

FLUORESCÊNCIA DE RAIOS-X: VALIDAÇÃO DA TÉCNICA PARA ESTUDO, *IN VITRO*, DOS COMPONENTES MINERAIS DO ESMALTE DE DENTES DECÍDUOS

Elaine Cristina Bernardes Miele¹, Claudia Maria de O. M. da Silva¹, Emilia Ângela L. Arisawa¹, Airton Abrahão Martin², Ana Maria do Espírito Santo²

¹UNIVAP/Faculdade de Ciências da Saúde - FCS, Av. Shishima Hifumi, 2911, 12244-000, São José dos Campos, SP.

²UNIVAP/Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento - IP&D/LEVB, Av. Shishima Hifumi, 2911, 12244-000, São José dos Campos, SP.

miele.ecb19@yahoo.com.br, claudia@univap.br, mirela@univap.br, amartin@univap.br, amesanto@univap.br

Resumo

A proposta do presente estudo foi avaliar as diferenças na proporção dos componentes Ca e P presentes na estrutura mineral de dentes decíduos. A técnica de micro-análise utilizada é a Espectrometria de Fluorescência de Raios-X por Energia Dispersiva (ED-XRF). Para tal foram utilizados quinze dentes decíduos humanos erupcionados hígidos, entre molares e incisivos, e um dente molar decíduo restaurado e cariado para comparação do teor mineral do esmalte, dentina hígida e dentina lesionada. A ED-XRF é uma técnica analítica não-destrutiva, com resultados em tempo real, que permite uma análise qualitativa e quantitativa dos elementos inorgânicos presentes em uma amostra. Os resultados obtidos indicaram uma redução da proporção Ca/P da dentina lesionada. Ainda, o maior valor desta proporção foi obtido para o esmalte. Com base na metodologia utilizada e nos resultados obtidos na presente pesquisa, é lícito afirmar que por meio desta técnica é possível determinar os teores dos componentes minerais Ca e P presentes na estrutura dentária humana e proceder à continuidade das investigações sobre a ação de medicamentos pediátricos sobre a erosão dental.

Palavras-chave: dente decíduo, desmineralização, medicamento pediátrico, fluorescência de raios-X

Área do Conhecimento: IV - Ciências da Saúde

Introdução

A maioria dos medicamentos pediátricos é prescrita na forma líquida que inclui sacarose na sua formulação a fim de mascarar o gosto desagradável dos mesmos. O medicamento, geralmente, é indicado para o tratamento de doenças agudas e crônicas. Evidências acumuladas, com base clínica e experimental, mostram uma associação efetiva entre a ingestão de medicamentos à base de sacarose e aumento da incidência de cárie dentária (SERAIARIAN; JACOB, 2003). Os componentes desses medicamentos possuem pH endógeno com elevada acidez, além de ausência ou diminuta quantidade de íons cálcio, flúor e fosfato em sua composição (LINNETT; SEOW, 2001).

A ingestão freqüente de formulações farmacêuticas por pacientes com doenças agudas ou crônicas, e a possibilidade dos fármacos causarem erosão dental por desmineralização, motivaram este estudo. O objetivo do trabalho é estabelecer os parâmetros experimentais apropriados para medir o teor de cálcio (Ca) e fósforo (P) em lesões dentais e em dentes decíduos hígidos por meio da técnica analítica de Fluorescência de Raios-X por Energia Dispersiva (ED-XRF). Deste modo, o presente trabalho

apresenta-se como um estudo piloto para validação da técnica de ED-XRF para a determinação dos teores minerais presentes na estrutura dental e possibilitar a continuidade das investigações sobre a ação de medicamentos pediátricos sobre a erosão dental.

A análise por Fluorescência de Raios-X (XRF) é um método semi-quantitativo baseado na medida da intensidade (número de fótons coletados por unidade de tempo) dos raios-X característicos emitidos pelos elementos que constituem a amostra quando devidamente excitada (BERTIN, 1975). A intensidade da energia característica emitida pelos componentes da amostra está relacionada com a concentração de cada elemento presente na amostra. Deste modo, uma avaliação quantitativa por comparação pode ser conduzida para determinar a relação dos teores dos elementos cálcio (Ca) e fósforo (P) presentes no composto mineral do esmalte dental. A análise por ED-XRF, é muito utilizada para estudo de materiais inorgânicos. Nos últimos 10 anos, tem sido utilizada para o estudo de tecidos biológicos (ALEXANDRE, BUENO, 2006).

Nesta técnica analítica é necessário o uso de padrões primários e, em alguns casos, de padrões secundários para quantificar, por interpolação, os teores composicionais em uma determinada

amostra. Como as demais técnicas analíticas, a XRF apresenta algumas limitações que podem levar a resultados errôneos, por exemplo, o efeito de interferência matricial. O cálculo a partir de matrizes puras é relativo, ou seja, é feito por comparação das relações dos teores dos elementos conhecidos da matriz e os presentes na amostra (SALVADOR, 2006). Entre as principais vantagens desta técnica analítica, destaca-se o fato de que não há qualquer necessidade de preparação prévia da amostra, as mesmas são técnicas não-destrutivas e o resultado pode ser obtido em tempo real.

Os resultados obtidos neste estudo permitirão verificar, *in vitro*, a ação de medicamentos pediátricos sobre o processo de desmineralização do esmalte de dentes decíduos hígidos.

Materiais e Métodos

Seleção dos dentes: Para a realização deste trabalho foram utilizados quinze dentes decíduos humanos erupcionados hígidos, entre molares e incisivos, e um dente molar decíduo lesionado por cárie. Este estudo foi executado segundo os princípios éticos das diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa envolvendo seres humanos, conforme Resolução no 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, sendo aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa da Universidade do Vale do Paraíba (n° H225/CEP/2007). Todos os responsáveis pelos pacientes menores foram informados sobre a pesquisa e assinaram um termo de consentimento para utilização dos materiais colhidos como amostras para a pesquisa científica.

Coleta das amostras: Os dentes foram removidos cirurgicamente em clínicas odontopediátricas da região do Vale do Paraíba e da Associação de Assistência à Criança Deficiente (AACD - São Paulo/SP). Após a extração, os dentes foram armazenados em frascos de polipropileno com solução fisiológica (NaCl 0,9%) e mantidos sob refrigeração a 9°C, aproximadamente.

Preparação das amostras: Os dentes foram manipulados no Laboratório de Espectroscopia Vibracional Biomédica do IP&D/UNIVAP sob adequada paramentação (luvas, máscara, gorro, avental e óculos de proteção) conforme as precauções universais e normas de biossegurança do Ministério da Saúde. No processo de descontaminação, os dentes recebidos, foram quimicamente desinfetados em solução de Timol aquosa à 0,1% pelo período de sete dias. Posteriormente, os dentes foram lavados em água corrente por 24 horas para remoção dos traços de Timol. Os dentes após serem descontaminados, foram limpos com curetas periodontais e polidos

com pedra-pomes e água, utilizando-se escovas de Robinson em baixa rotação, montada em um micro-motor da marca Beltec. Para a obtenção das amostras, os dentes foram hemi-seccionados longitudinalmente (sentido coroa-raiz) com uma lâmina de diamante montado em uma máquina de corte de precisão da marca Buehler, modelo IsoMet 1000, com disco diamantado e refrigerado com soro fisiológico.

A Figura 1 mostra as seções de um dente decíduo incisivo hígido (fig. 1.a) e um dente decíduo restaurado com amálgama na superfície oclusal e lesionado por cárie na face distal (fig. 1.b). As amostras foram tratadas por equipamento de ultra-som, marca Unique modelo Maxi Clean 1450, com água destilada por 10 minutos para remoção de detritos aderidos às superfícies a serem analisadas.

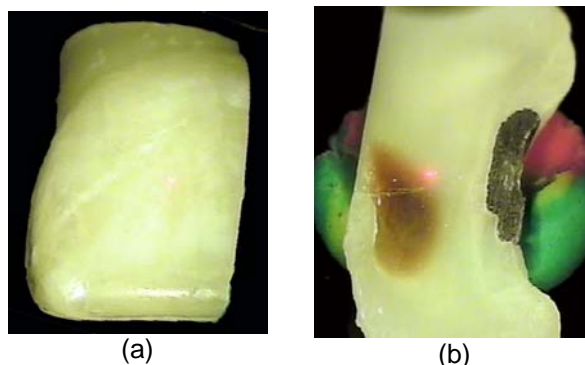


Figura 1: (a) face lingual de dente decíduo hígido incisivo central superior esquerdo e, (b) face distal lesionada de dente decíduo molar inferior direito.

Análise química: A análise dos componentes minerais, cálcio (Ca) e fósforo (P) das amostras foi realizada em um espectrofotômetro de Fluorescência de Raios-X marca Shimadzu modelo μ EDX-1300. A face lingual das amostras hígidas e a face distal da amostra lesionada foram analisadas longitudinalmente por dispersão de energia da radiação proveniente de um tubo de Rh acoplado a um sistema computadorizado. A varredura foi feita a cada 200 μ m, totalizando 3 pontos por superfície, com tempo de leitura de 100 s por ponto. A contagem da radiação foi feita por um detector semicondutor de Si (Li) refrigerado por nitrogênio líquido. A tensão e a corrente do tubo foi de 50 kV / 100 μ A.. As amostras foram colocadas na câmara e a face lingual foi excitada, coletando-se a radiação emitida de cada amostra. A calibração do equipamento foi feita utilizando-se, como referência, o reagente comercial certificado de hidroxiapatita estequiométrica (Aldrich 99.999% synthetic $\text{Ca}_5\text{HO}_{13}\text{P}_3$). As medidas foram coletadas utilizando-se os parâmetros fundamentais de emissão de raios-X característicos dos elementos Ca, P e O, após calibração da energia por padrões internos do equipamento.

Resultados

A medida do padrão de hidroxiapatita com os parâmetros estabelecidos apresentou o valor de $1,67 \pm 0,04$ com alta reprodutibilidade. Os resultados de análise química são apresentados nas Tabelas 1 e 2, para as amostras de dentes decíduos hígidos e lesionado, respectivamente.

Tabela 1: Teores médios (de 3 pontos medidos) de Ca e P da superfície lingual dos quinze dentes decíduos analisados.

Dente	Ca (% peso)	P (% peso)	Proporção Ca/P
1	49,86±0,12	21,37±0,18	2,32
2	36,41±0,07	14,17±0,12	1,84
3	28,35±0,08	41,62±0,15	1,42
4	20,95±0,07	11,94±0,13	1,71
5	13,76±0,03	9,02±0,08	1,52
6	27,48±0,08	14,60±0,14	1,87
7	26,88±0,07	14,47±0,13	1,85
8	26,94±0,07	14,13±0,13	1,86
9	25,63±0,07	13,98±0,13	1,80
10	31,66±0,09	15,93±0,16	1,96
11	13,74±0,03	8,68±0,08	1,58
12	36,13±0,09	17,10±0,16	2,09
13	37,93±0,12	17,09±0,18	2,14
14	27,43±0,07	14,68±0,13	1,85
15	40,78±12,95	18,48±0,19	2,17

Tabela 2: Teores médios (de 3 pontos medidos) de Ca e P medidos nas superfícies da estrutura dental da amostra lesionada.

Região	Teor Ca (% peso)	Teor P (% peso)	Relação Ca/P
Esmalte	39,05±0,08	18,41±0,14	2,12
Dentina	29,77±0,06	13,90±0,12	2,14
Cárie	25,23±0,06	12,61±0,11	2,00

O gráfico da figura 2 mostra os espectros de fluorescência de raios-X para os elementos Ca e P, respectivamente, de quatro amostras entre as quinze medidas dos diferentes dentes decíduos hígidos. O gráfico da Figura 3 mostra os espectros de fluorescência de raios-X para os elementos Ca e P, respectivamente, das regiões do esmalte, dentina e cárie da amostra de dente decíduo lesionado.

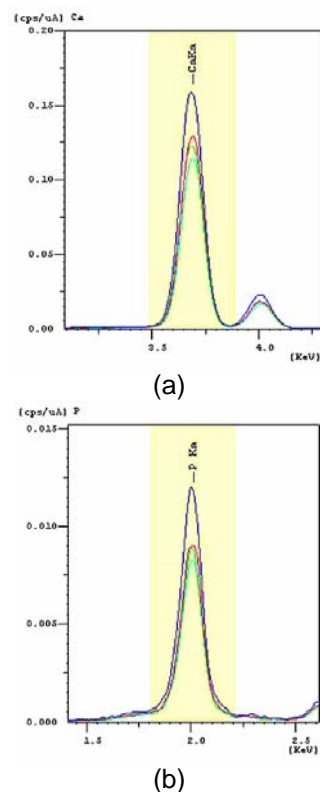


Figura 2: Espectro de fluorescência de raios-X de 4 amostras aleatórias de dentes decíduos hígidos: (a) teores de cálcio e (b) teores de fósforo

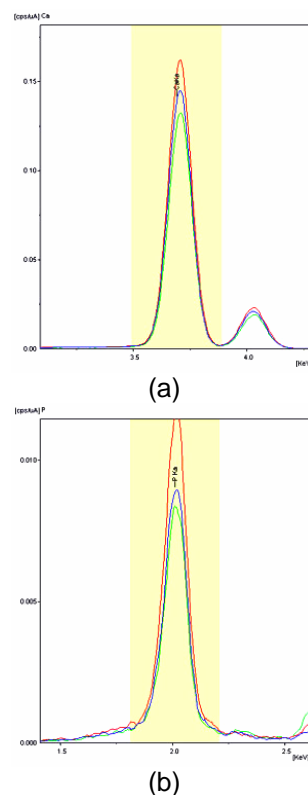


Figura 3: Espectro fluorescência de raios-X dos minerais das regiões analisadas da amostra de dente lesionado: esmalte (vermelho), dentina (azul) e lesão por cárie (verde). (a) Ca e (b) P.

Em todos os espectros, observa-se que os picos de Ca e P estão centrados em, aproximadamente, 3,68 keV e 2,01 keV, respectivamente, que corresponde exatamente à energia de transição da camada $K\alpha$ do elemento Ca (3,691 keV) e do elemento P (2,013 keV). Observa-se que há variabilidade das intensidades relativas dos picos entre as amostras. A intensidade dos picos está relacionada aos teores determinados para os elementos minerais Ca e P. Entretanto, os valores da proporção Ca/P é um fator indicativo da mineralização da hidroxiapatita dental. Quanto maior o valor desta proporção, mais a estrutura dental está mineralizada com Ca.

Discussão

Segundo Ten Cate (2001), o esmalte é o tecido mais mineralizado conhecido. É constituído por 96% de mineral sob a forma de cristais de fosfato de hidroxiapatita, e 4% de material orgânico e água, que forma uma fina rede de peptídeos firmemente ligados aos cristais de hidroxiapatita. A hidroxiapatita estequiométrica apresenta fórmula química $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$. A taxa de minerais da hidroxiapatita é determinada pela razão de Ca e P. A relação Ca/P calculada (teórica) para a hidroxiapatita estequiométrica é 1,67 que é o mesmo valor obtido experimentalmente com as condições estabelecidas neste trabalho. Entretanto, a hidroxiapatita presente nos tecidos biológicos duros apresenta uma variação deste valor dada pelo grau de mineralização do mesmo.

De acordo com a literatura, o intervalo mínimo e máximo para a proporção Ca/P da hidroxiapatita presente na estrutura dental humana está entre os valores 1,3 e 2,3 para a dentina intratubular e esmalte, respectivamente (ARNOLD et al., 2001).

As medidas do teor de Ca e P dos dentes decíduos, como confirmado pelos resultados no presente estudo, apresentaram uma grande variabilidade do teor de Ca e P. Isto indica que existem diferentes graus de mineralização das amostras. Este resultado é esperado devido às diferenças fisiológicas (intrínsecas e extrínsecas) de cada voluntário dadas por fatores cronológicos, hábitos alimentares e de higiene.

Como esperado, nota-se um decréscimo da relação mineral do dente molar decíduo lesionado na seqüência esmalte, dentina sadia e dentina desmineralizada (cárie). De fato, o esmalte é o componente mais mineralizado da estrutura dental, e a região lesionada é a mais desmineralizada.

Conclusão

Com base na metodologia e nos resultados obtidos no presente trabalho é lícito afirmar que por meio da técnica analítica de ED-XRF, é possível determinar os teores dos componentes

minerais Ca e P presentes no esmalte dentário humano decíduo. Com a validação da metodologia para a análise química quantitativa de dentes por ED-XRF, surge a possibilidade de prosseguimento do estudo. A sugestão é proceder ao tratamento das amostras para avaliar se ocorre um processo de desmineralização do esmalte provocado pelo uso contínuo do medicamento Novalgina® xarope pediátrico (dipirona sódica).

Agradecimentos

Os autores agradecem Marcela Garbi Pastore, cirurgiã-dentista residente em pacientes especiais na AACD, e Dr. Luís Eduardo Silva Soares, UNIVAP/LEVB.

Referências

- ALEXANDRE T. L., BUENO, M. I. M. S. Classification of some species, genera and families of plants by x-ray spectrometry. **X-ray spectrometry**, V. 35 (4), p. 257-260, 2006.
- BERTIN, E. P. **X-ray physics**. In: **Principles and practice of X-ray spectrometric analysis**. 2° ed, New York, Plenum Press Inc., 1975, 1078 p.
- LIEBHAFSKY, H. A., WINSLOW E. H., PFEIFFER H., **X-Ray Absorption and Emission in Analytical Chemistry**. In: **Spectrochemical Analysis with X-rays**. 2ª ed, New York, John Wiley e Sons Inc., 1966, 357 p.
- LINNETT, V.; SEOW, W.K. Dental erosion in children: a literatures review. **Pediatric Dent.**, V. 23, n.1, p.37-43, 2001.
- SALVADOR, V. L. R. **Fluorescência de raios-X**. In: **Química forense sob olhares eletrônicos**. 1° ed, Campinas, Millennium Editora, 2006, 293 p.
- SERAIDARIAN, P. I.; JACOB, M. F. Erosão dental: etiologia, prevalência e implicações clínicas. **J. Bras. Clin. Odontol. Integr.**, V.6, n.32, p. 140-144, 2003.
- TEN CATE, J. M. What dental diseases are we facing in the new millennium: some aspects of research agenda. **Caries Res.**, v.35, suppl.1, p. 2-5, 2001.
- ARNOLD, W. H.; KONOPKA, S.; GAENGLER, P. Qualitative and quantitative assessment of intratubular dentin formation in human natural carious lesions, **Calcif. Tissue Int.**, V. 69, p. 268-273, 2001.