

Área de Medicina Dentária da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

Mestrado Integrado em Medicina Dentária

**Estudo experimental da acção do ozono em
Streptococcus mutans e *Lactobacillus fermentum*,
desenvolvidos em cavidade de cárie**

Joana Rita Ferreira Marques

Orientador: Professora Doutora Eunice Vírgina Palmeirão Carrilho

Co-Orientador: Professora Doutora Teresa Gonçalves

Coimbra – 2010

**Trabalho final do 5ºano de Medicina Dentária com vista à atribuição do grau de Mestre
no âmbito do ciclo de estudos do Mestrado Integrado em Medicina Dentária da
Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra**

*“É preciso estudar muito
para saber um pouco”*

Charles Montesquieu

Aos meus pais
Aos meus irmãos
Ao João

Agradecimentos

À Professora Doutora Eunice Carrilho pelo voto de confiança e oportunidade, pelo acompanhamento e motivação, por todos os conhecimentos transmitidos.

À Professora Doutora Teresa Gonçalves pelo acompanhamento e disponibilidade, por todos os conhecimentos transmitidos.

À Dr.^a Anabela Paula, ao Dr. Paulo Ferreira e Dr. Nuno Brito, pelo auxílio no decorrer do trabalho experimental.

À Dr.^a Bárbara Oliveiros, pelo auxílio na elaboração da análise estatística.

À D. Alda por toda ajuda prestada na fase preparatória do trabalho experimental.

Aos meus Professores por todo o contributo para a minha formação.

Aos meus colegas e amigos, em especial Daniela, Luís e Rui, pelo apoio nesta jornada e pela amizade.

A todos os meus...

Índice

I – Introdução	9
1. Definição de cárie	10
2. Etiologia.....	11
3. Interações entre o dente e os fluidos orais.....	14
4. Epidemiologia	15
5. Classificação	16
6. Diagnóstico.....	17
7. Tratamento	18
8. Ozono.....	20
9. HealOzone.....	24
10. Indução Artificial de Cárie	25
11. Flúor.....	28
II – Trabalho Experimental	30
1. Objectivos.....	31
2. Materiais e Métodos	32
2.1 Fase Preparatória.....	32
2.2 Fase Experimental.....	32
2.3 Análise estatística.....	40
3. Resultados.....	41
4. Discussão	48
5. Conclusões.....	55
III - Bibliografia	57
IV - Anexos.....	60
Anexo I	61
Anexo II	62
Anexo III	63

Resumo

A lesão de cárie ocorre devido à dissolução ácida do esmalte e/ou dentina como consequência do metabolismo de microrganismos específicos, sendo os principais o *Streptococcus mutans* e o *Lactobacillus fermentum*. O ozono é um oxidante poderoso que tem a capacidade de eliminar bactérias, fungos e vírus. O HealOzone (KaVo Dental) é usado em lesões de cárie, permitindo a eliminação dos microrganismos através da exposição destes ao ozono. Uma vez eliminadas as bactérias ocorre remineralização da área tratada. Esta pode ser auxiliada por produtos com flúor, especialmente concebidos para o efeito, ou através da acção dos minerais da própria saliva.

Com o presente trabalho pretende-se avaliar: a eficácia na indução de cárie do protocolo usado; a eficácia do ozono na eliminação das bactérias cariogénicas e a capacidade de remineralização dos dentes após aplicação do ozono seguido dos suplementos de flúor fornecidos pelo fabricante.

Extraíram-se 60 dentes (pré-molares e molares) isentos de cárie. Constituíram-se 5 grupos. Os dentes do grupo I foram imersos em saliva artificial. Os dentes do grupo II foram inoculados com *Streptococcus mutans* e imersos em saliva artificial. Os dentes do grupo III foram inoculados com *Lactobacillus fermentum* e imersos em saliva artificial. Os dentes do grupo IV foram inoculados com *S. mutans* e *L. fermentum* e imersos em saliva artificial. Os dentes do grupo V foram inoculados com *S. mutans* e *L. fermentum*, e foram sujeitos à aplicação do ozono e à acção de um gel mineralizante de flúor (fornecido pelo fabricante). Após aplicação do ozono foi aplicado diariamente produtos do estojó de remineralização fornecidos pelo fabricante. Foi avaliada a presença de cárie com o DiagnoDent (KaVo Dental), no final foi feita uma recolha das cavidades para análise e avaliação da actividade bacteriana. Foi efectuada análise estatística, apresentando-se os valores médios e erro padrão para cada medição, foi realizada a análise inferencial com recurso ao teste t-Student e à ANOVA. Toda a análise de dados foi efectuada através da aplicação SPSS, versão 18, tendo os testes estatísticos sido avaliados ao nível de significância de 5%.

Na medição inicial todos os grupos tinham valores idênticos, houve um aumento estatisticamente significativo na avaliação final. Verifica-se que os grupos I, II, III e IV apresentam valores finais semelhantes, no entanto cada um deles apresenta um valor médio, na medição final, significativamente inferior ao do grupo V.

As bactérias em estudo mostraram-se eficazes a produzir cárie nos dentes imersos em saliva artificial. No grupo sujeito à aplicação de ozono verificou-se a remineralização das lesões de cárie produzidas pelo protocolo de indução de cárie usado. A terapêutica com ozono é vantajosa em dentisteria minimamente invasiva, uma vez que mantém o tecido saudável, não requer anestesia e com um procedimento simples e não moroso apresenta resultados satisfatórios.

Abstract

A caries lesion is due to acid dissolution of enamel and/or dentin as consequence of the metabolism of specific microorganisms, the main *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus fermentum*. Ozone is a powerful oxidant that has the ability to eliminate bacteria, fungi and viruses. The HealOzone (KaVo Dental) is used in caries lesions, allowing the elimination of these microorganisms through exposure to ozone. Once eliminated bacteria remineralization occurs in the treated area. This can be aided by products with fluoride, especially designed for the effect or by the action of own saliva mineral.

The present work aims to assess: the effectiveness in inducing caries of protocol used, the effectiveness of ozone in the elimination of cariogenic bacteria and the ability to remineralization of the teeth after application of ozone, followed of fluoride supplements provided by the manufacturer.

Were extracted 60 teeth (premolars and molars) free of caries. Five groups were constituted. The teeth in Group I were immersed in artificial saliva. The teeth in group II were inoculated with *Streptococcus mutans* and immersed in artificial saliva. The teeth of group III were inoculated with *Lactobacillus fermentum* and immersed in artificial saliva. The teeth in group IV were inoculated with *S. mutans* and *L.fermentum* and immersed in artificial saliva. The teeth in group V were inoculated with *S. mutans* and *L. fermentum*, and were subjected to application of ozone and subjected to the action of a fluoride gel mineralizing (supplied by manufacturer). After application of ozone, products of remineralization kit supplied by the manufacturer were applied daily. Caries were evaluated with the DIAGNOdent (Kavo Dental), at the end samples were collected for analysis and evaluation of bacterial activity. The statistical analysis was performed, presenting the average values and standard error for each measurement, the inferential analysis was performed using the t test Student and ANOVA. All data analysis was performed by applying SPSS, version 18, and statistical tests were evaluated at the level of 5% significance.

In the initial measurement all groups had identical values, in the final evaluation was an increase statistically significant. It appears that the groups I, II, III and IV show similar final values, however each of them has an average value in the final measurement, significantly less the group V.

The bacteria studied were effective to produce tooth decay immersed in artificial saliva. In the group subjected application of ozone was found remineralization of carious lesions produced by the caries induction protocol used. Ozone therapy is advantageous in minimally invasive dentistry, because it maintains healthy tissue, does not require anesthesia and with a simple and not time consuming procedure gives satisfactory results.

I – Introdução

1. Definição de cárie

A cárie dentária é uma doença crónica que afecta todas as populações, desde a evolução humana, e é um dos factores responsáveis pela dor e perda dentária.¹

Em 1914, Black definiu cárie dentária como a "...dissolução química dos sais de cálcio do dente pelo ácido láctico, acompanhada pela decomposição da matriz orgânica, ou corpo gelatinoso, que, na dentina, ocorre após a dissolução de sais de cálcio. Na cárie de esmalte, toda a substância tecidual é removida pela dissolução de sais de cálcio, havendo tão pouca matriz orgânica no esmalte que ele não se irá manter íntegro e, conseqüentemente, uma cavidade é formada pela simples dissolução dos sais de cálcio dos quais o esmalte é composto. Esta dissolução inicia-se na superfície, nunca no interior. A destruição do dente é, portanto, causada por um agente que actua fora do dente, actuando na superfície no início e penetrando pouco a pouco no seu interior." ¹

Actualmente a cárie dentária pode ser definida como uma doença multifactorial, infecciosa, caracterizada pela desmineralização localizada dos tecidos duros do dente, causada pelos produtos acidícos resultantes da fermentação bacteriana dos hidratos de carbono.¹⁻² É uma doença crónica de progressão lenta, na maioria dos casos, e na ausência de tratamento, pode levar à destruição total do dente. Esta pode afectar o esmalte, a dentina e o cemento.¹⁻²

2. Etiologia

Somente nos últimos 120 anos é que se soube que as cáries eram mediadas por bactérias, quando o Dr. Miller apresentou a teoria químico-parasitária, em 1890. Todavia as limitações da tecnologia na época não permitiram a identificação de patogénicos específicos, por isso toda a placa bacteriana era vista como patogénica. Em 1924, Clarke identificou o *Streptococcus mutans* em lesões de cárie, 36 anos mais tarde Fitzgerald e Keyes descobriram que estas bactérias eram capazes de induzir cárie em *hamsters*. Na mesma época foi estudado um grupo de recrutas da U.S. Navy, para examinar os níveis de *S. mutans*, no qual concluíram que os recrutas com baixos níveis de *S. mutans* não apresentavam cárie, enquanto os recrutas com níveis de *S. mutans* elevados apresentavam elevados níveis de cárie. Outros investigadores demonstraram que os bebés recém-nascidos, antes da erupção dos primeiros dentes não apresentam *S. mutans*, no entanto aos 5 anos, mais de metade já os tinham. Berkowitz e Jordan mostraram que as crianças infectadas tinham o mesmo microrganismo das mães.³

Foram vários os estudos que mostraram que em seres humanos as cáries são uma constatação de infecção bacteriana, mediada primariamente por *S. mutans*, sendo estes transmitidos pela saliva dentro da unidade familiar³. Os *Lactobacillus fermentum* estão também associados ao processo de cárie, não sendo responsáveis pelo estabelecimento deste, uma vez que não possuem capacidade de adesão como os *S. mutans*.³

Outros estudos realizados nos anos 30 e 40, focaram o papel da nutrição no processo de cárie, mostram o papel da nutrição na susceptibilidade à cárie. Mais tarde foi comprovada a forte correlação entre o consumo de açúcar e a presença de cárie.¹

Até à actualidade não foi descoberto nenhum factor que, isoladamente seja indutor de cárie, ao invés disso são propostos vários factores.¹ Se não existir um acúmulo de bactérias orais sobre a superfície do dente, não se dará início ao processo de cárie, no entanto mesmo que os dentes estejam cobertos por placa bacteriana, o processo pode não ser iniciado. Assim, a cárie é produto de vários factores, como os microrganismos, a dieta, os dentes e a saliva, resultando na actividade metabólica das bactérias que vão fermentar os hidratos de carbono da dieta produzindo ácido láctico.^{2, 4} A actividade metabólica leva a alterações de pH na interface da superfície dentária e os depósitos bacterianos, produzindo um desequilíbrio entre o esmalte e o fluído da placa, causando a perda de minerais do dente quando o pH baixa, ou o ganho de minerais quando o pH aumenta.¹ O resultado cumulativo destes processos de desmineralização e remineralização pode ser a perda líquida de minerais, conduzindo à dissolução dos tecidos dentários e à formação de cárie.¹

Há três hipóteses *major* para a etiologia das cáries dentárias: a da placa específica, a da placa não específica e a da placa ecológica.⁵ A hipótese da placa específica defende que a lesão de cárie é provocada apenas por algumas espécies bacterianas como o *S. mutans*. A hipótese da placa não específica defende que a lesão de cárie é o resultado de toda a actividade da microflora, sendo esta composta por várias espécies. Por último, a hipótese da placa ecológica, em que a lesão de cárie é resultado das mudanças no equilíbrio da microflora devido a alterações no ambiente oral.⁵

As bactérias associadas tradicionalmente à cárie têm sido identificadas usando métodos baseados em culturas. Actualmente têm se recorrido a métodos moleculares para identificar as bactérias.⁵

Em 2002, Becker e *col* compararam as espécies bacterianas encontradas em cáries de dentes permanentes em crianças. Algumas espécies foram associadas a um estado de ausência de cárie, como o *Streptococcus sanguinis*, enquanto outras foram associadas à presença de cárie como o *S. mutans*, outros *Streptococcus spp.*, *Veillonella spp.*, *Actinomyces spp.*, *Bifidobacterium spp.* e *L. fermentum*.⁵

Munson e *col* em 2004 usaram culturas e técnicas moleculares, para determinar as espécies associadas a cáries em adultos. Estes demonstraram a presença de *S. mutans*, *Lactobacillus spp.*, *Rothia dentocariosa* e *Propionibacterium spp.*⁵

Em 2005, Chour e *col* usaram também técnicas moleculares, para determinar a diversidade microbiana em cáries avançadas em adultos. Ficou demonstrado uma abundância de espécies do género *Lactobacillus*, *Prevotella*, *Selenomonas*, *Fusobacterium*, *Eubacterium*, *Olsenella*, *Bifidobacterium* e *Propionibacterium*. O *S. mutans* não foi comumente detectado.⁵

Corby e *col*, em 2005, examinaram as bactérias associadas a cárie dentária em 204 gémeos com idades entre os 1,5 e 7 anos de idade. Foram associadas à cárie, espécies de *Actinomyces*, *S. mutans* e *Lactobacillus spp.*⁵

Um estudo realizado por Aas e *col*, identificou as bactérias presentes em esmalte intacto, lesões de mancha branca, e lesões de dentina profundas. Demonstraram que a etiologia bacteriana das cáries, envolve outras espécies produtoras de ácido para além do *S. mutans*. Ficou também demonstrado que o *S. mutans* e o *Lactobacillus spp.* são dominantes nas cáries avançadas. Estes demonstraram que há espécies específicas de bactérias presentes num estado de ausência de cárie, na iniciação de cárie e na progressão da mesma. Contudo, há variação de indivíduo para indivíduo na composição bacteriana, o que suporta a teoria da placa ecológica, em que alterações dos factores ecológicos, requerem diferentes características bacterianas e estimulam alterações na composição bacteriana.⁵

Moore e Moore em 1994 e Paster e col em 2002 referem que a placa dentária é um biofilme que contém aproximadamente 500 espécies microbianas.⁶ Wall-Manning em 2002 refere que a placa dentária é um agente causal do processo de cárie, e que esta tem uma predominância Gram-positiva. Refere também, que o cariz cariogénico da placa surge quando as populações, normalmente baixas, de bactérias acidogénicas e acidúricas aumentam em resposta à elevada acidificação da placa, resultante do metabolismo dos hidratos de carbono provenientes da dieta, o que suporta a hipótese da placa ecológica.⁶

3. Interações entre o dente e os fluidos orais

Quando um dente erupciona na cavidade oral, está, em princípio, totalmente mineralizado, no entanto tem sido sugerido que este sofre uma maturação pós-eruptiva, supõe-se que os iões minerais e de flúor da cavidade oral se difundem para o interior do esmalte, o que têm sido explicado pelo facto de a concentração de flúor na superfície do esmalte aumentar após a erupção.¹ O esmalte, normal e hígido, é constituído por cristais de hidroxiapatite, organizados em prismas e no esmalte interprismático.¹ Através da microscopia electrónica de varrimento é possível observar que, apesar da união entre os cristais ser muito firme, existem espaços de tamanho muito reduzido a separá-los, denominados de microporos ou poros de esmalte. Estes espaços formam uma rede de vias de difusão no esmalte, estando preenchidos por água, lípidos e proteínas de origem do desenvolvimento. A presença desta matéria orgânica irá alterar os processos de difusão e as reacções da fase mineral com os factores ambientais da cavidade oral.¹

As superfícies oclusais dos dentes são particularmente susceptíveis à localização do processo carioso, uma vez que o crescimento da placa nestes sítios está mais facilitado, devido à estagnação da placa, nas fossas e fissuras. Devido, também, ao facto de a desmineralização do esmalte seguir a direcção dos prismas, a justaposição destes é maior no interior, uma vez que vão convergir nas fissuras e fossas. Assim, a direcção dos prismas de esmalte nestes locais não é totalmente perpendicular à junção amelo-dentinária, como nos outros locais. Uma lesão de cárie nestes locais resulta num padrão radial.⁷ Um facto também importante para a ocorrência de lesões de cárie neste local é o facto da espessura do esmalte ser inferior aos outros locais, é de 1 mm, enquanto nas cúspides de pré-molares, molares é de 3mm, nos bordos incisais é de 2mm e no canino é de 2,5 mm. Nos colos cervicais dos dentes é de 0,5mm.⁸

4. Epidemiologia

A cárie dentária tem vindo a sofrer um contínuo declínio na sua prevalência desde os anos 70, nos países industrializados, devido: à introdução do flúor na água, nos dentífricos e outros produtos dentários; à melhoria na higiene oral e profilaxia; ao acesso aos cuidados de saúde.⁹ Em Portugal têm havido um esforço contínuo nos últimos 20 anos, seguindo as directrizes da Organização Mundial de Saúde (OMS) para a promoção da saúde e prevenção das doenças orais, cuja monitorização tem sido feita pela Direcção-Geral da Saúde. A última monitorização foi realizada no ano lectivo de 2005/2006 em crianças de 6, 12 e 15 anos e o índice CPOD (Dentes Cariados, Perdidos ou Obturados) foi de 0,07, 1,48 e 3,04, respectivamente. Deste estudo destaca-se o facto de 51% das crianças aos 6 anos de idade estarem livres de cárie.¹⁰ Estes resultados mostram-se bastante animadores, uma vez que as metas da OMS para 2010, em relação ao índice CPOD em crianças com 12 anos era de 1,50 e, em Portugal em 2006, já apresentavam um índice inferior.¹⁰

A cárie dentária é uma das doenças crónicas infecciosas mais comuns no mundo.⁵ É de fulcral importância não só a contínua prevenção das doenças orais, na qual a cárie desempenha um papel central, como também, a busca contínua de tratamentos menos invasivos, e menos dispendiosos.

No Estudo Nacional de Prevalência das Doenças Orais foi também alvo de avaliação a qualidade de vida em saúde oral. Esta dimensão foi definida como a experiência de dor ou desconforto, percebida pelos indivíduos, em actividades do dia-a-dia tais como comer, escovar os dentes e/ou ingerir alimentos quentes ou frios. O estudo revela que aos 12 anos 35% e aos 15 anos 42% das crianças referiu sentir dor nos últimos 6 meses, ao realizar estas actividades.¹⁰ A dor e o desconforto são as consequências mais frequentes das lesões de cárie não tratadas¹. Embora os tratamentos restauradores sejam cada vez menos isentos de dor, nem sempre é possível suprimir-se a dor da injeção da anestesia local. Para que pode levar ao deferimento do tratamento, podendo levar à progressão da cárie. Pode-se afirmar que o processo de cárie pode ter um impacto significativo na qualidade de vida.¹ Na busca por tratamentos cada vez menos invasivos, um dos parâmetros inerentes deverá ser a ausência de dor, a dispensa de anestesia, permitindo maior adesão dos doentes a estes tratamentos o mais precocemente possível.

5. Classificação

A cárie dentária pode ser classificada de várias formas, uma destas refere-se à sua localização anatômica, podendo ser diferenciadas em coronárias ou radiculares.⁹ As cáries primárias são lesões que nunca foram restauradas, as secundárias ou recorrentes dizem respeito a lesões que se desenvolvem adjacentes a restaurações.⁹ As cáries ocultas designam cáries que atingem a dentina e não são detectadas pelo exame visual, no entanto no exame radiográfico são identificadas.⁹ Black propôs dois tipos de classificação para as cavidades de cárie, uma baseada nas áreas dos dentes susceptíveis à cárie: cáries de fossas e fissuras, cáries de superfícies lisas; a outra classificação é artificial, classificando em classes que requerem a mesma técnica de instrumentação e restauração, assim temos cinco classes: classe I (cavidades preparadas na face oclusal de pré-molares e molares, $\frac{2}{3}$ oclusais da face vestibular dos molares e na face lingual dos incisivos superiores e face palatina de molares superiores), classe II (cavidades preparadas nas faces proximais dos pré-molares e molares), classe III (cavidades preparadas nas faces proximais dos dentes anteriores, sem remoção do ângulo incisal), classe IV (cavidades preparadas nas faces proximais de dentes anteriores, com remoção e restauração do ângulo incisal ou cavidades resultantes de traumatismos coronários) e classe V (cavidades preparadas no terço cervical das faces vestibulares e linguais de todos os dentes, todavia podem não ser devidas a processos de cárie, mas sim a processos de perda não cariiosa de tecido dentário, como: a abrasão, a erosão, a atricção e a abfracção).^{11 12-13}

6. Diagnóstico

O diagnóstico das lesões de cárie é efectuado após o exame visual e táctil das superfícies dentárias, no entanto pode ser necessário recorrer a exames auxiliares de diagnóstico.¹ O exame radiográfico, é o exame auxiliar mais frequente, contudo vários instrumentos foram desenvolvidos para auxiliar o diagnóstico e quantificação de cárie.¹ Os métodos de diagnóstico quantitativos baseiam-se na interpretação dos sinais físicos.¹ Inicialmente, os sinais são obtidos, utilizando um aparelho receptor e, posteriormente, a intensidade do sinal obtido é quantificado e classificada.¹ Os métodos de diagnóstico quantitativos, actualmente descritos na literatura e disponíveis no mercado, baseiam-se em princípios físicos.¹ Os métodos quantitativos podem usar os raios X, a luz visível, a luz laser, a corrente eléctrica e os ultrassons.¹ A luz laser é composta por ondas electromagnéticas de comprimentos de onda e amplitudes iguais¹, alguns materiais têm a capacidade de fluorescer quando iluminados com a luz laser. O esmalte e a dentina têm propriedades de fluorescência, a lesão de cárie, a placa bacteriana e os microorganismos também têm estas propriedades.¹ Um instrumento desenvolvido para diagnóstico e quantificação de cárie foi o DIAGNOdent[®], que se baseia na fluorescência tecidual induzida pela luz laser. A diferença entre a fluorescência proveniente do tecido dentário e da lesão de cárie pode ser quantificada pelo DIAGNOdent[®] pen 2190 (versão actualizada do DIAGNOdent[®]), quantificando a existência de cárie. De acordo com os valores do DIAGNOdent[®] pen 2190, a KaVo recomenda terapias diferentes, referidas na tabela em anexo. O uso do DIAGNOdent[®] pen 2190 tem vantagens no âmbito da terapêutica minimamente invasiva, no entanto, os valores obtidos não devem ser o único factor a ser tomado em conta na decisão terapêutica, outros factores como a história de cárie, a frequência de ingestão de açúcares, a produção de saliva e a presença de bactérias cariogénicas têm de ser tidos em conta.⁹ Antes de se usar o DIAGNOdent[®] pen 2190 é recomendado que os dentes estejam limpos, sem placa bacteriana e secos, sem saliva.¹⁴

Na interpretação dos valores do DIAGNOdent[®] pen 2190, é necessário ter em consideração que podem existir falsos positivos, estes podem ocorrer nas seguintes situações: dentes com placa bacteriana, restaurações com compósitos fluorescentes, proximidade da polpa, resíduos alimentares nas fissuras, pastas profiláticas, cáries remineralizadas, fluorescência natural aumentada e doentes expostos a radiação.¹⁴

7. Tratamento

Quando falamos nas estratégias de abordagem das cáries, a ênfase tem sido dada aos tratamentos preventivos e aos procedimentos remineralizadores nos processos de cárie detectados precocemente.^{1,9}

Uma abordagem precoce pretende controlar a formação do biofilme bacteriano sobre a superfície dentária e o processo de desmineralização/remineralização. Para tal, há procedimentos que assumem um papel relevante, como a remoção mecânica/química da placa bacteriana e a modificação da dieta.¹⁵ A escovagem dentária, regular, nas crianças ajuda a reduzir a incidência de cárie⁹. Esta deve ser auxiliada por uma pasta dentífrica com flúor e pode, também, ser complementada pelo uso da clorhexidina, como um controlo químico da placa bacteriana.⁹

Um dos procedimentos mais realizados para prevenir cárie consiste na aplicação de selantes de fissuras. A evidência indica que determinadas lesões não progridem desde que o selante permaneça no local.⁹ Os materiais utilizados para selar uma lesão incluem diferentes tipos de resina composta (a última geração contém flúor) e cimentos de ionómero de vidro.⁹ A eficácia dos selantes de resina para prevenção de cáries, em dentes permanentes de crianças e adolescentes, foi demonstrada por Ahovuo-Saloranta e *col*, em 2004, numa revisão sistemática da Cochrane.⁹

Na presença de uma cárie temos várias opções de tratamento, tais como: não efectuar nenhuma intervenção e fazer a monitorização das superfícies desmineralizadas não cavitadas; efectuar tratamento preventivo não-invasivo ou efectuar um tratamento invasivo. A decisão terapêutica vai depender de vários parâmetros, como por exemplo, a profundidade do processo de cárie, a presença de mais dentes cariados, a existência de outros dentes restaurados, a vontade do doente, as condições de higiene oral e o tipo de dieta, entre outras.⁹

Nas lesões cavitadas a decisão torna-se mais simples, uma vez que a opção de tratamento é a intervenção restauradora, para remover o tecido cariado e a restauração da cavidade.⁹ Nas lesões que não estão cavitadas a decisão é mais complexa, podendo optar-se por dois tipos de abordagem, uma abordagem invasiva assumindo que a lesão vai progredir e que esta está activa ou, uma abordagem conservadora, com o intuito de que é possível parar a progressão de cárie. É nesta última abordagem que cada vez mais tem sido colocado ênfase, havendo cada vez mais investigação nesta área e novos procedimentos, envolvendo o flúor e o processo de remineralização.¹⁶

O conceito de dentisteria minimamente invasiva é uma filosofia contemporânea, que se foca na avaliação do risco de cárie do doente e utiliza tecnologias específicas para a sua detecção precoce, permitindo nas abordagens modernas de intercepção e tratamento¹⁵. Estas abordagens podem ser divididas em intervenções não invasivas das quais fazem parte a educação para a higiene oral e dieta, a aplicação tópica de flúor, o controlo químico da placa bacteriana, a aplicação de selantes de fissuras e o ozono.¹⁵ Podemos considerar intervenções invasivas selectivas: a eliminação de fissuras, a remoção química de cárie e a remoção selectiva de cárie, utilizando um laser.¹⁵ Podem ser intervenções minimamente invasivas, as que incluem um desenho conservador de cavidades e a reparação de restaurações.¹⁵

As intervenções não invasivas centram-se na prevenção de cáries e na preservação do esmalte e dentina desmineralizada, mas sem a presença de cavidade. Nestas condições julga-se ser possível o “*restitutio ad integrum*”, pela eliminação de bactérias e dos produtos do seu metabolismo e possibilitando o processo de remineralização, usando fluoretos.¹⁵ Os efeitos antimicrobianos do ozono são conhecidos à muitos anos.⁹ A aplicação directa deste, em gás, nas superfícies coronárias ou radiculares, parece ter um efeito de esterilização.¹⁷ Refere-se que este é capaz de retardar, parar, ou ainda, reverter o processo de cárie¹⁵. Acredita-se que o ozono é, também, útil na redução da flora microbiana em lesões cavitadas, antes de se proceder à restauração da cavidade.¹⁵

8. Ozono

O ozono foi descoberto em 1834 por Schönbein. Este realizou uma descarga eléctrica pela água, e sentiu um cheiro estranho, que denominou de ozono. Mais tarde considerou o ozono como um oxidante e desinfectante.¹⁸ Durante a I Guerra Mundial este teve uma aplicação notável na terapêutica da gangrena, ainda hoje é amplamente usado na esterilização da água.¹⁸ O primeiro dentista a usar o ozono foi Edward Fisch em 1950, usou-o para tratar um cirurgião australiano. Este passou-o a usar e dedicou a sua pesquisa à sua aplicação nos cuidados de saúde.¹⁹ Na época, a terapêutica com ozono era bastante limitada devido à escassez de materiais que lhe eram resistentes, como o nylon, o dacron e o teflon.¹⁹ Foi também nesta época que dois alemães desenvolveram o primeiro gerador de ozono para uso médico.¹⁹ Este gerador continua a ser a base dos equipamentos modernos com os mesmos fins.

O ozono é um composto químico constituído por três átomos de oxigénio (O_3 – oxigénio triatómico) com uma estrutura cíclica. Está presente na estratosfera, na forma de gás, tendo a capacidade de filtrar os raios UV, sendo esta propriedade de extrema importância para manter o equilíbrio na biosfera. Esta camada protectora é a camada responsável pela coloração azul do céu.¹⁹ No entanto a presença deste gás na troposfera é tóxico para o tracto respiratório.²⁰ Relativamente ao oxigénio o ozono, é 1,6 vezes mais denso e 10 vezes mais solúvel na água.²⁰ Embora o ozono não seja um radical, é o terceiro oxidante mais potente ($E^0 = +2.076$ V) a seguir ao fluorino e ao persulfato. O ozono é produzido naturalmente por dois processos: por descargas eléctricas (produzidas nas tempestades, por exemplo) em que a molécula de oxigénio (O_2) ao receber uma descarga eléctrica se separa em dois átomos de oxigénio, que se vão combinar formando a molécula do ozono; ou pelos raios UV emitidos pelo sol, que funcionam como as descargas eléctricas no oxigénio presente na estratosfera, criando uma camada de ozono que absorve a maioria da radiação UV emitida pelo sol.²¹ Existem três sistemas para gerar ozono. O sistema que produz ozono pelos raios UV, é mais utilizado na área da estética, sendo aplicado em saunas. Outro sistema é o plasma frio, usado para a purificação do ar e da água. Por último o que é aplicado na área da medicina é o sistema de descargas que permite um maior controlo e é utilizado para produzir ozono em elevadas concentrações.²¹

O ozono usado em Medicina é uma mistura de oxigénio puro e ozono puro, numa proporção de 0,05% a 5% de ozono, para 95% a 99,5% de oxigénio.^{15, 19-20} Este é produzido a partir do oxigénio puro, passando por uma alta voltagem (5-13mV).^{15, 20} A molécula de ozono é bastante instável, por isso este só deve ser preparado imediatamente antes uso,

uma vez que se decompõe rapidamente em moléculas de oxigénio. Devido ao ser elevado poder oxidativo, todos os materiais com que o ozono entra em contacto devem ser resistentes ao seu efeito, tais como o aço-inoxidável, o vidro, o silicone e o teflon.²⁰

De acordo com a lei de Henry, todos os gases se dissolvem em água pura, estando dependente da temperatura, pressão e concentração do gás.²⁰ A dissolução em água pura é a única situação em que o ozono não reage, formando a água ozonada, que se mantém activa durante alguns dias, sendo usada como desinfectante.²⁰ Ao entrar em contacto com os fluidos corporais, o ozono reage de imediato, dissolvendo-se na água biológica (plasma, linfa e urina).^{15, 20} Este, reage preferencialmente com os ácidos gordos polinsaturados, os antioxidantes e os compostos tiol, como a cisteína, glutatona e albumina.^{15, 20} Os carboidratos, enzimas e RNA podem também ser afectados pelo ozono, dependendo da dose.^{15, 20} A reacção do ozono com os componentes anteriores é uma reacção de oxidação, actuando estes como dadores de electrões. Os produtos desta reacção são as espécies reactivas de oxigénio e os produtos lipídicos da oxidação.^{15, 20} A espécie de oxigénio reactiva mais importante é o peróxido de hidrogénio, uma vez que é este que vai actuar como mensageiro do ozono, desencadeando os seus efeitos terapêuticos. O excesso de espécies de oxigénio reactivas também pode ser prejudicial, uma vez que pode resultar na produção de outros compostos tóxicos.^{15, 20} Embora estes sejam decompostos em menos de um segundo, podem danificar células.^{15, 20} Assim a produção destes tem que ser estritamente calculada de modo a obtermos, apenas, efeitos terapêuticos, sem danos. Nas doses terapêuticas, o ozono é capaz de desencadear uma variedade de respostas biológicas, que podem reverter infecções crónicas, doenças autoimunes, aterosclerose, processos degenerativos e cancro.²⁰ Todavia a ozonoterapia só deve ser usada quando todas as terapêuticas médicas convencionais foram esgotadas.¹⁵ Dado o seu poder oxidativo, induz a destruição das paredes celulares e das membranas citoplasmáticas em bactérias e fungos²²⁻²³. Sendo também activo contra alguns vírus, alguns autores referem que a terapêutica com ozono é indicada em 260 patologias diferentes.¹⁹

A aplicação de ozono está contra-indicada nas seguintes situações: gravidez, deficiência da glucose-6-fosfato desidrogenase (favismo), hipertiroidismo, anemia severa, miastenia severa e hemorragias activas.

Os efeitos secundários do ozono estão relacionados com a sua inalação, uma vez que este é tóxico para o sistema pulmonar. As manifestações mais comuns de intoxicação pelo ozono são a epífora, a rinite, a tosse, as cefaleias, as náuseas e os vómitos.²¹ A frequência destes é bastante baixa, sendo na ordem de 0,0007 em cada aplicação.²¹ No caso de ocorrer intoxicação pelo ozono, os doentes devem ser colocados em posição de supina, deve ser administrado oxigénio puro por máscara, ácido ascórbico e vitamina E.²¹

A OSHA, “U.S Occupational, Safety and Health Administration”, recomendou como limites de segurança para a exposição ao ozono 0,06 ppm por 8h considerando 5 dias a uma semana, ou, 0,3 ppm por 15 min.¹⁷ Concentrações de 50 ppm por 60 minutos podem ser fatais.¹⁷

O ozono pode ser administrado, na generalidade, por duas vias: a sistémica, que consiste na passagem extra corporal do sangue por uma solução de ozono, e a aplicação tópica, que é a via aplicada na medicina dentária.²⁰

Actualmente existem dois equipamentos para aplicação do ozono em medicina dentária. Um dos equipamentos é o HealOzone desenvolvido pela CurOzone USA Inc. e distribuído pela KavoDental (Kavo GmbH, Biberach, Alemanha), gera elevadas concentrações de ozono (2100 ppm, 0,052% v/v no ar a uma taxa de 13,33 ml por segundo).²⁰ Este equipamento possui um sistema de vácuo, que permite uma selagem à volta do dente, só sendo o ozono aplicado após estar estabelecido o vácuo.²⁰ Se este não for conseguido o equipamento não opera e não gera o ozono. O outro equipamento é o Ozi-cure (PO Box 68992, Centurion, South Africa), que não se encontra licenciado na Europa, estando só disponível em alguns mercados, como na África do Sul. Este usa concentrações de ozono mais baixas e não permite a obtenção do vácuo antes da aplicação, facto que levanta questões relativamente à segurança do seu uso. Um estudo realizado por Millar em 2007 comparou a segurança dos dois aparelhos, concluindo que com a ausência de vácuo os valores de ozono medidos no ar durante aplicação atingiam $1,33 \pm 0,52$ ppm, o que ultrapassa o limite de segurança de 0,3ppm em 15 min; com o HealOzone não foram detectáveis valores de ozono no ar, considerando este equipamento como seguro.¹⁷ Um outro estudo realizado por Johansson e *col*, em 2007, para testar os níveis de ozono adjacentes a um sistema de libertação de ozono, considerou o equipamento HealOzone como seguro.²⁴

A aplicação do ozono em medicina dentária tem sido advogada para a esterilização de cavidades, de canais radiculares, de bolsas periodontais e de lesões herpéticas.²¹ No entanto, a sua indicação *major* é o tratamento de cáries.^{9, 24} Têm sido reportadas outras aplicações do ozono na área da medicina dentária.²¹ Foi realizado um estudo para avaliar a eficácia de um sistema de libertação do ozono no tratamento da hipersensibilidade dentinária, embora no grupo em que foi aplicado o ozono tenha havido redução da hipersensibilidade, não houve diferenças em relação ao grupo controlo com placebo.²⁵ Outra aplicação reportada foi a prevenção de lesões de mancha branca durante o tratamento ortodôntico com *brackets*. Todavia o ozono não se mostrou mais eficaz na prevenção que os outros produtos com flúor.²⁶ Oizumi e *col* em 1998, Murakami e *col* em 2002, Arita e *col* em

2005 e Estrela e col em 2006 realizaram estudos que demonstraram a eficácia antimicrobiana do ozono em gás na desinfecção de próteses.⁹

9. HealOzone

O HealOzone[®] é composto por um filtro de ar, uma bomba de vácuo, um gerador de ozono e uma peça de mão para acoplar as pontas de silicone. As pontas de silicone estão disponíveis em 5 tamanhos diferentes, variando o seu diâmetro de 3 a 8 mm. O equipamento requer corrente eléctrica para poder gerar o ozono a partir do ar e para depois transformar o ozono em oxigénio quando o processo estiver completo.⁹

O ozono só é libertado através do fluxo de ar, quando o vácuo é estabelecido. O fluxo de ar dá-se a uma taxa de 615cm³ por minuto mantendo a concentração de ozono a 2100 ppm. Este procedimento demora entre 20 a 120 segundos.⁹ O procedimento do HealOzone[®] consiste na aplicação de ozono em gás, no uso de agentes remineralizantes e num estojo de higiene oral para dar ao doente. Após a aplicação do ozono na superfície dentária é aplicada uma solução remineralizante, denominada de redutora, que contém flúor, cálcio, zinco, fosfato e xilitol, dispensada numa ampola. Após o procedimento terapêutico é fornecido aos doentes um estojo, que contém um spray, uma pasta dentífrica e um colutório, todos contêm flúor, cálcio, zinco, fosfatos e xilitol, com o objectivo de promover o processo de remineralização.⁹

10. Indução Artificial de Cárie

A simulação do meio oral em laboratório tornou-se necessária devido aos problemas éticos associados aos estudos *in vivo* e à complexidade do meio oral.²⁷ Para a simulação do meio oral foram desenvolvidos modelos laboratoriais.²⁷ A estes modelos laboratoriais é dado o epíteto de “boca artificial”.²⁷ O princípio de uma boca artificial é fornecer os nutrientes necessários para a sobrevivência das bactérias da placa bacteriana e para o crescimento de biofilmes, de modo a mimetizar as condições da cavidade oral *in vivo*.²⁷ Durante os procedimentos experimentais, recorrendo a modelos artificiais é possível observar em tempo-real o crescimento e desenvolvimento da placa bacteriana/biofilmes. Podendo ser alvo de análises microbiológica, bioquímica, molecular.²⁷

Magitot e Miller no século XIX, propuseram o conceito do sistema de boca artificial.²⁷ A investigação de Magitot envolvia a colocação de dentes extraídos num meio bacteriológico.²⁷ A de Miller consistia na inoculação em dentes extraídos de uma mistura de saliva e pão.²⁷ Estas investigações levaram ao desenvolvimento de lesões de cárie artificiais idênticas às cáries naturais.²⁷ Miller afirmou que era claramente possível induzir desmineralização nos dentes *in vitro* e que não é possível diferenciar as cáries induzidas artificialmente das *in vivo*.²⁷ Muitos investigadores, seguiram o exemplo de Miller e Magitot tentando induzir cáries em dentes extraídos, usando misturas de bactérias orais em diferentes meios.²⁷ Estas experiências foram realizadas com controlo da temperatura ambiente, no entanto a contaminação bacteriana das culturas verificou-se quase sempre.²⁷

Nos primeiros estudos desenhados para estudar a patogenia das cáries, toda a superfície de esmalte era desmineralizada, incluindo cristas e cúspides, o que raramente acontece *in vivo*, levando ao desenvolvimento de um modelo para obter cáries nas fossas e fissuras.²⁷ Em 1986 Katz *et al* seleccionaram pré-molares e molares extraídos, e inocularam as fossas e fissuras com *S. mutans*. Suplementaram com uma camada nutritiva de 15% de agar, 15% glicerina e 5% sacarose, colocando por cima placa bacteriana criada artificialmente um papel de filtro. Os dentes foram incubados a 37°C e continuamente lavados com saliva artificial, com potencial de hidrogénio (pH) neutro.²⁷ Os dentes foram higienizados com escova e pasta dentífrica 5 dias por semana e a experiência foi conduzida durante 8 semanas. Após avaliação microscópica, as lesões artificiais mostraram-se similares às naturais de fossas e fissuras.²⁷

A composição da saliva natural varia durante as 24 horas. À noite há maior concentração de glucose, a concentração de glucose na saliva de um adulto após acordar é de 0,01%, as glândulas sub-linguais estão mais activas à noite. Estas têm células secretoras

serosas e mucosas, sendo a saliva produzida por estas mais viscosa e com pouca água. As glândulas submaxilares e as parótidas estão mais activas durante o dia, neste período a saliva é mais rica em água.²⁸

Um modelo artificial da boca pressupõe a mimetização das condições orais, os substitutos de saliva desempenham um papel importante na simulação do ambiente oral.²⁹ Um dos meios mais usados como substituto da saliva para cultura de biofilmes é o meio BMM (basal medium mucine) que não é quimicamente definido, mas contém extracto de levedura, proteoses, peptonas resultantes de um hidrolisado de caseína num total de 20g/l; quantidade superior à encontrada na saliva, que é de 2-5g/l.²⁹ Tem sido demonstrado que no meio BMM o crescimento da placa bacteriana é estrutural e quimicamente igual à formada naturalmente.²⁹ Todavia tornou-se claro que para haver controlo do meio é necessário que este seja quimicamente definido.^{27, 29} Recentemente, foi desenvolvido um novo substituto designado por meio DMM (defined medium mucine), este suplementa o meio BMM.²⁹ O meio DMM contém vários iões, mucina, aminoácidos, vitaminas e factores de crescimento em concentrações semelhantes às encontradas na saliva.²⁷

Foi realizado um estudo no Brasil em 2009, por uma equipa de investigadores que pretendia comparar lesões de cárie naturais em dentina com diferentes métodos de indução de cáries.³⁰ Os métodos de indução de cárie usados foram a indução por um gel ácido, por uma alternância de pH nas soluções (uma solução de desmineralização e uma de remineralização) e por uma indução microbiológica.³⁰ Os autores afirmam que a indução por um gel ácido e pela alternância da pH das soluções promove uma grande extensão de desmineralização, no entanto, a desmineralização verificada com a solução ácida é uma desmineralização superficial, sendo a alternância de pH das soluções mais efectiva a induzir cárie.³⁰ As cáries induzidas por estes dois processos são semelhantes às cáries radiculares, possuindo uma área circundante bem mineralizada.³⁰ Os autores afirmam que a indução de cárie por modelos microbiológicos reproduz algumas características das cáries naturais, como a cor. Todavia ainda não há um protocolo consensual para este método. Como conclusão destes estudos, os autores referiram que quando se pretende simular uma lesão de dentina com uma camada infectada, simulando uma lesão de cárie antes da remoção da mesma, o método microbiológico parece ser o mais indicado, e o *S. mutans* provoca uma descida de pH mais rápida do que os outros microorganismos.³⁰

A desmineralização do esmalte está dependente de um pH ácido e de uma absorção específica de aniões pelo esmalte.³¹ De acordo com Hingston e col (1967) a absorção específica é uma propriedade que os aniões de todos os ácidos fracos têm em comum.³² Um estudo realizado por Hoppenbrouwers e Driessens em 1988 demonstrou o efeito do ácido láctico e do ácido acético na formação artificial de lesões de cárie. Neste estudo ficou demonstrado que o ácido láctico provoca maior desmineralização quando o pH varia entre

3,6 e 4,5 e que esta é superior à provocada pelo ácido acético.³² As bactérias cariogénicas, como o *S. mutans* e *L. fermentum*, possuem características peculiares, são acidogénicas e acidúricas.¹ Permanecem viáveis, mas preferencialmente crescem e metabolizam hidratos de carbono fermentáveis em pHs baixos, resultando ácido láctico.¹ O ácido láctico é derivado do piruvato, este por sua vez é originado pela fermentação do carbono, presente na glucose ou no citrato.³³ Uma unidade de substrato de glucose origina duas unidades de piruvato, enquanto o citrato origina apenas uma.³³ Se a frequência de ingestão de hidratos de carbono aumenta, a placa bacteriana permanece, por mais tempo, com o pH abaixo do crítico (cerca de 5,5) para a desmineralização do esmalte.¹ Para os *S. mutans* e *L. fermentum* se desenvolverem requerem glucose.³¹

11. Flúor

A literatura tem vindo a comprovar que o ião flúor reduz a incidência de cáries, mesmo a baixa concentração.³⁴⁻³⁸ Tem sido proposto que os iões metálicos podem ser agentes cariostáticos, isoladamente ou em combinação com o flúor.³⁴ Em 1996 foi realizado um estudo para avaliar os efeitos do cobre, ferro e flúor cristalizados com açúcar, em ratos sem glândulas salivares. Ficou demonstrado que baixas concentrações de ferro, cobre e flúor, isoladamente ou em combinação, eram efectivos em inibir a cárie, mesmo em ambientes cariogénicos, como é o caso da ausência de produção de saliva.³⁴ O flúor interfere com o metabolismo bacteriano e com a placa bacteriana, pela inibição de enzimas glicolíticas, das fosfatases, peroxidases e catalases.³⁴

A importância do flúor na prevenção das cáries foi descoberta em observações feitas em populações com águas fluoretadas naturalmente.³⁹ Há 60 anos, quando começaram os primeiros programas de aplicação de flúor, pensava-se que o seu efeito cariostático era atribuído à sua incorporação no esmalte durante o desenvolvimento dos dentes ou pela sua aplicação tópica.³⁹ Presumia-se que o flúor reduzia a dissolução do esmalte, aumentando, assim, a resistência às cáries. Desde essa data que vários estudos têm sido desenvolvidos para avaliar a eficácia da aplicação de flúor, em pastas dentífricas, nas águas, no sal, entre outros.³⁹ Actualmente, acredita-se que o maior efeito do flúor é pós-eruptivo e que aplicado topicamente, mesmo em baixas concentrações, pode reduzir a desmineralização e promover a remineralização.³⁹ Foram realizados estudos para comparar a concentração de flúor na saliva após aplicação tópica de vários meios. Conclui-se que os produtos que produziam maior concentração na saliva eram o verniz de flúor, seguido do gel, dos *sprays* e, por fim, dos dentífricos.³⁹ Foi demonstrado noutros estudos que, quando há uma mudança no aporte de flúor para se atingir um novo equilíbrio, demora-se duas semanas, sendo que nenhum suplemento de flúor é capaz de produzir uma elevação permanente da concentração de flúor na cavidade oral.³⁹ Assim para se obter um efeito preventivo é necessária uma aplicação tópica regular.³⁹

Após ocorrer a desmineralização do esmalte, com perda dos iões cálcio, o esmalte está disponível para adquirir os iões flúor, presentes no ambiente oral, de modo a restabelecer a estabilidade, o que irá permitir a nova fixação dos iões cálcio, ocorrendo assim a remineralização.⁴⁰ Esta hipótese foi testada e confirmada por Ingram e Nash.⁴⁰ Após a incorporação do flúor no esmalte, os cristais de hidroxiapatite tornam-se mais resistentes ao ataque ácido.³⁶

Em 2006, Rainer Seemann *e col* realizaram um projecto experimental, para testar *in vitro* agentes preventivos de cárie. Testaram uma solução de NaF (Fluoreto de Sódio) a 10 ppm e uma solução experimental de glicano, preparado pela hidrólise de mucina gástrica de origem porcina. Ficou demonstrado em ratos, o efeito preventivo de cáries do glicano.⁴¹ Seeman *e col* demonstraram que a solução de NaF inibia o desenvolvimento de lesões de cáries quase completamente, mostrando uma diminuição da profundidade de cárie de 91,8% em relação ao grupo controlo, que foi inoculado com *S.mutans* e estava imerso com saliva artificial. O glicano mostrou-se também eficaz, mas não tanto como o NaF, mostrando uma diminuição da profundidade de 43,5%.⁴¹

Questões relativas à concentração de flúor necessária para ocorrer a remineralização continuam a ser levantadas, uma vez que há autores que referem que o uso da pasta dentífrica é suficiente, enquanto outros referem que a aplicação tópica de flúor em elevadas concentrações não fornece um efeito adicional na remineralização.³⁶ Há estudos que revelam que um aumento da frequência é mais efectivo na manutenção dos níveis de flúor na cavidade oral, do que um aumento na concentração.³⁶

II – Trabalho Experimental

1. Objectivos

Com o presente trabalho pretende-se avaliar: a eficácia na indução de cárie do protocolo usado; a eficácia do ozono na eliminação das bactérias cariogénicas e a capacidade de remineralização dos dentes após aplicação do ozono seguido dos suplementos de flúor fornecidos pelo fabricante.

2. Materiais e Métodos

2.1 Fase Preparatória

Foram extraídos 60 dentes (pré-molares e molares) sem cárie e armazenados em soro fisiológico.

Foi preparada a solução de saliva artificial, baseada numa modificação do meio BMM com saliva artificial de Shellis²⁹ cuja, composição se encontra descrita no tabela em anexo II

2.2 Fase Experimental

2.2.1 Microrganismos e indução bacteriana de cárie

As bactérias utilizadas foram *S. mutans* (referência ATCC: 25175) e *L. fermentum* (referência ATCC: 14932). Estas estirpes bacterianas foram mantidas e cultivadas de acordo com as instruções da ATCC (American Type, Culture, Collection). Assim, *S. mutans* foi mantido em BHI (Brain Heart Infusion) em atmosfera normal a 37°C e, *L.fermentum* em MRS agar, também em atmosfera normal a 37°C.

Para a inoculação dos dentes foram preparadas, em PBS, suspensões bacterianas, posteriormente diluídas para o valor final de 10⁵ ufc (unidades formadoras de colónias) de cada uma das bactérias na saliva artificial utilizada neste estudo. A verificação da carga bacteriana foi feita por plaqueamento nos meios referidos anteriormente para cada uma das bactérias.

2.2.2 Aplicação do Ozono

Os dentes extraídos foram incluídos em blocos de acrílico e foram numerados de 1 a 60 (figura 1 e 2)



Figura 1 – Dentes incluídos em blocos de acrílico

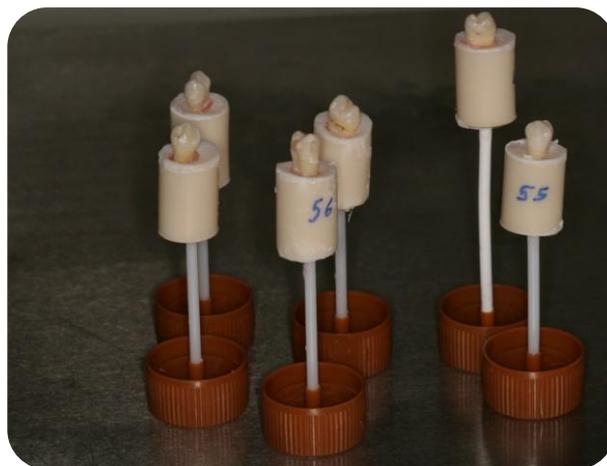


Figura 2 – Dentes incluídos em blocos de acrílico e numerados

Antes de se usar o DIAGNOdent® pen 2190 os dentes foram limpos e secos¹⁴ de seguida foi medido o valor de cárie de cada dente com o DIAGNOdent® pen 2190, percorreu-se o sistema fissurário até à escolha do valor mais elevado (figura 3).

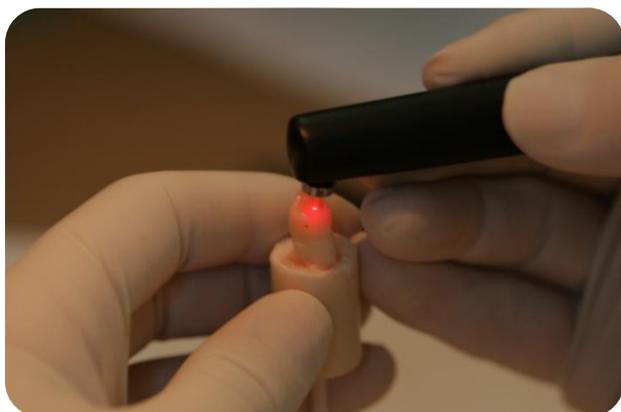


Figura 3 – Quantificação da cárie com o DIAGNOdent® pen 2190

Foi efectuada uma cavidade na face oclusal, de dimensões reduzidas (0,08mm de largura, 1mm de profundidade e 3mm de comprimento) com uma broca cilíndrica 008 diamantada, colocada em turbina e com refrigeração ar/água (Figura 4 e 5).



Figura 4 – Realização de uma cavidade na face oclusal, com turbina e refrigeração ar/água



Figura 5 - Cavidade oclusal com 0,08mm de largura, 1mm de profundidade e 3 mm de comprimento

Os dentes foram esterilizados pelo óxido de etileno.

À saliva artificial foi adicionada glucose a 2% (20g/l)

Foram constituídos cinco grupos:

Grupo I – 10 dentes, imersos em saliva artificial.

Grupo II – 10 dentes, inoculados com *L. fermentum* com uma carga bacteriana de 10^5 e imersos em saliva artificial.

Grupo III – 10 dentes, inoculados com *S. mutans* com uma carga bacteriana de 10^5 e imersos em saliva artificial.

Grupo IV – 10 dentes, inoculados com *L. fermentum* e *S. mutans* com uma carga bacteriana total de 10^{10} e imerso em saliva artificial.

Grupo V – 20 dentes, inoculados com *L. fermentum* e *S. mutans* com uma carga bacteriana total de 10^{10} , sujeitos à aplicação de ozono e à acção de um gel mineralizante de flúor (fornecido pelo fabricante) e imerso em saliva artificial.

Todos os dentes no decorrer do protocolo experimental foram mantidos numa estufa a 37°C e em agitação permanente a 150rpm. Todos os procedimentos efectuados durante o protocolo experimental foram efectuados em câmara de fluxo laminar.



Figura 6 - Dentes colocados nos tubos de armazenamento e no respectivo suporte



Figura 7 - Dentes nos suportes para serem colocados na estufa

No grupo I os dentes ficaram imersos em saliva artificial, foi avaliada a presença de cárie, com o DIAGNOdent[®] pen 2190, 3 e 7 semanas após o início do estudo, foi também avaliado o pH do meio, usando uma fita medidora de pH (Universalindikator pH 1-10 Merck).

No grupo II os dentes foram inoculados com *L. fermentum* e imersos em saliva artificial, foi avaliada a presença de cárie, com o DIAGNOdent[®] pen 2190, 3 e 7 semanas após a inoculação, foi também avaliado o pH do meio.

No grupo III os dentes foram inoculados com *S. mutans* e imersos em saliva artificial, foi avaliada a presença, DIAGNOdent[®] pen 2190, de cárie 3 e 7 semanas após a inoculação, foi também avaliado o pH do meio.

No grupo IV os dentes foram inoculados com *L. fermentum* e *S. mutans* e imersos em saliva artificial, foi avaliada a presença de cárie, com o DIAGNOdent[®] pen 2190, 3, 5 e 7 semanas após a inoculação, foi também avaliado o pH do meio (figura 8 e 9).

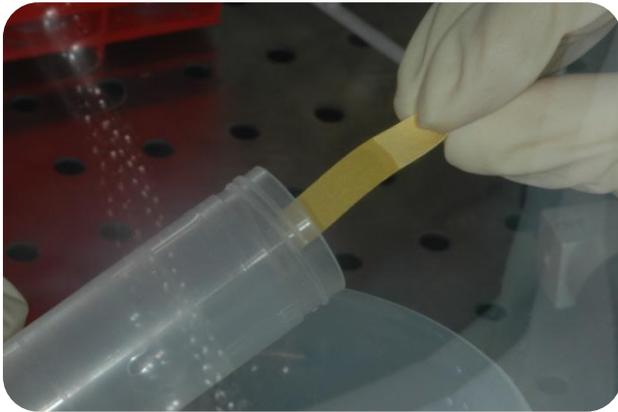


Figura 8 - Medição do pH, com fita medidora de pH

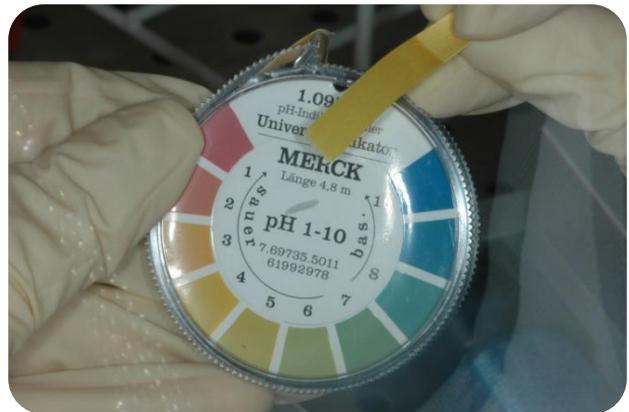


Figura 9 - Obtenção do valor de pH por comparação com a escala

No grupo V os dentes foram inoculados com *L.* e *S. mutans* e imersos em saliva artificial. Foi avaliada a presença de cárie, com o DIAGNOdent® pen 2190, 3 semanas após a inoculação, no mesmo dia foi feita a primeira aplicação de ozono.

Os dentes foram retirados do meio e lavados com soro fisiológico estéril (figura 10), de seguida foi feita aplicação de ozono, com o HealOzone®, durante 60 segundos (figura 11), a cúpula de silicone foi seleccionada de acordo com o tamanho de cada dente e mudada entre cada (figura 12).



Figura 10 - Lavagem dos dentes com soro fisiológico



Figura 11 - Aplicação ozono durante 60 segundos

Após a aplicação do ozono foi aplicada a solução redutora, fornecida pelo fabricante, durante 60seg. De seguida os dentes foram novamente imersos em meio novo.

Ao meio novo, igualmente composto por saliva artificial (figura 13), foi adicionada glucose a 0,05%. Os frascos foram lavados com soro fisiológico estéril antes de ser introduzido o novo meio.



Figura 12 - Cúpula de silicone adaptada ao dente



Figura 13 – Saliva artificial

Nos 30 dias seguintes os dentes foram escovados, com um escovilhão (figura 14) e pasta dentrífica fornecida pelo fabricante (figura 15). No final da escovagem foi aplicado um *spray* com flúor (figura 16), também fornecido pelo fabricante, como protocolo de remineralização, uma vez por dia.



Figura 14 - Escovilhões usados para escovar os dentes



Figura 15 - Pasta dentrífica fornecida pelo fabricante

Às 7 semanas, foi avaliada a presença de cárie com o DIAGNOdent[®] pen 2190 e foi feita nova aplicação de ozono, usando o mesmo protocolo. A presença de cárie foi avaliada no dia seguinte com o DIAGNOdent[®] pen 2190.

Após as 7 semanas foi efectuada uma recolha do grupo IV e V, por escavação das cavidades preparadas, com escavadores dentinários esterilizados (Figura 17). As amostras recolhidas foram armazenadas com PBS com glicerol a 25%.



Figura 16 - aplicação do spray com flúor

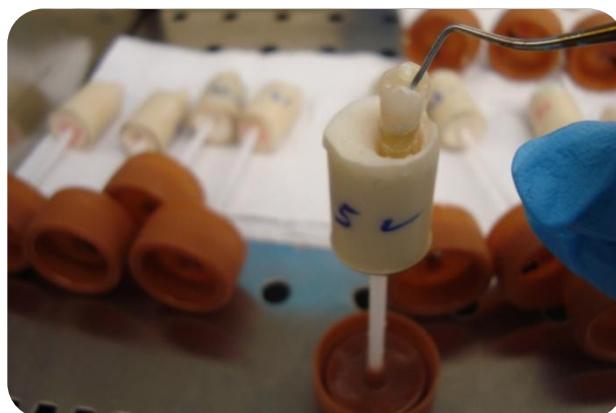


Figura 17 - Recolha de amostras para análise de DNA

2.2.3 Extracção de DNA

A extracção de DNA total das bactérias foi realizada pelo método da Proteinase K. As amostras foram preparadas, adicionando 180 μ L de tampão e 20 μ L de Proteinase K a 200 μ L de cada amostra. As amostras foram incubadas a 65°C durante 10 minutos, e posteriormente foram incubadas a 95°C durante 10 minutos.

A extracção foi realizada usando o protocolo das bactérias Lysis Buffer da Roche.

Após a extracção o DNA foi quantificado, foi colocado numa cuvete 50 μ L de DNA extraído e esta foi colocada no espectrofotometro quantificador de DNA.

A amplificação e sequenciação foram realizadas por PCR em Tempo Real, utilizando primers específicos para o gene que codifica o rRNA 16S. Os primers usados foram: F-968 - 5' CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GAA CGC GAA GAA CCT TAC 3' e R-1401 - 5' CGG TGT GTA CAA GAC CC 3'. Foram utilizados como reagentes a 4 µL de Sybr Green, 0.3 µL de cada primer e 10.4 µL de H₂O para cada amostra. Estes foram misturados num eppendorf. Em cada capilar de reacção foi colocado 15 µL da mistura anterior e 5 µL de DNA extraído. As amostras foram colocadas no LightCycler 2.0 e foi realizado o protocolo das bactérias 16S rRNAs. Os ciclos de temperaturas usados foram: desnaturação, 95°C durante 10 minutos; amplificação, 95°C durante 10 segundos, 58°C durante 5 segundos e 72°C durante 20 segundos, este ciclo foi repetido 45 vezes; melting curve, 95°C 0 segundos, 65°C durante 1 minuto, 95°C 0 segundos (Ramp Rate – 0.1°C/s); arrefecimento, 40°C durante 30 segundos.

2.3 Análise estatística

Na análise estatística dos resultados apresentam-se os valores médios e respectivo erro-padrão (EP) para cada medição (inicial e final), quer globalmente, quer por grupo.

A análise inferencial foi efectuada com recurso ao teste t-Student para amostras emparelhadas, quando se pretendeu comparar a avaliação inicial com a avaliação final, e recorrendo à ANOVA (com comparações múltiplas pelo teste de Tukey, sempre que se justificasse) quando se pretendia comparar os 5 grupos, quer na medição inicial, quer na final. O recurso a testes paramétricos justifica-se pelo facto de as variáveis em causa seguirem distribuição normal, em cada momento, e em cada grupo.

Toda a análise de dados foi efectuada através da aplicação SPSS, versão 18, tendo os testes estatísticos sido avaliados ao nível de significância de 5%.

3. Resultados

3.1 Medições efectuadas com o DIAGNOdent[®] pen 2190

Os resultados das medições efectuadas com o DIAGNOdent[®] pen 2190, para cada um dos grupos, encontram-se nos seguintes quadros:

Nº dente	Medição inicial	2ª Medição (12-1-2010)	Medição final (8-2-2010)
1	9	14	3
2	7	0	7
3	6	2	6
4	2	0	3
5	5	4	6
6	6	17	11
7	4	0	6
8	6	0	3
9	11	45	52
10	5	0	5

Quadro 1- Valores das medições do DIAGNOdent[®] pen 2190, para o grupo I, só com saliva artificial

Nº dente	Medição inicial	2ª Medição (12-1-2010)	Medição final (8-2-2010)
11	8	63	40
12	5	9	21
13	10	19	26
14	6	47	56
15	6	10	22
16	2	7	15
17	3	9	17
18	7	7	34
19	4	2	7
20	3	21	30

Quadro 2 - Valores das medições do DIAGNOdent[®] pen 2190, para o grupo II, inoculado com *L. fermentum*

Nº dente	Medição inicial	2ª Medição (12-1-2010)	Medição final (8-2-2010)
21	2	0	3
22	8	17	18
23	2	27	36
24	8	10	29
25	7	14	54
26	7	77	65
27	5	12	16
28	2	99	99
29	9	37	23
30	6	7	25

Quadro 3 - Valores das medições do DIAGNOdent® pen 2190 para o grupo III, inoculado com *S. mutans*

Nº dente	Medição inicial	2ª Medição (12-1-2010)	3ª Medição (24-1-2010)	Medição final (8-2-2010)
31	5	9	30	3
32	5	7	22	1
37	3	12	27	8
38	5	5	29	4
43	10	11	26	45
44	5	16	47	2
47	5	13	43	20
50	8	8	33	50
54	12	13	46	44
60	2	5	16	8

Quadro 4 - Valores das medições do DIAGNOdent® pen 2190, para o grupo IV, inoculado com *S. mutans* e *L. fermentum*

Nº dente	Medição inicial	2ª Medição (12-1-2010)	3ª Medição (8-2-2010)	Medição final (9-2-2010)
33	3	55	99	73
34	1	20	57	34
35	12	22	65	73
36	8	41	22	26
39	9	26	73	87
40	10	28	17	14
41	4	20	45	86
42	4	24	74	84
45	4	82	99	99
46	11	39	40	69
48	2	48	48	24
49	10	73	99	99
51	4	79	51	99
52	4	33	43	50
53	5	99	99	99
55	3	46	33	46
56	2	99	99	99
57	2	35	10	23
58	4	28	45	42
59	1	22	34	72

Quadro 5 - Valores das medições do DIAGNOdent® pen 2190, para o grupo V, inoculado com *S. mutans* e *L. fermentum*, sujeito à aplicação de ozono e protocolo de remineralização

3.2 Análise de DNA

No grupo V, sujeito aplicação do ozono, não foi detectado DNA bacteriano.

No grupo IV foi detectado DNA bacteriano, na figura 18, encontram-se os resultados da PCR em tempo real para alguns dentes do grupo IV.

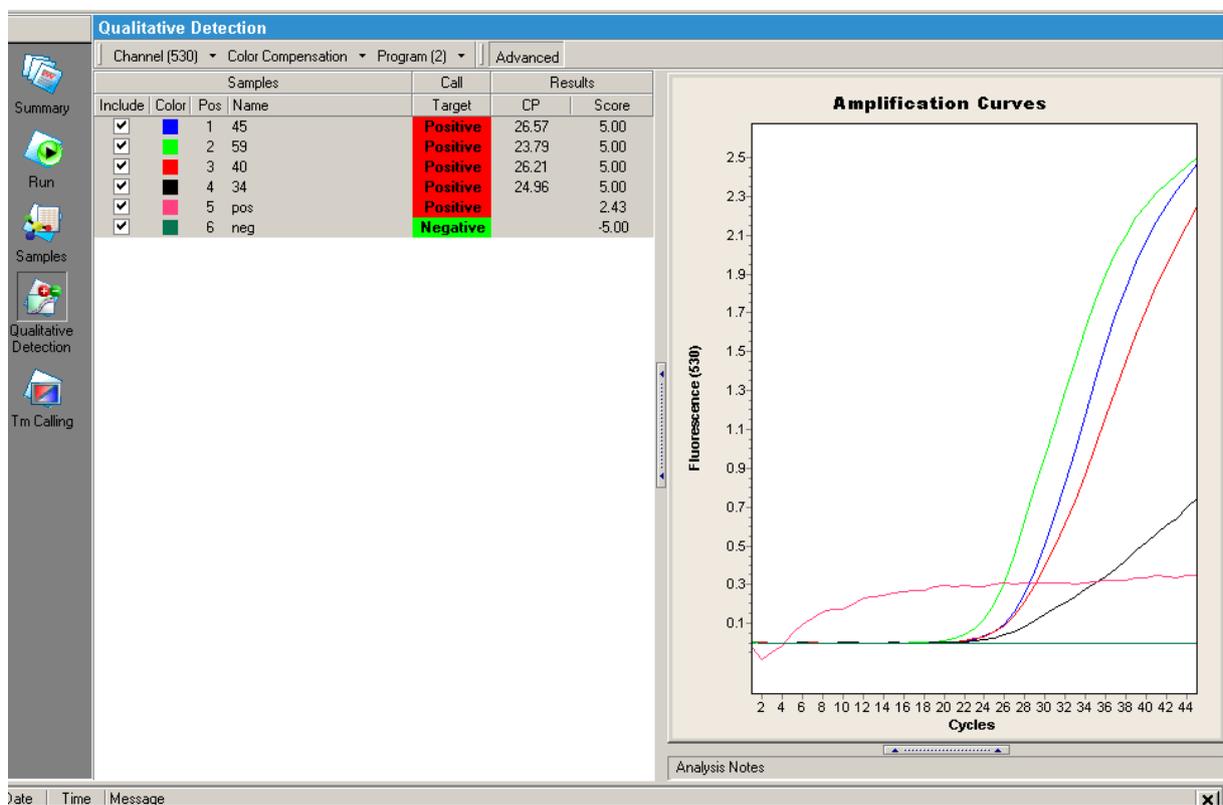


Figura 18- Curvas de Amplificação da PCR em tempo-real para o grupo IV, inoculado com *S. mutans* e *L. fermentum*

3.3 Análise estatística

O valor médio inicial da amostra foi de $5,73 \pm 0,39$ e o valor médio final foi de $37,02 \pm 4,07$.

Há um aumento estatisticamente significativo, independentemente do grupo, entre a primeira e a última avaliação ($p < 0,001$)^a, ainda que não exista correlação entre os registos de ambas as medições ($p = 0,699$).

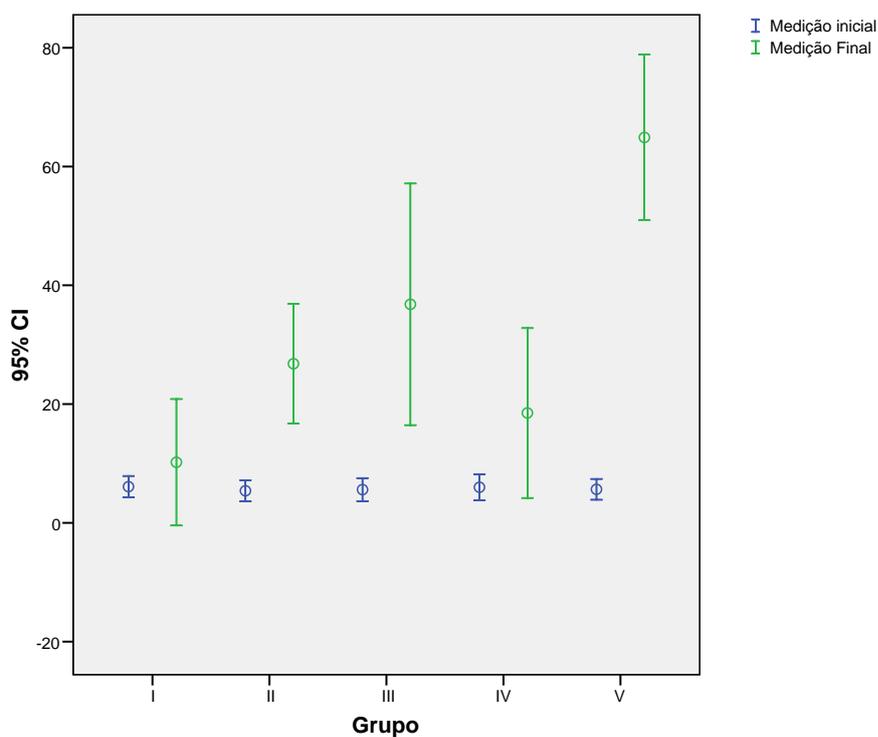


Figura 19 – Intervalo de Confiança a 95% para a média na avaliação inicial e final, em cada grupo

^a $p = 1,898 \times 10^{-10}$

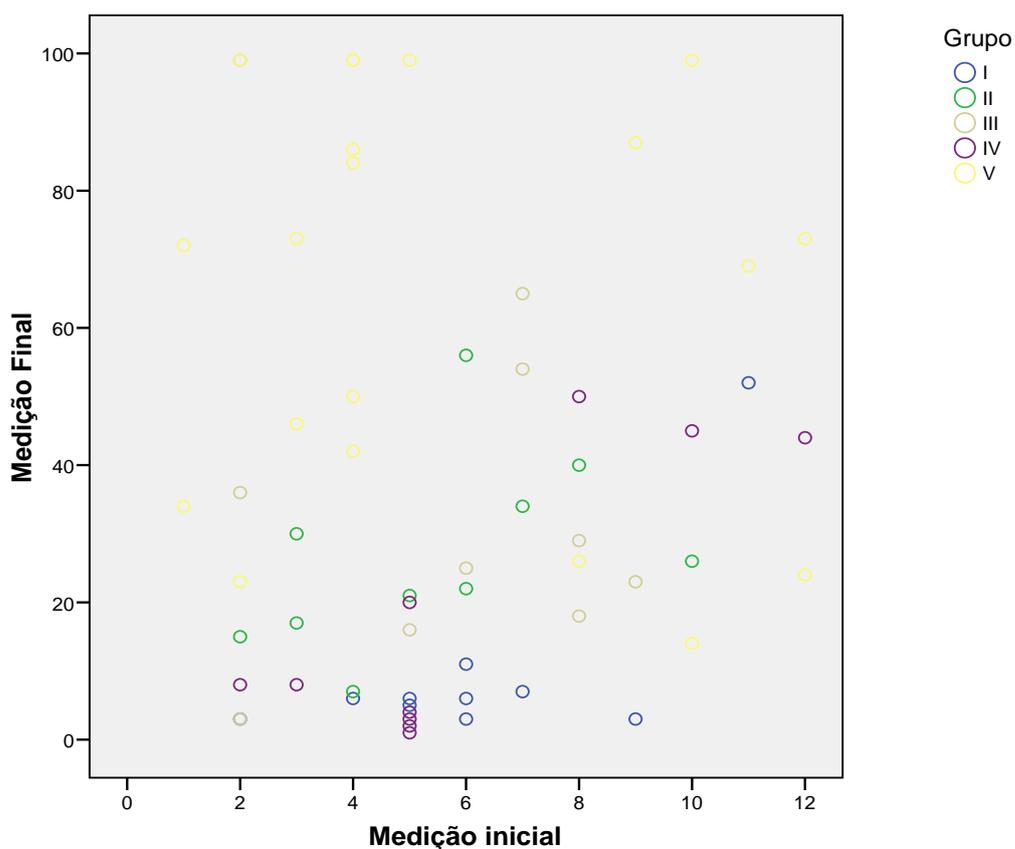


Figura 20 – Diagrama de dispersão representativo da correlação entre os valores medidos no momento inicial e final, em cada grupo

Grupo	Medição	Diferença inicial/Final					Correlação Inicial/Final	
		Média	n	EP	Effect size	P	R	P
I	Inicial	6,10	10	0,795	≈ 0,00	0,355	0,685	0,029
	Final	10,20	10	4,706				
II	Inicial	5,40	10	0,792	-5,17	0,001	0,452	0,190
	Final	26,80	10	4,439				
III	Inicial	5,60	10	0,859	-3,39	0,008	-0,200	0,580
	Final	36,80	10	8,994				
IV	Inicial	6,00	10	0,978	-2,26	0,051	0,824	0,003
	Final	18,50	10	6,321				
V	Inicial	5,65	20	0,834	-8,69	< 0,001 ^b	-0,117	0,623
	Final	64,90	20	6,669				

Quadro 6 – Descrição, comparação e correlação entre os valores iniciais e finais, em cada grupo

^b $p = 4.797 \times 10^{-8}$

Na medição inicial todos os grupos tinham valores idênticos ($p = 0,985$), existindo diferença estatisticamente significativa na avaliação final ($p < 0,001$)^c.

Grupos		Diferença média	EP	P	IC 95% para a diferença de médias	
I	II	-16,60	10,71	0,535	-46,81	13,61
	III	-26,60	10,71	0,109	-56,81	3,61
	IV	-8,30	10,71	0,937	-38,51	21,91
	V	-54,70	9,28	< 0,001 ^d	-80,86	-28,54
II	III	-10,00	10,71	0,883	-40,21	20,21
	IV	8,30	10,71	0,937	-21,91	38,51
	V	-38,10	9,28	0,001	-64,26	-11,94
III	IV	18,30	10,71	0,437	-11,91	48,51
	V	-28,10	9,28	0,029	-54,26	-1,94
IV	V	-46,40	9,28	< 0,001 ^e	-72,56	-20,24

Quadro 7 – Comparações múltiplas entre os grupos, dos valores obtidos na medição final, pelo Teste de Tukey, após a ANOVA

^c $p = 5,116 \times 10^{-7}$

^d $p = 2,302 \times 10^{-6}$

^e $p = 5,871 \times 10^{-5}$

4. Discussão

No início do trabalho experimental, todos os dentes estavam isentos de cárie. Os valores mais elevados que foram admitidos, quantificados pelo DIAGNOdent® pen 2190, foram de 12. De acordo com as recomendações da KaVo (anexo I) correspondem ao valor limite para se considerar o tecido dentário normal e hígido.

A placa bacteriana no ser humano é um biofilme complexo que compreende centenas de espécies microbiológicas.²⁹ Moore e Moore em 1994 e Paster e *col* em 2001 afirmaram que a placa dentária contém aproximadamente 500 espécies microbianas.⁶ A cultura da placa bacteriana usando o meio BMM, exibe um comportamento e taxas de crescimento semelhantes à natural.²⁹ Os fluidos orais são a maior fonte de nutrientes para a placa bacteriana.²⁹ Vários estudos *in vitro* simularam estes fluidos orais, contendo como principais componentes a mucina, o extracto de levedura e/ou as peptonas. Uma destas formulações é o meio BMM, que tem sido amplamente usado para estudos *in vitro* das bactérias orais.²⁹ A presença de extracto de levedura e de peptonas contribui para presença de uma concentração variável de péptidos, vitaminas e iões no meio.²⁹ Têm sido consensual que, para se poder estudar o meio oral, é necessário controlar os fluidos orais e o fornecimento de nutrientes.²⁹ Assim, torna-se essencial, o uso de um meio quimicamente definido, podendo ser feitas alterações nos componentes individuais.²⁹ Shellis em 1978, desenvolveu uma saliva artificial, definida quimicamente, contendo vários iões, aminoácidos, vitaminas, factores de crescimento e mucina de origem bovina.²⁹ Esta tem como componentes maioritários o cloreto de potássio, o cloreto de sódio, o hidrogenocarbonato de sódio e o tiocianato de potássio.²⁹

A saliva artificial usada neste trabalho experimental consistiu numa modificação do meio BMM, com saliva artificial de Shellis modificada, uma vez que o sistema utilizado era simples, sendo apenas composto por duas bactérias, *S. mutans* e *L. fermentum*. A formulação do meio BMM com a saliva artificial de Shellis, é usada para cultura de sistemas complexos, com elevadas exigências nutricionais como é o caso da placa bacteriana.²⁹

A saliva artificial formulada para este trabalho contém extracto de levedura e proteose/peptonas, que fornecem glucose e uma mistura de aminoácidos respectivamente, contém também cloreto de potássio, hidrogenocarbonato de sódio e tiocianato de potássio.

Para permitir um maior crescimento bacteriano, antes da inoculação das bactérias nos dentes, a saliva artificial foi suplementada com glucose a 2%, permitindo a formação de ácido láctico pela fermentação desta.

Após o aparecimento de cárie e aplicação do ozono, os dentes foram mergulhados em novo meio, igual ao usado anteriormente, mas sem a suplementação de glucose, uma vez que a lesão de cárie já estava estabelecida e que a concentração de glucose no extracto de levedura deverá corresponder a 0,05% e a concentração de glucose na saliva num adulto ao acordar é de 0,01%.²⁸

Com o intuito de favorecer a retenção bacteriana no local e permitir o desenvolvimento mais rápido do processo de cárie, foi realizada uma cavidade de reduzidas dimensões na face oclusal. Uma vez que as superfícies oclusais são particularmente susceptíveis à cárie.¹

Três semanas após a inoculação das bactérias, a existência de cárie foi quantificada em todos os grupos, usando o DIAGNOdent[®] pen 2190, tendo os cuidados prévios à sua utilização nos dentes. Vários autores sugerem que o exame visual seguido de um método auxiliar de diagnóstico, aumenta a precisão do diagnóstico de cárie.⁴² Outros autores afirmam que as tecnologias de diagnóstico, como o ECM ou o DIAGNOdent, têm um melhor desempenho na detecção precoce de cáries, de superfícies oclusais, face ao exame visual.⁴² Goel e col, em 2009, conduziu um estudo *in vivo* que compara a eficácia do DIAGNOdent com outros métodos convencionais (visual, táctil e radiografias bitewings).⁴³ O estudo foi realizado em molares primários, com cáries oclusais, com indicação para extracção. Antes da extracção os dentes foram avaliados, usando o DIAGNOdent, o exame visual e táctil, e as radiografias bitewings. Após a extracção dos dentes foram realizados cortes histológicos, para comparar os métodos. Para cáries de esmalte, a precisão do diagnóstico no exame visual, táctil e radiográfico foi de 49,40%, e para o DIAGNOdent foi de 84,34%.⁴³ Para as cáries que atingem a dentina, a precisão do exame visual e táctil foi de 73,49%, para o exame radiográfico foi de 60,24% e para o DIAGNOdent 74,70%.⁴³ Os autores concluíram que o DIAGNOdent mostrou elevada precisão quando comparado com os métodos convencionais para a detecção de cáries de esmalte, no entanto quando as cáries já atingem a dentina embora a precisão seja elevada, esta é semelhante aos outros métodos de diagnóstico.⁴³

O DIAGNOdent foi o método de diagnóstico escolhido para este trabalho, uma vez que permite a quantificação de cárie, apresenta uma boa precisão, reproductibilidade, sensibilidade e validade.⁴²⁻⁴³

No grupo I verificou-se que dois dentes apresentavam valores, 14 e 17, correspondentes a uma desmineralização inicial de esmalte. Verificou-se também que um dente apresenta o valor de 45 que corresponde a uma forte desmineralização. Este grupo não foi inoculado com as bactérias em estudo, no entanto, pode ter ocorrido contaminação destes, durante o transporte ou durante o decorrer dos procedimentos.

No grupo II, inoculado com *L. fermentum*, após as três semanas, quatro dentes apresentavam valores superiores a 12, correspondendo a desmineralização inicial.

No grupo III, inoculado com *S. mutans*, após as três semanas, seis dentes apresentavam valores superiores a 12.

Os dentes pertencentes aos grupos IV e V, inoculados com *L. fermentum* e *S. mutans*, às três semanas, no conjunto dos trinta dentes, vinte e três apresentavam valores correspondentes à presença de cárie. Destes vinte e três foram seleccionados vinte dentes, com valores de DIAGNOdent[®] iguais ou superiores a 20, para iniciar aplicação do ozono. Constituindo estes vinte dentes o grupo V.

Nos dentes do grupo IV voltou a ser avaliada a presença de cárie às cinco semanas após a inoculação, apresentando todos os dentes cárie e a maioria destes valores superiores a 20.

Às sete semanas após a inoculação, o que corresponde a trinta dias após aplicação do ozono no grupo V, todos os dentes voltaram a ser avaliados.

No grupo I apenas um dente apresentava valores superiores a 12, o mesmo que apresentava na segunda medição valores de forte desmineralização.

No grupo II, à excepção de um dente, todos apresentavam cárie.

No grupo III, à excepção de um dente, todos apresentavam cárie.

No grupo IV, apenas quatro dentes tinham valores correspondentes a cárie, tendo havido diminuição dos valores de cárie nos restantes dentes. Apesar de não ser estatisticamente significativo, uma possível explicação para a ocorrência deste fenómeno é o facto de que este grupo tinha o dobro da carga bacteriana, o que leva a uma competição maior pelo substrato e o consumo mais rápido deste, com consequente paragem da produção de ácido láctico. Deixando de haver produção de ácido láctico, há aumento do pH, a reacção de desmineralização/remineralização dá-se no sentido da remineralização.

No grupo V, foi efectuada uma medição às sete semanas e outra no dia seguinte após aplicação do ozono. Verificou-se, na maioria dos dentes, um aumento substancial em relação à medição efectuada às três semanas. Dado os resultados da análise de DNA, demonstrarem a ausência de DNA bacteriano no grupo V, estes resultados dever-se-ão a um falso positivo¹⁴ do DIAGNOdent. Neste caso ter-se-á dado a remineralização, pelo facto da análise de DNA confirmar a ausência de bactérias.

O valor médio inicial na amostra foi de $5,73 \pm 0,39$ e o final foi de $37,02 \pm 4,07$, verificando-se um aumento estatisticamente significativo, independentemente do grupo. Quando comparamos a avaliação inicial e final em cada grupo (figura 19), verifica-se que no grupo I, não se encontram diferenças estatisticamente significativas, o que seria de esperar, uma vez que era o grupo controlo negativo, no qual não foram inoculadas bactérias. No grupo V é onde se verifica maior diferença entre a medição inicial e final, embora também

exista diferença estatisticamente significativa nos grupos II e III. No grupo IV existe uma tendência para que venha a haver um aumento estatisticamente significativo ($p = 0,051$), tendo esta tendência de ser comprovada ou refutada por estudos futuros.

Deve, contudo, observar-se que, apenas nos grupos onde não se encontram alterações estatisticamente significativas, existe correlação positiva entre os valores obtidos na medição inicial e final (figura 20).

No quadro 6 estão representadas os valores médios para cada grupo no instante inicial e final, assim como a comparação e correlação. Podemos verificar que as médias de cada grupo no instante inicial rondavam o valor de 6, correspondente à ausência de cárie. No grupo I a média final é de 10,20, que corresponde à ausência de cárie. No grupo II e III a média final é de 26,80 e 36,80, respectivamente, o que corresponde a uma forte desmineralização, de notar que a média para o grupo III, inoculado com o *S. mutans* apresenta a média para o instante final superior ao grupo II, inoculado com *L. fermentum*. No grupo IV a média final é de 18,50, o que corresponde a uma desmineralização inicial, no entanto ao observar as medições efectuadas neste grupo às 5 semanas, verifica-se que a maioria dos dentes, oito dos dez, apresenta valores correspondentes a uma forte desmineralização, e ou outros valores de uma desmineralização inicial. No grupo V a média final é de 64,90, é o grupo que apresenta maior diferença entre a média inicial e final, como se encontra exposto no quadro 7.

No quadro 7 podemos verificar que os grupos I, II, III e IV apresentam valores finais semelhantes, enquanto cada um deles apresenta um valor médio, na medição final, significativamente inferior ao do grupo V. Este facto é facilmente explicável uma vez que todos os grupos apresentam valores iniciais semelhantes, e o grupo V é o que apresenta uma maior diferença para o instante final.

O efeito antimicrobiano do ozono já foi demonstrado por vários estudos.⁴⁴⁻⁴⁵ No entanto há estudos que revelam resultados contraditórios, como o realizado por Baysan e *col*, em 2007, que demonstrou que a aplicação de ozono lesões cáries de dentina não cavidades não reduzia significativamente o número de bactérias detectadas na dentina infectada.⁴⁵ Castillo e *col*, em 2008, realizaram um estudo *in vitro*, em que usaram 41 cepas de *S. mutans*, incluindo cepas autóctones colhidas da saliva de 27 crianças, após serem cultivadas, foram efectuadas suspensões, com 0,5 na escala de McFarland (aproximadamente $1,5 \times 10^8$ bactérias), colocadas em eppendorf.²³ O ozono foi aplicado com o HealOzone nos eppendorf, os resultados mostram que após aplicação de ozono durante 40 segundo, nenhuma bactéria era viável.²³

Olga Polydorou e *col*, em 2006, comparam o efeito antibacteriano do ozono com o de dois sistemas adesivos de dentina.⁴⁴ Os sistemas adesivos usados foram o Clearfil SE Bond (Kuraray Europa, Düsseldorf, Alemanha) e o Clearfil Protect Bond (Kuraray, Europa), o

Clearfil Protect Bond, é um adesivo self-etch, como o Clearfil SE Bond, mas adicionalmente permite a libertação de flúor e tem incorporado um monómero antibacteriano, o MDPB (12 – metacriloiloxidodecilpridinium bromido).⁴⁴ Os sistemas adesivos mostraram uma actividade antibacteriana significativa, contudo aplicação de ozono revelou-se promissora na eliminação de microrganismos residuais em cavidades fundas e com potencial aumento do sucesso clínico das restaurações.⁴⁴

Knight *et al*, em 2008, realizaram um estudo *in vitro* para determinar os efeitos da aplicação do ozono na dentina antes da formação de um biofilme.⁴⁶ O estudo demonstrou que aplicação de ozono preveniu a formação de um biofilme de *S. mutans* e *Lactobacillus acidophilus* por um período de quatro semanas.⁴⁶

Os resultados do trabalho desenvolvido estão de acordo com outros estudos realizados para avaliar a eficácia do ozono no tratamento de cáries incipientes.

Abu Naba'a *et al*, em 2003, conduziram um estudo aleatorizado, no qual incluíram 90 participantes, com pelo menos duas cáries primárias de fossas e fissuras, sem cavitação, em dentes permanentes posteriores. Foram incluídas no estudo, um total de 390 cáries primárias de fossas e fissuras, nos quais foi aplicada a terapêutica com ozono em 195 dentes, nos outros 195 foi efectuada apenas uma limpeza, sem aplicação de ozono. A terapêutica com ozono era aplicada durante 10 segundos a uma concentração de 2100 ppm. Foi aplicado um selante de fissuras em 66 dentes de cada grupo, perfazendo um total de 132 dentes selados. Nos restantes dentes que não foram selados, dos dois grupos, foi avaliada a progressão e regressão de cárie com o DIAGNOdent e com o ECM (Electric Caries Meter). O período de avaliação foi 12 meses, sendo avaliado aos 1,3,6, 9 e 12 meses. A qualidade dos selantes aplicados foi também avaliada. No primeiro mês os valores encontrados foram significativamente melhores, $p < 0.05$, no grupo com ozono do que no grupo controlo. Nos controlos seguintes, os valores foram sempre piores para o grupo controlo do que para o grupo com a terapêutica com o ozono, no entanto não apresentavam significância estatística, $p = 0.081$. Nos dentes selados não houve diferenças na retenção dos selantes para os dentes sujeitos à terapêutica com o ozono.²²

O mesmo grupo de investigadores conduziram um estudo piloto aleatorizado com oito participantes, com pelo menos duas cáries de fossas e fissuras com cavitação em dentes posteriores. Dezanove lesões receberam uma terapêutica com ozono, outras dezanove não receberam nenhuma terapêutica. A evolução ou regressão de cárie foi avaliada com DIAGNOdent e ECM. Verificaram que não houve progressão de cárie nos dentes com terapêutica de ozono. Os autores concluíram que o tratamento com ozono durante 10 segundos remineraliza lesões e pode ser proposto como alternativa para novas lesões de cárie de fossas e fissuras.²²

Huth e *col*, em 2005, realizaram um estudo clínico aleatorizado para avaliar a eficácia da aplicação de ozono, durante 40 segundos, na progressão ou regressão de cáries de fossas e fissuras oclusais iniciais, não cavitadas. No estudo tinha 41 participantes, com idade média de $7,7 \pm 2,2$ anos, com 57 pares de lesões, contra-laterais, aleatoriamente divididas em dois grupos, um grupo teste que recebeu ozono e um grupo controlo no qual não foi efectuada nenhuma terapêutica. Um examinador calibrado e cego monitorizou as lesões passados 3 meses. Verificou que significativamente mais cáries reverteram ou reduziram a sua progressão no grupo tratado com ozono, embora não haja significância estatística na diferença entre os grupos quando toda a população foi observada.²²

Foram, também realizados estudos para avaliar a eficácia do ozono no tratamento de cáries radiculares.²²

Um estudo realizado por Baysan e *col*, com 79 participantes, com duas ou quatro cáries radiculares primárias. As lesões foram divididas em quatro grupos: um grupo sujeito à aplicação de ozono e à solução redutora; um grupo sujeito à aplicação só da solução redutora; um grupo sujeito à aplicação de ozono e selantes; e outro grupo sujeito à aplicação de selantes. Em todos os grupos foi avaliada a progressão de cárie com DIAGNOdent e pelo ECM. Os resultados mostraram que houve melhor remineralização nos grupos tratados com ozono.²²

Holmes, em 2003, realizou um estudo aleatorizado, duplamente cego, para avaliar o efeito do ozono, combinado com o uso diário do estojo de remineralização do doente, em cáries radiculares primárias. O estudo tinha 89 participantes com duas cáries primárias radiculares, que foram aleatoriamente escolhidas para serem sujeitas aplicação do ozono durante 40 segundos a 2100ppm ou ar. As cáries foram avaliadas aos 3, 6, 12 e 18 meses e foram classificadas de acordo com a sua dureza em *soft*, *leathery* e *hard*. Ao final de 3 meses das cáries tratadas com ozono 69% das lesões endureceram, tornando-se *hard* e nenhuma se deteriorou, enquanto 4% do grupo controlo piorou. Aos 6 meses o grupo tratado com ozono, 8% das cáries mantém-se *leathery*, enquanto os restantes 92% tornaram-se *hard*, no grupo controlo 11% das cáries pioraram. Aos 12 meses 98% das ⁹18 meses 100% das cáries tratadas com ozono regrediram, 37% do grupo controlo pioraram. O autor concluiu que cáries radiculares *leathery*, podem reverter quando tratadas com ozono e produtos de remineralização e que este procedimento é uma alternativa efectiva à convencional remoção de cárie e restauração.⁴⁷

Os estudos realizados para avaliar a eficácia do ozono em lesões de cárie de fossas e fissuras e radiculares, já apresentam um bom nível de evidência científica, uma vez que são estudos aleatorizados. No entanto, há autores que levantam questões quanto ao método de avaliação, que é na maioria dos casos realizada pelo DIAGNOdent, e quanto ao facto dos participantes terem conhecimento da terapêutica que lhes foi administrada, apenas

o estudo realizado por Holmes é duplamente cego, e pelo facto de muitos dos estudos realizados serem conduzidos por membros da equipa do principal precursor desta terapêutica, Edward Lynch.²²

As revisões sistemáticas sobre o tema são unânimes quanto ao facto de ser necessária mais evidência científica para que esta terapêutica possa ser aceite como uma alternativa terapêutica na abordagem às cáries detectadas precocemente.^{9, 22}

5. Conclusões

Do estudo realizado pode-se concluir que:

- O protocolo de indução de cárie utilizado neste trabalho mostrou-se eficaz no desenvolvimento de lesões cáries.
- A aplicação do ozono através do HealOzone, durante 60 segundos, a uma concentração de 2100ppm demonstrou eficácia na eliminação das bactérias presentes nas lesões de cárie, não tendo sido detectado DNA bacteriano após aplicação do ozono seguida da aplicação diária dos produtos de remineralização durante um período de 30 dias.
- O protocolo de aplicação de ozono sugerido pelo fabricante, com a aplicação nos 30 dias seguintes de produtos de remineralização, promove a remineralização de lesões de cárie não cavitadas em superfícies oclusais.
- A terapêutica com ozono é vantajosa em dentisteria minimamente invasiva, uma vez que mantém o tecido saudável, não requer anestesia e com um procedimento simples e não moroso apresenta resultados satisfatórios.
- Contudo é necessária mais evidência científica para que possa ser avaliado o rácio custo-benefício.

Fonte de financiamento

Gabinete de Apoio a Projectos de Investigação (GAPI) da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, candidatura nº19, formulário de candidatura em anexo (anexo III),

III - Bibliografia

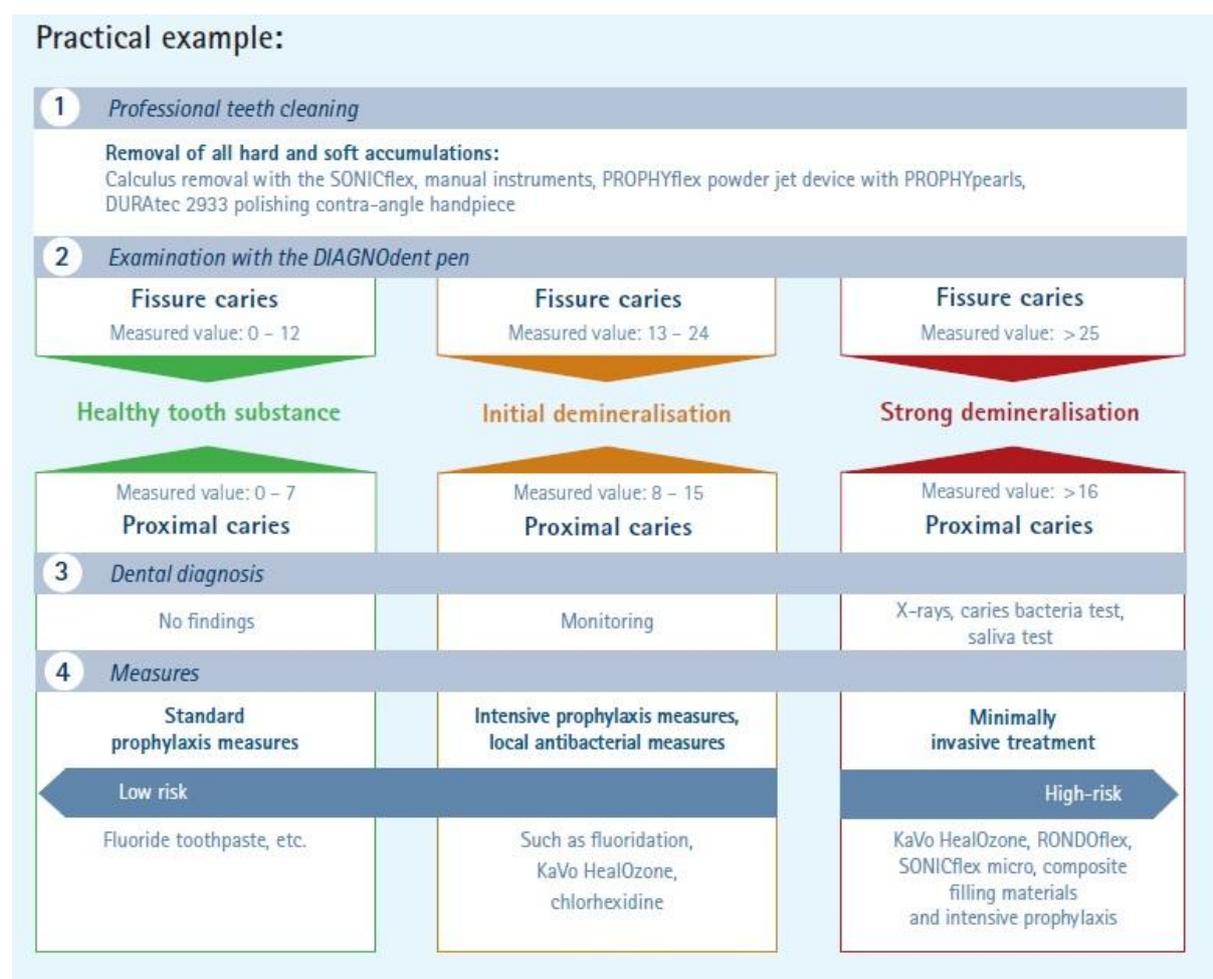
1. Fejerskov O, Kidd E. *Cárie Dentária - A Doença e seu Tratamento Clínico*. São Paulo: Livraria Santos Editora; 2005.
2. Selwitz RH, Ismail AI, Pitts NB. Dental Caries. *Lancet* 2007;369:51-59.
3. Anderson MH, Bales DJ, Omnell KA. Modern management of dental caries: the cutting edge is not the dental bur. *J Am Dent Assoc* 1993;124(6):36-44.
4. Johansson E, Claesson R, Dijken JWV. Antibacterial effect of ozone on cariogenic bacterial species. *Journal of Dentistry* 2009;37:449-53.
5. Aas JA, Griffen AL, Dardis SR, Lee AM, Olsen I, Dewhirst FE, et al. Bacteria of Dental Caries in Primary and Permanent Teeth in Children and Young Adults. *Journal of Clinical Microbiology* 2008;46(4):1407-17.
6. Wall-Manning GM, Sissons CH, Anderson SA, Lee M. Checkerboard DNA-DNA hybridisation technology focused on the analysis of Gram-positive cariogenic bacteria. *Journal of Microbiological Methods* 2002;51:301-11.
7. Permar D, Melfi RC. *Oral Embriology and microscopic anatomy*. 6th ed. London: Henry Kimpton Publishers; 1977.
8. Melanie RFH. *Identificação Humana em vítimas de carbonização: análise odonto-legal através da microscopia electrónica* [São Paulo; 1998.
9. Brazzelli M, McKenzie L, Fielding S, Fraser C, Clarkson J, Kilonzo M, et al. Systematic review of the effectiveness and cost-effectiveness of HealOzone for the treatment of occlusal pit/fissure caries and root caries. *Health Technol Assess* 2006;10(16):iii-iv, ix-80.
10. Ministério da Saúde D-GdS. *Estudo Nacional da Prevalência das Doenças Orais*; 2008.
11. Mondelli J. *Dentística - Procedimentos pré-clínicos*. 1ª ed. São Paulo: Livraria Santos; 2002.
12. Sturdevant CM, Roberson TM, Heymann HO, Sturdevant JR. *The Art and Science of Operative Dentistry*. 3rd edition ed. St. Louis: Mosby - Year Book, Inc; 1995.
13. Baratieri LN, Monteiro S, Andrada MACd, Vieira LC, Ritter A, Cardoso A. *Odontologia Restauradora - Fundamentos e Possibilidades*. São Paulo: Livraria Santos Editora; 2003.
14. KaVo G. Instructions for use of DIAGNOdent pen 2190.
15. Lynch E. *Ozone: the revolution in dentistry*. London: Quintessence Publishing Co. Ltd.; 2004.
16. Doméjean-Orliaguet S, Léger S, Auclair C, Gerbaud L, Tubert-Jeannin S. Caries management decision: Influence of dentist and patient factors in the provision of dental services. *Journal of Dentistry* 2009;37:827 - 34.
17. Millar BJ, Hodson N. Assessment of the safety of two ozone delivery devices. *Journal of Dentistry* 2007;35:195-200
18. Bocci V. Ozone as Janus: this controversial gas can be either toxic or medically useful. *Mediators of inflammation* 2004;13(1):3-11.
19. Novales CG, Ferrari PH, Kantorovich EO, Lage-Marques JL. Ozone Therapy in Medicine and Dentistry. *The Journal of Contemporary Dental Practice* 2008;9(4):1-9.
20. Bocci VA. Scientific and Medical Aspects of Ozone Therapy. State of the Art. *Archives of Medical Research* 2006;37:425-35.
21. Nogales CG, Ferrari PH, Kantorovich EO, Lage-Marques JL. Ozone Therapy in Medicine and Dentistry. *The Journal of Contemporary Dental Practice* 2008;9(4):1-9.
22. Azarpazhooh A, Limeback H. The application of ozone in dentistry: A systematic review of literature. *Journal of Dentistry* 2008;36:104 - 116.
23. Castillo A, Galindo-Moreno P, Avila G, Valderrama M, Liebana J, Baca P. In vitro reduction of mutans streptococci by means of ozone gas application. *Quintessence Int* 2008;39(10):827-31.
24. Johansson E, Andersson-Wenckert I, Hagenbjörk-Gustafsson A, Dijken JWV. Ozone air levels adjacent to a dental ozone gas delivery system. *Acta Odontologica Scandinavica*, 2007;65:324-30.
25. Azarpazhooh A, Limeback H, Lawrence HP, Fillery ED. Evaluating the Effect of an Ozone Delivery System on the Reversal of Dentin Hypersensitivity: A Randomized, Double-blinded Clinical Trial. *JOE* 2009;35(1).
26. Kronenberg O, Lussi A, Ruf S. Preventive Effect of Ozone on the Development of White Spot Lesions during Multibracket Appliance Therapy. *The Angle Orthodontist* 2009;79(1):64-69.

27. Tang G, Yip HK, Cutress TW, Samaranayake LP. Artificial mouth model systems and their contribution to caries research: a review. *J Dent* 2003;31(3):161-71.
28. Di Gioia ML, Leggio A, Le Pera A, Liguori A, Napoli A, Siciliano C, et al. Quantitative analysis of human salivary glucose by gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2004;801(2):355-8.
29. Wong L, Sissions CH. A comparison of human dental plaque microcosm biofilms grown in an undefined medium and chemically defined artificial saliva. *Archives of Oral Biology* 2001;46:477-86.
30. Marquezan M, Corrêa FNP, Sanabe ME, Filho LER, Hebling J, Guedes-Pinto AC, et al. Artificial methods of dentine caries induction: A hardness and morphological comparative study. *Archives of Oral Biology* 2009;54:1111-17.
31. Benito IL, Ledesma OV, Pesce AA, Oliver G. Effect of Lactate on the Growth and Production of Diacetyl and Acetoin by Lactobacilli. *Journal of Dairy Science* 1985;68:1897-901.
32. Hoppenbrouwers PMM, Driessens FCM. The Effect of Lactic and Acetic Acid on the Formation of Artificial Caries Lesions. *Journal of Dental Research* 1988;67(12).
33. Goupry S, Croguennee T, Gentil E, Robins RJ. Metabolic flux in glucose/citrate co-fermentation by lactic acid bacteria as measured by isotopic ratio analysis. *FEMS Microbiology Letters* 2000;182:207-11.
34. Rosalen PL, Pearson SK, Bowen WH. Effects of copper, iron and fluoride co-crystallized with sugar on caries development and acid formation in desalivated rats *Archives of Oral Biology* 1997;41(11):1003-10.
35. Wiegand A, Buchalla W, Attin T. Review on fluoride-releasing restorative materials - Fluoride release and uptake characteristics, antibacterial activity and influence on caries formation. *Dental Materials* 2006;23:343-62.
36. Jardim JJ, Pagot MA, Maltz M. Artificial enamel dental caries treated with different topical fluoride regimens: An in situ study. *Journal of Dentistry* 2008;36:396-401.
37. Yamazaki H, Litman A, Margolis HC. Effect of fluoride on artificial caries lesions progression and repair in human enamel: Regulation of mineral deposition and dissolution under in vivo-like conditions. *Archives of Oral Biology* 2007;52:110-20.
38. Petersen PE, Lennon MA. Effective use of fluorides for the prevention of dental caries in the 21st century: the WHO approach. *Community Dentistry and Oral Epidemiology* 2004;32:319-21.
39. Castioni NV, Baehni PC, Gurny R. Current status in oral fluoride pharmacokinetics and implications for the prophylaxis against dental caries. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 1998;45:101-11.
40. Ingram GS, Agalamanyi EA, Higham SM. Caries and fluoride processes. *Journal of Dentistry* 2005;33:187-91.
41. Seemann R, Kluck I, Kage A. An in vitro microbial-based model for studying caries-preventive agents. *Acta Odontol Scand* 2006;64(1):27-30.
42. Pereira AC, Eggertsson H, Martinez-Mier EA, Mialhe FL, Eckert GJ, Zero DT. Validity of caries detection on occlusal surfaces and treatment decisions based on results from multiple caries-detection methods. *European Journal of Oral Sciences* 2009;117:51-57.
43. Goel A, Chawla H, Gauba K, Goyal A. Comparison of validity of DIAGNOdent with conventional methods for detection of occlusal caries in primary molars using the histological gold standard: An *in vivo* study. *J Indian Soc Pedod Prevent Dent* 2009;27(4).
44. Polydorou O, Pelz K, Hahn P. Antibacterial effect of an ozone device and its comparison with two dentin-bonding systems. *European Journal of Oral Sciences* 2006;114:349-53.
45. Baysan A, Beighton D. Assessment of the Ozone-Mediated Killing of Bacteria in Infected Dentine Associated with Non-Cavitated Occlusal Carious Lesions. *Caries Research* 2007;41:337-41.
46. Knight GM, McIntyre JM, Craig G, Mulyani, Zilm P. The inability of *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus acidophilus* to form a biofilm in vitro on dentine pretreated with ozone. *Australian Dental Journal* 2008;53:349-53.
47. Holmes J. Clinical reversal of root caries using ozone, double-blind, randomised, controlled 18-month trial. *Gerodontol* 2003;20:106-14.

IV - Anexos

Anexo I

Recomendações da KaVo para os diferentes valores DIAGNOdent® pen 2190 para cáries de fissuras e de superfícies



Anexo II

Composição da saliva artificial

(Modificação do meio BMM, com saliva artificial de Shellis modificada²⁹)

	(g/l)
Yeast extract	5
Proteose peptone	10
Cloreto de potássio (KCL; 74.5 g/mol)	1.2
Hidrogenocarbonato de sódio (NaHCO₃; 84 g/l)	0.6
Tiocianato de potássio (KSCN; 97,18 g/mol)	0.23
Di-hidrogenofosfato de sódio (Na₂HPO₄.12 H₂O; 358 g/mol)	0.9

Anexo III

Formulário de candidatura ao GAPI, nº 19



Gabinete de Apoio a Projectos de Investigação Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

**PROPOSTA DE TUTORIA DE PROJECTOS DE INVESTIGAÇÃO
E CANDIDATURA A PROJECTOS PARA ALUNOS-GAPI
Disciplinas de Investigação do Mestrado Integrado em
Medicina e Gabinete de Apoio a Projectos de Investigação–
GAPI - FORMULÁRIO ÚNICO -**

Orientador/es responsável/eis (docente ou investigador doutorado da FMUC):

Eunice Virgínia Palmeirão Carrilho (Professora Auxiliar com Agregação); Teresa Gonçalves (Professora Auxiliar)

Centro/Serviço/Instituto: Departamento de Medicina Dentária, Estomatologia e Cirurgia Maxilo-Facial – Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra; Centre for Neurosciences and Cell Biology Institute of Microbiology

EMAIL: eunicecarrilho@netcabo.pt **Nº TELEF:** 962405828

Área Temática do Projecto/Título do Projecto:

Dentistaria Operatória – Estudo experimental da acção do ozono em *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus fermentum*, desenvolvidos em cavidades dentárias.

Duração do projecto:

O projecto terá a duração, aproximada, de 9 meses sendo susceptível de ser continuada ao longo do tempo do curso.

(indicar especificamente se o projecto é susceptível de ser continuado ao longo do tempo do curso e respectiva duração)

FINANCIAMENTO

O projecto dispõe de financiamento: Sim Não

Em caso afirmativo:

Indicar agência financiadora:

Em caso negativo:

É solicitado financiamento GAPI: Sim Não

O projecto mantém condições para acolher alunos na ausência de financiamento GAPI Sim Não

ALUNOS

Nº máximo de alunos no projecto: 1

Exigência de competências prévias aos alunos? Sim Não

Quais? Aluno do 3º ano de Medicina Dentária, prática completa de Pré-Clínico com aprovação na disciplina de Dentistaria Operatória do 3º ano do Mestrado integrado de Medicina Dentária. Prática clínica básica de Dentistaria Operatória (História Clínica, remoção de tecido cariado, preparação cavitária e restauração com resina composta e amálgama).

(não aplicável a alunos do 1º e 2º anos do Mestrado Integrado em Medicina)

ROTAÇÕES LABORATORIAIS

(não aplicável ao Mestrado Integrado em Medicina Dentária)

O laboratório/serviço de acolhimento está disponível para receber alunos em rotação laboratorial? Sim Não

(As rotações laboratoriais são indispensáveis para que o aluno possa efectuar uma escolha informada do laboratório de acolhimento para realização do seu projecto de investigação. As rotações têm a duração de 1-2 meses e recebem grupos de 2-3 alunos. As rotações laboratoriais enquadram-se nas disciplinas de Investigação II e VII. Todos os projectos financiados pelo GAPI devem obrigatoriamente assegurar a realização de rotações laboratoriais, um semestre antes do início do financiamento do projecto.)

INFORMAÇÃO

(não aplicável ao Mestrado Integrado em Medicina Dentária)

De acordo com os Planos de Estudo aprovados para as Disciplinas de Investigação, a realização dos projectos de investigação será acompanhada pelos Regentes das Disciplinas referidas e envolverá apresentações regulares dos trabalhos em curso.

A avaliação dos Regentes contribuirá em 50% para as notas das disciplinas e a informação do Orientador Responsável corresponderá aos restantes 50%

(Disciplinas de Investigação III a VI e VIII a X).

Gabinete de Apoio a Projectos de Investigação-GAPI

Instituto de Fisiologia, Sub-Unidade 1, Pólo III

email: fisiologiamed@gmail.com

Gabinete de Apoio a Projectos de Investigação**Título do projecto:**

Estudo experimental da acção do ozono em *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus fermentum*, desenvolvidos em cavidades dentárias.

Resumo (Max. de 300 palavras):

O HealOzone (KaVo Dental) é usado em lesões cárie, permitindo a eliminação dos microrganismos através da exposição destes ao ozono. O ozono é um oxidante poderoso que tem a capacidade de eliminar 99% das bactérias, fungos e vírus. A lesão por cárie ocorre devido à dissolução ácida do esmalte e/ou dentina como consequência do metabolismo de micro-organismos específicos, sendo os principais o *Streptococcus mutans*, o *Lactobacillus* e várias espécies de *Actinomyces* e de *Streptococcus*. Uma vez eliminadas as bactérias ocorre remineralização da área tratada. Esta, pode ser auxiliada por produtos com altas concentrações de flúor, especialmente concebidos para o efeito, ou através da acção dos minerais da própria saliva. Obtem-se uma superfície dentária mais resistente a ambientes ácidos proporcionados por bactérias cariogénicas.

Este método de tratamento da cárie dentária, se eficaz, permitirá uma maior preservação dos tecidos dentários e uma intervenção operatória mínima sem necessidade de anestesia.

O nosso estudo tem como objectivo avaliar a eficácia antimicrobiana do ozono, quando aplicado em cavidades dentárias infectadas com *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus fermentum*.

Extraíram-se 60 dentes pré-molares isentos de cárie, devido a indicação ortodôntica. Constituíram-se 4 grupos com 10 dentes cada e um grupo com 20 dentes: grupo I – controlo, imerso em saliva artificial; grupo II – infectado com *Lactobacillus fermentum* (imerso em saliva artificial); grupo III – infectado com *Streptococcus mutans* (imerso em saliva artificial); grupo IV – infectado com *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus fermentum* (imerso em saliva artificial); grupo V – infectado com *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus fermentum*, sujeito aplicação do ozono e à acção de um gel mineralizante de flúor (fornecido pelo fabricante).

A avaliação da presença bacteriana foi realizada por amplificação do DNA 16 S e sequenciação sendo posteriormente efectuada a análise estatística dos dados.

(área, importância, meios, metodologias, etc.)

Objectivos (Max. de 500 palavras):

Fornecer um conjunto de regras e normas básicas (de pesquisa, organização discursiva e bibliográfica) que o trabalho nesta área necessariamente envolve.

Desenvolver as capacidades de pesquisa e selecção de informação na área da Medicina Dentária.

Compreender como o ozono actua e como exerce o seu efeito terapêutico.

Entender o mecanismo de acção do ozono na cavidade dentária: contacto com saliva, placa bacteriana e biomoléculas da dentina cariada.

Entender a acção antimicrobiana e remineralizante do ozono em dentes com lesão por cárie.

Comprovar que o esmalte e a dentina cariados são permeáveis ao ozono.

Identificar as situações indicadas para o uso do ozono na prática da Medicina Dentária.

Compreender e identificar a acção dos produtos fluoretados de remineralização.

Conhecer o equipamento disponível para aplicação do ozono em Medicina Dentária.

Reconhecer o papel do ozono numa prática clínica operativa minimamente invasiva.

Desenvolver capacidades de trabalho laboratorial, compreender o modelo experimental e saber interpretar os resultados, relacionando-os com os conhecimentos previamente adquiridos sobre a acção e eficácia das terapêuticas.

Plano de trabalhos (Max. de 1500 Palavras):

(fases, objectivos, metodologias, resultados de cada fase, calendarização, etc.)

Fases:**Fase preparatória:**

Extracção e armazenamento imediato dos dentes em soro fisiológico.

Fase Experimental:

Foram extraídos 60 pré-molares isentos de cárie, devido a indicação ortodôntica, e incluídos em blocos de acrílico.

Constituíram-se 4 grupos de 10 dentes cada e o grupo V com 20 dentes:

grupo I – controlo, imerso em saliva artificial;

grupo II – infectado com *Lactobacillus fermentum* (imerso em saliva artificial);

grupo III - infectado com *Streptococcus mutans* (imerso em saliva artificial);

grupo IV - infectado com *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus fermentum* (imerso em saliva artificial)

grupo V – infectado com *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus fermentum* sujeito à aplicação do ozono (imerso em saliva artificial);

No grupo I, II, III, IV e V efectuam-se as preparações das cavidades na fissura ocluso principal. Inoculam-se colónias de *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus fermentum* nas cavidades preparadas.

No grupo II, III, IV após inoculação, mantém-se em saliva artificial até ao final da fase experimental numa estufa a 37°C.

No grupo V, após co-infecção, faz-se uma aplicação de 40 segundos da terapêutica com ozono (Heal-Ozone) segundo a técnica descrita pelo fabricante.

No grupo V, após a aplicação do Ozono os dentes são mantidos em saliva artificial numa estufa a 37°C durante 30 dias, sendo efectuadas aplicações diárias de produtos fluoretados do kit de re-mineralização recomendado pelo fabricante.

Análise dos resultados:

Quantificação de cárie é efectuada pelo DIAGNOdent® pen 2190

Análise e avaliação da actividade bacteriana após a fase experimental anteriormente descrita directamente por amplificação do DNA 16 S e sequenciação.

Processamento dos resultados:

Análise estatística dos resultados obtidos na fase anterior.

Objectivos:

1 - Avaliação da eficácia antimicrobiana do ozono, quando aplicado em cavidades dentárias infectadas com *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus fermentum*.

Metodologia:

Na fase pré-operatória, os 60 pré-molares seleccionados apresentavam-se isentos de cárie, tendo sido extraídos com forceps de modo a evitar fissuras no esmalte. Seguidamente, foi efectuado o seu armazenamento em frascos de recolha imersos em soro fisiológico.

Na fase experimental, os 60 pré-molares são incluídos em blocos de acrílico.

Os dentes ficam imersos em saliva artificial numa estufa a 37°C durante o decorrer do trabalho experimental.

Nos grupos I, II, III, IV e V é efectuada uma cavidade de dimensões reduzidas (0,08mm de largura, 1mm de profundidade e 3mm de comprimento) com uma broca cilíndrica 008 diamantada montada em turbina, com refrigeração ar/água.

No grupo II, os dentes são inoculados com *Lactobacillus fermentum*, ficando imersos em saliva artificial numa estufa a 37°C durante o decorrer do trabalho experimental.

No grupo III, os dentes são inoculados com *Streptococcus mutans*, ficando imersos em saliva artificial numa estufa a 37°C durante o decorrer do trabalho experimental.

No grupo IV, os dentes são inoculados com *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus fermentum*, ficando imersos em saliva artificial numa estufa a 37°C durante o decorrer do trabalho experimental.

No grupo V, os dentes são inoculados com *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus fermentum* e mantidos em saliva artificial numa estufa a 37°C durante 4 semanas. Após este período são sujeitos à aplicação do ozono através do Heal-Ozone mediante a adaptação do dispositivo de aplicação com cúpulas de silicone seleccionadas segundo o tipo de superfície, sobre a qual formam um vácuo. Nessas cúpulas o ozono apresenta uma concentração de 2100 ppm com um fluxo de 100x/segundo. Esta terapêutica é repetida após 30 dias.

Durante o tempo decorrido entre as aplicações e após a segunda aplicação do Ozono, os dentes são mantidos em saliva artificial numa estufa a 37°C durante 30 dias sendo efectuadas aplicações diárias de produtos fluoretados do kit de re-mineralização recomendado pelo fabricante.

Após o final da fase experimental é efectuada uma recolha, por escavação de cada uma das cavidades preparadas através dos escavadores dentinários esterilizados. A análise e avaliação da actividade bacteriana faz-se directamente por amplificação do DNA 16 S e sequenciação.

O processamento dos dados é efectuada através da análise estatística dos resultados obtidos na fase anterior.

Resultados esperados para cada grupo:

No Grupo I, grupo de controlo, não se espera encontrar actividade bacteriana.

No Grupo II, III e IV espera-se encontrar um número mais elevado de colónias bacterianas do que no grupo V, já que não se efectua qualquer tratamento sobre a superfície dentária.

No Grupo V, espera-se encontrar, para além ausência ou redução da actividade bacteriana, áreas de re-mineralização dos tecidos dentários.

(fases, objectivos, metodologias, resultados de cada fase, calendarização, etc.)

Competências específicas a adquirir pelo aluno:

- 1.Recolha de bibliografia actual sobre o tema a desenvolver
2. Formular uma hipótese científica.
- 3.Realizar os grupos/amostra e integrá-los nos materiais que o próprio deve definir, para

aplicação do método experimental a desenvolver.

4. Recolher os resultados.

5. Entender e/ou aprender o tratamento dos resultados.

6. Saber interpretar e discutir os resultados de forma crítica, integrando-os e relacionando-os com a recolha bibliográfica prévia.

(Entre outros requisitos, os alunos deverão: ser capazes de formular uma hipótese científica; ser capazes de desenhar um projecto científico e identificar a sua relevância face ao estado actual do conhecimento; saber desenhar experiências científicas aplicando protocolos específicos; saber interpretar e discutir de forma crítica os resultados obtidos; descrever e expor oralmente os resultados obtidos.)