



André Ulisses Dantas Batista
Ricardo Dias de Castro
Organizadores

MÉTODOS E TÉCNICAS DE PESQUISA APLICADAS À ODONTOLOGIA

EJ Editora
UFPB

**MÉTODOS E TÉCNICAS DE PESQUISA
APLICADAS À ODONTOLOGIA**



**UNIVERSIDADE
FEDERAL DA PARAÍBA**

Reitora

MARGARETH DE FÁTIMA FORMIGA MELO DINIZ

Vice-Reitor

BERNARDINA MARIA JUVENAL FREIRE DE OLIVEIRA

Pró-Reitora PRPG

MARIA LUIZA DE ALENCAR MAYER FEITOSA



Diretora

EDITORA DA UFPB

IZABEL FRANÇA DE LIMA

Supervisão de Administração

GEISA FABIANE FERREIRA CAVALCANTE

Supervisão de Editoração

ALMIR CORREIA DE VASCONCELLOS JÚNIOR

Supervisão de Produção

JOSÉ AUGUSTO DOS SANTOS FILHO

CONSELHO EDITORIAL

ADAILSON PEREIRA DE SOUZA (Ciências Agrárias)

ELIANA VASCONCELOS DA SILVA ESVAEL (Linguística, Letras E Artes)

FABIANA SENA DA SILVA (Interdisciplinar)

GISELE ROCHA CÔRTEZ (Ciências Sociais Aplicadas)

ILDA ANTONIETA SALATA TOSCANO (Ciências Exatas e da Terra)

LUANA RODRIGUES DE ALMEIDA (Ciências da Saúde)

MARIA DE LOURDES BARRETO GOMES (Engenharias)

MARIA PATRÍCIA LOPES GOLDFARB (Ciências Humanas)

MARIA REGINA VASCONCELOS BARBOSA (Ciências Biológicas)

André Ulisses Dantas Batista
Ricardo Dias de Castro
Organizadores

MÉTODOS E TÉCNICAS DE PESQUISA APLICADAS À ODONTOLOGIA

Editora UFPB
João Pessoa-PB
2019

Copyright © 2019- UFPB

Efetuada o Depósito Legal na Biblioteca Nacional,
conforme a Lei nº 10.994, de 14 de dezembro de 2004.

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS À EDITORA UFPB

É proibida a reprodução total ou parcial, de qualquer forma ou por qualquer meio.
A violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610/1998) é crime estabelecido no artigo
184 do Código Penal.

O conteúdo desta publicação é de inteira responsabilidade do autor.

Impresso no Brasil. Printed in Brazil.

Projeto Gráfico	EDITORA UFPB
Editoração Eletrônica	CLEMENTE RICARDO SILVA
Design da Capa	CLEMENTE RICARDO SILVA
Imagens da Capa	Fotomicrografia de corte transversal da raiz distovestibular do primeiro molar superior esquerdo, demonstrando as fibras colágenas da matriz óssea e ligamento periodontal por microscopia confocal, 200x magnificação. <i>Créditos:</i> Fátima Regina Nunes de Sousa, Vanessa Costa de Sousa Ferreira e Renata Ferreira de Carvalho Leitão.

Catálogo na publicação - Setor de Catalogação e Classificação

M593 Métodos e técnicas de pesquisa aplicadas à odontologia / André Ulisses Dantas Batista, Ricardo Dias de Castro (organizadores). - João Pessoa : Editora UFPB, 2019.
206p. : il.
ISBN: 978-85-237-1427-7
1. Odontologia. 2. Esmalte dental. 3. Saúde dental. I. Batista, André Ulisses Dantas. II. Castro, Ricardo Dias de. III. Título.

UFPB/BC

CDU: 616.314

EDITORA DA UFPB Cidade Universitária, Campus I – s/n
João Pessoa – PB
CEP 58.051-970
editora.ufpb.br
editora@ufpb.edu.br
Fone: (83) 3216.7147

Editora filiada à:



Livro aprovado para publicação através do Edital Nº 5/2018-2019, financiado pelo Programa de Apoio a Produção Científica - Pró-Publicação de Livros da Pró-Reitoria de Pós-Graduação da Universidade Federal da Paraíba.

SUMÁRIO

PREFÁCIO	09
-----------------------	-----------

CAPÍTULO 1

BIOÉTICA APLICADA À PESQUISA ODONTOLÓGICA

Cláudia Helena Soares de Moraes Freitas

Daianne de Sousa Medeiros

<i>Ricardo Dias de Castro</i>	11
-------------------------------------	-----------

CAPÍTULO 2

EPIDEMIOLOGIA COMO FERRAMENTA DE PESQUISA EM SAÚDE

Yuri Wanderley Cavalcanti

<i>Antônio Carlos Pereira</i>	23
-------------------------------------	-----------

CAPÍTULO 3

REVISÕES SISTEMÁTICAS E METANÁLISES EM ODONTOLOGIA

Bianca Marques Santiago

<i>Yuri Wanderley Cavalcanti.....</i>	61
---------------------------------------	-----------

CAPÍTULO 4

QUANTIFICAÇÃO DO CONTEÚDO MINERAL DO ESMALTE DENTAL

Frederico Barbosa de Sousa

Raquel Fernanda Gerlach

<i>Eugênia Livia de Andrade Dantas</i>	87
--	-----------

CAPÍTULO 5

METODOLOGIAS APLICADAS PARA SIMULAR A CORROSÃO IN VITRO DAS ESTRUTURAS DENTAIS E DE MATERIAIS ODONTOLÓGICOS

Fabiola Galbiatti de Carvalho

Hugo Lemes Carlo

Alana Gail Lopes

Taís Chaves Magalhães 113

CAPÍTULO 6

MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DA DUREZA E RUGOSIDADE SUPERFICIAL DE BIOMATERIAIS ODONTOLÓGICOS

Sara Brito da Silva

André Ulisses Dantas Batista

Eliton Souto de Medeiros

Paulo Rogério Ferreti Bonan 123

CAPÍTULO 7

OS PRODUTOS NATURAIS NO CONTEXTO DA PESQUISA ODONTOLÓGICA

Ricardo Dias de Castro

Maria Carmeli Correia Sampaio

Gisely Maria Freire Abílio de Castro

Edeltrudes de Oliveira Lima 163

CAPÍTULO 8

TÉCNICAS HISTOMORFOMÉTRICAS DO TECIDO MINERALIZADO APLICADO A PESQUISA EXPERIMENTAL NA ODONTOLOGIA

Fátima Regina Nunes de Sousa

Vanessa Costa de Sousa Ferreira

Renata Ferreira de Carvalho Leitão 185

SOBRE OS AUTORES..... 201

Prefácio

Com o propósito de promover compartilhamento de saberes relacionados às investigações científicas atreladas às suas linhas de pesquisa, o Programa de Pós-Graduação em Odontologia (PPGO) do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba propõe nessa obra intitulada **“Métodos e Técnicas de Pesquisa Aplicadas à Odontologia”** apresentar um referencial teórico, embasado em literatura científica atualizada, a oportunidade de divulgação do seu expertise em pesquisa, que vem marcando as atividades do programa, desde sua concepção.

O Programa de Pós-graduação em Odontologia da UFPB, iniciando em 1990, vem contribuindo de forma significativa para o desenvolvimento da pesquisa científica e formação de recursos humanos no estado da Paraíba, além de apresentar inserção dos seus egressos em instituições de ensino no estado e em outros estados brasileiros. Imerso nessa conjuntura institucional e regional, o PPGO da UFPB comemora em 2018 a conquista do conceito 4 da CAPES, o que nos habilitou a solicitar a oferta do curso de doutorado, considerando sua reconhecida trajetória na formação, em nível de mestrado, de 209 profissionais. Trata-se de um programa que reconhece a extrema necessidade de consolidação de suas atividades a partir de uma postura centrada na qualidade, ética e atenta às demandas atuais do campo científico e tecnológico, com integração loco-regional e internacional. Os capítulos apresentam conceitos teóricos que envolvem as linhas de pesquisa do programa, que foram reformuladas e apresentam 3 eixos norteadores: **“O cuidado em saúde e a prática odontológica baseadas em evidências”**; **“Fisiopatologia e morfologia dos tecidos buco-maxilo-faciais”** e **“Inovação de produtos e terapêutica dos agravos em saúde”**.

Esta obra reflete o caráter multifacetado, interdisciplinar e colaborativo do PPGO/UFPB. Nela, docentes pesquisadores, pertencentes a UFPB ou fora dela, que representam parte da rede de colaboração interinstitucional, bem como estudantes, apresentam conhecimentos

relacionados aos principais métodos e técnicas de pesquisas científicas que são desenvolvidas no âmbito da UFPB. Isso reflete seu patrimônio físico e intelectual, e fomenta maior inserção social de suas ações, uma vez que tal divulgação promove maior diálogo com a sociedade, tão necessário para proposição de investigações científicas que atendam aos anseios e demandas sociais. Desejamos que ela possa auxiliar àqueles que se interessam em se aprimorar no campo da pesquisa odontológica, auxiliando também aos estudantes e pesquisadores da Odontologia interessados em participar de atividades de pesquisas desenvolvidas pelo referido Programa.

Agradecemos também a todos os demais autores que dedicaram seu tempo e com o relato de suas experiências, puderam dar a essa obra uma identidade própria. Por último, nossa gratidão à UFPB, pela oportunidade de divulgá-la. A todos os envolvidos, nossa gratidão.

André Ulisses Dantas Batista
Ricardo Dias de Castro
Organizadores

Capítulo 1

BIOÉTICA APLICADA À PESQUISA ODONTOLÓGICA

Cláudia Helena Soares de Moraes Freitas

Daianne de Sousa Medeiros

Ricardo Dias de Castro

Introdução

A premissa de que a realização de pesquisas científicas deva atender aos preceitos éticos e respeitar a dignidade humana está posta. Entretanto, é necessário compreender que a atual conjuntura institucional brasileira e os valores e concepções da sociedade que permeiam essa temática são recentes e estão em processo constante de reflexão e discussão.

Bioética, reconhecida academicamente como ética aplicada à vida, tem como ponto de partida dilemas e conflitos éticos que se apresentam durante o cotidiano de profissionais de saúde e pesquisadores. São situações que levam ao processo de reflexão individual e coletiva para tomadas de decisão. Os valores, cultura, religião, conhecimentos científicos e legislações institucionais colaboram para que os envolvidos com os referidos dilemas e conflitos éticos possam encontrar uma solução para os mesmos.

Os preceitos teóricos e práticos atuais que envolvem a aplicação da bioética são passíveis de mudança, uma vez que os mesmos são marcados pelo tempo e espaço, e, como construção histórica, estão em constante processo de releitura e renovação. Quando pensamos a aplicação da bioética no contexto das pesquisas científicas, devemos reconhecer o caráter mutável e questionável do conhecimento científico, que além de apresentar continuamente dilemas éticos, também ajuda na compreensão de novos modos de pensar e agir diante dos problemas de pesquisa.

Essa constatação pode ser exemplificada a partir de questionamentos como este: De que modo as novas tecnologias reprodutivas são encaradas, do ponto de vista ético, pela sociedade e comunidade científica? De

modo semelhante, podemos refletir sobre a aplicabilidade de técnicas de manipulação genética na prevenção e tratamento de doenças.

As investigações científicas no âmbito da Odontologia, a exemplo das outras áreas do conhecimento no campo da saúde, são caracterizadas pelo marcante caráter quantitativo, positivista e centrado na figura do pesquisador. Esses aspectos influenciam as concepções atreladas à bioética, que de modo objetivo é compreendida a partir de marcos regulatórios, a exemplo das resoluções publicadas pelo Conselho Nacional de Saúde, como a 466, datada de 22 de dezembro de 2012.

Neste capítulo, apresentaremos elementos básicos que colaboram para compreensão de conceitos e normas atreladas à condução de pesquisas científicas que envolvem seres humanos.

A bioética e a teoria principialista

O termo Bioética (“ética da vida”) foi utilizado pela primeira vez no início da década de 1970, pelo médico oncologista norte-americano Van Rensselaer Potter, que preocupado com as proporções tomadas pelos avanços da ciência e tecnologia sobre a vida humana e dos ecossistemas propôs uma nova área de conhecimento que discutiria as implicações do progresso científico e tecnológico a luz dos valores humanos. Desta forma, Potter definiu a bioética como a “ciência da sobrevivência humana”, que tinha como intenção auxiliar a comunidade a repensar às possíveis problemáticas do progresso científico e tecnológico à vida e limitar a ação do homem sobre esta (JUNQUEIRA, 2010; PESSINI, 2013).

Sendo assim, a bioética é uma área de estudo multidisciplinar que integra as ciências biológicas, médicas e humanas afim de discutir problemáticas morais relacionados a temas complexos como aborto, eutanásia, fertilização *in vitro*, estudos com células tronco, melhoramento genético, entre outros (DALLAGNOL, 2005).

Um grande marco para a bioética foi a criação, em 1974, da *Comissão Nacional para Proteção de Seres Humanos da Pesquisa Biomédica e Comportamental*, que tinha como objetivo nortear os princípios éticos-

morais básicos para experimentação com seres humanos, que originaria mais para frente, em 1978, o Relatório de Belmont, documento que instituiu os três princípios éticos fundamentais para pesquisas com seres humanos: o respeito à autonomia, beneficência e justiça (LOPES, 2014; DALL'AGNOL, 2005).

Em 1979, tendo como base o relatório de Belmont, os estudiosos Tom Beauchamp e James Childress publicaram a obra *Princípios da ética biomédica*, que consolidou a teoria principialista e direcionaram os aspectos éticos e morais as práticas clínicas em saúde. No principialismo, Beauchamp e Childress idealizaram quatro princípios bioéticos que norteiam as práticas terapêuticas e as pesquisas médicas biológicas em saúde, que são elas: respeito à autonomia, beneficência, não-maleficência e justiça (MUNÖZ, 2004).

O princípio da autonomia refere-se à capacidade de autodeterminação do indivíduo sobre dado problema ou situação, exercitando sua competência de analisar, decidir e agir livremente sem sofrer influências externas (UGARTE e ACIOLY, 2014; DALL'AGNOL, 2005). Para tanto, é preciso que fique claro que um indivíduo só pode ser considerado autônomo quando este tem capacidade de se autogovernar, agindo intencionalmente e com liberdade para agir intencionalmente; desta forma nem todos podem ser considerados seres autônomos, sendo aos vulneráveis (crianças, deficientes mentais ou privados de liberdade) garantido o direito de proteção enquanto seres não autônomos. Uma maneira de garantir e estimular o respeito à autonomia, que deve ser realizada por pesquisadores/profissionais da saúde, é por meio do conhecimento, de forma clara e acessível, quanto aos objetivos, procedimentos metodológicos e benefícios a que o indivíduo será submetido no tratamento ou pesquisa a qual se pretende fazer, pois somente bem instruído é que um indivíduo é capaz de exercer livremente sua autonomia (UGARTE e ACIOLY, 2014, JUNQUEIRA, 2010).

O respeito à autonomia dos indivíduos em participar de pesquisas na área biomédica é salvaguardado, no Brasil, pela Resolução 466/2012 (alínea IV), que afirma: “O respeito devido à dignidade humana exige

que toda pesquisa se processe com consentimento livre e esclarecido dos participantes, indivíduos ou grupos que, por si e/ou por seus representantes legais, manifestem a sua anuência à participação na pesquisa” (BRASIL, 2013).

Os princípios da beneficência (*bonumfacere*) e da não maleficência (*primum non nocere*) que são atribuídas à tradição hipocrática da medicina, tratam da máxima importância de fazer o bem e não ocasionar o mal. Sendo assim, toda vez que um profissional da saúde propor um procedimento terapêutico, deve-se avaliar se o procedimento proposto é o mais indicado para enfermidade a ser tratada e ponderar se os benefícios elencados são maiores aos riscos em que o paciente será submetido (BANDEIRA et al., 2014).

O último princípio da teoria principialista é o da justiça que está intimamente ligado à equidade dos serviços em saúde e aos benefícios providos por este. No principialismo este princípio está unicamente ligado à justiça distributiva, ou seja, que se refere a devida alocação dos recursos na saúde pelo Estado e sua obrigatoriedade em instituir condições mínimas para seu bom funcionamento. Entretanto, outra concepção de justiça pode ser aplicada à saúde, além do financiamento de custos, trata-se do procedimento terapêutico justo e adequado a que os usuários têm direito levando em consideração as necessidades individuais de cada ser humano (JUNQUEIRA, 2010; BANDEIRA et al., 2014).

Embora o principialismo seja a teoria bioética mais conhecida na saúde, inúmeras críticas são posicionadas a ela, sobretudo por utilizar em suas bases normativas critérios subjetivos ou generalistas demais na resolução de problemas complexos; por exemplo, algumas críticas estão voltadas ao princípio da beneficência que diz que o profissional/pesquisador deve procurar fazer o bem, entretanto, o conceito de bem ou mal vai de acordo com as concepções individuais de cada pessoa e o que pode ser considerado “bem” para um profissional para outro profissional ou para o paciente pode não ter o mesmo significado (DALL’AGNOLL, 2005). Além disso, vários dispositivos constitucionais poderiam ser transversalmente invocados como orientadores da bioética, assim como todas as disposições relativas à vida humana e à sua preservação e qualidade, não devendo ficar restrita a uma análise baseada na teoria principialista.

A regulamentação da pesquisa em seres humanos no Brasil

No Brasil a primeira iniciativa objetivando normatizar a pesquisa na área da saúde e a ética nas pesquisas em seres humanos foi a Resolução no 01/88, do Conselho Nacional de Saúde (CNS), de aplicação em todo o território nacional. Apesar de ter sido pouca seguida pelos pesquisadores, foi um marco importante e norteou a elaboração da Resolução 196/96 do CNS, a primeira que regulamentou a pesquisa em seres humanos. A nossa Resolução tomou como base documentos internacionais como o Código de Nuremberg (1947), a Declaração dos Direitos do Homem (1948), a Declaração de Helsinque (1964), o Acordo Internacional sobre Direitos Cíveis e Políticos (1966) e as Propostas e Diretrizes Éticas Internacionais para Pesquisas Biomédicas Envolvendo Seres Humanos (1982), e incorporou também a legislação brasileira, com a aprovação da constituição de 1988. Esta Resolução estabeleceu os princípios básicos para análise ética dos protocolos de pesquisa, adotando os referenciais da Teoria Principialista; a criação dos Comitês de Ética em Pesquisa (CEP) e a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP).

Um dos principais papéis desenvolvidos pelos CEPs é defender os interesses dos participantes da pesquisa, protegendo-os e salvaguardando seus direitos e dignidade. Além disso, contribui para a qualidade das pesquisas e para a discussão do papel da pesquisa no desenvolvimento institucional e social da comunidade.

Além da Resolução 196/96, outras Resoluções complementares, leis e decretos foram editadas para normatizar várias áreas temáticas: novos fármacos, vacinas e testes diagnósticos; remoção de órgãos, tecidos e partes do corpo humano para fins de transplante e tratamento; a prática de grandes laboratórios multinacionais de utilizarem os países em desenvolvimento como locais de pesquisa; reprodução humana; populações indígenas; engenharia genética, clonagem ou pesquisa genética com embriões (ROCHA, 2011).

Após 17 anos de vigência da Resolução 196/96, o Conselho Nacional de Saúde aprovou a Resolução 466/2012, substituindo-a, tendo em vista o aprimoramento dos seus critérios, fruto de muitas discussões, destacando-se alguns aspectos referentes à autonomia do paciente: ninguém tem

o direito de utilizar informação ou material biológico de outro, sem o seu consentimento; e o termo de consentimento não é genérico, o consentimento é para um determinado projeto de pesquisa.

Uma mudança bastante evidente diz respeito à ampliação da autonomia. Na nova resolução o consentimento livre e esclarecido passa a chamar-se **Do processo de consentimento livre e esclarecido**, ao mesmo tempo em que aumenta os direitos de proteção dos participantes. Isto pode ser constatado no item III.2, onde o antigo “ou” foi substituído pelo “e”: “assegurar aos participantes da pesquisa as condições de acompanhamento, tratamento, assistência integral e orientação, conforme o caso, enquanto necessário, inclusive nas pesquisas de rastreamento. Outro destaque é para as pesquisas em âmbito internacional ou envolvendo colaboração estrangeira, que passou a exigir, por exemplo, o registro obrigatório no Brasil de eventuais patentes de drogas desenvolvidas no território.

Outras mudanças trazidas pela resolução 466/12 estão: a garantia que o placebo, quando necessário, será comparado com os efeitos dos melhores métodos equivalentes existentes; garantia do acesso gratuito e por tempo indeterminado ao melhor tratamento existente, independentemente dos resultados da pesquisa, isto é, seja ele oriundo dos resultados da própria pesquisa ou não (BRASIL, 2013).

Os órgãos regulamentadores em pesquisa reconhecendo as necessidades específicas da área de Ciências Humanas e Sociais (CHS) aprovaram a Resolução CNS 510/16. Essa Resolução atende as demandas da área, permitindo análise diferenciada nos protocolos de pesquisas, principalmente no que diz respeito aos riscos e a aplicação do Termo de Consentimento Livre Esclarecido, que no artigo 15 trata do consentimento e do assentimento, os quais podem ser dispensados com a devida justificativa. O registro do consentimento e do assentimento pode ser feito de formas variadas (escrita, sonora, imagética, entre outras).

Mesmo estando em vigência a Resolução 510/2016, a sua plena operacionalização é problemática, pois há a necessidade do formulário específico de CHS na Plataforma Brasil, e a aprovação da resolução sobre tramitação de protocolos de acordo com o nível de risco. Sem essas duas

medidas, a efetividade da Resolução 510/2016 fica bastante prejudicada (MAINARDES, 2017).

Plataforma Brasil

A Plataforma Brasil, lançada em 2012, é um sistema *online* nacional e unificado de registros de pesquisas envolvendo seres humanos, que acompanha todos os tramites dos protocolos de pesquisa apresentados por todas as áreas do conhecimento nas instituições de pesquisa no Brasil, o sistema CEP/CONEP. Ela permite que as pesquisas sejam acompanhadas em seus diferentes estágios - desde sua submissão até a aprovação final pelo CEP e pela CONEP, quando necessário, possibilitando também o acompanhamento das pesquisas através dos relatórios parciais e finais. O sistema permite, ainda, a apresentação de documentos também em meio digital, e propicia à sociedade o acesso aos dados públicos de todas as pesquisas aprovadas (BRASIL, 2012).

Como destacam Schuch e Victora (2015), a Plataforma Brasil também é um instrumento de avaliação e regulação do trabalho dos próprios CEPs, pois a página inicial do site da Plataforma Brasil apresenta o relatório quantitativo da qualidade de seu próprio funcionamento. É possível verificar o número de projetos recebidos e emitidos dos CEPs e da CONEP, o tempo médio do primeiro parecer e do parecer final, assim como o número de pendências emitidas e o de projetos em andamento, ou seja, permite a elaboração de indicadores de desempenho e o seu acesso público, o que parece procedimentos eficazes de controle e regulação ética, e também de transparência nos processos regulatórios.

Pesquisa com uso de animais em investigações científicas

As pesquisas básicas envolvem, de modo geral, problemáticas relacionadas ao aprimoramento do conhecimento de processos fisiopatológicos de órgão e sistemas biológicos. Além disso, se propõem ao desenvolvimento de novas propostas terapêuticas de grande potencial para aplicação em seres humanos, garantindo, de certo modo, minimização de

riscos e consolidação de hipóteses científicas alternativas que direcionam para o efeito benéfico esperado.

Aproximações de características fisiológicas e bioquímicas entre os sistemas biológicos de animais e seres humanos impulsionaram de modo expressivo o número de investigações a partir de utilização de animais, especialmente após o desenvolvimento do método científico. Atualmente ainda se evidencia a ampla utilização dos mesmos em experimentos, com destaque para o uso de vertebrados maiores como cobaias, ratos, camundongos, coelhos, porcos e cachorros, e menores, como zebra fish. Além destes, uma discussão atual, à luz da bioética, inclui a utilização de animais invertebrados, como *Artemia salina*, *Drosophila melanogaster* e *Galleria mellonella* (FREIRES et al., 2017).

Independente da classificação que considerada presença ou não de coluna vertebral, é inquestionável que a manipulação de animais em aulas acadêmicas e experimentos científicos mereça atenção de toda sociedade. Como mencionado no início deste capítulo, a ciência e a ética são moldadas pelo tempo e espaço, e, no tempo atual, concepções e valores que envolvem o papel do animal na ciência são moldados pelas preocupações em relacionadas ao direito à vida, ao sofrimento e a real necessidade da utilização dos mesmos que justifiquem o progresso da ciência e tecnologia.

Nesse sentido, a experimentação animal, classificada como delineamento de pesquisa não clínica (*in vivo*) deve ser precedida por estudos prévios, a exemplo dos protocolos *in vitro* e *in silico*, que apontem hipóteses que sustentem a condução do estudo *in vivo*. Condutas como estas devem fazer parte dos protocolos dos grupos de pesquisa e a discussão deve considerar todos as pessoas envolvida: estudantes, técnicos de laboratórios e pesquisadores.

Nos últimos anos, impulsionadas pelo desenvolvimento de uma mentalidade sustentável, as empresas privadas e públicas, passaram a adotar o princípio dos três R's (*Reduzir, Reutilizar e Reciclar*), visando minimizar os impactos ambientais das práticas produtivas. Nesta mesma direção, defensores dos direitos dos animais e comunidade científica propuseram a aplicação do princípio dos três R's para o uso de

animais (*Reduction* - redução, *Replacement* – substituição e *Refinement* - refinamento), e desde a década de 1950 é reconhecido como compromisso mundial para proteção de animais em meio acadêmico. O quadro 1 apresenta os principais pressupostos desse princípio dos três R's para uso de animais.

QUADRO 01: Princípios dos R's no uso de animais em pesquisas científicas

<i>Reduction</i> Redução	<i>Replacement</i> Substituição	<i>Refinement</i> Refinamento
Redução no número de animais utilizados nas pesquisas a partir da realização adequada delineamentos experimentais e cálculo amostral.	Substituição de estudos com animais por análises sistemas computacionais (<i>in silico</i>) e/ou aplicação de técnicas de <i>in vitro</i> utilizando cultivos de células e tecidos.	Realização de treinamento adequado antes de realizar qualquer experimento, uso de técnicas apropriadas para manuseio dos animais, uso de analgésicos e anestésicos para procedimentos potencialmente dolorosos, estabelecimento de cuidados pós-operatórios.

No Brasil, a Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008 estabelece procedimentos para o uso científico de animais vertebrados e cria o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), que tem como objetivo de credenciar instituições para criação e/ou utilização de animais para fins de pesquisa e ensino, estabelecendo e revendo, constantemente, normas e cuidados para o uso e cuidados com animais, bem como normatizando o funcionamento de centros de criação, biotérios e laboratórios de experimentação animal.

Em âmbito institucional, a condução de projetos de pesquisas que envolvem a participação de animais deve ser precedida pela prévia aprovação

dos mesmos pelas Comissões de Ética no Uso de Animais (CEUA), que são integrados por médicos veterinários, biológicos, pesquisadores e representantes de sociedades protetoras de animais legalmente estabelecidas no país. Estas comissões apresentam, dentre suas atribuições, a função de analisar previamente os protocolos e procedimentos de pesquisa a serem realizados. Atualmente, instituições de pesquisas, agências de fomento, eventos e revistas científicas exigem apresentação prévia de certificado de aprovação do projeto de pesquisa pelo CEUA, quando este envolver o uso de animais em seus protocolos experimentais.

Considerações finais

A questão da proteção da pesquisa envolvendo seres humanos nos requisitos éticos e bioéticos é motivo de constante preocupação da comunidade científica. O conflito de interesses é constante, portanto os pesquisadores devem refletir sobre os aspectos éticos dos projetos que pretendem desenvolver. O processo de avaliação ética não pode ser um procedimento meramente burocrático e utilitarista, é essencial conceber a ética na pesquisa como uma questão de formação, que envolve o estudo e a discussão da ética na pesquisa na graduação e na pós-graduação (seus princípios e procedimentos), para assim avançar nas discussões sobre ética em pesquisa.

É fundamental também o incremento da participação dos pesquisadores de ciências humanas e sociais nos CEPs das instituições, o que contribuirá na avaliação da ética em geral e no aprendizado do grupo sobre o processo de avaliação, a partir de uma discussão interdisciplinar e multidisciplinar. De modo similar, a disseminação de uma cultura de respeito e reconhecimento da vida animal deve fazer parte do processo formativo de pesquisadores, que devem promover uma ciência justa, ética e responsável.

Referências

BANDEIRA, A. M. B.; WERNECK, J. T.; POSTORIVO, R.; MEDEIROS, U. V. A visão bioética do código de ética odontológico brasileiro. **Revista Brasileira de Odontologia**, v. 71, n. 1, p. 53-57, jan-jun 2014.

BRASIL. Conselho Nacional de Saúde. Resolução nº 196, de 10 de outubro de 1996. Aprova Diretrizes e Normas regulamentadoras de pesquisa envolvendo seres humanos. Brasília: **Diário Oficial da União**, 1996.

BRASIL. Ministério da Saúde. Plataforma Brasil. Brasília-DF, 2012. Disponível em: <http://plataformabrasil.saude.gov.br>. Acessado em: 02 out 2018.

BRASIL. Conselho Nacional de Saúde. Resolução nº 466, de 12 de dezembro de 2012. Aprova normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos. Brasília: **Diário Oficial da União**, 2013.

BRASIL. Conselho Nacional de Saúde. Resolução nº 510, de 7 de abril de 2016. Dispõe da Diretrizes e Normas regulamentadoras de pesquisa envolvendo seres humanos. Brasília: **Diário Oficial da União**, 2016.

BRASIL. Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008. Regulamenta o inciso VII do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais; revoga a Lei nº 6.638, de 8 de maio de 1979, e dá outras providências. Brasília: **Diário Oficial da União**, 2008.

DALL'AGNOL, D. **Bioética**. 5ª edição. Rio de Janeiro: Jorge Zahar, 2005.

FREIRES, I. A.; SARDI, J. C. P.; CASTRO, R. D.; ROSALEN, P. L. Alternative animal and non-animal models for drug Discovery and

development: bônus ou burden? **Pharmaceutical Research**, v. 34, n. 4, p. 681-686, nov, 2017.

JUNQUEIRA, C. R. **Bioética**: Conceito, fundamentação e princípios. In: RAMOS, D. L.P. São Paulo, 2010. Disponível em: http://www.unasus.unifesp.br/biblioteca_virtual/esf/1/modulo_bioetica/Aula01.pdf. Acessado em: 20 set 2018.

LOPES, J.A. Bioética- uma breve história: de Nuremberg (1947) a Belmont (1979). **Revista Médica de Minas Gerais**, v. 24, n.2, p. 262-273, 2014.

MAINARDES, J. A ética na pesquisa em educação: panorama e desafios pós-Resolução CNS nº 510/2016. Educação (Porto Alegre), v. 40, n. 2, p. 160-173, mai- ago, 2017.

MUÑOZ, D. R. Bioética: a mudança da postura ética. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 70, n. 5, p. 578-579, set-out, 2004.

PESSINI, L. As origens da bioética: do credo biomédico de Potter ao imperialismo bioético de Fritz Jahr. **Revista Bioética**, v. 21, n. 1, p. 9-19, 2013.

ROCHA, M.E.G.T. A Bioética em face da legislação brasileira e do mercosul. In **Bioética em Debate: aqui e lá fora** (Swedenberger do Nascimento Barbosa Org) Editora IPEA, 2011, p.131-146.

SCHUCH, P.; VICTORA C. Pesquisas envolvendo seres humanos: reflexões a partir da Antropologia Social. *Physis: Revista de Saúde Coletiva*, v. 25, n.3, p. 779-796, 2015.

UGARTE, O. N.; ACIOLY, M. A. O princípio da autonomia no Brasil: discutir é preciso... **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiãos**, v. 41, n. 5, p. 274-277, 2014.

Capítulo 2

EPIDEMIOLOGIA COMO FERRAMENTA DE PESQUISA EM SAÚDE

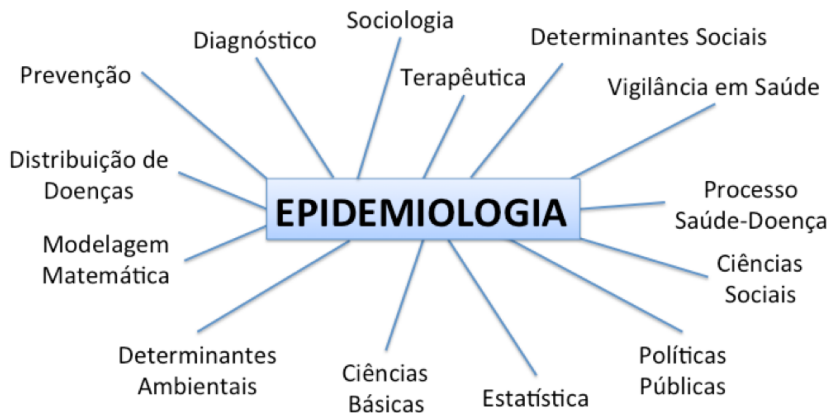
Yuri Wanderley Cavalcanti
Antônio Carlos Pereira

Introdução

A Epidemiologia consiste em uma área de estudo comum à todas as áreas da saúde, com o objetivo de produzir informações sistematizadas a respeito das condições de saúde da população (ALMEIDA FILHO; BARRETO, 2012). Frequentemente, o conceito de epidemiologia se confunde com o estudo das epidemias ou da distribuição de doenças na população. Entretanto, sabe-se que essa é uma compreensão equivocada e muito limitada do verdadeiro conceito de Epidemiologia.

Ao estudar a raiz da palavra Epidemiologia, verificamos que esta deriva do grego, onde *epi* significa “sobre”; *demos*, “povo”; e *logos*, “estudo”. Sendo assim, o conceito de Epidemiologia é ampliado ao estudo das populações, de seus determinantes de saúde, e do processo saúde-doença em si. Amplia-se também do campo observacional ao experimental, envolvendo métodos de prevenção, diagnóstico e tratamento; validados por meio do uso de ferramentas estatísticas e do cálculo matemático. Um conceito mais abrangente e complexo do que seria a epidemiologia pode ser traduzido por Almeida Filho e Rouquayrol (2006): “*ciência de que estuda o processo saúde-doença nas comunidades, analisando sua distribuição populacional, os determinantes do risco de adoecer, e os eventos associados à saúde, de modo que sejam estabelecidas medidas de prevenção, controle e/ou erradicação das doenças*”. No escopo da epidemiologia, essas medidas podem apoiar a tomada de decisão no planejamento e na administração de recursos direcionados à saúde (ALMEIDA FILHO; ROUQUAYROL, 2006). Entende-se também que a Epidemiologia possui ligações com diversas áreas do conhecimento, que incluem as ciências humanas, sociais e da

saúde, além de utilizar de ferramentas das ciências exatas para validar suas observações. O diagrama abaixo mostra a possibilidade de ramificações que a Epidemiologia pode adotar em sua amplitude.



1 História da Epidemiologia

A história da Epidemiologia em muito se confunde com a história do homem e do seu conhecimento sobre saúde. A necessidade de explicar a origem das enfermidades que atacavam a saúde do homem origina da Grécia e Roma Antigas. Nesse período, a mitologia tinha papel muito importante na explicação dos fenômenos das sociedades antigas. Exemplo disso é a crença destinada aos deuses Hygeia e Asclépio (ou Hígia e Esculápio), deuses relacionados à prevenção e a cura de doenças, respectivamente. A influência dessas figuras pode ser observada até a atualidade, inclusive no termo “Higiene” e nos símbolos da medicina e da saúde (em que figura o bastão de esculápio envolto por uma serpente).

Ainda com base nas sociedades antigas, o filósofo Hipócrates foi o primeiro a referir o termo Epidemia, podendo portanto ser considerado precursor da Epidemiologia. Esse mesmo filósofo também foi o precursor da racionalidade da medicina, em contraposição à crença mitológica das sociedades antigas. A partir de observações, Hipócrates lançou a teoria

de que o adoecimento das populações poderia ser fruto de “Miasmas”, consideradas emanações de locais insalubres capazes de provocar doenças. Além disso, a explicação de doenças se deu também a partir do desequilíbrio de humores (líquidos) corporais. Com isso, a compreensão hipocrática levou a sociedade a se preocupar com as condições ambientais em que vive, bem como do indivíduo. Ainda que de forma empírica, foi possível instituir tratamentos que desvinculavam a origem mágico-religiosa predominante na Antiguidade (ALMEIDA FILHO; BARRETO, 2012).

Com o avanço do império Persa e Mulçumano, foi possível ampliar a visão racional do processo saúde doença, visto que esse período foi influenciado por filósofos precursores do pensamento científico moderno. Filósofos como Averróis e Avicena contribuíram para introdução dos algarismos arábicos e da álgebra no ocidente, sendo também responsáveis pela incorporação da matemática em saúde. Com isso, ampliou-se a visão racionalista da medicina. Em parte, essa guinada à racionalidade se deu em virtude da preocupação com a saúde das comunidades (do vasto império persa), voltando as medidas de saúde para abordagem coletiva das doenças.

No período da Idade Média, no entanto, a forma de organização da sociedade e a forte influência da igreja promove a negação do racionalismo na sociedade ocidental. Nesse período, cresce novamente a forte crença em miasmas e entidades espirituais que seriam responsáveis pelos fenômenos de adoecimento da sociedade. Exemplo disso é que nos países de língua inglesa diz-se “*God bless you*” (Deus te abençoe) quando alguém espirra à sua frente. Durante a Idade Média também cresceu e se disseminou o emprego de tratamentos baseados na espiritualidade e magia, associados à medicina Hipocrática. Nesse sentido, observou-se o emprego de torniquetes, sangrias, uso de ervas e boticários, bem como o emprego de medidas religiosas.

Com o fim da Idade Média e Início da Era Moderna, verificou-se novamente o crescimento do racionalismo nas sociedades ocidentais. O crescimento das cidades, a expansão marítima e a revolução industrial impulsionaram novos desafios para as sociedades modernas, inclusive na forma de compreender como se dá o processo de adoecimento e a

perspectiva de ampliar a expectativa de vida das populações. O modo de produção capitalista implicou na necessidade de reduzir as chances de adoecer e ampliar a parcela da população economicamente ativa.

Nesse sentido, várias áreas das ciências básicas e da vida puderam avançar livremente e explicar diversos fenômenos anteriormente desconhecidos. Com isso, as áreas de estudo da Microbiologia, Bioquímica, Patologia, Citologia, Imunologia auxiliaram a explicação dos fenômenos e ampliaram a compreensão sobre o processo saúde-doença. Além disso, a estatística ganhou força como forma de validar a explicação dos fenômenos para a população de modo geral, a ponto de manter o estado de pé (Estatística à *Staat + stare* = Estado de pé/firme). Essas foram as bases para o enfrentamento dos principais problemas de saúde da sociedade pós-feudal, que levou à superação dos miasmas, negação da espiritualidade, ampliação da racionalidade e quantificação, e implementação do conceito de contágio.

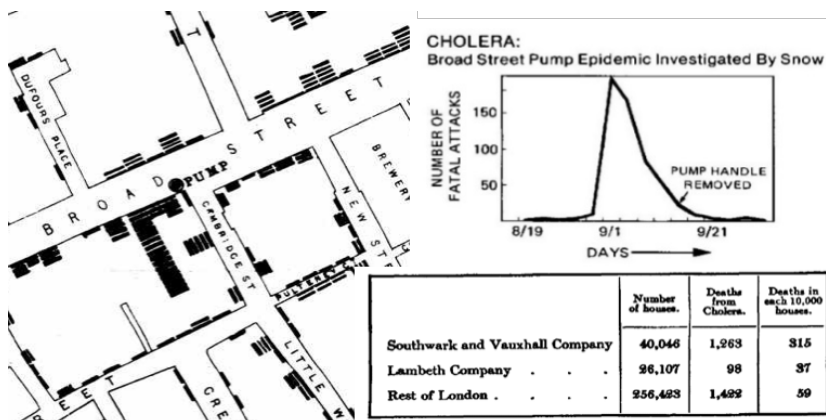
Assim como parte das ciências básicas serviram de base para sustentar o modelo econômico em vigor daquele período, parte das ciências sociais passou a se preocupar com o sistema de exploração e as condições de trabalho sob os quais os trabalhadores eram expostos àquela época. Reconhecidamente, o trabalho de Frederick Engels (“The Condition of the Working Class in England”) foi pioneiro em expor esses problemas e fazer uma análise do ponto de vista social-epidemiológico que futuramente influenciaria a Medicina Social com viés político-social-econômico. Esse trabalho influenciou também a implementação de medidas sanitárias com enfoque ampliado à coletividade.

Dos avanços em saúde ocorridos na Era Moderna, destaca-se os trabalhos em Epidemiologia realizados pelo Dr. John Snow, em Londres, na segunda metade do século XIX. Seus esforços para equacionar o problema da cólera na cidade de Londres por volta do ano 1854 foram relatados no livro “On the Mode of Communication of Cholera”, publicado em 1955. Ao fazer uma análise do número de mortes e sua relação com a localização das bombas de abastecimento público, Dr. John Snow conseguiu demonstrar que havia relação entre a mortalidade por cólera e o consumo de água contaminada. Com base nesses achados, o poder público removeu a manivela da bomba d’água, o que resultou na drástica redução do número

de mortes. Esse estudo foi o precursor da Epidemiologia Moderna, capaz de prever fatores de risco a partir do uso da matemática e da análise de distribuição espacial; resultando em efeitos diretos (e rápidos) na redução do risco de morrer.

A figura 2 ilustra registros da época, nos quais são reportados os casos de óbitos próximo a bomba da rua Broad Street, bem como a frequência de mortes por cólera segundo a companhia de água que fornecia abastecimento, e um gráfico que ilustra a drástica redução do número de mortes após a remoção da manivela da bomba de água, precedida da recomendação para fervura da água de consumo.

FIGURA 02 – Registros do Dr. John Snow a respeito do surto de cólera na cidade de Londres, em 1854.



FONTE: <http://www.ph.ucla.edu/epi/snow/snowbook.html>

No Brasil, a Epidemiologia, bem como a grande parte do desenvolvimento nacional, só passa a fazer parte da história após a chegada da família real no início do século XIX. Embora o país acumule grande carga de preconceito racial, inclusive por desenvolver uma história de escravidão e opressão frente à população negra e indígena, a Epidemiologia prestou-se inicialmente para negar o determinismo racial e ambiental das doenças da população.

O século XIX foi marcado pela elevada prevalência de doenças tropicais (Malária, Dengue, Varíola etc), bem como enfermidades relacionadas ao desenvolvimento urbano desordenado e rápido aumento da população (peste negra, cólera tuberculose etc). Nesse sentido, medidas sanitárias foram tomadas pelo Estado para evitar uma crise na saúde, a qual poderia produzir reflexos significativos na economia do país. Além disso, o caráter disseminado (e não exclusivo da população pobre) incentivou o aprofundamento dos estudos e a abordagem coletiva das doenças.

Oswaldo Cruz e Carlos Chagas tornam-se então expoentes do campo da Epidemiologia e das medidas sanitárias entre o final do século XIX e início do século XX. O trabalho desses pesquisadores e sanitaristas é reconhecido até hoje, mas foi recebido com restrições à época. Oswaldo Cruz e Carlos Chagas tiveram um papel muito importante no desenvolvimento de vacinas, na implementação de medidas de saneamento básico, e na idealização de campanhas de conscientização e vacinação da população.

Durante a primeira metade do século XX, diante dos cenários pós-guerra e pós-crise de 1929, a influência norte-americana dominou a forma de estudar e de se produzir saúde às populações. O documento que ficou conhecido como relatório Flexner delineou medidas de como ensinar e produzir saúde, pautando estratégias como a superespecialização e intervenções com enfoque na cura.

Hoje, a Epidemiologia pauta-se nos determinantes da saúde, na análise do processo saúde doença, na produção de novas estratégias de diagnóstico e terapêutica. Como veremos a seguir, essas medidas extrapolam o campo biológico da saúde e envolvem o análise dos fenômenos quanto a sua complexidade.

2 Usos da Epidemiologia

Tradicionalmente, a Epidemiologia Clássica divide-se em Epidemiologia Clínica e Epidemiologia dos fatores de risco, ambas de enfoque individual, embora compreendendo o indivíduo como parte de uma população. Essa visão tradicional da Epidemiologia se consolidou diante

dos avanços tecnológicos e da saúde até meados do século XX. Não se pode deixar de considerar que ainda hoje essas visões da Epidemiologia ainda estão presentes como estratégias de investigação e como base teórica para implementação de várias medidas em saúde. Entretanto, a Epidemiologia Atual considera outros aspectos, em consonância com o conceito atual de saúde e com a forma de enfrentar o processo saúde doença.

Atualmente, é dada maior importância ao *contexto* (social, econômico, cultural, educacional etc) no qual as populações estão inseridas, sendo possível identificar os principais determinantes relacionados ao equilíbrio do processo saúde-doença. Embora possa ainda prevalecer a ideia de que a Epidemiologia preocupa-se *quase que exclusivamente* com a distribuição de doenças, entende-se que responder qual é a distribuição dos agravos em saúde não é suficiente para o campo da Epidemiologia. Se faz necessário entender quais são os determinantes biológicos e contextuais que determinam a distribuição dessas doenças, bem como os possíveis fatores determinantes para sua prevenção ou proteção.

Do ponto de vista da produção do conhecimento, não se admite que a Epidemiologia, ou qualquer outra área da ciência, invista tempo, dinheiro, recursos humanos e financeiros em questões já amplamente conhecidas pela sociedade. Nesse sentido, as investigações do campo da Epidemiologia devem ser *baseadas em problemas* e movidas a dar respostas a dificuldades enfrentadas pela sociedade, mesmo que a resposta para esses problemas não seja obtida a partir do primeiro ou segundo plano.

Para dar um exemplo, o surto de microcefalia ocorrido na região Nordeste do Brasil entre os anos de 2015 e 2016 impulsionou diversos pesquisadores e órgãos governamentais a se debruçar sobre as possíveis causas desse problema de saúde. Embora fosse um problema já observado em menor proporção em anos anteriores, o crescimento exponencial da doença associada aos eventos de infecção por zica vírus em grávidas da região Nordeste ligou o alerta e apontou uma necessidade pujante de investigar o referido problema. As implicações desse surto epidemiológico vão além do nível individual e demandam custos diretos e indiretos para o Estado. Sendo assim, não bastava determinar a frequência do

agravo, mas era necessário definir suas causas, implantar estratégias de tratamento/prevenção, bem como a avaliar o impacto social e econômico deste problema.

Do ponto de vista mais moderno, a Epidemiologia atual também tem se debruçado a respeito da investigação de novos processos e procedimentos diagnósticos e terapêuticos, com enfoque na inovação e no uso racional de recursos (materiais e humanos). Além disso, desvincula-se do modelo biomédico-tradicional, abrindo espaço para novas práticas integrativas e complementares. Nessa perspectiva, busca validar o uso e a implementação da medicina popular como estratégia de promoção da saúde. Além disso, a nanotecnologia e a informatização da saúde também tornam-se objetos de investigação da Epidemiologia.

Nessa perspectiva, a Epidemiologia Translacional ganha espaço, uma vez que se propõe ao desenvolvimento de tecnologias e a investigação de produtos em nível laboratorial até que esses possam ser avaliados do ponto de vista clínico e populacional, quando serão definidas novas questões de pesquisa para o melhoramento científico e tecnológico da intervenção em desenvolvimento. Assim, o campo de investigação pode variar do nível micro ao macro, e vice e versa, permitindo avanços translacionais na fronteira do conhecimento.

Para fins ilustrativos e didáticos, pode-se conceber quatro principais usos e abordagens da Epidemiologia atual. São eles:

- Epidemiologia Social (dos determinantes e desigualdades) – nível macro

Ramo da Epidemiologia que estuda os determinantes do processo saúde-doença, as desigualdades e as iniquidades relacionadas à saúde, a oferta de serviços de saúde, considerando-se a perspectiva ampliada (macro) das populações ou comunidades. Envolve a identificação de problemas clínicos e correlaciona a prevalência ou a incidência dos agravos com variáveis sócio-demográficas, econômicas, culturais, sanitárias, entre outras. Suas conclusões permitem fazer inferência para fatores de risco clínico do indivíduo inserido na comunidade.

- Epidemiologia Clínica – nível individual

O objeto de estudo deste ramo da Epidemiologia é o indivíduo. Tem por objetivo identificar possíveis fatores de risco à saúde ou delinear estratégias de intervenção com enfoque à evolução do quadro clínico. Aborda, na maioria das vezes, o indivíduo do ponto de vista clínico e biológico. Busca identificar a distribuição dos agravos do ponto de vista clínico e desenvolver estratégias para sua resolução, geralmente em condições experimentais controladas.

- Epidemiologia Molecular – nível micro

Debruça-se sobre a distribuição de agravos e problemas de saúde que estão relacionados ao campo das ciências básicas. Usa de ferramentas da genética, microbiologia, imunologia, parasitologia, entre outros, para frequência de agravos e desenvolver estratégias para sua resolução. Além disso, faz uso de ferramentas das ciências básicas para estudar possíveis fatores de risco relacionados à manifestação clínica da doença.

- Epidemiologia Translacional (top-down e bottom-up) – multiníveis

Procura relacionar os três níveis anteriormente descritos, de modo que problemas de saúde identificados em qualquer um dos daqueles níveis possam ser mais profundamente investigados sob outras perspectivas (macro, clínico, ou individual). Esse processo permitirá que o problema da pesquisa passe por diferentes áreas, ultrapassando o limite da fronteira do conhecimento existente. É uma estratégia bastante usada no desenvolvimento de novos produtos e processos, na medida em que as condições experimentais possam perpassar na perspectiva laboratorial, clínica e comunitária; eventualmente retornando ao campo laboratorial e clínica para melhoramentos.

3 Tipos de Estudo

Os estudos epidemiológicos em geral podem assumir um caráter quantitativo, ou qualitativo. Os estudos qualitativos, em uma maioria, consistem de estudos descritivos, com o objetivo de descrever realidades, percepções, subjetividades que caracterizam determinada população, local ou grupo social (estudos qualitativos, em geral). Pode também estar relacionado à descrição dos fatos, procedimentos, etapas, processos (a exemplo do caso clínico).

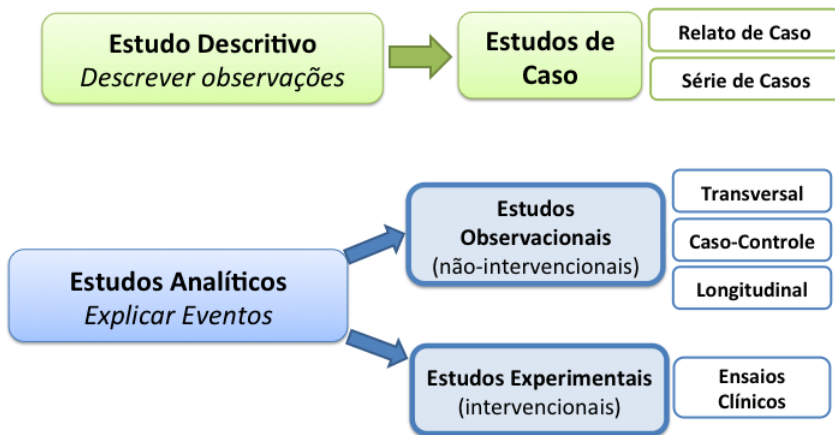
Os *estudos de caso* consistem de estudos descritivos com o objetivo de reportar uma determinada realidade ou processo. Neste grupo de estudos incluem-se os estudos qualitativos em geral, que se caracterizam pelo uso de ferramentas metodológicas de abordagem qualitativa, baseada na identificação das percepções e subjetividades dos sujeitos.

Ainda como subcategoria dos estudos de caso, incluem-se os relatos de caso e as séries de casos, que visam a descrição (em sua maioria, técnica) de procedimentos processos, protocolos. No campo da saúde, este tipo de estudo é melhor representado pelo relatos de invenção (ou intervenções) profissionais, com o objetivo de ilustrar ou descrever como determinada técnica pode/deve ser realizada. Serve ainda para divulgação de estratégias de abordagem clínica e para orientação profissional a respeito de determinado caso clínico. A diferenciação do relato de caso para série de casos encontra-se no número de casos reportados. Enfatiza-se que esse tipo de estudo não tem a pretensão (nem a evidência clínica suficiente) para embasar decisão clínica profissional (por um procedimento ou outro), mas descreve o ponto de vista e a abordagem de (geralmente) um *expert* no assunto.

Os **estudos analíticos**, por sua vez, compreendem na principal linha de atuação do campo da Pesquisa Epidemiológica. Nesse grupo, incluem-se os **estudos observacionais**, nos quais não há intervenção direta do Pesquisador; bem como o **estudos intervencionais**; no qual o pesquisador avalia os resultados de uma intervenção na população em estudo. Para esses dois grupos de estudo há subdivisões que abordaremos a seguir.

Para efeito didático classificamos os tipos de estudos conforme a Figura 4.1 baixo. Neste capítulo, detalharemos com maior profundidade os estudos do tipo analítico, sub-classificados em observacionais (transversal, coorte e caso-controle) e intervencionais (ensaios clínicos)

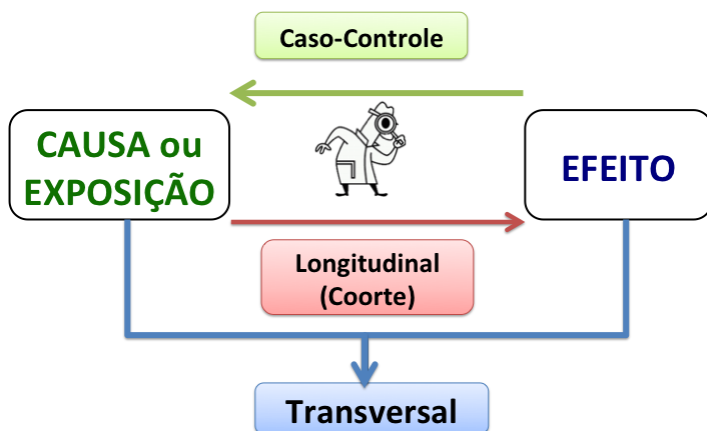
FIGURA 4.1: Tipos de estudo epidemiológico, segundo o objetivo da investigação (descrever ou explicar eventos), bem como segundo a intervenção do pesquisador (intervencional e não-intervencional).



3.1 Estudos Observacionais

No conjunto de estudos observacionais, diferenciam-se três tipos de estudo: **Transversal, Caso-Controle e Coorte (ou Longitudinal)**. Nessas modalidades de investigação, o pesquisador ocupa um lugar de observador da realidade, não participando do processo de intervenção. O principal fator que distingue esses três estudos observacionais é a perspectiva que o pesquisador adota em relação ao modelo de causalidade que pretende investigar, conforme observado na Figura 4.2.

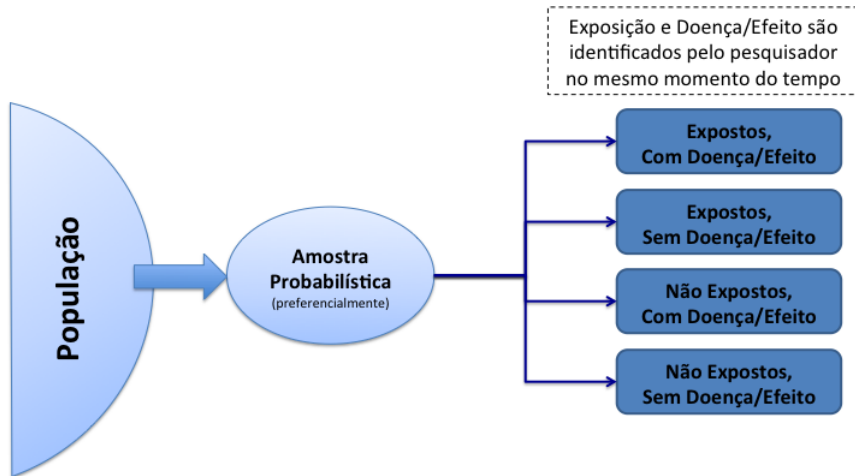
FIGURA 4.2: Tipos de estudo observacionais e sua relação com a causalidade da pesquisa epidemiológica. O estudo transversal identifica, ao mesmo tempo, a exposição e os efeitos do agravo em estudo (linha azul). No estudo de caso-controle, o pesquisador parte do efeito e busca identificar as causas do agravo no passado (linha verde). No estudo de coorte, o pesquisador parte da exposição para determinar os efeitos no futuro (linha vermelha).



3.1.1 Estudos Transversais

Os estudos transversais são conhecidos também como levantamentos epidemiológicos, estudos de prevalência, estudos seccionais ou *cross-sectional* (da língua inglesa). Tem o objetivo de determinar a prevalência do agravo e a distribuição dos fatores de risco (exposição) na população. Nessa modalidade, o pesquisador deve estabelecer, preferencialmente, uma amostra probabilística e determinar a frequência de exposição e de agravos na população (Figura 4.3). Este tipo de estudo apresenta limitada capacidade de realizar inferências do tipo causa-efeito, uma vez que a exposição e o efeito são identificados ao mesmo tempo. A principal medida de associação utilizada para este tipo de estudo é a Razão de Prevalência, mas a Odds Ratio também é frequentemente utilizada.

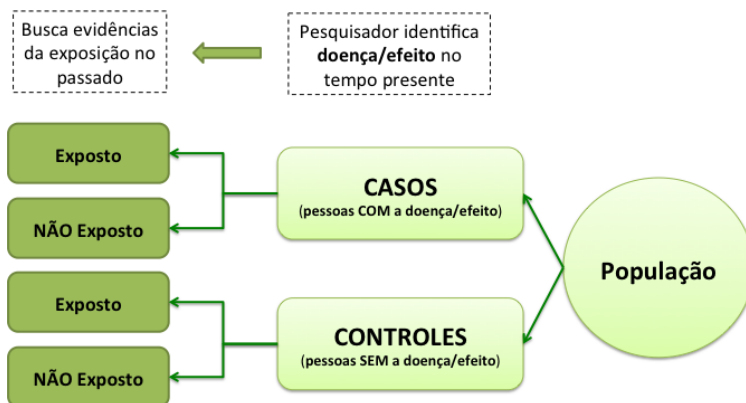
FIGURA 4.3: Fluxograma das etapas do estudo transversal. A distribuição da frequência de exposição agravos é determinada após a definição probabilística da amostra.



3.1.2 Estudos de Caso-Controle

Os estudos de Caso-Controle assumem uma perspectiva retrospectiva. Nessa modalidade, o pesquisador identifica um grupo de indivíduos afetados, o que apresentam a manifestação da doença (Casos) e um outro grupo de indivíduos não afetados, o que não apresentam a manifestação da doença (Controles). A partir desse ponto, o pesquisador investigará fatores de exposição no passado que estejam relacionados à manifestação da doença no presente (Figura 4.4). As limitações deste tipo de estudo estão relacionadas à fidelidade da memória dos participantes, e à seleção não probabilística dos casos e dos controles.

FIGURA 4.4: Fluxograma das etapas do estudo Caso-Controle. Notar que o fluxo foi organizado no sentido inverso para ilustrar que, após selecionar o grupo de casos e controles, o pesquisador buscará as informações sobre a exposição no tempo pretérito. Será verificada as frequências de expostos e não expostos dentro de cada grupo. A Odds Ratio consiste na principal medida de associação.



3.1.3 Estudos Longitudinais (Coorte)

Os estudos de coorte, ou seguimento, ou longitudinais são estudos de longa duração, comparada aos demais tipos de investigação em Epidemiologia. Nessa modalidade, o pesquisador não é responsável pelo processo de intervenção e avalia a incidência do agravo ao longo do tempo. Após eleger uma amostra de indivíduos saudáveis na população, o pesquisador fará uma avaliação dos desfechos (aplicação de questionários, exames físicos e laboratoriais) no tempo denominado Baseline (Figura 4.5). Após isso, cada nova avaliação será denominada onda, a qual tem por objetivo identificar a mudança na exposição ao fator de risco e a manifestação do agravo na amostra. O período entre as ondas é definido pelo pesquisador, mas este deve ser compatível com o tempo necessário para manifestação ou evolução da doença/agravo.

As limitações deste tipo de estudo encontram-se na elevada probabilidade de perda de segmento, a qual corresponde na falha do acompanhamento, geralmente relacionada à longa duração do estudo. Além disso, os custos e o tempo necessário para conclusão do estudo são um fator limitante. Dentre os estudos observacionais, o estudo de coorte talvez seja o mais crítico em relação à casualidade. Uma vez que grande quantidade de tempo, dinheiro e recursos humanos são investidos nesses estudos, é fundamental que as hipóteses que se deseja investigar no estudo de coorte tenham base científica sólida, evitando a geração de associações espúrias inúteis ao final do estudo. Não obstante, este também é um fator de relevância para os estudos transversais e de caso controle. A medida de associação utilizada nos estudos de coorte é o Risco Relativo.

FIGURA 4.5: Fluxograma da realização do estudo de coorte, ilustrando que o desenho clássico é prospectivo (acompanhamento dos voluntários ao longo do tempo – futuro). Após eleger uma amostra de indivíduos saudáveis no tempo *baseline*, o pesquisador fará avaliações sistemáticas e periódicas para avaliar a exposição a fatores de risco e identificar a manifestação do agravo em saúde no futuro. Por meio deste estudo, é possível obter a medida de incidência segundo a exposição a determinado fator de risco, o que permitirá o cálculo do Risco Relativo.

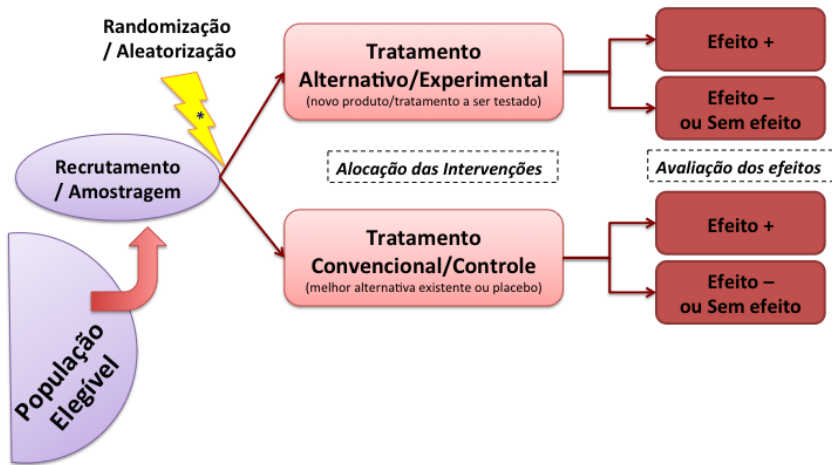


3.2 Ensaios Clínicos

Os ensaios clínicos são modalidades de estudos experimentais, no qual o pesquisador avalia o efeito de determinada intervenção (seja ela um procedimento – como uma restauração dentária – ou um processo – como uma estratégia educacional para mudar hábitos de higiene). O modelo mais complexo e conhecido desse tipo de estudo é o **Ensaio Clínico Controlado e Randomizado**, largamente utilizado pela indústria de desenvolvimento de medicamentos. Nesse grupo de estudos também devem ser considerados os **Ensaios Clínicos Comunitários** e os **Estudos Clínicos Quase-Experimentais**, assim chamados por não incluir o controle (estudos do tipo antes e depois) e/ou não realizar o processo de randomização (estudos não-randomizados). Em todos eles, entretanto, há o processo de intervenção do pesquisador para avaliar seu efeito na redução de algum agravo em saúde. É importante mencionar que, entre os tipos de estudos clínicos citados acima e discutido adiante, o pesquisador não deve fazer juízo de valor ou hierarquizar se um deve ser considerado melhor que outro. Deve sim, reconhecer qual é a aplicação e relevância de cada um deles para produção do conhecimento científico.

Essa modalidade de pesquisa pode apresentar diferentes desenhos experimentais em odontologia, que incluem os **ensaios cruzados** (nos quais todos os participantes são submetidos a todas intervenções ao longo do período experimental – utilizado apenas para intervenções que tem efeito reversível), os **ensaios de boca dividida** (na qual o mesmo voluntário recebe duas ou mais intervenções ao mesmo tempo, em regiões distintas), e ainda os **ensaios *in situ*** (realizados em corpos de prova inseridos em ambiente humano, quando assume-se que a intervenção possa provocar danos ao(s) tecido(s) do indivíduo).

FIGURA 4.6: Desenho clássico de um Ensaio Clínico Controlado e Randomizado. A partir da população elegível, deve-se escolher uma sequência aleatória para seleção randômica da amostra. A partir deste etapa-realiza-se o sorteio da alocação (Randomização/Aleatorização) com o objetivo de definir qual intervenção será realizada para cada participante do estudo. Após aplicar a intervenção e transcorrer o tempo proposto, os voluntários serão avaliados quanto o efeito dos tratamentos no agravo em saúde. Para os ensaios comunitários e quase-experimentais, geralmente utiliza-se amostragem por conveniência (não-probabilística). Além disso, o processo de randomização para alocação da amostra entre os grupos experimental e controle nem sempre faz parte do fluxograma experimental do estudo.



3.2.1 Ensaio Clínico Controlado e Randomizado

O modelo mais clássico dos estudos clínicos é reconhecido por estabelecer condições experimentais em ambiente extremamente controlado. Neste caso, é possível gerar evidências a respeito da eficácia dos tratamentos, enquanto que a efetividade será avaliada nos ensaios comunitários.

Nesta modalidade, busca-se reduzir ao máximo o risco de viés, assumindo-se que possíveis erros implicados na condução do estudo são resultados do acaso. Para isso, o processo de randomização deve ser seguido a risca, utilizando-se estratégias de aleatorização como sorteio probabilístico em software estatístico ou sorteio por moeda. Além disso, é fundamental que o processo de intervenção seja cego e as intervenções mascaradas apropriadamente. Para isso, o pesquisador responsável pelo processo de randomização deve atuar de forma independente do operador (pesquisador que realiza a intervenção), e estes dois últimos atuarem de forma independente do avaliador (pesquisador que avaliar a presença do agravo, ao final). Eventualmente, é relevante que o voluntário não tenha conhecimento sobre o processo de intervenção a qual ele está sendo submetido naquele momento (mas deve saber a quais intervenções ele será exposto ao longo da pesquisa).

Entre as intervenções, eleger um controle apropriado também é fundamental. Nesse sentido, a intervenção controle deve estar relacionada às expectativas produto que será testado. *O produto teste é melhor que a melhor alternativa disponível? O Produto teste produz melhor efeito do que a ausência de intervenção ou uso do placebo?* Além disso, para avaliação do efeito das intervenções, é relevante que o pesquisador-avaliador receba treino apropriado de modo que a avaliação dos diferentes voluntários da pesquisa apresente nível de concordância aceitável, sem sofrer a influência de fatores externos.

Os resultados dos ensaios clínicos randomizados podem ser interpretados à luz do risco relativo (medida de associação mais relevante) ou pelo uso de softwares estatísticos que possibilitem o teste de hipóteses de diferença.

3.2.2 Ensaios Clínicos Comunitários

Os ensaios clínicos comunitários assemelham-se em muito aos estudos de coorte, diferenciando-se quanto à exposição a um processo de intervenção. Neste caso, o pesquisador pode eleger populações com o mesmo agravo em saúde, as quais serão submetidas a intervenções distintas

e independentes. Neste caso, o pesquisador não realiza, necessariamente, a aleatorização e randomização dos sujeitos, nem participa diretamente do processo de intervenção. Entretanto, como esses estudos geralmente envolvem um grande número de indivíduos (várias escolas, cidades ou regiões de saúde) o risco de viés é reduzido. Neste caso, outros pressupostos do ensaio clínico controlado e randomizado também não são assumidos, a exemplo do cegamento e treinamento/calibração de examinadores. Entretanto, esses ensaios tem maior poder para avaliação da efetividade dos tratamentos, pois avalia o seu efeito em condições reais, não necessariamente controladas.

3.2.3 Estudos Quase-Experimentais

Os **estudos quase-experimentais, ou não-controlados e não randomizados**, são aqueles que possuem desenho e tamanho da amostra semelhante aos ensaios clínicos controlados e randomizados, entretanto não realizam o processo de randomização, nem necessariamente comparam o efeito de suas intervenções a uma alternativa considerada como controle. Nesse tipo de estudo incluem-se os **ensaio clínicos do tipo antes e depois**, em que o pesquisador avalia o efeito da intervenção, comparando-a com a situação de saúde inicialmente identificada no recrutamento dos sujeitos. Alternativamente, consistem de estudos que avaliam o efeito de uma intervenção alternativa e seu controle, sem entretanto envolver o processo de randomização, cegamento, e qualquer outra estratégia para redução do risco de viés. São considerados estudos totalmente abertos que tem por objetivo realizar uma triagem (ou teste) inicial das intervenções a serem investigadas. Alternativamente, permitem a identificação de efeitos adversos previamente à realização do ensaio clínico controlado e randomizado.

4 Medidas de Frequência, Associação e Impacto

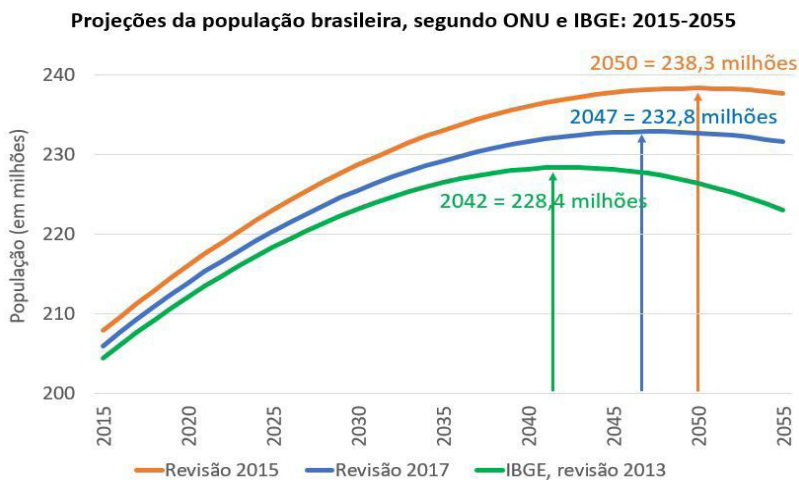
As medidas de saúde podem ser apresentadas de diferentes formas e significados. Nos estudos epidemiológicos normalmente se

dividem didaticamente em medidas de frequência, de associação e de impacto.

5.1 Medidas de Frequência

Medidas de Frequência podem ser apresentadas em termos absolutos (somente numerador) ou relativos (quociente numerador/denominador). Embora as frequências absolutas somente quantifiquem eventos, e por isso tenham comparabilidade limitada entre diferentes populações, estas são muito importantes para vários setores (Ex. planejamento de saúde, contagem de casos de doenças ou agravos a saúde e sua série histórica, etc.). As frequências relativas por considerarem o denominador, permitem comparações entre diferentes espaços, em diferentes tempos e contextos (Ex. população hab/km² - Brasil, regiões estados ou municípios em diferentes períodos de tempo).

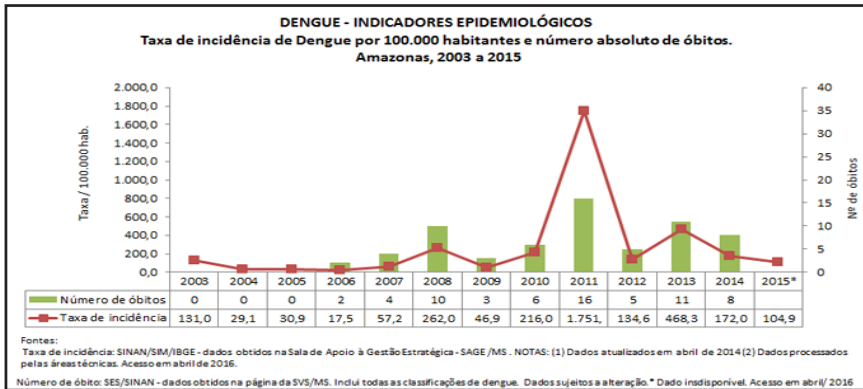
Exemplo de frequência absoluta: Projeções da população brasileira, segundo o IBGE, entre 2015 e 2055.



Fonte: World Population Prospects: 2015 and 2017 Revisions; IBGE, Revisão 2013

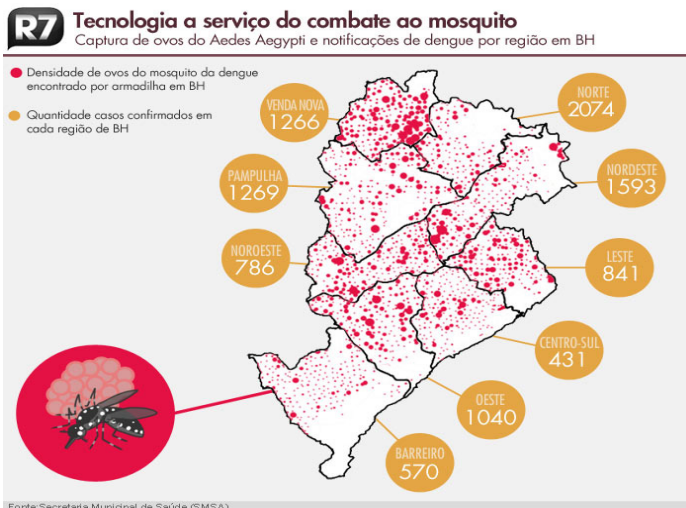
<https://esa.un.org/unpd/wpp/>

Exemplo de frequência relativa: taxa de incidência de dengue por 100.000 hab no Estado do Amazonas entre 2003 e 2015.



FONTE: Ministério da Saúde. <http://www.conass.org.br/guiainformacao/amazonas-24/>

Exemplo de frequência absoluta e relativa. Captura de ovos do *Aedes aegypti* e notificações de dengue por região em Belo Horizonte, MG, 2013.



FONTE: Secretaria Municipal de Saúde de Belo Horizonte, 2013. <http://noticias.r7.com/minas-gerais/noticias/combate-a-dengue-em-mg-tem-tecnologia-de-ponta-mas-esbarra-no-descuido-da-populacao-20130317.html>

Para que o conceito de frequência (relativa ou absoluta) seja entendido, precisamos levar em conta em que temporalidade estes foram coletados. Se somente consideramos os casos atuais de determinado evento, então estamos falando de prevalência, mas se todos os casos novos e atuais são obtidos, então temos a incidência.

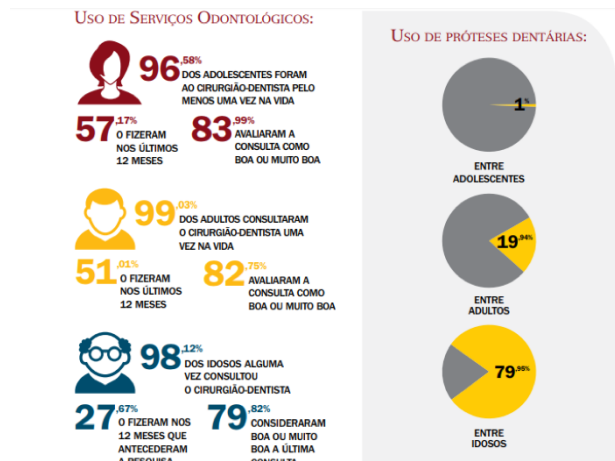
Prevalência

$P = \text{número de casos} / \text{total da pop}$

Coeficiente de prevalência = número de casos (novos + antigos) de doença X 10^n
população da área no mesmo tempo

Coeficiente de mortalidade = (número de óbitos / população) x 10^n

Exemplo: Ex. Percentual de pessoas que utilizaram os serviços de saúde e os que necessitavam de próteses dentárias no Estado de São Paulo em 2015.

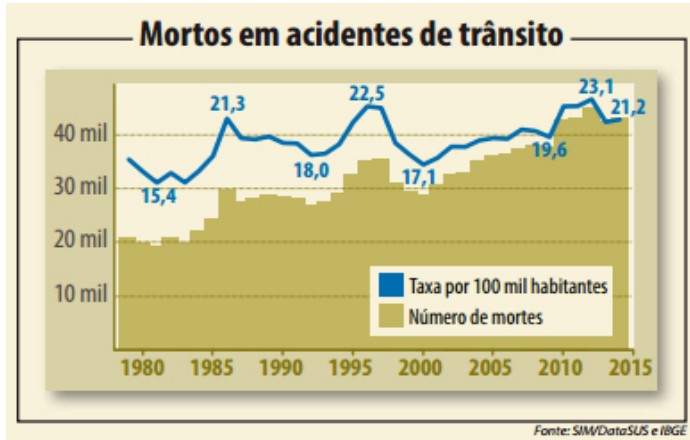


FONTE: Levantamento SB SP 2015. <http://www.fo.usp.br/wp-content/uploads/Sa%C3%BAdo-Bucal-no-Estado-de-SP.pdf>

Incidência: número de novos casos de uma doença (sem ter em conta o tamanho da população)

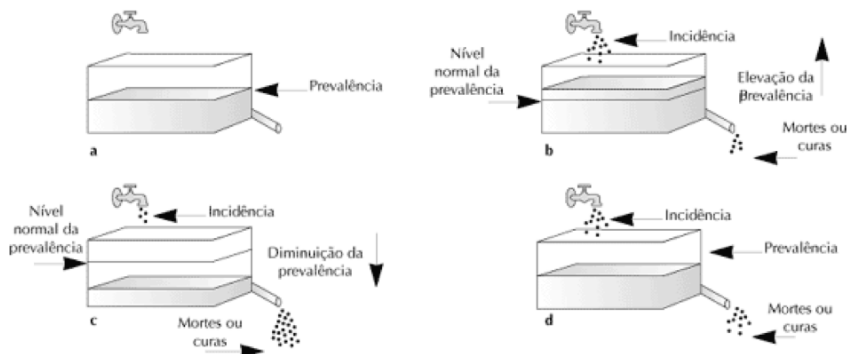
Coeficiente de incidência = $\frac{\text{número de casos novos de doença}}{\text{população da área no mesmo tempo}} \times 10^n$

Ex. Mortes em Acidentes de carro no Brasil, 1980 a 2015.



FONTE: SIM/DataSUS e IBGE. <https://www12.senado.leg.br/noticias/materias/2016/03/29/em-vigor-ha-18-anos-codigo-de-transito-brasileiro-e-alvo-de-propostas-de-atualizacao>

Na figura abaixo podemos entender a relação entre prevalência e incidência.



FONTE: Brasil, Estado de Santa Catarina. Coleção Saúde e Cidadania. http://portales.saude.sc.gov.br/arquivos/sala_de_leitura/saude_e_cidadania/ed_07/03_02_04.html

Para exemplificar melhor a questão da comparabilidade entre as frequências absolutas e relativas, apresentamos um exemplo prático abaixo.

Tabela 1. Casos de tuberculose em população latino americana por ano 1995-2000

Ano	Nº de casos	Total população
1995	60	30.000
2000	80	50.000

Fonte. Organização Panamericana de Saúde, 2010. <https://pt.slideshare.net/jairon-jackson/enfermagem-manual-procedimentosenfermagemguiadebolso2>

Observamos que se, por um lado, houve um aumento de 60 para 80 no número de casos, também aumentou de 30.000 a 50.000 a população no mesmo período. Portanto, o que desejamos comparar é a diferença entre 60 casos em 30.000 pessoas e 80 casos em 50.000.

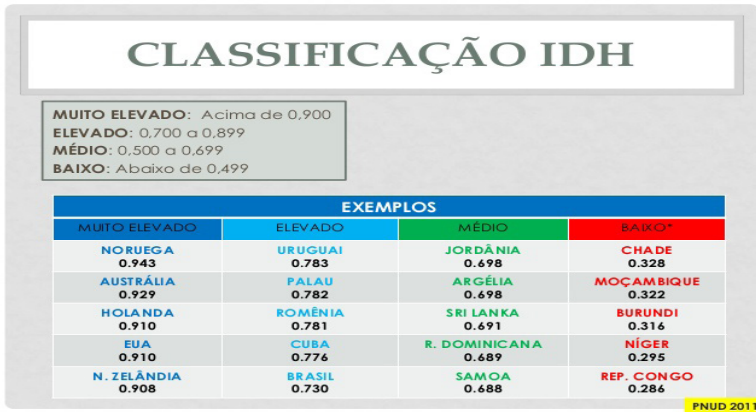
Um cálculo simples nos permitirá a comparação mais direta.

- em 1995: $\rightarrow 60 / 30.000 = 0,0020$ - 20 a cada 10.000 hab
- em 2000: $\rightarrow 80 / 50.000 = 0,0016$ - 16 a cada 10.000 hab

Além da apresentação tradicional já informada, as medidas de frequência podem ser apresentadas na através de Índices ou Indicador, Coeficientes, Taxas e Razões:

Índices ou Indicadores: Termos numéricos que refletem a noção de grandeza existente. O indicador é um valor numérico simples que reflete alguma situação de vida e saúde (Ex. Indicador de mortes no trânsito). Os índices são a combinação de medidas que apresentam algum significado, por exemplo o Índice de Desenvolvimento Humano – IDH, utilizado para avaliar a qualidade de vida e o desenvolvimento econômico de uma população, é composto por indicadores de Saúde: Vida longa e saudável a qual é medida pela expectativa de vida; Educação: Acesso ao conhecimento, à média de anos estudados (adultos) e anos esperados de escolaridades (crianças) e Renda: Um padrão de vida decente (Renda): medido pela Renda Nacional Bruta (RNB) com base na Paridade de Poder de Compra (PPC) por habitante.

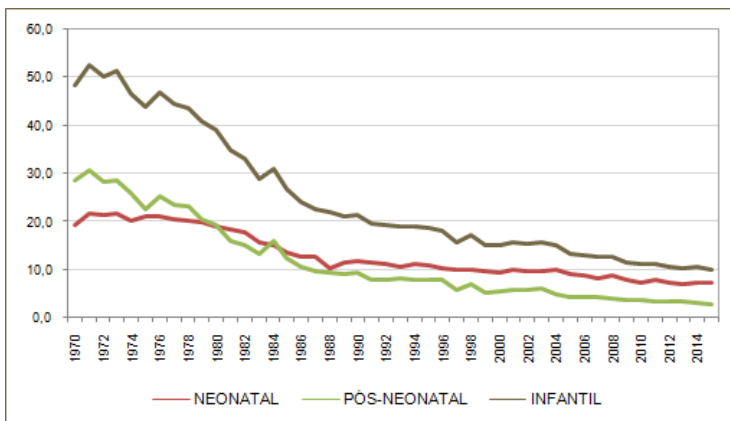
Ex. Índice: Classificação do IDH



FONTE: PNUD, 2011.

Coeficientes: são medidas secundárias que representam a possibilidade de um determinado evento ocorrer na comunidade. Nesse caso, o denominador representa a população exposta ao risco e o numerador o número de ocorrências nessa mesma população, ou seja, o denominador faz parte da população estudada ($\text{coeficiente} = (A / A+B) \times 10^n$).

Exemplo: Evolução do Coeficiente de Mortalidade Infantil, Neonatal e Pós Neonatal no RS 1970-2015 (óbitos/1000 n.v).

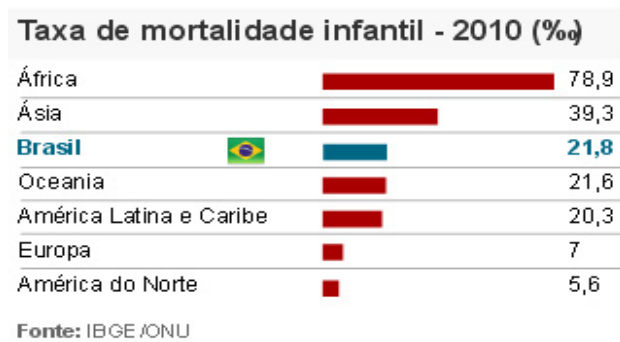


FONTE: SES RS/ Estatísticas de Saúde – Mortalidade. <http://www.atlassocioeconomico.rs.gov.br/coeficiente-de-mortalidade-infantil>.

Taxas: são coeficientes multiplicados por uma potência de 10. A porcentagem é uma Taxa Centesimal, pois a razão decimal Parte/Base é multiplicada pela segunda potência de 10 ($10^2 = 100$). Essas medidas são aplicadas para cálculos de estimativas e projeções de incidência e prevalência. A diferença básica entre taxa e coeficiente é que a primeira expressa a variação de um fenômeno por unidade de tempo.

Taxa = (número de infecções de nascidos vivos / total de nascidos vivos) X 10^n ao mês

Exemplo: Taxa de mortalidade infantil (por 1000) no ano de 2010 no Brasil e outras regiões no mundo em 2010.

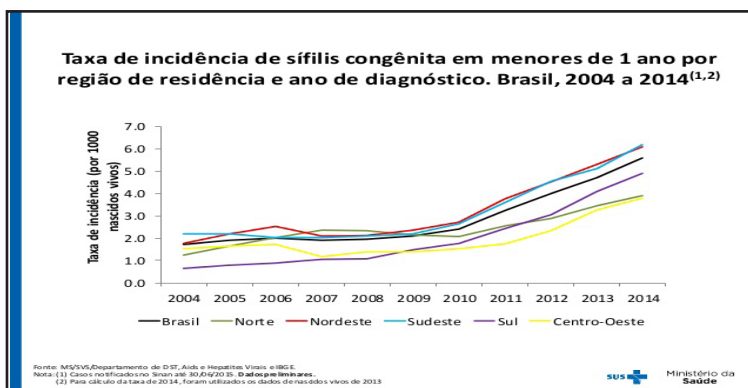


FONTE: IBGE/ONU. <https://blogdoenem.com.br/taxa-mortalidade-infantil-geografia/>

Taxa de incidência

I = número de casos novos / número de pessoas expostas x tempo

Exemplo: Taxa de Incidência de Sífilis congênita em menores de 1 ano por região de residência e ano de diagnóstico. Brasil, 2004 a 2014.



FONTE: Ministério da Saúde. <https://www.slideshare.net/CONASS/ct-epidemiologia-210316-situao-atual-da-sfilis-em-gestantes-e-da-sfilis-congnita-no-brasil>

Razões: são quocientes entre eventos independentes, onde o numerador A não faz parte do denominador B (Razão = A / B)

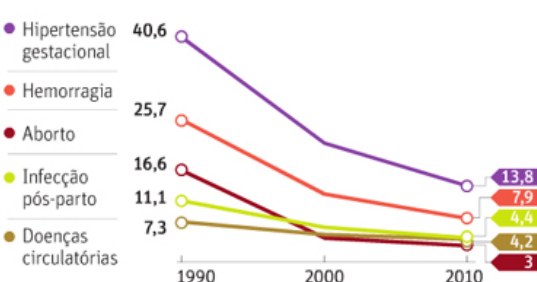
Ex. R = Número de óbitos maternos / número de nascidos vivos

Exemplo: Razão de Mortalidade Materna por 100.000 nascidos vivos no Brasil e suas principais causas, 1990 a 2015.

EVOLUÇÃO DOS NÚMEROS
Total de óbitos de mães por
100 mil nascidos vivos



PRINCIPAIS CAUSAS DA MORTALIDADE MATERNA
Óbito materno por 100 mil nascidos vivos



*Estimativa a partir de dados ainda preliminares **Meta estabelecida nos Objetivos do Milênio

FONTE: Ministério da Saúde. <http://www.politicadistrital.com.br/2016/03/21/falta-penicilina-para-combater-sifilis-na-rede-publica-de-saude-do-df/>

Dessa forma essas medidas não podem ser interpretadas da mesma forma. As razões são índices, enquanto que as proporções (por 10^2) e os coeficientes (por 10^n) são frequências ou frações relacionadas ao risco. As taxas nos auxiliam a entender a velocidade com que a doença ocorre na população.

5.2 Medidas de Associação

Nós vimos que as medidas de frequências quantificam dados e podem compará-los através de taxas, índices, razão e coeficientes. Contudo, há outros objetivos quando quantificamos eventos em saúde. Um deles é verificar a relação entre as frequências obtidas entre os fatores de exposição e a prevalência/incidência de eventos em saúde, ou seja conhecer os fatores determinantes do processo saúde/doença.

Em termos gerais as medidas de associação nos ajudam a mensurar a força estatística (matemática) com que as variáveis (exposição e desfecho) se relacionam, procurando uma possível relação de causalidade. Basicamente nós temos medidas de associação baseadas em razões e diferenças.

Risco relativo (RR); Odds ratio (OR) ou razão de chances;
Razão de prevalência

- Auxiliam avaliar causalidade, etiologia

Risco atribuível (RA); Risco atribuível populacional (Rap);
Fração atribuível na população (FAP)

- Auxiliam avaliar impacto, portanto, grande utilidade para decisões em saúde

Risco relativo (RR) ou razão de incidência – é a razão entre a incidência entre os expostos e a incidência entre não expostos. Mensuramos quão maior é a incidência de uma doença no grupo dos expostos quando comparado ao grupo dos não expostos. Esta medida é recomendada para uso em estudos longitudinais, do tipo Observacional Analítico (Coorte) ou Intervencional.

Risco Relativo

- Risco relativo (RR) ou razão de incidência – é a razão entre a incidência entre os expostos e a incidência entre não expostos

		Doença ou Agravamento		
		Presente	Ausente	Total
Exposição	Presente	A	B	A+B
	Ausente	C	D	C+D
Total		A+C	B+D	A+B+C+D

$$\frac{\frac{A}{A+B}}{\frac{C}{C+D}}$$

Exemplo:

MENDONÇA, Marcela Franklin Salvador de; LUDERMIR, Ana Bernarda. Violência por parceiro íntimo e incidência de transtorno mental comum. Rev. Saúde Pública, São Paulo, v. 51, 32, 2017. Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-89102017000100227&lng=en&nrm=iso>.

OBJETIVO

Investigar a associação da violência por parceiros íntimos relatada contra as mulheres nos últimos 12 meses e últimos sete anos com a incidência dos transtornos mentais comuns.

MÉTODOS

Estudo de coorte prospectivo com 390 mulheres de 18 a 49 anos, cadastradas no Programa Saúde da Família da cidade do Recife, PE, entre julho de 2013 e dezembro de 2014. A saúde mental foi avaliada pelo Self Reporting Questionnaire-20 (SRQ-20). A violência por parceiro íntimo foi definida por atos concretos de violência psicológica, física ou sexual infligidos à mulher pelo parceiro. A regressão de Poisson foi utilizada para estimar os riscos relativos (RR) brutos e ajustados da associação entre transtorno mental comum e violência por parceiro íntimo.

Tabela 3. Incidência dos transtornos mentais comuns nas mulheres vítimas de VPI nos últimos 12 meses e últimos sete anos.

Variável	n	%	RR bruto	IC95%	RR ajustado	IC95%*
VPI nos últimos 12 meses						
Sem violência	46	55,4	1		1	
Apenas psicológica	16	19,3	2,9	1,8–4,6	3,0	1,9–4,7
Física e sexual com ou sem psicológica	21	25,3	3,2	2,1–4,8	3,1	2,1–4,7
VPI nos últimos sete anos						
Sem violência	47	56,6	1		1	
Apenas psicológica	12	14,5	1,9	1,1–3,2	1,8	1,0–3,0
Física e sexual com ou sem psicológica	24	28,9	2,3	1,5–3,5	2,5	1,7–3,8

VPI: violência por parceiro íntimo

* Ajustado pelas variáveis “inserção produtiva” e “renda mensal”.

Conforme a tabela 3, os autores verificaram que o risco relativo (RR) foi maior nas situações de violência física e sexual com ou sem psicológica. A incidência de Transtorno Mentais Comuns mostrou forte associação com Violência do Parceiro Íntimo (VPI) nos últimos 12 meses (RR = 3,1; IC95% 2,1–4,7) e últimos sete anos (RR = 2,5; IC95% 1,7–3,8), mantida mesmo após o ajuste do RR por possíveis fatores de confusão.

Como interpretar na prática o Risco Relativo?

$$\% \text{ de mudança no Risco} = (RR-1) \times 100$$

RR	Vezez	Varição em Porcentagem
3	Risco 3 vezes maior	Aumento do risco em 200%
1,5	Risco 50% maior	Aumento do risco em 50%
1	Risco similar	
0,75	Risco 1,33 menor	Diminuição do risco em 25%
0,50	Risco 2 vezes menor	Diminuição do risco em 50%

Razão de Prevalências – utiliza a mesma fórmula matemática para o cálculo da força de associação e conceitua-se com a razão entre a prevalência de um evento (desfecho) no grupo de exposto em relação a prevalência no grupo dos não expostos. Esta medida é recomendada para estudos de prevalência (Transversal/sagital).

$$RR = PE / PnE$$

Exemplo de estudo:

Um grupo de pesquisa conduziu um estudo para investigar a frequência de hepatite C na população e fatores de risco associados. Ao todo, 1.150 moradores foram selecionados; cada um deles foi entrevistado e, simultaneamente, foi coletada uma amostra de sangue para sorologia (procedimento padrão de detecção de antecedente de hepatite C). Um dos fatores inquiridos foi o antecedente de uso de drogas injetáveis (UDI) sendo que apenas 60 indivíduos referiam tal antecedente. Os resultados da sorologia revelaram que 12 pessoas eram soropositivas sendo que 6 delas pertenciam aos UDI.

Relações pertenciam aos UDI.		Hepatite C		
		Presente	Ausente	Total
UDI	Presente	6	54	60
	Ausente	6	1.084	1.090
Total		12	1.138	1.150

$$P_E = 6 / 60 = 0,1$$

$$P_{NE} = 6 / 1.090 = 0,005$$

$$RR = P_E / P_{NE} = 0,1 / 0,005 = 20$$

Portanto, se o RR e a RP têm a mesma fórmula, qual seria então a diferença? Para responder a essa pergunta precisamos entender o delineamento de cada estudo. Estudos de coorte (longitudinais prospectivos) tem a características de calcular uma relação de causalidade e utilizam o RR, enquanto estudos transversais não permitem relação de causalidade, mas é possível calcular a relação entre a prevalência de um evento em expostos e não expostos (RP).

Medidas de associação

- ❖ **Odds ratio ou razão de chances** – razão entre a chance de exposição entre os casos e a chance de exposição entre os controles
- ❖ **Chance de exposição entre os casos** – razão entre a probabilidade de exposição e a probabilidade de não exposição entre os casos
- ❖ **Chance de exposição entre os controles** – razão entre a probabilidade de exposição e a probabilidade de não exposição entre os controles

		Doença		
		Presente	Ausente	Total
Exposição	Presente	A	B	A+B
	Ausente	C	D	C+D
Total		A+C	B+D	A+B+C+D

- **Odds ratio** ou razão de chances – razão entre a chance de exposição entre os casos e a chance de exposição entre os controles

$$\frac{\frac{A}{C}}{\frac{B}{D}} = \frac{A \times D}{B \times C}$$

Exemplo de estudo:

CAMINHA, Maria de Fátima Costa et al. Risk factors for not breastfeeding: a case - control study. Rev. Bras. Saude Mater. Infant. [online]. 2015, vol.15, n.2 [cited 2018-05-10], pp.193-199. Available from: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1519-38292015000200193&lng=en&nrm=iso>

Objetivos:

Analisar os fatores de risco para a não amamentação em Pernambuco, Nordeste do Brasil, em 2006.

Métodos:

Estudo caso-controle, cujos casos (70 crianças que nunca mamaram) e controles (140 crianças amamentadas exclusivamente por quatro meses ou mais) foram pareados por sexo e idade, tendo como base dados da III Pesquisa Estadual de Saúde e Nutrição realizada em Pernambuco, em 2006. Foram analisados fatores maternos e biológicos das crianças. Calcularam-se, através de análises bivariadas, as razões de chance brutas (odds ratio). Mediante ajustamentos aplicados por regressão logística de Poisson, foram seletivamente incorporadas as variáveis com valor $p < 0,20$. Consideraram-se como significativas as variáveis com valor de $p < 0,05$.

Características da população do estudo e fatores associados ao risco de crianças menores de cinco anos nunca terem sido amamentadas no Estado de Pernambuco, 2006.

Variáveis	Casos		Controles		OR _{bruta}	IC95%	p	OR _{ajustada}	IC95%	p
	n*	%	n*	%						
Obstétricas e assistência pré-natal										
Tipo de parto							0,378			
Vaginal	45	64,3	98	70,0	1					
Cesáreo	25	35,7	42	30,0	1,3	(0,7-2,5)				
Cadastrada no PSF ^c							0,248			
Sim	45	64,3	101	72,1	1					
Não	25	35,7	39	27,9	1,4	(0,8-2,7)				
Visita do ACS ^d							0,425			
Sim	56	80,0	118	84,3	1					
Não	14	20,0	22	15,7	1,4	(0,6-2,9)				
Distância serviço de saúde (km)							0,791			
< 1	16	45,7	32	47,1	1					
> 1	19	54,3	36	52,9	0,9	(0,3-2,4)				
Biológicas da criança										
Peso ao nascer (g)							0,114			0,399
< 2500	9	14,1	9	6,4	3,1	(0,9-9,7)		0,8	(0,1-4,9)	
2500 a 2999	15	23,4	26	18,6	1,4	(0,7-2,9)		1,9	(0,7-5,2)	
> 3000	40	62,5	105	75,0	1			1		

Fonte: III Pesquisa Nacional em Saúde e Nutrição no Estado de Pernambuco, 2006.

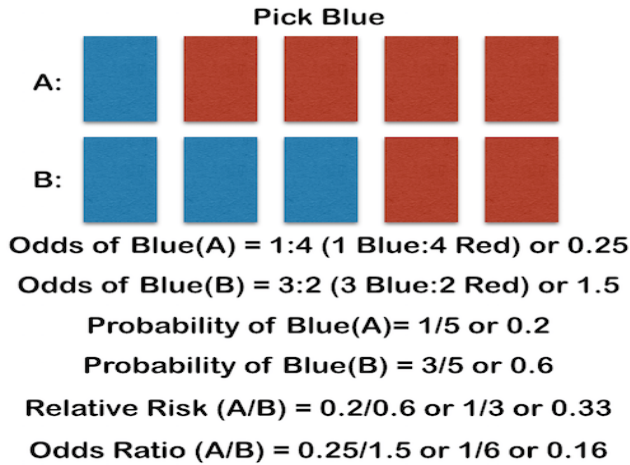
*Variações da amostra em cada categoria se devem a eventual falta de informações; ** Salário mínimo;

^a Região Metropolitana do Recife; ^b Pré-natal; ^c Programa de Saúde da Família; ^d Agente Comunitário de Saúde.

Verifica-se, portanto, que crianças com 5 anos de idade que nasceram através de parto cesáreo tem 1,3 vezes chance aumentada (aumento da chance em 30%) de não ter sido amamentada, quando comparada com aqueles que nasceram de parto normal.

Dessa forma, uma dúvida que persiste é qual a diferença entre Probabilidade (Risco) e Chance. Para isso, nós temos que pensar em exemplos práticos. Por exemplo, quando vc joga um dado, a chance do dado parar no número 2 é de 1:5, pois temos 1 chance de ser 2 e 5 chances de ser outro número. Contudo, a probabilidade é de 1:6, ou seja, se eu jogar o dado previamente eu já sei que serei submetido a uma operação de risco, ou seja, a probabilidade de parar no 2 será de 16,7%.

Obviamente essas considerações não são fáceis de entender, contudo pensemos no exemplo a seguir.



FONTE: <http://www.howardisms.com/evidence-based-medicine/odds-ratios-versus-relative-risk/>

Esse exemplo mostra claramente que embora possam ser confundidos, o RR e o ODDs podem apresentar resultados diferentes.

4.3 Medidas de Impacto

Por fim, as medidas de associação exprimem uma relação de prevalência ou incidência de um evento entre indivíduos expostos e não expostos. Contudo, em alguns estudos precisamos saber qual o impacto que determinada exposição causa nos indivíduos e na população. Para esse objetivo utilizamos as medidas de impacto.

Risco Atribuível (RA) é a diferença entre a incidência de um evento verificado no grupo exposto menos o grupo não exposto. Portanto verifica o impacto da variável de exposição nos grupos estudados.

$$RA = I_e - I_{ne}$$

Imagine que a incidência de problemas respiratórios em fumantes seja de 25% (estudo de 5 anos de acompanhamento) e de 10% em não fumantes. O risco atribuível (RA) será de 25% - 10% = 15%.

Exemplo: (dados hipotéticos) Em uma cidade há 100 mil habitantes. Um total de 5000 pessoas tiveram câncer e 3000 eram fumantes. A prevalência de fumantes era de 20%.

Risco atribuível				
Câncer				
		Sim	Não	Total
Fumante	Sim	4.000	16.000	20.000
	Não	1.000	79.000	80.000
Total		5.000	95.000	100.000

$$I_E = 4.000/20.000 = 0,2 \text{ ou } 200/1.000$$

$$I_nE = 1.000/80.000 = 0,012 \text{ ou } 1,2/1.000$$

$$RA = 0,2 - 0,012 = 0,188 \text{ ou } 188/1.000$$

$$RA = I_E - I_nE$$

Risco Atribuível Proporcional % (RA_%) é a incidência de casos na população que se relaciona à exposição (margem de excesso). Permite calcular a contribuição percentual de um determinado fator de Risco (Exposição) nas taxas de uma determinada doença (evento), ao invés de indivíduos como é feito no RA.

$$RA_{\%} = \frac{I_{exp} - I_{nexp}}{I_{exp}}$$

$$Ra_{\%} : \frac{0,2 - 0,188}{0,2} = 0,94$$

Isso significa que se o fumo fosse abolido da sociedade, 94% de câncer do pulmão seriam prevenidos.

Se o risco absoluto não é conhecido, a razão de risco (RR) pode ser usada, com a fórmula:

$$RA_{\%}(\text{expostos}) = \frac{(RR-1) \times 100}{1+(RR-1)}$$

$$RA\%(\text{expostos}) = \frac{16,67-1}{16,67} \times 100 = 94\% \text{ (basicamente igual ao anterior)}$$

Risco Atribuível População (RA_{pop}) estima a proporção do risco de adoecer na população total que é atribuível à exposição. Permite responder: : “Na população geral, quanto do risco total para câncer de pulmão fatal é devido ao tabagismo?”

$$RA_{\text{pop}} = RA \times \text{prevalência da exposição}$$

$$RA_{\text{pop}} = 0,188 \times 0,20 = 37,6 \text{ por mil}$$

Fração Atribuível populacional (FA_{pop}) é a proporção de casos na população atribuída ao fator de risco em estudo ou proporção de casos evitados caso o fator de risco fosse removido. Pode-se estimar que proporção dos casos podem ser evitados caso a exposição fosse controlada, ou seja, qual a proporção de casos de câncer no município atribuídos ao hábito de fumar?

$$FA_{\text{pop}} = RA_{\text{pop}} / \text{Incidência Total}$$

$$FA_{\text{pop}} = 0,0376 / 0,05 = 0,752 \text{ ou } 75,2\%$$

Referências

ALEXANDRE, Lourdes B. dos S. Pito (org). **Epidemiologia:** aplicado nos serviços de saúde. São Paulo: Martinari, 2012.

ALMEIDA FILHO, Naomar de; BARRETO, Mauricio L. **Epidemiologia & Saúde: Fundamentos, Métodos, Aplicações.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.

ANTUNES, José Leopoldo Ferreira; Peres, Marco Aurélio. **Epidemiologia da Saúde Bucal.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

ESTRELA, Carlos. **Metodologia Científica.** São Paulo: Artes Médicas, 2009.

FRANCO, Laercio Joel; PASSOS, Afonso Dinis Costa (org.) **Fundamentos de Epidemiologia.** 2ed. São Paulo: Manole, 2011.

HULLEY, Stephen B., et al. **Delineando a Pesquisa Clínica.** Porto Alegre: Artmed, 2015.

PEREIRA, Mauricio Gomes. **Epidemiologia:** Teoria e Prática. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. Cap.1(p.1-6) e Cap. 8 (p.157-185).

ROUQUAYROL, Maria Zélia; ALMEIDA FILHO, Naomar. **Epidemiologia e Saúde.** 6ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 2003.

Capítulo 3

REVISÕES SISTEMÁTICAS E METANÁLISES EM ODONTOLOGIA

*Bianca Marques Santiago
Yuri Wanderley Cavalcanti*

Introdução

Prática Baseada em Evidências

A velocidade na geração e publicação de novos estudos científicos na área da saúde dificulta o processo de atualização dos profissionais de saúde e, consequentemente, sua tomada de decisão frente a um desafio na prática clínica.

Considera-se importante para a construção do conhecimento científico o acúmulo de evidências e a síntese do pensamento (HUNT, 1997). Todavia, nem sempre as estratégias de pesquisa e as práticas em saúde têm sido orientadas pela melhor informação disponível (SACKET, 2002; CHALMERS, 2007; COUTINHO; RODRIGUES, 2011).

Um movimento ocorrido inicialmente dentro da Medicina culminou com a "Medicina Baseada em Evidências" como uma resposta ao volume excessivo de publicações em um número também enorme de revistas biomédicas, contrastando com o fato de que somente 15% das intervenções médicas eram apoiadas em evidências científicas sólidas, inclusive com a ausência de avaliação criteriosa de muitos tratamentos (SMITH, 1991; NADANOVSKY, 2008).

Esse movimento se espalhou para as outras profissões da saúde, como a Odontologia, e hoje pode ser resumido como a "Prática Clínica Baseada em Evidências". A partir dela, preconiza que as decisões clínicas sejam baseadas na melhor evidencia disponível, considerando-se a experiência do profissional, as necessidades do paciente, bem como suas preferencias individuais (COUTINHO, 2008; MAIA; ANTONIO, 2012),

ao invés de seguir convenções, hábitos, preferências do profissional ou opiniões de colegas (NADANOVKY, 2008).

No entanto, nesse cenário, surge a seguinte pergunta: Como acessar a melhor evidência disponível sobre determinado problema clínico? Revisões narrativas, também denominadas tradicionais ou jornalísticas, não se constituem em uma boa resposta a essa dúvida. Essas revisões fazem uso de métodos informais e subjetivos na coleta e interpretação de achados dos estudos, podendo refletir opiniões pessoais do autor e/ou valorizar referências que reforçam ideias preconcebidas (COUTINHO; RODRIGUES, 2011; MAIA; ANTONIO, 2012). Essa constatação pode ser ilustrada pela possibilidade de duas revisões narrativas concebidas na mesma época por diferentes autores resultarem em conclusões distintas, já que não há uma estratégia explícita para identificar e selecionar os estudos (COUTINHO; RODRIGUES, 2011).

Novos métodos começaram a ser propostos na década de 1980, culminando com uma abordagem caracterizada pela explicitação e transparência das etapas no seu delineamento, a revisão sistemática. Em 1994, durante a conferência de Potsdam-Alemanha, definiu-se a revisão sistemática como um processo de síntese das evidências disponíveis a partir da aplicação de estratégias científicas para limitar vieses na reunião sistemática, avaliação crítica e síntese de todos os estudos relevantes sobre um tópico específico (COOK et al., 1995; COUTINHO, 2008; COUTINHO; RODRIGUES, 2011).

Portanto, o objetivo principal de uma revisão sistemática é, além de buscar evidências, sintetizar os dados existentes de estudos primários e revisões bem conduzidas (MAIA; ANTONIO, 2012). Para tanto, é uma metodologia de estudo secundário que utiliza métodos, sistemáticos e explícitos, para identificar, selecionar e avaliar criticamente pesquisa relevante, coletando e analisando os dados dos estudos primários que forem incluídos na revisão.

Nesse sentido, apesar de não ser obrigatório, é possível utilizar métodos estatísticos para analisar e resumir os resultados de estudos individuais (NADANOVKY, 2008). A metanálise, como é conhecida, consiste numa modalidade de análise estatística concebida para combinar e

sintetizar resultados de estudos diferentes sobre o mesmo tema (COOK et al., 1995), mas não tem como objetivo único a produção de uma “medida-sumário”. Nela, também são realizadas a identificação de estudos apropriados, a rejeição de estudos não rigorosos e a explicação de inconsistências entre os achados dos diversos estudos, o que é tão importante quanto à integração numérica dos seus resultados (COUTINHO; RODRIGUES, 2011).

Para completar esse panorama inicial, seria inaceitável não mencionar a iniciativa Cochrane, cujo lema “Evidencias confiáveis. Decisões bem informadas. Melhor saúde” reflete a missão de oferecer informação acessível e confiável para apoiar a tomada de decisões, como mecanismo para o desenvolvimento da saúde global. Trata-se de uma rede global e independente de pesquisadores, profissionais, pacientes, cuidadores e pessoas interessadas na saúde, iniciada há 20 anos, com o objetivo de reunir e resumir a melhor evidência das pesquisas para ajudar no processo de escolha sobre tratamentos com base em boas informações (COCHRANE, 2018 - <https://www.cochrane.org/pt/2017/about-us>).

As revisões Cochrane são as melhores ilustrações de revisões sistemáticas (NADANOVKY, 2008) e seus manuais, materiais e softwares são extremamente úteis para os pesquisadores que conduzem revisões sistemáticas, principalmente aquelas realizadas para com foco em intervenções clínicas.

Usos e indicações

A criação de uma revisão sistemática começa com um dilema clínico, que pode e deve ser traduzido em uma pergunta clínica bem definida, o que será discutido posteriormente nesse capítulo. Por ora, é necessário compreender que nem todas as perguntas clínicas se referem a que tipo de tratamento empreender frente a determinada patologia.

Assim, o uso de revisões sistemáticas não está restrito a perguntas a respeito de modalidades de tratamento. Elas podem ser conduzidas para responder outros dilemas relativos à: diagnóstico, prevalência, etiologia, prognóstico e até prevenção de patologias (CLARKSON et al., 2003; MAIA; ANTONIO, 2012).

Independente do tipo de revisão sistemática recomenda-se que a metodologia esteja de acordo com o protocolo para revisões sistemáticas, proposto pelo Preferred Reporting Items for Systematic Reviews (PRISMA) (MOHER et al., 2009), que inclui as seguintes etapas: estratégia de busca da literatura, seleção de estudos a partir de critérios de inclusão e exclusão, seleção de artigos, avaliação da qualidade metodológica e risco de vieses dos estudos selecionados, extração e tabulação de dados e metá análise. Adicionalmente, aquelas revisões com perguntas relativas ao tratamento também precisam ser pautadas nas diretrizes da Cochrane (DEEKS et al., 2013).

Registro de protocolos

Como todo estudo científico, a revisão sistemática precisa ser delineada em um protocolo ou projeto. Uma vez definida a pergunta que os autores desejam responder com uma revisão sistemática, torna-se necessário definir os critérios de inclusão e exclusão dos estudos primários e, a seguir, redigir um protocolo claro, no qual esteja descrito o estado da arte, as hipóteses a serem testadas e a metodologia que será utilizada (MAIA; ANTONIO, 2012).

Algumas bases de dados foram especificamente criadas para o registro de protocolos de revisão sistemática, como o International Prospective Register of Systematic Reviews (PROSPERO) da University of York, que pode ser acessado no seguinte endereço eletrônico: <https://www.crd.york.ac.uk/prospero/>.

A própria Cochrane também recebe protocolos de revisão sistemática e, após criteriosa avaliação da metodologia e da importância do conhecimento que será sintetizado/produzido, realiza o registro em sua base de dados.

O registro de um protocolo de revisões sistemáticas é um passo inicial importante e fundamental por dois principais motivos. Primeiro, porque permite o registro da ideia que será desenvolvida, minimizando o risco de dois grupos de pesquisadores diferentes conduzirem,

simultaneamente, duas revisões sistemáticas para responder a mesma pergunta, dificultando, posteriormente, o processo de aceitação para publicação (STRAUS; MOHER, 2010). O segundo motivo refere-se exatamente ao processo de submissão da revisão sistemática para publicação em periódico científico. Há uma tendência relativamente recente por parte das revistas bem conceituadas de exigirem o número do registro do protocolo durante a submissão do artigo de revisão sistemática, condicionando a revisão por pares à apresentação desse registro.

Etapas de uma Revisão Sistemática

Pergunta foco (PICO/PECO)

A definição da pergunta da revisão sistemática, denominada pergunta foco, é uma etapa primordial no delineamento da revisão, visto que dela dependerão todos os passos subsequentes.

Uma pergunta mal formulada levará a um insucesso no seu mapeamento e conseqüentemente na elaboração da estratégia de busca, resultando numa busca equivocada da evidência científica disponível, que findará no insucesso da revisão sistemática como um todo.

O ideal é que a pergunta formulada envolva uma questão clínica importante vivenciada por profissionais e pacientes na prática clínica cotidiana. O objetivo da pergunta foco é ajudar a esclarecer o quê de fato o autor deseja ou precisa responder (MAIA; ANTONIO, 2012). Para facilitar essa tarefa recomenda-se utilizar o acrônimo PICO/PECO que subdivide a questão em 4 componentes: (P) Paciente/População, (I) Intervenção ou (E) Exposição, (C) Controle ou Comparação e (O) *Outcome*, isto é, Defecho (CLARKSON et al., 2003; MAIA; ANTONIO, 2012).

Assim, a pergunta será estruturada de uma forma fácil, clara e objetiva, focando na resposta a um problema específico, o que ainda facilitará o delineamento de uma estratégia de busca eficiente (NEEDLEMAN, 2003; MAIA; ANTONIO, 2012).

Critérios de elegibilidade

Os critérios de elegibilidade consistem na discussão e definição por parte dos autores da revisão sistemática de quais critérios nortearão a seleção e inclusão de estudos primários e quais serão levados em consideração para decidir pela não inclusão ou exclusão de estudos na revisão. Logicamente essa etapa deve ser desenvolvida da pergunta foco formulada, definindo a população, a intervenção/exposição, as comparações e algumas vezes o tipo de estudo de interesse (ACEVEDO, 2009; MAIA; ANTONIO, 2012).

Um cuidado adicional deve ser tomado nesse processo de discussão e definição de critérios de elegibilidade para que os autores da revisão não introduzam um viés em seu estudo. É preciso ter mente que um simples erro nos critérios de inclusão e/ou exclusão será suficiente para excluir um estudo da revisão. Por outro lado, os autores precisam refletir sobre a heterogeneidade resultante de diferenças existentes entre pacientes, intervenções ou métodos de aferição do desfecho entre os estudos primários, o que pode ocasionar na impossibilidade de conduzir a metanálise. Essa reflexão pode auxiliar na identificação do motivo que leva a uma alta heterogeneidade e levar a uma redefinição dos critérios de elegibilidade (MAIA; ANTONIO, 2012).

Mapeamento da pergunta e Estratégia de Busca

A estratégia de busca será montada a partir da definição da pergunta foco, realizando um mapeamento da mesma nos seus quatro componentes (PICO/PECO) e considerando os critérios de elegibilidade elencados na etapa anterior.

O auxílio de um bibliotecário ou de alguém experiente em buscas da literatura e/ou conhecedor das particularidades das diferentes bases de dados pode ser de grande valia (MAIA; ANTONIO, 2012), visto que é preciso compreender o uso e as indicações dos operadores booleanos (OR, AND, NOT), dos Mesh Terms ou descritores exatos (Decs) e seus termos relacionados e sinônimos.

Inicialmente os componentes da pergunta deverão ser analisados separadamente, identificando termos de busca (Mesh terms) que representem cada um e ainda os termos relacionados que também podem ter sido utilizados pelos autores dos estudos primários para indexar e/ou redigir título e resumo dos seus artigos. Assim, teremos uma lista de termos exatos, sinônimos, abreviaturas e termos relacionados para população, intervenção ou exposição, controle ou comparação e desfecho.

Nessa fase, buscas preliminares da literatura para acessar tanto revisões sistemáticas e o volume de artigos primários potencialmente elegíveis serão úteis para identificar termos relacionados que representem cada uma das partes do acrônimo PICO/PECO. Outro auxílio interessante seria o contato com experts da área temática de interesse da revisão sistemática (MANZIES, 2011; MAIA; ANTONIO, 2012).

Uma sugestão útil é realizar “sub-estratégias” de busca para cada componente do acrônimo e, posteriormente, realizar a combinação dessas para chegar na sintaxe final. A título de ilustração, seriam como gavetas de uma cômoda: na primeira, todos os termos identificados para reportar o P serão combinados com o operador booleano OR; na segunda, os termos que representam o I/E, também combinados entre si pelo OR; na terceira, termos do C; e, finalmente, na quarta, os termos relacionados ao desfecho (O). Feito isso, cada “gaveta” será combinada com a seguinte com o uso do operador booleano AND (Quadro 1), resultando na sintaxe ou na estratégia de busca propriamente dita.

Há que se ressaltar que nem toda revisão sistemática terá sua estratégia de busca com as quatro partes (“gavetas”). Por exemplo, dependendo da natureza do estudo, o controle ou comparação estará implícito e não precisará ter uma “subestratégia” própria. Esse é o caso de algumas revisões sistemáticas de diagnóstico, onde o resultado do teste diagnóstico é comparado com uma característica inerente do indivíduo (SANTIAGO et al., 2018), ou de prevalência, onde a ocorrência de determinada condição de saúde é comparada entre dois grupos diferenciados unicamente pelo fator de exposição (SILVA E FARIAS et al., 2018).

QUADRO 01: Exemplo de estruturação da estratégia de busca em partes, utilizando o acrônimo PICO/PECO.

P	“termo 1” OR “termo 2” OR “termo 3”...
AND	
I/E	“termo 1” OR “termo 2” OR “termo 3”...
AND	
C	“termo 1” OR “termo 2” OR “termo 3”...
AND	
O	“termo 1” OR “termo 2” OR “termo 3”...

Todo cuidado deve ser tomado para montar uma estratégia de busca abrangente, com vistas a atender a recomendação de que as buscas sejam exaustivas para encontrar todos os estudos possivelmente relevantes (MAIA; ANTONIO, 2012). Para atingir esse objetivo também é importante que várias bases de dados sejam pesquisadas. Em geral, utiliza-se Medline ou Pubmed, Embase, Web of Science, Sopus, Cochrane library, LILACS e Google Scholar. Outras fontes de evidencia também devem ser pesquisadas, mesmo que para isso a busca seja manual, como a análise da lista de referências dos estudos primários selecionados e até de revisões narrativas da literatura, que apesar de não serem elegíveis para inclusão na revisão sistemática, podem ter citados estudos primários relevantes para a mesma.

Ainda recomenda-se a busca em anais de eventos científicos, em base de registros de protocolos de pesquisa, bem como a busca por literatura cinzenta em bases como a SIGLE (System for Information on Grey Literature in Europe Archive) (MAIA; ANTONIO, 2012).

Uma vez realizadas as buscas, é necessário contabilizar o resultado encontrado em cada uma das bases e realizar a remoção das duplicatas, visto que cada artigo pode ser indexado em mais de uma base. Para tanto, um software gerenciador de referências pode ser útil, facilitando esse procedimento. Mendeley, Zotero, EndNote são alguns exemplos de

gerenciadores de referencia que podem ser utilizados, cada um ainda apresentando funcionalidades adicionais que poderão ser úteis em etapas posteriores. A importação dos resultados das buscas nas diferentes bases para esses softwares pode ser realizada a partir da geração e download de arquivos nas próprias bases.

Screening inicial (títulos e abstracts)

Após a remoção das duplicadas, dois membros da equipe de desenvolvimento da revisão sistemática deverão, independentemente, ler os títulos dos artigos resultantes das buscas, tendo em mente os critérios de elegibilidade definidos em etapa anterior. O resultado dos dois pesquisadores será comparado e somente serão descartados aqueles estudos cujos títulos foram considerados irrelevantes pelos dois examinadores (MAIA; ANTONIO, 2012).

Em seguida, uma nova triagem será realizada, novamente por dois pesquisadores de forma independente, a partir da leitura dos resumos dos estudos primários, levando em consideração os critérios de inclusão. Ao comparar a análise dos dois examinadores, os resumos que ambos consideraram inelegíveis serão descartados, permanecendo para a fase de leitura na íntegra os considerados relevantes e aqueles em que existe dúvida quanto a sua elegibilidade (MANZIES, 2011; MAIA; ANTONIO, 2012).

Ao final, é preciso anotar quantos estudos foram excluídos pela leitura de títulos e resumos, não sendo necessária a especificação dos motivos de exclusão.

Leitura na íntegra

Nessa fase, dois autores realizaram a leitura na íntegra do texto do artigo para confirmar que os mesmos se enquadram nos critérios de elegibilidade da revisão sistemática, devendo ser selecionados e incluídos na mesma. Ao contrario da etapa anterior, faz-se necessário contabilizar a quantidade de artigos excluídos, especificando os motivos que levaram a essa exclusão.

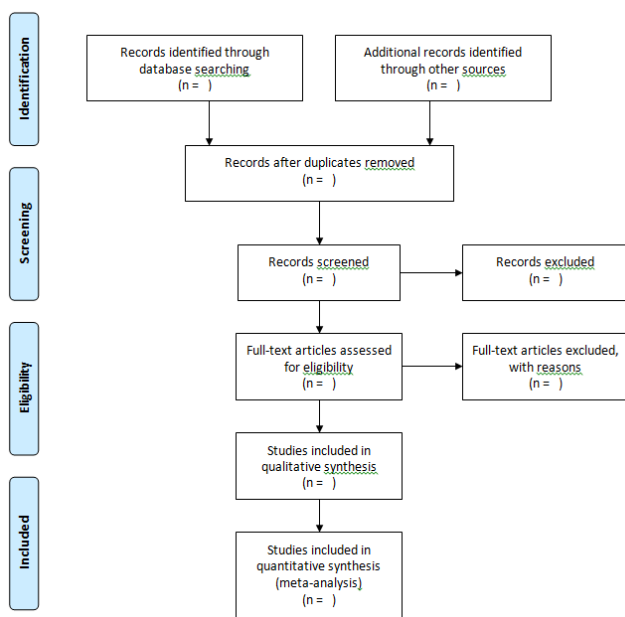
Fluxograma PRISMA

Como reportado anteriormente nesse capítulo, a condução de estudos de revisão sistemática deve ser realizada de acordo com o protocolo proposto pelo PRISMA. Uma das recomendações desse protocolo é a ilustração por meio de um fluxograma das etapas compreendidas entre a busca da literatura e a seleção dos artigos incluídos na revisão sistemática.

Por esse motivo, nas subseções anteriores, foi mencionada a necessidade de contabilização da quantidade de referencias em cada passo, sendo possível preencher um diagrama que demonstra o número de estudos remanescentes em cada etapa do processo de seleção de estudos primários a serem incluídos na síntese qualitativa e/ou quantitativa.

No endereço eletrônico do PRISMA (<http://prisma-statement.org>), é possível realizar o download de um modelo de fluxograma (Figura 1), facilitando a elaboração desse diagrama que documenta o processo de seleção dos estudos.

FIGURA 01 - Fluxograma proposto pelo PRISMA para documentação do processo de seleção dos estudos.



Como reportar uma RS?

As Revisões Sistemáticas assumem o pressuposto de reunir a melhor evidência científica a respeito de uma determinada pergunta-foco, a qual já orientou todo o processo de busca e definiu critérios de elegibilidade. Ao chegar neste ponto, o pesquisador deve fazer uma análise detalhada dos artigos científicos classificados como elegíveis. A partir destes, os resultados de uma revisão sistemática poderão ser reportados por meio de uma síntese qualitativa, a qual pode (ou não) ser complementada pela síntese quantitativa (meta-análise).

Enfatizamos novamente que as revisões sistemáticas não devem reportar, necessariamente, uma síntese quantitativa (meta-análise) dos estudos considerados elegíveis. Em muitos casos, o desenho metodológico, os instrumentos de pesquisa e os resultados reportados não permitem uma comparação direta entre os estudos incluídos. Nestes casos, a síntese qualitativa será tão somente a estratégia utilizada para reportar os resultados da revisão sistemática. Apresentaremos a seguir aspectos relevantes para a síntese qualitativa e quantitativa. Entretanto, a adequação dessas recomendações varia entre as diferentes modalidades de revisão sistemática.

Síntese Qualitativa

A síntese qualitativa tem por objetivo contextualizar e confrontar os diferentes estudos incluídos a respeito de uma mesma pergunta-foco. Para isso, o pesquisador deve produzir instrumentos que sistematizem esses dados e produzam uma informação prática ao leitor. Além disso, o pesquisador deve avaliar a qualidade metodológica e o nível de evidência dos estudos incluídos, de modo que as conclusões geradas a partir da revisão sistemática sejam baseadas, preferencialmente, nos estudos com baixo risco de viés e com melhor nível de evidência.

A seguir descreveremos e ilustraremos os passos necessários para síntese qualitativa em uma revisão sistemática. Destacamos que

a execução dos passos a seguir (e consequente montagem de quadros e tabelas) não exime o pesquisador de realizar uma síntese descritiva que contextualize os resultados, a qualidade metodológica e o nível de evidência dos estudos incluídos. A síntese qualitativa recebe esse nome exatamente pela necessidade do pesquisador/autor contextualizar os principais achados e ponderar sobre a qualidade dos estudos, sendo possível gerar novas conclusões a respeito da pergunta-foco.

Extração dos dados

Após aplicar os critérios de elegibilidade e definir quais estudos serão incluídos na revisão, o pesquisador deverá fazer uma nova leitura completa dos artigos/textos incluídos no processo de revisão. Nessa nova leitura, o pesquisador deverá realizar a extração e sistematização dos dados dos estudos incluídos em uma **tabela de extração de dados**. Esta, por sua vez, deve conter informações a respeito de cada estudo, incluindo detalhes metodológicos, como tamanho da amostra, detalhamento das intervenções/exposições, metodologia de análise de dados, principais resultados e principais conclusões. Exemplificamos a seguir que tipo de informação deverá ser extraída de cada estudo e como sistematizar esses dados em uma tabela.

Exemplo de Tabela de extração de dados. Texto em vermelho apresenta o detalhamento que cada informação extraída do estudo deve ter.

Referência (autor/data)	País de Realização do Estudo	Desenho do estudo	Intervenção ou Exposição	Grupo controle	Principais Resultados (quantitativos)	Principais Conclusões
Estudo 1						
Estudo 2						
...						
Estudo n						
Observações à Descrever cada estudo em uma linha	Caso seja relevante (ex.: local do estudo pode ser relevante para avaliar conclusões)	Incluir detalhes metodológicos do desenho do estudo, quando são observadas diferentes desenhos entre os estudos	Descrever intervenção ou exposição, incluindo o tamanho da amostra	Descrever intervenção ou exposição, incluindo o tamanho da amostra	Apresentar resultados quantitativos de cada estudo, incluindo o teste estatístico e o valor da significância	Transpor as conclusões de cada estudo incluído

Destacamos que a tabela acima descrita é apenas uma proposta de sistematização para extração dos dados. O *layout* da tabela de extração deve variar de acordo com as especificidades de cada pergunta de revisão sistemática. Por exemplo, se o país de realização do estudo não é relevante para a pergunta-foco da revisão, não há porque o pesquisador preocupar-se em coletar esta informação.

Alternativamente, o tipo de estudo “ensaio clínico randomizado e controlado” (ECCR) pode ser um critério chave para definição da elegibilidade dos estudos incluídos. Nesse caso, todos os estudos incluídos apresentarão um desenho do tipo ECCR. Assim, a coluna correspondente ao “Desenho do estudo” pode dar lugar a algum detalhamento da informação metodológica (ex.: cegamento, tipo de randomização, tipo de amostragem etc), ou outro dado que o(s) pesquisador(es) julgar(em) relevante.

Preferencialmente, o procedimento de extração de dados deve ser realizado por pares, assim como as demais etapas da revisão sistemática. Esse aspecto é relevante para que informações importantes não sejam

perdidas diante da leitura dos textos completos. Além disso, a extração de dados realizada por mais de um pesquisador reduzirá o risco de que informações mal apresentadas no texto sejam perdidas. Em caso de dúvidas, um terceiro pesquisador pode ser envolvido no procedimento de extração; ou os autores dos estudos primários podem ser contatados para maiores esclarecimentos.

O contato direto com os autores dos estudos primários incluídos talvez se faça necessário diante das etapas de avaliação da qualidade metodológica e de avaliação do nível de evidência. Recomendamos o mínimo de três tentativas de contato com os autores. Diante da não-resposta, os pesquisadores devem declarar a imprecisão da informação extraída dos artigos.

Abaixo apresentamos alguns exemplos de tabelas de extração extraídas de estudos de revisão sistemática.

Table 1: Review of studies on BMI and dental caries

Authors	Year	Study site	Age group	Sample size	Study design	Results
de Jong-Lenters et al ⁹	2015	Pediatric dental care in Noordijk, the Netherlands	5-8 years	230	Cross-sectional	Results showed no statistically significant differences between the mean DMFT or decayed missing filled surface (DMFS) scores of overweight and nonoverweight children, even after adjusting for potential confounders like gender, socioeconomic status and ethnicity
Lempert et al ¹⁰	2014	Data from European Youth Heart Study and Danish National Board of Health	9.6 years	385	Case-control study	No significant association was found between caries experience and BMI
Sharma et al ¹¹	2014	Meerut district, India	13-17 years	504	Cross-sectional	The association between BMI and caries was statistically nonsignificant with p-value 0.661 even when both genders were analyzed separately
Creske et al ¹⁷	2013	Riverside County's Coachella valley	6-11 years	177	Cross-sectional	Results showed that children in the obese category had a statistically significant lower rate of DMFT than the children of healthy weight category
Martins et al ¹²	2013	Charity institution in Aracatuba, Brazil	3.9 ± 1.0	91	Cross-sectional study	Contingency C coefficient test found no association between BMI and caries
Bagherian and Sadoghi ¹⁸	2013	Rafsanjan, Iran	30-70 months	400	Cross-sectional	The results revealed a statistically significant direct association between BMI for age and dental caries (p = 0.001), after adjusting for gender and age
Shahraki et al ¹⁹	2013	Zahedan, Iran	6-11 years	1213	Cross-sectional	Results revealed a significant association between BMI and DFT (p = 0.005). BMI for age values revealed that 34 children were caries-free in the normal weight and underweight cases, while 28 children in the overweight and obese groups were caries-free
Shaltee et al ²³	2013	Shimla city, India	12 and 15 years	1011	Cross-sectional study	Results showed a negative correlation of BMI with DMFT (r = 0.312, p < 0.011)
Parkar and Chokshi ²⁴	2013	Ahmedabad city, India	10.96 ± 3.14 years	750	Cross-sectional study	A negative correlation was observed between dmft and BMI, which was significant
Chukwumah et al ¹³	2012	Ugbowo, Benim city, Nigeria	7-15 years	210	Cross-sectional	There was no significant association between BMI and caries experience
Elangovan et al ¹⁴	2012	Private dental college, Tamil Nadu, India	6-12 years	510	Cross-sectional study	There was no statistically significant difference in the mean caries score between children belonging to various BMI for age categories (p > 0.05)
Cantekin et al ²⁰	2012	Erzurum, Turkey	12 years	224	Cross-sectional study	A possible correlation between obesity and caries was seen, but not between overweight and caries

Exemplo de Tabela de Extração de Dados de um estudo de revisão sistemática. Fonte: Shivakumar S, Srivastava A, C Shivakumar G. Body Mass Index and Dental Caries: A Systematic Review. Int J Clin Pediatr Dent. 2018 May-Jun;11(3):228-232. doi: 10.5005/jp-journals-10005-1516.

Table 4. Included studies assessing different doses of corticosteroids

Study	Year of publication	Patients			Materials and methods						Outcome measures		
		Number	Age (years)	Sex	N	AT	AR	CO	DO	DO in DEX	Swelling	Pain	Trismus
Lim and Ngeow [30]	2017	60	25 (SD 4)	11 M; 49 F	A 20	PREOP	S.m.	DEX	4 mg	4 mg	*	*	*
					B 20			MET	40 mg	7.5 mg			
					C 20			-	0 mg	0 mg			
Üstün et al. [32]	2003	20	21.9 (SD 2.6)	NM	A 20	PREOP	i.v.	MET	1.5 mg/kg	0.5 mg/kg	-	-	-
					B 20				3 mg/kg	1 mg/kg			
Laureano Filho et al. [33]	2008	60	19.5	30 M; 30 F	A 30	PREOP	Oral	DEX	8 mg	8 mg	*	-	*
					B 30				4 mg	4 mg			
Agostinho et al. [34]	2014	27	21.7 (SD 6.4)	10 M; 17 F	A 27	PREOP	Oral	DEX	4 mg	4 mg	-	-	-
					B 27				12 mg	12 mg			

*Significant difference between groups, $P < 0.05$.

AR = administration route; AT = administration time; CO = corticosteroid; DEX = dexamethasone; DO = dose; i.v = intravenous; MET = methylprednisolone; N = number of interventions; PREOP = preoperatively; S.m. = submucosal; M = male; F = female.

Exemplo de Tabela de Extração de Dados de um estudo de revisão sistemática. Fonte: Larsen MK, Kofod T, Christiansen AE, Starch-Jensen T. Different Dosages of Corticosteroid and Routes of Administration in Mandibular Third Molar Surgery: a Systematic Review. J Oral Maxillofac Res. 2018 Jun 29;9(2):e1. doi: 10.5037/jomr.2018.9201.

Avaliação da qualidade metodológica

Após montar a tabela de extração de dados, o próximo passo para conduzir a síntese qualitativa é realizar a análise da qualidade metodológica dos estudos incluídos. Para isso, a literatura disponibiliza diferentes instrumentos conhecidos como *Quality Assessment Tool*, os quais funcionam na modalidade de *checklist* ou estabelecem escala de pontuação.

Para efeito de divulgação dos resultados da revisão sistemática no formato de artigo, recomendamos o uso de ferramentas de *quality assessment* no formato de *checklist*. Algumas ferramentas baseadas em escala de pontuação recebem certo criticismo por basear-se em um valor numérico, e não no cumprimento de certos domínios-chave.

Para cada tipo/desenho de estudo, recomenda-se um tipo de instrumento de avaliação da qualidade metodológica. O quadro a seguir relaciona os principais tipos de estudo com os ferramentas recomendadas para o *Quality Assessment*.

QUADRO 02: Ferramentas de avaliação metodológica segundo tipo de estudo.

Tipos de Estudo	Quality Assessment Tool
Estudos Transversais	Fowkes and Fulton, 1991 (Fowkes FG, Fulton PM. Critical appraisal of published research: introductory guidelines. <i>BMJ</i> 1991;302(6785):1136-1140.) Newcastle-Ottawa adapted for Cross-Sectional (http://www.ohri.ca/programs/clinical_epidemiology/oxford.asp)
Estudos de Coorte	Newcastle-Ottawa for Cohort and Case-Control studies (Wells GA et al. The Newcastle-Ottawa Scale (NOS) for assessing the quality of nonrandomised studies in meta-analyses. Available from: http://www.ohri.ca/programs/clinical_epidemiology/oxford.asp)
Estudos de Caso-Controle	
Estudos de Acurácia	QUADAS-2 (Whiting PF et al. QUADAS-2 Group. QUADAS-2: a revised tool for the quality assessment of diagnostic accuracy studies. <i>Ann Intern Med</i>. 2011 Oct 18;155(8):529-36.) (http://www.bristol.ac.uk/population-health-sciences/projects/quadas/quadas-2/)

Ensaio Clínicos Randomizados	Cochrane Collaboration's tool for assessing risk of bias (Higgins JP et al. The Cochrane Collaboration's tool for assessing risk of bias in randomised trials. BMJ. 2011 Oct 18;343:d5928. doi: 10.1136/bmj.d5928.) https://handbook-5-1.cochrane.org/chapter_8/table_8_5_a_the_cochrane_collaborations_tool_for_assessing.htm
Revisões Sistemáticas	AMSTAR Shea BJ, et al. AMSTAR 2: a critical appraisal tool for systematic reviews that include randomised or non-randomised studies of healthcare interventions, or both. BMJ. 2017 Sep 21;358:j4008 https://amstar.ca/docs/AMSTAR-2.pdf

De modo semelhante ao processo de extração de dados, a avaliação da qualidade metodológica dos estudos deve ser realizada por pares e sistematizada em uma tabela. Para montagem da tabela de *Quality Assessment*, cada pergunta do *checklist* deverá ser organizada em uma linha/coluna, ao passo que cada estudo deverá ser ordenado consecutivamente nas colunas/linhas. Apresentamos abaixo um exemplo de tabela de avaliação da qualidade metodológica dos estudos incluídos.

	Berg 2013	Deja 2012	Ferrari 1998	Fuller 1985	Chaffariz 2007	Goldman 1998	Goldman 1991	Hockings 1993	Kallis 1994	Klein 1998	Matsuzaki 1997	Morawski 2005	Myers 2016
Random sequence generation (selection bias)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Allocation concealment (selection bias)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Blinding of participants and personnel (performance bias)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Blinding of outcome assessment (detection bias)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Incomplete outcome data (attrition bias)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Selective reporting (reporting bias)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Other bias	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Figure S2 Risk of bias assessment. Critical appraisal of included trials assessing the seven domains (randomization, allocation concealment, blinding, completion of outcome data, selective outcome reporting, and other sources of bias). Green circle indicates low risk of bias, red circle indicates high risk of bias, and yellow circle indicates unclear reporting or uncertain risk of bias.

Exemplo de Tabela de *Quality Assessment* de um estudo de revisão sistemática. Fonte: Solo K, et al. Pre-operative use of aspirin in patients undergoing coronary artery bypass grafting: a systematic review and updated meta-analysis. J Thorac Dis. 2018;10(6):3444-3459. doi: 10.21037/jtd.2018.05.187.

Avaliação da evidência (GRADE)

A avaliação do nível de evidência segundo o *Grading of Recommendations Assessment, Development, and Evaluation* (GRADE) tem por objetivo fazer uma análise sobre a qualidade da evidência dos artigos incluídos. Essa estratégia de avaliação foi criada em 2008 e tem atraído a atenção dos pesquisadores recentemente. A partir da avaliação do GRADE, é possível definir se o nível de evidência permite ou não fazer recomendações práticas. Além de considerar aspectos metodológicos (risco de viés, inconsistência, fatores de confundimento, imprecisão e viés de publicação), o GRADE considera outros aspectos como a magnitude de efeito observada e a plausibilidade das observações. Para essa avaliação, a qualidade da evidência pode variar de muito baixa a alta.

Table 4 GRADE assessment for overall quality of evidence

No. of subjects (studies)	Risk of bias	Inconsistency	Indirectness	Imprecision	Publication bias	Overall quality of evidence	Risk ratio (95%CI)	Absolute effect of aspirin per 1,000 patients treated per year (95% CI)
Mortality: 3,391 (9 RCTs)	Serious ^a	Not serious ^b	Serious ^c	Serious ^d	Strongly suspected ^e	⊕○○○ (very low)	1.41 (0.73–2.74)	4 more events (2 fewer to 15 more)
Myocardial infarction: 3,768 (9 RCTs)	Serious ^a	Not serious ^b	Serious ^c	Serious ^d	Strongly suspected ^e	⊕○○○ (very low)	0.84 (0.69–1.03)	16 fewer events (3 more to 32 fewer)
Postoperative chest tube drainage: 4,377 (13 RCTs)	Serious ^f	Serious ^g	Serious ^c	Serious ^d	Strongly suspected ^e	⊕○○○ (very low)	–	–
Saphenous vein graft occlusion: 760 (3 RCTs)	Serious ⁱ	Not serious ^b	Serious ^c	Not serious ^j	Strongly suspected ^e	⊕⊕○○ (low)	0.69 (0.49–0.97)	NA*

FONTE: Solo K, et al. Pre-operative use of aspirin in patients undergoing coronary artery bypass grafting: a systematic review and updated meta-analysis. J Thorac Dis. 2018;10(6):3444-3459. doi: 10.21037/jtd.2018.05.187.

Síntese Quantitativa

A síntese qualitativa, ou meta-análise, de uma revisão sistemática consiste da análise estatística consolidada de diferentes estudos primários incluídos numa revisão. Para definir se a revisão sistemática deve ou não reportar uma meta-análise, o pesquisador deve avaliar se os estudos incluídos apresentam certa semelhança quanto as estratégias e ferramentas metodológicas, bem como segundo a forma de apresentação dos dados.

Diante desta constatação, o pesquisador pode reunir os dados dos diferentes estudos incluídos e então gerar uma meta-análise, ou seja, a análise secundária dos resultados de estudos primários. O objetivo deste procedimento é gerar uma conclusão baseada na perspectiva quantitativa e estatística.

Um dos parâmetros a ser considerado para inferir confiabilidade às meta-análises é a quantificação da heterogeneidade, traduzida pelo I^2 . Quando a heterogeneidade dos estudos é alta ($I^2 > 50\%$), o pesquisador deve lançar estratégias para tentar reduzir a heterogeneidade. Um delas, consiste em remover da meta-análise estudos com alto risco de viés, e/ou com baixa qualidade da evidência. Alternativamente, pode-se subagrupar estudos que reúnem características semelhantes entre si.

Não é objetivo deste capítulo descrever em detalhes os procedimentos necessários para uma meta-análise, porém fazemos algumas recomendações ao leitor:

Que dados reunir para realizar meta-análise?

Primeiramente, o pesquisador deve identificar que tipo de dado foi reportado nos estudos primários.

No caso de dados dicotômicos (ex.: presença e ausência), em que são reportadas frequências ou medidas de associação, o pesquisador deve ter em mãos o tamanho da amostra de cada grupo e a frequência de pessoas afetadas em cada grupo. Neste caso, as medidas de associação (Razão de Prevalência, Razão de Chances ou Risco Relativo) e Intervalo de Confiança (95%) serão utilizadas para reportar os resultados da meta-análise.

No caso de dados contínuos, a exemplo de medidas de tendência central e medidas de dispersão, o pesquisador deve utilizar parâmetros como a média da diferença para estimar as diferenças entre as intervenções. Em todos os casos, o tamanho da amostra de cada grupo se faz muito relevante, com o objetivo de calcular o peso para cada estudo.

Que programa utilizar?

Uma rápida busca bibliográfica resultará em diferentes programas estatísticos ou planilhas eletrônicas que viabilizam os cálculos necessários para uma meta-análise. Nossa recomendação, entretanto, é que o pesquisador utilize ferramentas largamente validadas por outros pesquisadores para este fim. Aqui sugerimos dois programas estatísticos de livre acesso e de fácil utilização para gerar a sua meta-análise:

-> à RevMan 5 (Cochrane Collaboration): <https://community.cochrane.org/help/tools-and-software/revman-5/revman-5-download>

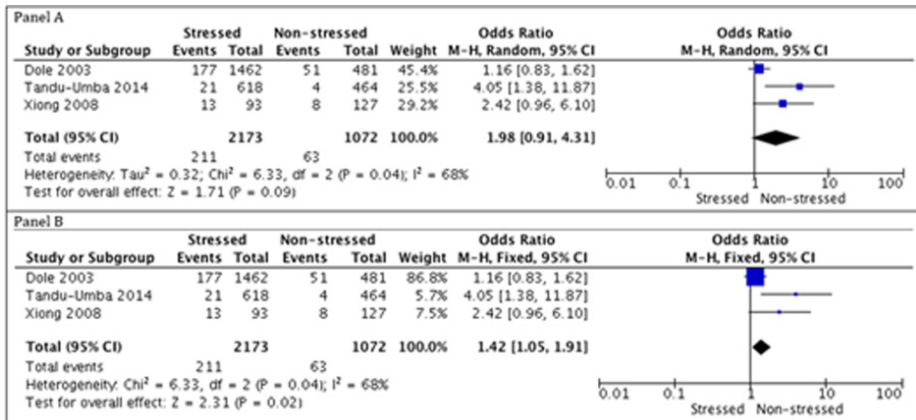
-> à OpenMeta[Analyst] (The School of Public Health Brown University):

-> <http://www.cebm.brown.edu/openmeta/>

Interpretando os dados de uma meta-análise

Apresentamos a seguir um gráfico do tipo *forest-plot* frequentemente utilizado para reportar meta-análises.

Exemplo de meta-análise:



FONTE: Lima SAM, et al. Is the risk of low birth weight or preterm labor greater when maternal stress is experienced during pregnancy? A systematic review and meta-analysis of cohort studies. PLoS One. 2018 Jul 26;13(7):e0200594. doi: 10.1371/journal.pone.0200594.

Na figura apresentada acima, podemos identificar que cada estudo incluído na meta-análise foi listado consecutivamente na primeira coluna. Essa revisão sistemática com meta-análise avaliou se a exposição ao estresse durante a gravidez está associado ao baixo peso ao nascer ou parto prematuro. Para cada estudo, foi apresentado a frequência de eventos e o tamanho da amostra, bem como calculado o peso de cada estudo diante da análise global de todos os artigos incluídos. O peso de cada estudo correlaciona-se com o tamanho do quadrado azul no elemento gráfico à direita. Note que o estudo que tem peso de 86,8% da análise, possui maior tamanho do quadrado azul.

A última coluna de valores apresenta a medida de associação (razão de chances – *odds ratio*) e o intervalo de confiança reportado em cada estudo. No gráfico à direita, a medida de associação é representada pela posição do quadrado azul, e as linhas representam o intervalo de confiança. Ao analisar a linha horizontal de cada estudo, identifica-se

que àqueles em que o intervalo de confiança cruzou a linha central (1), não se observa diferença estatística entre as exposições.

A análise global do efeito da exposição ou não ao estresse durante a gravidez é representado pelo losango preto na porção inferior dos gráficos. A diagonal vertical do losango representa a posição medida sumarizada de associação (valor de *odds ratio*, neste caso). A diagonal horizontal do losango representa o intervalo de confiança. No elemento gráfico superior, o losango toca a linha central. Isso significa que, dentro daquele subgrupo de estudos, a exposição ao estresse não interfere significativamente no baixo peso ao nascer ou na prevalência de parto prematuro. No elemento gráfico inferior, o losango não toca a linha central do gráfico, significando que a meta-análise deste subgrupo aponta para o efeito significativo do estresse sobre o desfecho em análise. Note que entre a primeira e a segunda meta-análise o limite de confiança foi reduzido, indicando menor variabilidade dos estudos.

As informações sumarizadas das meta-análises na figura acima encontram-se na porção inferior esquerda de cada meta-análise. No exemplo acima, as meta-análises apresentaram heterogeneidade moderada ($I^2=68\%$). Além disso, o valor de *odds ratio* indica efeito significativo do stress sobre o desfecho observado.

Considerações finais e a Experiência do PPGO/UFPB

As revisões sistemáticas possuem um patamar consolidado enquanto publicação de relevância e alto valor de evidência. Muito embora este capítulo tenha procurado desmistificar e simplificar a condução de revisões sistemáticas, reforçamos que este é um processo árduo que carece de dedicação de tempo e esforço intelectual para seu desenvolvimento.

Destacamos que a definição da pergunta-foco consiste no aspecto mais importante para idealização e condução de uma revisão sistemática. Embora possa parecer óbvio, por trata-se da primeira etapa de uma revisão sistemática, destacamos que a definição da pergunta chave orienta todo o processo de sistematização da literatura e influencia, inclusive, a publicação.

O emprego de uma pergunta-foco mal definida, mal elaborada ou irrelevante, comprometerá o sucesso de todas as etapas subsequentes. Portanto, é natural que o pesquisador dedique maior tempo e esforço nesta etapa inicial.

Esclarecemos também que a construção das revisões sistemáticas se dá sobre uma curva de aprendizado, na qual o pesquisador acumula e revisita a experiência pessoal no campo da metodologia científica e da área de conhecimento na qual está estudando. Portanto, é necessário que o pesquisador que desafia-se a seguir o caminho da revisão sistemática compreenda a necessidade de atualização com conceitos de metodologia, epidemiologia, bioestatística e, fundamentalmente, na área de pesquisa sobre a qual a revisão será estruturada.

A Experiência do PPGO-UFPB no campo das revisões sistemáticas tem se demonstrado frutífera. Em 2018, o programa está ministrando a Disciplina Tópicos em Revisão Sistemática pela terceira vez. Atualmente, temos três revisões sistemáticas em avaliação por revistas científicas, dois artigos aceitos para publicação e um artigo publicado em revistas com abrangência internacional.

Essa iniciativa nasceu do curso de revisão sistemática oferecido pela Profa. Dra. Lucianne Cople Maia em 2016. Naquela oportunidade docentes e alunos fizeram uma imersão nas etapas para construção de revisões sistemáticas. O curso da Profa. Lucianne então motivou o corpo docente do PPGO/UFPB a oferecer e apoiar uma disciplina para alunos do Mestrado em Odontologia.

A expectativa é que o grupo passe por um amadurecimento e que os resultados positivos das revisões sistemáticas submetidas para publicação possam motivar novos alunos a se empenhar e mergulhar no campo das revisões sistemáticas.

Referências

ACEVEDO, A. M. **A step-by-step guide on how to conduct a systematic review.** In: Handbook of Cientific Methodology: A guide for dental researcher. São Paulo: SBPQO – Sociedade

Brasileira de Pesquisa Odontológica; LAR – Latin American Region of The International Association for Dental Research (IADR), 2009. CAP. 11, p.157-79.

CHALMERS, I. **The lethal consequences of failing to make full use of all relevant evidence about the effects of medical treatments: the importance of systematic reviews.** In: ROTHWELL, P. M. Treating individuals. From randomised trials to personalised medicine. Edinburgo: Elsevier, 2007. Cap. 2, p.37-58.

CLARKSON, J.; HARRISON, J. E.; ISMAIL, A. I.; NEEDLEMAN, I.; WORTHINGTON H. **Evidence based dentistry for effective practice.** Londres: Taylor and Francis Group, 2003. 228p.

THE COCHRANE COLABORATION. **About us.** Disponível em: <https://www.cochrane.org/about-us>. Acesso em 28 out. 2018.

COOK, D.J.; SACKET, D. L.; SPITZER, W. O. Methodological guidelines for systematic reviews of randomized controlled trials in health care from the Potsdam consultation on meta-analysis. **Journal of Clinical Epidemiology**, v. 48, p. 167-171, 1995.

COUTINHO, E. **Revisão Sistemática e Metanálise em Odontologia.** In: LUIZ, R. R.; COSTA, A. J. L.; NADANOVSKY, P. Epidemiologia e Bioestatística em Odontologia. São Paulo: Atheneu, 2008. Cap.18, p.397-403.

COUTINHO, E. S. F.; RODRIGUES, L. C. **Metanálise de Estudos Epidemiológicos Observacionais e de Intervenção.** In: Epidemiologia & Saúde. Fundamentos, Métodos, Aplicações. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. Cap. 27, p.307-318.

DEEKS, J.J.; WISNIEWSKI, S.; DAVENPORT, C. **Guide to the contents of a Cochrane Diagnostic Test Accuracy**

Protocol. In: DEEKS, J.J.; BOSSUYT, P.M.; GATSONIS, C. Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Diagnostic Test Accuracy Version 1.0.0. The Cochrane Collaboration, 2013. Cap.4. Available from: <http://srdta.cochrane.org/>.

HUNT, M. **How Science Takes Stock. The history of Meta-Analysis.** Nova York: Russel Sage Foundation, 1997.

MAIA, L.C.; ANTONIO, A.G. Systematic reviews in dental research. A guideline. **J Clin Pediatr Dent.** v.37, p.117–24. 2012 doi:10.17796/jcpd.37.2.h606137vj3826v61.

MANZIES, D. Systematic reviews and meta-analysis. **Int J Tuberc Lung Dis**, v.15, p.582-593, 2011.

MOHER, D.; LIBERATI, A.; TETZLAFF, J.; ALTMAN, D.G. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. **Ann Intern Med.** v. 151, n. 4, p. 264-9, 2009.

NADANOVSKY, P. **Odontologia Baseada em Evidência.** In: LUIZ, R. R.; COSTA, A. J. L.; NADANOVSKY, P. Epidemiologia e Bioestatística em Odontologia. São Paulo: Atheneu, 2008. Cap.17, p.375-395.

NEEDLEMAN, I. **Introduction to evidence based medicine.** In: CLARKSON, J.; HARRISON, J. E.; ISMAIL, A. I.; NEEDLEMAN, I.; WORTHINGTON H. Evidence based dentistry for effective practice. Londres: Taylor and Francis Group, 2003. Cap. 1, p.1-17.

SACKETT, D. L. The arrogance of preventive medicine. **Canadian Medical Association Journal**, v.67, p.363-364, 2002.

SANTIAGO, B.M.; ALMEIDA, L.; CAVALCANTI, Y.W.; MAGNO, M.B.; MAIA, L. C. Accuracy of the third molar maturity index in assessing the legal age of 18 years: a systematic review and meta-analysis. **International Journal**

of Legal Medicine, v. 132, p.1167–1184, 2018. doi:10.1007/s00414-017-1766-4.

SILVA-E-FARIAS, I. P., et al. Does non-institutionalized elders have a better oral health status compared to institutionalized ones? A systematic review and meta-analysis **Ciência & Saúde Coletiva**, 2018.[prelo]

SMITH, R. Where id the Wisdom? The poverty of medical evidence (editorial). **BMJ**, v.303, p.798-799, 1991.

STRAUS, S.; MOHER, D. Registering Systematic Review. **Canadian Medical Association Journal**, v.182, n.1, p.13-14, 2010. doi:10.1503/cmaj.081849.

Capítulo 4

QUANTIFICAÇÃO DO CONTEÚDO MINERAL DO ESMALTE DENTAL

*Frederico Barbosa de Sousa
Raquel Fernanda Gerlach
Eugênia Livia de Andrade Dantas*

Introdução

A quantificação do conteúdo mineral do esmalte é uma das mais importantes ferramentas para se estudar o esmalte dentário, e isso decorre justamente do fato do esmalte ser o tecido mais mineralizado dos mamíferos, com cerca de 96% de mineral em peso (ANGMAR, 1963). Mas há grande quantidade de incertezas quanto à real porcentagem de mineral do esmalte, uma vez que os cálculos usados para determinar a quantidade de mineral pelo método mais aceito atualmente (radiomicrografia) não levam em conta a composição exata dos elementos minoritários presentes no esmalte (ELLIOTT, 1997; ELLIOT 1998).

Há duas maneiras de quantificar o conteúdo mineral do esmalte através do exame radiomicrográfico: a analógica (com filmes radiográficos físicos) e a digital (com câmera radiográfica digital). A opção analógica depende do uso de filmes radiográficos de alta definição juntamente com a revelação e fixação em câmera escura.

A descontinuidade da fabricação dos filmes radiográficos de alta resolução associada ao aumento do número de aparelhos de microtomografia digital tridimensional de raios X (equipados com câmera radiográfica digital) em anos recentes os centros de pesquisa deve tornar a radiomicrografia digital um método mais acessível para pesquisa de cárie, de defeitos de esmalte humano e de modelos animais de alterações adamantinas. E o intuito deste capítulo é justamente facilitar a confecção das primeiras radiomicrografias para quem nunca as fez.

1 FONTE DE RAIOS X E PICO DE ENERGIA DE EMISSÃO

O conhecimento do pico de energia de raios X incidente na amostra de esmalte é necessário para que se torne possível realizar a radiomicrografia quantitativa. A absorção de raios X pelos componentes químicos do esmalte dental varia em função do pico de energia de raios X incidente na amostra. Características da fonte de raios X, como tipo específico de ânodo (Cobre, Tungstênio, Molibdênio, etc), voltagem e amperagem, afetam o pico de energia de raios X emitido. A faixa do espectro eletromagnético dos raios X varia de 0,01 a 10 nm, correspondendo a frequências de 30 PetaHertz (3×10^{16} Hz) a 30 HexaHertz (3×10^{19} Hz). O pico de energia de raios X é dado em quilo elétron volts (keV). A relação entre comprimento de onda e keV é dada por:

$$f \times \lambda = \frac{h \times c}{\lambda} = \frac{(4.135667516 \times 10^{-15} eV) \times (299.792.458 m/s)}{\lambda(nm)}$$

Onde “h” é a constante de Planck e “c” é a velocidade da luz. Isto pode ser simplificado para:

$$E = \frac{(1.239,84193 eVnm)}{\lambda (nm)}$$

Um fóton com comprimento de onda de 550 nm (no centro do espectro de luz visível) do teria energia de 2,25 eV, enquanto que um fóton com comprimento de onda de 0,12 nm teria energia de 10.332,02 eV (10,3 keV).

De acordo com a energia dos fótons, os raios X são classificados em duros e moles. Os raios X duros são aqueles com energia acima de 5 a 10 keV, não havendo um limite preciso. Os raios X com energias menores são chamados de moles. Todo equipamento de raios X tem um filtro acessório para filtrar (barrar) os raios X moles, deixando os raios X duros interagir com a amostra.

Caso a informação do pico de energia de emissão de raios X não conste no manual do equipamento, duas alternativas podem ser tentadas. Uma é consultar um técnico da empresa que fabricou o equipamento. A outra é encontrar o pico de energia de emissão a partir do espectro teórico de emissão de raios X previsto por Boone et al. (1997). Com informações sobre o tipo de ânodo, voltagem e amperagem, é possível encontrar a equação que descreve o espectro de emissão e deste último se pode obter o pico de energia de emissão.

Como exemplo de fonte de raios X que pode ser usada para radiomicrografia analógica, a Figura 1 mostra um espectro de emissão de raios X conforme previsto por Boone et al. (1997). Esse é o espectro de energia de emissão (em keV) de uma fonte de raios X com ânodo de Tungstênio (modelo Faxitron MX-20, Faxitron, EUA), filtro de Berílio, operando numa voltagem de 20 kV. O pico de emissão é em 8 keV. Ainda para radiomicrografia analógica, um outro equipamento, modelo PCBA Inspector (GE, Alemanha), com ânodo de Tungstênio, filtro de Berílio, operando a 40 kV, tem o pico de emissão em 24 keV (Figura 2).

FIGURA 01: Espectro mais provável produzido pelo Faxitron MX-20 com ânodo de tungstênio, com pico em 8.5 KeV (BOONE et al., 1997).

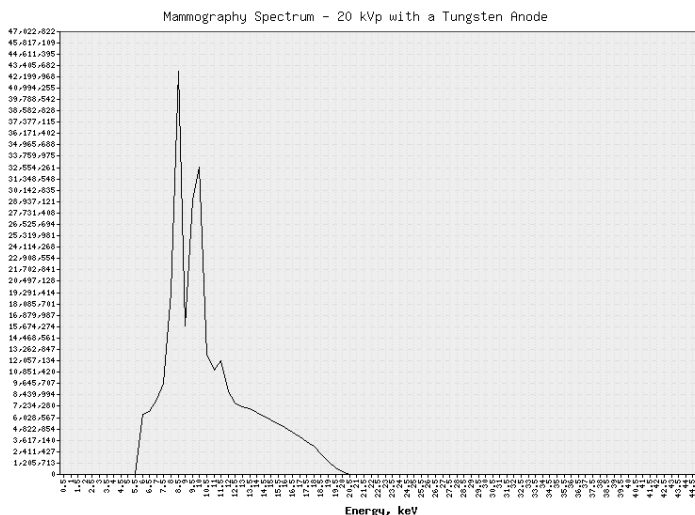
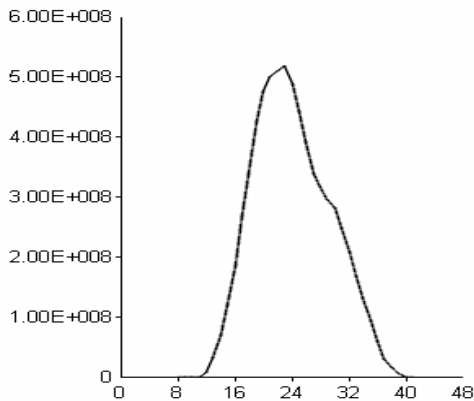


FIGURA 2: Espectro de emissão de raios X de um equipamento com ânodo de Tungstênio, operando a 40 kV.



Espectro de emissão de PCBA inspector com 40 kV. Pico em 24 keV.

Como exemplo de fonte de raios X que pode ser usada para radiomicrografia digital, a Tabela 1 lista os picos de emissão de raios X para uma fonte de um microtomógrafo digital (Skyscan 1172, Bruker, Bélgica) operando com diferentes voltagens e filtros.

TABELA 01: Picos de emissão de raios X de um microtomógrafo digital (Skyscan 1172, Bruker, Bélgica).

Filtro	20Kv	40Kv	50Kv	60Kv	70Kv	80Kv	100Kv
No filter	8Kev	9Kev		10Kev			
Al 0,5mm		19Kev	20Kev		22Kev		
Cu + Al				28Kev		30Kev	59Kev

2 ATENUAÇÃO DE RAIOS X PELO ESMALTE DENTAL

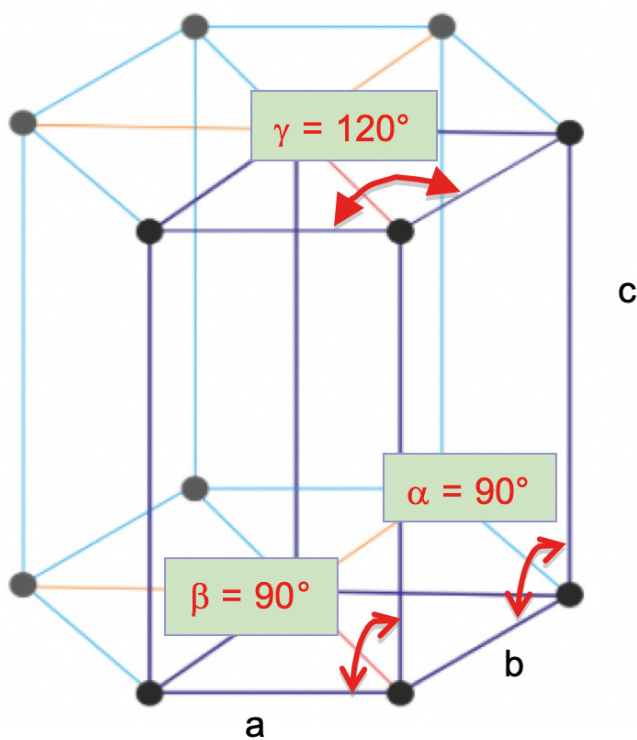
A quantificação de conteúdo mineral do esmalte dental através de radiomicrografia é baseada na atenuação (absorção) de raios X pelo esmalte. Em física, se usa o coeficiente de atenuação de massa (CAM) para quantificar a atenuação de raios X por um material. O CAM depende da composição química do esmalte e do pico de emissão de raios X usado. Em termos práticos, os conteúdos de água e orgânicos são desconsiderados devido às suas baixas quantidades no esmalte e a seus baixos valores de CAM.

O conhecimento da composição química do esmalte dental é uma condição indispensável para calcular o CAM. Considerando a diversidade de elementos químicos encontrados, a composição química do componente mineral do esmalte pode variar bastante. Uma vez que uma análise destrutiva do esmalte é necessária para se quantificar todos os elementos químicos presentes, tornando difícil a investigação da exata composição da amostra de esmalte que se vai ter seu conteúdo mineral quantificado, a radiomicrografia é normalmente feita com uma aproximação teórica da composição química do mineral do esmalte.

2.1 FÓRMULA DA CÉLULA UNITÁRIA DA HIDROXIAPATITA DO ESMALTE

O CAM de um material é baseado na composição química da célula unitária, que é o menor padrão repetitivo de distribuição espacial de átomos em materiais sólidos. A célula unitária da apatita do esmalte é da categoria hexagonal, na qual os comprimentos dos lados a , b e c seguem a seguinte regra: $a = b \neq c$ (Figura 3). Os ângulos entre os lados são o alfa, beta e gama. A regra para hexagonal é: $\alpha = \beta = 90^\circ$; $\gamma = 120^\circ$. Na lista de grupos de espaço da categoria hexagonal, a apatita do esmalte tem o sistema P63/m.

FIGURA 03: Ilustração da célula unitária da apatita do esmalte (categoria hexagonal).



A tabela 2 ilustra duas aproximações de composição química da célula unitária do esmalte.

TABELA 02: Aproximações da composição da célula unitária da hidroxiapatita do esmalte e do colágeno.

Composição	Massa total (g)	Densidade (g.cm ⁻³)	Quantidades por elemento
^a Ca _{8,858} Mg _{0,198} (PO ₄) _{5,312} (OH) ₂ (CO ₃) _{0,557} (HPO ₄) _{0,28} - HAP	955,688	^b 3,15	Ca (37,1 %), Mg (0,5%), P (18,1%), O (43,3%), H (0,24%), C (0,7%)
^c Ca _{8,856} Mg _{0,088} Na _{0,292} K _{0,010} (PO ₄) _{5,312} (HPO ₄) _{4,0280} (CO ₃) _{3,0407} (OH) _{0,702} Cl _{0,078} (H ₂ O) _{1,120} (CO ₃) _{0,050} - HAP	957,845	2,99	Ca (37,1%), Mg (0,2%), Na (0,7%), K (0,04%), P (18,1%), Cl (0,3%), O (42,7%), H (0,34%), C (0,6%)
^d C ₁₂ H ₂₄ N ₃ O ₄ - Colágeno	235,341	^e 1,19	O (27,19%), H (10,28%), N (1,28%), C (61,24%)

^{a,b}Angmar et al. (1963), ^cElliot, J.C (1997), ^dOmokanwaye et al., 2010, ^eGautieri et al., 2011.

O modelo de célula unitária usada neste protocolo é o modelo 4 da Tabela 3 de Elliot (1997). Neste modelo, a água estrutural usada nos cálculos é apenas a água dos íons hidroxila (1,120 moles de H₂O). Os moles de água dos íons fosfato e cálcio não entram.

O esmalte é heterogêneo do ponto de vista da quantidade de mineral, variando a quantidade de cálcio de 30 a 40% (ROBINSON et al., 1971) e a de volume mineral de 97 a 77% (MACENA et al., 2014), sendo as menores concentrações encontradas no esmalte próximo da dentina (WEATHERELL et al., 1974; MACENA et al., 2014). É nesta região, aproximadamente nos 0,3 mm mais internos do esmalte (próximo da dentina), onde há o maior volume de matéria orgânica (MACENA et al., 2014).

Do ponto de vista dos componentes inorgânicos, a hidroxiapatita pode adquirir vários outros íons por substituição heteroiônica, havendo bastante variação na composição iônica, embora raramente estas substituições ultrapassem 1%. A Tabela 3 lista os elementos químicos inorgânicos que podem ser encontrados em pequenas quantidades no esmalte.

TABELA 03: Elementos químicos inorgânicos minoritários encontrados no esmalte suas quantidades (em ppm).

Elemento	Quantidade (ppm)	Elemento	Quantidade (ppm)
Na	520-8740	K	<10-1000
Rb	5	Cs	<1
Mg	730-3000	Sr	25-600
Ba	10-100	Sc	<1
Y	01.out	La	<1
Ti	10-100	Zr	<1
V	<1	Nb	<1
Ta	1 a 10	Cr	0,004-10
Mo	0,003-10	W	0,24
Mn	0,1-100	Fe	11-338
Ru	<1	Co	0,0002
Ni	<10-100	Pd	<1
Pt	<1	Cu	0,3-162
Ag	0,005-97	Au	0,02
Zn	190-210	Cd	1 a 10
Hg	30-129	B	1 a 10
B	1 a 10	Al	30-129
Ga	1 a 10	In	<1
Si	3-1000	Ge	1 a 10
Sn	<1-80	Pb	<10-550
As	0,03-100	Sb	0,005-10
S	10-100	Se	0,4-1,6
F	26-337	Cl	<1000-6500
Br	4,6	I	<1

Adaptada de Weatherell & Robinson, 1974.

No esmalte, o carbonato (CO_3) varia entre de 1% a 4%, com um incremento na quantidade de carbonato da superfície do esmalte em direção à parte interna do esmalte, junto à junção amelodentinária (ROBINSON et al., 1995). Entre os outros elementos presentes em menor quantidade está o magnésio, que se apresenta entre 0,1% e 0,5%, com distribuição similar à do carbonato. Outros elementos presentes em menor quantidade, como o flúor, o chumbo e o zinco, têm distribuição bastante diferente, pois se concentram na superfície externa do esmalte, onde são encontrados em quantidades que variam de centenas de ug/g (ou ppm), podendo chegar até a 5000 ug/g (WHEATHERELL et al., 1973; ALMEIDA et al., 2007.)

Considerando as variações na composição química mineral do esmalte, o modelo de Elliott (1997) se aproxima mais da realidade. Na prática, é este modelo que mais usamos para quantificar volume mineral. No caso de volume mineral, por exemplo, o valor obtido com o modelo de Elliott (1997) é 5-6 % maior que aquele obtido com o modelo de Angmar et al. (1963). Assim, a referência ao modelo usado é crucial para as comparações entre dados de conteúdo mineral no esmalte.

O volume mineral do esmalte de 86,2% (correspondendo a 95% em peso) foi relatado com base em medidas feitas com uma densidade de $3,15 \text{ g/cm}^3$ (Angmar et al., 1963). Este valor foi medido no esmalte externo da porção média coronal (entre a oclusal e a cervical). Com o valor de densidade proposto por Elliott (1997), que é de $2,99 \text{ g/cm}^3$, o volume mineral do esmalte relatado por Angmar et al. (1963) sobe para 93% e o percentual de peso sobe para ~ 97 % (ELLIOTT et al., 1998). Para essa conversão, Elliott et al. (1998) usaram o valor de volume mineral de 87%, citando Angmar et al (1963) como fonte, apesar destes últimos relatarem 86,2% no seu artigo. Deixando as discrepâncias no valor exato relatado por Angmar et al (1963) de lado, a proposta de Elliott (1997) eleva em cerca de 5-6 % o volume mineral do esmalte em relação às medidas feitas com uma densidade de $3,15 \text{ g/cm}^3$. Considerando que o esmalte tem 6% (MACENA et al, 2014) de volume de água, o valor de 86,2% deixa um volume residual para matéria orgânica que é muito maior que aquele relatado por diversos laboratórios. Assim, 93 % mais 6 % resultam num volume residual de 1 % para matéria orgânica, sendo mais próximo da

realidade. Cuidado deve ser tomado ao se fazer comparações entre dados de diferentes fontes que usam densidades diferentes.

A seguir, todas as abordagens serão feitas com base no modelo de Elliott (1997). As dimensões dos lados a, b e c da apatita do esmalte são: $a=9,441 \text{ \AA}$; $b=9,441 \text{ \AA}$; $c=6,878 \text{ \AA}$ (YOUNG & MACKIE, 1980). O volume da célula unitária pode ser calculado usando recurso disponível na internet: <http://xray.tamu.edu/cell.html>. Para a apatita do esmalte, o cálculo resulta num volume de célula unitária de $530,93 \text{ \AA}^3$.

Para obter a densidade do mineral do esmalte, deve-se considerar a constante de unidade de massa atômica ($\text{amu} = 1,66 \times 10^{-24} \text{ g}$). A densidade pode ser calculada por:

O valor de densidade aproximado de $2,99 \text{ g/cm}^3$ pode ser usado para quantificar conteúdo mineral do esmalte.

$$(\text{massa total} \times \text{amu}) / \text{Volume} = 957,83 \times 1,66 \times 590,93 = 2,99475 \text{ g/cm}^3$$

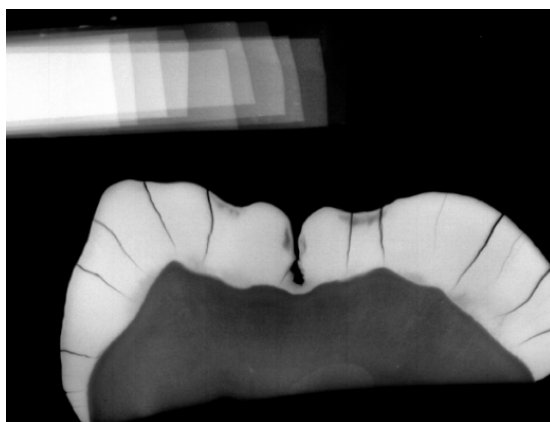
3 TIPOS DE RADIOMICROGRAFIA

3.1 PADRÃO DE ALUMÍNIO

Qualquer que seja a técnica de radiomicrografia (analógica ou digital), é importante ressaltar que um padrão de referencia de alumínio de alta pureza ($\geq 99\%$) deve ser posicionado sobre filme, adjacente às amostras, durante a exposição aos raios X. Esse padrão de alumínio (cunha de alumínio) normalmente é confeccionado com folhas de alumínio de espessura conhecida. Idealmente, cada folha deve ter aproximadamente $20 \mu\text{m}$ de espessura. A espessura deve ser mensurada com a melhor precisão possível ($<1 \mu\text{m}$). Não é aconselhável usar a espessura informada pelo fabricante sem antes conferir por um método independente. A cunha não é encontrada pronta no comércio, devendo ser confeccionada pelo usuário. Um conjunto de 10 folhas, cada uma com dimensões de 2 mm por 15 mm , é montado com as folhas empilhadas e desniveladas em uma das extremidades de modo a expor ao feixe de raios X diferentes

quantidades de folhas, com intervalo de uma folha (Figura 4). Se cada folha tiver 20 μm de espessura, uma faixa de espessura de 20 a 200 μm é obtida com a cunha de alumínio.

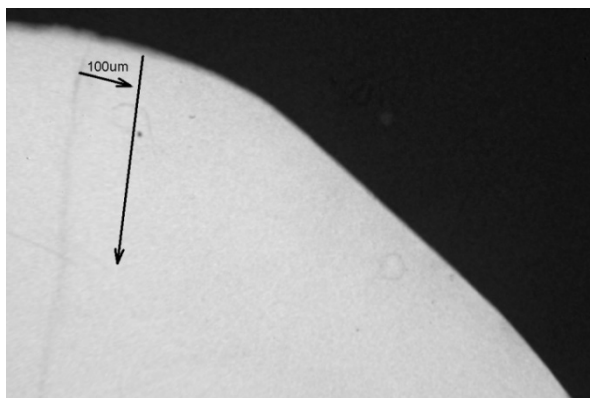
FIGURA 04: Padrão de alumínio (cunha de alumínio) com folhas de alumínio de espessura conhecida.



3.2 RADIOMICROGRAFIA ANALÓGICA

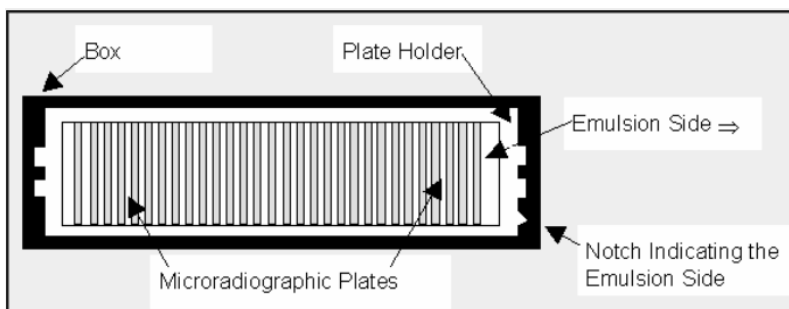
A radiomicrografia analógica (Figura 5) é feita a partir de filmes físicos de vidro com emulsão sensível aos Raios X em um dos lados. Os filmes de alta definição (AGHD plates) da empresa Microchrome Technologies (São José, Califórnia, Estados Unidos), com 2.000 linhas/mm, são comumente usados.

FIGURA 05: Fotomicrografia de radiomicrografia analógica do esmalte. Ao longo da seta longa ficam os pontos de interesse para medir a densidade óptica.



Os filmes vêm numa caixa preta, vedada, com proteção para iluminação externa. Sua manipulação deve ser feita em câmera escura desde o momento em que a caixa é aberta para retirar um filme novo para uso (Figura 6). Todas as etapas de manipulação do filme, desde a retirada da caixa, passando pela a inserção das amostras sobre o filme, a colocação do filme no equipamento de raios X, a exposição aos raios X, até a revelação e fixação, devem ser feitas em câmera escura, caso contrário o filme fica inútil. Na abertura da caixa, o usuário deve, com o toque dos dedos, identificar um seta na em uma das extremidades da caixa que indica o lado da emulsão sensível ao raios X. Este lado deve ser primeiro a ser atravessado pelo feixe de raios X. É sobre esse lado que as amostras são dispostas sobre o filme. Uma fina camada de plástico (ex.: folha transparente para retroprojeto) deve ser colocada sobre o lado sensível do filme para evitar que as amostras danifiquem a emulsão.

FIGURA 06: Vista superior da caixa contendo as placas de radiomicrografia. A seta do lado direito indica o lado que deve ser voltado para cima e sobre o qual deve-se colocar as amostras.



Os parâmetros de exposição de raios X variam dependendo do equipamento. Na nossa prática, usamos um PCBA Inspector (Ge, Alemanha), com ânodo de Tungstênio, operando a 40 keV e 0,25 mA. Um tempo de exposição de 25 minutos é usado. Logo em seguida, com a sala em estado de câmara escura, as amostras são retiradas de cima do filme e este é logo levado para processamento. Nessa etapa, são usados os seguintes tempos: 6 minutos no revelador, 1 minuto na água deionizada, 12 minutos no fixador e 20 minutos no banho final em água. Deve-se deixar o excesso de água escorrer do filme, deixando-o em posição inclinada numa bancada sobre papel absorvente. Deve-se evitar tocar com as digitais dos dedos a face sensível do filme. Após fixado e seco, o filme deve ser guardado em ambiente seco, à temperatura ambiente, em volta em folha de papel para limpeza de lentes.

As estruturas histológicas do esmalte são visualizadas através de um microscópio de luz transmitida, com o filme posicionado na platina do microscópio. A etapa de obtenção de fotomicrografias digitais é imprescindível para realizar a quantificação do conteúdo mineral.

3.2.1 DENSITOMETRIA ÓPTICA

As densidades ópticas do esmalte e do padrão de alumínio são avaliadas através de fotomicrografias digitais do filme de radiomicrografia já processado. As fotomicrografias obtidas em microscópio óptico de luz transmitida normalmente sofrem de iluminação heterogênea, que significa uma intensidade de luz maior no centro da imagem do que na periferia. Isto é um viés na quantificação da densidade óptica e deve ser corrigido. A correção chama-se de correção de campo plano (MURPHY, 2001).

As seguintes fotomicrografias digitais devem ser obtidas: uma com o campo escuro (imagem D; com a frente da lente fechada), uma com a amostra (imagem R) e uma do campo de visão iluminado sem a amostra (imagem F). Todas devem estar em tipo 8 bits preto e branco. Usando um software de análise de imagens (ImageJ, por exemplo), procede-se à correção de campo claro:

$$\text{Imagem corrigida} = (R-D)/(F-D)$$

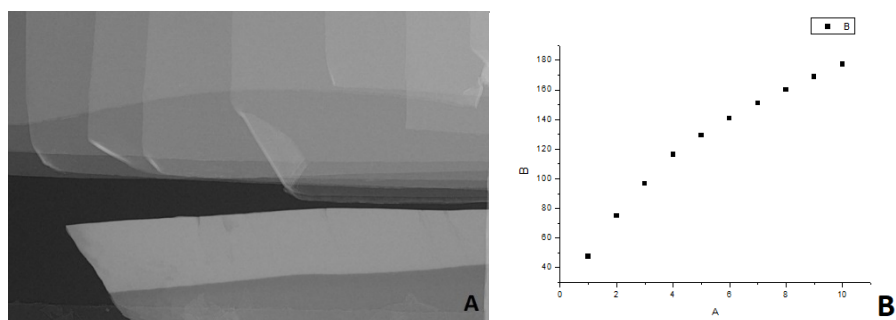
Este procedimento deve ser feito para todas as imagens R (da amostra e de cada folha de alumínio).

4 RADIOMICROGRAFIA DIGITAL

Fontes de raios X equipadas com câmeras fotográficas digitais sensíveis aos raios X podem ser usadas para radiomicrografia digital. Com a descontinuidade da fabricação dos filmes físicos, a tendência é que a radiomicrografia digital venha a substituir por completo a versão analógica. Os equipamentos de microtomografia digital são boas opções para radiomicrografia digital. A amostra não precisa ser varrida em 3D; basta obter uma imagem bidimensional. Normalmente não se usa nenhum filtro adicional ao filtro de Berílio que bloqueia os raios X moles. Na linguagem dos operadores de micro-CT, se diz que se está usando sem filtros. Uma imagem digital com pelo menos 1000 pixels por mm é recomendada. O campo de visão deve ser suficiente para caber a cunha

de alumínio e amostra de esmalte (Figura 7). Na técnica digital, são dispensados filme, revelador, fixador e microscópio.

FIGURA 07-A: Imagem de radiomicrografia digital feita em Micro-CT, em que se observa a amostra (fatia de elemento dentário, visualiza-se esmalte e dentina) e a cunha de alumínio. **B.** Gráfico correspondente à curva de calibração dos níveis de cinza da cunha de alumínio. Com um software adequado, a relação entre níveis de cinza e espessura de alumínio é calculada através de um polinômio de quarta ordem.



O pico de energia de 10 keV é emitido quando a fonte de raios X do Micro-CT Skyscan 1172 opera a 60 kV sem filtro de alumínio (apenas com o filtro de Berílio padrão).

5 ATENUAÇÃO DE RAIOS X PELO ESMALTE

5.1 COEFICIENTE DE ATENUAÇÃO DE MASSA (CAM) DA HIDROXIAPATITA DO ESMALTE

De posse do pico de energia de raios X emitido pelo equipamento, e após escolher a modelo da célula unitária do esmalte, o CAM do esmalte pode ser calculado através de:

$$CAM_{Esmalte} = \sum_{i=1}^9 Mol_i \times \frac{Massa_i}{MassaTotal} \times CAM_i$$

O CAM é o somatório dos produtos das frações de peso de cada elemento da célula unitária do mineral do esmalte por seus respectivos CAMs. No modelo de Elliot (1997) há nove elementos químicos. Os valores de CAM dos elementos da apatita do esmalte podem ser obtidos no sítio da internet do *National Institute of Standards and Technology* (NIST): <https://physics.nist.gov/PhysRefData/Xcom/html/xcom1.html>. Logo na página inicial, estão marcadas as opções (que devem ser mantidas) de identificar o material por elemento e a de inserir dados de energia manualmente. Após submeter o formulário, a página seguinte solicita informações sobre o elemento químico (número atômico ou símbolo), opções de gráfico (pode ser nenhum), unidades (cm^2/g), valor de energia adicional (em MeV), e os valores máximo e mínimo (deixar valores padrões) (Figura 8).

FIGURA 08: Páginas da internet do *National Institute of Standards and Technology* (NIST) com o banco de dados de CAM para elementos químicos. **A.** Página inicial. **B.** Segunda página com formulário para dados de elemento, tipo de gráfico, unidade e energia de pico.



Element/Compound/Mixture Selection

In this database, it is possible to obtain photon cross section data for a single element, compound, or mixture (a combination of elements and compounds). Please fill out the following information:

[Help](#)



A

Identify material by:

☒ Element
☐ Compound
☐ Mixture

Method of entering additional energies (optional)

☒ Enter additional energies by hand
☐ Additional energies from file (Note: Your browser must be file-upload compatible)

[Submit information](#) [Reset](#)

Fill out the form to select the data to be displayed:

[Help](#)

B

Select by: (only elements 1 - 100)

Atomic Number:

or

Symbol:

Graph options:

☒ Total Attenuation with Coherent Scattering
☐ Total Attenuation without Coherent Scattering
☐ Coherent Scattering
☐ Incoherent Scattering
☐ Photoelectric Absorption
☐ Pair Production in Nuclear Field
☐ Pair Production in Electron Field
☐ None

Options for output units:

☒ All quantities in cm^2/g
☐ All quantities in barns/atom
☐ Partial interaction coefficients in barns/atom and total attenuation coefficients in cm^2/g

Additional energies in MeV (optional) (up to 100 allowed)

Note: Energies must be between 0.01 - 100000 MeV (1 keV - 100 GeV) (only 4 significant figures will be used). One energy per line. Blank lines will be ignored.

0.01

☒ Include the standard grid

Energy Range:

Minimum: MeV

Maximum: MeV

[Submit information](#) [Reset](#)

Após submeter formulário mais uma vez, deve ser coletado o resultado de atenuação total com espalhamento coerente (em cm^2/g). A opção sem espalhamento coerente é para raios gama. Como exemplo, o CAM do Al para energia de 0,0221 MeV (22,1 keV) é de 2,589 cm^2/g (Figura 9).

FIGURA 09: Página do *National Institute of Standards and Technology* (NIST) com resultado (em destaque) do CAM do alumínio para a energia especificada.

Aluminum

Atomic Number : 13

To download data in spreadsheet (array) form, choose a delimiter and use the checkboxes in the table heading. After

Delimiter:

- ☒ space
☐ | (vertical bar)
☐ tab
☐ newline

Download data | Reset

Edge	(required) Photon Energy	Scattering		Photoelectric Absorption	Pair Production		Total Attenuation	
		Coherent	Incoherent		In Nuclear Field	In Electron Field	With Coherent Scattering	Without Coherent Scattering
	MeV	cm^2/g	cm^2/g	cm^2/g	cm^2/g	cm^2/g	cm^2/g	cm^2/g
13 K	1.000E-03	2.256E+00	1.427E-02	1.183E+03	0.000E+00	0.000E+00	1.185E+03	1.183E+03
	1.500E-03	2.040E+00	2.477E-02	4.002E+02	0.000E+00	0.000E+00	4.023E+02	4.002E+02
	1.560E-03	2.015E+00	2.594E-02	3.600E+02	0.000E+00	0.000E+00	3.621E+02	3.600E+02
	1.560E-03	2.015E+00	2.594E-02	3.955E+03	0.000E+00	0.000E+00	3.957E+03	3.955E+03
	2.000E-03	1.838E+00	3.375E-02	2.261E+03	0.000E+00	0.000E+00	2.263E+03	2.261E+03
	3.000E-03	1.523E+00	4.732E-02	7.865E+02	0.000E+00	0.000E+00	7.881E+02	7.866E+02
	4.000E-03	1.295E+00	5.810E-02	3.591E+02	0.000E+00	0.000E+00	3.605E+02	3.592E+02
	5.000E-03	1.116E+00	6.787E-02	1.922E+02	0.000E+00	0.000E+00	1.934E+02	1.923E+02
	6.000E-03	9.638E-01	7.696E-02	1.143E+02	0.000E+00	0.000E+00	1.153E+02	1.143E+02
	8.000E-03	7.229E-01	9.292E-02	4.950E+01	0.000E+00	0.000E+00	5.032E+01	4.960E+01
	1.000E-02	5.513E-01	1.058E-01	2.556E+01	0.000E+00	0.000E+00	2.621E+01	2.566E+01
	1.500E-02	3.136E-01	1.265E-01	7.515E+00	0.000E+00	0.000E+00	7.955E+00	7.641E+00
	2.000E-02	2.046E-01	1.371E-01	3.100E+00	0.000E+00	0.000E+00	3.442E+00	3.237E+00
	2.210E-02	1.759E-01	1.400E-01	2.273E+00	0.000E+00	0.000E+00	2.589E+00	2.413E+00
	3.000E-02	1.095E-01	1.464E-01	8.722E-01	0.000E+00	0.000E+00	1.128E+00	1.019E+00

A Tabela 4 ilustra os valores dos moles, massas, percentuais de massas e CAM para cada elemento da célula unitária do mineral do esmalte no modelo de Elliott (1997). Os valores são relativos a uma energia de 10 keV. Para calcular o CAM da apatita do esmalte, multiplica-se o percentual de peso de cada elemento (relativo à massa da apatita= 957,83 g) pelo seu CAM. No exemplo abaixo, com energia de 10 keV (0,010 MeV), o valor do CAM da apatita do esmalte foi 44,822 cm^2/g .

TABELA 04: Valores de CAM para componentes da apatita do esmalte para uma energia de 10 keV (0,01 MeV).

Elemento	Mol	massa	mol x massa	peso	CAM (cm ² /g)	CAM x peso
Ca	8,856	40,078	354,930768	0,3705	93,41	34,6136
Mg	0,088	24,305	2,13884	0,0022	21,06	0,04702
Na	0,292	22,99	6,71308	0,0070	15,57	0,10912
K	0,01	39,098	0,39098	0,0004	79,07	0,03227
P	5,592	30,974	173,206608	0,1808	40,36	7,29837
Cl	0,078	35,45	2,7651	0,0028	57,25	0,16527
O	25,561	15,999	408,950439	0,4269	5,953	2,54165
H	3,222	1,008	3,247776	0,0034	0,3854	0,00130
C	0,457	12,011	5,489027	0,0057	2,373	0,01359
Total		221,913	957,832618	1		44,8222
Al				1	26,21	26,21

Uma vez que uma amostra de alumínio puro é normalmente usada como padrão de referência, os dados para Al também são incluídos na Tabela 4.

5.2 COEFICIENTE DE ATENUAÇÃO LINEAR (LAC) DO ESMALTE

O parâmetro físico que quantifica a atenuação de raios X à medida que o feixe atravessa uma determinada espessura da amostra é chamado de Coeficiente de Atenuação Linear (CAL) de raios X, que é obtido por:

$$CAL_{\text{Esmalte}} = CAM_{\text{esmalte}} \times \text{densidade}_{\text{esmalte}}$$

O CAL da apatita do esmalte é o produto do CAM pela **densidade**. No caso do exemplo acima (para energia de 10 keV), seria :

$$\text{CAL} = \text{CAM} \times \text{densidade} = 48,8222 \text{ cm}^2/\text{g} \times 2,99475 \text{ g}/\text{cm}^3 = 134,231 \text{ cm}^{-1}$$

O CAL do alumínio seria:

$$\text{CAM} \times \text{densidade} = 26,21 \text{ cm}^2/\text{g} \times 2,699 \text{ g}/\text{cm}^3 = 70,741 \text{ cm}^{-1}$$

6 EQUAÇÃO PARA VOLUME MINERAL DO ESMALTE

Uma vez a radiomicrografia tenha sido obtida e o CAL do esmalte e do alumínio tenham sido calculados, o conteúdo mineral do esmalte pode ser quantificado. Quando se trabalha com cortes histológicos por desgaste do esmalte, se faz uma quantificação do volume mineral. A medida informa qual o proporção de mineral num determinado volume de esmalte numa localização histológica bem definida do corte histológico. A unidade não é cm^3 , mas sim porcentagem. O volume mineral do esmalte é medido usando níveis de cinza de uma área de $15 \mu\text{m} \times 15 \mu\text{m}$ (correspondendo a 3×3 primas) na superfície da amostra de esmalte e pode ser calculado usando a equação de Angmar (ANGMAR et al.,1963):

$$V = \frac{\mu_{AL} \times t_{AL}}{\mu_M \times t_S} \times 100$$

Onde μ_{AL} e μ_M são os CALs (cm^{-1}) do alumínio e da apatita do esmalte, respectivamente. E t_S e t_{AL} são a espessuras (em μm) da amostra de esmalte no ponto de medida e a espessura de alumínio necessária para se obter os mesmos níveis de cinza do ponto do esmalte em análise.

A medição da espessura do esmalte deve ser feita com um erro $< 1 \mu\text{m}$, para minimizar a incerteza do volume mineral. Tal nível de precisão, normalmente se usa um microscópio óptico. A amostra é cortada ao longo da camada de esmalte, aplicando uma navalha de metal no corte histológico por desgaste, perpendicular à superfície do esmalte, adjacente (~ 50 a 100 mm de distância) aos locais de interesse para quantificar o volume mineral. O lado exposto pelo corte é posicionado voltado para a

objetiva, na platina de um microscópio óptico. Uma objetiva de 20X com abertura numérica de 0,5 oferece uma resolução de $0,7 \frac{1}{4} \mu\text{m}$ com uma luz de comprimento de onda de 550 nm, sendo razoável para a medição de espessura do esmalte. A medição pode ser feita através de fotomicrografia ou diretamente através de uma ocular equipada com retícula. Comumente, a espessura varia da superfície ao limite amelo-dentinário, tanto em esmalte normal como em esmalte hipomineralizado (cariado, fluorótico, etc). Não se deve esperar um valor único ao longo de toda a camada de esmalte. A figura 10 mostra a face cortada de uma amostra de esmalte, revelando a variação de espessura da superfície em direção ao esmalte interno. Exemplos de medidas feitas numa amostra de esmalte dental decíduo humano são mostrados na Tabela 5.

FIGURA 10: Fotomicrografia de uma face do esmalte que foi exposta após aplicação de navalha de aço. Seta indica a superfície original do esmalte. A fatia de esmalte é posicionada na lateral de uma lâmina histológica, girada em 90° em relação à posição convencional, sendo mantida em posição pela tensão superficial exercida por uma camada de água.

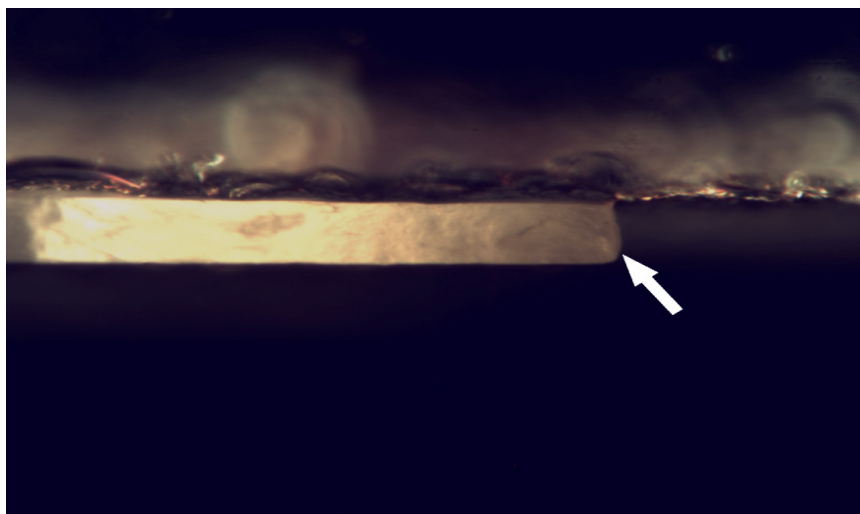


TABELA 05: Quantificação do volume mineral do esmalte decíduo (densidade de $2,99 \text{ g/cm}^3$), levando em consideração a distância da superfície do esmalte e a espessura para cada ponto específico.

Distância da superfície (μm)	Espessura (μm)	Volume Mineral do esmalte (%)
286	100	84,87
326	99	77,49
366	97	82,48
406	95	82,45
446	95	80,38

7 RADIOMICROGRAFIA COM MICROTOMÓGRAFO TRIDIMENSIONAL (MICRO-CT)

A radiomicrografia com microCT pode ser feita com cortes histológicos (fatias finas) ou no dente íntegro (ou fatia grossa). Cada tipo de amostra (fatia ou dente inteiro) requer um filtro e um kV próprio, resultando num pico de energia diferente emitido pela fonte de raios X. O pico de energia de raios X afeta o CAM e o CAL.

As equações para quantificar o conteúdo mineral e as unidades também diferem. No caso de cortes histológicos, segue-se a metodologia descrita acima. Para dentes inteiros, ou segmentos espessos (hemisseção, por exemplo), a metodologia segue abaixo.

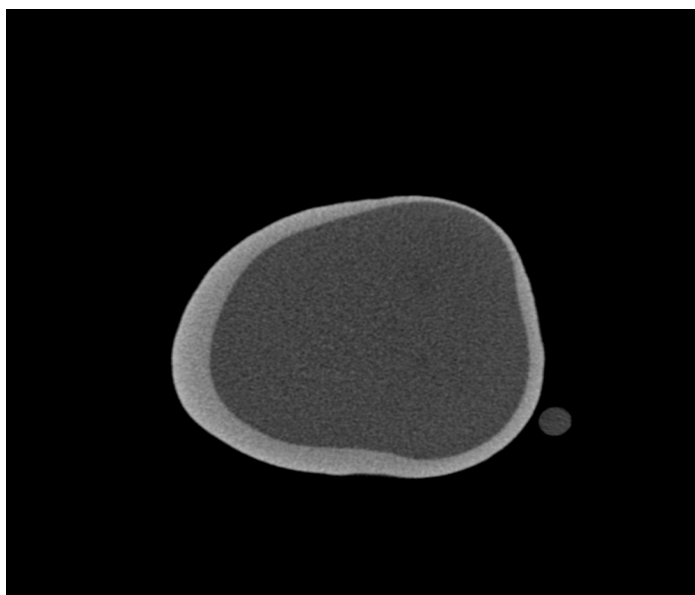
Num tipo de microCt que usamos (Skyscan 1172, Bruker, Bélgica), aplicamos os seguintes parâmetros:

- filtro Al-Cu;
- 100 kV (pico de energia = 59 keV);
- janela de Berílio (espessura de 0,8 mm).

O conteúdo mineral é quantificado em termos de concentração mineral e a unidade é em g/cm^3 . Isto não significa que será feita medida da densidade da célula unitária da apatita do esmalte. Aqui é quantificada uma aproximação da densidade do esmalte como um todo. Se o tecido tiver um volume de mineral de 100%, a concentração mineral experimental deve ser $\sim 2,99 \text{ g}/\text{cm}^3$. Com valores menores de volume mineral, a concentração mineral diminui. A relação entre a concentração mineral quantificada com esta técnica e o volume mineral não é muito precisa. Assim, se a medida de volume mineral for realmente necessária, deve-se escolher pela radiomicrografia com cortes histológicos finos.

No caso de amostras espessas, deve-se usar um fio de alumínio, espessura de cerca de 1 mm e com alta pureza, como padrão de referencia. A figura 11 mostra um corte transversal da coroa dental com o fio de Al ao lado.

FIGURA 11: Corte transversal microtomográfico da coroa dental com o fio de Al ao lado.



O conteúdo mineral é quantificado em termo de g.cm^{-3} , usando a equação de (WONG et al.,2004):

$$Ce = \frac{\mu_{\min} \times \mu_{Al(\text{teor})}}{\mu_{Al} \times CAM_{\min(\text{teor})}}$$

Onde $m_{Al(\text{teor})}$ é o CAL teórico (isto é, obtido com base nos valores de CAM publicados no banco de dados de referência, NIST, e na densidade) do alumínio. $CAM_{\min}$ é o CAM teórico do mineral do esmalte. E $m_{\min}$ e m_{Al} são os níveis de densidade óptica (níveis de cinza) do esmalte (numa região histológica de interesse) e do fio de Al. Para o cálculo do $CAM_{\min}$, recomenda-se usar o modelo de Elliot (1997) para a célula unitária da apatita do esmalte.

Referências

- ALMEIDA, G.R.C.; SARAIVA, M.C.P.; BARBOSA JR., F.; KRUGD, F.J. CURY, J.A.; SOUSA, M.L.R.; BUZALAF, M.A.R.; GERLACH, R.F. Lead contents in the surface enamel of deciduous teeth sampled in vivo from children in uncontaminated and in lead-contaminated areas. **Environmental Research**, v.104 , n.3, p.337–345, 2007.
- ANGMAR, B.; CARLSTRÖM, D.; GLAS, J. Studies on the ultrastructure of dental enamel. IV. The mineralization of normal human enamel. **Journal of Ultrasructure Research**, v.8, n.1-2, p.12-23, Feb., 1963.
- BOONE, J.M.; FEWELL, T.R.; JENNINGS, R.J. Molybdenum, rhodium, and tungsten anode spectral models using interpolating polynomials with application to mammography. **Med Phys**, v.24, n12, p.1863-74, Dec., 1997.
- ELLIOTT, J.C. Structure, crystal chemistry and density of enamel apatites. **Dental Enamel** (ed. by D. Chadwick & G. Cardew), Ciba Foundation Symposium v. 205, p. 54–72, 1997.

GAUTIERI, A.; VESENTINI, S.; REDAELLI, A; BUEHLER, M.J. Hierarchical Structure and Nanomechanics of Collagen Microfibrils from the Atomistic Scale Up. **Nano Lett.**, v.11, n.2, p.757-766, 2011.

MACENA, M.S.A; LEITE, M.L.A.S.; GOUVEIA, C.L.; LIMA, T.A.S; ATHAYDE, P.A.A.; SOUSA, F.B. A comparative study on component volumes from outer to inner dental enamel in relation to enamel tufts. **Archives of Oral Biology**, v.59, p.568-577, 2014.

MURPHY, D.B. **Fundamentals of Light Microscopy and Digital Imaging**. Wiley-Liss, New York, p.43–59, 2001.

OMOKANWAYE, T.; WILSON, O.; IRAVANI, H.; KARIYAWASAM, P. **Extraction and Characterization of a Soluble Chicken Bone Collagen**. In: Herold K.E., Vossoughi J., Bentley W.E. (eds) 26th Southern Biomedical Engineering Conference SBEC, College Park, Maryland, USA, v. 32, p.520-523, 2010.

ROBINSON, C.; KIRKHAM, J.; BROOKES, S.J; ROGER, C.S. **Chemistry of mature enamel**. In: Robinson C, Kirkham J, Shore R, editors. Dental enamel: formation to destruction. 1st ed. London: CRC Press, p. 167–88, 1995.

ROBINSON, C.; WEATHERELL, J.A.; HALLSWORTH, A.S. Variations in the composition of dental enamel within ground sections. **Caries Research**, v.5, p.44-50, 1971.

SOUZA-GUERRA, C., BARROSO, R.C.; ALMEIDA, A.P; PEIXOTO, I.T.A.; MOREIRA, S.; SOUSA, F.B.; GERLACH, R.F. Anatomical variations in primary teeth microelementos with known differences in lead contente by micro-Synchrotron Radiation X-Ray Fluorescence (μ -SRXRF) – A preliminar study. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v.28, n.2, p.186–193, 2014.

WEATHERELL, J. A.; ROBINSON, C.; HALLSWORTH, A.S.
Variations in the Chemical Composition of Human Enamel. **J Dent Res Supplement**, v.53, n.2, p.180-192, 1974.

WEATHERELL, J.A., ROBINSON, C. **The Inorganic Composition of Teeth**, in ZIPKIN, I.ed: Biological Mineralization, New York: John Wiley, p 43-74, 1973.

WEATHERELL, J.A.; HALLSWORTH, A.S.; ROBINSON, C.:
The Effect of Tooth Wear on the Distribution of Fluoride in the Enamel Surface of Human Teeth, **Arch Oral Biol**, v.18, n.9 1175-1189, 1973.

WONG, F.S.L.; ANDERSON, P.; FAN, H.; DAVIS, G.R. X-ray microtomographic study of mineral concentration distribution in deciduous enamel. **Arch Oral Biol**, v.49, n.12 ,p.937-944, 2004.
YOUNG, R.A.; MACKIE, P.E. Crystallography of human tooth enamel: Initial structure refinement. **Materials Research Bulletin**, v.15, n.1, p.17-29, 1980.

Capítulo 5

METODOLOGIAS APLICADAS PARA SIMULAR A CORROSÃO *IN VITRO* DAS ESTRUTURAS DENTAIS E DE MATERIAIS ODONTOLÓGICOS

Fabiola Galbiatti de Carvalho

Hugo Lemes Carlo

Alana Gail Lopes

Taís Chaves Magalhães

Introdução

O desgaste dental é definido como a perda de estrutura dos tecidos por meio da corrosão, atrição e abrasão (LUSSI; CARVALHO, 2014). Dentre eles, a corrosão é um processo químico de dissolução ácida, sem envolvimento bacteriano, resultando na desmineralização da estrutura dental. O mecanismo da corrosão na cavidade bucal ocorre por meio da ação de ácidos de origem extrínseca (especialmente por exposição ácida pela dieta), ação bioquímica de ácidos intrínsecos (principalmente por problemas gastroesofágicos) e de enzimas proteolíticas que causam degradação molecular do tecido (BUZALAF, CHARONE, TJÄDERHANE, 2015; LUSSE; CARVALHO, 2014). O ataque ácido ocasiona a perda irreversível do tecido dental, o qual é acompanhado pelo amolecimento progressivo da superfície. A área amolecida é mais susceptível as forças mecânicas da abrasão, geralmente ocasionada pela escovação com dentífrícios, causando assim maior perda de estrutura. Os processos químicos e mecânicos de desgaste dental podem ocorrer individualmente ou em conjunto, de modo que os efeitos da corrosão dental são frequentemente dominantes (MAGALHÃES et al., 2009).

Para simular o processo de desgaste por corrosão e/ou abrasão nas estruturas dentais, estudos *in vitro* e em *in situ* são conduzidos. Porém, não existe um protocolo padronizado para simular a corrosão dental *in vitro*, existindo grande variabilidade entre os estudos quanto as etapas metodológicas. Sendo assim, o presente capítulo abrangerá parâmetros metodológicos e métodos de avaliação *in vitro* que podem ser planejados para os experimentos de corrosão na cavidade bucal.

Ácidos extrínsecos relacionados à corrosão dental

Os parâmetros físico-químicos das substâncias ácidas da dieta possuem grande importância no desenvolvimento do desgaste corrosivo, por modularem a dissolução mineral das estruturas dentais. Estes parâmetros são investigados e determinam o potencial corrosivo das substâncias, como: potencial de hidrogênio (pH); acidez titulável (quantidade de base necessária para que a solução retorne ao pH neutro, determinando a disponibilidade de íons hidrogênio - H^+ para interagir com a superfície dental); capacidade de tamponamento (capacidade de uma solução em manter seu valor de pH, está relacionada ao ácido não dissociado da bebida); grau de saturação em relação ao conteúdo mineral do dente (determinado pela concentração de íons cálcio, fosfato e fluoreto, bem como pelo valor de pH da bebida ácida), viscosidade (relacionada a capacidade de molhamento da substância à superfície dental) e presença de inibidores da corrosão (como polímeros e proteínas)(BARBOUR; LUSSI, 2014; CARVALHO et al., 2017).

Para simular a corrosão dental os estudos utilizam refrigerantes, sucos, bebidas esportivas e energéticas, chás, vinhos, entre outros (CARVALHO et al., 2017; MEDEIROS et al., 2014; MEDEIROS et al., 2018; LUTOVAC et al., 2017). Porém, o ácido cítrico é uma das substâncias mais utilizadas por ser parte da composição da grande maioria das bebidas e frutas ácidas (CARVALHO; LUSSI, 2015). O potencial corrosivo do ácido cítrico é relacionado a sua capacidade de liberar íons

H⁺ e a sua ação quelante. Este ácido libera até três íons H⁺, a partir de cada molécula, pela sua dissociação em água, os quais são capazes de atacar diretamente os íons carbonato e/ou fosfato da estrutura dental, causando a desmineralização. Conforme o pH aumenta e o meio torna-se básico, o citrato se liga ao íon cálcio (Ca⁺²), formando um complexo e removendo-o da estrutura cristalina do mineral, o que é chamado de ação quelante. Quanto mais forte a ligação do citrato ao Ca⁺², maiores serão a quantidade de íons Ca⁺² removidos e a degradação química do dente (BARBOUR; LUSSI, 2014).

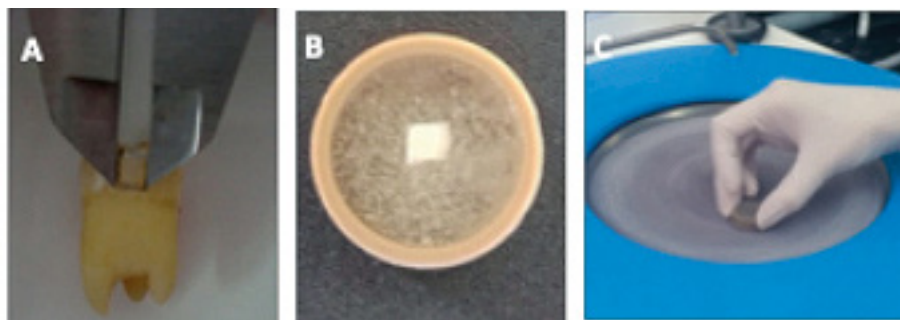
Com relação à simulação de corrosão *in vitro* por origem intrínseca, na maioria dos estudos o ácido hidrocloreídrico (ácido do suco gástrico) é utilizado em concentrações de 0,01 a 0,1 molar (TAIRA et al., 2018).

Parâmetros metodológicos para simular a corrosão dental *in vitro*

O tipo, a concentração e o tempo de exposição da solução ácida aos dentes/materiais odontológicos, além dos outros parâmetros químicos anteriormente relatados, são fundamentais para o efeito corrosivo e/ou abrasivo das substâncias às estruturas investigadas.

Os experimentos de corrosão geralmente utilizam dentes extraídos para confecção de amostras de esmalte e dentina, as quais são desgastadas para obtenção de superfícies planas e polidas (**Figura 1**). Tal fato se deve à maioria dos métodos de avaliação de corrosão necessitarem de superfícies polidas para garantir uma análise precisa. De acordo com Attin e Wegehaupt (2014), esse fato não seria desfavorável para os estudos *in vitro*, pois, clinicamente, as superfícies de esmalte ou dentina mais externas são continuamente degradadas e removidas, devido aos ataques ácidos, deixando as superfícies polidas.

FIGURA 01: Preparo de amostra de esmalte para experimento de corrosão. **A.** Terceiro molar com o bloco 2 x 2 mm desenhado na superfície proximal para o corte com disco diamantado; **B.** Amostra com bloco de esmalte embutido em resina acrílica e tubo de PVC; **C.** Polimento da superfície do esmalte realizada em politriz com água e lixas de carbeto de silício de granulação crescente (# 400, 600, 1200, 2000 e suspensão de alumina 1 μ m).



A formação de película adquirida nas estruturas dentais antes do desafio ácido tem sido indicada, podendo ser coletada *in vivo* (mais indicado) ou realizada com saliva artificial. Sua importância se relaciona a prevenção fisiológica da corrosão, pois a película adquirida é considerada uma camada semipermeável de biopolímeros salivares ligados entre si, a qual é dissolvida continuamente durante a exposição ácida. Essa camada não pode prevenir o contato direto das substâncias ácidas ao dente, mas pode reduzir ou retardar a interação imediata entre os ácidos e as estruturas dentais. Além disso, as proteínas adsorvidas podem agir como um tampão pela união aos íons H^+ (HANNIG; HANNIG, 2014; MUTAHAR et al., 2017). Geralmente, a saliva estimulada é coletada de adultos saudáveis (sem alimentação por 1h antes da coleta) para imersão das amostras por 2 h antes do início da corrosão (CARVALHO et al., 2017).

O tipo de ácido e seu tempo de exposição às estruturas dentais variam amplamente na literatura, bem como a utilização de solução remineralizante (RE) ou saliva entre os ciclos ácidos (ciclagem).

Geralmente, refrigerantes a base de cola e ácido cítrico (de 0,3% a 1%) são os mais utilizados (DE CARVALHO et al., 2013; MEDEIROS et al., 2014; MEDEIROS et al., 2018; MUTAHAR et al., 2017; MYLONAS et al., 2018). O tempo de exposição e de ciclagem variam de acordo com a necessidade em realizar uma corrosão inicial (curta duração) ou mais agressiva (longa duração) às estruturas/materiais. Estudos *in vitro* mostraram que a corrosão inicial (tempo de exposição ácida menor que 5 min) ao esmalte pode causar amolecimento e desgaste na superfície entre 0,2 a 5 mm de profundidade, aumentando a rugosidade e diminuindo a dureza de superfície do esmalte (MYLONAS et al., 2018). O ideal é que o tempo de exposição do ácido à estrutura dental simule aquele em que a bebida permanecerá na cavidade bucal. Na literatura este tempo varia de segundos a minutos, sendo contabilizado por meio da quantidade de exposição ácida ao dia (uma ou várias exposições) (CARVALHO et al., 2017; MEDEIROS et al., 2018), variando de 5 s a 2 h para 1 ciclo ácido, ou até mais de 5 ciclos diários com tempo de exposição variados (MYLONAS et al., 2018). Além disso, caso agentes remineralizantes (fluoreto e agentes contendo cálcio e fosfato) sejam investigados como produtos de proteção às estruturas dentais frente ao desafio corrosivo, o momento de aplicação dos mesmos deve ser planejado (se ocorrerá antes ou depois dos ciclos ácidos).

A associação da corrosão à abrasão por escovação na avaliação do desgaste dental é encorajada *in vitro* para mimetizar a situação clínica, de modo que a escovação deve ser combinada ao uso de dentifrícios para que o desgaste dental seja relevante (WIEGLAND; SCHLUETER, 2014). A abrasão por escovação pode ser realizada com escova elétrica ou em máquina de escovação simulada, geralmente utilizando-se, por amostra: dentifrício diluído em água destilada (3:1), força de escovação de 150 a 200 g, tempo de escovação de 10 a 20 s, totalizando em torno de 45 ciclos ou mais, de acordo com o planejamento do estudo (LIPPERT et al., 2017; SCARAMUCCI et al., 2016).

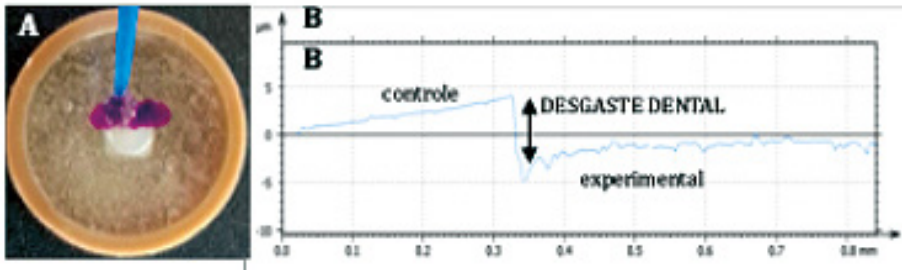
Métodos de avaliação da corrosão dental e de materiais odontológicos

Vários métodos são utilizados para avaliar as alterações causadas nas estruturas dentais e em materiais odontológicos por meio da corrosão e abrasão. A análise de microdureza superficial é um dos métodos mais utilizados para determinar as mudanças de dureza e a perda de estrutura dental na superfície (ATTIN; WEGEHAUPT, 2014; STEIGER-RONAY et al., 2018). A profundidade de indentação da ponta de diamante (Knoop ou Vickers) do microdurômetro, com aplicação de uma certa quantidade de carga por tempo específico de penetração, pode analisar a mudança de estrutura ocorrida pela corrosão. Geralmente, a mudança de dureza de superfície da estrutura/material é obtida pela análise de dureza antes e depois da corrosão e/ou abrasão; ou mantendo-se uma parte da amostra como controle (sem exposição ácida), obtendo-se a mudança de dureza causada pela corrosão por meio da comparação dos valores entre o lado exposto à corrosão e o controle (**Figura 2A**). A seguinte fórmula pode ser aplicada para obter a porcentagem de alteração dos valores de dureza (%) em uma superfície após o experimento de corrosão (MEDEIROS et al., 2018):

$$\% = 100 \times (Dureza_{\text{pós-corrosão}} - Dureza_{\text{pré-corrosão}} / Dureza_{\text{pré-corrosão}})$$

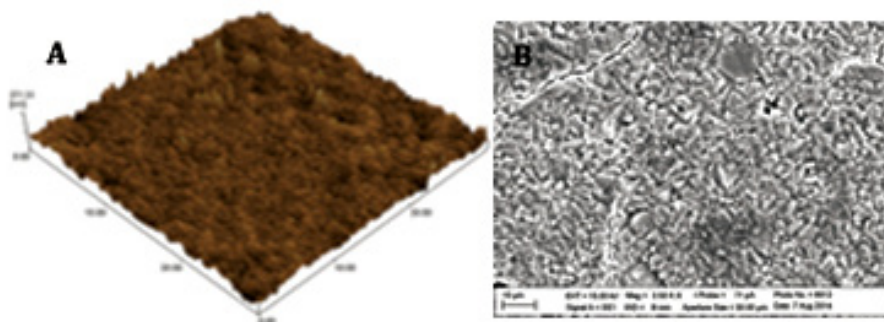
A análise da topografia de superfície também é considerada um método de análise da perda de estrutura ocasionada pela corrosão e abrasão, a qual pode ser realizada em perfilômetro óptico e microscópio de força atômica (AFM). O escaneamento da superfície da amostra com o perfilômetro gera um perfil gráfico da parte controle (não exposta ao desafio ácido) e da parte experimental (exposta ao desafio), de modo a permitir o cálculo da perda de estrutura (desgaste dental ou do material) por meio da diferença entre as medidas controle e experimental (**Figura 2B**).

FIGURA 02 -A: Amostra de bloco de esmalte embutido em resina acrílica com metade da amostra sendo isolada com esmalte unha (controle) e metade exposta para ser submetida aos ciclos ácidos (experimental). **B.** Gráfico obtido em perfilômetro óptico do bloco de esmalte submetido aos ciclos de corrosão com ácido cítrico 1%, mostrando o desgaste dental obtido pela diferença entre os perfis da parte controle e experimental (seta).



O efeito da corrosão na superfície dental e de materiais odontológicos também pode ser analisado por comparação do perfil topográfico da superfície antes e após os ciclos de corrosão/abrasão em perfilômetro óptico ou AFM (**Figura 3A**), bem como pela análise da morfologia da superfície em microscópio eletrônico de varredura (MEV) (**Figura 3B**). A rugosidade de superfície após exposição ácida e/ou abrasão pode ser quantificada por meio de análise das amostras em rugosímetro ou perfilômetro óptico, obtendo-se valores absolutos de rugosidade (em micrometros ou nanômetros). Para aprofundar o conhecimento sobre os métodos de avaliação da corrosão dental, os autores sugerem a leitura do trabalho de Attin e Wegehaupt (2014).

FIGURA 03: Imagens de AFM e MEV obtidos em experimentos de corrosão. **A.** Perfil da superfície de esmalte dental obtido em AFM após 4 ciclos diários de 5 min de refrigerante a base de cola, mostrando topografia irregular e porosa da estrutura. **B.** Superfície de cimento de ionômero de vidro convencional exposto aos ciclos ácidos com refrigerante a base de cola, mostrando o aspecto rugoso com desgaste da matriz de sílica e protrusão das partículas de carga.



Conclusão

Como não existe protocolo padronizado de corrosão dental *in vitro*, os parâmetros discutidos para desenvolver um modelo de corrosão e abrasão dental (tipo e concentração de ácido, tempo de exposição ácida, número de ciclos ácidos, número de ciclos e tempo de abrasão), bem como os métodos de avaliação a serem realizados devem ser investigados na literatura para planejamento e delineamento criterioso da metodologia do estudo, de acordo com os objetivos pretendidos.

Referências

ATTIN, T.; WEGEHYAUP, F.J. Methods for assessment of dental erosion. **Monographs in Oral Science**, v.25, p. 123-142, Jun. 2014.

BARBOUR, M.E.; LUSSI, A. Erosion in relation to nutrition and the environment. **Monographs in Oral Science**, v.25, p.143-154, Jun. 2014.

BUZALAF, M.A.; CHARONE, S.; TJÄDERHANE, L. Role of host-derived proteinases in dentine caries and erosion. **Caries Research**, v.49, n.1, p.30-37, Apr. 2015.

CARVALHO, T.S. et al. Erosive effect of different dietary substances on deciduous and permanent teeth. **Clinical Oral Investigations**, v.21, n.5, p.1519-1526, Jun. 2017.

CARVALHO, T.S.; LUSSI, A. Susceptibility of enamel to initial erosion in relation to tooth type, tooth surface and enamel depth. **Caries Research**, v.49, n.2, p.109-115, Jan. 2015.

DE CARVALHO, F.G. et al. Protective effect of calcium nanophosphate and CPP-ACP agents on enamel erosion. **Brazilian Oral Research**, v.27, n.6, p.463-470, Dec. 2013.

HANNIG, M.; HANNIG, C. The pellicle and erosion. **Monographs in Oral Science**, v.25, p.206-214, Jun. 2014.

LIPPERT, F. et al. Interaction between toothpaste abrasivity and toothbrush filament stiffness on the development of erosive/abrasive lesions in vitro. **International Dental Journal**, v.67, n.6, p.344-350, Dec. 2017.

LUSSI, A.; CARVALHO, T.S. Erosive tooth wear: a multifactorial condition of growing concern and increasing knowledge. **Monographs in Oral Science**, v.25, p.1-15, Jun. 2014.

LUTOVAC, M. et al. Testing the effect of aggressive beverage on the damage of enamel structure. **Macedonian Journal of Medical Sciences**, v.5, n.7, p.987-993, Dec. 2017.

MAGALHÃES, A.C. et al. Insights into preventive measures for dental erosion. **Journal of Applied Oral Science**, Bauru, v.17, n.2, p.75-86, Apr. 2009.

MEDEIROS, I.C. et al. In vitro effect of calcium nanophosphate and high-concentrated fluoride agents on enamel erosion: an AFM study. **International Journal of Paediatric Dentistry**, v.24, n.3, p.168-174, May. 2014.

MEDEIROS, M.I.D. et al. TiF_4 varnish protects the retention of brackets to enamel after in vitro mild erosive challenge. **Journal of Applied Oral Science**, Bauru, v.26, n.0, p. e20170222, May. 2018.

MUTAHAR, M. et al. The presence of acquired enamel pellicle changes acid-induced erosion from dissolution to a softening process. **Scientific Reports**, v.7, n.1, p.10920, Sep. 2017.

MYLONAS, P. et al. In vitro evaluation of the early erosive lesion in polished and natural human enamel. **Dental Materials**, v.34, n.9, p.1391-1400, Sep. 2018.

SCARAMUCCI, T. et al. Influence of toothbrushing on the antierosive effect of film-forming agents. **Caries Research**, v.50, n.2, p.104-110, Mar. 2016.

STEIGER-RONAY, V. et al. Comparison of profilometric and microindentation analyses for determining the impact of saliva on the abrasion of initially eroded enamel. **Caries Research**, v.53, n.1, p.33-40, Jun. 2018.

TAIRA, E.A. et al. Changes in the proteomic profile of acquired enamel pellicles as a function of their time of formation and hydrochloric acid exposure. **Caries Research**, v.52, n.5, p.367-377, Mar. 2018.

WIEGAND, A.; SCHLUETER, N. The role of oral hygiene: does toothbrushing harm? **Monographs in Oral Science**, v.25, p. 215-259, Jun. 2014.

Capítulo 6

MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DA DUREZA E RUGOSIDADE SUPERFICIAL DE BIOMATERIAIS ODONTOLÓGICOS

Sara Brito da Silva

André Ulisses Dantas Batista

Eliton Souto de Medeiros

Paulo Rogério Ferreti Bonan

Introdução

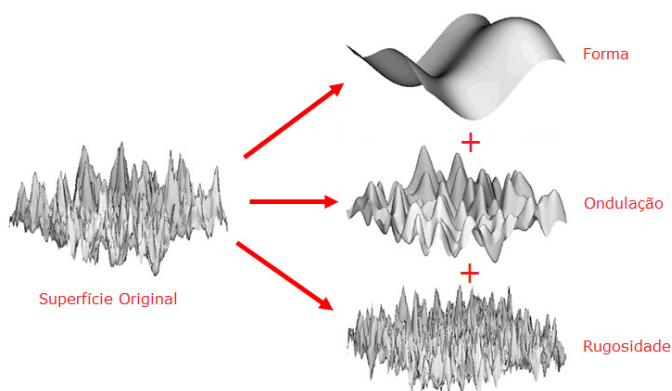
Diversas propriedades de superfície podem influenciar na performance clínica de materiais odontológicos, motivo pelos quais a literatura odontológica é abundante na sua avaliação. Dentre as propriedades de superfície existentes, duas foram selecionadas para compor esse capítulo, tendo em vista a experiência dos autores em sua avaliação laboratorial.

Dessa forma, as propriedades de **rugosidade superficial** e **dureza** serão definidas e os principais métodos de sua caracterização apresentados, para auxiliar o pesquisador na determinação e escolha dos parâmetros mais adequados para o material que se propõe a testar.

a) Rugosidade Superficial

Uma superfície, ao contrário do que costumamos enxergar a olho nu, é na verdade algo complexo que pode ser constituído por três elementos: **forma**, **ondulação** e **rugosidade** propriamente dita, existindo em combinação (Figura 1).

FIGURA 01: Representação dos componentes de uma superfície - Superfície original e seu desmembramento em forma, ondulação e rugosidade. Adaptado de JOSSO et al, 2002.



A **forma** tende a ser o componente mais grosseiro e mais facilmente observado. Por exemplo, uma peça e/ou material pode apresentar-se em um formato retangular, esférico, plano e assim por diante. No entanto, ao nos aproximarmos desta superfície observaremos que ela também possui **ondulações** e estas, por sua vez, são constituídas de estruturas ainda menores que representarão a **rugosidade** da peça.

O conceito de rugosidade está presente em diversas áreas, mas, basicamente pode ser definido como um conjunto de desvios microgeométricos, caracterizado por pequenas saliências e reentrâncias presentes em uma superfície. Essas pequenas irregularidades podem decorrer tanto do processo de fabricação, quanto do próprio desgaste do material. Ou seja, por mais plano e polido que um determinado corpo se apresente ainda assim, o mesmo exibirá picos e vales que caracterizam a rugosidade.

O estudo dessa propriedade tem se tornado de grande importância e sendo cada vez mais aplicado. Isso porque o acabamento superficial e a rugosidade são capazes de influenciarem em diversas outras características de um material, como por exemplo:

- Resistência a corrosão, ao desgaste e a fadiga;
- Coeficiente de atrito;
- Resistência oferecida ao escoamento de fluidos;
- Qualidade da aderência de revestimentos;
- Aparência e estética.

Além disso, ao se trabalhar com materiais para fins de uso odontológico, certos padrões de rugosidade criam nichos propícios para adesão e multiplicação de microrganismos e formam áreas inacessíveis para higienização. Dessa forma, dentre várias outras propriedades de superfície que podem influenciar na adesão microbiana, a rugosidade é frequente estudada e avaliada devido ao potencial de retenção de biofilme, manchamento e causar desconforto ao paciente (GUNGOR; GUNDOGDU; YESIL DUYMUS, 2014; SONG; KOO; REN, 2015).

Como forma de amenizar tais desvantagens, os processos de acabamento e polimento são fundamentais para obterem-se superfícies lisas, polidas e adequadas. A presença de rugosidades além de estar ligada com o fator bacteriano pode afetar também a reflexão de luz e o brilho, implicando na perda do aspecto natural das restaurações, provocando o envelhecimento das mesmas e causando perdas estéticas.

• **Sistemas de medição de rugosidade**

Atualmente, contamos basicamente com dois sistemas de medição de rugosidade: o da linha média (M) e o sistema da envolvente (E). Entre os dois, o sistema da linha média, no qual todas as grandezas são baseadas em uma linha de referência, é amplamente o mais utilizado, além de ser adotado e recomendado no Brasil pelas normas ABNT NBR 6405-1985, NBR 8404/1988 e NBR ISO 4287/2002. Além do Brasil, Estados Unidos, Inglaterra, Japão e Rússia adotam o sistema M. A Alemanha e Itália optam pelo sistema E, enquanto a França utiliza ambos.

- **Medições horizontais da rugosidade** – Trabalham com parâmetros de espaçamento determinados somente pelo espaçamento as irregularidades ao longo da superfície. **Exemplo: RSm.**
 - **Medições proporcionais da rugosidade**- Levam em consideração parâmetros híbridos que são determinados tanto pela amplitude quanto pelo espaçamento, ambos em combinação. **Exemplo Rdq.**
-
- **Avaliação da Rugosidade e Filtros**

A avaliação dessa propriedade é feita por meio de um perfil de rugosidade. Tal perfil é obtido após a separação do desvio de forma, textura e ondulações do perfil efetivo, com esse procedimento sendo realizado através do uso de filtros.

O uso desses artifícios nesse tipo de análise é muito importante, já que a má aplicação dos mesmos pode levar a uma interpretação totalmente incorreta dos parâmetros da superfície, podendo gerar dados que não corresponderiam a real situação da amostra.

A filtragem é usada na análise de textura da superfície para separar os recursos de forma, ondulação e rugosidade, de modo que os mesmos possam ser medidos de forma independente um do outro. Desta maneira, uma frequência espacial é escolhida como o limite entre ondulação e rugosidade. Isto é conhecido como “*Cut-off*” ou “*Lambda C*” (λ_c). O comprimento de amostragem ou *Cut-off* tem como função, justamente minimizar o efeito da ondulação e dos desvios de forma na avaliação da rugosidade.

O comprimento de onda do filtro determina o que deve passar ou não. Simplificadamente falando, o sinal da rugosidade apresenta frequências mais altas (ondas com menores comprimentos) enquanto os demais erros de forma juntamente com as ondulações exibem sinais com baixas frequências (altos comprimentos de ondas). Aparelhos de leitura como os rugosímetros utilizam assim, filtros que deixam passar os sinais de alta frequência e eliminam os de baixa frequência. Tais filtros são denominados **Filtros Passa-alta**.

Nos instrumentos de medição, os valores de *cut-off* são definidos de acordo com as recomendações existentes em função da distância entre os sulcos ou ainda da rugosidade esperada para determinada superfície.

Além do *cut-off* é possível utilizarmos outros artifícios como filtros mecânicos (sapata) ou matemáticos – que consistem em equações ajustadas aos resultados das mensurações para corrigir os desvios de forma e ondulações. Como exemplo de filtros matemáticos temos:

- Filtros 2RC - mais antigo;
- Gauss - mais comum. Presente na maioria dos instrumentos;
- Spline;
- Regressão Guasiana Robusta (RGRF) – Baseado no Gauss, mas, com uma abordagem mais interativa. Entre outros.

Idealmente, uma boa especificação de acabamento de superfície usará filtros e parâmetros que identificarão claramente defeitos inaceitáveis, além de confirmar que a superfície é geralmente aceitável.

• **Parâmetros de avaliação da rugosidade**

A textura complexa das superfícies a qual nos referimos anteriormente tornou-se a principal razão pela qual tantos parâmetros foram propostos para quantificar os vários recursos e perfis. Desta forma, é preciso estar atento e tomar os devidos cuidados para garantir a escolha de referências corretas de leitura. Assim sendo, devemos sempre iniciar nossa avaliação de textura levando em consideração a superfície com a qual estamos lidando.

A seleção dos parâmetros de rugosidade com os quais se pretende trabalhar baseia-se principalmente em experiências e testes anteriores realizados, além do respaldo e indicações na literatura da área estudada. As especificações e interpretações dos valores obtidos com os diferentes

parâmetros existentes podem ser feitas levando em consideração alguns pontos como, por exemplo:

- A rugosidade associada e inerente aos diferentes tipos de produção e fabricação de um determinado material;
- A relação entre os valores de rugosidade e a função das superfícies;
- O que vem a ser considerado adequado para diferentes tipos de aplicações;
- As relações e implicações práticas que podem existir entre valores de diferentes parâmetros de rugosidade.

A rugosidade pode ser mensurada de forma óptica ou mecânica, dividindo-se a região medida (lm) em cinco subregiões (le) e calculando-se uma linha média do perfil, para a qual a área dos picos acima e abaixo da mesma é igual. A partir desses pressupostos, é possível calcular inúmeros parâmetros para representar a rugosidade da superfície.

Certos parâmetros levam em conta tanto os picos quanto os vales da superfície. No entanto, outros são projetados apenas para examinar o número e o espaçamento das partidas da linha central, seja para cima ou para baixo.

A seguir, serão descritos àqueles mais comumente utilizados.

✓ **Rugosidade média (Ra)**

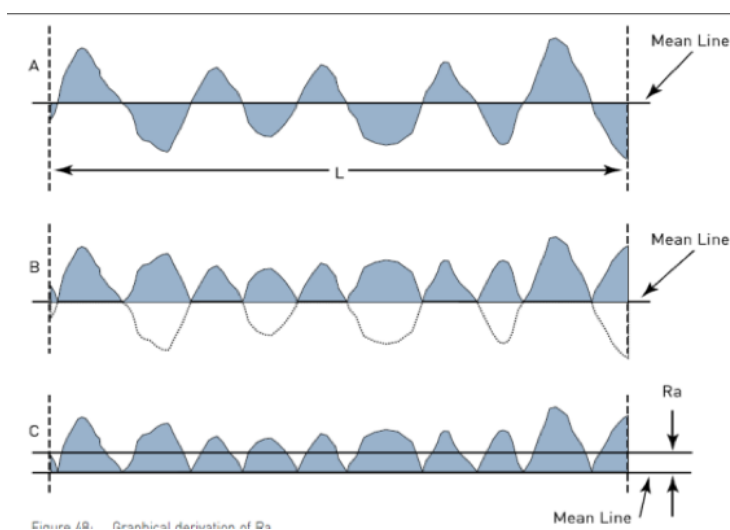
Se cada superfície diferente pudesse receber um único número capaz de caracterizar sua rugosidade, a avaliação dessa propriedade seria convertida de um processo subjetivo para algo totalmente objetivo. No entanto, infelizmente, nenhum método único é capaz de lidar com a complexidade e representar verdadeiramente as características da maioria das superfícies. Portanto, se faz necessário uma série de parâmetros e,

consequentemente, a quantificação de uma característica por vez para nos dar um guia de uma boa avaliação.

Os principais critérios para selecionar um parâmetro de textura de superfície são: ele pode ser relacionado ao desempenho ou ao processo de produção que controla? O valor do parâmetro muda com que velocidade a partir da função que será monitorada?

O parâmetro mais comumente usado no cotidiano e relatado na literatura é o **Ra** ou Roughness Average (Rugosidade Média). O mesmo também costumava ser chamado de CLA (Center Line Average – Média da Linha Central) ou AA (Arithmetical Average – Média Aritmética). Matematicamente falando, Ra é o valor médio aritmético do desvio absoluto do perfil da linha de referência (M) ao longo do comprimento de amostragem (lm) (figura 03). O valor de Ra pode ser expresso em micrometro (μm), o mais comum, ou em micropolegada.

FIGURA 03: Derivação gráfica de Ra - (A) Perfil com linha central; (B) Porções inferiores do perfil invertido; (C) Ra é a média do perfil. Retirado de “EXPLORING SURFACE TEXTURE – A fundamental guide to the measurement of surface finish. 7th Edição.



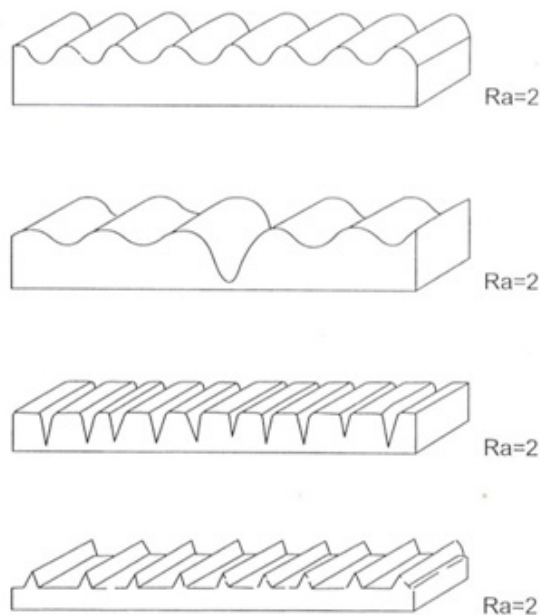
O Ra é bastante utilizado, devido à sua facilidade de obtenção, principalmente quando se faz necessário um controle de rugosidade contínuo nas linhas de produção. Sendo empregado também ao analisarem-se superfícies de pouca responsabilidade, como por exemplo, acabamentos com fins apenas estéticos.

Tal parâmetro de medição tornou-se um dos mais utilizados em todo o mundo, sendo aplicável à maioria dos processos de fabricação. Devido a seu grande emprego, quase a totalidade dos equipamentos apresenta este parâmetro (de forma analógica ou digital eletrônica). O valor da rugosidade neste parâmetro está de acordo com a curva de Gauss que caracteriza a distribuição de amplitude.

A maioria das Normas Nacionais e Internacionais sugere que as avaliações sejam feitas ao longo de pelo menos cinco comprimentos de amostragem consecutivos e, em seguida, os dados calculados em média. Isso garante que o valor Ra seja típico da superfície.

Apesar de todas as facilidades de obtenção e uso, o valor de Ra ao longo de um comprimento de amostragem representa a rugosidade média, desta forma se um pico ou vale não típico surgir na superfície, embora seja calculado, ele não terá uma influência significativa nos resultados, pois o valor da média não sofrerá grandes alterações, o que pode ocultar possíveis defeitos. Nenhuma distinção é feita entre picos e vales. Seu resultado também não é capaz de definir a forma das irregularidades de um perfil. Dessa maneira, podemos obter um mesmo Ra para superfícies que sofreram diferentes processos conforme verifica-se na figura 04 (LÖBERG et al., 2010; WENNERBERG; ALBREKTSSON; WENNERBERG A, 2000).

FIGURA 04: Representação de amostras com irregularidades diferentes, mas, que possuem um mesmo valor de Ra. Imagem disponível em: <http://engenheirodemateriais.com.br/2017/02/08/rugosidade-de-uma-superficie>

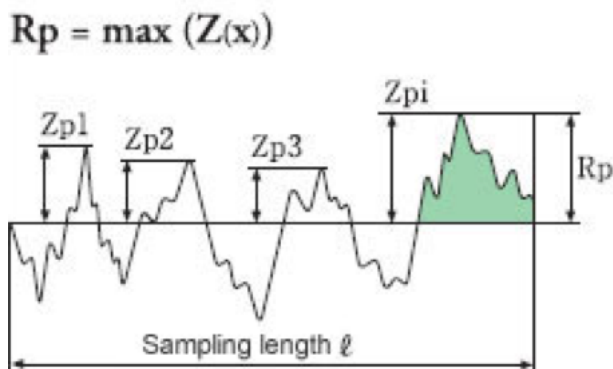


Para alguns processos de fabricação onde há uma frequência muito alta de vales ou picos, como é o caso dos sinterizados, o parâmetro não é adequado, já que a distorção provocada pelo filtro eleva o erro até níveis inaceitáveis.

✓ **Altura máxima de pico (R_p)**

Corresponde à maior altura de pico ao longo do comprimento medido (l_m), sendo calculada em relação a linha média. (**Figura 5**)

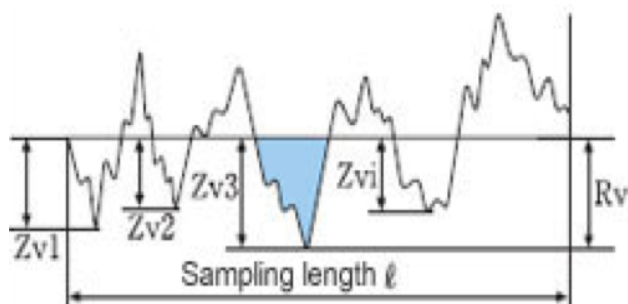
FIGURA 05: Representação do padrão Rp Imagem disponível em: <http://engenheirodemateriais.com.br/2017/02/08/rugosidade-de-uma-superficie>



✓ **Profundidade máxima de vale (R_v)**

Semelhante ao R_p , no entanto em relação aos vales. Isto é, corresponde a maior altura das regiões abaixo da linha média. (Figura 6)

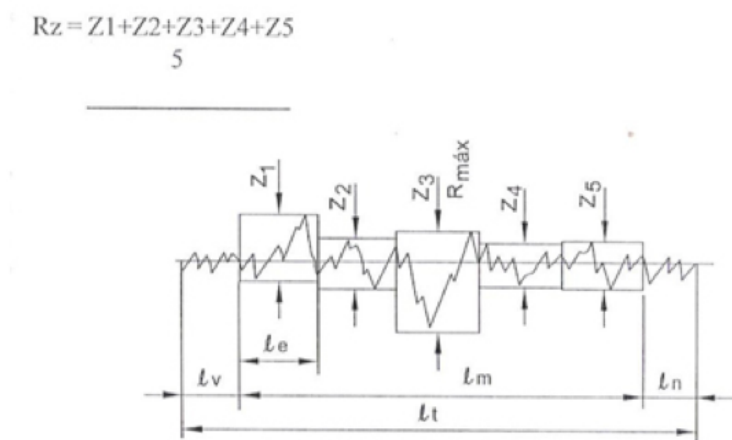
FIGURA 06: Representação do padrão R_v Imagem disponível em: <http://engenheirodemateriais.com.br/2017/02/08/rugosidade-de-uma-superficie>



✓ Altura máxima do perfil de rugosidade (Rz)

Representa à média aritmética dos 5 valores de rugosidade parcial, sendo que se define por rugosidade parcial (Z_i) a soma dos valores absolutos das ordenadas dos pontos de maior afastamento, acima e abaixo da linha média, existentes dentro de um comprimento de amostragem (cutoff). Na representação gráfica do perfil, este valor corresponde à distância vertical entre o maior pico (R_p) e o vale mais profundo (R_v) ao longo do comprimento de medição (l_m). (Figura 7)

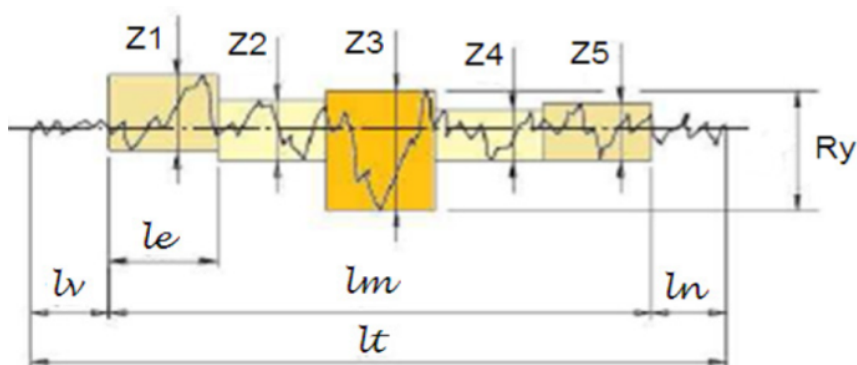
FIGURA 07: Representação do padrão Rz Imagem disponível em: <http://engenheirodemateriais.com.br/2017/02/08/rugosidade-de-uma-superficie>



✓ Altura total do perfil de rugosidade (Rt)

Parâmetro semelhante ao R_z . No entanto, os picos e vales máximos que são levados em consideração devem pertencer a uma região específica de amostragem (l_e) e não a todo o comprimento de medição. Acaba, portanto representando o maior valor das rugosidades parciais (Z_i) (Figura 8).

FIGURA 08: Representação do padrão Rt Imagem disponível em: <http://engenheirodemateriais.com.br/2017/02/08/rugosidade-de-uma-superficie>



Na figura acima, o maior valor parcial é o Z3, que está localizado no 3º cut-off, a medição dos picos e vales dessa área representa o Rt.

Tal parâmetro é ainda capaz de informar sobre a máxima deterioração da superfície vertical de uma peça, é de fácil obtenção quando o equipamento de medição fornece o gráfico da superfície e fornece informações complementares ao Ra. No entanto, pode ocorrer a obtenção de uma imagem errada da amostra já que avalia desvios localizados, tornando-se também menos abrangente do que Rz. Além disso, nem todos os equipamentos disponíveis fornecem esse parâmetro.

✓ Desvio médio quadrático (Rq)

É obtido pelo quadrado de cada valor e tomando a raiz quadrada da média desses valores. Ou seja, define-se como a raiz quadrada da média dos quadrados das ordenadas do perfil efetivo em relação à linha média dentro do percurso total de medição (l_m). Também conhecido como RMS (Root Mean Square), acentua o efeito dos valores do perfil que se afastam da média. (Figura 9)

Figura 09: Representação do padrão Rq.

$$Rq = \sqrt{\frac{1}{L} \int_0^L y^2 dx} \quad Rq = \sqrt{\sum_{i=1}^N \frac{Y_i^2}{N}}$$

Sendo N = nº de ordenadas

FONTE: Imagem disponível em: <http://engenheirodemateriais.com.br/2017/02/08/rugosidade-de-uma-superficie>.

Os valores de Rq tendem a ser mais significativos do que os de Ra quando utilizados em trabalho estatístico, tendo o efeito de dar peso extra para valores altos (cerca de 11% maior que Ra e esta diferença passa a ser importante em muitos casos).

Pode ser utilizado em superfícies onde o parâmetro Ra exibe pouca resolução ou onde a detecção de picos ou vales se torna importante, mesmo quando estes aparecem ao acaso, evidenciando-os mais que o Ra, pois eleva ao quadrado o erro, acentuando-o.

Em contrapartida, ainda é pouco utilizado e mais difícil de obter graficamente que o Ra. Assim como o Ra, não define a forma das irregularidades e normalmente deve vir acompanhado Rz ou Rt.

• Parâmetros 3D

Os parâmetros para avaliação de área 3D ainda estão em discussão pela ISO e outras organizações de padrões. No entanto, é mais provável que pelo menos 18 parâmetros sejam adotados conforme definido atualmente em “EUR 15178EN Provisório”. Em relação à pesquisa odontológica, existe uma tendência à utilização cada vez maior dos parâmetros tridimensionais, tendo em vista que são mais precisos na avaliação de superfícies complexas, como as de implantes dentários. (LÖBERG et al., 2010; WENNERBERG; ALBREKTSSON; WENNERBERG A, 2000)

Abaixo daremos destaque aos principais parâmetros de amplitude.

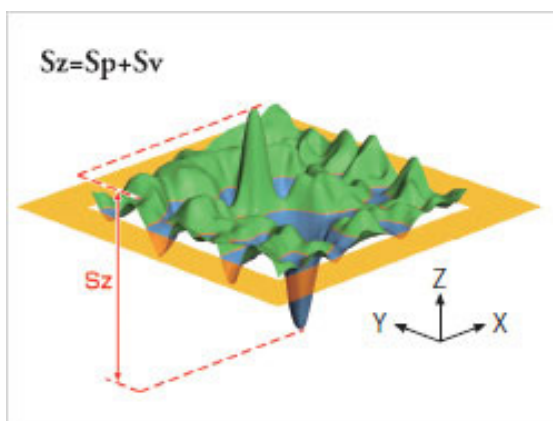
Parâmetros de Altura (picos e vales)

Costumam serem os pontos mais usados dentro das análises 3D. Sendo úteis, além da análise de rugosidade, para avaliação de propriedades como brilho, resistência de superfície, atrito, resistência de contato elétrico, etc.

✓ Altura máxima (Sz)

Corresponde a um parâmetro 3D expandido a partir da correlação 2D - Rz. Ele expressa a soma do valor máximo da altura do pico Z_p e o valor máximo da profundidade do vale Z_v na superfície dentro da área medida. (Figura 10).

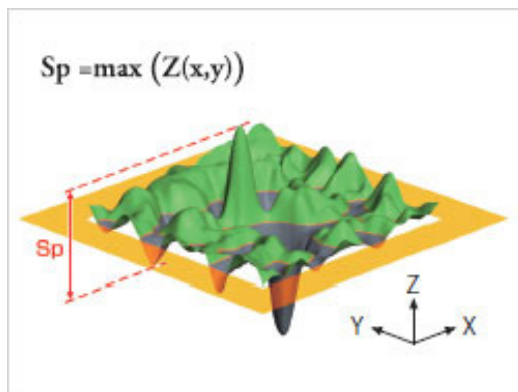
FIGURA 10: Representação do padrão Sz. Imagem disponível em: https://www.olympusims.com/pt/knowledge/metrology/roughness/3d_parameter/



✓ Altura máxima do pico (Sp)

Parâmetro 3D expandido a partir da referência de rugosidade (2D) R_p . Expressa o valor máximo da altura do pico Z_p na superfície na área medida. (Figura 11)

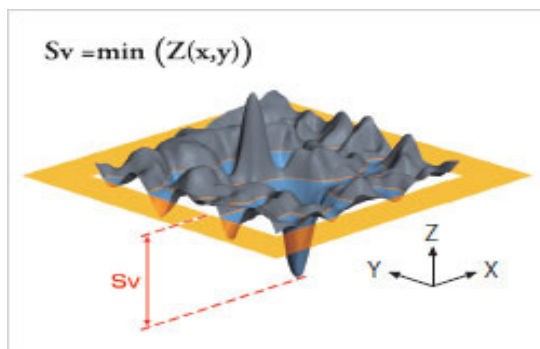
FIGURA 11: Representação do padrão Sp Imagem disponível em: https://www.olympusims.com/pt/knowledge/metrology/roughness/3d_parameter/



✓ **Profundidade máxima do vale (Sv)**

Este é um parâmetro 3D expandido a partir do parâmetro Rv de rugosidade (2D). Expressando a profundidade máxima do vale Zv na superfície na área medida. (Figura 12)

FIGURA 12: Representação do padrão Sv. Imagem disponível em: https://www.olympusims.com/pt/knowledge/metrology/roughness/3d_parameter/



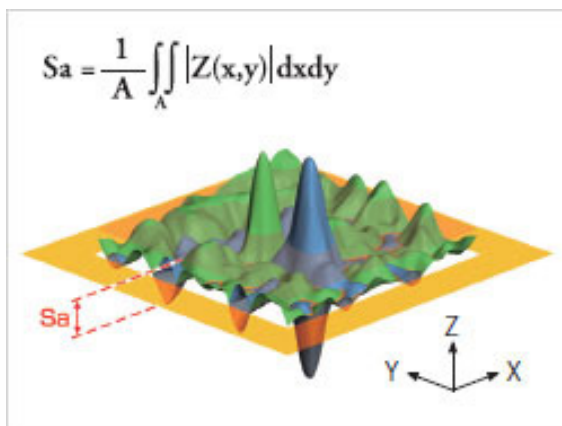
É um ponto frequentemente usado para avaliação da resistência superficial e resistência à corrosão.

Parâmetros de Altura (média da amplitude na direção da altura)

✓ Altura média aritmética (Sa)

Este é um parâmetro 3D expandido a partir do correspondente (2D) Ra. O mesmo expressa a média dos valores absolutos de $Z(x, y)$ na área medida. É equivalente à média aritmética da região medida no diagrama de exibição tridimensional quando os vales foram alterados para picos por conversão para valores absolutos. É considerado o parâmetro mais usado. (Figura 13).

FIGURA 13: Representação do padrão Sa. Imagem disponível em: https://www.olympusims.com/pt/knowledge/metrology/roughness/3d_parameter/

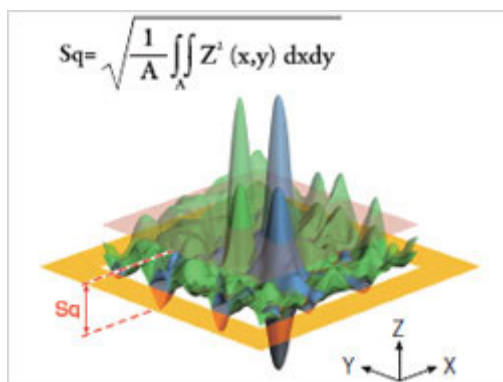


A influência de uma única distorção no valor da medição torna-se extremamente pequena, portanto resultados estáveis podem ser obtidos.

✓ Raiz média quadrática da altura (Sq)

Parâmetro expandido a partir do (2D) Rq. Ela expressa a raiz quadrada de $Z(x, y)$ na área medida. É equivalente à média do quadrado da região medida no diagrama de exibição tridimensional quando os vales foram alterados para altos picos por quadratura. Métodos de avaliação utilizando Rq são frequentemente empregados quando desenvolvidos em 3D. (Figura 14)

Figura 14: Representação do padrão Sq. Imagem disponível em: https://www.olympusims.com/pt/knowledge/metrology/roughness/3d_parameter/



• Técnicas Topográficas e Instrumentos para Medição da Rugosidade

Quando desejamos trabalhar com análises de superfícies é sempre importante ter em mente quais resultados esperamos obter. Para isso, vários fatores devem ser considerados e alguns questionamentos podem nos ajudar a escolher a melhor técnica e instrumento de medição.

- Qual o tipo de superfície se pretende medir e qual a geometria apresentada por ela?
- Que tipo de material compõe a superfície que se pretende analisar?

- Qual o tamanho do corpo de prova e/ou objeto que se deseja avaliar a superfície?
- Qual o tempo necessário para mensurar e medir as características de uma amostra?
- O que se deseja obter durante as mensurações? Quais características são de importância para o trabalho realizado?
- Que tipo de técnica e/ou instrumento pode fornecer os melhores dados a respeito da amostra com a qual se deseja trabalhar?

Todas essas questões auxiliam a traçar uma metodologia concreta e segura para que possamos obter resultados satisfatórios e fidedignos ao longo das análises de superfícies propostas e/ou almejadas.

Entre as técnicas disponíveis para trabalharmos com topografia de superfícies podemos citar:

- ✓ Perfilometria de contato (Stylus - Rugosímetro)
- ✓ Perfilometria de não-contato (Óptica)
- ✓ Microscopia eletrônica de varredura
- ✓ Microscopia de força atômica
- ✓ Microscopia de tunelamento

Vale salientar que o sucesso da técnica dependerá também da qualidade do instrumento utilizado e da habilidade do operador. É comum se ouvir dizer que “uma cadeia é tão forte quanto seu elo mais fraco”. Ou seja, em muitos aspectos, o desempenho de um instrumento pode ajudar ou atrapalhar os resultados finais de determinadas medições.

Por exemplo, se um instrumento tiver um ótimo recurso, como uma alta resolução, o resto do sistema deve ter qualidade suficiente para que esse recurso seja bem aproveitado e tenha realmente alguma utilidade. Dessa maneira, um equipamento bem projetado deve ter um equilíbrio de desempenho em todas as áreas para assim oferecer a melhor capacidade geral possível.

Um aparelho mal instalado, não calibrado ou usado de maneira errônea, dará respostas equivocadas. Portanto, é importante lembrar que quanto maior a precisão que se deseja alcançar, mais rigorosamente essas diretrizes precisam ser seguidas.

Tratando-se especificamente da rugosidade, iremos destacar algumas das técnicas e instrumentos mais utilizados no âmbito científico para a mensuração dessa característica.

✓ RUGOSÍMETRO

Como o próprio nome já sugere, trata-se de um equipamento utilizado para mensurar a rugosidade de uma superfície. Desenvolvido originalmente há muitos anos atrás, o rugosímetro ainda possui grande aplicação e faz parte da rotina de vários processos.

Existem basicamente dois grandes tipos desse equipamento. Um no qual é fornecida apenas a leitura dos parâmetros de rugosidade, podendo se apresentar da forma analógica ou digital. E um segundo tipo que além da leitura, fornece também a possibilidade do registro em papel do perfil efetivo da superfície que foi lido.

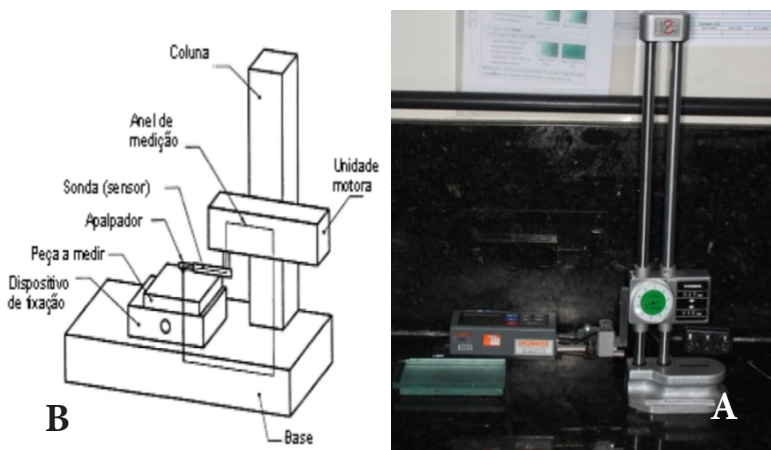
Os rugosímetros possuem uma estrutura básica, composta por partes distintas, todas trabalhando de maneira conjunta e se tornando essenciais para a realização das medições.

- **Agulha**- representada por uma ponta de diamante que irá percorrer a amostra ao longo de um eixo estabelecido;
- **Apalpador** – estrutura também denominada “pick-up”, é responsável por deslizar sobre a superfície que será verificada, levando os sinais da agulha apalpadora até o amplificador;
- **Unidade de acionamento** – dispositivo que desloca o apalpador sobre a superfície que está sendo medida. Realiza seu movimento característico com velocidade e direção constantes através da distância estabelecida;

- **Amplificador** – Possui o controle eletrônico principal, com um indicador de leitura que recebe os sinais da agulha, ampliando e calculando os mesmos em função do parâmetro escolhido;
- **Registrador** – é um acessório do amplificador, que pode estar presente em alguns equipamentos, sendo responsável por fornecer a representação, em papel, do perfil efetivo da superfície, nos casos em que se tem essa função.

As figuras abaixo representam os componentes e a estrutura de um rugosímetro (Figura 15).

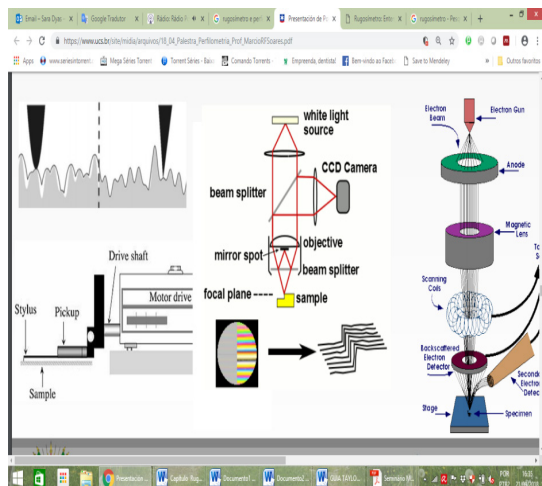
FIGURA 15 -A – Desenho esquemático dos componentes de um rugosímetro de bancada. Adaptado de Simões Morais, “Desenho técnico básico 3”, Porto Editora, 2006. **B** - Rugosímetro Digimess TR 200 do Laboratório Integrado de Biomateriais da UFPB. Arquivo dos autores.



Resumidamente, a ponta da agulha que é bastante afiada, percorre a superfície passando pelos picos e vales a uma velocidade de constante durante uma distância já pré-definida (Fig 16 e 17). Tal movimento é transformado em impulsos elétricos e o sinal decorrente desse processo é obtido e amplificado.

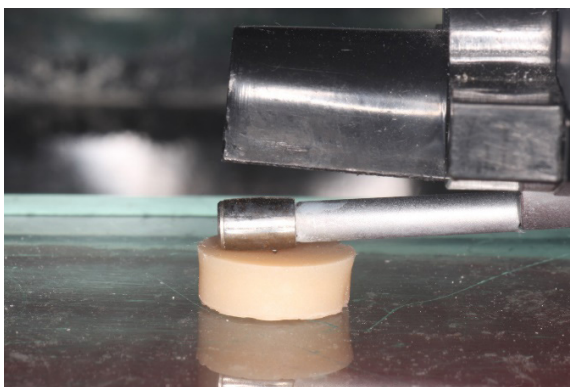
Finalmente, este sinal pode ser exibido nas saídas de gráficos e telas, juntamente com os valores numéricos que caracterizam a textura da superfície.

FIGURA 16- Representação esquemática do percurso de uma agulha ao longo dos picos e vales de uma superfície



FONTE: https://www.ucs.br/site/midia/arquivos/18_04_Palestra_Perfilometria_Prof_MarcioRFSoures.pdf. Março, 2017.

FIGURA 17- Avaliação da rugosidade superficial de um corpo-de-prova de resina acrílica. Arquivo dos autores.



A maioria dos rugosímetros fornece seus dados através do parâmetro Ra (Rugosidade aritmética) e adota o μm (micrometro) como unidade de medida padrão.

Apesar do grande emprego e de sua facilidade de uso, alguns fatores como, por exemplo, a diâmetro da ponta da agulha, a carga aplicada por essa ponta e a velocidade da mesma, o deslocamento lateral que pode ocorrer devido a irregularidades na amostra, a elasticidade e consistência da superfície analisada e vibrações externas no momento das aferições podem provocar erros de medições capazes de atrapalharem os resultados finais que se desejam. Dessa forma, é imprescindível ficar atento às possíveis intercorrências que podem ocorrer durante o uso desse equipamento.

✓ PERFILÔMETRO ÓPTICO

Como alternativa aos perfilômetros mecânicos de contato as técnicas de medição através de princípios ópticos tem crescido e ganhado espaço. Os instrumentos ópticos, quando comparados aos rugosímetro, por exemplo, além da grande vantagem de serem sem contato, apresentam também um índice de resposta mais rápido.

De forma geral, os perfilômetros ópticos apresentam-se em duas categorias, baseadas no princípio de funcionamento: interferometria e detecção de erro focal.

Os perfilômetros que funcionam através do princípio da interferometria possuem fonte de luz LED verde ou branca. E o que torna esses equipamentos tão eficientes é uma combinação de campo, resolução, precisão e reprodutibilidade de leitura em diversos tipos de amostras, desde uma superfície muito rugosa, até peças com acabamento muito bem polido.

Os principais benefícios de tal sistema estão baseados na possibilidade de leitura de um grande número de pontos (tipicamente 1024x1024), rapidez de processamento e geração de imagens e parâmetros 3D, capacidade de mapeamento da topografia e rugosidade da superfície, diversas combinações de lentes e objetivas (x10; x20; x50;

x100) e possibilidade de combinação de imagens (stitching) usando o estágio XY automatizado. Alguns equipamentos mais modernos possuem também sistemas de antivibração pneumático, que os mantém isolados de trepidações externas. Com programação e uso geralmente simplificados, os perfilômetros ópticos sem contatos abrem um leque de possibilidades topográficas para análises de diversas superfícies e parâmetros de rugosidade.

Em contrapartida a tantas vantagens, algumas vezes, dependendo da refletividade do material, o método óptico não é possível de ser aplicado e superfícies muito curvas podem não retornar a luz ao detector, o que também dificulta ou até mesmo impossibilita as análises. A Figura 18 apresenta a imagem de um perfilômetro óptico de não-contato e as Figura 19 a 21 apresentam a imagem de uma perfilometria 3D de uma ponta diamantada odontológica.

FIGURA 18 - Perfilômetro Talysurf CCI MP- Lite (Taylor Hobson) do Laboratório Integrado de Biomateriais (LABIO) da UFPB. Arquivo dos autores, João Pessoa, 2017.



FIGURA 19 – Representação 2D da superfície de uma ponta diamantada (Arquivo dos autores, João Pessoa, 2017).

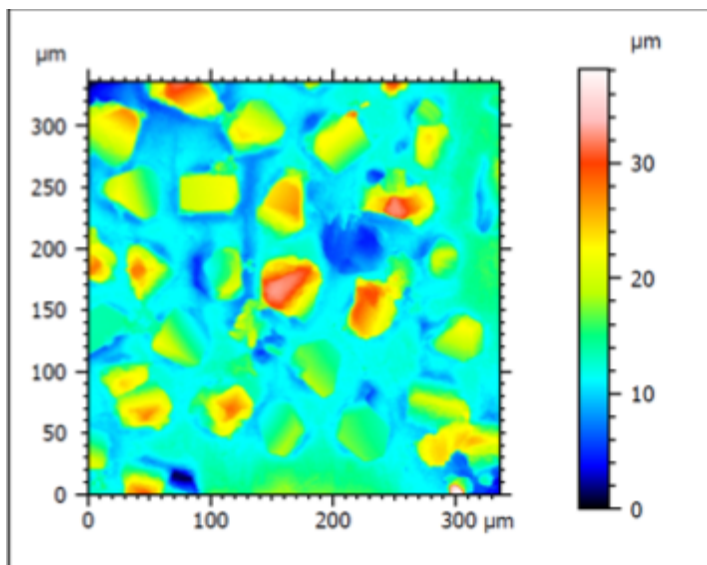


FIGURA 20 – Representação 3D da superfície de uma ponta diamantada (Arquivo dos autores, João Pessoa, 2017).

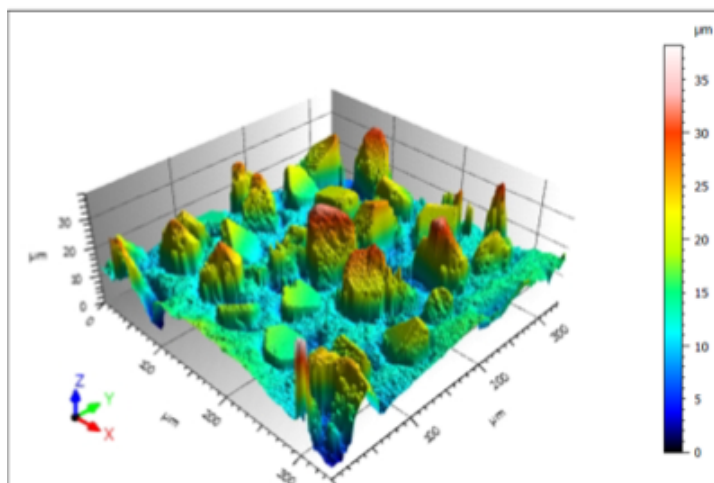


FIGURA 21 – Tabela com os valores de rugosidade de superfície de uma ponta diamantada – ISO 25718 (Arquivo dos autores, João Pessoa, 2017).

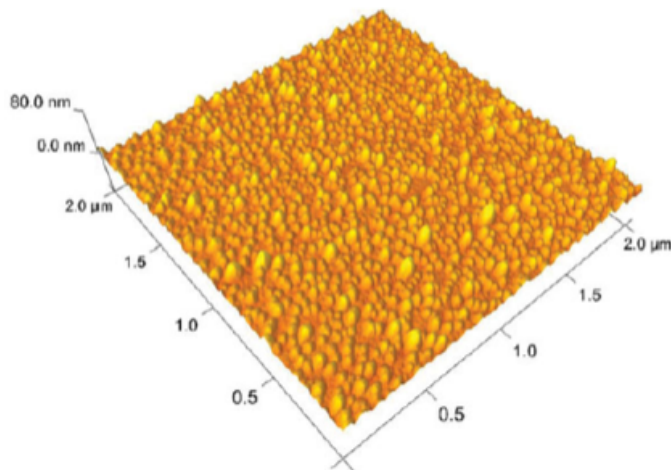
ISO 25178			
Height Parameters			
Sq	5.02	µm	<i>Root-mean-square height</i>
Ssk	1.09		<i>Skewness</i>
Sku	4.18		<i>Kurtosis</i>
Sp	24.2	µm	<i>Maximum peak height</i>
Sv	14.0	µm	<i>Maximum pit height</i>
Sz	38.2	µm	<i>Maximum height</i>
Sa	3.89	µm	<i>Arithmetic mean height</i>

✓ MICROSCÓPIO DE FORÇA ATÔMICA

Estritamente falando, os Microscópios de Força Atômica (AFMs - Atomic Force Microscopes) são dispositivos de medição de contato, mas, devido às forças geradas pela ponta serem muito reduzidas, são geralmente considerados sem contato para propósitos práticos. Os AFMs oferecem uma capacidade de medição 3D de alta resolução: podendo demonstrar até mesmo átomos individuais.

São equipamentos frequentemente utilizados por empresas de semicondutores e em pesquisa de materiais. Mas, embora sejam muito versáteis em suas capacidades de medição, deve ser lembrado que eles só podem medir sobre uma pequena área (cerca de 100µm x 100µm) e sobre uma pequena altura (cerca de 5µm) além de produzir conjuntos de dados muito pequenos. Os AFMs são notoriamente difíceis de calibrar e acabam sendo mais bem utilizados para imagens qualitativas de uma superfície do que para análise quantitativa. A figura 22 demonstra uma imagem de AFM.

FIGURA 22 – Imagem de AFM de um filme de Carbono-diamante dopado com nanopartículas de prata. Fonte: (QUEIROZ et al., 2013).



Outro fator importante que não deve ser ignorado é que a medição primária é baseada na força e não no deslocamento. Portanto, é possível introduzir distorções na superfície como resultado de interações materiais entre a superfície e a sonda, que afetam a força na ponta, em vez de seu deslocamento.

❖ IMPORTANTE LEMBRAR!

Antes de passar a explorarmos outros aspectos referentes a medição e avaliação das texturas de superfície, é válido lembrar que:

- Qualquer avaliação, qualitativa ou quantitativa, deve ser interpretada em relação à mesma - seu método de produção, composição e/ou sua função.
- Rugosidade, ondulação e forma são três maneiras pelas quais uma superfície pode se afastar da suavidade e planicidade perfeitas.

Embora sempre sejam encontrados em combinação, os efeitos sobre o desempenho são diferentes e, ao escolher o cut-off apropriado, tais fatores podem ser avaliados separadamente.

- Os recursos de superfície podem ser medidos com precisão levando em conta as diferentes ampliações verticais e horizontais e cada parâmetro escolhido é capaz de representar uma determinada característica da amostra em questão.
- A escolha dos parâmetros de leitura deve ser feita em função da aplicação da superfície, sendo recomendado o uso de mais de um deles para identificar particularidades desejáveis.

B) Dureza

Dentre as propriedades mecânicas com importância para os biomateriais, a dureza é uma das mais trabalhadas. A definição desse termo costuma ser variada e de difícil consenso. Mas, ao trabalharmos voltados para área odontológica e de produção e testes de biomateriais, podemos considerar a dureza como uma propriedade particular de resistência a endentação. Ou seja, podemos defini-la como a capacidade de um corpo resistir a uma penetração permanente (deformação plástica) em sua superfície, sendo calculada baseada na resposta que o material testado apresenta diante da carga que lhe é aplicado. (ANUSAVICE; SHEN; RAWLS, 2013)

Os resultados obtidos com a dureza são capazes de expressar a interação entre diversas outras propriedades. Dessa forma, associa-se também o termo com características referentes a resistência a risco, abrasão, corte, desgaste, resistência a compressão, ductilidade e limite de proporcionalidade.

Embora muitas vezes os ensaios realizados para mensurar as propriedades mecânicas não representem necessariamente o que realmente ocorre com o desempenho dos materiais em seu ambiente de uso, tais medidas são importantes para orientar a respeito do comportamento

clínico que estes podem apresentar. Assim sendo, os testes de dureza estão inclusos em diversas normas para avaliação de materiais formuladas pela International Organization for Standardization (ISO) e American Dental Association (ADA).

ENSAIOS DE DUREZA

Os ensaios de dureza são bastante empregados como parte da caracterização de diversos materiais. O fato de serem de fácil e rápida medição, requerer regiões ou amostras relativamente pequenas e normalmente não implicar na destruição ou inutilização posterior dos corpos de provas, fez com que tais metodologias se tornassem bastante difundidas e usuais.

Apesar disso, é preciso estar atento para aplicar convenientemente os resultados obtidos de forma prática, devendo-se compreender o tipo de medição a ser feita, a resposta esperada do material que está sendo submetido ao ensaio e a expressividade dos valores encontrados. Pois, quando questões desse tipo não são consideradas, corre-se o risco de incoerências na escolha e análise dos materiais e principalmente na expectativa do seu desempenho apoiando-se apenas nos resultados apontados pelos testes de dureza.

A aferição de dureza desdobra-se em um leque enorme de possibilidades de materiais que podem ser medidos. Isso faz com que sejam necessários aparelhos específicos e de qualidade para que se obtenham boas mensurações.

As medições desse padrão são comumente feitas na área da indústria e podem ser aplicadas ao longo de várias etapas dos processos de produção. Os materiais corriqueiramente medidos nesse campo são metais, mas, também existem padrões para mensurar a dureza de cerâmicas, resinas, borrachas e elastômeros.

Os aparelhos utilizados para realização dos ensaios de dureza são genericamente denominados de durômetros. Esses instrumentos apresentam os dados referentes a um determinado material, permitindo com que essas informações sejam interpretadas e verificadas de acordo com um padrão que se tenha de referência.

Existem basicamente três maneiras para se quantificar a dureza: risco, penetração e choque. No entanto, a forma mais comum de mensurar tal característica é através da penetração que é baseada na profundidade ou na área deixada por uma ponta de endentação de formato estabelecido e simétrico, agindo com uma força padronizada sobre o material testado. A aplicação de tal força produz um padrão característico que pode então ser mensurado através de um microscópio para área, largura ou profundidade da endentação causada. Ao final do ensaio, as dimensões das endentações serão inversamente proporcionais a resistência à penetração do material avaliado.

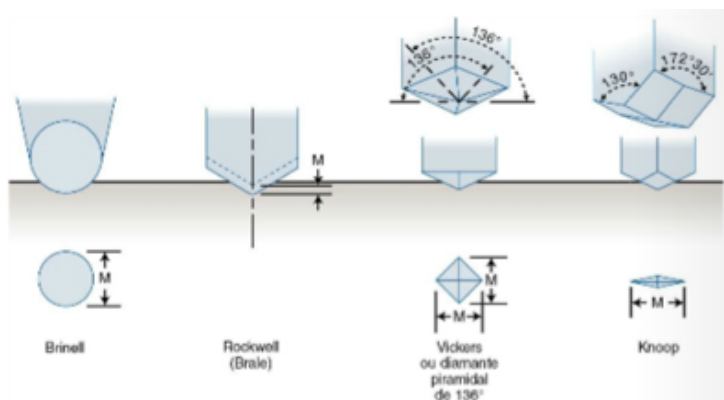
Para materiais mais resilientes e elásticos como borrachas e até mesmo plásticos, a dureza costuma usualmente ser mensurada por choque. Nesse tipo de ensaio equipamento provoca um impacto sobre a superfície do material e parte da energia é captada e referida para a medida de dureza.

Nos trabalhos de desenvolvimento e estudo tanto de novos biomateriais quanto de compósitos já existentes na odontologia, os principais métodos padronizados de medição de dureza são:

- Teste de Dureza Brinell
- Teste de Dureza Rockwell
- Testes de Dureza Vickers e Microdureza (Vickers /Knoop)
- Teste de Dureza Shore.

Cada um dos métodos difere entre si pela natureza do material que será testado e uma combinação da composição e geometria do endentador e da carga aplicada (figura 23).

FIGURA 23 - Formato de pontas edentadoras para dureza (parte superior) e impressões deixadas nas superfícies dos materiais (parte inferior). A dimensão mensurada M que é mostrada para cada teste é utilizada para calcular a dureza. Imagem disponível em: Cap 4 – Propriedades Mecânicas dos Materiais Dentários IN ANUSAVICE, J. K. **Phillips** - **Materiais Dentários**. 12 ed, p.76. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013.



Com o objetivo de simplificar, nos deteremos aqui em duas metodologias frequentemente utilizadas nos trabalhos de pesquisa desenvolvidos no PPGO, que são a utilização dos padrões de dureza e microdureza Vickers, além da dureza Shore. Os demais tipos de dureza podem ser encontrados com mais detalhes em outras referências (ANUSAVICE; SHEN; RAWLS, 2013)

✓ TESTE DE DUREZA VICKERS

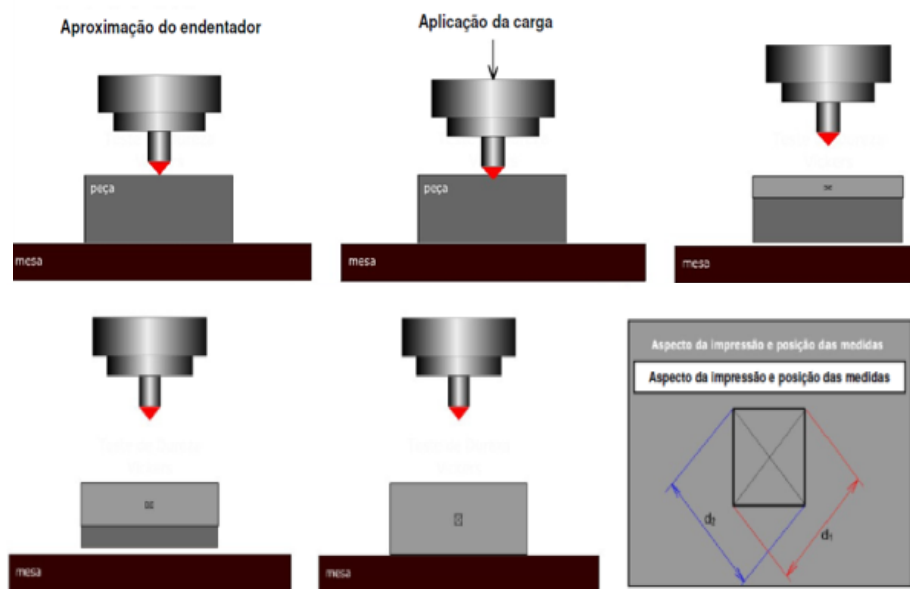
Desenvolvido por Smith e Sandland em meados de 1925, o teste de dureza Vickers consiste em endentar um corpo de prova com uma ponta diamantada que possui a forma de uma pirâmide de base quadrada com uma angulação de 136° entre as faces opostas fazendo com que se produza uma marcação no formato de um losango e as diagonais deixadas pelas endentações são então medidas.

No entanto, como a precisão dos resultados dependerá diretamente do cuidado e exatidão aplicados na medição das diagonais, os equipamentos de dureza Vickers contam com instrumentos ópticos acoplados (geralmente microscópios) a fim de permitir uma mensuração mais acurada das regiões impressas.

As cargas utilizadas nesse ensaio costumam variar entre 1 e 100kgf, sendo aplicadas durante tempos de 10 a 15 segundos.

Com os valores obtidos nas diagonais calcula-se uma média aritmética e a dureza será expressa pela relação entre a área de impressão e a carga aplicada, semelhante ao cálculo que faz para obter a dureza Brinell. A figura abaixo ilustra a técnica (Figura 24)

FIGURA 24 – Exemplo do teste de dureza Vickers



FONTE: Imagens disponíveis em: <http://www.engbrasil.eng.br/pp/em/aula3.pdf>.

Os ensaios de dureza Vickers empregam uma escala contínua e geram marcações bem pequenas, que geralmente não comprometem ou prejudicam a amostra. Sendo bem realizados, os mesmos apresentam grande precisão, principalmente pelo fato do seu penetrador não sofrer deformação durante as medições.

✓ **TESTES DE MICRODUREZA**

No âmbito das pesquisas odontológicas os parâmetros mais usados são os de microdureza. As técnicas de microdureza Vickers proporcionam a medição de dureza em áreas pequenas graças a utilização de cargas de baixo valor, o que gera endentações pequenas o suficiente capazes de determinar a dureza de forma ainda mais localizada.

○ **Microdureza Vickers**

A medição da microdureza Vickers envolve basicamente os mesmos procedimentos descritos anteriormente para o padrão Vickers. A diferença principal do método diz respeito apenas a carga aplicada que pode variar de 10gf até no máximo 1kgf, além de ser feito em equipamentos de maior precisão.

Por outro lado, a superfície que se deseja testar requer uma atenção especial no que diz respeito ao seu acabamento e polimento. Isso porque, quanto menor a carga aplicada no teste, maior o acabamento superficial e planicidade necessários.

Desta forma, aplicando-se cargas delicadas é possível mensurar a dureza em basicamente qualquer espessura de material, em peças delicadas e superfícies alteradas ou tratadas. A figura 25 apresenta um microdurômetro Vickers.

FIGURA 25 – Vista de um microdurômetro Shimadzu (HMV Micro Hardness Test, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão), disponível no Núcleo de Estudos e Pesquisas em Biomateriais (NEPIBIO) da UFPB.



Uma das poucas desvantagens que podem ser relacionadas aos testes de microdureza Vickers diz respeito ao fato dos seus resultados serem influenciados pelas medições do operador do microdurômetro. No entanto, um possível viés pode ser minimizado através do treinamento e calibração do pesquisador assim como as orientações do correto uso da máquina e interpretação dos seus resultados.

✓ **TESTE DE DUREZA SHORE**

Consiste no tipo de método que pode ser empregado em ensaios de materiais que comumente apresentam consistência mais macia, como borrachas, plásticos, elastômeros e outros de comportamento similar.

O equipamento utilizado (durômetro Shore) é simples, portátil e de fácil manuseio. Estando disponível no mercado tanto na forma analógica, quanto digital.

Durante os testes de dureza Shore a amostra analisada é submetida a uma carga que é distribuída através de uma mola presente no aparelho e atua no endentador. Com isso, o aparelho irá fornecer a profundidade endentação e o valor de dureza será baseado nessa característica.

Vale salientar que para que sejam obtidos resultados concisos e aceitáveis, o aparelho precisa ser mantido em alinhamento vertical e a superfície testada em direção horizontal. Além disso, recomenda-se um bom apoio do corpo de prova de maneira a evitarem-se vibrações capazes de interferirem na leitura (figura 26). Por fim, a espessura do material testado também deve ser adequada e não muito fina, para que assim sejam alcançados resultados de dureza satisfatórios e consistentes.

Diferentes escalas Shore foram criadas ao longo do tempo baseadas em características específicas dos dispositivos existentes no mercado. As escalas A e D são as mais usuais. No entanto, como os diversos materiais apresentam comportamentos diferentes diante de cada escala, ainda não é possível estabelecer uma correlação entre elas.

FIGURA 26 - Avaliação da dureza *Shore A* com durômetro portátil, em uma amostra de reembasador macio para próteses durante pesquisa realizada no Laboratório Integrado de Biomateriais (LABIO) da UFPB. Arquivo dos autores, João Pessoa, 2017.



Considerações finais

A mensuração e utilização dos parâmetros e valores de rugosidade superficial e de dureza podem ser aliadas no processo de produção, avaliação e estimativa de qualidade de diversos tipos de materiais presentes e capazes de serem utilizados nas diversas áreas da odontologia.

Como foi demonstrado ao longo do texto, vários padrões e métodos estão disponíveis para avaliar cada uma dessas propriedades, com indicações específicas para cada tipo de material com o qual se deseja trabalhar. Sendo assim, é importante lembrar que as condições e especificações dos testes irão depender também do pesquisador e daquilo que se espera obter ao final dos testes. Isso porque os resultados dos ensaios estarão sempre sujeitos as variações de cargas e tempos de aplicações sobre os corpos.

Dessa forma, para que possamos obter uma comparação válida entre essas propriedades em materiais distintos, devemos empregar o mesmo tipo de ensaio e seguir os protocolos experimentais, sobre amostras devidamente padronizadas.

Finalmente, entender as propriedades de superfície e mecânicas e consequentemente as limitações de um determinado material, permite além do desenvolvimento de novos produtos, um entendimento mais claro do comportamento e da previsibilidade de sucesso que eles podem obter ao serem aplicados clinicamente e/ou submetidos às condições da cavidade bucal.

Referências

AL-KHERAIF A. A. A. The effect of mechanical and chemical polishing techniques on the surface roughness of heat-polymerized and visible light-polymerized acrylic denture base resins. **Saudi Dental Journal**, v. 26, n. 2, p. 56–62, 2014.

AL-RIFAIY, M. Q. The effect of mechanical and chemical polishing techniques on the surface roughness of denture base acrylic resins. **Saudi Dental Journal**, v. 22, n. 1, p. 13–17, 2010.

ANUSAVICE, K. J.; SHEN, C.; RAWLS, R. **Materiais Dentários**. 12ª Edição ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013.

Apostila **Rugosidade Superficial nas Operações de Torneamento**. SENAI Sta Bárbara D'oeste – Fundação Romi.

BARBOSA, D. G. O; MONTENEGRO, A.C; DUARTE, J.L.P. Avaliação da rugosidade superficial de três resinas acrílicas para restauração provisória submetidas a diferentes métodos de polimento. **Rev. bras. odontol.**, Rio de Janeiro, v. 70, n. 2, p. 152-5, jul./dez. 2013.

CALLISTER, W. D. **Ciência e Engenharia dos materiais**, Editora LTC, São Paulo, Brasil. 2000.

COGO, D.M.; CREMONESE, R.V.; RANGEL, S.M.; SAMUEL, S.M.W. Efeito de Técnicas Alternativas de Polimento sobre a Rugosidade Superficial de Resinas Acrílicas. **Revista Faculdade de Odontologia**, v.44, p. 26-30, 2003.

GUNGOR, H.; GUNDOGDU, M.; YESIL DUYMUS, Z. Investigation of the effect of different polishing techniques on the surface roughness of denture base and repair materials. **The Journal of prosthetic dentistry**, v. 112, n. 5, p. 1271–7, nov. 2014.

JOSSO, Bruno; BURTON, David R.; LALOR, Michael J. Frequency normalised wavelet transform for surface roughness analysis and characterisation. **Wear**, v. 252, n. 5, p. 491-500, 2002.

Livro Telecurso 2000 - **Mecânica – Ensaio de Materiais**, Editora Globo – 1º edição de 10/2003.

LÖBERG, J. et al. Characterisation of Titanium Dental Implants I: Critical Assessment of Surface Roughness Parameters. **The Open Biomaterials Journal**, v. 2, p. 18–35, 28 abr. 2010.

LORENSET, V. G.; SERMAN, R. J.; PELLISSARI, L. P. Análise da rugosidade superficial em resina acrílica ativada

quimicamente submetida a diferentes tratamentos de superfície **Prosthesis Laboratory in Science**. v.1, n. 4, p.239-246, 2012.

MORAIS, W.; MAGNABOSCO, A.S. **Caderno Técnico: DUREZA**. Tubo & Cia.

NAGEM FILHO, H. et al. Surface roughness of composite resins after finishing and polishing. **Brazilian dental journal**, v. 14, n. 1, p. 37–41, 2003.

QUEIROZ, J. R. C. et al. Effect of Diamond-Like Carbon Thin Film Coated Acrylic Resin on Candida albicans Biofilm Formation. **Journal of Prosthodontics-Implant Esthetic and Reconstructive Dentistry**, v. 22, p. 451–455, 2013.

ROSALEM, C.G.C; FRAZÃO, M. C. A.; LAGO, A. D. N.; FIROOZMAND L. M; COSTA, J. F. Ensaios de dureza aplicados em odontologia: revisão bibliográfica/ *Hardness tests applied in dentistry: bibliograph review*. **Rev Pesq Saúde**, v.15, n.3, p. 368-372, set-dez, 2014.

SIMÕES MORAIS, **Desenho técnico básico** 3, Porto Editora, 2006.

SONG, F.; KOO, H.; REN, D. Effects of material properties on bacterial adhesion and biofilm formation. **Journal of Dental Research**, v. 94, n. 8, p. 1027–1034, 2015.

TAYLOR HOBSON LTD. **EXPLORING SURFACE TEXTURE – A fundamental guide to the measurement of surface finish**. 7th Edição, 2014.

WANG, L; D'ALPINO, P. H. P.; LOPES, L. G; PEREIRA, J. C. Mechanical properties of dental restorative materials: relative contribution of laboratory tests. **J Appl Oral Sci**, v. 11, n 3, p. 162-167, 2003.

WENNERBERG, A.; ALBREKTSSON, T.; WENNERBERG A, A. T. Suggested guidelines for the topographic evaluation

of implant surfaces. **The International journal of oral & maxillofacial implants**, v. 15, n. 3, p. 331–344, 2000.

SITES CONSULTADOS

Disponível.em.<<http://engenheirodemateriais.com.br/2017/02/08/rugosidade-de-uma-superficie/>>. Acesso em 10 de Maio de 2018.

Disponível.em.<http://www.multiesferas.com.br/o-que-e-rugosidade-e-sua-importancia-nas-diferentes-aplicacoes/>>. Acesso em 10 de Maio de 2018.

Disponível.em.< <https://laboratorios-tork.com.br/servicos/testes-em-materiais/determinacao-de-rugosidade-superficial/>>. Acesso em 15 de Maio de 2018.

Disponível.em.<<http://moldesinjecaoplasticos.com.br/parametros-de-avaliacao-da-rugosidade-acabamento/>> Acesso em 15 de Maio de 2018.

Disponível.em.<<http://www.multiesferas.com.br/o-que-e-dureza-e-sua-importancia-nas-diferentes-aplicacoes/>> Acesso em 18 de Junho de 2018.

Disponível.em.< <http://www.durocontrol.com.br/blog/dureza/>>. Acesso em 18 de Junho de 2018.

Disponível.em.<https://www.cimm.com.br/portal/material_didatico/6560#.W6XD33tKjIU>. Acesso em 20 de Agosto de 2018.

Disponível.em.<<http://www.ebah.com.br/content/ABAAABUw8AJ/>relatorio-dureza> Acesso em 20 de Agosto de 2018.

Disponível.em.<<http://www.engbrasil.eng.br/pp/em/aula3.pdf>> Acesso em 20 de Agosto de 2018.

Disponível.em.<https://www.olympusims.com/pt/knowledge/metrology/roughness/3d_parameter/> Acesso em 20 de Agosto de 2018.

Disponível.em.<<https://www.mitutoyo.com.br/nossosprodutos/equipamentos-dureza.html>> Acesso em 14 de Setembro de 2018.

Disponível.em.<https://www.cimm.com.br/portal/material_didatico/6562-teste-do-escleroscopio-escala-shore#.W6f11XtKjIU> Acesso em 14 de Setembro de 2018.

Disponível.em.<https://www.ucs.br/site/midia/arquivos/18_04_Palestra_Perfilometria_Prof_MarcioRFSoares.pdf. Março, 2017>. Acesso em 19 de Setembro de 2018.

Disponível.em.<<http://engenheirodemateriais.com.br/2017/02/08/rugosidade-de-uma-superficie>>. Acesso em 19 de Setembro de 2018.

Indicação de Normas para Consulta

ABNT NBR ISO 4287 – Especificações geométricas do produto (GPS) – Rugosidade: Método do perfil – Termos, definições e parâmetros da rugosidade.

ABNT NBR ISO 4288 – Especificações geométricas do produto (GPS) – Rugosidade: Método do perfil – Regras e procedimentos para avaliação de rugosidade.

ISO 4287 – Geometrical Product Specifications (GPS) – Surface texture: Profile Method – Terms, definitions and surface texture parameters.

ISO 13565-2 – Geometrical Product Specifications (GPS) – Surface texture: profile method; Surfaces having stratified functional properties-Part 2.

ISO 12085 – Geometrical Product Specifications (GPS) – Surface texture: profile method; Motif parameters.

ISO 25178-2 – Geometrical Product Specifications (GPS) – Surface texture: Areal –Part2: Terms, definitions and surface texture parameters.

Capítulo 7

OS PRODUTOS NATURAIS NO CONTEXTO DA PESQUISA ODONTOLÓGICA

Ricardo Dias de Castro

Maria Carmeli Correia Sampaio

Gisely Maria Freire Abílio de Castro

Edeltrudes de Oliveira Lima

Pedro Luiz Rosalen

Introdução

Os produtos de origem natural com propriedades sobre sistemas biológicos sempre estiveram presentes em práticas de prevenção, cura e diagnóstico de doenças no cotidiano da humanidade. A partir do desenvolvimento do método científico, especialmente após o século XVIII, evidenciou-se ampliação dos estudos para avaliação das propriedades farmacológicas de extratos e substâncias encontradas em plantas reconhecidas tradicionalmente como medicinais.

Atualmente, sabe-se que 85% dos fármacos aprovados pela Food and Drug Administration (FDA) entre os anos de 1994 e 2014, nos Estados Unidos da América, são oriundos de produtos naturais, seja a partir do isolamento de moléculas, semi-síntese das mesmas ou síntese orgânica com inspiração em estruturas químicas encontradas na natureza (NEWMAN; CRAGG, 2016).

Em odontologia, podemos citar as moléculas com propriedades anestésicas, elaboradas a partir do isolamento da cocaína do *Erythroxylum coca*, antibióticos sintetizados a partir de substâncias produzidas por fungos, ou anti-inflamatório, elaboradas a partir de produtos naturais.

Outros produtos, a exemplo de extratos obtidos de plantas, comercialmente reconhecidos com medicamentos fitoterápicos fazem parte do arsenal terapêutico utilizado na clínica odontológica. Neste

produtos podemos encontrar extratos obtidos de *Chamomilla recutita* ou *Cordia Verbenacea*, por exemplo.

Neste capítulo apresentaremos aspectos teóricos e práticos necessários à condução de investigações científicas, retratando uma abordagem não específica para determinada planta ou produto natural, mas com fundamentais para o processo de planejamento e execução dos experimentos, sejam de natureza clínica ou não.

Histórico de Utilização de Produtos Naturais em Odontologia

As práticas de utilização de produtos naturais com fins medicinais é um estágio científico de uma antiguidade renovada. Representa não só um resgate dos conhecimentos advindos dos primórdios da civilização, mas um caminho real, capaz de utilizar o potencial da biodiversidade existente, das plantas medicinais dos nossos múltiplos biomas.

Dentre os produtos naturais, os obtidos de plantas medicinais são mais utilizadas e colaboraram para formulação do termo “Fitoterapia”, que deriva da união da palavra “Phyton” = vegetal e “Therapeia” = terapia. Henri Leclerc introduziu esse termo, que foi denominado pelo dicionário Aurélio como o “Tratamento de doença mediante o uso de plantas “. Assim, a Fitoterapia, é uma terapêutica caracterizada pelo uso de drogas de origem vegetal e seus derivados em diferentes formas farmacêuticas, a exemplo das cápsulas, comprimidos, balas, géis, pomadas, soluções aquosas, soluções hidroalcoólicas e chás – (infuso e decocto).

O homem, no início da sua existência, descobriu e utilizou as plantas como alimentos e para fins curativos. Tais fatos são comprovados por documentos, como o Papiro Ebers, datado do ano de 1500 a.C. escrito no Antigo Egito, pelos Sumérios, na Mesopotâmia que descrevem, em tratados médicos-farmacêuticos e na China em relatos de 2500, a.C. sobre o uso de plantas medicinais. É interessante citar que a literatura médica medieval da Inglaterra, dos séculos XII e XIV relata que os cuidados com os dentes era em grande parte limitados aos tratamentos não-invasivos, que em sua maioria, envolviam as ervas medicinais.

No Brasil, historicamente, existem relatos de trabalhos escritos que advém do século XVIII, como a Tese defendida por Theodoro Perkolt Junior na Faculdade de Medicina do Rio de Janeiro em 28 de setembro de 1881: Plantas adstringentes brasileiras - Produtos naturais em cremes dentais - *Zizyphus joazeiro* Mart, e *Theobroma cacao* Linné, bem como os relatos de viajantes interessados nas riquezas naturais brasileiras são contundentes em deixar claro a utilização desses produtos pelas populações nativas.

Atualmente, do ponto de vista político-institucional, a publicação da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) pelo Ministério da Saúde, contribuiu de modo significativo para divulgação e práticas para o uso da fitoterapia no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS). No entanto, ainda é incipiente uma prática odontológica que incorpore produtos de origem natural no planejamento terapêutico.

Entretanto, é possível vislumbrar a aplicabilidade e necessidade da fitoterapia em odontologia, considerando que preparações farmacêuticas elaboradas a partir de plantas medicinais podem apresentar atividades biológicas de interesse para área, a exemplo das ações antimicrobiana, anti-inflamatória, cicatrizante, anti-ulcerogênica, reparação óssea, evidencição de biofilmes, limpeza e desinfecção de canais radiculares, dentre outras

Do ponto de vista do uso de medicamentos fitoterápicos, produtos tecnicamente elaborados pela indústria farmacêutica, no Brasil, com aplicação na prática odontológica, podemos citar Papacarie* (*Carica papaya* L., conhecido como Mamoeiro) Nenê Dent n° (apresenta em sua composição *Chamomilla recutita*, sendo indicado para controle de dor, prurido e inflamação associados à erupção dentária), Ad Muc* (*Chamomilla recutita*, usado para promoção de cicatrização de feridas na mucosa bucal, pois apresenta efeitos antibacteriano e anti-inflamatório), Eugenol* (*Caryophilus aromaticus* L., conhecido como cravo da índia, com reconhecida ação antimicrobiana e – anti-inflamatória, Acheflan* (*Cordia Verbenacea*, cujo nome popular é erva-baleeira, de uso externo para controle de lesões inflamatórias em afecções musculoesqueléticas.

O contexto da fitoterapia aplicada à odontologia é complexo. Em consulta à farmacopeia nacional poucos são os produtos fitoterápicos indicados para problemas bucais. Em adição, a cavidade bucal apresenta algumas peculiaridades: a) ambiente com mucosa vulnerável às agressões mecânicas e químicas; b) tecido lingual com papilas e projeções que podem impedir a penetração de antimicrobianos; c) elementos dentários com biofilme microbianos de composição mista (bactérias aeróbicas e anaeróbicas, fungos). A saliva, líquido imprescindível para a digestão/saúde e consequentemente para o perfeito funcionamento do corpo humano, dificulta a aderência e absorção de determinados medicamentos. Por esse motivo, novas formulações e formas de delivery são importantes para os produtos voltados para a saúde bucal.

Além desses aspectos relacionados aos indivíduos, é extremamente importante que as pesquisas científicas considerem métodos e técnicas capazes de produzir informação seguras e produtíveis proporcionando geração de novas hipóteses investigativas e reprodutibilidade dos achados. A seguir mencionaremos os principais aspectos relacionados à investigação científica com produtos naturais.

Aspectos metodológicos envolvidos na pesquisa com produtos naturais

1) Coleta e identificação botânica

As plantas com propriedade terapêuticas devem ser cultivadas em locais com exposição solar, fornecimento adequado de água de boa qualidade e distante de esgotos e trânsito, respeitando-se as necessidades individuais de sistemas de adubação. A utilização de produtos químicos como agrotóxicos é condenada durante o plantio destas espécies, considerando-se a possibilidade de ocorrência de interações químicas que alterem a estrutura e a atividade farmacológica dos princípios ativos. No entanto, mantendo-se as condições adequadas de cultivo as plantas medicinais não apresentam suscetibilidade ao ataque de doenças e pragas.

O teor de princípios ativos produzidos por uma espécie vegetal apresenta alta variabilidade, dependendo órgão da planta coletado, estágio de desenvolvimento, época do ano e hora do dia. Portanto, para se estabelecer

as condições ideais de coleta de uma planta medicinal, deve-se conhecer a fisiologia da planta visando a obtenção de um material com alto teor de princípios ativos. Para melhor padronização dos extratos obtidos das plantas é válido considerar um estudo dos mesmos em função da sazonalidade (RODRIGUES, 2004). Além disso, o teor de micro e macronutrientes do solo influenciam a composição química dos produtos extraídos. A tabela 1 apresenta diferenças relativas à atividade antifúngica de óleos essenciais extraídos de *Mentha pipetira* (Menta) cultivada em diferentes tipos de adubação.

Durante o processo de colheita deve-se evitar plantas doentes, incidência direta de raios solares sobre flores e folhas. Recomenda-se a realização da colheita de plantas contendo óleos essenciais no período da manhã e de plantas com glicosídeos no período da tarde. Além disso, dias chuvosos podem influenciar a composição dos produtos coletados, devendo, portanto, serem evitados.

TABELA 01: Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) de óleos essenciais extraído de *Mentha pipetira* (Menta) cultivada em diferentes meios de adubação sobre espécies de *Candida krusei*. Os valores da CIM e CFM são expressos em µg/mL.

O.E. <i>Mentha piperita</i>	<i>Candida krusei</i> ATCC 34135		
	CIM	CFM	CFM/CIM Razão*
Adubação 1	250	250	1
Adubação 2	>100	>100	≠
Adubação 3	>100	>100	≠
Adubação 4	250	250	1
Adubação 5	250	250	1
Adubação 6	500	500	1
Adubação 7	500	500	1

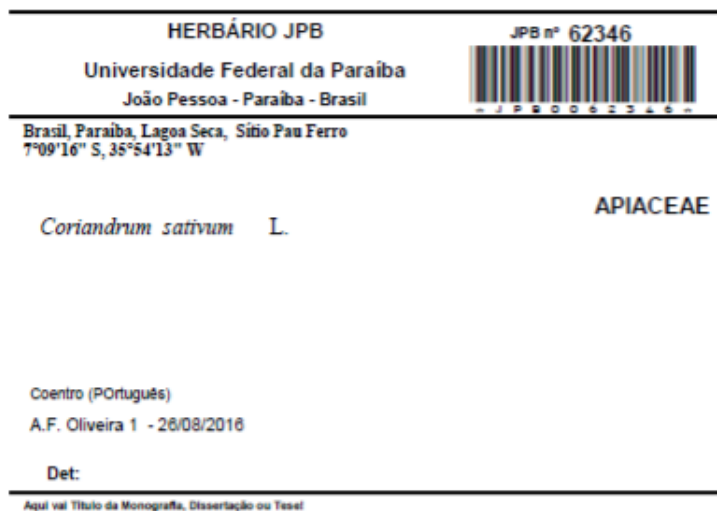
*CFM/CIM Razão ≥ 4 atividade fungistática, ou < 4 atividade fungicida.

≠ Não determinado.

Considerando que as plantas medicinais frequentemente utilizadas pela população são costumeiramente conhecidas por seus nomes populares e que o reconhecimento da sua verdadeira identidade pode variar muito de uma região para outra, faz-se necessária a correta identificação botânica das espécies coletas, evitando-se ambiguidades e minimizando o surgimento de intoxicações aos usuários.

A identificação botânica é realizada sempre que se deseja saber o nome de um exemplar coletado ou encontrado na natureza e consiste na comparação com uma espécie já descrita. Popularmente, as plantas medicinais são identificadas usando-se os sentidos e a memorização dos aspectos de importância. Para a identificação científica faz-se necessária a elaboração de uma exsicata e posterior comparação com espécies já classificadas em coleções de herbário. Esta identificação deve ser realizada por um profissional especialista e credenciado como botânico, que normalmente atuam como responsáveis por herbários institucionais, comumente localizados em instituição de ensino e pesquisa, além de jardins botânicos. Para a elaboração da exsicata as plantas coletadas com suas estruturas reprodutivas, flores e folhas devem ser submetidas à secagem à sombra e prensadas em jornal. Após a secagem a planta deve ser fixada em cartolina com linha e agulha e adicionada etiqueta com as seguintes informações: nome científico e populares, local, data de coleta e nome do coletor (SILVA; SANTOS; RABELO, 2010).

FIGURA 01: Identificação botânica de *Coriandrum sativum* L. (coentro) utilizado em pesquisa conduzida pelos autores deste capítulo.



2) Métodos de extração e identificação de princípios ativos e marcadores químicos de plantas medicinais de interesse para a odontologia

As plantas coletadas e identificadas podem ser utilizadas como material fresco, garantindo uma ação mais eficaz das suas propriedades terapêuticas. No entanto, o alto teor de umidade presentes em órgãos como flores e folhas favorecem a sua rápida deterioração. Alternativamente, os vegetais com propriedades terapêuticas podem ser submetidos à secagem para comercialização ou à extração de princípios ativos.

A extração é uma operação físico-química, na qual um solvente com determinadas características químicas mantém contato direto com a microestrutura da matriz vegetal formada por células, espaços intracelulares, capilares e poros, provocando a transferências dos princípios ativos contidos nas plantas para o solvente (CLARKE, 1985).

O rendimento de uma extração de compostos de um vegetal é influenciado por várias condições, tais como as características do material, do solvente, agitação, temperatura e tempo necessário para realização do processo (SIMÕES, et al., 2007). No sentido de otimizar este processo a planta deve ser previamente triturada, proporcionando o aumento da área de contato entre o solvente e a matriz vegetal.

A seleção do solvente apropriado para a extração vegetal deve considerar a polaridade das substâncias de interesse, devendo-se utilizar o solvente, ou mistura de solventes, que apresente polaridade mais próxima às moléculas que devem ser extraídas. No caso da extração de material desconhecido do ponto de vista fitoquímico, recomenda-se submeter o material a uma extração com misturas etanólicas ou metanólicas. Praticamente todos os constituintes de interesse para a farmacoquímica e farmacologia apresentam alguma solubilidade nos solventes mencionados. O material obtido desta extração deverá ser seco em rotoevaporador, visando-se a retirada do solvente e obtenção do extrato bruto seco, que poderá ser submetido a sucessivas extrações, com solventes de polaridade crescente. No final deste processo serão obtidas várias frações, uma para cada solvente utilizado, contendo compostos químicos com diferentes polaridades, a exemplo do acetato de etila, clorofórmio, hexano, etc, apresentados em ordem de menor para maior polaridade, conforme apresentado no quadro 1. As frações obtidas ao fim do processo de extração com esses solventes podem ser submetidas a técnicas cromatográficas que visam a separação e isolamentos de substâncias.

QUADRO 01: Principais solventes utilizados no processo de extração de produtos naturais e graus de polaridade

Solvente	Grau de polaridade
Água	++++++
Metanol	+++++
Etanol	++++
Acetato de etila	+++
Diclorometano	++
Hexano	+

* Maior número de + indica maior polaridade da substância

Os métodos de extração sólido-líquido podem ser realizados à frio ou à quente. Os métodos que utilizam altas temperaturas são mais rápidos do que os realizados à baixas temperaturas. Este fato justifica-se na observação que qualquer substância tem sua solubilidade aumentada com o aumento da temperatura. No entanto, considerando-se que muitas substâncias são instáveis em altas temperaturas, os métodos de extração à quente não devem ser empregados para todas as plantas medicinais. Os métodos de extração a frio mais utilizados são a maceração e a percolação, enquanto que a infusão, decocção, extração sob refluxo e extração em aparelho de Soxhlet são os mais empregados para as extrações à quente.

Considerando-se que muitas atividades farmacológicas atribuídas à compostos extraídos de plantas medicinais estão diretamente relacionadas à classe química a qual estas moléculas pertencem, torna-se imprescindível a realização da classificação química das substâncias vegetais. Para tanto, pode-se submeter o extrato bruto, frações ou composto purificado a reações químicas que resultem no desenvolvimento de coloração e/ou precipitado característico. Como exemplo, citam-se os reativos de Dragendorff, Mayer, Wagner e Bertrand, todos utilizados para identificação de alcaloides.

Após a classificação química de uma substância isolada através de reativos específicos, deve-se proceder a sua elucidação estrutural

utilizando-se métodos físicos de análise, tais como, espectrometria de massa, espectroscopia no ultravioleta (UV), no visível e no infravermelho e ressonância magnética nuclear (RMN) de hidrogênio e carbono. A figura 2 apresenta esquema de extração e isolamento de substância química (caulerpina) de planta medicinal com potencial biológico a partir destes métodos de identificação.

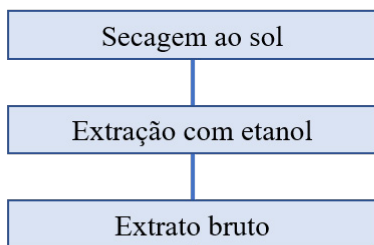
A avaliação farmacológica aliada ao estudo da estrutura química de uma molécula permite a identificação dos grupos químicos (farmacóforo) responsáveis pela atividade desenvolvida, contribuindo para elucidação do provável mecanismo de ação. Estudos *in silico*, a exemplo do docking molecular e ensaios biológicos (estudos de expressão gênica, de proteômica ou utilização de estratégias farmacológicas com uso de antagonistas) são requeridos para confirmar os mecanismos moleculares envolvidos na interação das moléculas identificadas e sítio de ligação no receptor farmacológicos.

É importante destacar que a descoberta das substâncias extraídas de produtos naturais com destacável atividade biológica representa um importante passo para o avanço na síntese laboratorial e realização de reações orgânicas de semi-síntese com finalidade de promover modificações estruturais que confirmem melhores propriedades farmacodinâmicas e farmacocinéticas de novas estruturas moleculares. Estes processos fomentam a formulação de produtos farmacêuticos a base de fitofármacos ou fitoterápicos padronizados, eficazes e seguros para uso em seres humanos.

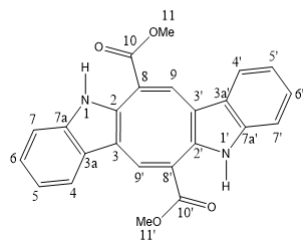
FIGURA 02: Processo de extração e isolamento de substância química (caulerpina) de planta da flora marinha com potencial medicinal (*Caulerpa racemosa*).



Coleta de *Caulerpa racemosa* realizada em Pitimbu, Paraíba



Extração de caulerpina



3) Principais modelos para avaliação de atividades biológicas de produtos naturais de interesse para odontologia

Neste capítulo abordaremos modelos metodológicos incipientes, porém necessários, para avaliação de atividade biológica de produtos naturais de interesse para principais patologias bucais, que são, geralmente, de origem infecciosa e de caráter inflamatório. Após essa avaliação inicial, estratégias metodológicas com maior especificidade e sensibilidade, como as que adotam mecanismos moleculares e genéticos, por exemplo, devem ser conduzidas para melhor compreensão das referidas atividades biológicas.

Abordaremos, portanto, metodologias relacionadas às atividades antimicrobiana, imunomoduladora, citotóxica e antinociceptiva orofacial.

a) Atividade antimicrobiana

As principais patologias bucais, ainda de alta prevalência de países desenvolvidos e em desenvolvimento, a exemplo de cárie dentária e doença periodontal, e seus desdobramentos em estágios avançados dessas doenças (infecções endodônticas e periapicais, periodontite e abscessos periodontais, por exemplo) impulsionam a realização de investigações científicas voltadas à descoberta de estratégias farmacológicas ou não para prevenção e/ou controle das mesmas.

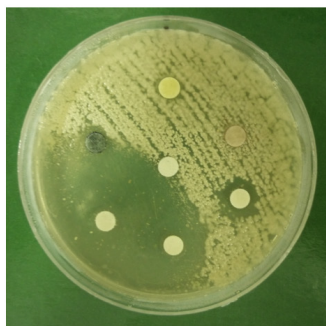
Nos últimos tempos devido a crescente incidência dos efeitos adversos associado às drogas licenciadas, bem como o aumento de resistência microbiana aos antibióticos e a importância clínica dada às infecções, em especial, aquelas instaladas em indivíduos imunocomprometidas, tem-se conduzido cada vez mais as pesquisas para avaliação antimicrobiana de produtos de origem natural (PAULO et al., 1992).

Os estudos das propriedades antimicrobianas de produtos naturais e/ou sintéticos, incluindo extratos, frações, óleos fixos e voláteis, compostos isolados ou semi-sintetizados tem sido comprovadas através de pesquisas no mundo inteiro (OLIVEIRA FILHO et al., 2016). No geral, essas propriedades são estudadas, avaliadas e confirmadas utilizando-se ensaios biológicos *in vitro*, a exemplo de testes de sensibilidade, onde são determinadas os efeitos bacteriostáticos/bactericidas, fungistáticos/fungicidas dos produtos avaliados. O estudo de atividade antimicrobiana de produtos naturais, compostos isolados ou semi-sintéticos é avaliado através da determinação de uma pequena quantidade do produto ou substância necessária para inibir o crescimento do micro-organismo de interesse: esse valor é conhecido como Concentração Inibitória Mínima– CIM (CLSI, 2012; 2002). Nesse contexto, um critério relevante na determinação da CIM de produtos vegetais é a preocupação quanto aos aspectos toxicológicos e legais pertinentes aos produtos naturais (PINTO et al., 2003).

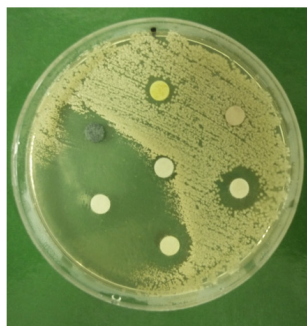
De modo geral, os ensaios são realizados por meio de técnicas padronizadas, inicialmente sem alvos específicos, sendo as mais utilizadas o método de difusão em meio de culta sólido previamente inoculado com o microrganismo de interesse, seja este de coleção de referência (American Type Culture Collection - ATCC ou Central Bureau voor Schimmelcultures - CBS, por exemplo) ou de origem clínica.

Para realização desse ensaio usa-se placas de Petri (15 x 90 mm), descartáveis e estéreis (podem ser utilizadas placas de vidro previamente esterilizadas). É depositado, na placa, 1 mL do inóculo de cada microrganismo, previamente preparado e ajustado quanto à sua concentração, que depende da espécie do micro-organismo estudado (10^6 UFC/mL para estreptococos orais, como *Streptococcus mutans*, e 10^8 para leveduras do gênero *Candida*, por exemplo). Na sequência, adicionam-se 20 mL do meio de cultura sólido fundido (Agar Nutriente ou Muller-Hinton e Agar Sabouraud Dextrose, para bactérias e fungos, respectivamente) e resfriado a 45-50°C. Deve-se, então ser feita homogeneização lenta e, após solidificação do meio, são depositados discos de papel de filtro de 6 mm de diâmetro esterilizados impregnado com produto teste em concentrações definidas pelo pesquisador. Opcionalmente, poderão ser realizadas cavidades com 6 mm de diâmetro no meio sólido com cânulas de vidro e incluídos 50 µL de cada produto testado em concentrações diversas. É realizado controle para cada micro-organismo e com antimicrobianos padrão, de acordo com cada espécie estudada. Todo sistema de ensaio é incubado em temperatura e tempo adequados ao crescimento do micro-organismo em análise. A figura 2 apresenta atividades antifúngicas, representadas pelos halos de inibição de crescimento microbiano, de óleos essenciais extraídos de plantas medicinais.

FIGURA 03: Halos de inibição produzidos por óleos essenciais extraídos de plantas medicinais sobre *Candida albicans* e *Candida tropicalis*.



Candida albicans



Candida tropicalis

Os resultados obtidos a partir da realização do teste de difusão em ágar sugerem uma medida quantitativa (medição do diâmetro do halo de inibição) e qualitativa da atividade biológica do produto testada. Este último tipo de análise leva em consideração aspectos relacionados à solubilidade da substância avaliada, composição química do meio de cultura e sua propriedade hidrofílica. Estes aspectos podem limitar a difusão da substância no meio de cultura e não alcançando, dessa forma, os microrganismos mais distantes do seu local de aplicação, promovendo, com frequência, resultados falso negativos.

Atualmente, o métodos de avaliação antimicrobiana em meios de cultura líquidos são melhor aceitos pela comunidade científica, considerando as limitações já mencionadas para o teste de difusão em meio sólido, que são amplamente utilizados para realização de *screening* da atividade antimicrobiana de um hall de produtos naturais sob investigação. Os métodos que utilizam meios de cultura líquido são denominados de macro e microdiluição (CLSI, 2012; 2002). Neste capítulo abordaremos a realização de último, pois o mesmo representa uma otimização de tempo e recursos financeiros necessários à sua condução.

Os ensaios para avaliar atividade antibacteriana e/ou antifúngica de um produto natural e/ou sintético pela técnica de microdiluição, conforme

os protocolo proposto pelo CLSI (2012; 2002), são os mais difundidos pela literatura científica. Para realização do mesmo, são utilizadas placas de 96 poços com fundo em forma de “U”, em que são distribuídos 100 µL de meio de cultura. Em seguida, são distribuídos 100 µL dos produtos testados, em contrações definidas pelo pesquisado. Sugere-se que a concentração inicial do produto testado seja 1000 µg/mL, que será submetida a diluições seriadas. Por fim, são dispensados 100 µL do inóculo microbiano em cada orifício da placa, onde cada linha será representada por uma única cepa. Em paralelo são realizados o controle de viabilidade para cada micro-organismo, utilizando poços apenas com meio de cultura e inóculo de cada espécie microbiana, o controle de susceptibilidade das cepas frente a ação aos antimicrobianos padrão e o controle de esterilidade, utilizando poços apenas com meio de cultura.

As placas são seladas e incubadas em estufa microbiológica em temperatura e tempo requeridos pela espécie microbiana, e, posteriormente, deverá ser realizada leitura por meio de verificação visual do crescimento dos micro-organismos. O ensaio deve ser realizado em triplicada, em três momentos distintos, e o resultado expresso pela moda das CIMs obtidas.

Em seguida, pode ser determinada a Concentração Bactericida ou Fungicida Mínima (CBM/CFM). Após leitura da CIM, alíquotas de 10 µL do sobrenadante das cavidades nas placas de microdiluição onde se observa completa inibição do crescimento do micro-organismo, são semeadas em placas contendo o meio de cultura compatível com cada grupo de micro-organismo. O ensaio é incubado em temperatura e tempo requeridos pela espécie microbiana, e a CFM será considerada como a mais baixa concentração capaz de inibir o crescimento microbiano. Os ensaios devem ser realizados em triplicada, em três momentos distintos, e o resultado é expresso pela moda das CFM's obtidas (NCUBE; AFOLAYAN; OKOH; 2008). A relação CFM/CIM poderá ser calculada para determinar a natureza fungistática/bactericida ($CFM/CIM \geq 4$) ou fungicida/bacteriostática ($CFM/CIM < 4$) (SIDDIQUI et al., 2013).

b) Atividade anti-inflamatória *in vitro*

São diversas as metodologias não clínicas, incluindo modelos *in vitro* e com emprego de animais, empregadas para avaliação de atividade imunomoduladora de produtos naturais e/ou sintéticos. Neste item abordaremos aspectos gerais relacionados a avaliação *in vitro* da atividade anti-inflamatória de produtos naturais sobre células eucarióticas (macrófagos) e sua propriedade de ação sobre produção de NO.

A linhagem celular, que deve ser preferencialmente padronizada, a exemplo dos macrófagos murínicos Raw 264.7 extraídos de camundongo com leucemia, são cultivados e mantidos em meio nutritivo (Dmem) contendo em sua composição 10% de soro fetal bovino e 1% de solução antibiótica com 1000U/mL de penicilina G e 100U/mL de sulfato de estreptomicina (BUENO-SILVA et al., 2017).

Sequencialmente, essas células, em concentração de 1×10^5 células/poço (uso de placas de cultura de 96 poços) devem ser ativadas com adição de agente indutor de processo inflamatório (por exemplo: lipopolissacarídeo (LPS) de *E. coli* com concentração final de 500 ng/mL). Após desse processo, alíquotas do produto natural, em concentração pré-determinada, são adicionadas a cada poço e as placas incubadas por 48 horas a 37°C em uma atmosfera contendo 5% de CO₂. Os controles devem ser conduzidos com poços contendo somente células, células com agente indutor de inflamação, como LPS de *E. coli* sem adição do produto natural, e células somente com produto natural.

A produção de NO é determinada através de mensuração de nitritos nos sobrenadantes das culturas celulares pelo método de Griess. Alíquotas de 50 µl do sobrenadante das culturas celulares serão incubadas com um volume igual de reagente Griess, e a densidade óptica (D.O) é determinada em leitor de ELISA, com comprimento de onda ajustado para 540 nm. Os resultados são expressos em µM de NO₂⁻ com base em curva padrão com concentrações conhecidas de nitrito de sódio (NaNO₂).

A viabilidade celular pode ser determinada utilizando MTT [3(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide. Após 48h

de cultivo celular, são adicionados 5 mg/ml de solução de MTT por poço e posterior incubação a 37°C por 3h. Posteriormente, deve ser feita a adição de 100 µl de solução de SDS (10%) e incubação por 18h a 37°C. A leitura deverá ser realizada em leitor de ELISA, co DO de 540 nm. A viabilidade de 100% é considerada para os valores de DO obtidos nas amostras de poços controle, contendo somente células (Bueno-Silva et al., 2015).

Em situações em que os produtos naturais ou moléculas apresentem bons resultados nesses dois testes in vitro, outros ensaios podem ser realizados para avaliação do efeito dos mesmos na produção de TNF-α, IL-6 e IL-10 no sobrenadante da cultura de macrófagos tratados com o produto teste por meio de reações de ELISA.

Testes iniciais que consideram modelo animais são bem representados pela avaliação do recrutamento de leucócitos para a cavidade peritoneal, utilizando-se camundongos machos com pesos e idade padronizadas (20 a 25 g e 8 semanas de idade), preferencialmente livres de patógenos específicos. De modo resumido, inicialmente, é realizada aplicação subcutânea do produto de origem natural, por via oral ou parenteral, em concentração pré-determinada, seguida da administração intraperitoneal do estímulo inflamatório, como carragenina (geralmente 500 µg por cavidade). Após estas etapas, as células deverão ser retiradas após lavagem da cavidade peritoneal com PBS acrescido de EDTA, para a contagem total de células. A contagem diferencial pode ser realizada pelo preparo de esfregaços em cito-centrífuga, as quais são corados por Rosenfeld, utilizando microscópio óptico através da objetiva de imersão em óleo (aumento de 1000x). Caso a administração diminua a contagem leucocitária em relação aos controles, a mesma será considerada como potencial agente anti-inflamatório.

c) Atividade antinociceptiva orofacial

Para avaliação da atividade antinociceptiva orofacial, abordaremos o modelo de análise comportamental animal em condições inflamatórias, conhecido como Comportamento Espontâneo de Fricção (*Spontaneous*

grooming behavior), que consiste na observação e quantificação dos comportamentos caracterizados pela fricção do animal, considerando o tempo (em segundos) que o animal permaneceu friccionando a área injetada com as patas traseiras ou dianteiras (ROMERO-REYES et al., 2012).

A técnica consiste em aplicar, via oral ou parenteral, a substância a ser avaliada 30 minutos antes da injeção dos agentes indutores de nocicepção. As doses sugeridas para avaliação da eficácia farmacológica devem baseadas em estudos prévios para avaliação do efeito antinociceptivo em modelos clássicos (teste de contorções abdominais e edema de pata, por exemplo). Os controles também devem ser conduzidos (negativo, com uso de solução de NaCl como controle negativo; e sulfato de morfina ou codeína (ou outra agente farmacológico com reconhecida ação analgésica). Após os 30 minutos iniciais, os agentes indutores de nocicepção (formalina, capsaicina e glutamato, por exemplo) serão aplicados na região de lábio superior direito (perinasal) do camundongo.

O experimento deve ser conduzido a partir da utilização de caixas de madeira em formato triangular, com duas paredes de 25cm de altura e largura, formadas por espelho e uma de vidro transparente. O pesquisador, previamente calibrado, fará a observação direta intensiva do comportamento do camundongo. Ele portará um cronômetro para contagem do tempo, em segundos, o qual o animal apresentará o comportamento nociceptivo (fricção da área na qual recebeu o agente indutor de nocicepção com as patas traseiras ou dianteiras).

Considerações Finais

Apesar de seu caráter milenar, o uso de produtos naturais ainda é discriminado por grande parte dos profissionais de saúde e a defesa pela sua prática nem sempre é fácil. O aporte financeiro disponível para pesquisas no nosso país nem sempre contempla o pesquisador de maneira adequada. Os incentivos são incipientes e a utilização de produtos naturais na odontologia agrega-se aos poucos estudos clínicos controlados aleatórios. Aliado a este fato, o desconhecimento e a falta de capacitação profissional também contribuem para esse desinteresse.

E, mesmo considerando que a maioria dos medicamentos disponíveis é desenvolvida direta ou indiretamente de fontes naturais, no Brasil, há escassez de depósitos de patentes para esta finalidade. Há pouco investimento voltado à utilização do vasto potencial da nossa flora nativa, formada pelos biomas da Amazônia, dos cerrados, do pantanal, dos pampas, da mata atlântica, da caatinga, limitando, assim o desenvolvimento e a prática da fitoterapia nos processos de cuidado em saúde.

Verifica-se, portanto, que, no contexto atual, impera a necessidade de novas pesquisas com vistas à descoberta e ao desenvolvimento racional de novos produtos ou metabólitos secundários, derivados de produtos naturais e/ou sintéticos, com propriedades terapêuticas. Então, a meta geral é encontrar novos e efetivos produtos naturais e/ou sintéticos com propriedades antimicrobianas com novos modelos de ação. As plantas medicinais que possuem propriedades antimicrobianas e /ou terapêuticas, vêm sendo largamente estudadas nas últimas décadas no Brasil e no mundo. Há determinados fatores que estimulam o interesse pelo assunto, como a confiabilidade medicinal passada pelas populações, a fácil aquisição das plantas medicinais, o baixo custo, baixa ou ausência de toxicidade e a diminuição da credibilidade da medicina ortodoxa. Por estas razões, vários grupos de pesquisadores têm se dedicado ao estudo das plantas medicinais dentro dos parâmetros da etnomedicina, etnofarmacologia, fitoquímica, farmacologia, biologia molecular, bem como aos estudos de estratégia de modificação molecular racional para entender o mecanismo de ação dos princípios ativos contidos nas plantas. E somente assim, será possível se conseguir a produção de fármacos para serem utilizados como modelo para o desenvolvimento de moléculas sintéticas apropriadas e viáveis para a produção de medicamentos eficazes no tratamento das doenças infecciosas.

Referências

BUENO-SILVA, B; KAWAMOTO, D.; ANDO-SUGUIMOTO, E.S.; ALENCAR, S.M.; ROSALEN, P.L.; MAYER, M.P.
Brazilian Red Propolis Attenuates Inflammatory Signaling

Cascade in LPS-Activated Macrophages. **PLoS One**,
Dezembro, v. 10, n. 12, p. e0144954, 2015.

BUENO-SILVA B, ROSALEN PL, ALENCAR SM, MAYER
MP. Anti-inflammatory mechanisms of neovestitol from
Brazilian red propolis in LPS-activated macrophages. **Journal
of Functional Foods**, v.36, n.1, p. 440-447, Setembro, 2017.

CLARK, N. A. Surface memory effects in liquid crystals:
Influence of surface composition. **Physical Review Letter**,
v.55, p.292 - 295, 1985.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. **Reference
Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility
Testing of Yeasts**, CLSI Document M27-A2, CLSI,
Philadelphia, Pa, USA, Second edition, 2002.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. **Reference
Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests
for Bacteria that Grow Aerobically**; Approved Standard, 9th
edn, M07-A9 Wayne, PA Clinical and Laboratory Standards
Institute 2012;. p.70.

NCUBE N. S.; AFOLAYAN A. J.; AND OKOH. A. I.
.Assessment techniques of antimicrobial properties of natural
compounds of plant origin: current methods and future
trends. **Afr. J. Biotechnol.**, v. 7 n.12, p. 1797-1806, 2008.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as
sources of new drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural
Products**, Março, v. 79, n. 3, p. 629-61, 2016.

OLVEIRA FILHO, A. A.; FERNANDES, H. M. B.; SOUSA,
J. P.; MEIRELES, D. R. P.; BARBOSA FILHO, JOSÉ MARIA;
PESSOA, H. L. F.; LIMA, E. O.; MAIA, G. L. A. Antimicrobial
effect of the chloroform phase of *Praxelis clematidea* R. M.
King & Robinson. **Int. Journal of Pharmacognosy and
Phytochemical Research (IJPPR)**, v.7, p.1-11, 2015.

PAULO, M. Q.; LIMA, E. O.; QUEIROZ, E. F.; KEPLAN, M. A. C. Chemical and antimicrobial analysis obtained of essential oil of *Annonaceae*. **Phytochem. Soc. North Am. Newslett.**, Baltimore, v. 32, n. 1, p.27, 1992.

PINTO, T. J. A.; KANECO, T. M.; OHANA, M. T. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2003. 325 p.

RODRIGUES, V. G. S. **Cultivo, uso e manipulação de plantas medicinais**. Porto Velho: Embrapa Rondônia, 2004.

ROMERO-REYS, M. et al. Spontaneous Behavioral Responses in the Orofacial Region: A Model of Trigeminal Pain in Mouse. **Headache**. v.6, n.1, p.137-151, 2013.

SILVA, A. F.; SANTOS, A. P.; RABELO, M. F. R. Identificação botânica das plantas medicinais. **Plantas medicinais e aromáticas**. V. 31, n. 255, 2010.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6 ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Editora da UFSC, 2007.

Capítulo 8

TÉCNICAS HISTOMORFOMÉTRICAS DO TECIDO MINERALIZADO APLICADO A PESQUISA EXPERIMENTAL NA ODONTOLOGIA

*Fátima Regina Nunes de Sousa
Vanessa Costa de Sousa Ferreira
Renata Ferreira de Carvalho Leitão*

Introdução

O tecido mineralizado é constituído do tecido ósseo e dentário (esmalte, dentina e cimento), importantes componentes da cavidade bucal, particularmente dos dentes e periodonto. Em comum, apresentam uma matriz inorgânica formada de íons, como cálcio e fosfato, que são responsáveis pela característica de dureza específica nestes tecidos. O conhecimento da estrutura dos tecidos mineralizados é de especial interesse na pesquisa odontológica, principalmente de modelos experimentais em animais, com a finalidade de avaliação das células e matriz extracelular através de técnicas histomorfológicas, diferenciando as características normais dos tecidos e suas alterações.

O tecido ósseo é um tipo de tecido conjuntivo especial, rígido, altamente vascularizado e metabolicamente ativo (FLORENCIO-SILVA et al., 2015). A matriz óssea apresenta componentes orgânicos (35%) e inorgânicos (65%). A parte orgânica é constituída de fibras colágenas tipo I, proteoglicanas e proteínas não colagênicas (osteocalcina, osteopontina, osteonectina) (LU et al., 2018). A parte inorgânica é constituída de íons, como cálcio, fosfato, zinco, flúor, magnésio (FIELD et al., 2000).

Componentes celulares do tecido ósseo apresentam células de duas linhagens diferentes: Linhagem osteoblásticas (células osteoprogenitoras,

osteoblastos e osteócitos), com origem embriológica mesenquimal; Linhagem osteoclástica (osteoclastos) origem embriológica hematopoiética, provenientes dos monócitos. Osteoblastos são células mesenquimais da medula óssea, de revestimento, na superfície óssea, com função de controle da concentração plasmática de cálcio, sendo considerados os sítios primários da troca de íons entre o sangue e o osso (YANG et al., 2001). São células engajadas na síntese, glicosilação e secreção de proteínas, como fosfatase alcalina, osteocalcina, osteopontina e colágeno tipo I (ALPHY et al., 2018). Osteócitos são diferenciados dos osteoblastos por proteínas morfogenéticas ósseas (BMP) e fator de crescimento transformante- β . São células altamente ramificadas com seu corpo celular nas lamelas (UDA et al., 2017). Seus prolongamentos são responsáveis pela comunicação celular permitindo o controle da remodelação óssea por meio de detecção de cargas mecânicas (WU et al., 2017). Osteoclastos são células multinucleadas com média de 3 a 15 núcleos, apresenta na membrana plasmática receptor da calcitonina e fosfatase ácida resistente ao tártaro (TRAP), além de sintetizar e liberar catepsina K, adenosina trifosfato, isozima anidrato carbônica II que auxiliam na função de degradação da matriz óssea, promovendo a reabsorção óssea (TEITELBAUM; ROSS, 2003).

Os tecidos dentários, com exceção do esmalte, têm origem ectomesenquimal e, portanto, natureza conjuntiva, com matriz extracelular constituída principalmente por colágeno tipo I e proteínas não colágenas. A dentina é secretada por odontoblastos, células presentes na periferia da polpa dentária, com características ultraestruturais típicas de uma célula sintetizadora e secretora de proteínas com o pólo ou a extremidade proximal, do lado do núcleo, e distal, do lado da matriz em formação (ARANA-CHAVEZ et al., 2004). O cimento recobre a dentina na porção radicular, são formados por cementoblastos e apresenta uma função de proteção e de inserção do ligamento periodontal ao osso alveolar. No terço apical é observado uma camada de matriz mineralizada com cementócitos, bem como a presença de cementoclastos (FRACALOSSO et al., 2009). O esmalte é originado do ectoderma, regulado por células epiteliais, ameloblastos que expressam um importante conjunto de genes que codificam a produção de proteínas essenciais para a formação deste

tecido (HALUSIC et al., 2014). Os ameloblastos sintetizam e secretam proteínas da matriz do esmalte, tais como amelogenina, ameloblastina e enamelinina. A deficiência de uma destas proteínas pode levar a má formação dentária, como hipoplasia do esmalte de diversas magnitudes de severidade (KANCHAN *et al.*, 2015).

ANÁLISE DO TECIDO ÓSSEO E DENTÁRIO DESMINERALIZADO EM MICROSCOPIA ÓPTICA

O tecido ósseo pode ter sua matriz extracelular modificada pelo processo de descalcificação, que consiste na remoção de íons como cálcio e fosfato depositados na matriz orgânica. Após a coleta do tecido mineralizado, este deve ser fixado no formol tamponado 10% por até 24 horas, seguido de lavagem em água corrente para iniciar o processo de descalcificação (DOMINGUEZ et al., 2012). A preservação das estruturas celulares é uma das dificuldades no processo de descalcificação, bem como o período necessário para realizar, que dependendo da substância utilizada pode permanecer por até 60 dias. Substâncias ácidas (ácido nítrico, ácido acético, ácido fórmico) promovem descalcificação em curto período de tempo, mas quase sempre promove a desestruturação do tecido (OLIVEIRA et al., 2009). O agente descalcificador mais utilizado é o EDTA, uma substância quelante que mantém a preservação das estruturas celulares, atuando na capturação de íons, como cálcio da camada externa do cristal de hidroxiapatita. Estes íons são, em seguida, substituídos por íons das camadas mais profundas reduzindo o tamanho dos cristais e preservando os componentes dos tecidos (CARVALHO et al., 2008).

Solução do uso do descalcificador EDTA 10%

EDTA100 g

Água destilada.....1000 ml

pH (7,4)

Procedimento:

- 1- Suspender o espécime no líquido descalcificador, com o volume igual ou superior a dez vezes o volume da peça anatômica.
- 2- Trocar o EDTA diariamente e se possível manter o frasco em agitação
- 3- Testar após 3 a 4 semanas, para verificar se já ocorreu a descalcificação
- 4- Lavar em água corrente por algumas horas
- 5- Proceder ao processamento histológico

ANÁLISES DAS CÉLULAS E MATRIZ ORGÂNICA CORADOS COM HEMATOXILINA-EOSINA (HE)

Após a descalcificação inicia o processamento histológico com a preparação das peças para serem emblocadas em parafina e posteriormente cortadas cerca de 4 μm , para analisar o tecido em microscópio óptico. O tecido mineralizado, mesmo após a descalcificação ainda permanece cerca de 85% de água, dessa forma para que a parafina entre neste material biológico é necessário que a água seja retirada, por uma etapa de processamento de desidratação, sendo o álcool etílico o produto mais utilizado para esta finalidade, e é indicado que seja feito de forma gradual de concentração até chegar no álcool absoluto (HOROBIM et al., 2008).

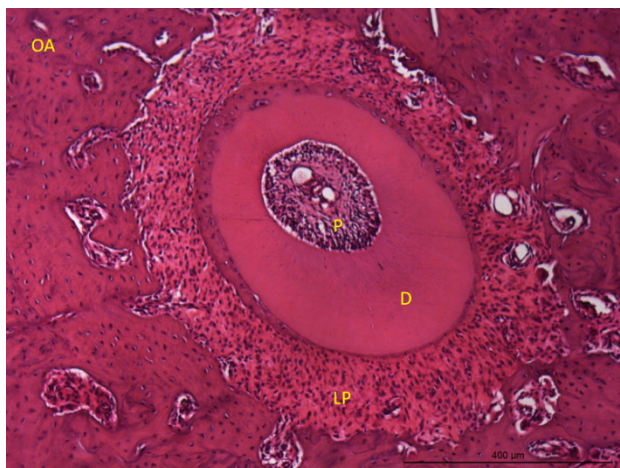
A etapa seguinte é a diafinização, que utiliza o xilol para preparar as peças a impregnação de resinas e parafinas nas peças por uma substância de consistência firme, que permite uma rigidez na realização de cortes fino, ocupando todos os espaços preenchidos por água e gordura.

Na inclusão, a parafina envolve o exterior da peça e, após esfriar e endurecer, forma um bloco que será submetido à microtomia, importante fase da preparação das lâminas, uma vez que a posição das peças determinará o corte que será realizado. Análises histológicas de modelos experimentais de periodontite induzida em animais deverão ser incluídas em plano logintudinal, enquanto modelos de movimentação dentária induzida geralmente são incluídos no plano transversal. Tais variações podem modificar de acordo com o objetivo da pesquisa e o que planeja avaliar posteriormente.

A visualização dos tecidos em microscópio óptico é possível quando estão corados, uma vez que as células são incolores e transparentes. A coloração dos tecidos pode ser feita através de corantes, de reações químicas especiais ou de deposições metálicas. Há diversos tipos de corantes utilizados, naturais ou artificiais, que podem se ligar a estruturas celulares específicos, de acordo com sua afinidade química.

A hematoxilina e eosina (HE) é o tipo de coloração mais utilizada na prática histológica. A hematoxilina, corante natural oriundo de fonte vegetal, tem afinidade por substâncias ácidas, como ácidos nucléicos, sendo responsável por corar o núcleo da célula de roxo-azulado devido ao seu caráter básico (TRIMM et al., 2005). A hematoxilina para se tornar um corante, necessita ser oxidada em hemateína e a utilização de um mordente, como alumínio ou ferro para possuir a afinidade com os tecidos. A eosina, atraída pelos elementos básicos das proteínas citoplasmáticas, confere uma coloração rósea avermelhada ao citoplasma, sendo um corante acidófilo (GATNER; HIATT, 1999).

FIGURA 01: Fotomicrografia da raiz distovestibular do primeiro molar superior



LEGENDA: Coloração de HE, magnificação de 100x. AO-osso alveolar, D-dentina, P-polpa, LP-ligamento periodontal.

FIGURA 02: Fotomicrografia da raiz distovestibular do primeiro molar superior movimentado ortodonticamente.



LEGENDA: Análises das células ósseas, com coloração HE, magnificação 200x.

FIGURA 03: Fotomicrografia da raiz distovestibular do primeiro molar superior

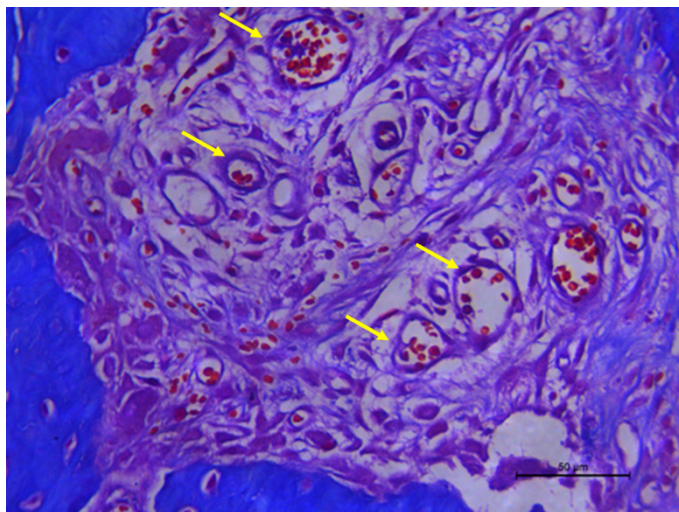


LEGENDA: Análises dos tecidos dentários (polpa, dentina e cimento), Coloração HE, magnificação 200x.

ANÁLISE DOS VASOS SANGUÍNEOS ATRAVÉS DA COLORAÇÃO DE TRICÔMICO DE MALLORY

Tricômico de *Mallory* é um corante utilizado comumente na identificação de fibras colágenas, que são evidenciadas em azul nessa coloração e que constitui a matriz orgânica dos tecidos mineralizados. Esta coloração permite melhor avaliação dos vasos sanguíneos, considerando que as hemácias e as células endoteliais são fortemente marcadas em vermelho, o que facilita a identificação dos vasos sanguíneos em análises de microscopia óptica (NARIMIYA et al., 2017). Para avaliação dos vasos sanguíneos devem ser fotografados 6 campos ou mais em um aumento de 400x na região de interesse e as fotomicrografias podem ser avaliadas quantitativamente pelo software de análise de imagem *ImageJ*®. Após serem calibradas, pode quantificar o número e diâmetro dos vasos sanguíneos.

FIGURA 04: Fotomicrografia do ligamento periodontal da raiz distovestibular do primeiro molar superior esquerdo.



LEGENDA: Coloração tricômico de Mallory, 400x. Setas amarelas indicam vasos sanguíneos presentes no ligamento periodontal.

ANÁLISE HISTOQUÍMICA DE FIBRAS COLÁGENAS POR *PI-CROSIRIUS RED* SOB LUZ POLARIZADA

O colágeno é o maior componente da matriz extracelular (CUTTLE et al., 2005) e atua como arcabouço estrutural nos tecidos durante o processo de cicatrização modulando a proliferação e migração celular (TRACY et al., 2016). O colágeno tipo III é um importante componente da matriz extracelular, predominando nas fases iniciais do processo de cicatrização, sendo sintetizado por fibroblastos no tecido de granulação (OLCZYK et al., 2014). Com a maturação e fechamento da ferida, o colágeno tipo III é degradado e a síntese do colágeno tipo I aumenta (OLCZYK et al., 2014). Doenças crônicas inflamatórias têm sido relacionadas ao aumento da expressão de colágeno tipo III (HIROTA et al., 2003).

O colágeno I é o mais comum dos tipos de colágeno, estando presente em estruturas rígidas como tendões, ossos e cartilagens, enquanto o tipo III está em abundância em órgãos relacionados com elasticidade, como pulmão e vasos sanguíneos (COUDROY et al., 2015).

Assim, por ocasião da análise histológica, é sugerido a realização da coloração para *Picrosirius Red* e análise sob luz polarizada, para determinação da quantidade de colágeno total e diferencial (Tipo I e III) nos tecidos.

A coloração de *Picrosirius Red* é um método simples e sensível de detectar a presença de colágeno (JUNQUEIRA et al., 1979) aumentando sua birrefringência quando analisado sob luz polarizada (JUNQUEIRA et al. 1979; MONTES; JUNQUEIRA, 1991), permitindo assim a identificação do tipo de colágeno (colágeno tipo I - coloração amarelo-avermelhada e colágeno tipo III – coloração verde-esbranquiçada) (JUNQUEIRA et al., 1979; MONTES; JUNQUEIRA, 1991).

Na Odontologia, podemos avaliar a presença e o tipo de fibras colágenas do ligamento periodontal, já que o colágeno é o principal componente do ligamento periodontal e tecido ósseo e desempenha papel chave na arquitetura do periodonto. Portanto, a degradação do colágeno é tida como o principal marcador da progressão da doença periodontal.

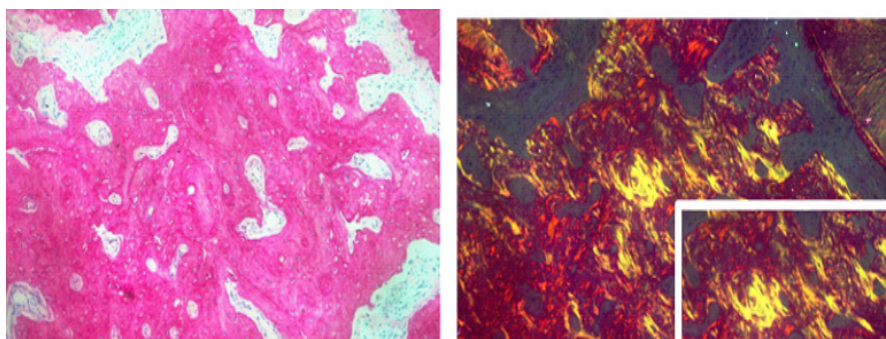
Para realização desta análise, secções histológicas de 3 µm serão dispostas em lâminas de vidro silanizadas e desparafinados em estufa a 60°C por 3h e três banhos de xilol (5 minutos). Após reidratação em série decrescente de álcool as lâminas devem ser incubadas em solução de Picrosirius (ScyTek®, Logan, UT, USA) por 30 minutos e então lavadas rapidamente em dois banhos de ácido clorídrico 5%, contra-coradas com hematoxilina de Harris por 45 segundos e montadas com Enhtellan®. Após preparo, as lâminas devem ser analisadas sob microscópio convencional e sob filtro de luz polarizada.

Para avaliação do colágeno devem ser fotografados 6 campos ou mais em um aumento de 200x na região de interesse e as fotomicrografias avaliadas quantitativamente pelo software de análise de imagem ImageJ®, após calibração das imagens pelo comando Color Thershold (Image

> Adjust > Color Thershold) na função RGB para as cores Vermelho (Mínimo de 71 e Máximo de 255), Verde (Mínimo de 0 e Máximo de 69) e Azul (Mínimo de 0 e Máximo de 92). Depois da calibração as imagens devem ser convertidas para escala de cor de 8-bits (Image > Type > 8-bit), binarizadas (Process > Binary > Make Binary) e mensurada a porcentagem de área total de colágeno marcada em preto (Analyse > Analyse Particles). Após polarização de luz, o mesmo protocolo foi realizado ajustando-se as cores na função RGB para: Vermelho (Mínimo de 0 e Máximo de 255), Verde (Mínimo de 0 e Máximo de 255) e Azul (Mínimo de 0 e Máximo de 32).

Após ajuste, as imagens devem ser convertidas para escala de cor de 8-bits (Image > Type > 8-bit), binarizadas (Process > Binary > Make Binary) e mensurada a porcentagem de área de colágeno marcada em amarelo avermelhado relativa à área marcada em vermelho. Assim será obtida a área verde-esbranquiçada através de processo semelhante ao descrito para a área amarelo avermelhada alterando-se os canais de cores RGB para: Vermelho (Mínimo de 0 e Máximo de 65), Verde (Mínimo de 0 e Máximo de 255) e Azul (Mínimo de 0 e Máximo de 255) (adaptado de ANDRADE et al., 2011; FERREIRA JÚNIOR, 2016).

FIGURA 05: Fotomicrografia de fibras colágenas da matriz óssea de maxila coradas com *Picrosirius Red* e sob filtro de luz polarizada.



LEGENDA: Coloração *Picrosirius Red* sem polarização de luz (imagens à esquerda) e após polarização de luz (à direita), magnificação 200x

ANÁLISES DO TECIDO ÓSSEO E DENTÁRIO DESMINERALIZADO POR MICROSCOPIA CONFOCAL

Sabendo que o colágeno é uma proteína estrutural que apresenta um fenômeno natural de autofluorescência (MONICI, 2005), as mesmas lâminas utilizadas para o estudo histopatológico podem ser analisadas ao Microscópio Confocal através do software do fabricante. Para luz de fluorescência é necessário escolher o filtro a ser aplicado, no qual para tecido ósseo o comprimento de onda padronizado é o de 488 nm e canal de emissão de fluorescência FITC-verde (FSet10 (FITC)- excitação: BP 450-490; emissão: BP 515-565) (ORIÁ et al., 2003; LIMA et al., 2017).

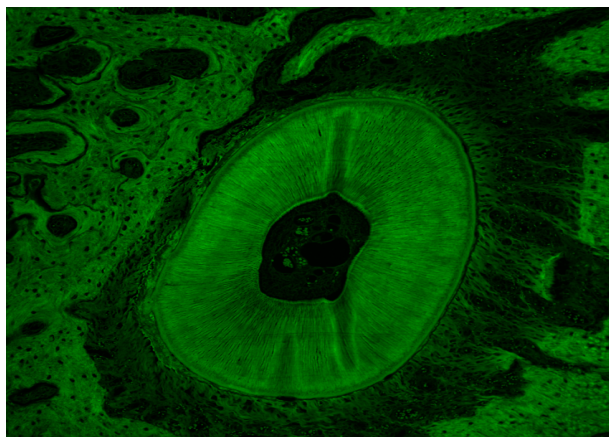
FIGURA 06: Microscópio Confocal.



Para medida do tecido ósseo pode realizar inicialmente a delimitação e recorte da área de escolha do estudo com auxílio do Software *ImageJ*®, utilizando o comando de seleção de área livre (Freehand selections> Clear Outside). Após essa etapa, pode mensurar a área total da área selecionada através do comando Measure (Analyze > Measure). Posteriormente, a imagem terá suas cores invertidas a partir do comando Invert (Edit > Invert) e será calibrada as imagens pelo comando Color Thershold (Image

> Adjust > Color Thershold) na função RGB para as cores Vermelho (Mínimo de 0 e Máximo de 255), Verde (Mínimo de 35 e Máximo de 69) e Azul (Mínimo de 0 e Máximo de 255). Depois da calibração, com destaque para tecido ósseo, as imagens podem ser convertidas para escala de cor de 8- bits (Image > Type > 8-bit), binarizadas (Process > Binary > Make Binary) para então ser mensurada a porcentagem da área marcada em branco, referente ao tecido ósseo (Analyze > Analyze Particles) (FERREIRA JÚNIOR, 2016).

FIGURA 07 - Fotomicrografia de fibras colágenas da matriz óssea e ligamento periodontal por microscopia confocal



LEGENDA: Corte transversal da raiz distovestibular do primeiro molar superior esquerdo, Microscopia Confocal, 200x magnificação.

Referências

ALPHY, A.; KANNAN, T.; NORAZMI, M.; NURUL, A. Interleukin-17A promotes osteogenic differentiation by increasing OPG/RANKL ratio in stem cells from human exfoliated deciduous teeth, **Journal of engineerng and regenerative medicine**, v. 12, n. 8, p.1856-1866, Agosto, 2018.

ANDRADE, T.A.; IYER, A.; DAS, P.K. The inflammatory stimulus of a natural latex biomembrane improves healing in mice. **Braz J Med Biol Res.** v. 44, n.01, p.1036-1047, 2011.

ARANA-CHAVEZ VE; MASSA L.F. Odontoblasts:the cells forming and maintaining dentine. **Int J Biochem Cell Biol**, v.36, p. 1367-73, 2004.

CARVALHO, L.F.C.S; NEVES, C. C; HERNANDEZ, L; RODE, R.S.M; MARTINS, A.M.A. Tempo de descalcificação e preservação do núcleo celular de tecido mineralizado descalcificado com ácido nítrico a 5%, EDTA 7% e Biodec. **Revista Periodontia**, v.18, n.2, 2008.

CAZARI, V.R.R; PEREIRA T.R; ROMERA, A.M; BRANDÃO, M.C; ZELANDO-FILHO, C; FAVARETO, A.P.A. Redução do uso do xilol na técnica de coloração hematoxilina e eosina. **Colloquium Vitae**, v.5, n.2, p.135-48, 2013.

COUDROY, R. et al. Use of Type III procollagen measurement as predictor of lung fibroproliferation in ARDS: early measurement for earlier antifibroproliferative therapy? **Intensive care medicine**, v. 41, n. 6, p. 1159–60, jun. 2015.

CUTTLE, L., et al. Collagen in the scarless fetal skin wound: detection with picrosirius-polarization. **Wound Repair Regen.**, v.13, n.2, p.198–204, 2005.

DOMINGUEZ, G.D. Como preparar secções histológicas de tecidos não descalcificados com implantes metálicos? Descrição de técnicas modificadas. **Revista Pós graduação**, São Paulo, v.19, n.2, 2012.

FERREIRA JÚNIOR, A. E. C. **Avaliação da influência da terapia por infliximabe na cicatrização óssea de alvéolos dentários pós-exodontia em ratos.** 2016. 81 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem. Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Fortaleza, 2016.

FIELD, R.A. Ash and calcium as measures of bone in meat and bone mixtures. **Meat Science**, v. 55, n.3, p. 255-264, 2000.

FLORENCIO-SILVA, R.; SASSO, G. R. D. S.; SASSO-CERRI, E.; SIMÕES, M. J.; CERRI, P. S. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. **BioMed Research International**, 2015.

FRACALOSSO, A.; SANTAMARIA JR, M.; CONSOLARO, M. F.; CONSOLARO, A. movimentação dentária experimental em murinos: período de observação e plano dos cortes microscópicos. **R Dental Press Ortodon Ortop Facial**, v. 14, n. 1, p. 143–157, 2009.

GARTNER L.P, HIATT J.L. **Tratado de histologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1999.

HALUSIC, A.M; SEPICH V.R; SHIRLEY D.C; GRANJEIRO J.M; COSTA M.C; KUCHEKER E.C; VIEIRA A.R. Calcium and magnesium levels in primary tooth enamel and genetic variation in enamel formation genes. **Pediatric Dent.**, v.36, n.5, p. 384-8, 2014.

HIROTA, A., et al. Collagen of chronically inflamed skin is over-modified and upregulates secretion of matrix metalloproteinase 2 and matrix-degrading enzymes by endothelial cells and fibroblasts. **J Invest Dermatol.** v.121, n.6, p.1317–1325, 2003.

HOROBIN R.W. How do histological stains work? In: Bancroft JD and Gamble M. **Theory and practice of histological techniques**. 6 th ed. Elsevier Health Sciences, p.105-19, 2008.

JUNQUEIRA, L. C.; BIGNOLAS, G.; BRENTANI, R. R. Picro sirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. **Histochem. J.**, v.11, n.1, p. 447–455, 1979.

KANCHAN T; MACHADO M; RAO A; KRISHAN K; GARG A.K. Enamel hypoplasia and its role in identification of individuals: A review of literature. **Indian Journal of Dentistry**, v.6, n.2, p. 99-102, 2015.

LIMA, M.R., et al. The Effect of *Calendula officinalis* on Oxidative Stress and Bone Loss in Experimental Periodontitis. *Front. Physiol.*, v.8, n.440, p. 1-9, 2017.

LU J, DUAN Y, ZHANG, M, WU M, WANG Y. Expression of Wnt 3a, Wnt 10b, β -catenina and DKK1 in periodontium during orthodontic tooth movement in rats. **Acta Odontologica Scandinavica**, 2015.

MONICI, M. Cell and tissue autofluorescence research and diagnostic applications. *Biotechnol Annu Rev.*, v. 11, p. 227-256, 2005.

MONTES, G.S.; JUNQUEIRA, L.C.U. **The use of the picosirius-polarization method for the study of biopathology of collagen.** Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v.86, n.03, p.1-11, 1991.

NUNES, C.S.; CINSÁ, L.A. Princípios do processamento histológico de rotina. *Revista interdisciplinar de estudos experimentais*, v.8, p.31-40, 2016.

OLCZYK P, MENCNER L, KOMOSINSKA-VASSEV K. 2014. The role of the extracellular matrix components in cutaneous wound healing. **BioMed Res Int.** v.74, p.75-84, 2014.

OLIVEIRA, R.S.F; PETERS, V.M; VITRAL, R.W.F. Determinação do ponto de descalcificação para o preparo histológico de tecidos mineralizados. **Revista interdisciplinar de estudos experimentais**, v.1, n.2, p.84, 2009.

ORIÁ, R. et al. Estudo das alterações relacionadas com a idade na pele humana, utilizando métodos de histo-

morfometria e autofluorescência. **An. Bras. Dermatol.**, v. 78, n. 4, p. 425-434, 2003.

TEITELBAUM, S. L.; ROSS, F. P. Genetic regulation of osteoclast development and function. **Nature Reviews Genetics**, v. 4, n. 8, p. 638–649, 2003.

TIMM LL. Técnicas rotineiras de preparação e análise de lâminas histológicas. **Caderno La Salle XI**, v.2, p. 231-9, 2005.

TRACY LE, MINASIAN RA, CATERSON EJ. Extracellular matrix and dermal fibroblast function in the healing wound. **Adv Wound Care** (New Rochelle). v.5, n.3, p.119–136, 2016.

UDA, Y.; AZAB, E.; SUN, N.; SHI, C.; PAJEVIC, P. D. Osteocyte Mechanobiology. **Current Osteoporosis Reports**, v. 15, n. 4, p. 318–325, 2017.

WU, Q.; ZHOU, X.; HUANG, D.; JI, Y.; KANG, F. IL-6 enhances osteocyte-mediated osteoclastogenesis by promoting JAK2 and RANKL activity in vitro. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 41, n. 4, p. 1360–1369, 2017.

YANG, J.; FIZAZI, K.; PELEG, S.; SIKES, C. R.; RAYMOND, A. K.; JAMAL, N.; HU, M.; OLIVE, M.; MARTINEZ, L. A.; WOOD, C. G.; LOGOTHETIS, C. J.; KARSENTY, G.; NAVONE, N. M. Prostate cancer cells induce osteoblast differentiation through a Cbfa1-dependent pathway. **Cancer Res**, v. 61, n. 14, p. 5652–5659, 2001.

SOBRE OS AUTORES

ORGANIZADORES

André Ulisses Dantas Batista

Professor Associado do Departamento de Odontologia Restauradora do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba. Vice-Coordenador (2017-2019) e Professor Permanente do Programa de Pós-graduação em Odontologia da UFPB.

Ricardo Dias de Castro

Professor Adjunto do Departamento de Clínica e Odontologia Social do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba. Coordenador (2017-2019) e Professor Permanente do Programa de Pós-graduação em Odontologia da UFPB.

AUTORES

Alana Gail Lopes

Estudante do Curso de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Federal de Juiz de Fora.

André Ulisses Dantas Batista

Professor Associado do Departamento de Odontologia Restauradora do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba. Professor Permanente do Programa de Pós-graduação em Odontologia da UFPB.

Antônio Carlos Pereira

Professor Titular do Departamento de Odontologia Social da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas. Professor Colaborador do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UFPB.

Bianca Marques Santiago

Professora Adjunta do Departamento de Clínica e Odontologia Social do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba. Professora Permanente do Programa de Pós-graduação em Odontologia da UFPB.

Cláudia Helena Soares de Moraes Freitas

Professora Associada do Departamento de Clínica e Odontologia Social do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba.

Daianne de Sousa Medeiros

Estudante do Curso de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Odontologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba.

Edeltrudes de Oliveira Lima

Professora Titular do Departamento de Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba. Professora Permanente do Programa de Pós-graduação em Odontologia da UFPB.

Eliton Souto de Medeiros

Professor Associado do Departamento de Engenharia de Materiais do Centro de Tecnologia da Universidade Federal da Paraíba. Professor Permanente do Programa de Pós-graduação em Odontologia da UFPB.

Eugênia Livia de Andrade Dantas

Estudante do Curso de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Odontologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba.

Fabiola Galbiatti de Carvalho

Professora Adjunta do Departamento de Odontologia da Universidade Federal de Juiz de Fora (Campus Governador Valadares) e Professora

do Corpo Permanente do Programa de Pós-Graduação em Clínica Odontológica da UFJF.

Fátima Regina Nunes de Sousa

Professora Adjunta de Anatomia e Histologia da Universidade Federal do Piauí, Campus de Picos.

Frederico Barbosa de Sousa

Professor Associado do Departamento de Morfologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba. Professor Permanente do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UFPB.

Gisely Maria Freire Abílio de Castro

Professora Adjunta do Departamento de Fisiologia e Patologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba.

Hugo Lemes Carlo

Professor Associado do Departamento de de Odontologia da Universidade Federal de Juiz de Fora (Campus Governador Valadares) e Professor do Corpo Permanente do Programa de Pós-Graduação em Clínica Odontológica da UFJF.

Maria Carmeli Correia Sampaio

Mestre e Doutora em Odontologia, área de concentração: semiologia, pela Universidade de São Paulo. Professora Aposentada do Departamento de Clínica e Odontologia Social do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba.

Paulo Rogério Ferreti Bonan

Professor Adjunto do Departamento de Clínica e Odontologia Social do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba. Professor Permanente do Programa de Pós-graduação em Odontologia da UFPB.

Pedro Luiz Rosalen

Professor Titular da área de Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica da Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual de Campinas.

Raquel Fernanda Gerlach

Professora Doutorada da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Professora Permanente do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UFPB.

Renata Ferreira de Carvalho Leitão

Professora Adjunta do Departamento de Morfologia e do Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais da Universidade Federal do Ceará.

Ricardo Dias de Castro

Professor Adjunto do Departamento de Clínica e Odontologia Social do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba. Professor Permanente do Programa de Pós-graduação em Odontologia da UFPB.

Sara Brito da Silva

Estudante do Curso de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Odontologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba.

Taís Chaves Magalhães

Estudante do Curso de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Federal de Juiz de Fora.

Vanessa Costa de Sousa Ferreira

Estudante do Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais da Universidade Federal do Ceará.

Yuri Wanderley Cavalcanti

Professor Adjunto do Departamento de Clínica e Odontologia Social da Universidade Federal da Paraíba. Professor Permanente do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UFPB.

U

Este livro foi diagramado pela Editora UFPB em 2019,
utilizando a fonte Minion Pro. Impresso em papel
Offset 75 g/m² e capa em papel Triplex 250 g/m².

O livro “Métodos e Técnicas de Pesquisa Aplicadas à Odontologia” é uma produção colaborativa de docentes, estudantes e pesquisadores associados ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal da Paraíba (PPGO-UFPB) que tem como objetivo apresentar informações científicas relevantes sobre as linhas de pesquisa que compõem o Programa.

A obra, de caráter multifacetado e interdisciplinar, apresenta referencial teórico sobre métodos e técnicas de pesquisa relacionadas às produções científicas dos pesquisadores do PPGO. Ela representa um importante instrumento de inserção social, uma vez que a socializa saberes com pessoas interessadas em um aprofundamento de conhecimentos atrelados às temáticas: epidemiologia, bioética em pesquisa, saúde coletiva, odontologia baseada em evidências, fisiopatologia e morfologia de tecidos buco-maxilo-faciais, produtos naturais e biomateriais.

ISBN 978-85-237-1452-9



9 788523 714529