostos ao ataque ácido. Além disso, a análise também foi feita considerando o efeito dos diferentes componentes salivares separadamente (proteínas e minerais). Verificaram que o pré-tratamento feito com os diferentes componentes salivares separadamente não apresentaram diferenças estatisticamente significativa, fornecendo uma proteção mínima ao esmalte. Em relação à análise da saliva considerando todos os componentes, foi verificada que a película protetora atuou positivamente na prevenção da desmineralização do esmalte.

Tendo em conta que tanto as amostras do grupo A como as do grupo B foram submersas em saliva humana durante o ciclo erosivo, era de esperar um efeito protetor da saliva também nas amostras do grupo A, o que não pode ser avaliado individualmente. Wang *et al.* [116] avaliaram o efeito de pré-tratamento com saliva e saliva + agentes de flúor (NaF), em esmaltes expostos à solução de ácido cítrico de pH= 2,23 durante 1 minuto. Os resultados obtidos verificaram que a saliva natural apresenta maior capacidade para formar a película protetora na superfície do esmalte. Também foi verificado que a adição do agente de flúor parece mostrar uma pequena contribuição à capacidade da saliva artificial. Num estudo feito por Wang *et al.* [117] não se registou o efeito protetor da solução contendo flúor (NaF) aplicado nas amostras de esmalte por 60 horas antes da exposição à solução de ácido cítrico. Sendo verificada que uma única aplicação de solução contendo flúor não foi capaz de proteger a estrutura do esmalte contra a erosão ácida. No entanto, foi verificado a mistura de soluções de flúor com soluções ácidas apresenta um efeito protetor devido a influência do pH ligeiramente ácido em aumentar o depósito de CaF<sub>2</sub> na superfície do esmalte.

O ácido cítrico tem sido utilizado em muitos estudos, pois é o principal ácido em muitas bebidas e sumos de frutas, tendo concentrações típicas de 15-45 mmol/L. Fatores como valor do pH e tempo de exposição são essenciais na análise da desmineralização do esmalte quando exposto a soluções ácidas [11].

Cândido *et al.* [13] aplicaram um ciclo erosivo em modelo *in vitro* no esmalte humano, utilizando coca-cola (pH = 2,43 ± 0,02). As amostras foram expostas ao ácido durante 1 minuto e em seguida submersas em saliva por 5 minutos. Este processo foi repetido 3 vezes ao dia num total de 10 dias. No entanto, verificaram uma diminuição significativa nas concentrações elementares do Ca e P após o ciclo erosivo, resultante do amolecimento de conteúdo mineral na superfície do esmalte pela dissolução ácida.

Soares *et al.* [74] analisaram as alterações morfológicas e estruturais do esmalte de dentes bovinas tratadas com vernizes de flúor por um período de 6 horas e seguidamente expostos a um ciclo erosivo, utilizando refrigerantes de pH baixo (3,8). Neste caso, além da análise feita por EDXRF também se fez avaliação quanto à rugosidade. Dos resultados obtidos, verificaram maior rugosidade após o ciclo

erosivo em esmaltes não tratados com verniz pois, a aplicação do verniz condicionou à formação de  $\text{CaF}_2$  levando ao aumento das concentrações de Ca e P nas amostras tratadas. No entanto, sugere-se que perante exposições frequentes de ácidos, o efeito protetor resultante de uma única aplicação de verniz pode não ser suficiente para evitar a erosão. Também Carvalho Filho *et al.* [76] avaliaram as alterações registadas na superfície do esmalte de dentes bovinas tratadas com vernizes perante um ciclo erosivo. Verificaram maior perda do conteúdo mineral perante ação ácida em esmaltes não tratadas com o verniz.

Assim, a comparação dos resultados obtidos no presente estudo com os achados da literatura é fundamental. No presente estudo a análise da rugosidade não se realizou, mas não deixa de ser uma mais valia em estudos futuros. Relativamente à redução dos principais elementos do esmalte verificado após o ciclo erosivo, está de acordo com os achados em estudos anteriores.

Contudo, pode se rejeitar as hipóteses nulas definidas para as amostras do grupo A e B, apesar do efeito protetor do flúor verificado pela análise por EDXRF ser mínima. Para as amostras do grupo B, mesmo sem proteção do flúor, o efeito da saliva humana foi capaz de evitar perdas significativas do conteúdo mineral na maioria das amostras.

### 6.3 Resultados do estudo de Raman

- **Grupo A**

Na figura 6.11 encontra-se representado os resultados bem como as respetivas incertezas da razão de despolarização das amostras antes e após o tratamento com pasta coute e verniz de flúor e a aplicação de uma substância ácida. Estes resultados correspondem à média aritmética das medições efetuadas em cada ponto da amostra e a incerteza é calculada com base no desvio padrão e na incerteza associada a cada medida. Além disso, também se encontram representados os resultados da análise estatística feita pelo método t-student pareado para p-value menor ou igual a 0,05.

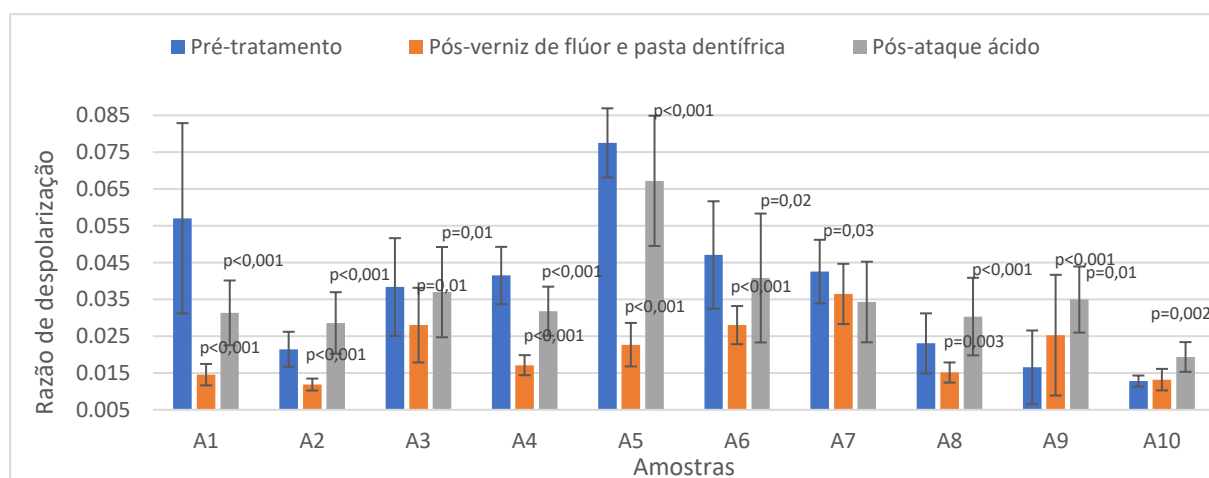


Figura 6.11- Resultados da razão de despolarização das amostras do grupo A em pré e pós tratamento.

Analisando os resultados antes e após o tratamento com verniz e pasta dentífrica, verifica-se que, neste grupo, parece haver uma tendência para a diminuição do valor da razão de despolarização após o tratamento. Nas amostras A1, A2, A3, A4, A5, A6, A7 e A8, esta tendência torna-se bastante evidente visto que, pela análise do teste t-student as diferenças entre as médias são estatisticamente significativas. Já para a amostra A9, o aumento do valor da despolarização ocorreu de forma muito significativa. Para a amostra A10, para além das barras de incerteza se intersetaram as diferenças entre as médias não são estatisticamente significativas, apresentando o valor de p-value de 0,3.

De modo a verificar se houve algum efeito do verniz de flúor na proteção do esmalte após sofrer um ataque ácido, fez-se a comparação do valor da razão de despolarização das amostras após tratamento com verniz de flúor e pasta dentífrica e após a aplicação do ataque ácido. É sugestivo que, o valor da razão de despolarização tende a aumentar após a aplicação do ataque ácido. Esta tendência é bastante evidente nas amostras A1, A2, A3, A4, A5, A6, A8 e A9 e A10 pois, pela análise do teste t-student as diferenças entre as médias são estatisticamente significativas. O único caso de exceção se verifica para a amostra A7 em que, para além das barras de incerteza se intersetaram as diferenças entre as médias não são estatisticamente significativas, apresentando o valor de p-value de 0,4. O valor médio da razão de despolarização para este grupo foi de  $0,04 \pm 0,01$  antes do tratamento e  $0,02 \pm 0,01$  após o tratamento com o verniz de flúor e a lavagem com a pasta dentífrica e  $0,04 \pm 0,01$  após o ataque ácido.

De modo geral, comparando estes dois valores, constata-se que ocorreu a remineralização com a aplicação do verniz de flúor e uma desmineralização do esmalte das amostras ao entrarem em contato com substância ácida. No entanto, sugere-se que o efeito protetor do verniz de flúor não foi suficiente para evitar a erosão ácida, tendo verificado uma proteção somente na amostra A7.

- **Grupo B**

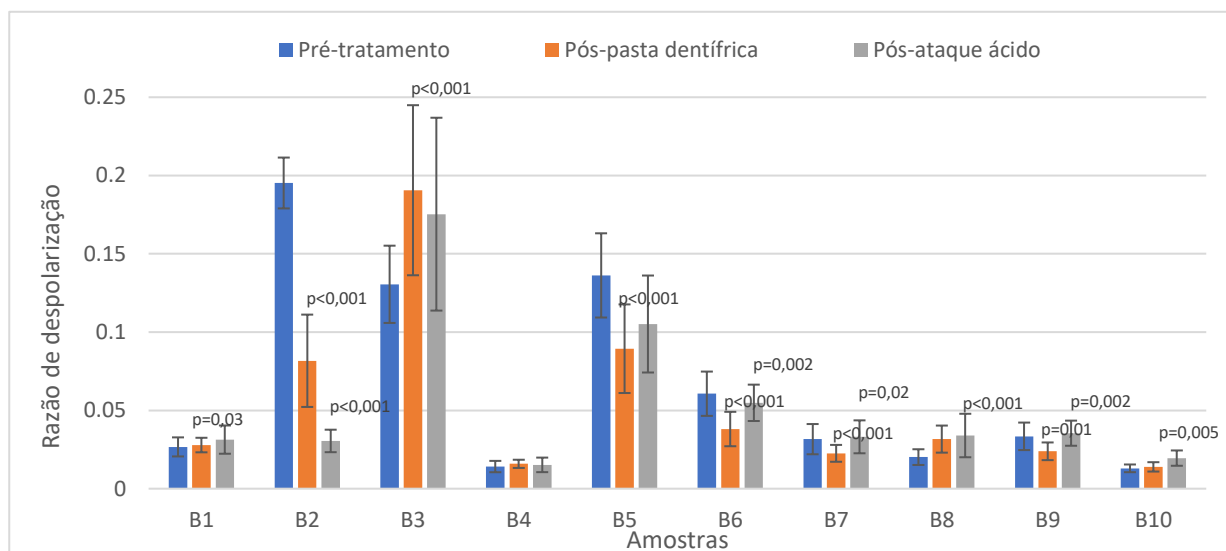


Figura 6.12- Resultados da razão de despolarização das amostras do grupo B em pré e pós tratamento.

Neste grupo, o valor da razão de despolarização após a lavagem das amostras com a pasta dentífrica, tende a se diminuir. Nas amostras B1, B2, B5, B6, B7 e B9 esta tendência é significativa, pois a diferença entre as médias registadas pelo teste t-student é estatisticamente significativa. Já para as amostras B3 e B8, o aumento da razão de despolarização após o tratamento foi muito significativo. Para as restantes amostras, não se registou diferenças significativas no valor da razão de despolarização (p-value superior a 0,05).

Comparando o valor da razão de despolarização após a lavagem das amostras com a pasta dentífrica e após a aplicação do ataque ácido, parece que o valor da razão de despolarização tende a aumentar nas amostras B6, B7, B9 e B10, e parece diminuir nas amostras B2. Para as restantes amostras (B1, B3, B4, B5 e B8), além das barras de incertezas se intersectaram o valor de p-value obtido é superior a 0,05. Entretanto, para estas amostras não se verificou alterações significativas no valor da razão de despolarização. O valor médio da razão de despolarização neste grupo foi de  $0,07 \pm 0,01$  antes do tratamento,  $0,05 \pm 0,02$  após a lavagem com pasta e  $0,05 \pm 0,02$  após a aplicação ácida.

De modo geral, é sugestivo que o ataque ácido não provocou a desmineralização do esmalte das amostras deste grupo pois, parece que o efeito protetor da saliva inibiu a desmineralização em algumas amostras.

Como referido no capítulo 5, a razão de despolarização fornece informações bastante úteis sobre o estado do esmalte. Nas amostras do grupo A, a razão de despolarização tende a diminuir após a aplicação do verniz e lavagem com pasta de dente, podendo afirmar que a aplicação do verniz permitiu a incorporação do flúor no esmalte contribuindo deste modo para a remineralização do esmalte.

Na figura 6.13 encontra-se representada a comparação dos espectros obtidos com uma polarização paralela para a amostra A3 antes do tratamento e após o tratamento, já com a correção de fundo. Pode-se verificar que picos de intensidade da banda Raman a  $959 \text{ cm}^{-1}$  aumenta quando se aplica o verniz de flúor no esmalte e diminui após o ataque ácido. Esta variação ocorre devido a alteração da morfologia do esmalte provocado pela desmineralização quando este, entra em contacto com substâncias ácidas alterando deste modo, a orientação dos seus cristais. No entanto, outro fenómeno resultante da desmineralização do esmalte é o aumento do sinal de fundo no espectro devido ao processo de fluorescência [118], representado na figura 6.14. Este processo é caracterizado pelo aumento do conteúdo orgânico no esmalte nomeadamente elementos leves como carbono e hidrogénio.

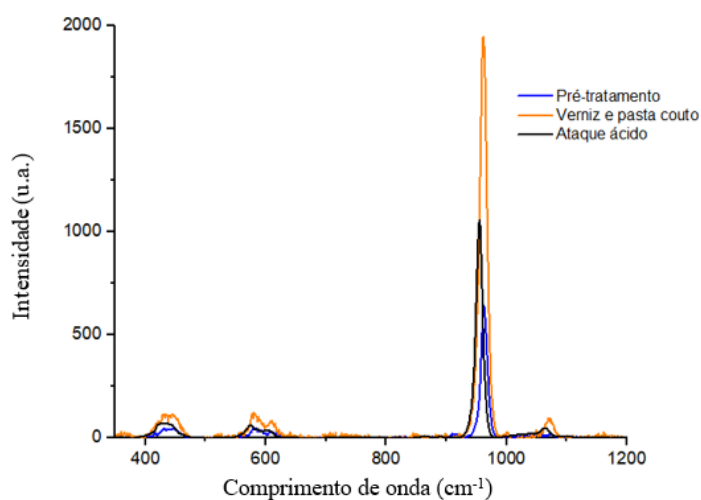


Figura 6.13- Comparação dos espectros obtidos com a amostra A3 com o polarizador paralelo antes do tratamento e após o tratamento.

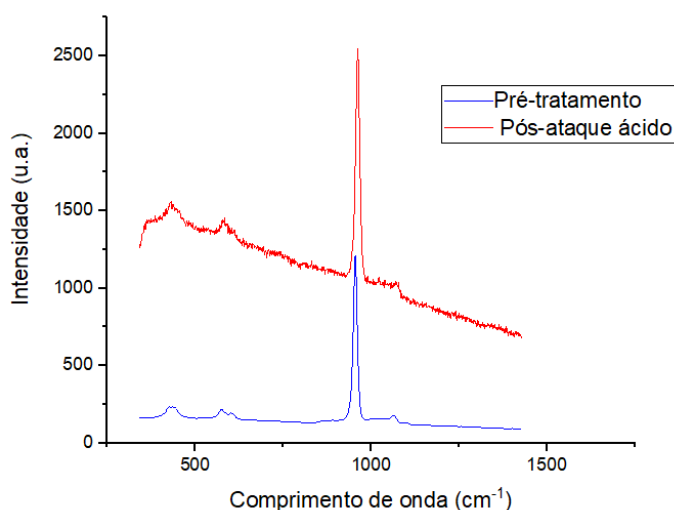


Figura 6.14- Comparação dos espectros obtidos para amostra A5 antes do tratamento e após o ataque ácido. Nota-se claramente o aumento do sinal de fundo.

Nesta técnica, também é de notar que os valores da razão de despolarização antes do tratamento são diferentes entre as amostras, isto pode ser devido as amostras serem oriundas de diferentes tipos de dentes. Estudos anteriores registram valores da razão de despolarização entre 0,02 a 0,08 em amostras antes de qualquer tipo de tratamento [84], [90].

A espectroscopia Raman foi utilizada neste estudo por ser uma técnica muito sensível às alterações superficiais das amostras permitindo averiguar se a aplicação do verniz de flúor evita a desmineralização do esmalte quando sujeito ao protocolo do ciclo erosivo. Este efeito é verificado através dos valores da

razão de despolarização que indica uma remineralização do esmalte quando os valores diminuem e desmineralização quando aumentam.

Candido *et al.* [13] avaliaram *in vitro* a desmineralização induzida pelo refrigerante coca-cola ( $\text{pH} = 2,43 \pm 0,02$ ) em esmalte humano. Verificaram um aumento dos valores da razão de despolarização resultante da perda do mineral na superfície do esmalte após o ataque ácido provocado pelo refrigerante. Braga *et al.* [119], analisaram a morfologia e o conteúdo mineral de esmalte de terceiros molares humanos sujeitos ao ciclo erosivo de suco gástrico ( $\text{pH}=1,6$ ) e sumo de laranja ( $\text{pH}=3,7$ ). As amostras de esmalte foram submetidas ao ataque ácido durante 5 minutos e em seguida submersas em saliva durante 3 horas. Este processo foi repetido 4 vezes por dia, num total de 14 dias. Os resultados obtidos da análise pela espectroscopia Raman não registou diferenças significativas nas amostras após o ciclo erosivo tanto pelo suco gástrico como sumo de laranja. No entanto, verificaram alterações na morfologia superficial do esmalte provocadas pelo ataque ácido, considerando as análises por Microscopia Eletrónica de Varrimento (MEV).

González-Solís *et al.* [120] avaliaram *in vitro*, a fluorose dentária pela técnica de espectroscopia Raman, em amostras de dentes humanos. Pelo espectro de Raman identificaram o pico associada ao composto  $\text{CaF}_2$  a um comprimento de onda de  $322 \text{ cm}^{-1}$ . Verificaram também, uma diminuição da intensidade da banda em  $960 \text{ cm}^{-1}$  referente ao modo de vibração de  $\text{PO}_4^{3-}$  quando a amostra apresentava maior registo de fluorose. Sugere-se que a análise quantitativa da fluorose pode ser feita recorrendo a espectroscopia Raman. No presente estudo apesar dos valores de flúor incorporado nalgumas amostras estarem dentro dos limites de fluorose, não se verificou pico associado ao composto  $\text{CaF}_2$  no espectro de Raman nessas amostras.

Chen *et al.* [121] partiram do pressuposto que a estrutura química da fluorapatite tem influência predominante na sua resistência ao ataque ácido. No entanto, utilizaram a técnica da espectroscopia Raman na avaliação do efeito da substituição de flúor na estrutura da hidroxiapatite. Nos espectros de Raman obtidos, verificaram um aumento da intensidade do pico associado ao ião fosfato em todas as amostras de apatite que continham flúor. Além disso, verificaram um aumento da largura a meia altura associado ao pico do ião fosfato, o que significa um aumento dos cristais da hidroxiapatite. Mei *et al.* [122] avaliaram o efeito de flúor presente em fluoreto de diamina de prata (SDF) nas estruturas minerais em amostras de apatite. A análise também foi feita pela técnica de espectroscopia Raman. Assim como noutros estudos, os espectros de Raman registaram um aumento na intensidade do pico associado ao ião fosfato. Verificaram aumento nos tamanhos de cristais de modo proporcional ao aumento do composto SDF nas amostras.

De modo geral, a diminuição da razão de despolarização verificada no presente estudo por aumento da intensidade do pico associado ao ião fosfato, vai de encontro aos achados em estudos anteriores. Esta verificação foi feita tanto nas amostras do grupo A como nas do grupo B, pois o efeito da saliva também proporciona a remineralização devido a presença de fósforo e cálcio na sua composição. No entanto, este efeito mostrou ser predominante no grupo B relativamente ao grupo A.

Assim, rejeita-se as hipóteses nulas:

- **Grupo A**

Hipótese nula ( $H_0$ ): a mineralização do esmalte não é influenciada pelo verniz de flúor e pasta dentífrica.

Hipótese nula ( $H_0$ ): a desmineralização do esmalte dentário não é influenciada pelo ataque ácido.

- **Grupo B**

Hipótese nula ( $H_0$ ): a mineralização do esmalte não é influenciada pela pasta dentífrica.

Hipótese nula ( $H_0$ ): a desmineralização do esmalte dentário não é influenciada pelo ataque ácido.



## 7 Conclusões e Perspetivas Futuras

### 7.1 Conclusões

Com o presente estudo, concluiu-se que a utilização do verniz tópico de flúor, VOCO Profluorid, permitiu a incorporação do flúor ao longo da superfície do esmalte, medida pela técnica PIGE. A incorporação do flúor procedeu-se de forma não uniforme entre as amostras. A remineralização do esmalte condicionado pela adição de flúor foi bem legível nos espectros de Raman, indicando um aumento na intensidade do pico associado ao ião fosfato.

A influência da pasta dentífrica sem flúor utilizada na remoção do conteúdo de verniz nas superfícies das amostras não se verificou pela análise EDXRF, mas houve uma diminuição da razão de despolarização em algumas amostras do grupo B após a lavagem com a pasta, medida pela espectroscopia de Raman.

A aplicação do ciclo erosivo mostrou em ambas as técnicas que o ácido cítrico contribui para a perda mineral e promove alterações morfológicas na superfície do esmalte. Nas amostras do grupo A, o efeito erosivo verificado ultrapassou a capacidade protectora tanto do verniz de flúor como da saliva humana aplicada nestas amostras. No entanto, o efeito protetor do flúor presente no verniz não foi predominante como esperado. Já, para amostras do grupo B a saliva mostrou ser muito eficaz na inibição da erosão ácida.

## 7.2 Perspetivas Futuras

Em relação aos trabalhos futuros as sugestões encontradas seriam:

- Aumentar a frequência de exposição ao ciclo erosivo de modo, a explorar o desgaste mineral em função da frequência de contacto com substâncias ácidas.
- Explorar o efeito protetor da saliva independentemente dos efeitos do verniz de flúor e da pasta dentífrica;
- Ter conhecimento acerca do nível de ingestão do flúor dos doadores das amostras durante o desenvolvimento do dente de modo, a melhorar a análise dos altos teores de flúor obtidos em algumas amostras. Isto pode ser através da análise de flúor no sangue no momento da extração do dente;
- Realização de mais estudos utilizando vários tipos de vernizes em que varie o tempo de contacto com o esmalte. Explorar a influência da temperatura para a capacidade protectora do flúor presente no verniz;
- Realização do estudo já com a gaiola de Faraday montada de modo, a verificar diferenças na contagem da carga.

A realização do presente estudo procurou dar resposta aos objetivos propostos no capítulo 1 como também, permitiu concluir que as aplicações de produtos tópicos de flúor são seguras uma vez que, não provocam a desmineralização, mas sim, fornece uma proteção aos dentes evitando a formação da cárie e da erosão dentária. As análises pelas três técnicas analíticas mostraram na prática que são fundamentais para uma análise completa das alterações morfológicas e estruturais do dente. No entanto, ainda são vários estudos que podem ser realizados melhorando a aplicação das técnicas analíticas no estudo do dente.

## Bibliografía

- [1] A. Nanci, *Ten Cate 's Oral Histology: development, structure, and function*, 9th ed. New York: Elsevier, 2011.
- [2] D. T. Zero, "Etiology of dental erosion-extrinsic factors," *Eur. J. Oral Sci.*, vol. 104, no. 2, pp. 162–177, 1996.
- [3] M. M. S. Salas, R. V. F. Dantas, H. R. Sarmento, F. Vargas-Ferreira, D. Torriani, and F. F. Demarco, "Tooth erosion and dental caries in schoolchildren: Is there a relationship between them?," *Brazilian J. Oral Sci.*, vol. 13, no. 1, pp. 12–16, 2014.
- [4] J. D. B. Featherstone, "The science and practice of caries prevention," *J. Am. Dent. Assoc.*, vol. 131, no. 7, pp. 887–899, 2000.
- [5] J. M. Ten Cate, "Contemporary perspective on the use of fluoride products in caries prevention," *Br. Dent. J.*, vol. 214, no. 4, pp. 161–167, 2013.
- [6] S. C. Leal and E. M. Takeshita, *Pediatric Restorative Dentistry*. Brasilia: Springer, 2019.
- [7] L. Seppä, "Fluoride Varnishes in Caries Prevention," *Med Princ Pr.*, vol. 13, no. 6, pp. 307–311, 2004.
- [8] R. Hawkins, J. Noble, D. locker, D. Wiebe, H. Murray, P. Wiebe, C. Frosina and M. Clarke, "A Comparison of the Costs and Patient Acceptability of Professionally Applied Topical Fluoride Foam and Varnish," *J. Public Health Dent.*, vol. 64, no. 2, pp. 106–110, Jun. 2004.
- [9] S. Georgina, P. Rosas, M. Ángel, A. Téllez, and E. V. Espinoza, "In vitro efficiency of fluoride-containing compounds on remineralization of carious enamel lesions under cyclic pH conditions," *Rev. Odontológica Mex.*, vol. 18, no. 2, pp. 96–104, 2014.
- [10] W. Peter Holbrook, I. B. Árnadóttir, and E. J. Kay, "Prevention. Part 3: Prevention of tooth wear," *Br. Dent. J.*, vol. 195, no. 2, pp. 75–81, 2003.
- [11] A. Venasakulchai, N. A. Williams, L. H. Gracia, and G. D. Rees, "A comparative evaluation of fluoridated and non-fluoridated mouthrinses using a 5-day cycling enamel erosion model," *J.*

- Dent.*, vol. 38, no. 3, pp. 21–29, 2010.
- [12] A. Lussi, M. C. D. N. J. M. Huysmans, and H.-P. Weber, “Fluoride and the Oral Environment,” *J. Chem. Inf. Model.*, vol. 22, no. 9, pp. 1689–1699, 2011.
- [13] M. Cândido, J. M. Silveira, A. Mata, M. L. Carvalho, and S. Pessanha, “In vitro study of the demineralization induced in human enamel by an acidic beverage using X - ray fluorescence spectroscopy and Raman microscopy,” *X-Ray Spectrom.*, vol. 48, no. 1, pp. 1–9, 2018.
- [14] G. Luís, H. Silva, J. Silveira, V. Manteigas, A. Mata, D. Marques, A. Jesus, M. Fonseca and S. Pessanha, “Evaluation of enamel demineralization and fluorine uptake caused by gustatory stimulants of salivary secretion ( GSSS ) using Raman spectroscopy and proton induced gamma - ray emission ( PIGE ),” *J. Raman Spectrosc.*, vol. 50, pp. 380–386, 2019.
- [15] A. Lussi, M Buzalaf, D. Duangthip, V. Anttonen, C. Ganss, S. Souza, T. Baumann and T. Carvalho, “The use of fluoride for the prevention of dental erosion and erosive tooth wear in children and adolescents,” *Eur. Arch. Paediatr. Dent.*, vol. 20, no. 6, pp. 517–527, Dec. 2019.
- [16] “Family Dentist in Beaverton: So You Need a Root Canal.” [Online]. Available: <https://www.beavertondentalcenter.com/what-every-patient-should-know-about-needing-a-root-canal/>. [Accessed: 23-Mar-2020].
- [17] G. Weiss and C. Scheid, *Woelfel’s Dental Anatomy*, 8th ed. Philadelphia: Elsevier, 2011.
- [18] B. Berkovitz, B. Moxham, R. Lindern, and A. Sloan, *Oral Biology*, 3rd ed. New York: Elsevier, 2011.
- [19] J. Featherstone and A. Lussi, “Understanding the Chemistry of Dental Erosion,” in *Monogr Oral Sci.*, vol. 20, 2005, pp. 66–76.
- [20] E. Abou Neel, A. Aljabo, A. Strange, S. Ebrahim, M. Coathup, A. Young, L. Bozek, V. Mudera, “Demineralization&ndash;remineralization dynamics in teeth and bone,” *Int. J. Nanomedicine*, vol. Volume 11, pp. 4743–4763, Sep. 2016.
- [21] J. Featherstone, “Prevention and reversal of dental caries : role of low level fluoride,” *Commun. Dent Oral Epidemiol*, vol. 27, no. 5, pp. 31–40, 1999.
- [22] D. Bartlett, “A new look at erosive tooth wear in elderly people,” *J. Am. Dent. Assoc.*, vol. 138, no. 9 SUPPL., pp. S21–S25, 2007.
- [23] J. Ten Cate and M. Buzalaf, “Fluoride Mode of Action: Once There Was an Observant Dentist...,” *J. Dent. Res.*, vol. 98, no. 7, pp. 725–730, 2019.
- [24] S. Chunmuang, S. Jitpukdeebodindra, C. Chuenarrom, and P. Benjakul, “Effect of xylitol and fluoride on enamel erosion in vitro.,” *J. Oral Sci.*, vol. 49, no. 4, pp. 293–297, 2007.
- [25] J. Ten Cate, “Current concepts on the theories of the mechanism of action of fluoride,” *Acta Odontol. Scand.*, vol. 57, no. 6, pp. 325–329, 1999.
- [26] R. Selwitz, A. Ismail, and N. Pitts, “Dental caries,” *Seminar*, vol. 369, no. 4, pp. 51–59, 2007.
- [27] M. Bossù, M. Saccucci, A. Salucci, G. Di Giorgio, E. Bruni, D. Uccelletti, M. Sarto, G. Familiari,

- M. Relucenti and A. Polimeni, "Enamel remineralization and repair results of Biomimetic Hydroxyapatite toothpaste on deciduous teeth: An effective option to fluoride toothpaste," *J. Nanobiotechnology*, vol. 17, no. 1, pp. 1–13, 2019.
- [28] G. Hemagaran and P. Neelakantan, "Remineralization of the tooth structure - The future of dentistry," *Int. J. PharmTech Res.*, vol. 6, no. 2, pp. 487–493, 2014.
- [29] C. Loke, J. Lee, S. Sander, L. Mei, and M. Farella, "Factors affecting intra-oral pH - a review," *J. Oral Rehabil.*, vol. 43, no. 10, pp. 778–785, 2016.
- [30] S. Humphrey and R. Williamson, "A review of saliva: Normal composition, flow, and function Sue," vol. 85, no. 2, 2001.
- [31] X. Wang, "Structural aspects of bleaching and fluoride application on dental enamel," Universität Hamburg, 2008.
- [32] E. Reynolds, F. Cai, N. Cochrane, P. Shen, G. Walker, M. Morgan, and C. Reynolds, "Fluoride and casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate," *J. Dent. Res.*, vol. 87, no. 4, pp. 344–348, 2008.
- [33] A. Tressaud, *Fluorine and the Environment*. 1s ed. Elsevier, 2006.
- [34] R. Weyant, S. Tracy, T. Tracy, E. Aguilar, K. Donly, W. Frese, P. Hujoel, t. Lafolla, W. Kohn, J. Kumar, S. Levy, N. Tinanoff, J. Wright, D. Zero, K Aravamudhan, J. Hawlwy and D. Meyer, "Topical fluoride for caries prevention," *J Am Dent Assoc.*, vol. 144, no. 11, pp. 1279–1291, 2015.
- [35] F. Perrini, L. Lombardo, A. Arreghini, S. Medori, and G. Siciliani, "Caries prevention during orthodontic treatment: In-vivo assessment of high-fluoride varnish to prevent white spot lesions," *Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop.*, vol. 149, no. 2, pp. 238–243, 2016.
- [36] S. Chandak, A. Bhondey, A. Bhardwaj, J. Pimpale, and M. Chandwani, "Comparative evaluation of the efficacy of fluoride varnish and casein phosphopeptide ' Amorphous calcium phosphate in reducing Streptococcus mutans counts in dental plaque of children: An in vivo study," *J. Int. Soc. Prev. Community Dent.*, vol. 6, no. 5, pp. 423–429, 2016.
- [37] A. Vicente, A. J. Ortiz Ruiz, M. García López, Y. Martínez Beneyto, and L. A. Bravo-González, "Enamel resistance to demineralization after bracket debonding using fluoride varnish," *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1, pp. 1–7, 2017.
- [38] H. N. Kim, J. B. Kim, and S. H. Jeong, "Remineralization effects when using different methods to apply fluoride varnish in vitro," *J. Dent. Sci.*, vol. 13, no. 4, pp. 360–366, 2018.
- [39] F. Godoi, N. Carlos, E. Bridi, F. Amaral, F. França, C. Turssi, K. Kantovitz and R. Basting, "Remineralizing effect of commercial fluoride varnishes on artificial enamel lesions," *Braz. Oral Res.*, vol. 33, no. e044, 2019.
- [40] Y. Wang and M. Nastasi, *Handbook of modern Ion Beam Materials Analysis*, 2nd ed. 2009.
- [41] M. Fonseca, "Análise de elementos leves por reacções nucleares com produção de radiação

- gama,” Ph.D. Dissertation, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, PT, 2010.
- [42] R. Hamm and M. Hamm, *Industrial Accelerators and Their Applications*. London WC2H 9HE: World Scientific.
- [43] M. D. Mihai, “Proton-induced gamma-ray emission for determination of light elements in glass (NIST SRM-1412),” *UPB Sci. Bull. Ser. A Appl. Math. Phys.*, vol. 81, no. 1, pp. 285–292, 2019.
- [44] C. Silva, “Desenvolvimento de Metodologias para Análise Elementar de Osso com Patologia,” Ph.D. Dissertation, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, PT, 2016.
- [45] “IBANDL.” [Online]. Available: <https://www-nds.iaea.org/exfor/ibandl.htm>. [Accessed: 30-Jan-2019].
- [46] International Atomic Energy, “Development of a Reference Database for Particle Induced Gamma Ray Emission (PIGE) Spectroscopy,” IAEA-TECDOC-1822, IAEA, Vienna, 2017.
- [47] A. Shukri, “Ab initio electronic stopping power in materials,” Ecole Polytechnique, 2016.
- [48] P. R. P. Allegro, M. de A. Rizzutto, and N. H. Medina, “Improvements in the PIGE technique via gamma-ray angular distribution,” *Microchem. J.*, vol. 126, pp. 287–295, 2016.
- [49] A. Manso, A. McIntosh, G. Peasle, J. Gauthier, K. Hagel, L. Heilborn, A. Jedele, M. McCarthy, Y. Pajouhafsar, E. Sals, A. Zarella, A. Wakhil and S. Yennello, “Implementing PIXE and PIGE at the Texas A&M University cyclotron institute,” in *AIP Conference Proceedings*, 2019, vol. 2160, no. 1, pp. 050023.1-050023.7.
- [50] “Física Nuclear.” [Online]. Available: <https://sites.fct.unl.pt/nuclear/pages/home>. [Accessed: 26-Jan-2019].
- [51] M. Fonseca, V. Manteigas, and M. Jesus, “ERYA Bulk User ’ s Manual,” Lisboa, Portugal, 2019.
- [52] M. Angeles, “Fluoride : Its Metabolism , Toxicity , and Role in Dental Health,” *J. Evid. Based. Complementary Altern. Med.*, vol. 17, no. 1, pp. 28–32, 2012.
- [53] L. TorrisiK, L. Sheng, E. Rapisarda, and G. Foti, “Depth Distribution of Fluorine in Enamel Teeth by,” *NUOVO Cim. D*, vol. 5, no. 2, p. pp 164–174, 1985.
- [54] K. Yagi, H. Yamamoto, R. Uemura, Y. Matsuda, K. Okuyama, T. Ishimoto, T. Nakano and M. Hayashi, “Use of PIXE / PIGE for sequential Ca and F measurements in root carious model,” *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1, pp. 1–9, 2017.
- [55] G. Demortier and S. Nammour, “In vivo PIXE – PIGE study of enhanced retention of fluorine in tooth enamel after laser irradiation,” *Elsevier*, vol. 266, no. 10, pp. 2408–2411, 2008.
- [56] Y. Funato, Y. Matsuda, K. Okuyama, H. Yamamoto, and H. Komatsu, “A new technique for analyzing trace element uptake by human enamel,” *Dent. Mater. J.*, vol. 34, no. 2, pp. 240–245, 2015.
- [57] H. Salah and N. Arab, “Application of PIGE to Determine Fluorine Concentration in Human

- Teeth : Contribution to Fluorosis Study,” *J. Nucl. Radiochem. Sci.*, vol. 8, no. 1, pp. 31–34, 2007.
- [58] E. Smith and G. Dent, *Modern Raman Spectroscopy*. Wiley, 2019.
- [59] J. da Silva, A. Queiroz, A. Oliveira, and V. Kartnaller, “Advances in the Application of Spectroscopic Techniques in the Biofuel Area over the Last Few Decades,” in *Frontiers in Bioenergy and Biofuels*, InTech, 2017.
- [60] G. S. Bumbrah and R. M. Sharma, “Raman spectroscopy – Basic principle , instrumentation and selected applications for the characterization of drugs of abuse,” *Egypt. J. FORENSIC Sci.*, vol. 6, no. 3, pp. 209–215, 2015.
- [61] S. Wartewig, *IR and Raman Spectroscopy*. Weinheim: Weinheim : Wiley-VCH, 2003.
- [62] S. DOBASHI, Y. YAMAGUCHI, Y. IZAWA, A. WADA, and M. HARA, *Introductory Raman Spectroscopy*, vol. 58, no. 2. E, 2010.
- [63] C. C. Moura, R. S. Tare, R. O. C. Oreffo, and S. Mahajan, “Raman spectroscopy and coherent anti- Stokes Raman scattering imaging : prospective tools for monitoring skeletal cells and skeletal regeneration,” *J R Soc Interface*, vol. 13, no. 118, pp. 9–11, 2016.
- [64] M. Fries and A. Steele, “Raman Spectroscopy and Confocal Raman Imaging,” Lund University, 2003.
- [65] T. Buchwald and Z. Buchwald, “Assessment of the Raman spectroscopy effectiveness in determining the early changes in human enamel caused by artificial caries,” *Analyst*, vol. 144, no. 4, pp. 1409–1419, 2019.
- [66] D. Wei, S. Chen, and Q. Liu, “Review of fluorescence suppression techniques in Raman spectroscopy,” *Appl. Spectrosc. Rev.*, vol. 50, no. 5, pp. 387–406, 2015.
- [67] A. Moreno, “Non-Destructive Characterization of Artworks in Paper Support Using Spectroscopic Techniques,” Ph.D. Dissertation, Universidade de Lisboa, Lisboa, PT, 2013.
- [68] R. Petry, M. Schmitt, and J. Popp, “Raman Spectroscopy – A Prospective Tool in the Life Sciences,” *HEMPHYSCHEM*, vol. 4, no. 1, pp. 14–30, 2003.
- [69] R. Klockenkämper and A. von Bohlen, *Total-Reflection X-Ray Fluorescence Analysis and Related Methods*, 2nd ed., vol. 9781118460. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, 2015.
- [70] R. Clapera, “Energy Dispersive X-Ray Fluorescence: measuring elements in solid and liquid matrices,” 2006.
- [71] C. Eaborn, “Handbook of Spectroscopy. Vol. II,” *J. Organomet. Chem.*, vol. 117, no. 1, p. C35, Aug. 1976.
- [72] J. A. Seibert and J. M. Boone, “X-ray imaging physics for nuclear medicine technologists. Part 2: X-ray interactions and image formation,” *J. Nucl. Med. Technol.*, vol. 33, no. 1, pp. 3–18, 2005.
- [73] A. Van Grieken, René E.; Markowicz, Andrzej, *Handbook of X-Ray Spectrometry*, Second.

Marcel Dekker, 2001.

- [74] L. Soares and A. Carvalho Filho, "Protective Effect of Fluoride Varnish and Fluoride Gel on Enamel Erosion : Roughness , SEM-EDS , and m -EDXRF Studies," *Micros Res Tech*, vol. 78, no. 3, pp. 240–248, 2015.
- [75] J. Castro, J. Godinho, A. Mata, J. M. Silveira, and S. Pessanha, "Study of the effects of unsupervised over-the counter whitening products on dental enamel using  $\mu$  -Raman and  $\mu$  -EDXRF spectroscopies," *J. Raman Spectrosc.*, vol. 47, no. 4, pp. 444–448, 2015.
- [76] A. De Carvalho Filho, R. P. Sanches, A. A. Martin, A. M. Do Espírito Santo, "Energy Dispersive X-Ray Spectrometry Study of the Protective Effects of Fluoride Varnish and Gel on Enamel Erosion," *Microsc. Res. Tech.*, vol. 74, no. 9, pp. 839–844, 2011.
- [77] A. P. Jones, *Microprobe techniques in the earth sciences*, vol. 6. London: Chapman & Hall, 2012.
- [78] R. Mateus, "Recolha automática de aerossóis e sua análise por técnicas analíticas nucleares," Ph.D. Dissertation, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, PT, 2003.
- [79] "solid works." [Online]. Available: <https://www.solidworks.com>. [Accessed: 22-Jan-2019].
- [80] S. Pessanha, S. Coutinho, M. L. Carvalho, J. M. Silveira, and A. Mata, "Determination of demineralization depth in tooth enamel exposed to abusive use of whitening gel using micro-Energy Dispersive X ray Fluorescence," *Spectrochim. Acta - Part B At. Spectrosc.*, vol. 138, pp. 8–13, 2017.
- [81] H. F. Luis, "Study of nuclear reactions relevant for astrophysics by Micro-AMS," Ph.D. Dissertation, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, PT, 2013.
- [82] H. Silva, "Elastic scattering of protons and oxygen ions from light nuclei," Ph.D. Dissertation, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, PT, 2018.
- [83] A. Ko, L. Choo-Smith, M. Hewko, M. G. Sowa, C. C. S. Dong, and B. Cleghorn, "Detection of early dental caries using polarized Raman spectroscopy," *Opt. Express*, vol. 14, no. 1, p. 203, 2006.
- [84] G. Luís, "Efeito de Estimulantes Gustativos de Secreção Salivar na desmineralização do esmalte dentário e incorporação de Flúor por  $\mu$  -Raman e PIGE," M.S. Thesis, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, PT, 2017.
- [85] "VOCO Profluorid ® Varnish." [Online]. Available: <https://www.voco.dental/pt> [Accessed: 04-Apr-2019].
- [86] "Home - Couto, S.A." [Online]. Available: <https://www.couto.pt/>. [Accessed: 12-Apr-2020].
- [87] R. F. Zanatta, D. M. D. S. Ávila, K. M. Miyamoto, C. R. G. Torres, and A. B. Borges, "Influence of surfactants and fluoride against enamel erosion," *Caries Res.*, vol. 53, no. 1, pp. 1–9, 2019.

- [88] “Acofarma Fórmulas Magistrales | Distribuidor de productos para farmacias.” [Online]. Available: <https://formulasmagistrales.acofarma.com/es/producto-quimico/excipientes/acido-citrico-monohidrato-cristal>. [Accessed: 12-Apr-2020].
- [89] S. R. Cherry, J. A. Sorenson, and M. E. Phelps, “Nuclear Counting Statistics,” in *Physics in Nuclear Medicine*, 2012, pp. 125–140.
- [90] S. Lucas, “Efeitos no esmalte dentário de produtos branqueadores contendo flúor,” M.S. Thesis, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, PT, 2018.
- [91] F. Brudevold, L. T. Steadman, and F. A. Smith, “Inorganic and Organic Components of Tooth Structure,” *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 85, no. 1, pp. 110–132, 1960.
- [92] I. Gedalia, Y. Kfir, and B. Azaz, “Fluoride in the Surface Enamel of Unerupted Teeth,” *J. Dent. Res.*, vol. 46, no. 6, pp. 1465–1468, 1967.
- [93] A. Candeli, F. Acavizzi, and F. Marci, “The Relationship between Fluoride Concentration and the Caries Frequency of Different Tooth Surfaces in a High Fluoride Area,” no. 4, pp. 69–77, 1970.
- [94] J. Li, H. Nakagaki, S. Tsuboi, S. Kato, S. Huang, M. Mukai, C. Robinson and M. Strong, “Fluoride profiles in different surfaces of human permanent molar enamels from a naturally fluoridated and a non-fluoridated area,” *Arch. Oral Biol.*, vol. 39, no. 8, pp. 727–731, 1994.
- [95] D. H. Retief, P. G. Sorvas, E. L. Bradley, R. E. Taylor, and A. R. Walker, “In vitro Fluoride Uptake, Distribution and Retention by Human Enamel After 1- and 24-Hour Application of Various Topical Fluoride Agents,” *J. Dent. Res.*, vol. 59, no. 3, pp. 573–582, 1980.
- [96] W. Arshed, O. A. Akankle, and N. M. Spyrou, “The distribution of fluorine and other elements in teeth using proton induced reaction analysis tecvhniques,” *Jounal Radioanal. Nucl. Chem.*, vol. 179, no. 2, pp. 349–355, 1994.
- [97] H. E. Zschau, F. Plier, G. Otto, C. Wyrwich, and A. Treide, “PIGE - Resonance profiling applied to a clinical test of flouride varnishes,” *Nucl. Inst. Methods Phys. Res. B*, vol. 66, no. 1–2, pp. 292–294, 1992.
- [98] A. Richards, O. Fejerskov, and V. Baelum, “Enamel fluoride in relation to severity of human dental fluorosis,” *Adv. Dent. Res.*, vol. 3, no. 2, pp. 147–153, 1989.
- [99] P. DenBesten and L. Wu, “Chronic Fluoride Toxicity: Dental Fluorosis,” *Monogr Oral Sci.*, vol. 22, pp. 81–96, 2011.
- [100] F. Plier, H. E. Zschau, and G. Otto, “The investigation of the fluorine uptake in tooth enamel after the application of a NaF containing varnish,” *Nucl. Inst. Methods Phys. Res. B*, vol. 66, no. 1–2, pp. 295–297, 1992.
- [101] F. Lippert, “Fluoride release from fluoride varnishes under acidic conditions,” *J. Clin. Pediatr. Dent.*, vol. 39, no. 1, pp. 35–39, 2014.
- [102] “NOVO FLUOR PROTECTORS®.” [Online]. Available:

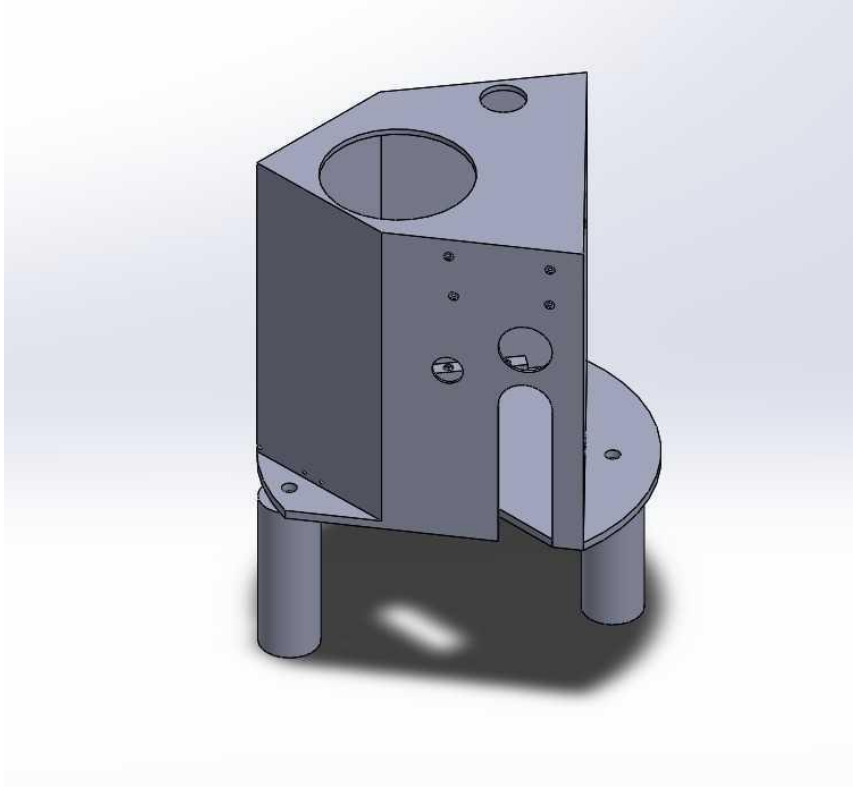
- <https://www.jornaldentistry.pt/news/marcas-e-produtos/novo-fluor-protector-s>. [Accessed: 12-Apr-2020].
- [103] “Colgate Duraphat Varnish | Overview | Dental Products.” [Online]. Available: <https://www.colgateprofessional.com.au/products/products-list/colgate-duraphat-varnish>. [Accessed: 12-Apr-2020].
- [104] B. Ögaard, G. Rolla, and K. Helgeland, “Fluoride retention in sound and demineralized enamel in vivo after treatment with a fluoride varnish (Duraphat),” *Eur. J. Oral Sci.*, vol. 92, no. 3, pp. 190–197, 1984.
- [105] “LAWEFUOR, gel - Prospect Medicament - Indicatii, Administrare, Reactii adverse.” [Online]. Available: <https://consultadoctorul.ro/l/lawefluor-gel/>. [Accessed: 12-Apr-2020].
- [106] C. Bruun, “Uptake and retention of fluoride by intact enamel in vivo after application of neutral sodium fluoride,” *Scand.J.dent.Res.*, vol. 81, pp. 92–100, 1973.
- [107] “Dentaid Xeros Spray.” [Online]. Available: [https://www.farmaciasportuguesas.pt/catalogo/catalog/product/view/id/445804/s/dentaid-xeros-spray/?\\_\\_SID=U](https://www.farmaciasportuguesas.pt/catalogo/catalog/product/view/id/445804/s/dentaid-xeros-spray/?__SID=U). [Accessed: 12-Apr-2020].
- [108] A. Fischer, D. Wiechuła, L. Postek-Stefańska, and J. Kwapuliński, “Concentrations of metals in maxilla and mandible deciduous and permanent human teeth,” *Biol. Trace Elem. Res.*, vol. 132, no. 1–3, pp. 19–26, 2009.
- [109] W. H. Arnold and P. Gaengler, “Quantitative analysis of the calcium and phosphorus content of developing and permanent human teeth,” *Ann. Anat.*, vol. 189, no. 2, pp. 183–190, 2007.
- [110] H.Y. Liu, J.-H. Chao, C.-Y. Chuang, H.-L. Chiu, C.-W. Yang, and Y.-C. Sun, “Study of P, Ca, Sr, Ba and Pb Levels in Enamel and Dentine of Human Third Molars for Environmental and Archaeological Research,” *Adv. Anthropol.*, vol. 03, no. 02, pp. 71–77, 2013.
- [111] D. G. A. Nelson, W. L. Jongebloed, and J. Arends, “Morphology of Enamel Surfaces Treated with Topical Fluoride Agents: SEM Considerations,” *J. Dent. Res.*, vol. 62, no. 12, pp. 1201–1208, 1983.
- [112] S. Baglar, A. Nalcaci, and M. Tastekin, “The effect of temperature change on fluoride uptake from a mouthrinse by enamel specimens,” *Eur. J. Dent.*, vol. 6, no. 4, pp. 361–369, 2012.
- [113] M. A. R. Buzalaf, A. R. Hannas, and M. T. Kato, “Saliva and dental erosion,” *J. Appl. Oral Sci.*, vol. 20, no. 5, pp. 493–502, 2012.
- [114] C. R. B. de Alencar, F. Mendonça, L. Guerrini, M. Jordao, G. Oliveira, H. Honório, A. Magalhães and D. Rios, “Effect of different salivary exposure times on the rehardening of acid-softened enamel,” *Braz. Oral Res.*, vol. 30, no. 1, p. e104, 2016.
- [115] J. D. B. Featherstone, J. M. Behrman, and J. E. Bell, “Effect of whole saliva components on enamel demineralization in vitro,” *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, vol. 4, no. 3–4, pp. 357–362, 1993.
- [116] X. Wang, B. Mihailova, A. Klocke, S. Heidrich, and U. Bismayer, “Effect of Artificial Saliva on

- the Apatite Structure of Eroded Enamel,” *Int. J. Spectrosc.*, vol. 2011, pp. 1–9, 2011.
- [117] X. Wang, A. Klocke, B. Mihailova, L. Tosheva, and U. Bismayer, “New insights into structural alteration of enamel apatite induced by citric acid and sodium fluoride solutions,” *J. Phys. Chem. B*, vol. 112, no. 29, pp. 8840–8848, 2008.
- [118] I. Ionita, “Diagnosis of tooth decay using polarized micro-Raman confocal spectroscopy,” *Rom. Reports Phys.*, vol. 61, no. 3, pp. 567–574, 2009.
- [119] S. R. M. Braga, D. L. Araújo de Faria, E. de Oliveira, and M. A. P. Sobral, “Morphological and mineral analysis of dental enamel after erosive challenge in gastric juice and orange juice,” *Microsc. Res. Tech.*, vol. 74, no. 12, pp. 1083–1087, 2011.
- [120] J. L. González-Solís, E. Martínez-Cano, and Y. Magaña-López, “Early detection of dental fluorosis using Raman spectroscopy and principal component analysis,” *Lasers Med. Sci.*, vol. 30, no. 6, pp. 1675–1681, 2015.
- [121] J. Chen, Z. Yu, P. Zhu, J. Wang, Z. Gan, J. Wei, Y. Zhao and S. Wei, “Effects of fluorine on the structure of fluorohydroxyapatite: A study by XRD, solid-state NMR and Raman spectroscopy,” *J. Mater. Chem. B*, vol. 3, no. 1, pp. 34–38, 2015.
- [122] M. L. Mei, F. Nudelman, B. Marzec, J. Walker, E. Lo, A. Walls and C. Chu, “Formation of Fluorohydroxyapatite with Silver Diamine Fluoride,” *J. Dent. Res.*, vol. 96, no. 10, pp. 1122–1128, 2017.

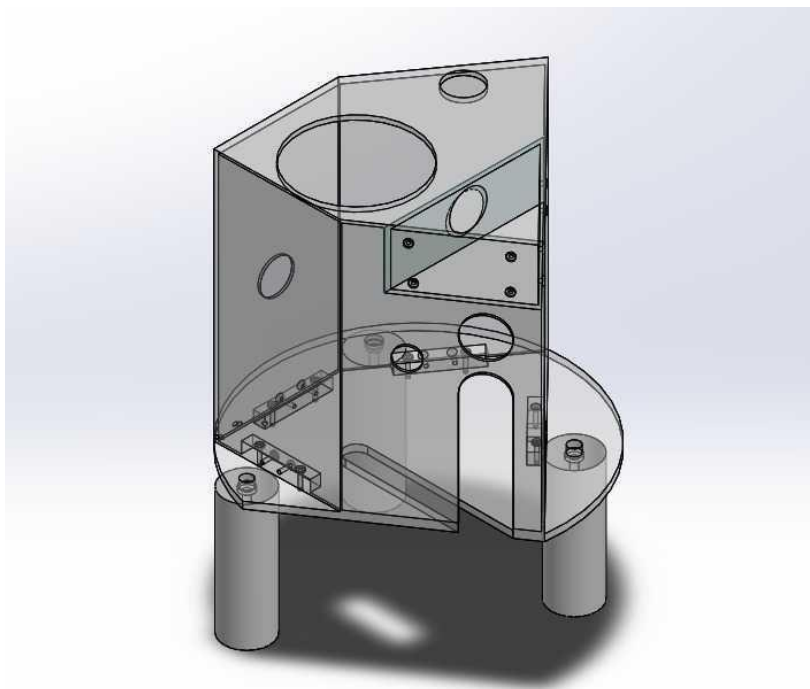


# Apêndice A

Desenhos da gaiola de Faraday feitos com recurso do SolidWorks.



*Figura A.1- Desenho em 3D da gaiola de Faraday.*



*Figura A.2- Desenho em 3D do conjunto gaiola de Faraday e canhão de elétrons.*

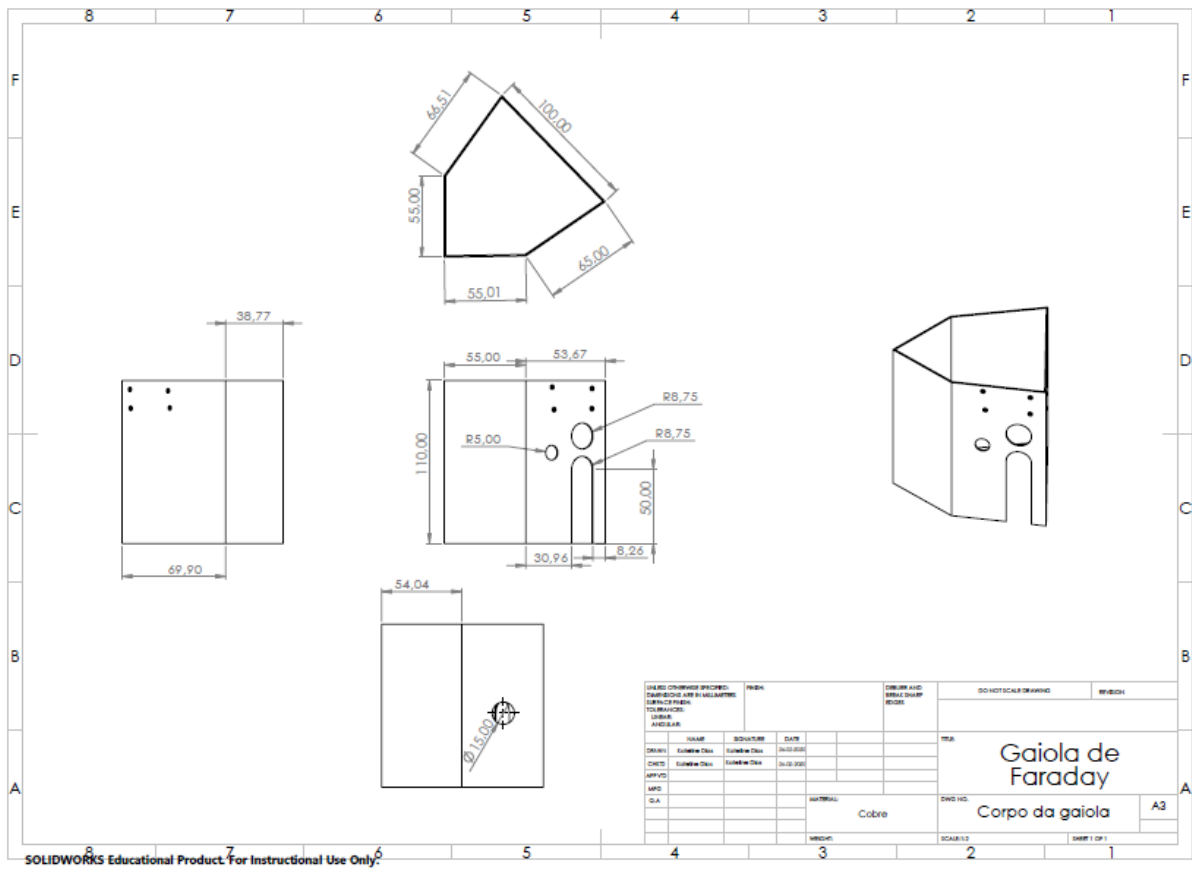


Figura A.3- Desenho do corpo da gaiola de Faraday.

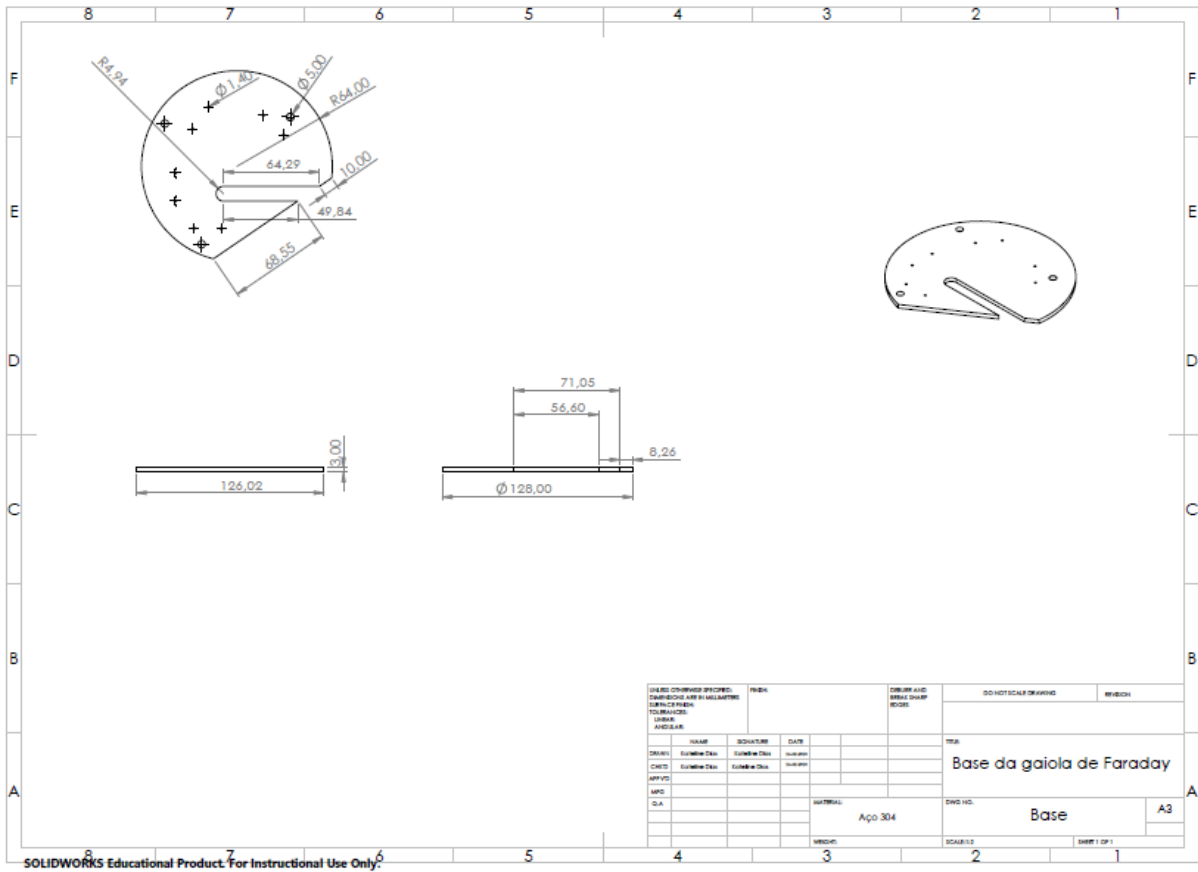


Figura A.4- Desenho da base da gaiola de Faraday.









## Apêndice B

Resultados das concentrações de fósforo e sódio das amostras do grupo B obtidos pela técnica PIGE.

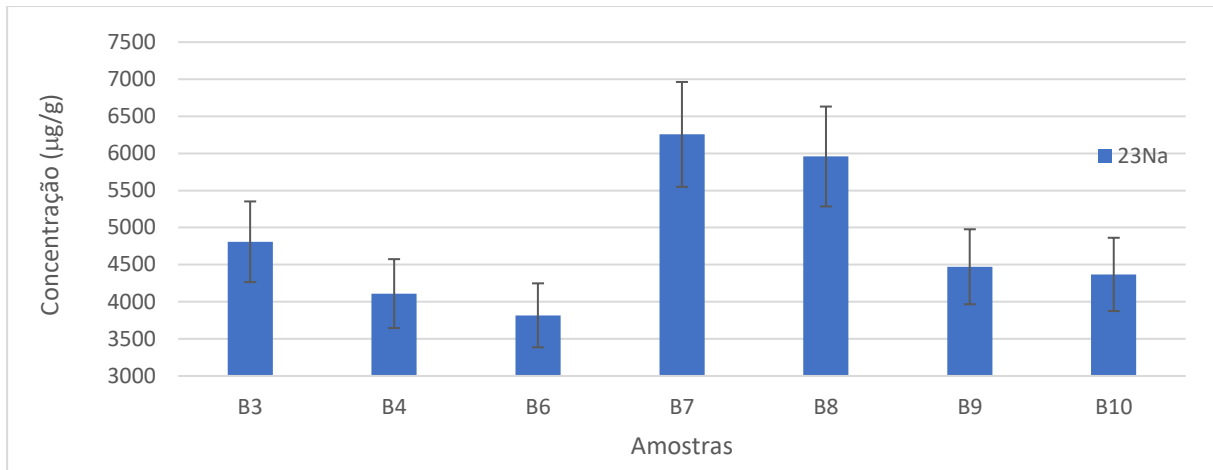


Figura B.1- Comparação da concentração de sódio em µg/g entre diferentes fases do tratamento das amostras do grupo B.

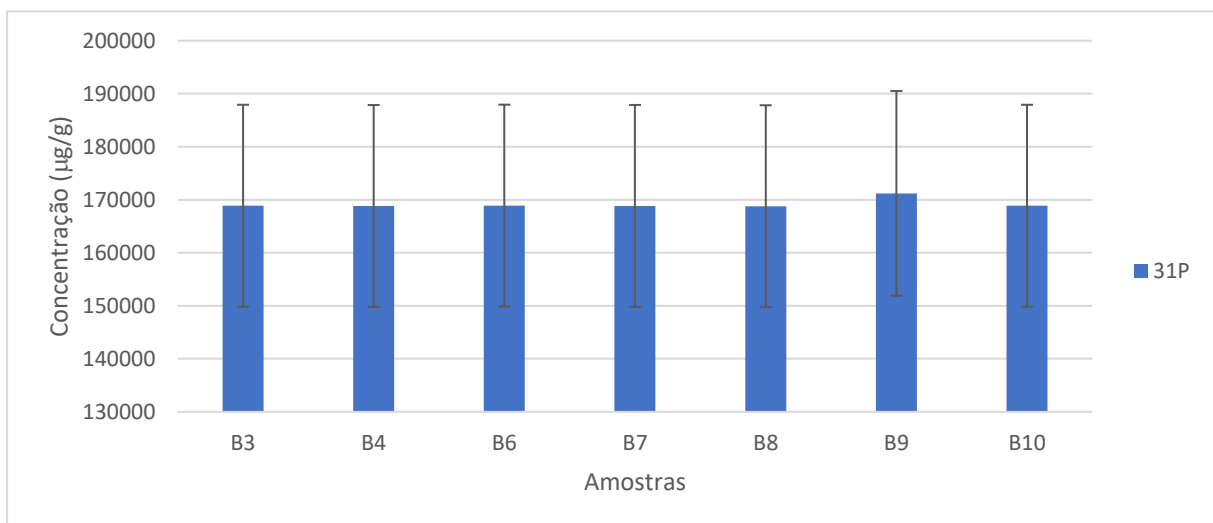


Figura B.2 - Comparação da concentração de fósforo em µg/g entre diferentes fases do tratamento das amostras do grupo B.

# Apêndice C

Poster apresentado no XXXIX Congresso Anual da SPEMD-2019, nos dias 18 e 19 de Outubro de 2019. Este poster foi aceite para o Prémio Congresso SPEMD.

## Incorporação de flúor no esmalte após aplicação de verniz com fluoreto de sódio

Categoria: Investigação

**Autores:** Kateline Dias, Iulian Otel, Micaela Fonseca, Sofia Pessanha, João Silveira\*, António Mata

**Instituições:** Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, Universidade Europeia, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, Faculdade de Medicina Dentária da Universidade de Lisboa, Faculdade de Medicina Dentária da Universidade de Lisboa

**Áreas de Interesse:** Biologia Oral e do Desenvolvimento, Cariologia, Farmacologia / Terapêutica / Toxicologia, Materiais Dentários, Saliva

### Objetivos

Este estudo *in vitro* teve como objectivo avaliar os efeitos da aplicação de um verniz, utilizado no tratamento da sensibilidade dentária, em amostras de esmalte dentário: (1) na incorporação de flúor através da técnica nuclear de PIGE (Particle Induced Gamma-Ray Emission), (2) na desmineralização através de  $\mu$ -espectroscopia de Raman e (3) na composição elementar por XRF (fluorescência de raios-X).

### Materiais e métodos

Foram utilizadas 20 amostras de esmalte dentário aleatorizadas em 2 grupos. As amostras do grupo A foram tratadas com um verniz contendo 5% de flúor (ProFluoride Varnish, VOCC) e uma pasta de dentes não fluoretada. As amostras do grupo B foram sujeitas apenas à escovagem com pasta não fluoretada.

As amostras foram analisadas com as técnicas de PIGE,  $\mu$ -Raman e XRF antes e após a aplicação do verniz. Entre as aplicações, as amostras foram conservadas em saliva artificial.

A análise por PIGE foi realizada no acelerador eletrostático Tandem de 3MV. Foi utilizado um feixe de prótons a 3,2 MeV realizando medições em 1 a 2 pontos por amostra. A análise por Raman foi realizada num espectrómetro confocal  $\mu$ -Raman com fonte de laser diodo de 785 nm realizando medições em 10 pontos por amostra, de modo a determinar a razão de despolarização da banda de alongamento simétrico do fosfato (960  $\text{cm}^{-1}$ ). Os resultados de PIGE obtidos encontram-se expressos como ppm (p/p) de flúor no esmalte, a razão de despolarização de  $\mu$ -Raman encontra-se expressa em unidades arbitrárias e os resultados de XRF encontram-se expressos em % da composição elementar do esmalte (p/p). O teste t de student, one-way ANOVA e Tukey post hoc foram utilizados conforme apropriado e o nível de significância estatística foi estabelecido em  $\alpha=0,05$ .

### Resultados

O ratio de despolarização no grupo A, antes e após a aplicação do verniz, diminuiu de forma estatisticamente significativa ( $p=0,015$ ). No grupo B, apesar de a diferença não ser significativa ( $p=0,114$ ), regista-se uma tendência de aumento de orientação cristalina da hidroxiapatite. A aplicação do verniz no grupo A, resultou num aumento de flúor no esmalte superficial de forma significativa ( $p=0,001$ ) correspondendo a uma diferença média de 34,68%. Relativamente ao conteúdo elementar de cálcio e fósforo verificou-se um aumento significativo no grupo A, ( $p=0,006$  e  $p=0,008$  respectivamente).

### Conclusões

A utilização do verniz com fluoreto de sódio resulta no aumento da concentração de flúor, cálcio, fósforo e orientação cristalina do esmalte dentário.

*Figura C.1- Poster apresentado no XXXIX Congresso Anual da SPEMD-2019.*

Poster apresentado na conferência *Colloquium Spectroscopicum Internationale XLI* no México, de 9 a 14 de Junho de 2019.

## Evaluation of protective effect of dental varnish in human enamel using non-destructive spectroscopic techniques

S. Passanha<sup>a,b</sup>, J. M. Silveira<sup>a,c</sup>, I. Otel<sup>a,b</sup>, V. Mantelgas<sup>b</sup>, K. Dias<sup>b</sup>, J. Cruz<sup>a,b</sup>, V. Vasilenko<sup>a,b</sup>, A. P. Jesus<sup>a,b</sup>, A. Mata<sup>a,c</sup>, H. Lulo<sup>a</sup>, M. Fonseca<sup>a,b,d</sup>

<sup>a</sup>IBRPHYS – Laboratory of Instrumentation, Microfluidic Engineering and Radiation Physics, Portugal; <sup>b</sup>Instituto de Ciência e Tecnologia de Universidade Nova de Lisboa, 2829-516, Monte Capucho, Portugal; <sup>c</sup>Faculdade de Medicina Dentária da Universidade de Lisboa, 1549-002 Lisboa, Portugal; <sup>d</sup>Universidade Europeia, AZE, Av. D. Carlos I, 4, 1200-669 Lisboa, Portugal; Instituto Superior Técnico, Universidade de Lisboa, 1049-001 Lisboa, Portugal.

s.passanha@ct.ulisboa.pt

---

### Introduction


In this work we present the in vitro study of the protective effects of commercial varnish used for fluoride dental therapy. Fluoride-based agents, for topical management of dental demineralization, have been used profusely in preventive dentistry, namely in children. Fluoride varnishes, composed of  $\text{CaF}_2$ , adhere to the enamel and release Fluorine ions into the hydroxyapatite matrix forming the less susceptible to demineralization, calcium fluoride. To evaluate the incorporation of F, a set of 10 specimens of human enamel were analyzed before and after application of the varnish ProFluorid® (VOCO).

---

### Experimental procedure

The fluoride containing varnish (5% NaF) was applied according to the manufacturer's recommendation.

#### Confocal Raman microscope



Raman spectra of samples were obtained using a Horiba XploRA Confocal Microscope using the 785 nm laser. A 100x objective was used as well as a 50% neutral density filter rendering an incident power on the sample of  $5.0 \pm 0.4$  mW. Each spectrum was obtained by 4 accumulations of 20 s each and an average of 20 measurements were performed for each sample.

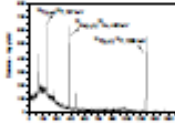
The depolarization ratio ( $\rho$ ) of the band assigned to the symmetric stretching of phosphate was determined. In each spot, spectra were recorded in two orthogonal polarizations of scattered light. The  $\rho_{\text{sym}}$  was then determined according to:

$$\rho_{\text{sym}} = \frac{I_{\text{V}}}{I_{\text{H}}}$$

#### Particle Induced Gamma ray emission

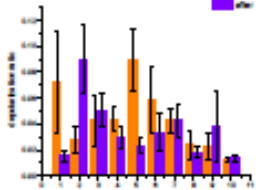
PIGE analysis were performed using the 3 MV Tandem accelerator  $E_{\text{beam}} = 3000$  keV (protons) and Ge(Hp) 40% Germanium Detector.

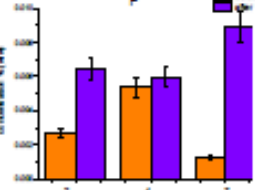
The fluoride gamma rays from the  $^{19}\text{F}(p,\gamma)^{19}\text{F}$  nuclear reaction was quantified using a standard free method for PIGE in thick samples, based on the Simbad Radiation Yield Analysis (SRYA) code.



---

### Results





---

### Conclusions

The obtained results for the depolarization ratio and F content before treatment showed that the specimens were very different from each other. Regarding depolarization ratio only 4 specimens present this factor below 0.04, indicating some previous demineralization for the remaining specimens. Regarding F content, it is visible that it varies from 10 ppm to 50 ppm, but its incorporation reached 700% in sample 7, without variation of the depolarization ratio. In sample 2, the F incorporation was followed by a significant increase of depolarization ratio, while in sample 4 there was not a significant incorporation of F as well as a significant variation in the depolarization ratio. More results on the remaining samples are needed for more relevant conclusions.

---

Acknowledgments: Authors would like to acknowledge the support of Portuguese Foundation for Science and Technology (FCT) in the context of LISPhyS (LISPhyS project) (2017-2020) and FCT in the area administered FCT for the research group F4046N-R1-2019-0001.












Figura C.2- Poster apresentado na conferência *Colloquium Spectroscopicum Internationale XLI* no México.