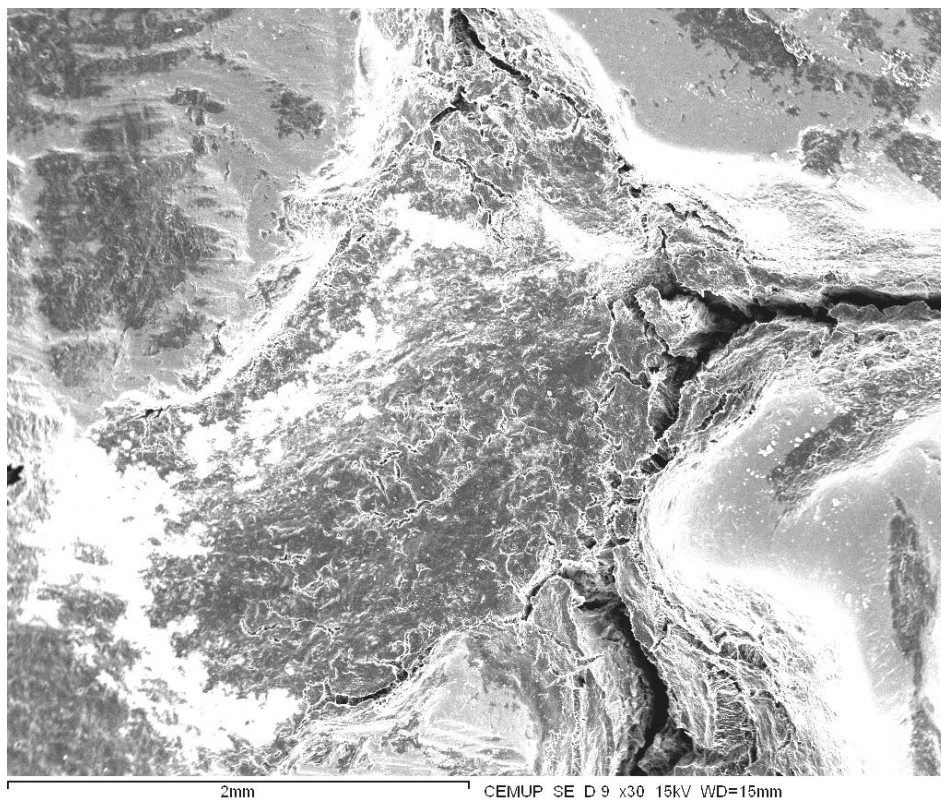


**Pesquisa de mercúrio e outros metais em dentes
restaurados a amálgama pelo método de SEM-XRM.
Considerações Médico-Legais.**

Isabel Cristina Ribeiro de Vasconcelos



Dissertação de Mestrado em Medicina - Legal

Isabel Cristina Ribeiro de Vasconcelos

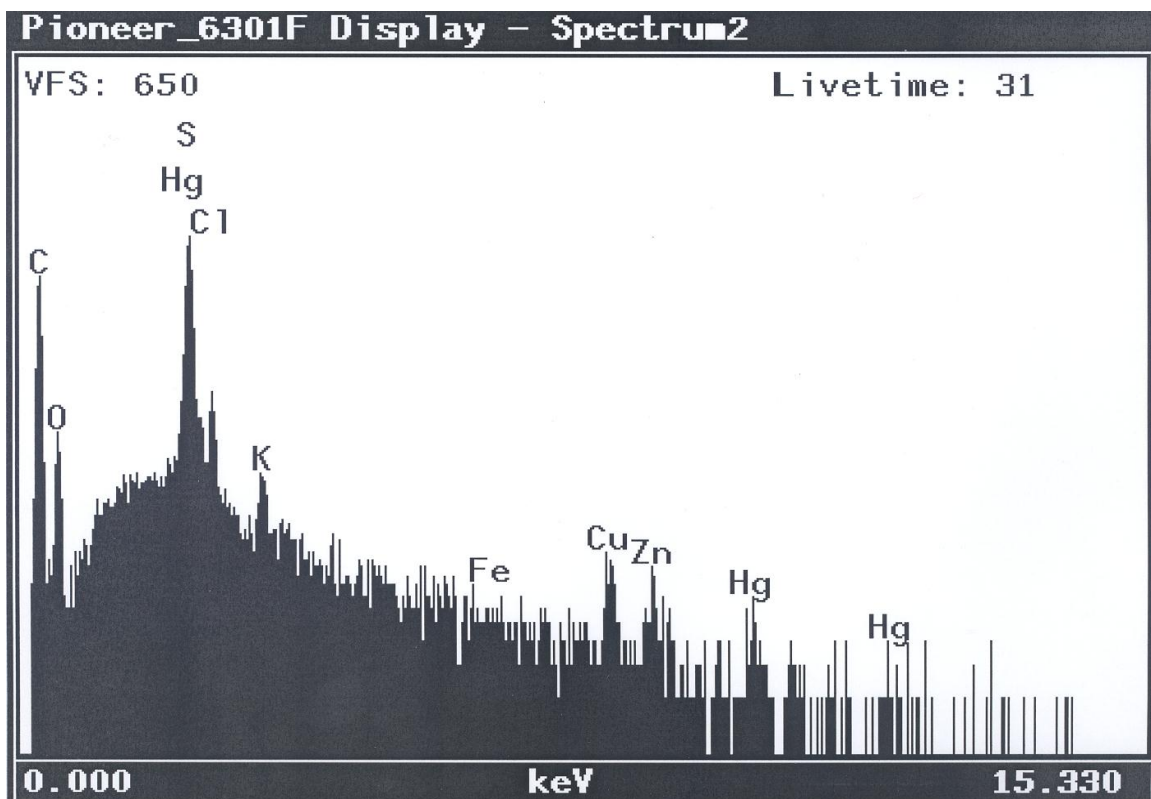
Pesquisa de mercúrio e outros metais em dentes restaurados a amálgama pelo método de SEM-XRM. Considerações Médico-Legais.

Dissertação de Candidatura ao grau de
Mestre em Medicina Legal submetida ao
Instituto de Ciências Biomédicas de Abel
Salazar da
Universidade do Porto
Orientador - Doutora Elisabete Cunha
Categoria – Professora auxiliar da Faculdade
de Medicina de Lisboa
Afiliação – Faculdade de Medicina da
Universidade de Lisboa
Co-orientador- Professora Doutora Maria José
Carneiro de Sousa Pinto da Costa
Categoria – Professora associada do Instituto
Ciências Biomédicas Abel Salazar
Afiliação – Instituto Ciências Biomédicas Abel
Salazar da Universidade do Porto

Universidade do Porto
Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar
Mestrado de Medicina Legal

Isabel Cristina Ribeiro de Vasconcelos

**Pesquisa de mercúrio e outros metais em dentes restaurados a amálgama pelo método de SEM-XRM.
Considerações Médico-Legais.**



Dissertação de Mestrado em Medicina-Legal apresentado no Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto sob orientação da Professora Doutora Mónica Elisabete da Silva Cunha e da Professora Doutora Maria José Carneiro de Sousa Pinto da Costa

“...se te queres tornar um verdadeiro cientista,
pensa, pelo menos meia hora por dia, de
maneira oposta à dos teus colegas...”

Einstein

Resumo

Nesta dissertação foi estudada a detecção de metais pesados, principalmente de mercúrio (Hg), em dentes restaurados com amálgamas dentários. Foi considerado como intervalo de tempo, um período entre o médio e longo prazo. A técnica utilizada foi a de microscopia electrónica de varrimento acoplada à microanálise por raio X (SEM-XRM). Técnica qualitativa e semi-quantitativa.

Foram utilizados para amostra um grupo de sessenta dentes com restaurações metálicas e trinta dentes sem restaurações (grupo controlo).

Ambos os grupos de dentes (restaurados/controlo) considerados para o estudo foram molares superiores. No grupo com restaurações de amálgama estas eram situadas nas suas faces oclusais (também designadas de faces mastigatórias) e foram realizados 3 cortes transversais ao longo do eixo longitudinal do dente de 2mm de espessura cada. Um dos cortes com a intenção de preservar a restauração para observação, os outros dois outros cortes feitos na região mais central da coroa dentária para se conseguir observar a dentina, túbulos dentinários e polpa dentária, procurando pela presença de metais que constituem os amálgamas nessas estruturas dentárias. Nos dentes usados para amostra de controlo em que também foi escolhido o mesmo tipo de dente mas sem restauração foi realizado apenas um corte de 2mm correspondendo à área da dentina e polpa.

Em termos de análise da restauração conseguimos obter resultados positivos na identificação qualitativa e semi-quantificativa dos seus constituintes como a prata (Ag), estanho (Sn), cobre(Cu), zinco (Zn) e de Hg. Foram também detectados outros elementos de origem exógena aos amálgamas devido à presença destes dentes na boca como o carbono (C), cálcio (Ca), fósforo (P), silício (S), flúor (F), enxofre (S), entre outros. Foi também feita a análise microscópica da sua topografia com resultados relevantes em termos das alterações verificadas na sua estrutura como a presença de poros, fissuras e de um filme biológico de revestimento.

Nas áreas pertencentes à dentina e polpa dentária foi detectada presença de Hg assim como outros metais que fazem parte da composição dos amálgamas,

salientando novamente aqui a presença de S um denominador comum ao longo dos nossos resultados e de relevante importância dadas as características de permutação entre Hg e S nos sistemas biológicos.

Esta tese apresenta conclusões originais, evidenciando resultados válidos na análise estrutural, demonstrando a aplicabilidade da técnica escolhida (SEM-XRM) aliado ao interesse médico-legal: sendo o Hg um dos três metais contemplados na Tabela Nacional de Incapacidades, podendo ser um motor de morbidade.

Abstract

The main objective of this work was the detection of metal specially mercury (Hg) on teeth with dental amalgams that were for a considerable period of time in function on the oral cavity until recently, using scanning electron microscopy with X ray microanalysis (SEM-XRM).

A group of sixty teeth with metal restorations were use as sample and a group of thirty teeth without any kind of restoration serve as group control for the purpose of analysis. Both groups were constituted of superior molar teeth.

The amalgam was on the mastigatory surface of the teeth so it was decided to make 3 cuts with 2mm thickness, along the longitudinal axle of the crown, with the intention to preserve the metal restoration and to observe the internal structures such as dentin and nerve pulp searching for amalgam residues. On the control group it was only make a single cut on the central area of the crown with the intention to obtain the natural composition of the teeth.

The results of the analysis of the amalgam were positive in the identification and (semi)quantification of their components such like silver(Ag),tin(Sn),copper(Cu), zinc(Zn) and more importantly mercury(Hg).Other chemical elements were found due to the fact that these were teeth in contact with the environment of the mouth, like carbon(C), calcium(Ca),Phosphorus(P), silicon (Si),Fluoride(F) and sulphur(S) among others. Relevant results were also observed in the analysis of the surface of the amalgams in terms of structural modifications like the presence of gaps, cracks or pores and the formation of a biological film covering in several places the exterior of these amalgams.

These first results were studied in comparison with other results obtained in another work about amalgams "in vitro" that is already published and was now attached to this dissertation.

In the dentin and nerve pulp of these amalgam teeth a significant presence of mercury (Hg) was found like other metals belonging to the restoration material. Once again the presence of sulphur (S) is also here detected and is interesting to enhance this fact due to the effect caused between Hg and S in biological systems.

In conclusion the results were positive for the initial objective but other results were also achieved in terms of the structural analysis, allow as to demonstrate the appliance of this method SEM-XRM to this study allied to the Legal-medical interest of the theme due to the presence of heavy metal Hg and its toxicological importance to the individual/ public health, and to the environment. In this thesis the mercury metal detention was studied weighed, mainly (Hg), in teeth restored with dental amalgams. It was considered as time interval, a period between the medium and long run. The used technique was of electronic microscopy of scanning connected to the microanalysis for X ray (SEM-XRM). Qualitative and half-quantitative technique.

A group of sixty teeth with metallic restorations and thirty teeth without restorations had been used for sample (group control).

Both the groups of teeth (restored/control) considered for the study had been molar superiors. In the group with amalgam restorations these were situated in its oclusals faces (also assigned of mastigatories faces) and had been carried through 3 transversal cuts throughout the longitudinal axle of the tooth of 2mm of thickness each. One of the cuts with the intention to preserve the restoration for comment, the other two cuts made in the region most central of the dental crown to obtain itself to observe the dentine and dental pulp, looking for the metal presence that constitutes amalgams in these dental structures. In used teeth for sample of control where also chosen the same type of tooth but without restoration was carried through only one cut of 2mm corresponding to the area of the dentine and pulp.

In terms of analysis of the restoration we obtain positive resulted in the qualitative identification and semi quantitative of its constituent as the silver (GAC), I tin (Sn), coper (Cu), zinc (Zn) and of Hg. Also other elements of exogenous origin to amalgams due to presence of these teeth in the mouth had been detected as the carbon (c), calcium (Here), match (p), silicon (s), fluorine (f), sulphur (s), among others. Also the microscopically analysis of its topography with excellent results in terms of the alterations verified in its structure was made as the presence of pores, fictions and of a biological covering film.

In the pertaining areas to the dentine and dental pulp presence of Hg as well as other metals was detected that are part of the composition of amalgams, pointing out again here the presence of S a common denominator throughout our results and of excellent importance given the characteristics of permutation between Hg and S in the biological systems.

This thesis presents original conclusions, evidencing resulted valid in the structural analysis, demonstrating to the applicability of the chosen technique (SEM-XRM) ally to the forensic interest: being Hg one of three metals contemplated in the National Table of Incapacities, being able to be a morbidity engine.

This thesis is the result of an initial assay (period of training of short duration), of which resulted already published in a original paper that are compiled in the part of the "Results".

Agradecimentos

A todos os que estiveram presentes que com as suas palavras de força de estímulo a sua ajuda, a sua colaboração que abriram mão do seu tempo e em muito contribuíram e permitiram que concluísse este trabalho de dissertação. A todos os que não desistiram de mim e não me deixaram desistir e que pelo contrário me impulsionaram em direcção ao final. A todos eles cabe-me fazer este agradecimento

Quero contudo salientar aqueles cujo contributo foi fundamental para alcançar mais esta “meta”!

Expresso aqui a os meus genuínos e sinceros agradecimentos:

À minha orientadora Prof. Doutora Mónica Cunha a ela devo TUDO e não caberia aqui a lista de motivos a agradecer e elogios, nem no total de páginas que tem esta tese. Permita-me dizer apenas EXCEPCIONAL! Esta palavra aplica-se tanto no trato profissional como no pessoal a ela lhe devo o meu crescimento e maturação desde que cheguei às suas mãos em forma de “semente”, hoje sou “árvore” e em breve serei “flor” e “fruto” contando com sua imprescindível parceria.

À Sr^a. Professora Doutora Maria José Carneiro de Sousa é com muito carinho que lhe agradeço toda a colaboração, disponibilidade, paciência e ajuda dadas sempre de boa vontade e com eficiente prontidão. A Sr^a professora é um bom exemplo de docente pois torce pelo progresso e sucesso dos seus alunos, foi isto que senti nesta caminhada conjunta para a tese. É com amizade que me despeço e lhe deixo o meu agradecimento

Ao Sr. Professor Doutor Pinto da Costa, pois foi com ele que começou o “bichinho” da Medicina Legal desde o tempo da licenciatura em Medicina dentária e já lá vão uns anos! No entanto nunca esquecida a vontade de voltar a ser sua aluna daí o regresso através da Pós-graduação em Ciências Médico-legais e é com muito orgulho que digo foi meu professor! A capacidade em

transmitir a riqueza de conhecimentos que possui tornam-no num docente maravilhoso e daí o meu contínuo gosto em o ouvir e ler.

.À Doutora Mónica, à Sr^a professora Maria José, ao Sr. Professor Pinto da Costa quero desde já agradecer pela inspiração dada durante o tempo de docência na Pós-Graduação que me levaram a querer prosseguir para o Mestrado.

À Dr^a Claudia Brites do departamento de Medicina Dentária da Faculdade de Medicina de Coimbra pela valiosa colaboração no tratamento das amostras; profissionalismo e simpática preocupação em me ajudar mesmo quando o assunto já ultrapassava a sua responsabilidade.

Quero também agradecer à Dr^a Daniela do CEMUP (Centro de Materiais da Universidade do Porto) pelo tempo, pela ajuda, simpatia e incansáveis explicações que me disponibilizou em todo o processo de investigação de SEM.

Ao Doutor Filipe Marçal e Dr^a Ascensão Lopes que me abriram a porta me ouviram e se dispuseram a ajudar desinteressadamente mesmo sem bem me conhecer.

À minha assistente Sílvia meu braço direito e esquerdo sempre pronta a me acompanhar em projectos mesmo que estes ultrapassem as portas da clínica; também minha colaboradora em fotografia neste trabalho. À minha assistente mais recente Carla que me veio conhecer numa fase mais exigente da vida devido à tese e teve que ter paciência. Às duas agradeço muito o facto de estarem prontas aceitar a minha constante mudança de horários e ausências que sobrecarregou, transtornou e influenciou os seus trabalhos na clínica e horas pessoais. Um beijinho grande de obrigada.

Ao colega e amigo Rocha que me ajudou nos primeiros passos importantes deste meu regresso aos estudos, tomou conta da clínica nas

primeiras ausências e ainda há pouco tempo se disponibilizava para novamente me ajudar.

Ao meu compadre Costa sei que a amizade não se agradece mas aqui quero agradecer o teu cuidadoso profissionalismo, eficiência senso crítico e inestimável prestação.

Aos meus pacientes muitos deles souberam e valorizaram este meu trabalho que também a eles lhes afectou muitas vezes a vida devido a alterações nas consultas e ausências da sua médica Dentista.

Aos amigos um pedido de desculpas por esta minha ausência e falta de notícias mas não me foi possível esse convívio.

E agora de forma mais especial tenho que estender esta lista nomeando um a um e acrescentando muitos beijinhos de gratidão à minha família:

Ao Pedro meu marido que na sua forma por vezes de desafio não me deixou desistir e acreditou nas minhas capacidades, "insuflando" continuamente o ar que me faltava para continuar a "respirar", para continuar a lutar, a "viver" este objectivo. És o meu "Sancho Pança" quando eu me ponho a ser o "Dom Quixote" e te levo para mais uma aventura com "lutas imaginárias" que mais não passam de "moinhos de vento". És o meu amor és o meu futuro.

Aos meus pais; minha querida mãe Dina que nestes 3 anos se desdobrou nos papéis de mãe e avó dando-me margem de manobra total para realizar este sonho. Falei nestes últimos 3 mas mãe se calhar não sabes como te sou grata por todos os outros que ficaram para trás em que sempre foste todos os papéis para além de MÃE como amiga, companheira, colaboradora, assistente, etc. Meu pai "baco" (como lhe chamam agora os netos) que sei que fica muito orgulhoso deste trabalho pois é um pouquinho dele o atingir desta meta através do seu trabalho do seu esforço me proporcionou uma educação superior. Enfim os 2 são os pilares das minhas fundações.

A minha mana Sofia obrigada sempre por tantas vezes "fazeres o pino" para me ajudares em tudo!! Também a ti Miguel meu cunhado sei que

posso sempre contar contigo. Beijos grandes aos 2 e ao meu Henrique o primeiro ramo novo a nascer nesta família.

Um simples beijo à minha avó e á memória do meu avô José Pinto Jorge.

E por fim porque é o mais especial o meu filho Afonso a ele dedico este trabalho que espero um dia tenha a oportunidade de o ler de o estudar e de fazer mais e melhor que a mãe. São os desejos de uma mãe que quer ver o filho atingir metas a alcançar objectivos a ter sonhos e lutar por eles!

A ELE esta dedicatória porque ele mais do que ninguém foi o meu companheiro de estudo de trabalho desde o tempo que estava na minha barriga e ele mais do que ninguém tem sido privado de parte do meu tempo e energia actualmente e ainda assim me recebe com um lindo e grande sorriso, abraços e beijinhos em cada chegada a casa. Tens e sempre terás o meu agradecimento e o meu amor incondicional. Beijos grandes da tua mamã “quitina”.

A todos Obrigada pela concretização desta tese.

Índice

Resumo-----	5
Agradecimentos-----	10
Introdução-----	16
Mercúrio-----	17
Mercúrio e poluição ambiental-----	24
Tabela Nacional de Incapacidades-----	26
Amálgamas Dentários-----	28
Dentes-----	33
Materiais e Métodos-----	37
Resultados-----	44
Discussão-----	85
Perspectivas Futuras-----	92
Bibliografia-----	95
Anexos-----	102

Introdução

Introdução

Os metais fazem naturalmente parte dos organismos e deles depende o seu normal funcionamento. São desde há muito utilizados em processos terapêuticos como o caso do mercúrio (Hg) usado na Europa do século XV ao século XVI no tratamento da sífilis, estendendo-se o seu uso para este efeito de forma generalizada no princípio do século XX.^{3,46.}

Actualmente alguns metais continuam a ser utilizados em tratamentos médicos do foro oncológico, em tratamentos dentários através dos amálgamas metálicas assim como são também utilizados em meios de diagnóstico como no caso da imagiologia.

São numerosas as suas potencialidades no campo clínico e são hoje mais conhecidos os seus efeitos adversos e tóxicos, contribuindo assim para uma maior consciencialização na sua utilização permitindo uma contínua evolução a nível médico/farmacológico procurando a redução da sua toxicidade.

Dentro dos vários metais é de salientar neste trabalho o H, o Ar e o Pb que são usados desde os Antecristo (A.C). Na actualidade muito se debate os efeitos da contaminação ambiental, principalmente devido à actividade humana.

Uma contaminação a este nível eleva o problema da toxicidade individual para um caso de saúde pública.

A perigosidade de um metal pesado reside na capacidade de acumulação deste num organismo; é o caso do cádmio nos rins e do chumbo nos ossos que é cerca de 20 a 30 anos (no sangue é de algumas horas).⁴⁴ Outros metais como o arsénio ou o lítio, têm uma semi-vida de apenas algumas horas ou poucos dias.⁴⁴

Mercúrio (Hg)

O Hg é um metal pesado e em condições de temperatura e pressões normais é metal prateado, inodoro e líquido. Não é bom condutor de calor comparado com outros metais no entanto é um bom condutor de electricidade. Estabelece liga metálica facilmente com outros metais como ouro ou prata produzindo amálgamas.

É insolúvel em água e solúvel em ácido nítrico. Quando a temperatura é aumentada transforma-se em vapores tóxicos e corrosivos mais densos que o ar. É perigoso quando inalado ingerido ou por contacto. O Hg está presente de diversas formas: metálico, orgânico, inorgânico e pode encontrar-se em 3 estados de oxidação: 0, +1, +2. O mercúrio inorgânico pode ser convertido em metilmercúrio e dimetilmercúrio pela acção de microorganismos, as designadas bactérias metanogénicas, particularmente em sedimentos.^{15,29,46}

Pode ser também usado em termómetros, barómetros, lâmpadas, medicamentos, espelhos, detonadores, corantes, baterias e outros.^{15,29,46} Esta aplicação industrial do Hg potencia o risco de exposição ocupacional e accidental.^{9,15,29,30,31} A exposição accidental em crianças mais registada acontecia principalmente por quebra de termómetros e se o período de contacto fosse curto, o mercúrio imediatamente limpo ou removido não eram evidentes grandes danos.⁹

São exemplo de exposição ocupacional na história da nossa industria século XIX, segunda década do século XX os operários chapeleiros de S. João da Madeira apelidados na região de “Unhas Negras”⁶⁷ dada a pigmentação

escura permanente com que ficavam nas extremidades das unhas ao trabalharem directamente com a ponta dos dedos numa mistura de tintas e químicos não muito bem identificados excepto que potencialmente incluía mercúrio. Na linha de circuito da confecção de chapéus este era o local designado na gíria operária de “Inferno”, pois não sabendo muito bem porquê os trabalhadores para aí designados adoeciam com mais facilidade e a esperança média de vida era muito menor. Numa altura em que a vida destes operários era uma “amarga penitência de sacrifícios”⁶⁷ e a necessidade do “magro salário semanal”⁶⁷ não dava margens para recusar trabalho apesar dos riscos. Hoje em dia as exposições resultantes de actividades profissionais são já mais conhecidas. A exposição da população em geral surge a partir de três fontes distintas de mercúrio: o consumo de peixe contaminado, as amálgamas dentárias e algumas vacinas.^{13,15,29,46} A actividade vulcânica, os fogos florestais as fontes ou estâncias termais são processos naturais que também libertam grandes quantidades de mercúrio, sendo embora difíceis de quantificar.¹⁵ Existem estudos geofísicos cujos resultados indicam que o mercúrio libertado das actividades humanas é maior do que o vindo da natureza. São contudo excepções como o caso da erupção vulcânica de 1980 do Mt.Saint.Helen no estado de Washington, representativas de um evento natural exacerbado.¹⁵

Metilmercúrio:

A exposição humana ao mercúrio faz-se sob duas formas orgânicas distintas do metal que são distintas mas relacionáveis, metilmercúrio (CH_3Hg^+) e etilmercúrio ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{Hg}^+$). O peixe contaminado é a maior, senão a única, fonte de metilmercúrio uma vez que hoje em dia não é já comum a utilização de

fungicidas contendo esta molécula.²⁹ O metilmercúrio tem a capacidade de permanecer por longos períodos nos tecidos do organismo é produzido no ambiente por biometilação do mercúrio inorgânico presente nos sedimentos aquáticos.⁴⁶ Estudos publicados reportam associação entre doenças cardiovasculares e mercúrio, principalmente na forma de metilmercúrio.²⁹ Um destes estudos mostra uma relação directa entre uma dada concentração de mercúrio e o risco de enfarte do miocárdio.⁴⁶ De todos os compostos de mercúrio orgânico, o metilmercúrio é o mais tóxico e é responsável pelos danos mais importantes observados em humanos.²⁴ Este facto tem a ver com a sua lenta eliminação, podendo ser mesmo de alguns anos no cérebro e rins. O sistema nervoso central é o alvo principal do metilmercúrio.^{11,12,24,29,30}

A intoxicação pelo metilmercúrio caracteriza-se por ataxia (perda de coordenação dos movimentos voluntários), disartria (problemas na articulação das palavras), parestesia (perda da sensibilidade nas extremidades e em torno da boca), visão de túnel (constricção do campo visual) e perda da audição.⁴⁶ Uma contaminação severa pode causar cegueira, coma e morte. O período médio de latência varia de 16 a 38 dias.⁴⁶

Etilmercúrio:

O etilmercúrio tem algumas semelhanças químicas com o metilmercúrio, ambos têm uma distribuição inicial similar no corpo e causam efeitos muito semelhantes em doses tóxicas para o cérebro. Contudo, o metilmercúrio é mais potente, o etilmercúrio é mais rapidamente metabolizado em mercúrio inorgânico. Talvez sendo esta a razão do etilmercúrio, contrariamente ao metilmercúrio, não causar lesões renais nos humanos. A mais recente

descoberta foi que o tempo de semi-vida do etilmercúrio no organismo é muito pequena⁴⁶. Em crianças que receberam timerosal em vacinas, o tempo de semi-vida do etilmercúrio no sangue são normalmente assumidos como sendo 7-10 dias. Já o tempo de semi-vida do metilmercúrio é de cerca de 50 dias.⁴⁶ Todas as formas de mercúrio têm efeitos adversos na saúde em doses elevadas. Contudo, as consequências da exposição dos humanos a pequenas doses de mercúrio quer a partir do consumo de peixe contaminado, das amálgamas dentárias ou do timerosal das vacinas. Embora vários trabalhos estabeleçam a ideia de relacionamento entre este preservante de vacinas com níveis de Hg e consequentes problemas neurológicos e/ou autismo tais resultados ainda são controversos e estão ainda sujeitos a discussão.^{9,13,38,45} No entanto o seu continuado uso (Hg) é contra os esforços globais em reduzir a exposição ao mercúrio especialmente idades tão jovens.⁹

Toxicidade:

O mercúrio sob a forma líquida é muito pouco absorvido pelo tracto gastrointestinal. Por outro lado ele é altamente lipofílico por isso os vapores deste metal quando inalados, podem facilmente atravessar a membrana alveolar até atingirem a circulação sanguínea.³⁰ No sangue, fígado e rins o mercúrio é oxidado à forma bivalente, Hg^{2+} , pelo complexo enzimático designado hidrogénio peróxido catalase.⁴⁶ Trabalhos de investigação em laboratório sobre a rápida distribuição visceral de mercúrio usando a microscopia electrónica de varrimento acoplada à microanálise por RaioX mostram que a maior concentração de mercúrio é no fígado ($60,9 \pm 24,9 Hg$

partículas por mm^2 de tecido), 3 a 6 vezes maior do que a concentração nos rins e baço.²² Nos rins este metal organiza-se em forma de partículas esféricas e junta-se a agregados de proteínas plasmáticas ou na superfície das células sanguíneas.²²

A maior forma de exposição humana a quantidades biologicamente significativas de mercúrio ocorre por exposição ocupacional sendo a via inalatória a principal fonte de intoxicação verificada em laboratórios industriais e de pesquisa.^{30,}

Embora o nível fatal de mercúrio não seja conhecido, uma exposição acima de $1\text{-}2 \text{ mg/m}^3$ de vapor de mercúrio elementar, por algumas horas causa bronquite química aguda e pneumonia.⁴⁶ Duas horas após a exposição é possível observarem-se danos no pulmão através da formação de uma membrana hialina e finalmente a ocorrência de fibrose pulmonar. A contaminação pelos diversos compostos de mercúrio também está associada a condições clínicas relacionadas com enfermidades cutâneas.

Concentrações de metal no sangue $\geq 5 \text{ } \mu\text{g/ dL}$, são geralmente acompanhados de sinais e de sintomas de toxicidade.¹⁵

A Environmental Protection Agency (EPA) indica “guidelines” que sugerem que os níveis de Hg no sangue sejam menos de $5\mu\text{g/l}$ de Hg no adulto médio e que a toma diária proveniente de todas as fontes deva ser menos de $0,1\mu\text{g/kg}$ de peso corporal principalmente grávidas porque são um tipo de população susceptível.²⁹

Os efeitos biológicos deste metal e seus derivados são extremamente variados, englobando desde efeitos citológicos, reprodutivos (teratogénicos) e neurológicos. Isto é referido num estudo de Litvak¹⁴ que há diminuição das funções neurológicas de forma visível nos trabalhadores da medicina dentária. O nível de Hg no sangue destes trabalhadores atingem os 9µg/l (o dobro das directrizes da EPA).¹⁵ Somando isto à ingestão excessiva de peixes (como o tubarão, atum, peixe espada preto), estão referenciados por terem valores de mercúrio até 90µg/l. Como já referido anteriormente as grávidas são um tipo de população susceptível e como tal devem ter consumos de diários inferiores a 0,1µg/Kg de mercúrio de todo o tipo de formas.¹⁴

A possível associação no processo carcinogénico, bem como os seus efeitos genotóxicos não estão ainda completamente esclarecidos.⁴⁶ Os testes genotóxicos detectam mutações tanto a nível cromossómico como a nível génico. Tais mutações são responsáveis pelo aparecimento de cancros e doenças hereditárias. Estudos efectuados em plantas e animais de laboratório mostraram que o mercúrio tem a capacidade de inibir a formação do fuso mitótico, originando uma distribuição anormal dos cromossomas e poliploidia. Esta acção resulta da forte afinidade do mercúrio para os grupos sulfidrílo encontrados nas proteínas do fuso e é considerada como a acção mais típica, a nível genético dos compostos de mercúrio. Embora o efeito genotóxico do mercúrio seja a sua ligação ao fuso mitótico, estudos recentes propõem um efeito deste metal na produção de radicais livres, via peroxidação lipídica.

São inúmeras as evidências do efeito do mercúrio ao nível do ADN.

Os efeitos biológicos do mercúrio e dos seus compostos derivados apesar das inúmeras contradições estes compostos apresentam consequências graves merecedoras de estudo. Artigos recentes relacionam a exposição a mercúrio metálico em adolescentes com baixas performances em testes auditivos apresentando dificuldades em distinguir sucessivos sons breves.⁶ Os efeitos de neurotoxicidade deste metal seja na forma orgânica ou inorgânica levou a estudos actuais embora controversos e não totalmente conclusivos a estabelecerem uma relação entre concentrações altas de mercúrio em pessoas com Autismo e a alterações neurológicas tais como Alzheimer.^{14,29,38,45} Estes estudos deverão servir de possíveis modelos para manter a integridade da saúde das pessoas potencialmente expostas ao metal.^{36,40} Poder-se-á pois concluir acerca da distribuição deste metal que é amplamente distribuído pelo organismo humano, é secretado pelo leite materno³⁰ (5% dos teores maternos), os rins possuem elevados teores (exposição a Hg e Hg²⁺), sistema nervoso central possui elevados teores de organomercuriais (córtex), verifica-se passagem pela placenta e o “uptake” de organomercúrio é 10 a 40 vezes superior ao mercúrio inorgânico.⁴⁶

Mecanismo de Acção:

O mercúrio forma rapidamente ligações covalentes com o enxofre na forma sulfidrilo (SH), alterando a solubilidade, dissociação, afinidade relativa para os receptores, distribuição e excreção das enzimas e compostos que contêm esses grupos sulfidrilo. É essa mesma afinidade do metal para os grupos tiois (com enxofre) que permite a utilização do dimercaprol ou a penicilina no tratamento de intoxicações por Hg. O mercúrio também se liga a

outros grupos químicos, como o fosforilo (PH₃), carboxilo (COOH), amina e amida.⁴⁶

Mercúrio e a Poluição Ambiental

O mercúrio é considerado como um poluente ambiental, e está classificado em 3º lugar no Top 20 das substâncias Perigosas publicadas na ATSDR.^{30,46}

As poluições por mercúrio encontram-se tanto na água como na terra sendo mais significativas as emissões na atmosfera por combustão dos combustíveis fósseis, carvão e petróleo. Em artigo publicado na revista *Chemosphere* de Fevereiro de 2011, estudou-se a acumulação de mercúrio nas camadas superficiais dos solos das montanhas de karkonosze sendo o mercúrio resultante da poluição atmosférica a maior fonte encontrada nestes solos, referindo uma concentração média de 0,04-0,97mg/kg.²

A contaminação ambiental pelo mercúrio resultante principalmente de um mundo grandemente industrializado não deixa de ter o contributo da odontologia e as restaurações de amálgama.^{15,31}

Estudos toxicológicos mostram que o armazenamento e o descarte inadequados dos resíduos de amálgama dentário contribuem para a contaminação do meio ambiente possibilitando tanto a exposição ocupacional como ambiental. Este facto é comprovado pela Organização Mundial de Saúde(OMS) que relata um despejo anual em torno de 7,41 mil toneladas de mercúrio no meio ambiente na forma desse composto (OMS 2005). De acordo com o autor do artigo publicado na “CDA Journal 2004” referenciado na

bibliografia estima-se que 13 toneladas por ano de mercúrio são libertadas dos consultórios dentários tanto na colocação como na remoção de amálgamas dentários.^{15,30,31} Estes devem ser correctamente manipulados, recolhidos e armazenados.⁴³

Portugal como estado membro da união europeia adoptou a directiva nº 84/156/CEE disposto no artigo 4º e 8º do decreto lei nº52/99 de 20 Fevereiro, indicado na portaria 744-A/99 de 25 de Agosto por forma a que desde 1 Junho 2001 todas as unidades de saúde estejam equipadas com separador de amálgama e a partir de 2000 seja preenchida por estas unidades de saúde a declaração obrigatória anual de resíduos hospitalares.⁶³

Em conclusão podemos lançar a pergunta retórica “Quanto mercúrio é libertado no ambiente por actividades humanas e por eventos da natureza?”

Tabela Nacional de Incapacidades (TNI)⁴⁶

Decreto-lei nº 341/93 de 30 de Setembro, a TNI tem por objectivo fornecer as bases de avaliação do prejuízo funcional sofrido em consequência de acidente de trabalho e doença profissional, com perda de capacidade de ganho. A cada situação do prejuízo funcional corresponde um coeficiente expresso em percentagem, que traduz a proporção da perda da capacidade de trabalho resultante da disfunção, como sequela final da lesão inicial, sendo a disfunção total, com incapacidade permanente absoluta para todo e qualquer trabalho. De acordo com o Decreto-Lei nº 352/2007, 23 de Outubro é aprovada a nova TNI por acidentes de trabalho e doenças profissionais revogando o anterior Decreto-lei (inicialmente citado). Este visa a criação de duas tabelas de avaliação de incapacidades: uma destinada a proteger os trabalhadores no domínio particular da sua actividade no âmbito do direito laboral, e outra direccionada para a reparação do dano em direito civil.

Na determinação do valor final da incapacidade devem ser observadas as seguintes normas: (i) sempre que se verifique perda ou diminuição de função inerente ou imprescindível ao desempenho do posto de trabalho que o indivíduo ocupava com carácter permanente, os coeficientes de incapacidade previstos são bonificados com a multiplicação pelo factor 1,5 se a vítima não for reconvertida em relação ao posto de trabalho ou tiver 50 anos ou mais; a incapacidade será igualmente corrigida com a multiplicação pelo factor 1,5 quando a lesão implicar alteração visível do aspecto físico (como no caso das dismorfias ou equivalentes), se a estética for inerente ou indispensável ao desempenho do posto de trabalho ou tiver 50 anos ou mais (não acumulável

com a alínea anterior); quando a função for substituída, no todo ou em parte, por prótese, a incapacidade poderá ser reduzida, consoante o grau de recuperação da função e da capacidade de ganho do sinistrado, não podendo, porém, tal redução ser superior a 15%; no caso de lesões múltiplas, o coeficiente global de incapacidades será obtido pela soma dos coeficientes parciais, segundo o princípio da capacidade restante, calculando-se o primeiro coeficiente por referência à capacidade do indivíduo anterior ao acidente ou doença profissional e os demais à capacidade restante, fazendo-se a dedução sucessiva do coeficiente ou coeficientes já tidos em conta no mesmo cálculo; as incapacidades que derivem de disfunções ou sequelas não descritas na Tabela são avaliados pelo coeficiente relativo a disfunção análoga ou equivalente.

O mercúrio foi a 1ª substância química a ser submetida a uma legislação para controlo da exposição em ambiente laboral estando também na lista elaborada pela “United States EPA” que relaciona os poluentes atmosféricos de maior risco para a saúde humana.³⁰ É um dos metais pesados que juntamente com o chumbo e o arsénio estão contemplados na TNI e como já foi sendo referido anteriormente o maior risco de exposição a este tóxico é por ocupação profissional

Amálgamas Dentários

Os amálgamas dentários são ligas metálicas de mercúrio (Hg) com limalha que contém prata (Ag), estanho (Sn), cobre (Cu), algumas podem apresentar Índio (In), Zinco (Zn), Platina (Pt), paládio (Pd) sendo variáveis as porções e a fórmula de acordo com os fabricantes.^{30,41,43} Esta liga visa restaurar a cavidade dentária causada por cárie e que pelo trabalho do dentista é removido tecido contaminado. É um material restaurador de baixo custo, fácil técnica e grande resistência ao desgaste e bom selamento marginal.^{30,33,34} Os chineses foram os primeiros povos a utilizar a “pasta de prata” em meados do século VII.^{3,41} No século XIX esta pasta era largamente empregada na Inglaterra e na França. Em 1826 um dentista norte-americano chamado *Taveau* usou moedas de cobre e prata para criar uma limalha que era amálgama com mercúrio.⁴² É Black que define cientificamente a composição básica do amálgama e as técnicas de aplicação. A mistura dos metais foi modificada desde as primeiras ligas assim como o formato das partículas de limalhas para esféricas e/ou esferoidais sendo feitas misturas entre os diferentes formatos e o enriquecimento com certas quantidades de partículas de Cu e Ag (designadas por ligas enriquecidas) para controlar a expansão, melhorar as suas propriedades físicas e mecânicas aumentando a durabilidade e êxito das restaurações. Citando o trabalho de revisão sobre este material assinalado na bibliografia apresentamos o seguinte resumo que permite uma melhor compreensão sobre este material restaurador de características metálicas:⁴¹

Cada componente deste material restaurador (falando apenas nos principais e mais comuns), representam no conjunto total características, composições e funções diferentes. A Ag representa dois terços da composição, assegura um aumento da resistência e menor oxidação com menor perda de brilho. O Sn é de aproximadamente um quarto da liga e serve para facilitar a mistura com o mercúrio na temperatura ambiente e auxilia a redução da expansão da prata.

O Cobre substitui em muito a prata e aumenta a resistência mecânica do amálgama. Se estiver em alta percentagem torna as restaurações mais escuras e com descolorações.

A presença de Zinco pode em alguns amálgamas ter a função de agente de limpeza das impurezas e antioxidante.

As concentrações de Hg em amálgamas consistem em aproximadamente 50% mas variam sempre de acordo com o fabricante da liga, por isso é difícil uma padronização das suas concentrações. Nestas ligas o Hg é o metal líquido (à temperatura ambiente) é o mais concentrado dessa mesma liga.

As ligas convencionais apresentam valores percentuais dos seus constituintes na ordem dos 65% de prata, 29% de estanho, 6% de cobre e 2% de zinco se existir. Nas ligas enriquecidas ou com adições as percentagens desses componentes são mais elevadas; o cobre pode ser superior a 12% e a prata superior a 60%.

As ligas actuais apresentam o sistema prata – estanho denominado de fase *gama* durante o processo de mistura com mercúrio verifica-se o rompimento de ligações anteriores a esses constituintes que reagem com o Hg e formam novas ligações com ele originando 2 fases distintas: *gama 1* e *gama 2*. A fase 1 demonstra a ligação do Hg com a Ag e a 2 representa a ligação do mercúrio com o estanho ficando o cobre livre para posteriormente formar ligações do tipo **eta** (combinação Cu_6Sn_5) ou **épsilon** (combinação Cu_3Sn).

A presença da fase *gama* é o que contribui para a resistência mecânica e à corrosão do amálgama principalmente nas primeiras fases da reacção. A fase *gama 1* é a mais nobre e *gama 2* é a menos forte às acções mecânicas. As fases **eta** e **épsilon** verificam-se de amálgamas enriquecidos.

Ligas com diferentes fases na reacção com o mercúrio resultam nos amálgamas de *fase dispersa*. Por outro lado em ligas de alto teor de algum dos seus componentes ocorre a anulação das fases iniciais aquando da reacção química permanecendo uma única combinação final que se designam os amálgamas de *fase única*. Também é do interesse para este

nosso trabalho é salientar que o tamanho das partículas que compõem o pó ou as pastilhas da liga é relevante na sua ligação ao componente líquido que é o Hg. Esse tamanho pode variar entre 15µm e 35µm, quando se verificam partículas mais pequenas que 3µm são designadas de "poeira" e necessitam de mais mercúrio sendo por isso menos vantajosas.

As amálgamas encontram-se mais frequentemente armazenadas em cápsulas sob a forma de pó ou de pastilhas juntamente com a respectiva concentração de mercúrio em estado líquido em saquetas fechadas, facilitando o trabalho dos profissionais de medicina dentária

Foi entre 1974 e 1977 que a "American Dental Association (ADA)" adoptou normas de utilização deste material.⁴¹

Mercúrio das Amálgamas:

A presença de mercúrio nas amálgamas ainda recentemente confirmada pelo artigo publicado "*Técnica de Microscopia Electrónica de Varrimento acoplada à microanálise por Raio X (SEM-XRM) aplicada ao estudo de amálgamas dentários*"¹⁶; tem originado ao longo dos anos opiniões controversas relacionadas ao uso deste material restaurador; gerando até um certo receio na opinião pública em ter amálgamas na cavidade oral.^{7,35,39}

As amálgamas dentárias emitem Hg sob a forma de vapor que é inalado ou absorvido pela mucosa oral e entra na corrente sanguínea.⁴² São vários e conhecidos os efeitos tóxicos resultantes da exposição ao mercúrio e vários os estudos que citam a relação entre restaurações de amálgama, níveis elevados de mercúrio e seus efeitos adversos.^{8,7,10,30} Assim sendo pacientes portadores de restaurações de amálgama apresentavam queixas de intoxicações crónicas tais como lesões orais, distúrbios auto-imunes e múltipla esclerose tinham níveis significativamente altos de mercúrio sem no entanto ultrapassar os limites recomendáveis.^{7,30,35,40,42} O tratamento dentário das cáries em autistas é extremamente difícil, o uso de restaurações de amálgama contendo mercúrio tem sido associado às elevadas taxas de autismo severo mas sem sucesso.^{38,45} Um artigo publicado recentemente sobre um estudo em jovens da Casa Pia portadores de um número médio de restaurações de amálgama

demonstra aumentos de 5 -10% no mercúrio associado às porfirinas urinárias, demonstrando que os amálgamas dentários são contribuidores crônicos significativos para o mercúrio acumulado no organismo.⁸ Pacientes preocupados com intoxicações de mercúrio provenientes das restaurações de amálgama procuraram os seus médicos de família no entanto muitas das queixas eram infundadas induzidas em erro por testes de urina pouco fiáveis.⁷ Em caso de suspeita moderada ou alta de toxicidade deve ser feito um teste aos níveis de mercúrio na urina a 24 horas ou recomendar a consulta de toxicologia evitando assim terapias de quelatação e o pânico desnecessários.⁷

Os amálgamas dentários representam um tipo de exposição ao mercúrio, no entanto é ainda considerada por muitos estudos pouco significativa ficando abaixo das normas de risco da EPA.

Os profissionais de medicina Dentária são considerados um grupo de risco por estarem continuamente expostos, esta exposição advém da manipulação “directa” com os amálgamas na confecção de restaurações cavitárias, no derrame acidental de gotas de mercúrio, amalgamadores com fugas, na remoção restaurações antigas, na acomodação dos restos de amálgama feita de forma inadequada.^{30,36,40,42,43} Uma aspiração pouco eficiente assim como uma má ventilação dos consultórios potencia o risco de contaminação.^{30,43}

Para além da exposição profissional acentuada muitos dos profissionais de dentária são também portadores de amálgamas dentários na cavidade oral.⁴²

Os riscos de contaminação podem ser grandemente reduzidos se forem respeitadas regras de segurança e boa prática como por exemplo: evitar derramamentos acidentais de mercúrio, os locais de trabalho devem ser devidamente ventilados com pisos de fácil limpeza, a presença de separadores de amálgama nos equipamentos dentários que recolhem os restos das amálgamas provenientes da boca dos pacientes e evitam a entrada de mercúrio na rede de esgotos reduzindo assim a contaminação ambiental.^{30,42,43} Estes e outros restos dos amálgamas devem ser devidamente acondicionados em recipientes apropriados para posterior recolha por parte de entidades recuperadoras de resíduos químicos, verificar se existem fugas nos aparelhos

de amalgamação.^{30,42,43} A protecção do profissional e auxiliares com batas, toucas, luvas, máscaras, óculos ou viseiras; a utilização de uma boa aspiração e refrigeração dos instrumentos rotativos no acto de corte; assim como a utilização de isolamento absoluto no paciente tanto na colocação como na remoção de amálgamas formam um conjunto de medidas redutoras da exposição ao mercúrio dos amálgamas em ambiente clínico.⁴³

A ADA (American Dental Association) estima que dos 165 mil dentistas de todas as especialidades (otodontistas, endodontistas, odontopediatras, etc) que estão no activo a exercer a profissão removeram 92 milhões de amálgamas em 1999 e foram realizadas 70 milhões de restaurações de amálgama nesse mesmo ano; no entanto foi muito menor do que em 1990 com 100 milhões de restaurações de amálgama.¹⁵ Apesar do distanciamento entre os anos 90 até à actualidade a amálgama é um material restaurador ainda muito usado com vantagens indiscutíveis e de longevidade atestada pela experiência de mais de um século sendo a média 20 anos de uso na cavidade oral.

Entretanto existe cada vez mais uma crescente resistência ao seu uso. A presença de metais pesados potencialmente tóxicos, o desgaste excessivo de estrutura dentária devido à necessidade de confeccionar cavidades retentivas, aliado ao factor antiestético pelo facto de ser uma liga metálica levam a que se estejam a propor alternativas como por exemplo as ligas com gálio (Ga).^{30,33,32,34}

Nos últimos anos a ADA tem investido no desenvolvimento dessa liga com Ga e já foram lançadas no mercado.^{30,33,34}

A controvérsia mantém-se à volta da libertação de mercúrio das restaurações de amálgama e a procura de substitutos deste metal pesado nas ditas restaurações demonstram alguma preocupação nos seus efeitos tóxicos para o organismo. Alguns pesquisadores mostram que cada restauração de amálgama pode libertar 2 a 20mg de mercúrio diariamente, causando intoxicações graves e acumulo do metal.⁴² Outras correntes de investigação afirmam que o mercúrio libertado das restaurações não oferece riscos à saúde em decorrência da reduzida capacidade de absorção intestinal para esse metal.⁴² Recentemente a FDA (Food and Drug Administration) aceitou em classificar as restaurações de amálgama como portadoras de Hg e que este

tem efeitos tóxicos (especialmente ao nível do sistema nervoso) principalmente junto de populações susceptíveis tais com as grávidas e pessoas que já apresentam problemas de saúde sendo mais sensíveis às exposições a este metal pesado.

Dentes

Os dentes estão aqui referidos uma vez que são parte interveniente e constituinte do nosso estudo sobre metais pesados; pareceu ser de interesse fazer uma breve descrição das suas características e composição. Eles representam um papel importante não só na função mastigatória como na fonação auxiliando na pronuncia de algumas palavras e na era actual têm um papel estético fundamental. Dadas as suas características estruturais de grande resistência a factores físicos, químicos e ambientais são utilizados em questões médico-legais de carácter identificativo inclusive pela extracção de DNA.

Os dentes são órgãos de consistência dura, cor “branca” e estão implantados no rebordo alveolar dos maxilares superior e inferior. O ser humano possui uma dentição heterodôntica isto é com peças dentárias diferentes entre si pois cada dente está especializado para uma função diferente. Assim no geral podemos dizer que os incisivos são para cortar, os caninos para rasgar e os molares para triturar.

Inicialmente nas nossas vidas possuímos uma dentição decídua composta por 20 dentes, que gradualmente por etapas cronológica vai sendo substituída (e aumentada no seu número) pela dentição definitiva ou permanente composta de 32 dentes. Numa fase intermédia temos a chamada dentição mista isto porque se verifica a presença na cavidade oral tanto de dentes decíduos como de definitivos.

Na dentição decídua temos 3 grupos de dentes: os incisivos, os caninos e os molares. Na permanente para além destes grupos temos o grupo dos pré-molares.

O dente pode ser dividido em 3 partes: na coroa, raiz e colo que é a área de interface entre a coroa e raiz. A coroa é revestida pelo *esmalte* - uma camada exterior de tecido altamente mineralizado 96% de minerais de hidroxiapatite; por baixo do esmalte numa área mais interna e de composição química semelhante ao osso, está a *dentina* que se prolonga pela raiz e protege a cavidade pulpar na área central contendo polpa dentária; um tecido altamente especializado com fibras nervosas sensitivas. A raiz para além da dentina é externamente revestida por uma lâmina delgada chamada de *Cemento*.

Nos dentes podemos diferenciar várias faces: uma face mastigatória ou oclusal, uma face vestibular orientada para o vestíbulo da boca, uma face lingual quando entra em contacto com a língua ou palatina quando está virada para o palato da boca. As zonas de contacto adjacentes entre os dentes podem ser divididas em faces mesiais ou faces distais consoante estejam orientadas em direcção aos incisivos centrais ou aos molares respectivamente.

Carie Dentária e Restaurações:

A cárie é uma doença infecciosa e transmissível resultante da acção de bactérias presentes na cavidade oral. O principal agente cariogénico interveniente é a bactéria *estreptococos mutans* que na presença de açúcares (principalmente a sacarose), produz-se uma interacção entre eles que resulta na produção de ácidos especialmente ácido láctico. Estes ácidos vão reduzir o Ph da boca desmineralizando o dente provocando uma cavidade e levando para o interior do dente outro tipo de bactérias no avanço da destruição dos tecidos dentários. Quando a dentina que está subjacente ao esmalte é atingida este deixa de ter suporte e fractura formando cavidades que expõem a parte interna do dente ao exterior que é a cavidade oral.

É nesta fase que o médico dentista é chamado a intervir para reparar a perda de tecido dentário limpando e removendo a área danificada e substituindo-a por uma restauração. Estas podem ser realizadas em vários materiais hoje disponíveis como cerâmicas, compósitos, compómeros feitas à base de

polímeros de resina; ou as metálicas feitas em ouro ou amálgamas de prata tal como as analisadas neste trabalho.

Consoante a face do dente atingida e o tipo de cavidade e restauração a ser realizada podemos classificar de uma forma muito geral e muito usada na prática clínica em classe I, classe II, classe III, classe IV até classe V. Sendo que a face oclusal ou mastigatória do dente quando em tratamento restaurador é designado por classe I e caso a face atingida seja uma das paredes de contacto entre dentes adjacentes é assinalada pelos profissionais de classe II. A classe V são restaurações que se verificam muitas vezes em áreas radiculares do dente ou na interface coroa/raiz isto é no colo do dente.

Uma vez reabilitado o dente após tratamento dentário este pode retomar a sua função sendo com isto evitada a perda de uma peça dentária na cavidade oral.

Materiais e Métodos

Materiais e Métodos

Neste trabalho foram utilizados 60 dentes restaurados a amálgama que foram divididos em 3 grupos de 20 dentes cada, cujo período de permanência das restaurações pode situar-se entre < 10anos; entre 10 a 20anos e >20 anos. Os amálgamas são normalmente compostas por cobre (Cu), estanho (Sn), Ag e Hg, variando nas suas concentrações de acordo com as marcas e fabricantes. Em alguns casos (como já referido anteriormente) podem existir na sua composição Zn; Índio (In); platina(Pt) e paládio(Pd).

Como grupo de controlo foram utilizados 30 dentes sem qualquer tipo de restauração.

Os dentes usados tanto os restaurados como os de controlo eram constituídos por molares superiores definitivos que foram removidos da cavidade oral de pacientes por exodontia em consultas de Medicina Dentária por apresentarem patologia e sem tratamento possível. Foi pedido aos respectivos pacientes a autorização para a permanência em nossa posse e estudo dos seus dentes através da assinatura de consentimentos informados.

Após a sua extracção os dentes eram colocados numa solução de diluída de hipoclorito de sódio a 0,5% por alguns minutos à temperatura ambiente e feita posteriormente a sua secagem com ajuda de compressas esterilizadas.

Era objectivo neste estudo observar 3 áreas distintas por motivos e interesses diferentes. Perante o dente na sua totalidade assinalamos que queríamos observar: (i) a zona oclusal correspondente à restauração de

amálgama; (ii) a zona mediana da coroa dentária abaixo da restauração que internamente é correspondente à dentina e polpa dentária coronal; (iii) uma área correspondente ao colo do dente situada na transição da coroa para a raiz correspondente à dentina e início de polpa radicular.

Para isso foram realizados (com a estreita colaboração do departamento de medicina dentária da universidade de Coimbra) neste grupo de dentes 3 cortes transversais em relação ao eixo do dente com espessuras de 2 mm. No grupo de controlo foi realizado um corte correspondente à zona interna do dente com as mesmas espessuras. Todos os cortes foram realizados com uma serra Exakt Band System 300 CL/CP nº série 30/838,22851 Norderstedt-Alemanha. Os cortes referentes às áreas internas do dente foram polidos com lixas de polimento Hermes – Silicon carbide Exakt – Alemanha, com a seguinte granulometria 300; 600; 1000;1200. Em todas as amostras foi feita desidratação com etanol a 50%, 70%, 90% e 100% por um período de 5 minutos e lavagem em ultra-sons por um período de 15 minutos. Só às amostras dos cortes transversais da zona coronal central e perto do colo do dente, foi aplicado nas suas superfícies ácido ortofosfórico a 37% durante 20 segundos, tempo normalmente recomendado pelo fabricante para a remoção da “semear Layer” ou lama dentinária da superfície da dentina e desobstrução dos seus túbulos permitindo uma melhor visualização da superfície do corte ao MEV.

Técnicas de Microscopia Electrónica de Varrimento Acoplada à Microanálise por Raio X²¹:

As características físicas e químicas das superfícies dos materiais determinam algumas das suas propriedades mecânicas, térmicas, eléctricas, ópticas, químicas e delimitam as suas potencialidades de aplicação tecnológica.

Os microscópios electrónicos são instrumentos que permitem a observação e caracterização de um material com base nas radiações resultantes da interacção com um feixe de electrões. O microscópio electrónico de varrimento permite obter imagens numa gama de ampliações da ordem de x10 a x500 00. O seu princípio de funcionamento consiste em realizar o varrimento da superfície da amostra por um feixe electrónico finamente focado, modulando o brilho em cada ponto da imagem obtida num monitor de visualização pelo sinal emitido pela amostra. Verifica-se assim uma correspondência ponto, por ponto, entre a imagem e a região observada da amostra, dependendo a natureza da informação contida na imagem da radiação e do detector utilizados.

As amostras a observar em SEM devem verificar algumas condições: (i) estabilidade nas condições de alto vácuo (pressão de 10^{-4} Pa) e condutividade eléctrica superficial, o que pode requerer a aplicação de um revestimento condutor, o carbono ou o ouro, tendo sido neste trabalho usado o carbono devido à sobreposição dos picos do Hg e do ouro no espectro difracção raio-X.

A detecção dos sinais resultantes da interacção do feixe de electrões com a superfície da amostra, permite realizar imagens com informação de topografia, composição química (n° atómico), da estrutura cristalina e da composição elementar desde que ao microscópio seja associado um espectrómetro de

raios X. Estas informações são obtidas e apresentadas em imagens simultâneas e podem ser directamente correlacionadas com a morfologia da superfície.

A designação de electrões retrodifundidos(ER), identifica os electrões emergentes da superfície da amostra com energia elevada, próxima da energia dos electrões primários. Uma característica relevante da emissão energia resulta do facto do coeficiente de retrodifusão ser uma função crescente com o número atómico (Z) do material.

A razão das imagens de ER apresentarem forte contraste topográfico é devida ao facto da intensidade da emissão dos electrões retrodifundidos ser crescente com o ângulo de incidência, a emissão de ER é fortemente direccional.

Para a detecção *in situ* de Hg, o microscópio electrónico de varrimento, (MEV), apresenta algumas vantagens relativamente ao microscópio electrónico de transmissão, (MET), nomeadamente devido ao facto de o processamento das amostras contendo Hg não envolver extracção do metal pesado, como acontece com o processamento para MET. Para além disso, a MEV tem ainda as seguintes vantagens: a sua profundidade de campo é superior à do MET, permitindo observar amostras mais espessas, maior rapidez do processamento técnico da amostra para observação e facilidade de observação directa das superfícies celulares e da forma geral das células, assim como análise do seu conteúdo químico; finalmente, a MEV permite observar grandes superfícies da mesma amostra num curto espaço de tempo. As desvantagens que podem ser indicadas à MEV são a sua mais baixa resolução relativamente ao MET e

também a impossibilidade de observar o citoplasma com o mesmo detalhe permitido pelo MET.

Quando o MEV está a funcionar no seu modo mais habitual (utilização de electrões secundários), as imagens assemelham-se às imagens habituais da observação visual, permitindo uma interpretação intuitiva mais ou menos imediata das superfícies celulares. Quando a imagem é obtida a partir de electrões retrodifundidos, a MEV perde detalhe mas permite, com o uso de microanálise, determinar o conteúdo químico do interior das células. Para a análise elementar do conteúdo celular utiliza-se a emissão de raios X que são produzidos sempre que um feixe de electrões interactua com a matéria. A emissão de raios X resulta da expulsão dos electrões das camadas mais internas dos átomos cujas orbitais estão ocupadas pelos electrões das camadas mais exteriores com emissão de radiação. Esta emissão de espectros característicos possibilita a microanálise qualitativa, semi-quantitativa e quantitativa dos elementos presentes na amostra. O Hg apresenta um espectro específico de emissão quando é atingido pelos electrões retrodifundidos, possibilitando assim a sua identificação por microanálise elementar.

O espectro de raios X emitido fornece informação específica acerca da composição química da área da amostra bombardeada pelos electrões. O método de análise por raios X é um procedimento que permite ainda informação quantitativa e permite a detecção da maioria dos elementos químicos até níveis da ordem 10^{-19} g.

As nossas amostras foram colocadas directamente sobre fita adesiva já previamente aplicada nos suportes metálicos adequados à observação microscópica e feito como já referido anteriormente um revestimento a carbono

a todas as amostras, em todos os suportes, melhorando a condutividade destas nas áreas não metais e permitindo estabilidade de imagem em áreas de contraste. Estes foram colocados no interior da câmara de observação do microscópio. O equipamento do CEMUP (Centro de Materiais da Universidade do Porto) utilizado na elaboração deste trabalho foi o microscópio electrónico de varrimento JEOL-6301F acoplado com Noren Voyager X-Ray com sistema EDS de detecção que permite a detecção de elementos químicos presentes numa concentração entre 0,1 a 0,2 %, e seleccionado para 30 segundos o tempo de exposição do feixe de electrões sobre áreas seleccionadas da superfície da amostra. As ampliações usadas foram variando de maiores para menores ampliações desde as 30x;100x;250x;500x;1000x e 5000x; dependendo do tamanho e qualidade da amostra a observar. Com esta técnica foi possível a obtenção de espectros de microanálise qualitativos e semi-quantitativos das zonas focadas a electrões retrodifundidos; para além da visualização topográfica da superfície dos amálgamas a electrões secundários.

Resultados

Resultados

Neste trabalho propusemo-nos através do SEM-XRM analisar 3 situações em dentes com restaurações de amálgama que permaneceram já restaurados em actividade na cavidade oral por longos períodos de tempo. Daí que os resultados apresentar-se-ão em 3 partes: a 1ª parte: *pesquisa da composição dos amálgamas, detecção e análise (SEM-XRM) de metais pesados como o Hg entre outros metais constituintes da liga, tendo como referência os resultados de um trabalho previamente realizado (já publicado e anexo aos Resultados) com amálgamas “in vitro”*. Uma 2ª parte onde foi feita a observação topográfica da superfície destas restaurações permitindo verificar o estado da sua estrutura após tantos anos de actividade funcional e/ou parafuncional (mastigatória, bruxismo, etc.) na boca. Também aqui utilizamos comparativamente os resultados “in vitro” obtidos com sucesso através da técnica já referenciada.

A 3ª parte consistiu na determinação da possibilidade de detectacção de vestígios de Hg em áreas mais internas do dente tais como dentina, tubulos dentinários e polpa dentária, usando como referência a análise da composição realizada nos cortes dos dentes de controlo.

Nos cortes dos dentes sem restauração verificamos uma riqueza em Ca e P, presença de C, O assim como Na, Mg e Cl. Como podemos observar pela microfotografia da Fig.1A 1B e seus respectivos espectros das zonas assinaladas como o demonstram a Fig.2.

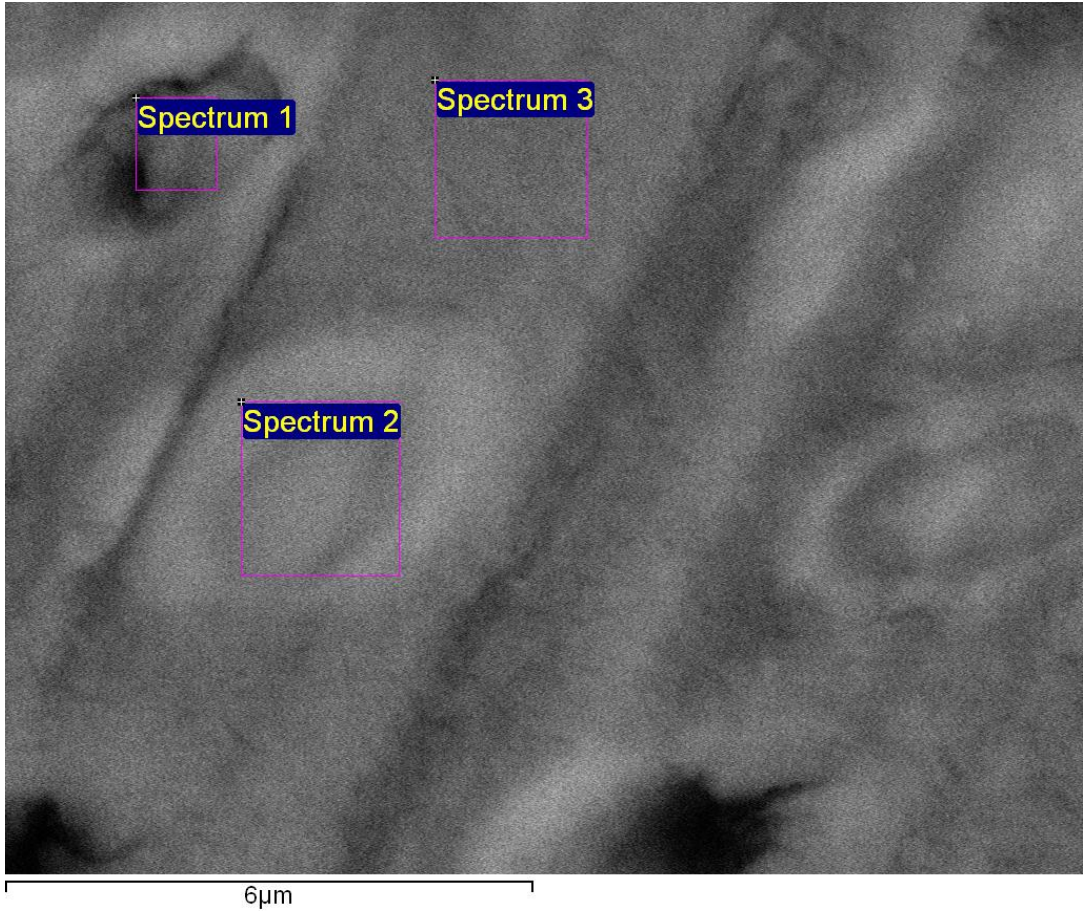
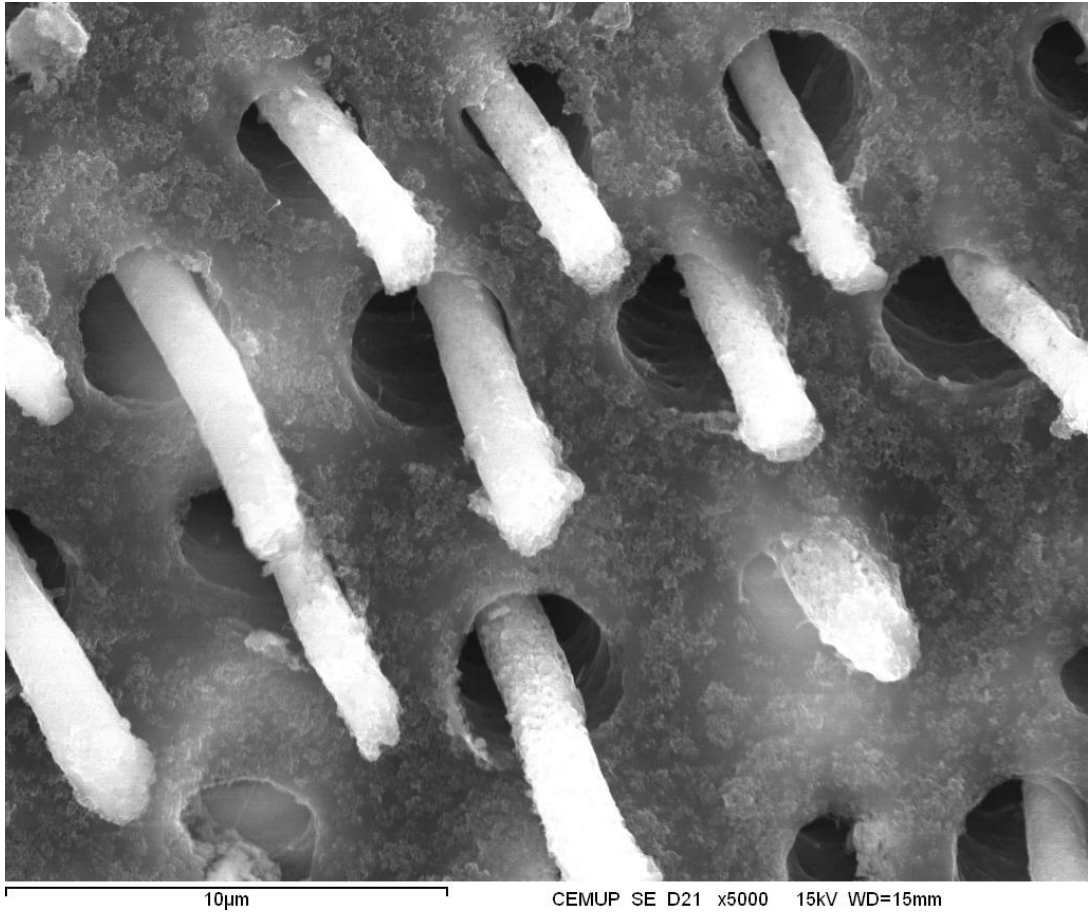


Fig. 1A 1B

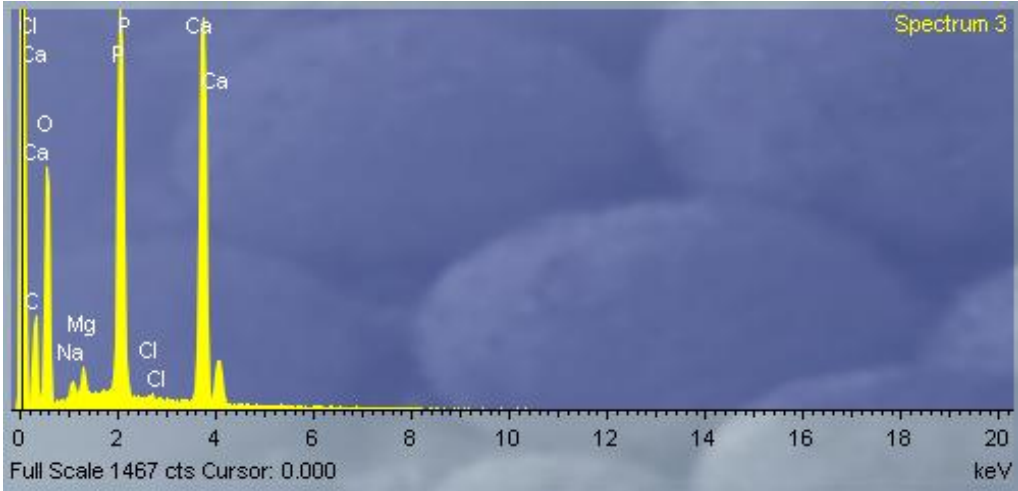
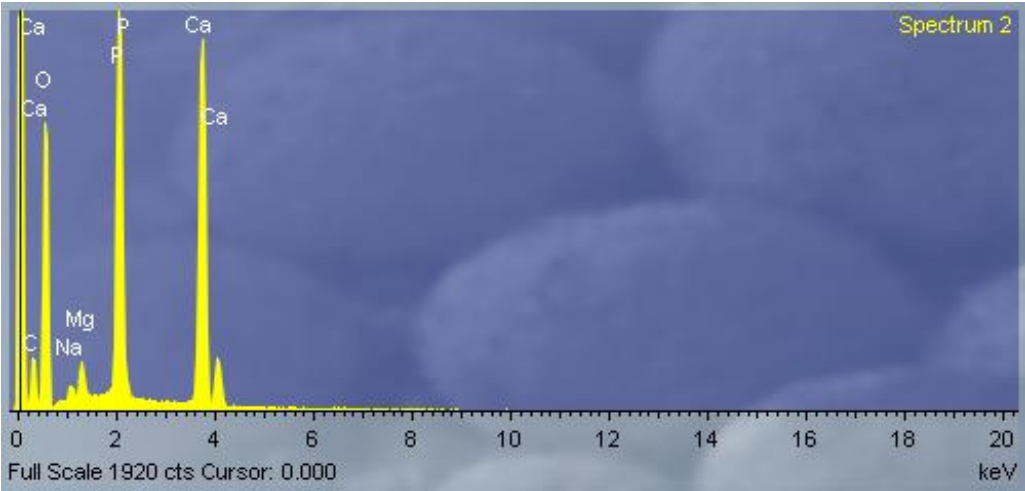
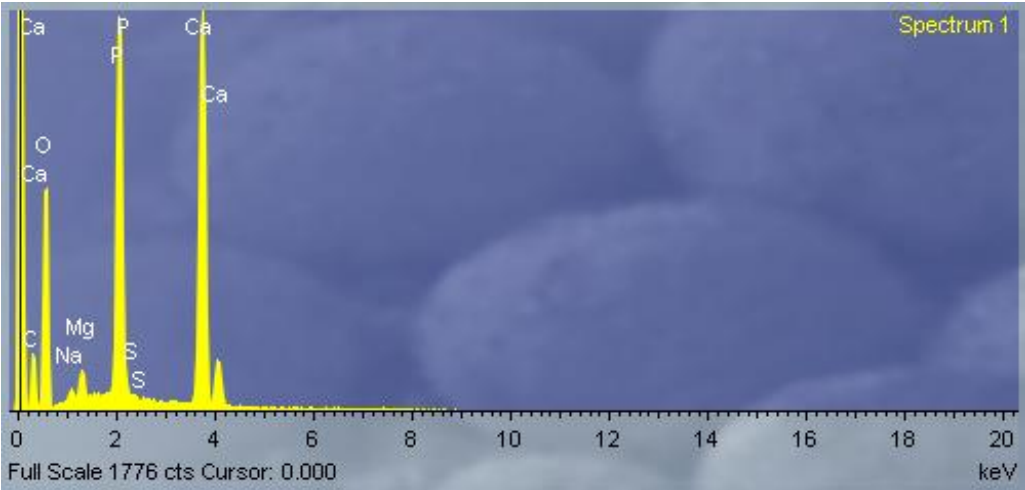


Fig. 2

Resultados 1ª parte – amálgamas “in vitro”

Estes são resultados relativos a um estudo com amálgamas realizado previamente ao actual trabalho e no âmbito de um estágio no CEMUP e que já foi publicado (apenso).

Os amálgamas aqui analisados estavam no seu estado original, isto é nunca estiveram na cavidade oral ou tiveram qualquer contacto com elementos que simulassem as condições da boca. Foram analisados usando a mesma técnica de SEM-XRM e toda a metodologia de trabalho encontra-se descrita no artigo respectivo anexado a esta tese.

É relevante salientar aqui os resultados deste estudo comparativamente aos resultados agora obtidos de forma a complementar todo o trabalho.

Pelos resultados obtidos verificamos: como se organizam e agregam as várias microestruturas tanto na presença do Hg (principal agente agregante), como no seu estado simples (só o pó sem o componente líquido) e em diferentes fases de preparação deste material restaurador, durante o trabalho de prática clínica do médico dentista. Observamos que a liga em pó organiza-se em microestruturas esféricas de várias dimensões onde se observam 2 fases Fig.3A 3B confirmando por EDS. Na observação a electrões retrodifundidos as duas fases caracterizam-se por uma área mais escura mais rica em Cu Z1 e uma área mais clara rica em Ag e Sn Z2.

Tal é confirmado pelos espectros de microanálise das zonas Z1 e Z2 respectivamente assinalados na Fig.4. Estas microestruturas apenas contendo Ag, Sn, Cu não se unem nem formam uma estrutura coesa susceptível de assim ser utilizada como se pode ver pela fotografia da Fig.3A.

Durante o processo de amalgamação em que tanto o componente líquido como o pó da respectiva liga se misturam o resultado é uma massa homogénea cinzenta inicialmente pastosa e relativamente fácil de manipular que gradualmente vai endurecendo e secando sendo quase impossível trabalhar nessas superfícies sem a ajuda de instrumentos rotativos de alta velocidade. Sob a visão da microscopia temos imagens de um material unificado onde é possível distinguir 3 áreas distintas de tonalidades e texturas diferentes entre si como se pode ver pela fig.5A 5B. Temos uma zona bastante

clara(branca) assinalada por Z2 onde o Hg definitivamente é o material preponderante estando a Ag também presente; uma zona Z3 cinza onde o Sn é o elemento mais concentrado e uma área de dimensões mais pequenas situada entre as duas anteriores zonas mas muito próxima a Z3 de tonalidade cinza mais escura assinalada por Z1 e onde o Cu é o mais concentrado logo seguido pelo Sn como se pode ver pelos respectivos espectros representados na Fig.6.

Quando observadas as imagens dos amálgamas após tratamento de condensação, compactação e brunimento pelo profissional de medicina dentária, a composição dos seus elementos a sua predominância e organização criando zonas de diferentes tonalidades e aspecto permanece praticamente igual ao que foi observado nas amostras anteriores (amálgamas não manipulados).

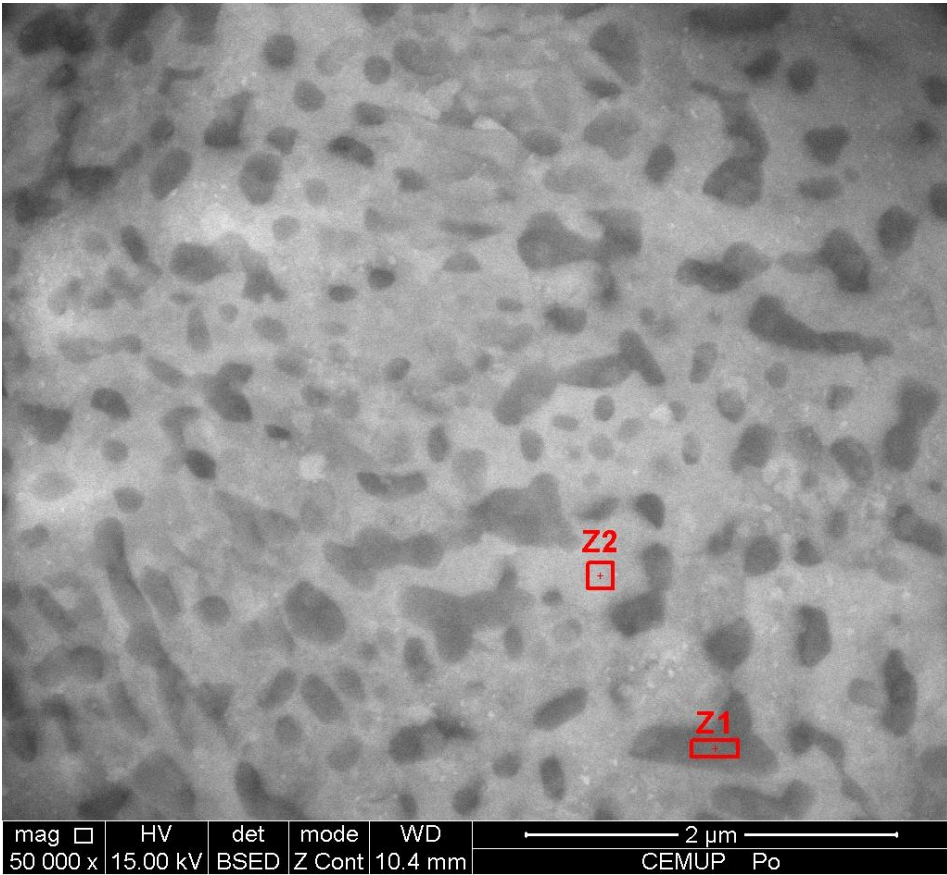
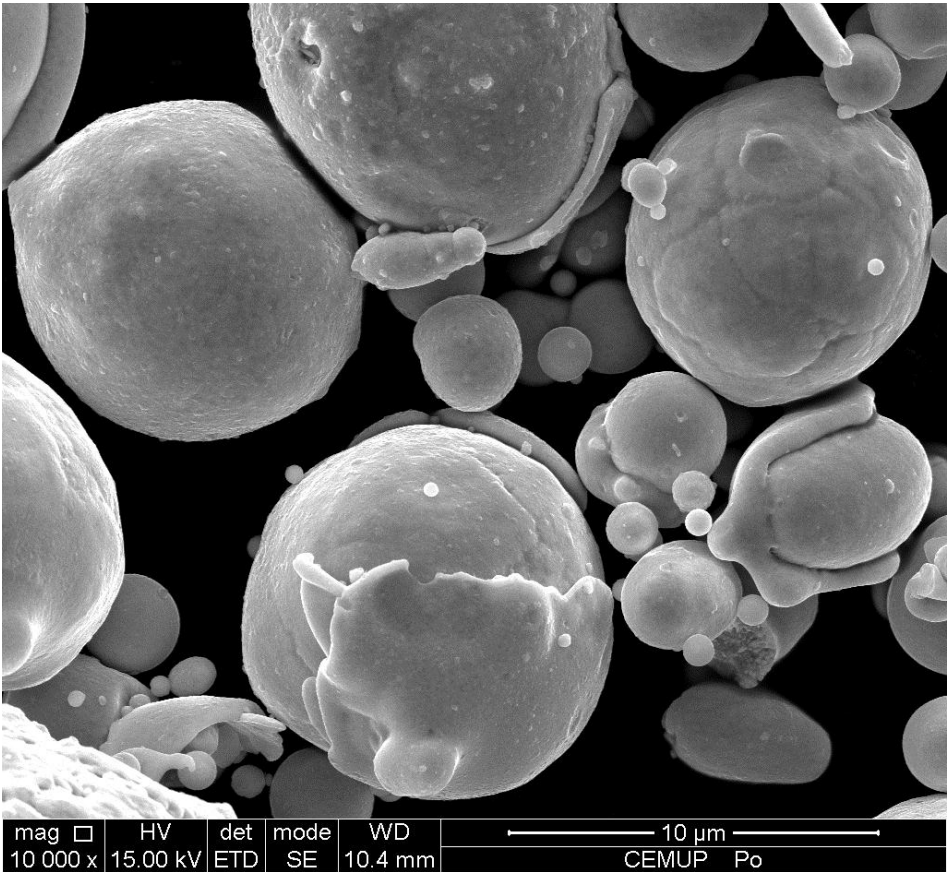
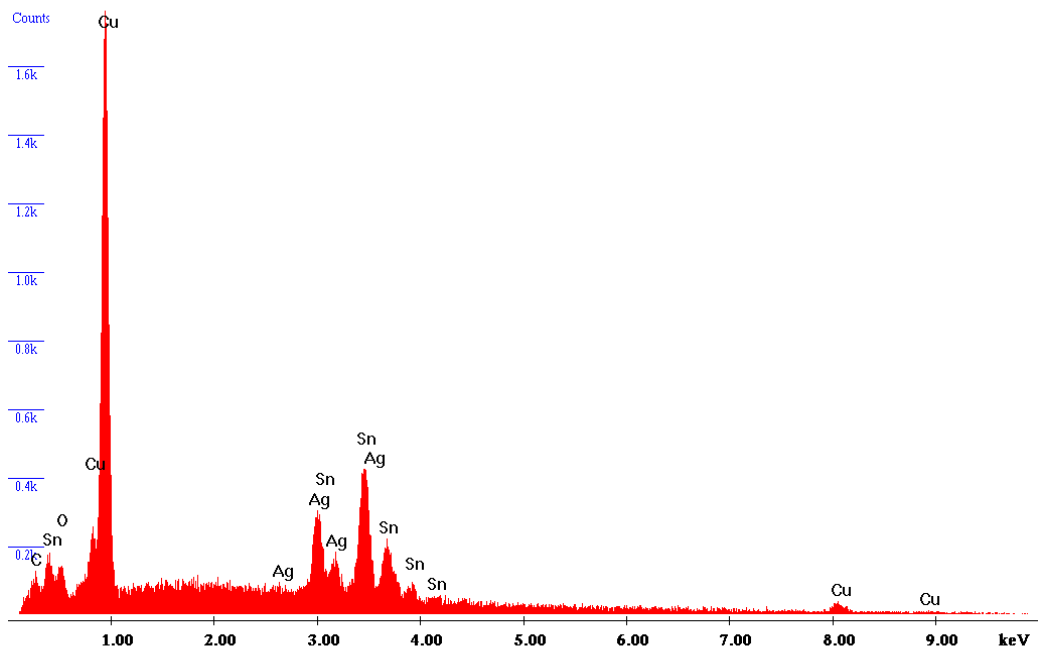


Fig. 3A 3B

\\Support-d8425\SharedData\CEMUP_ARQUIVO\CEMUP_2010\CEMUP_04_2010\20100

Label A: CEMUP 10kV Po Z1



\\Support-d8425\SharedData\CEMUP_ARQUIVO\CEMUP_2010\CEMUP_04_2010\20100

Label A: CEMUP 10kV Po Z2

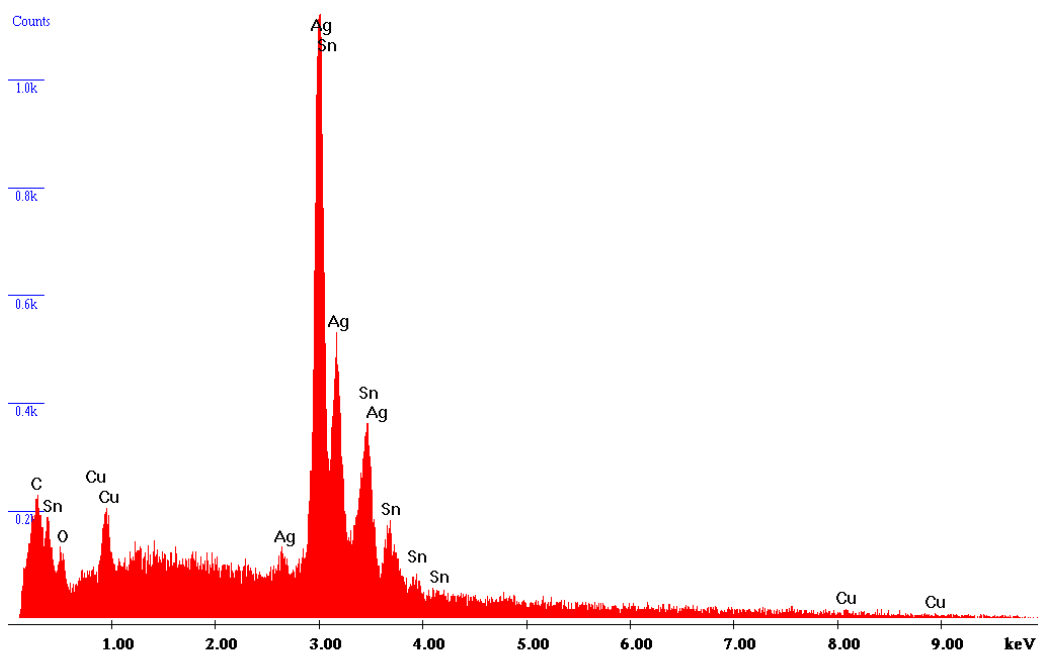


Fig. 4

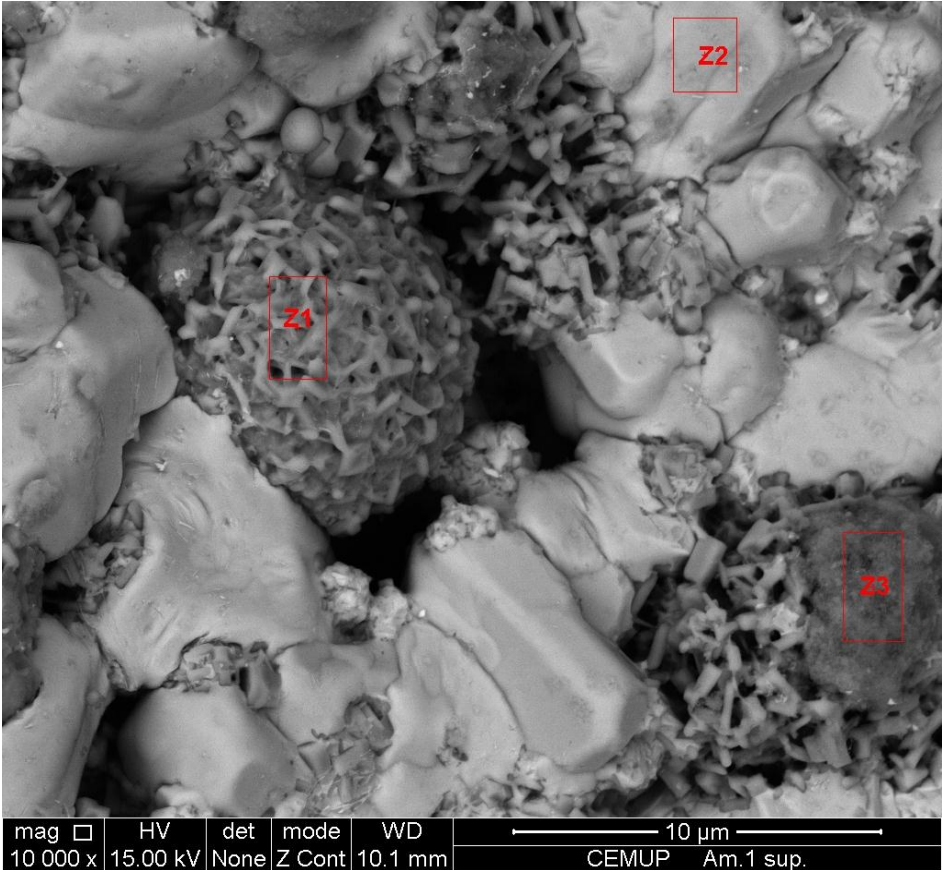
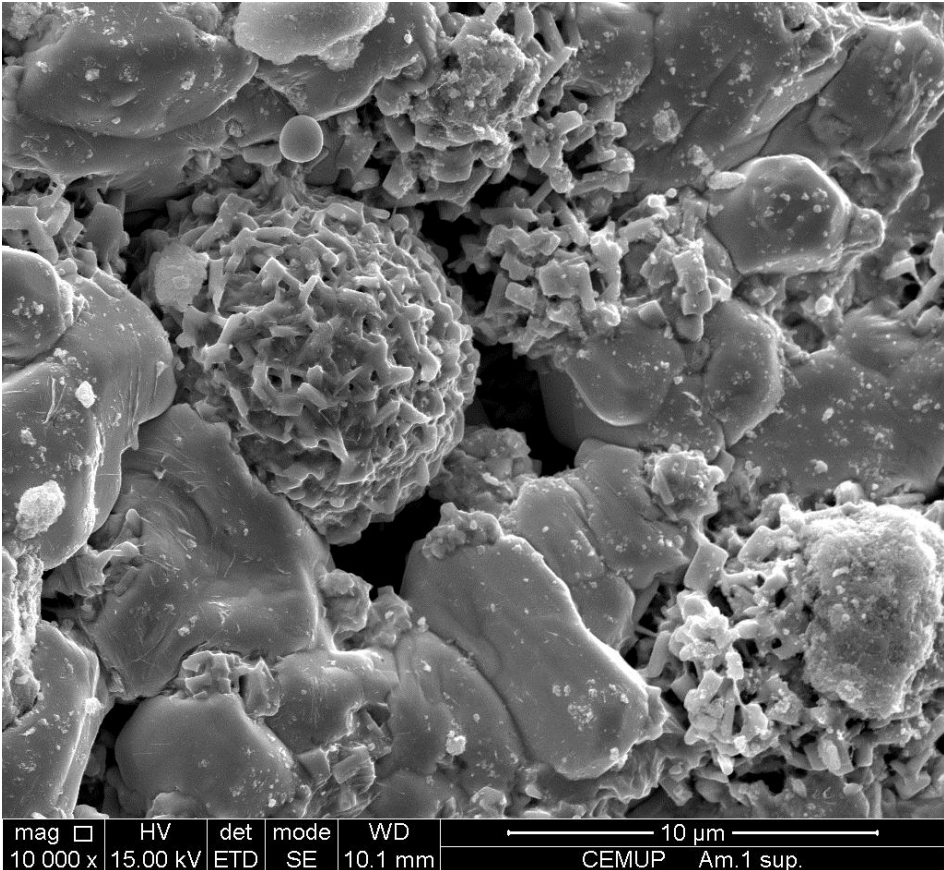


Fig. 5A 5B

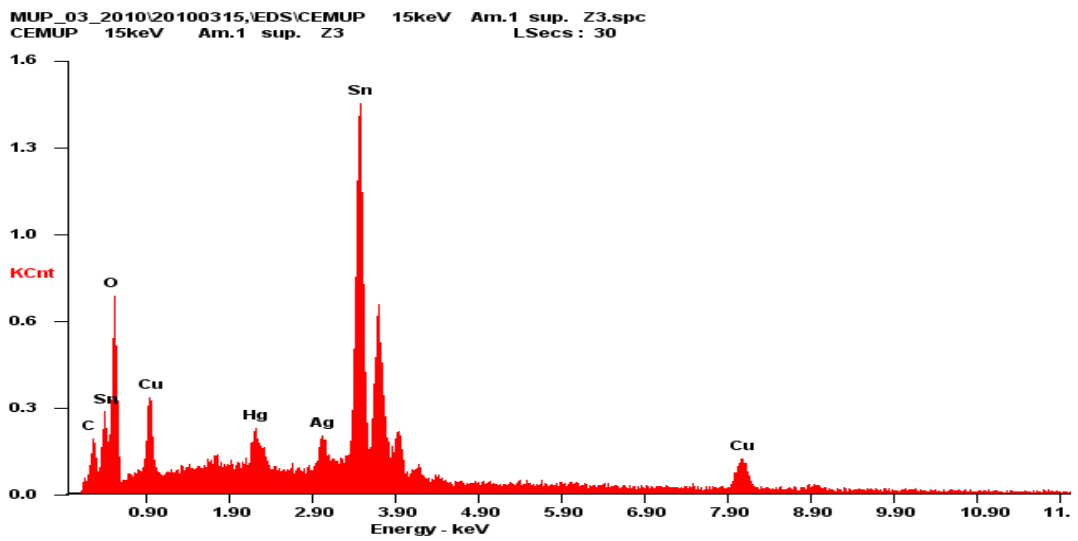
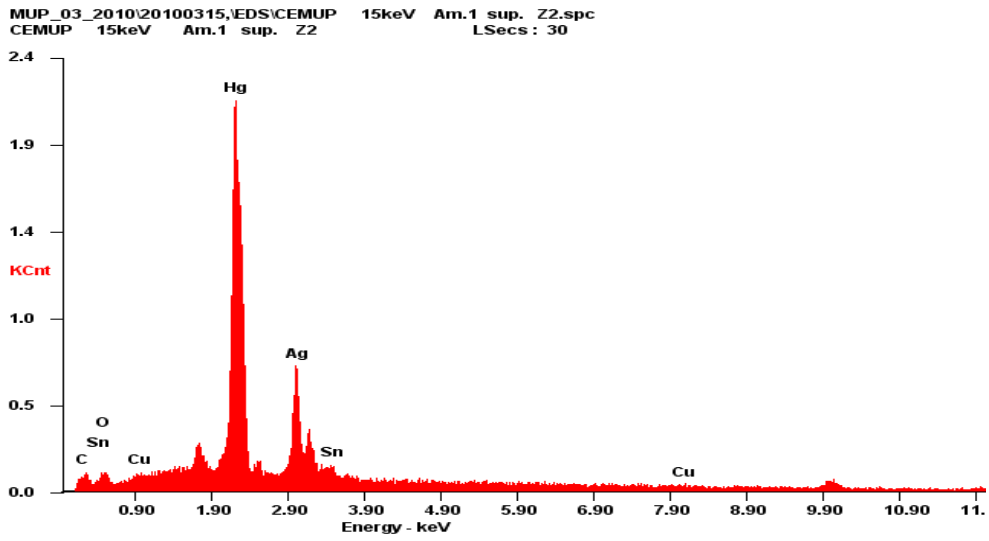
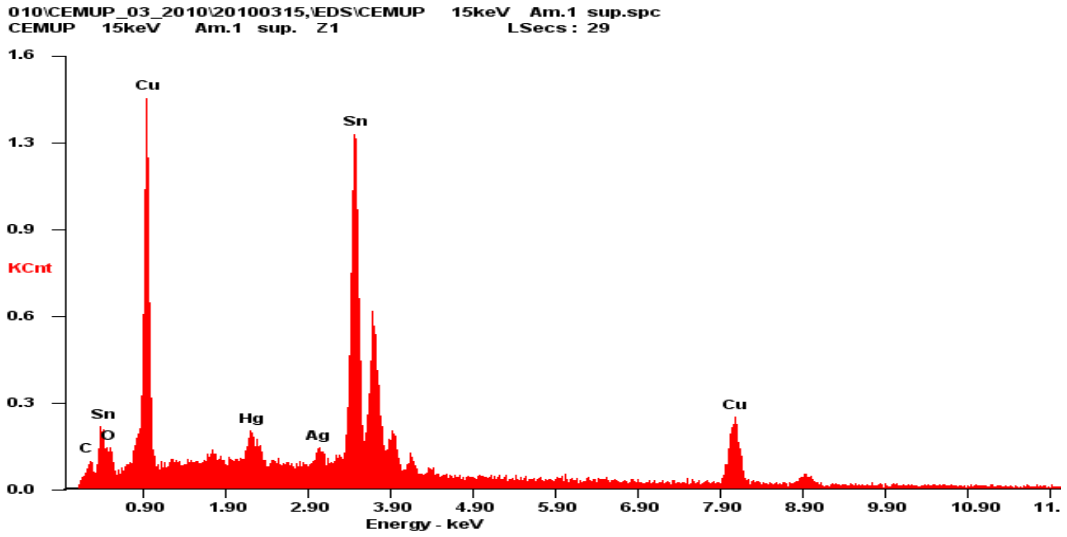


Fig. 6

Resultados da 1ª parte - amálgamas “in vivo”

Da análise das amostras de amálgamas a electrões retrodifundidos demarcam-se principalmente 4 zonas diferenciáveis entre si por apresentarem tonalidades distintas dadas as diferenças de número atómico. Isto é áreas muito claras, brancas até brilhantes (excluído qualquer potencial efeito de carga) têm elementos com número atómico elevado, áreas com menor número atómico apresentam-se mais escurecidas em tons cinza ou preto. Essas zonas foram sujeitas a análise química dos seus elementos por XRM e revelaram que: nas zonas brancas os pontos assinaladas por Z1 na imagem da Fig.7A 7B mostram que o Hg é o elemento químico preponderante acompanhado da presença significativa da Ag como se pode confirmar pelo respectivo espectro de microanálise representado na Fig.8. Na microfotografia a área cinza marcada por Z2 o elemento mais concentrado nestas áreas é o Sn, sendo que também o Cu aparece assinalado em Z3 como se pode ver pela observação dos espectros da Fig.8. São áreas cinza mais escuro e de aspecto mais rugoso (visível na imagem) que ele se apresenta mais concentrado. Podemos inferir que este cobre esteja já num estado de óxido de cobre pela análise do espectro dada a grande presença de oxigénio mostrando pelo aspecto fotográfico sinais de oxidação.

É possível verificar na totalidade da superfície dos amálgamas que há uma predominância das zonas cinzentas (sejam elas mais cinza claro ou cinza escuro) onde há predominância do Sn e/ou do Cu, sobre as áreas mais brancas ricas em Hg e Ag . A presença de zinco nestes amálgamas também é aqui assinalada como se pode ver pelo espectros de Z2 e Z3 correspondente à imagem assinalada anteriormente, sendo provável já se encontrar também no

estado de óxido demonstrando mais uma vez a existência de depósitos de óxidos nas superfície destes amálgamas. O Zn não foi detectado em todas as amostras.

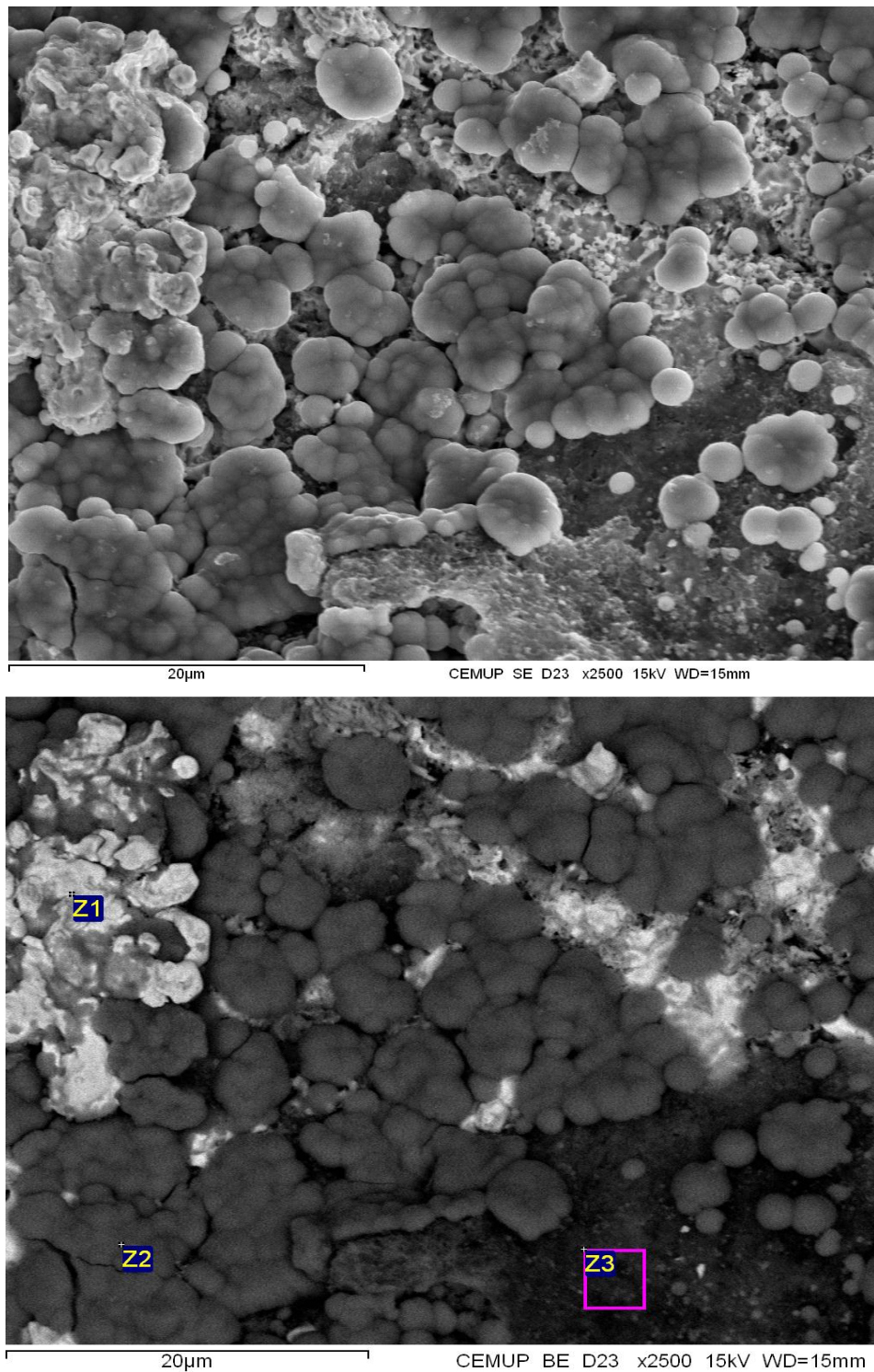


Fig. 7A7B

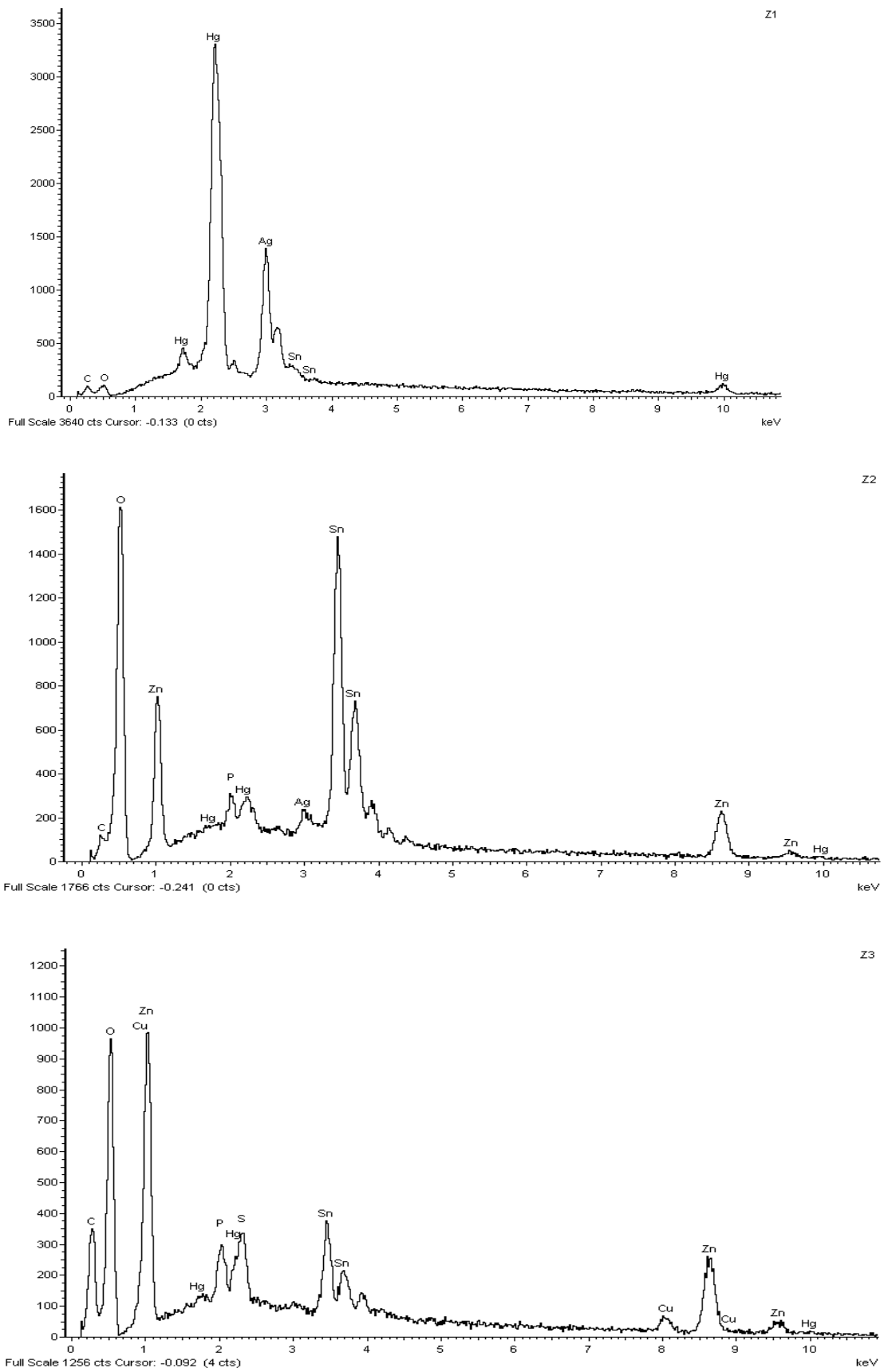
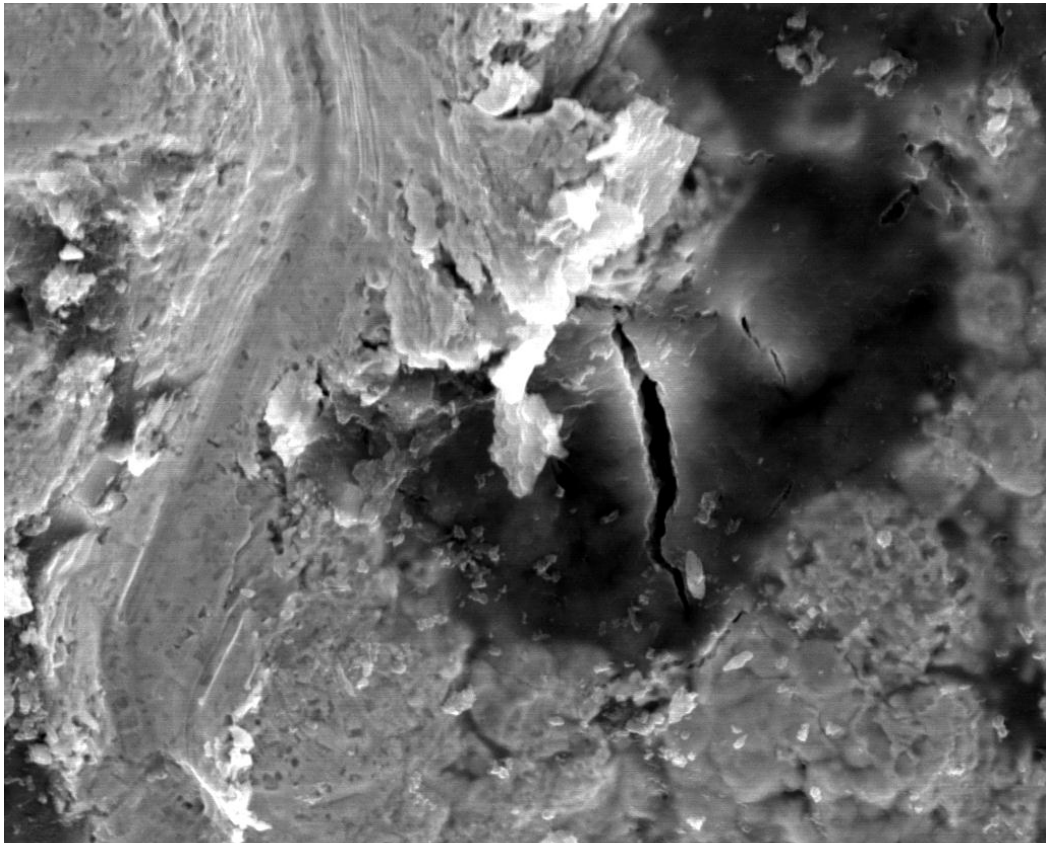


Fig. 8

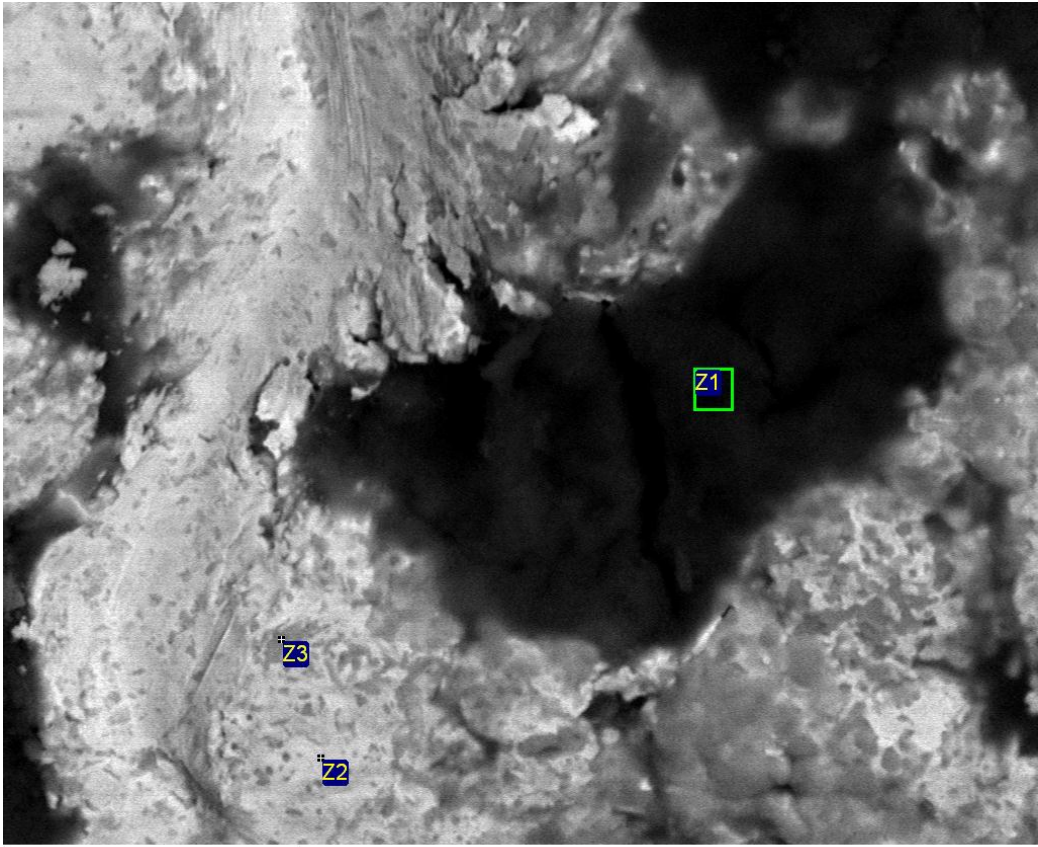
Uma área bastante escura também depositada na superfície dos amálgamas foi detectada em todas as amostras e foi quimicamente estudada por XRM como mostram as Fig.9A 9B assinalada por Z1 e revelou conter Cálcio(Ca), fósforo(P), carbono(C) e oxigénio(O) em quantidades altas mas sendo também visível a presença de sódio(Na),magnésio (Mg) e enxofre (S) confirmado pelo respectivo espectro na fig.10. Dada a sua composição podemos designar este material aí depositado e agora formando áreas na superfície dos amálgamas de filme biológico.

Também nesta imagem foram assinaladas as áreas marcadas por Z2 e Z3 e demonstrados os respectivos espectros de microanálise na Fig.10 que seguem a linha do que já foi anteriormente dito.



10µm

CEMUP SE Am.D16 x3500 15kV WD=15mm



10µm

CEMUP BE Am.D16 x3500 15kV WD=15mm

Fig. 9A 9B

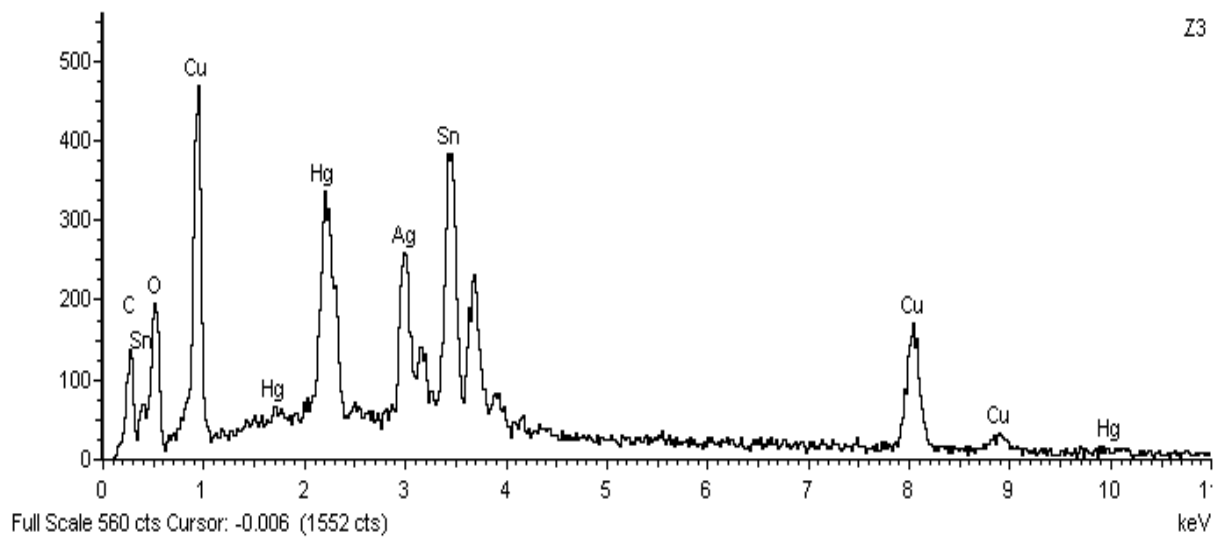
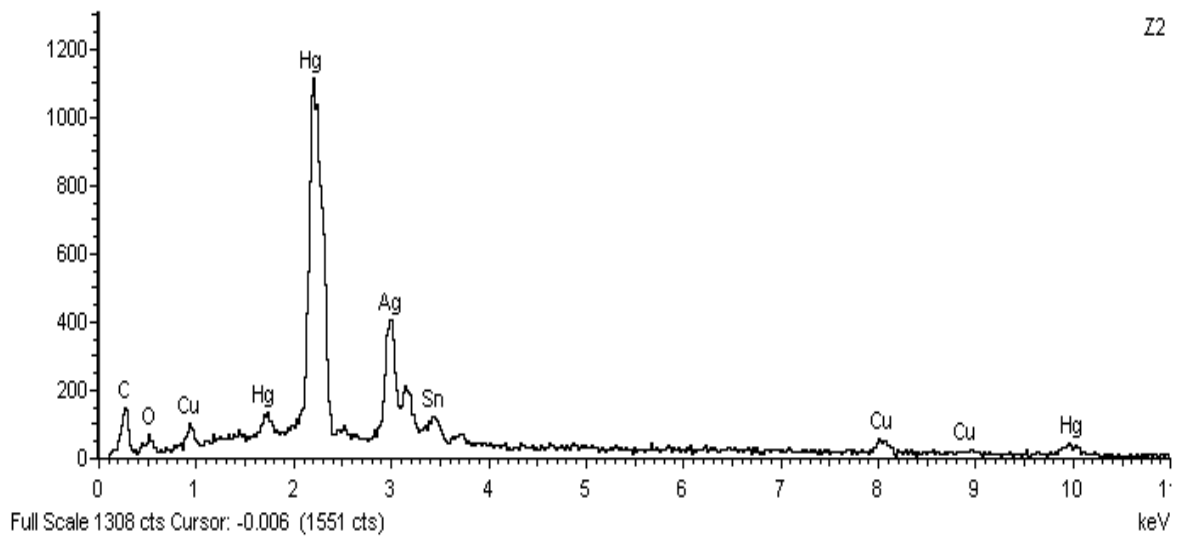
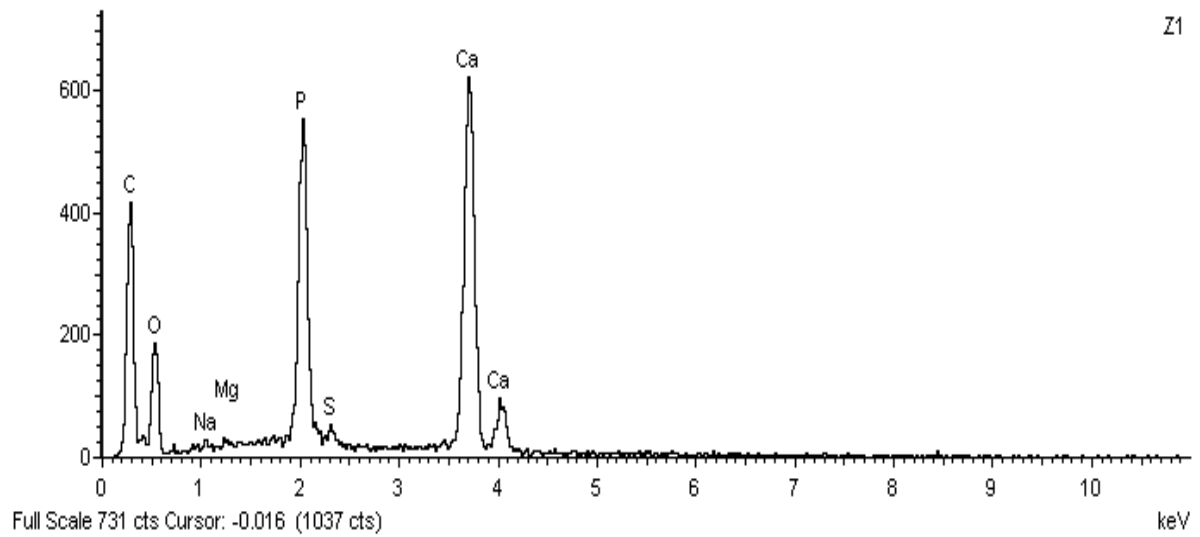


Fig. 10

Mais uma vez podemos inferir que em análise das imagens as zonas mais escuras (cinzas ou negras) comparativamente às zonas mais claras onde o Hg é predominante aparentam ser mais extensa em termos de área total. Isto é observam-se várias zonas claras (brilhantes) espalhadas pela superfície da massa de amálgama mas de dimensões mais reduzidas e refinadas sendo bastante extensa a zona cinza dominando a visão global que se tem da restauração.

Nestas 4 áreas assinalamos principalmente os elementos aí dominantes mas de resto como se pode observar pelos espectros indicados anteriormente muitos desses elementos químicos que nas zonas analisadas são preponderantes noutras zonas também são passíveis de ser encontrados mas em concentrações mais reduzidas. Outros elementos químicos como Silício(Si) e Cloro(Cl) aparecem em grande parte das amostras mas no geral em pequenas quantidades. Dentro da mesma linha de resultados pouco expressivos também foi detectada foi a presença de Flúor(F), Ferro(Fe), Titânio(Ti) e Alumínio(Al). Como se pode observar pelos espectros e imagens colocadas em anexos.

Salienta-se a presença de S nas amostras como se pode verificar pelos espectros representados anteriormente sendo ele um elemento que não faz parte da composição original e inicial dos amálgamas, mas sabe-se que permuta muito facilmente com o mercúrio nos organismos biológicos. É aqui detectado em diferentes zonas escolhidas para microanálise em várias amostras.

Resultados 2ª parte - amálgamas “in Vitro”

Em relação à estrutura destas amostras os resultados da observação mostram amálgamas “limpos” de qualquer biofilme contaminante e ocupante das suas superfícies. Tanto nos amálgamas não manipulados (Fig.11A 11B) como nos que foram trabalhados pelo médico dentista em fase laboratorial (Fig.12A 12B) apresentam grande definição na morfologia das microestruturas. Extensa área clara composta de microestruturas com aspecto rombóide densas no seu interior envolve múltiplas áreas de menor tamanho de contorno esférico e aspecto reticulado. Também facilmente distinguíveis são pequenas massas densas e escuras que existem em menor quantidade que estão mais visíveis nas imagens assinaladas no artigo anexado *“Técnica de microscopia electrónica de varrimento acoplada à microanálise por Raio X (SEM-XRM) aplicada ao estudo de amálgamas dentários.”*¹⁶

Existem contudo diferenças nos resultados “in vitro” observados entre as amostras não manipuladas e manipuladas. Estas ultimas apresentam uma redução no tamanho da totalidade das microestruturas observando-se menos hiatos maior união entre si resultando num material mais compacto de acabamento mais uniforme como se pode comparar entre imagens.

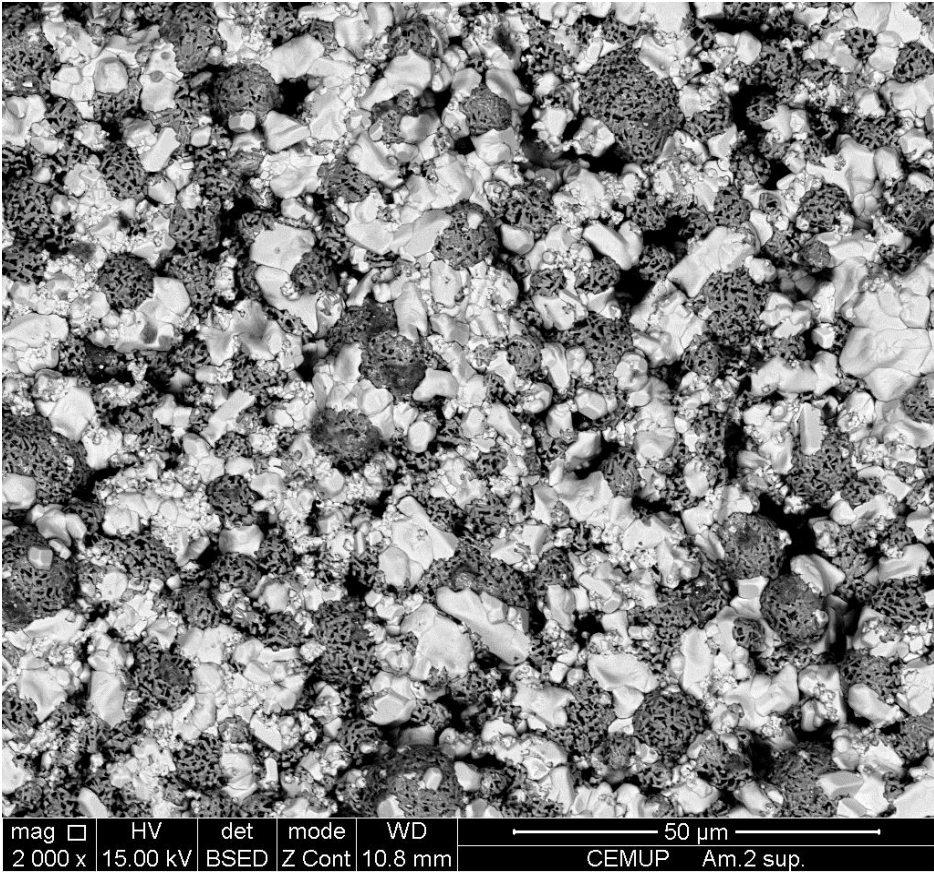
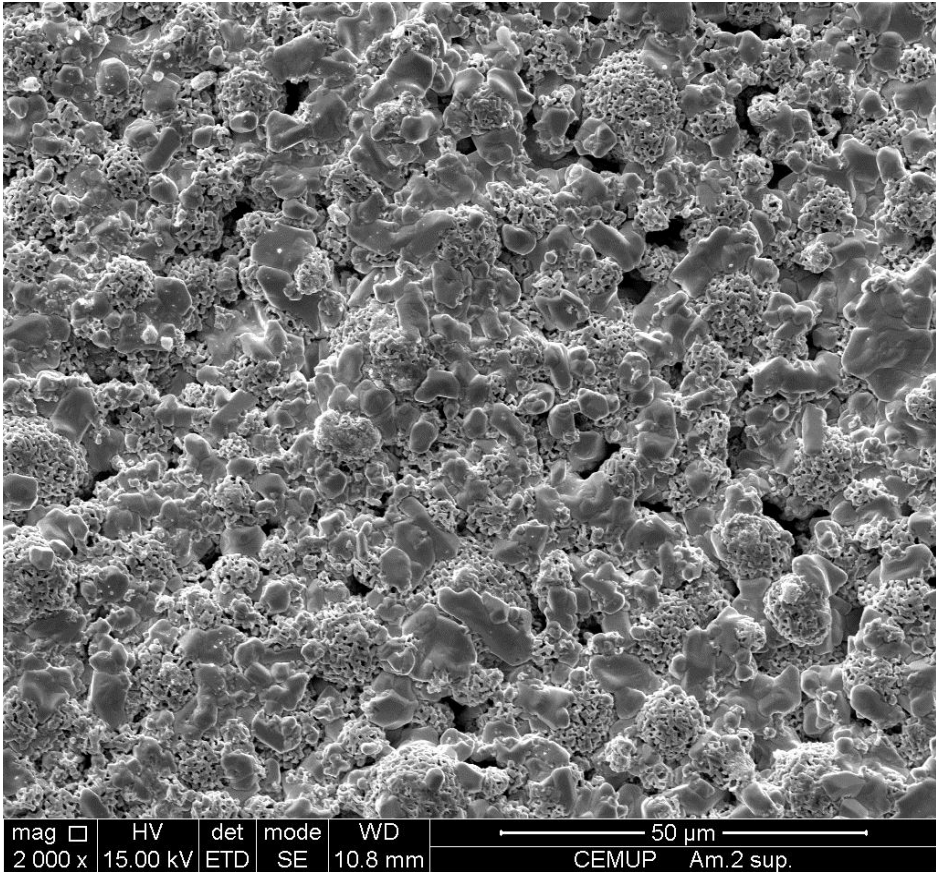


Fig. 11A 11B

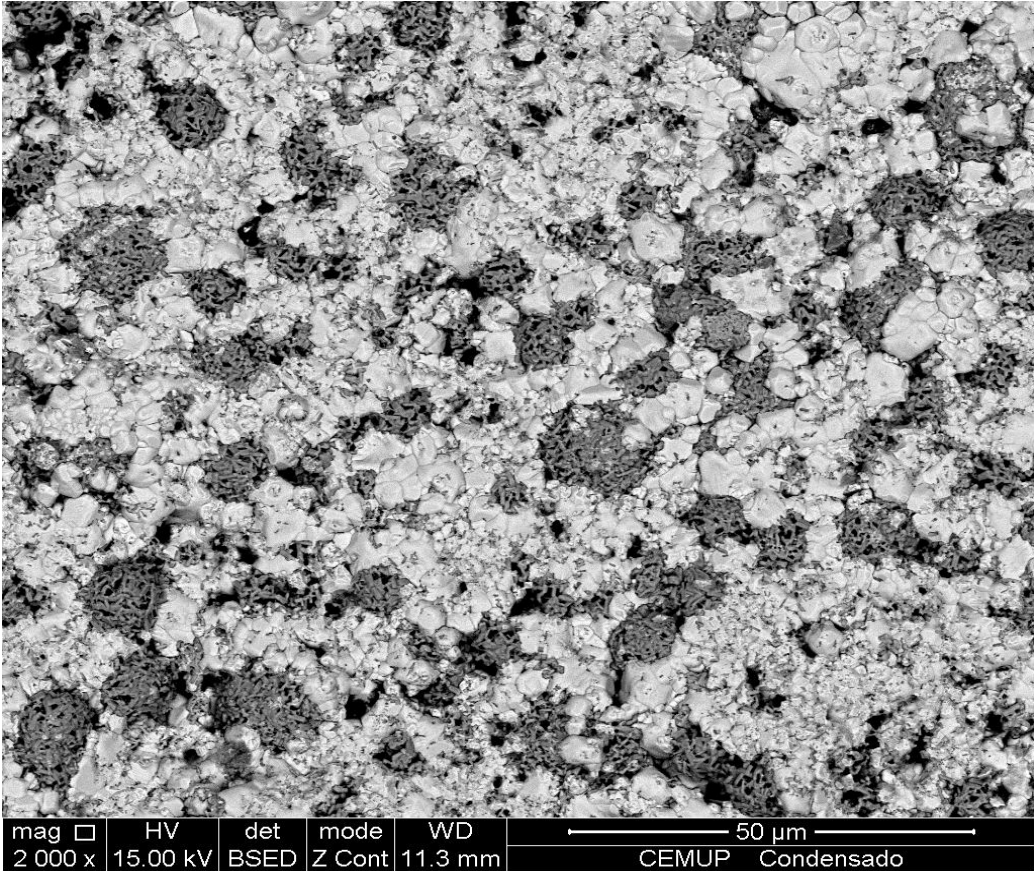
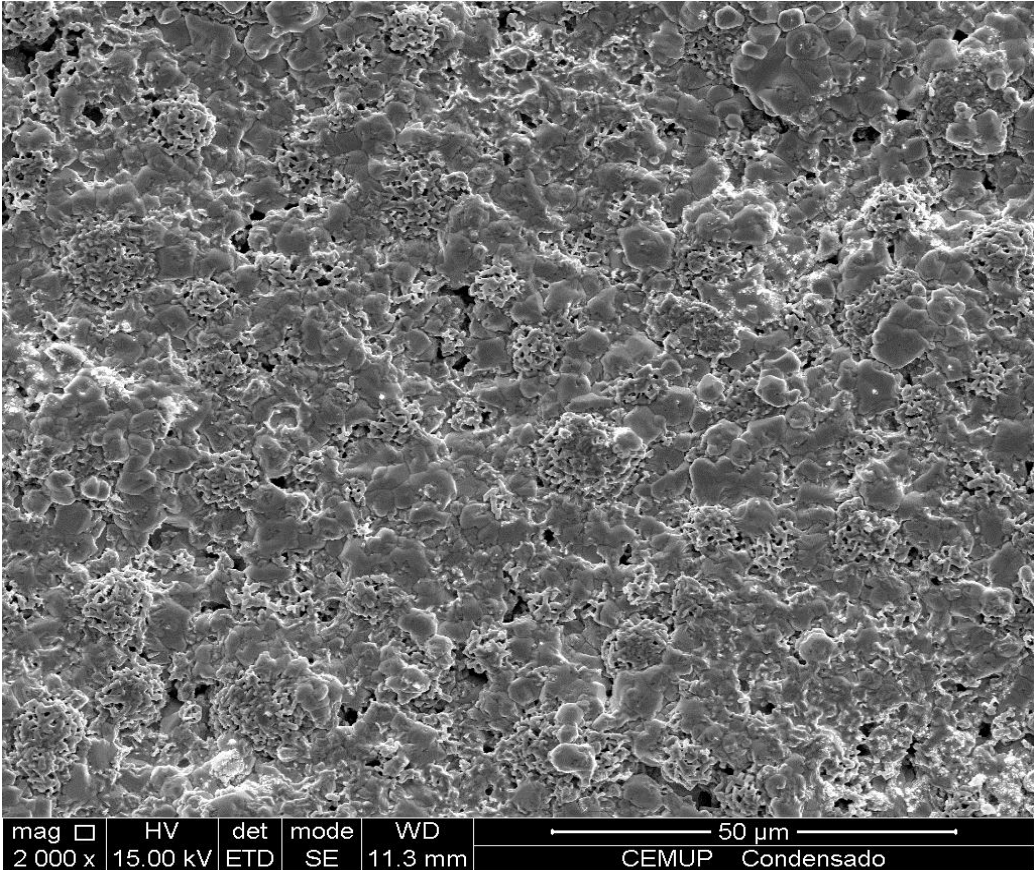


Fig. 12A 12B

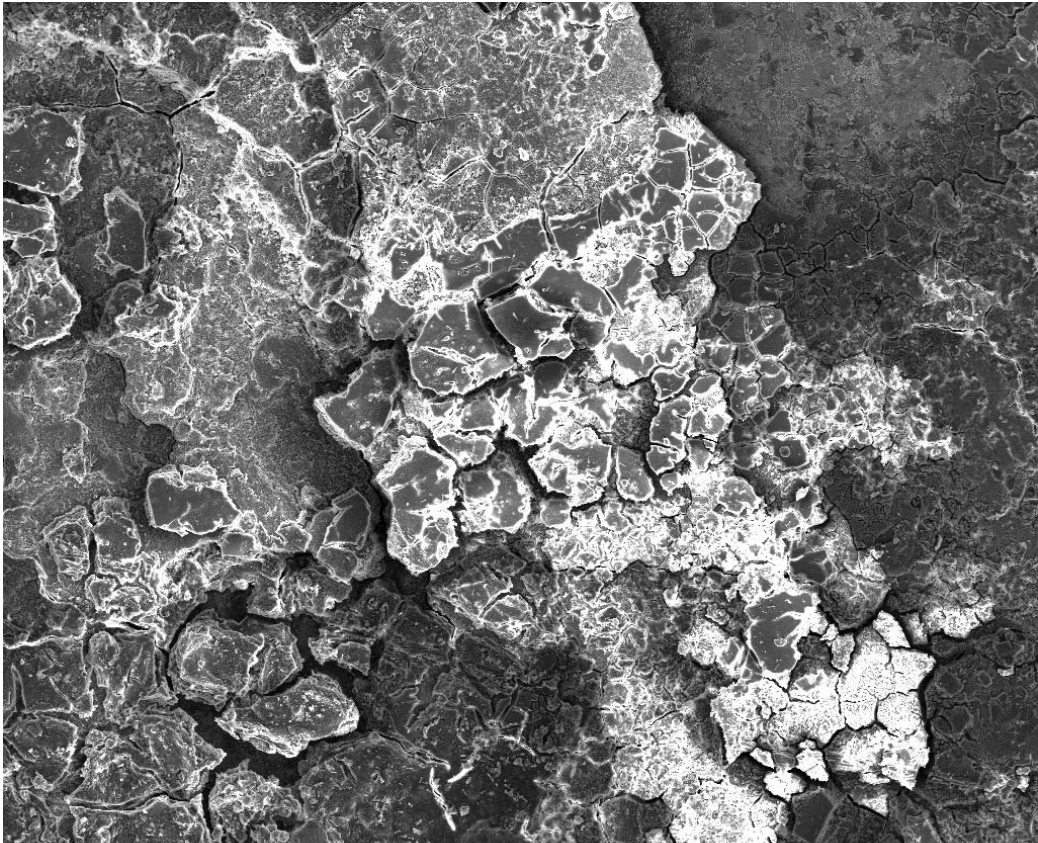
Resultados da 2ª parte- “in vivo”

Foram observadas ao microscópio electrónico por varrimento e microfotografadas as superfícies de amálgamas dentários que estiveram na cavidade oral por períodos de tempo entre o médio e longo prazo em actividade, em contacto com saliva, bactérias, alimentos, produtos de tratamento e higiene dentária. Sujeitos a efeitos de desgaste, corrosão, diferenças de PH, etc. Através das imagens a electrões secundários e retrodifundidos verificamos o aspecto que caracterizava a superfície desses amálgamas.

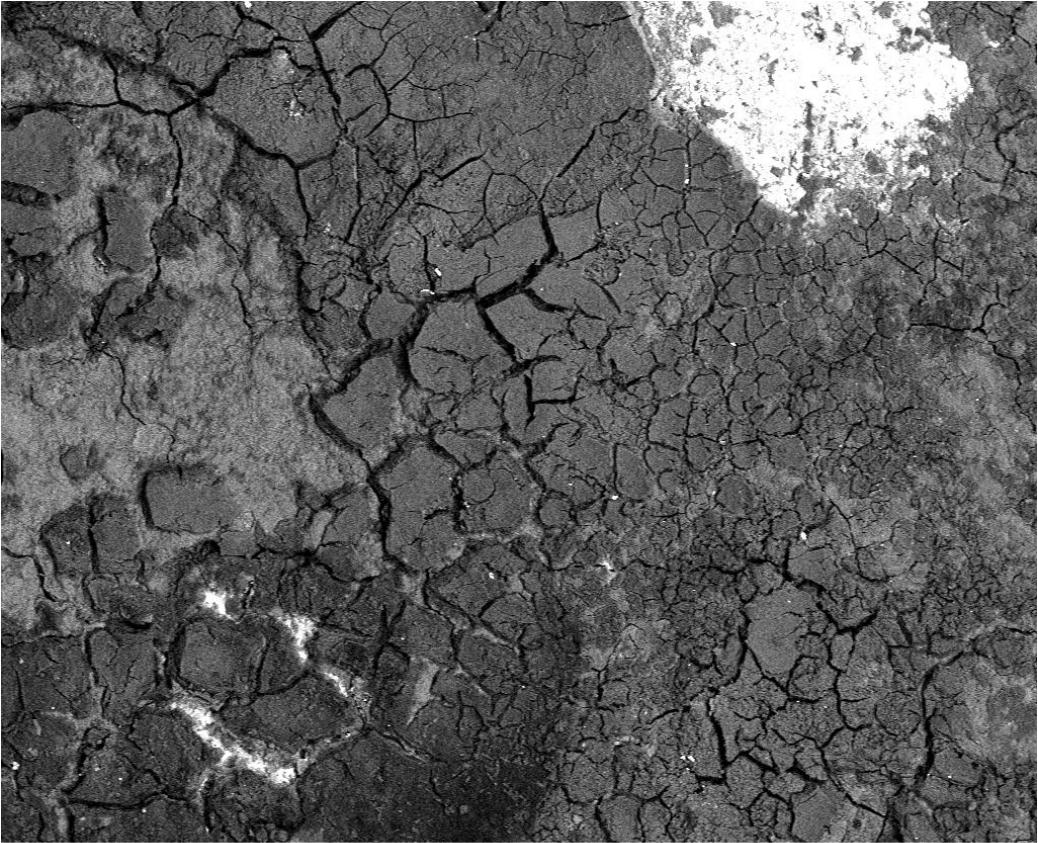
O que ressalta neste exame topográfico através do SEM é que em todas as amostras observadas se verifica a presença de uma camada de material a cobrir a superfície dos amálgamas. Está depositada sobre a restauração penetra e ocupa poros, cavitações e falhas que se criaram na estrutura original de amálgama, não cobrindo contudo a totalidade das suas superfícies deixando áreas livres onde é possível fazer observação do material de restauração. Tem um aspecto escuro variando na textura umas vezes é “liso” mais uniforme formando extensas placas que em determinadas áreas mostram-se fissuradas, ligeiramente levantadas (como se estivessem a descolar da parte mais inferior dando a forma do tipo “cracking” como se pode ver pela Fig.13A 13B. Outras vezes é rugoso, globular ou em forma de filamentos em intrincadas uniões Fig.14A 14B e fig.15A respectivamente. É uma massa resultante do acumulo de matéria orgânica, de elementos constituintes da estrutura dentária por desmineralizações desta, de depósito dos óxidos metálicos resultantes da corrosão destas ligas, de calcificações da placa bacteriana criando este biofilme revestidor da restauração. A sua composição que foi analisada

quimicamente por XRM e revela ser rica principalmente em C; O; P e Ca estes últimos já sob a forma de fosfatos cálcicos. O Cu e Zn aí detectados estarão na forma de óxidos resultantes dos processos de corrosão e oxidação da estrutura metálica. Também são detectados elementos como o S, Cl, Na, Mg, Si, como já referido nas análises anteriores e mostrado também pelo espectro exemplificativo da fig.16.

Flúor (F), ferro (Fe) e alumínio (Al) também foram encontrados mas só em 2 amostras por cada elemento e em concentrações vestigiais.



600µm CEMUP SE Am.D14 x100 15kV WD=15mm



600µm CEMUP BE Am.D14 x100 15kV WD=15mm

Fig. 13A 13B

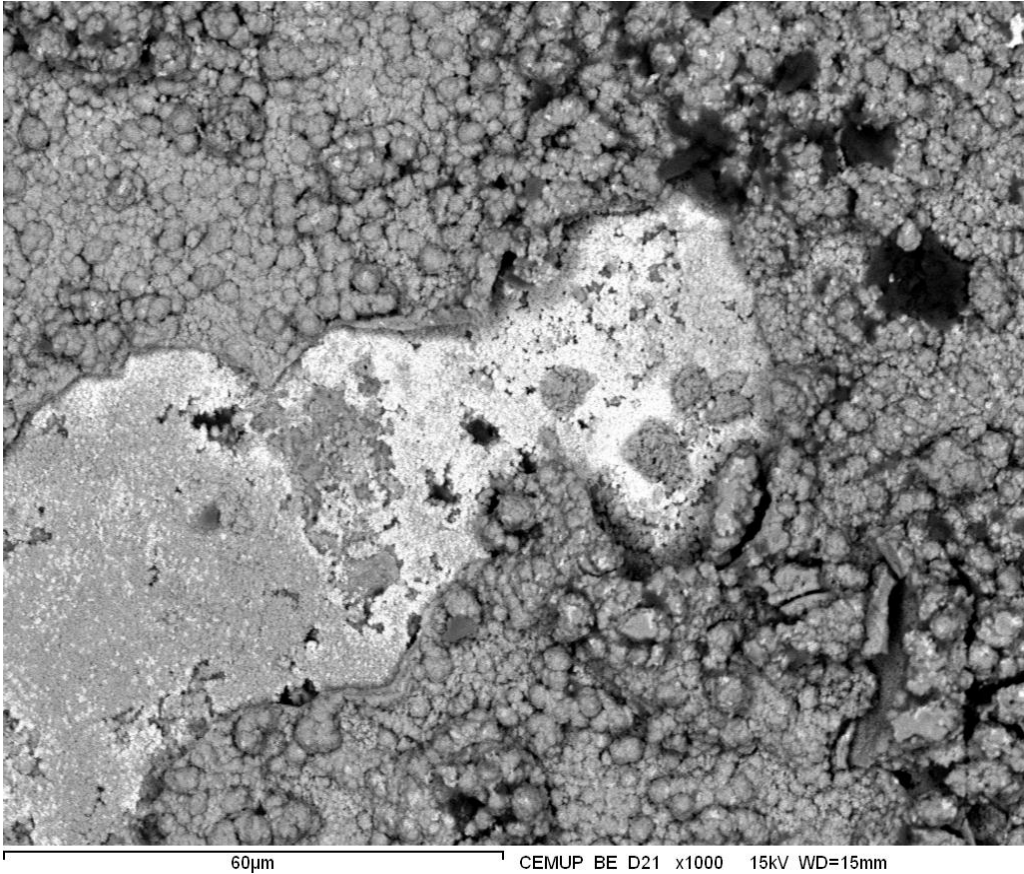
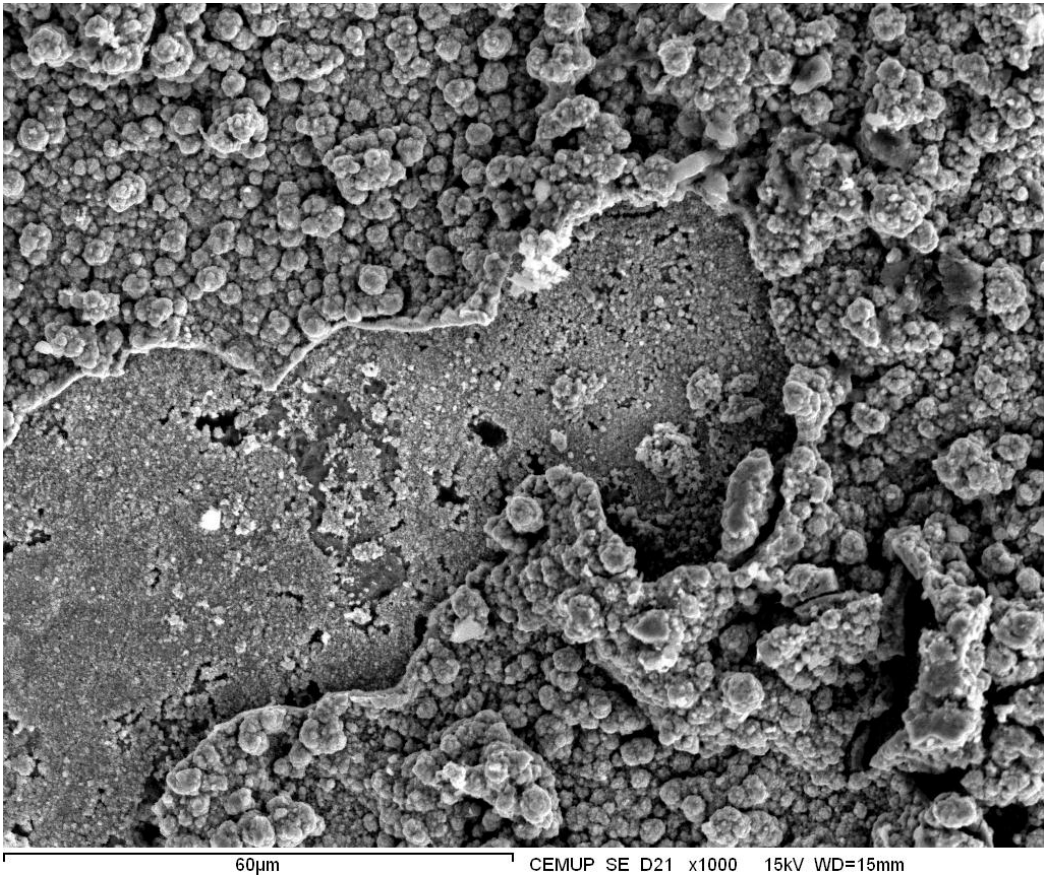
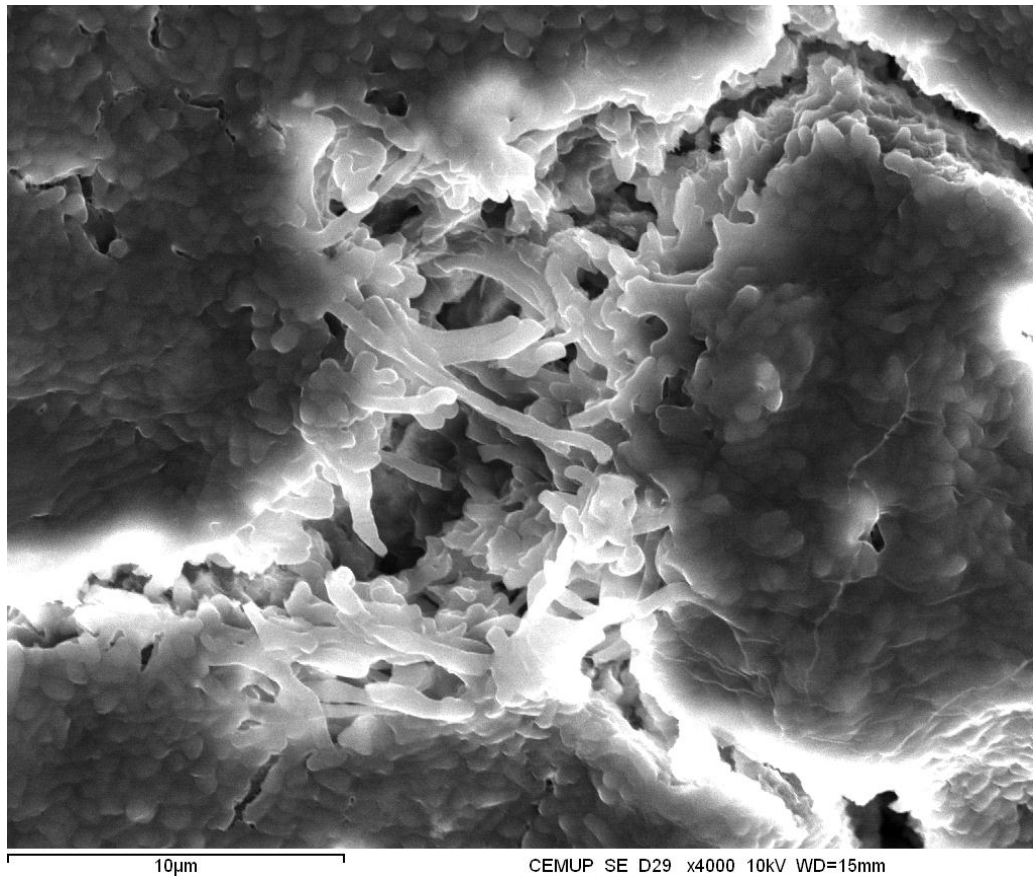
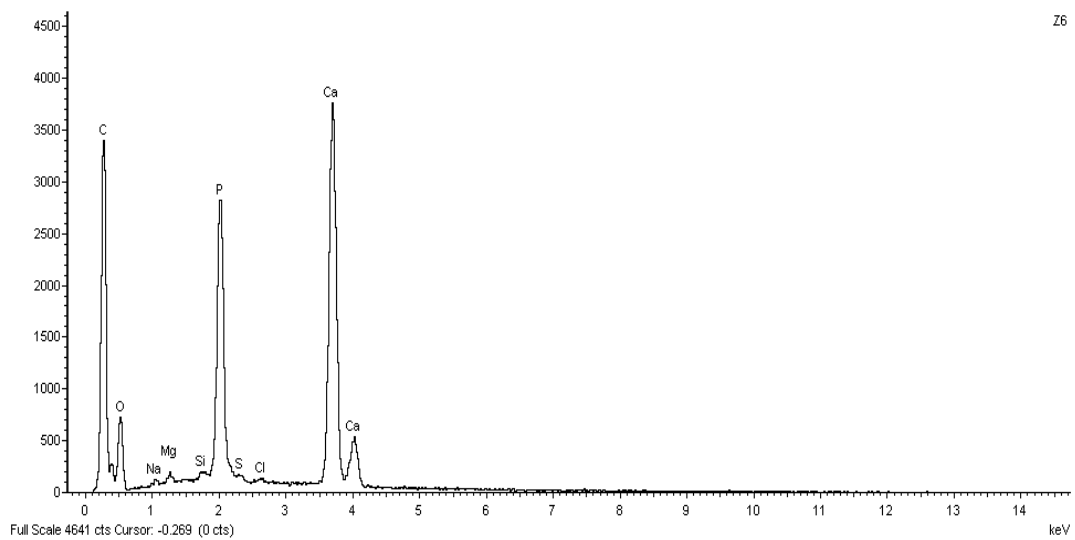


Fig. 14A 14B



Figs. 15A 15B



Z6

Fig. 16

Nas áreas de amálgama propriamente dito este apresenta-se bastante espalmado como tendo sido prensado, comprimido e de aspecto mais refinado e em algumas amostras tem áreas de aspecto bastante liso. Em relação ao dente na interface dente/restauração verifica-se algum afastamento da restauração em relação às paredes dentárias da cavidade onde este está alojado revelando alguma contracção e margem de espaço para possíveis infiltrações ou mesmo preenchimento deste espaço por materiais da sua corrosão e oxidação. Vemos que a amostra não é de características homogéneas e a grandes ampliações observamos na mesma “massa” de amálgama diferentes aspectos microestruturais. São também visíveis na estrutura destes amálgamas mesmo sem grandes ampliações fissuras, poros, covas, áreas com falta de material que andam na ordem dos micrómetros e outros na ordem dos nanómetros. Algumas amostras apresentam linhas de arrastamento sobre a superfície deixando marcas de riscos. Estas imagens a electrões secundários e retrodifundidas das figuras seguintes 17A17B;18A18B;19A19B;20A20B;21A21B, exemplificam a descrição anterior.

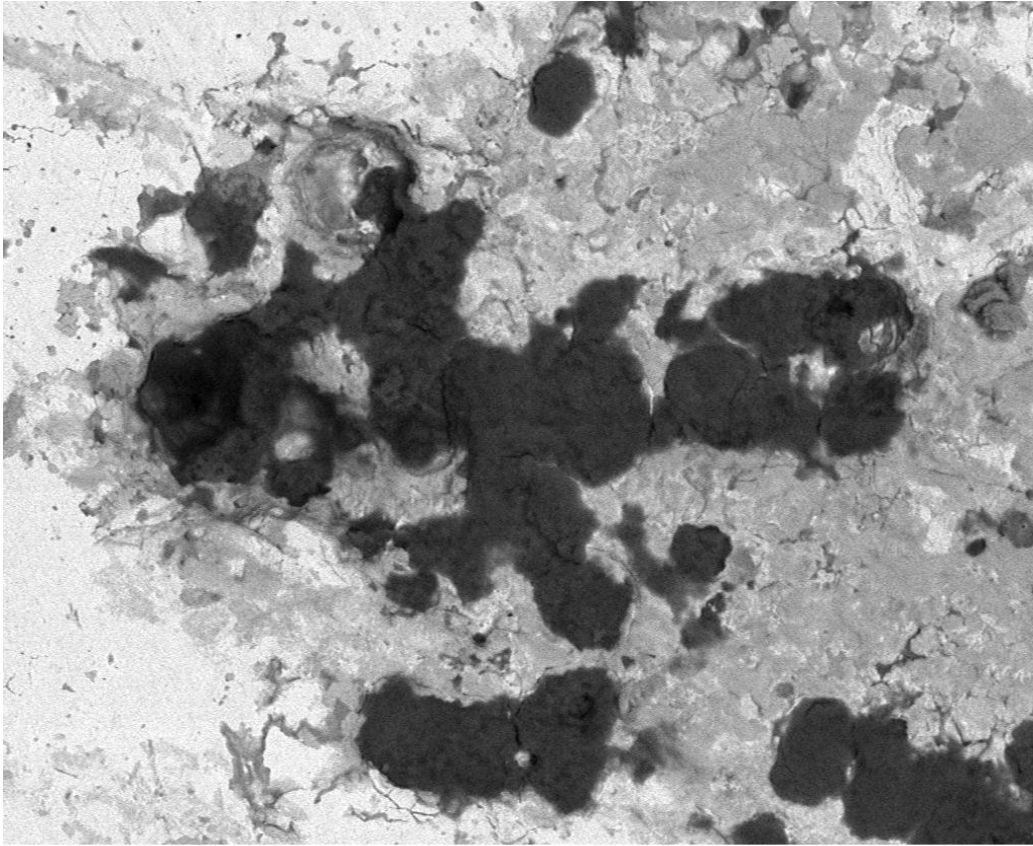
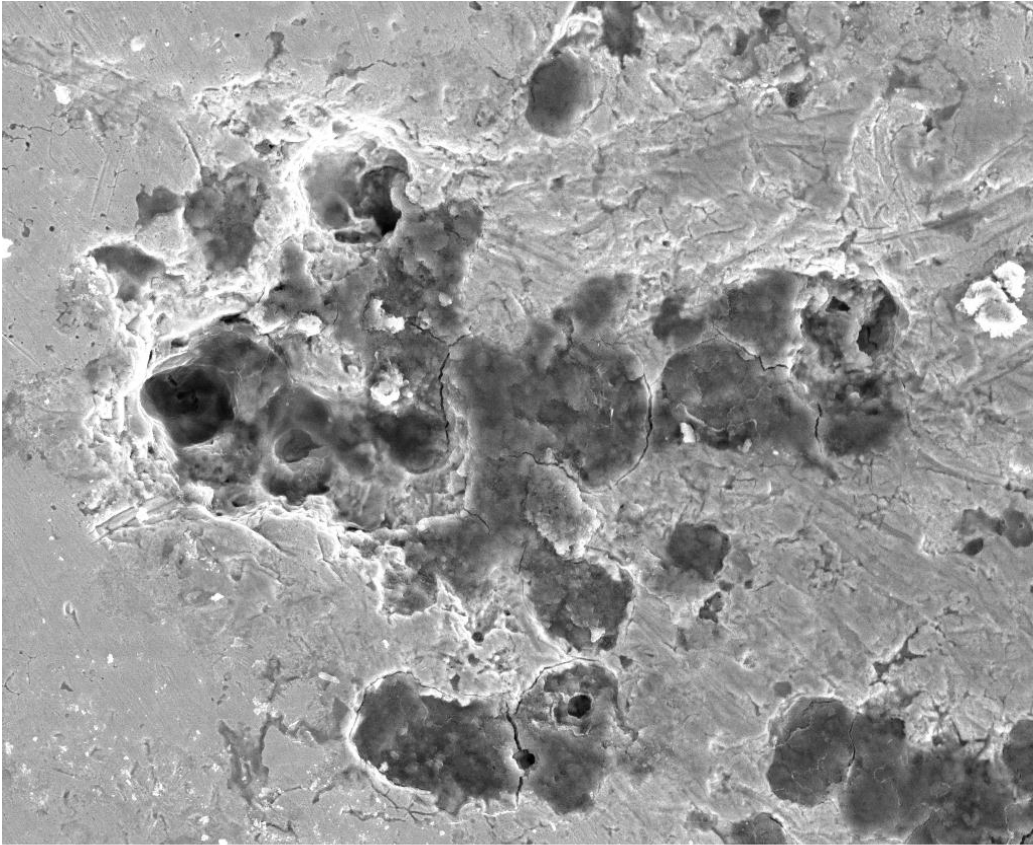
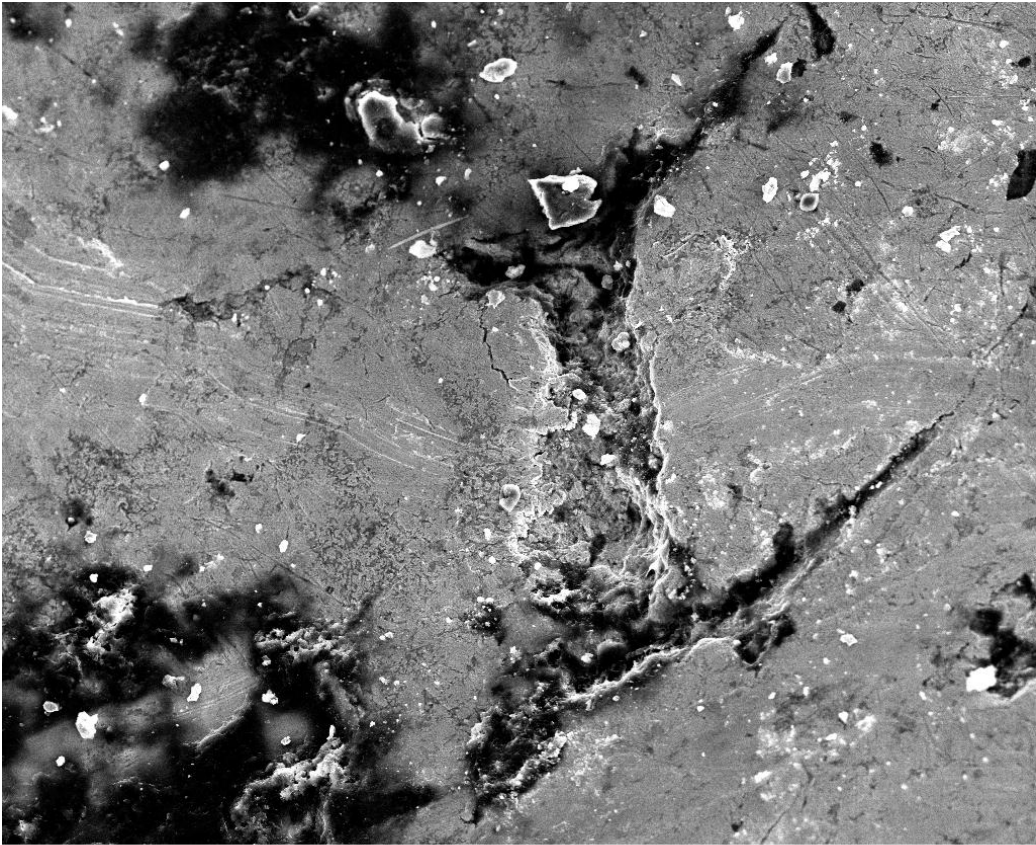
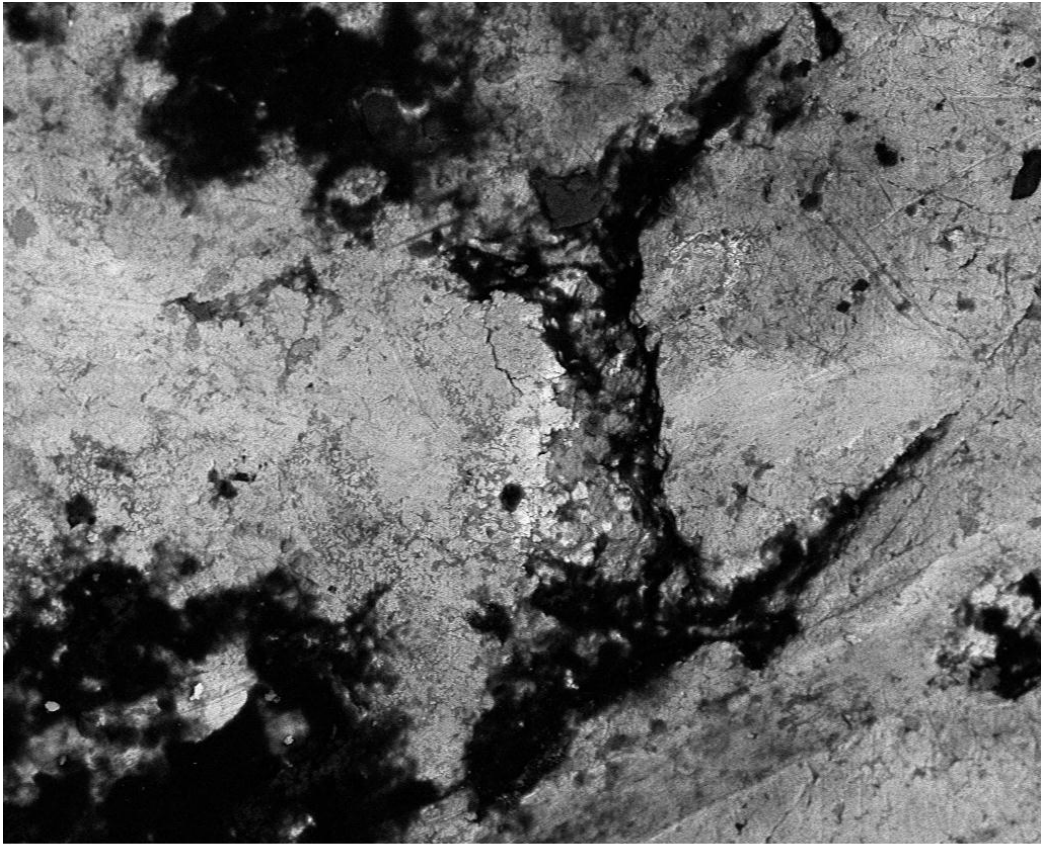


Fig. 17A 17B



200µm

CEMUP SE D7 x250 20kV WD=15mm



200µm

CEMUP BE D7 x250 20kV WD=15mm

Fig. 18A 18B

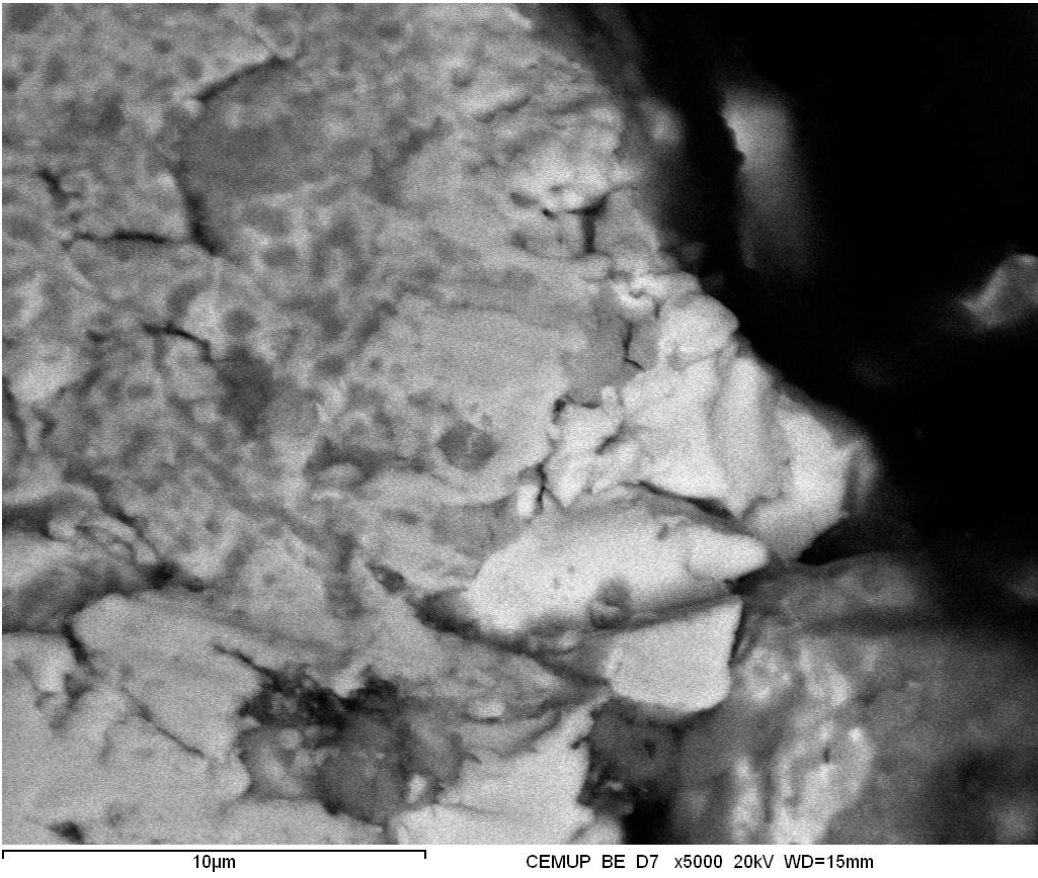
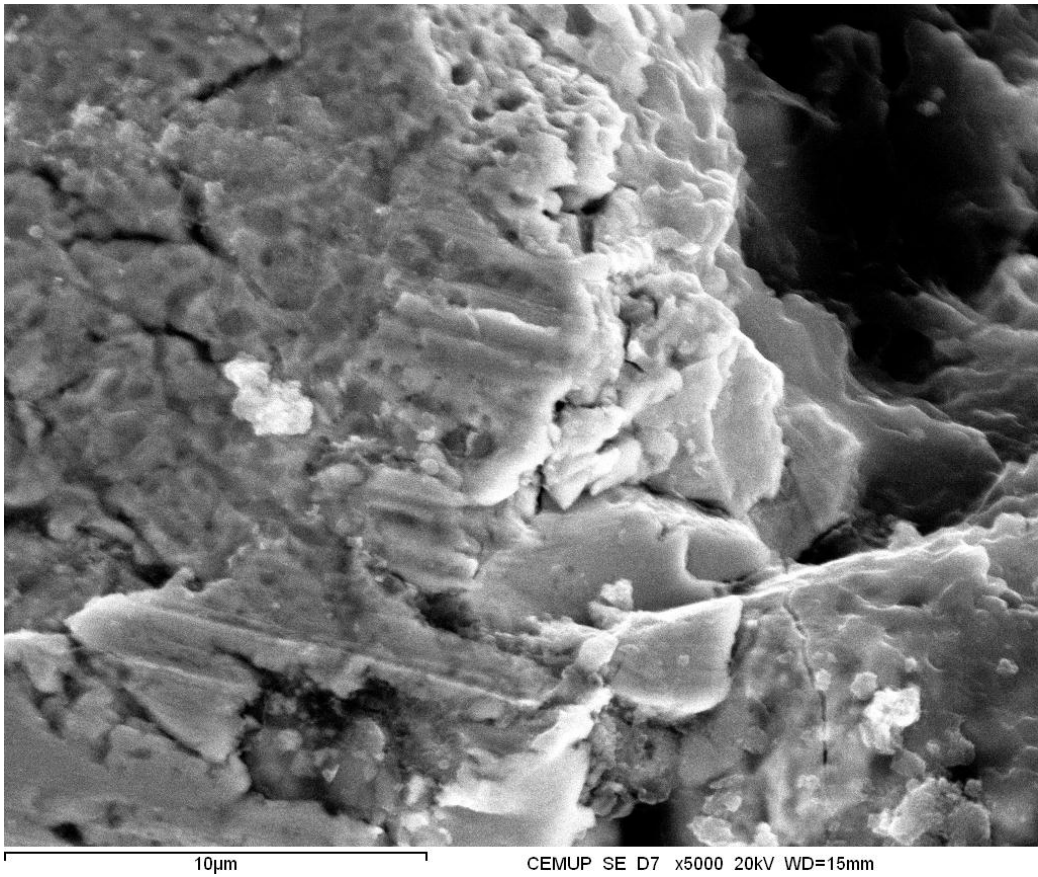


Fig. 19A 19B

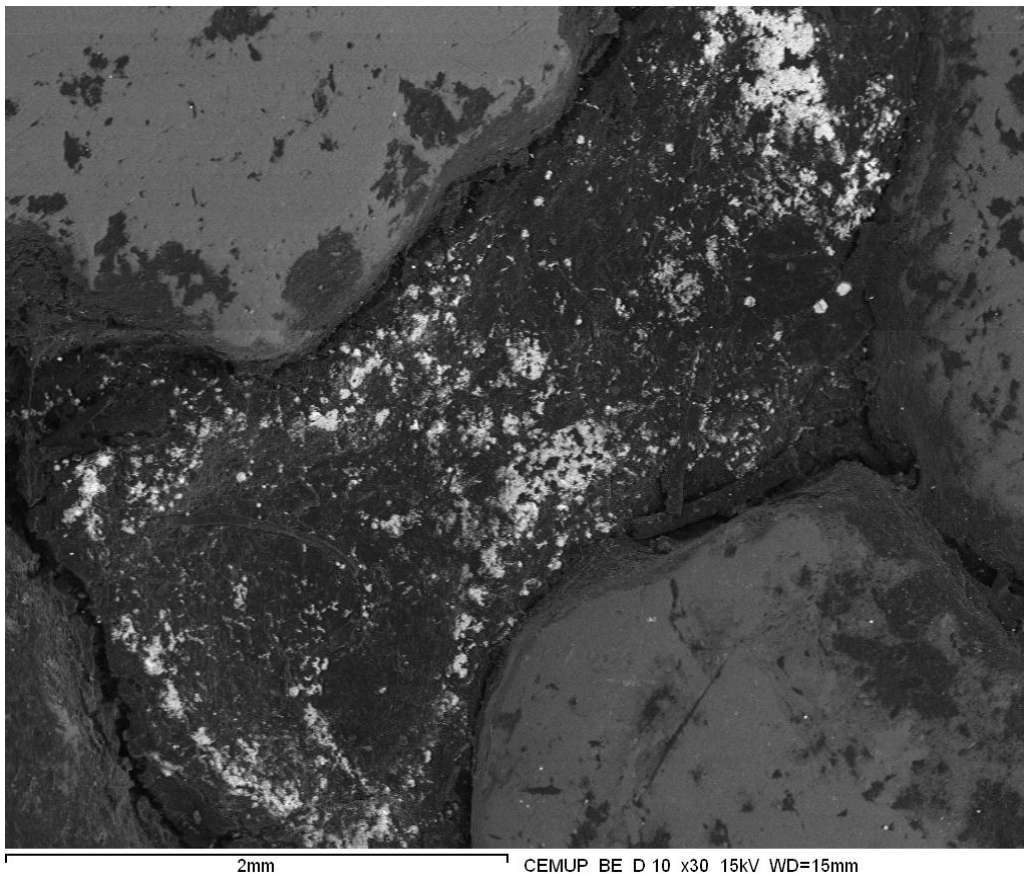
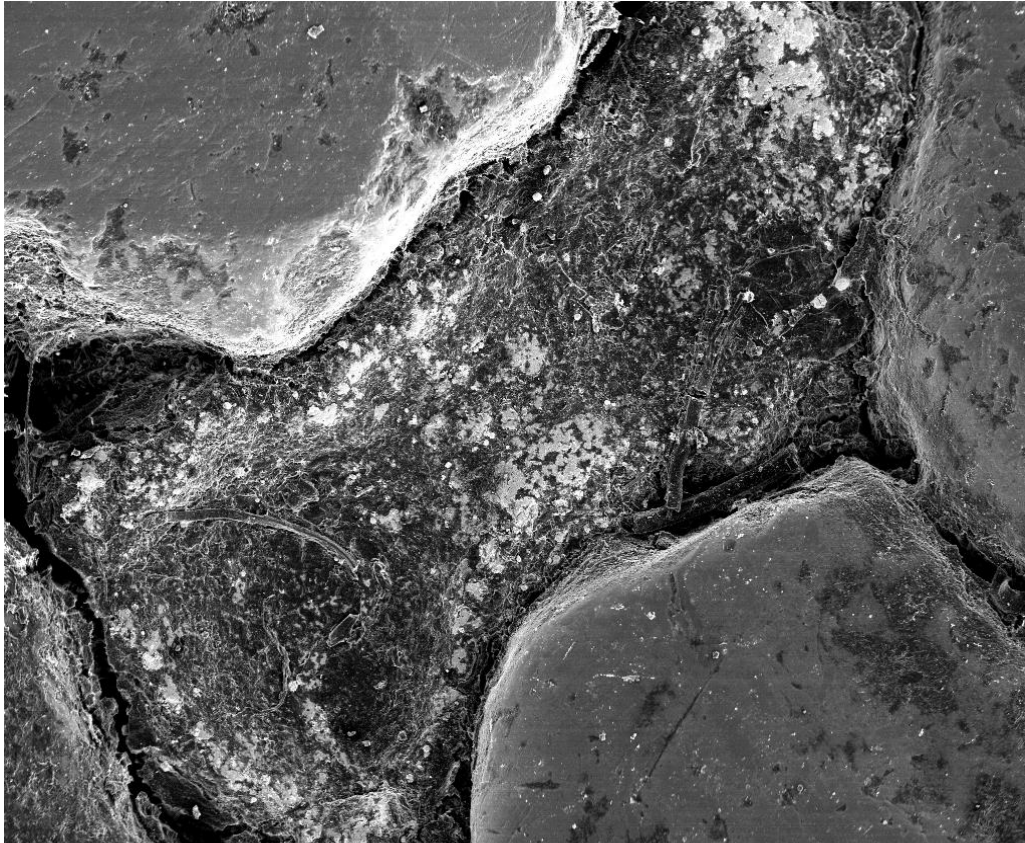


Fig. 20A 20B

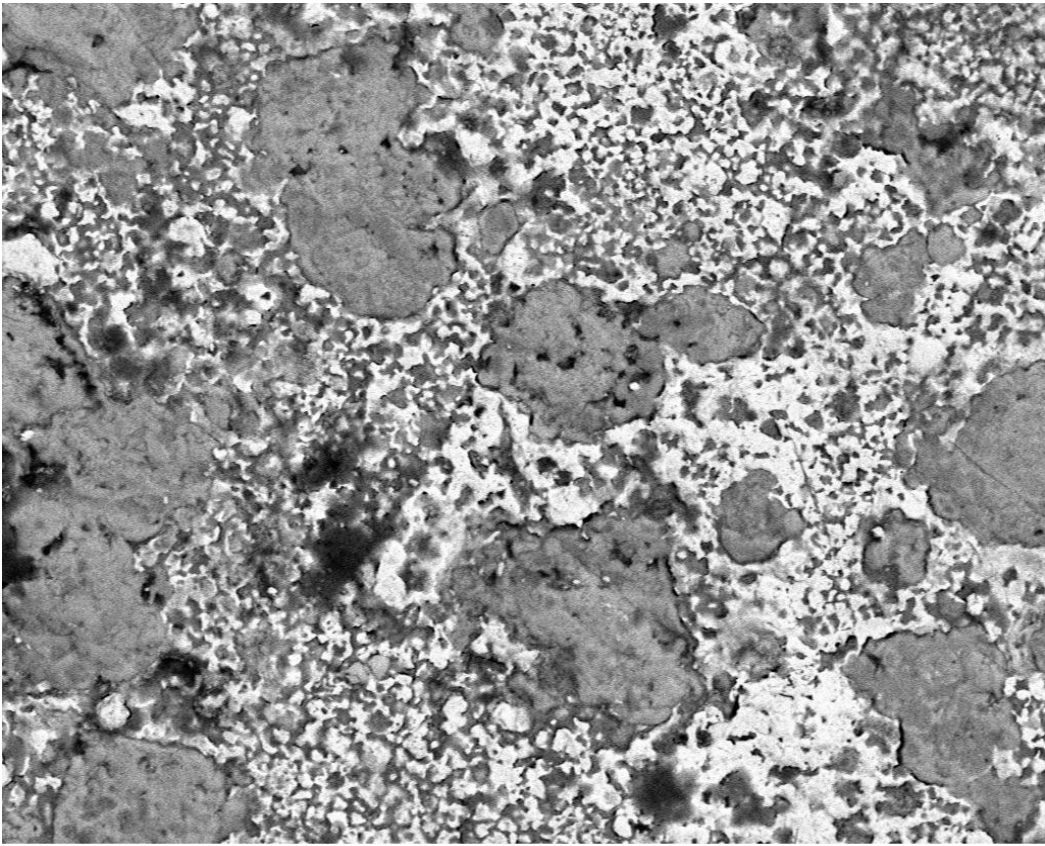
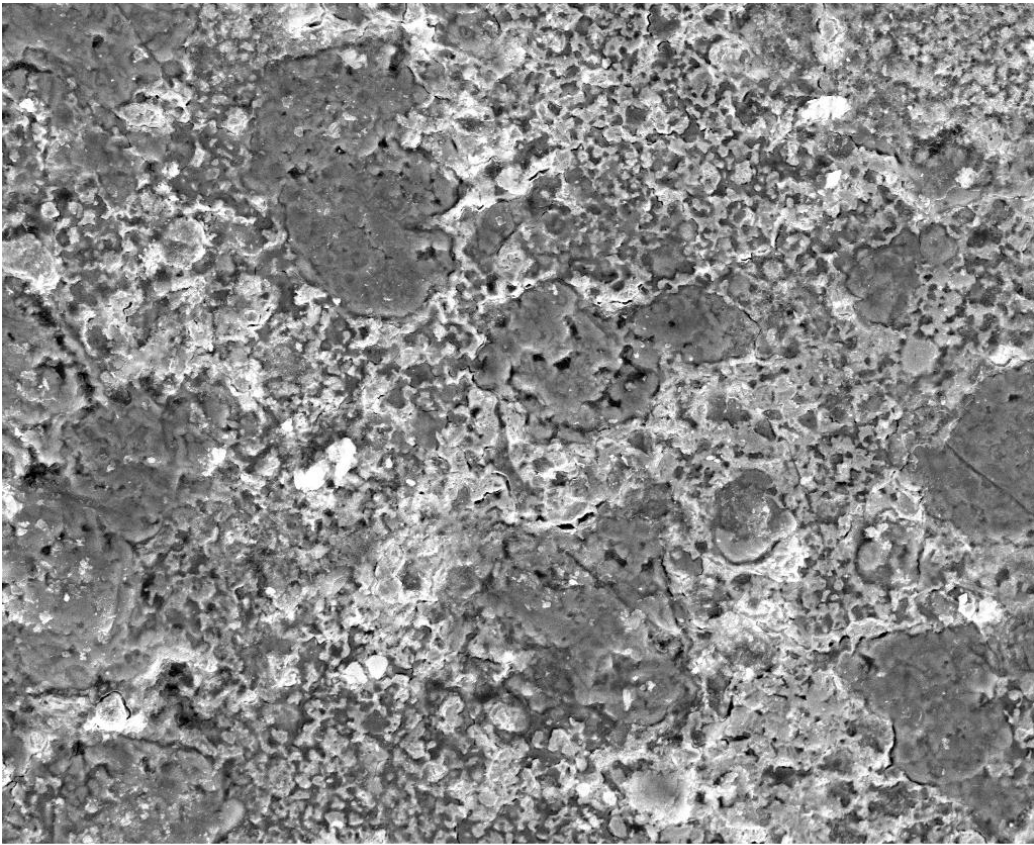


Fig. 21A 21B

Resultados da 3ª Parte

Da análise dos vários cortes feitos ao interior do dente para exposição da dentina e polpa em amostras com amálgamas dentários com a finalidade de encontrar vestígios de Hg entre outros metais que compõem o amálgama, observou-se a presença de vários pontos claros presentes nessas estruturas dentárias de dimensões várias Fig.22 representando a dentina e túbulos dentinários. Estes pontos foram quimicamente estudados por microanálise (XRM) e revelaram a correspondência a partículas com os vários componentes dos amálgamas. O Hg em alta concentração, a Ag, Sn, Cu e Zi também bem representados Fig.23. Em análise das amostras nestas áreas do dente também se observou a presença de outros elementos químicos como por exemplo no ponto claro assinalada por Z5 na Fig.24 (espectros da Fig.2) 5 elementos: Si, S, Mg e Titânio (Ti) na Fig.26 e respectivo espectro de microanálise Fig.27.

Foram também realizadas imagens da polpa dentária Fig.27A (electrões secundários e Fig.27B e electrões retrodifundidos) onde também são visíveis esses pontos brancos. Fazendo um ampliação dessa área pulpar onde se localizam esses pontos claros Fig.28, e realizando-se a microanálise por raio X e obtiveram-se os espectros correspondentes Fig.29, onde se realça a presença de Hg.

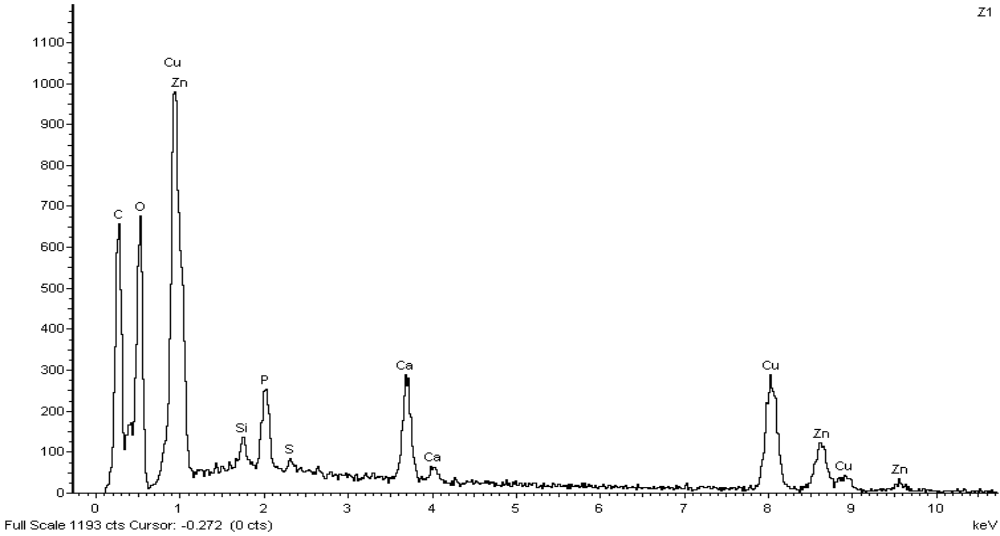
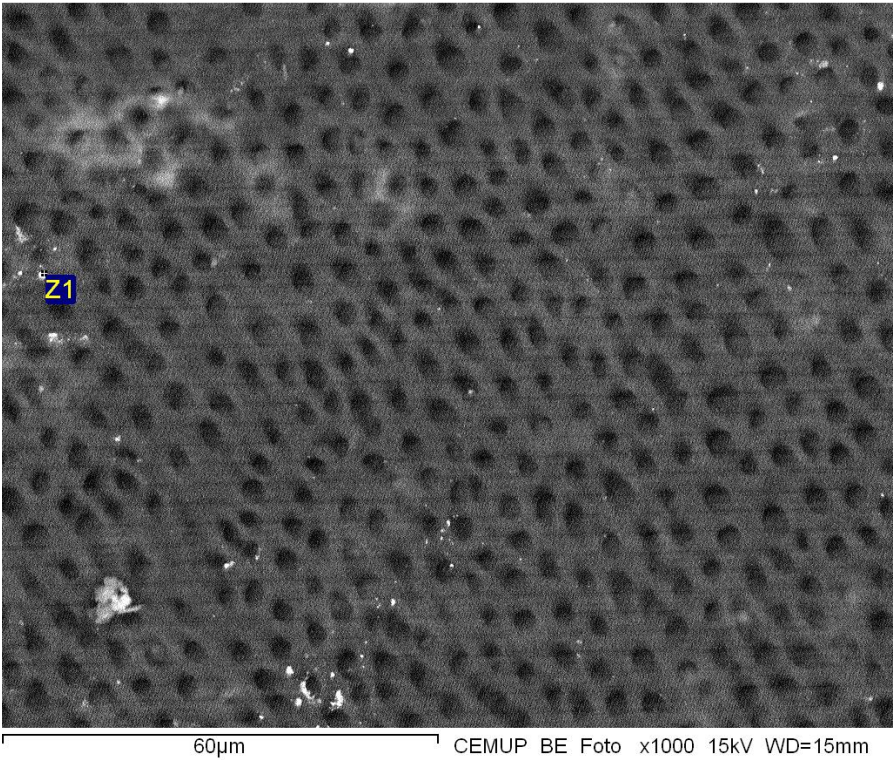


Fig. 22

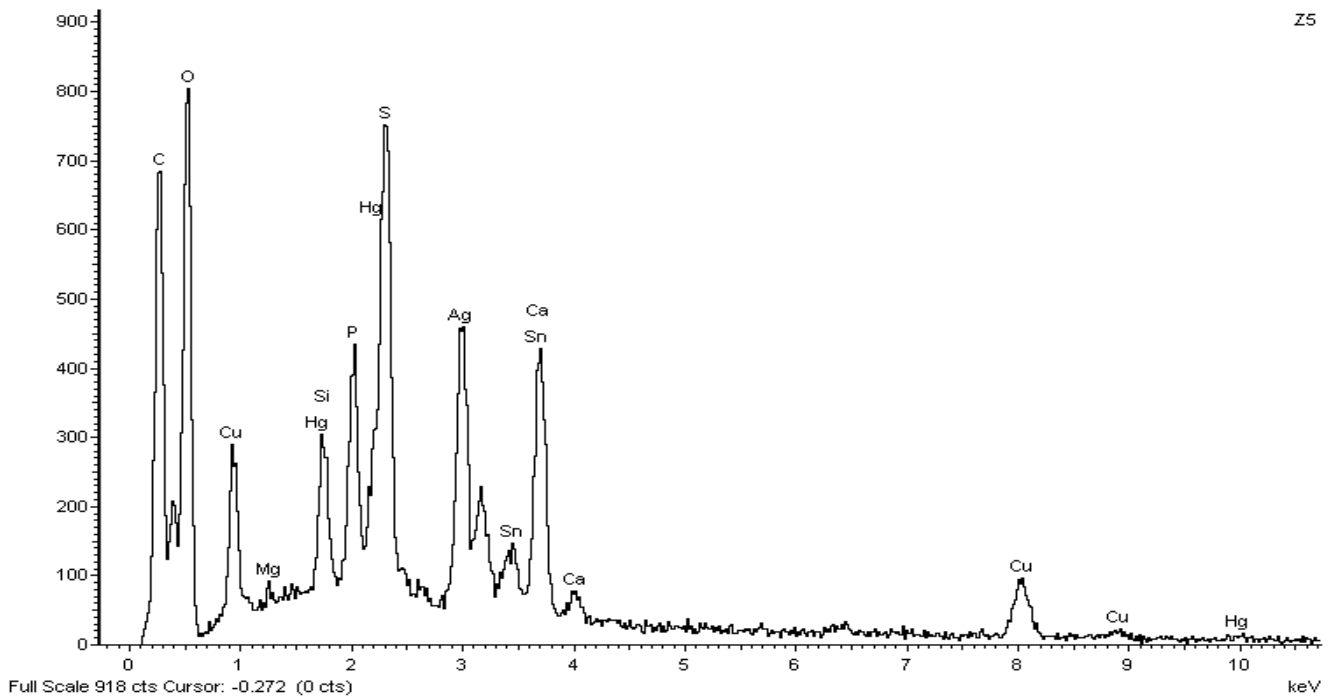
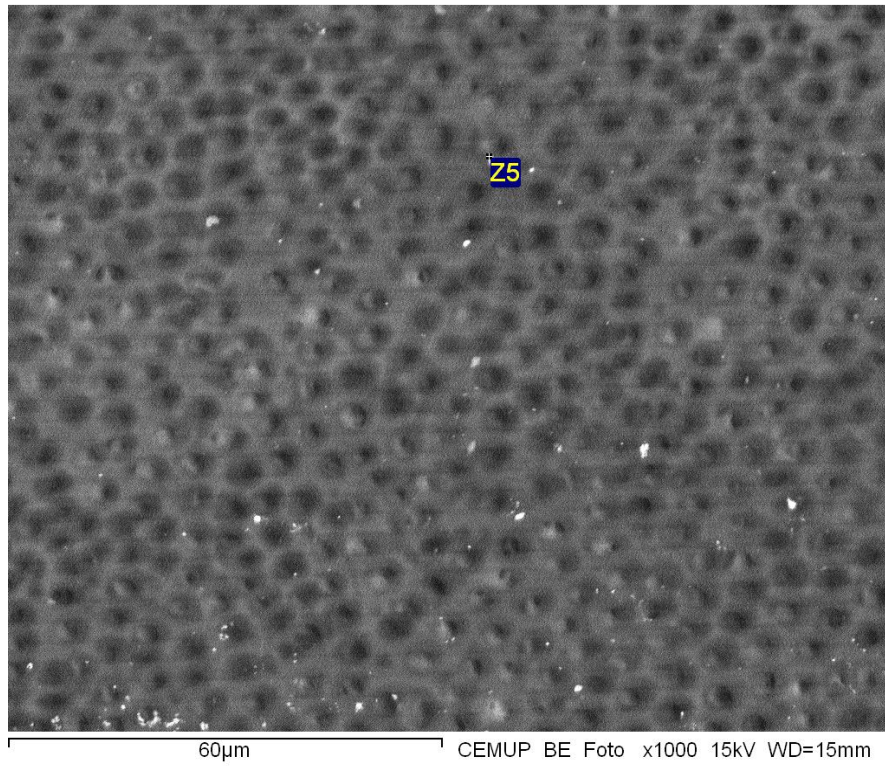


Fig. 23

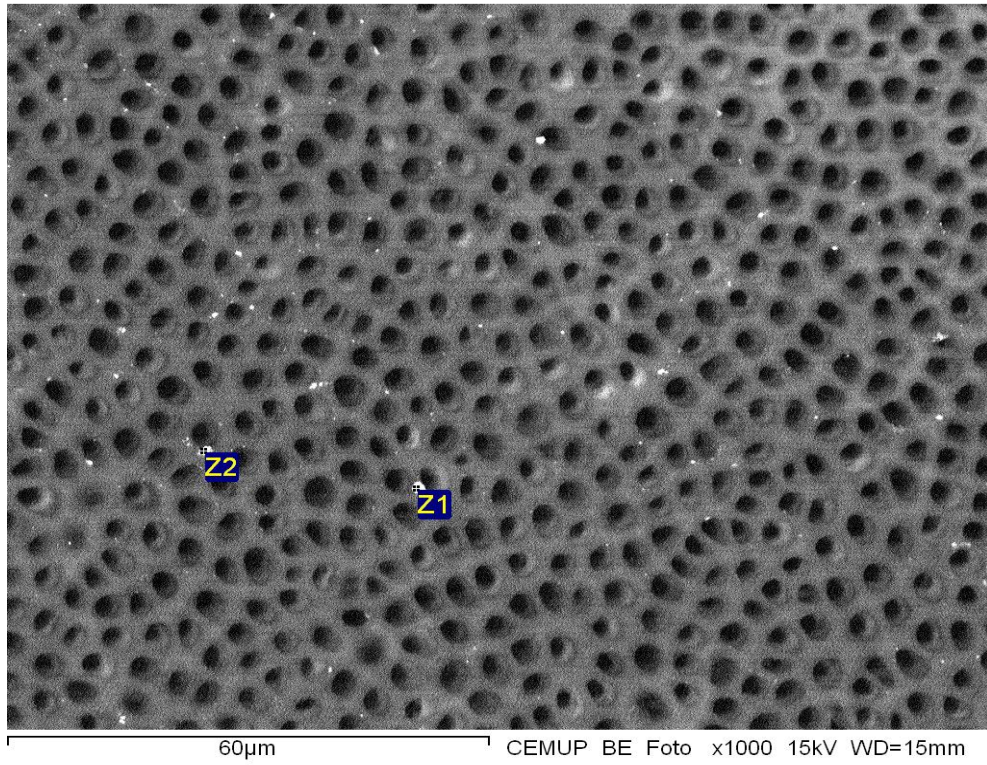
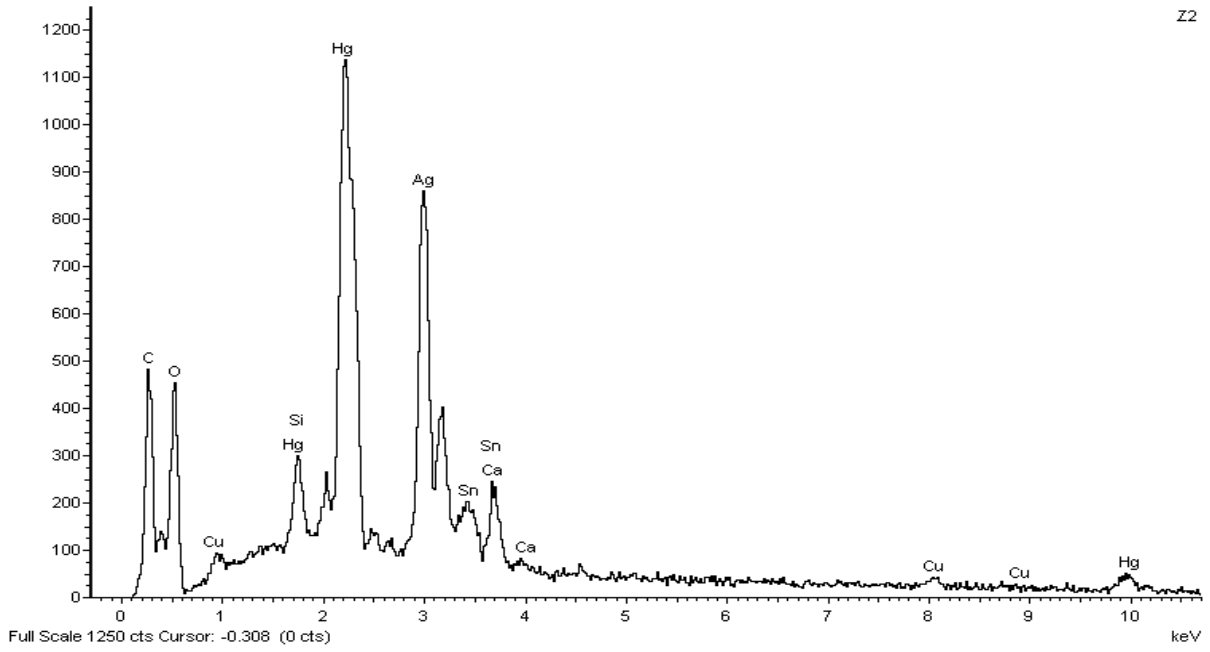


Fig. 24

Z2



Z1

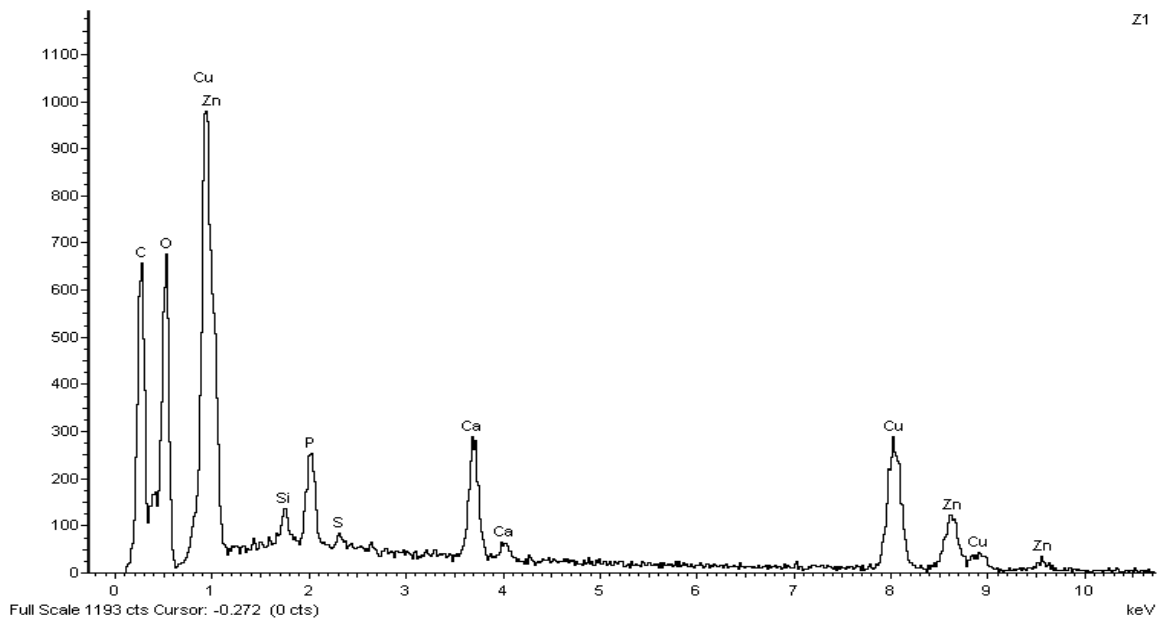


Fig.25

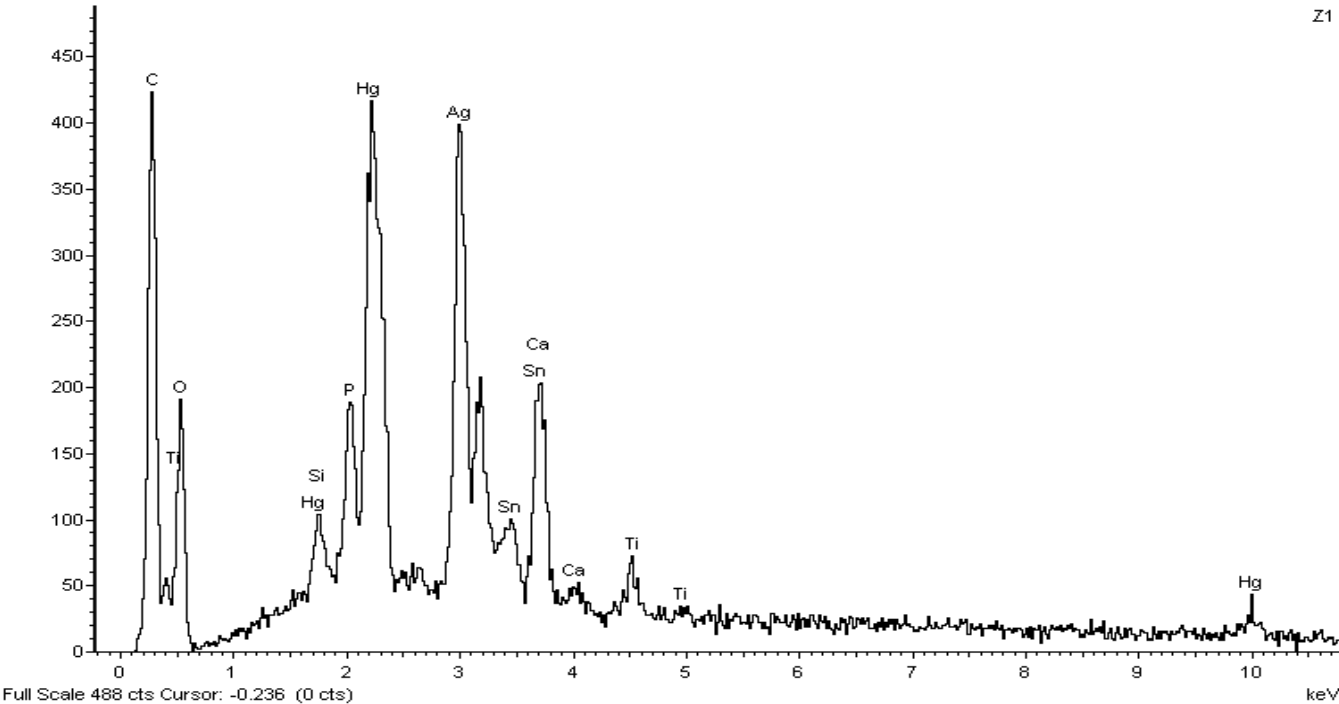
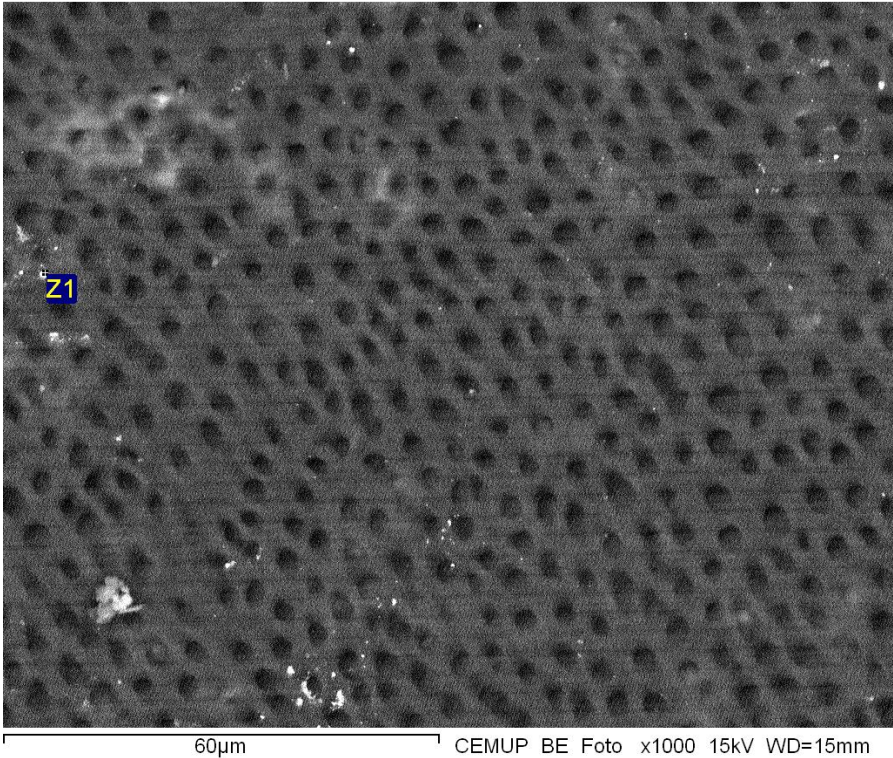
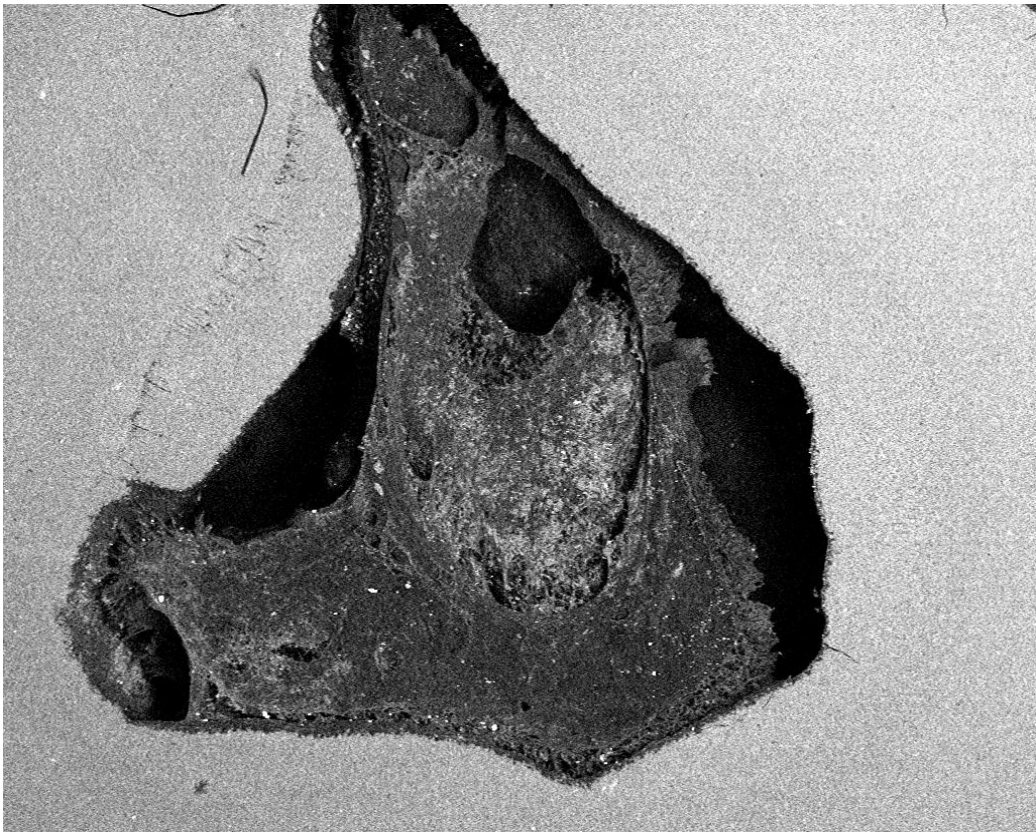
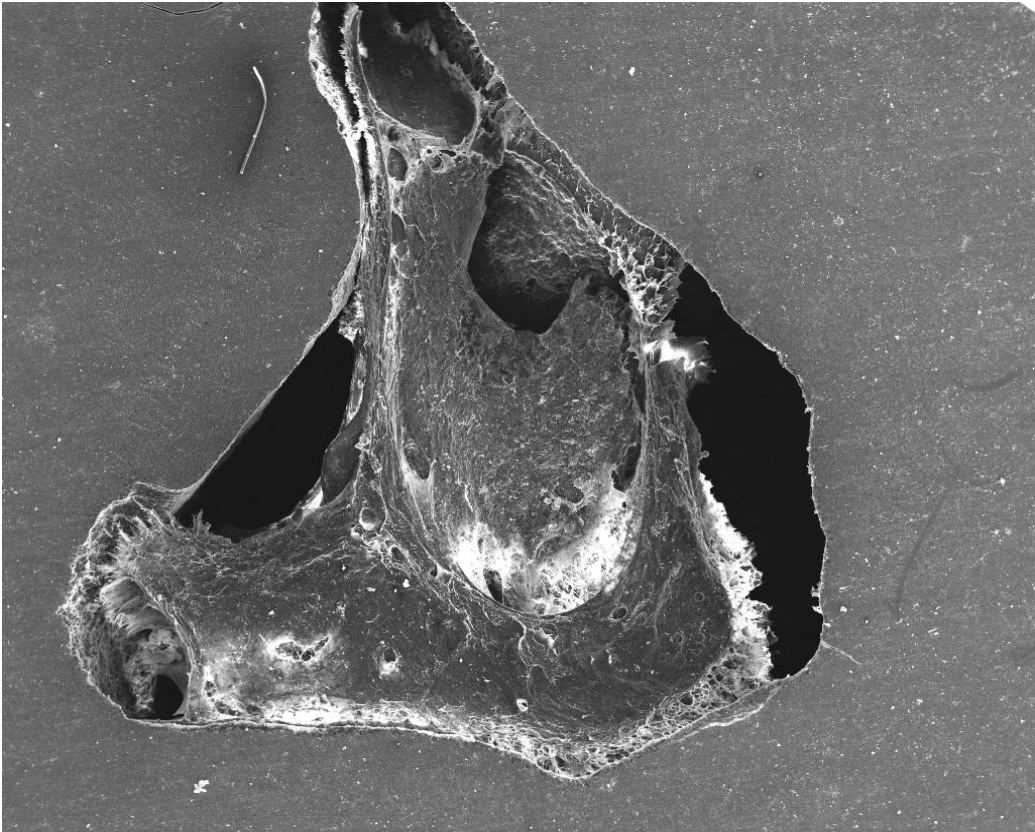


Fig.26



2mm



2mm

Fig.27A27B

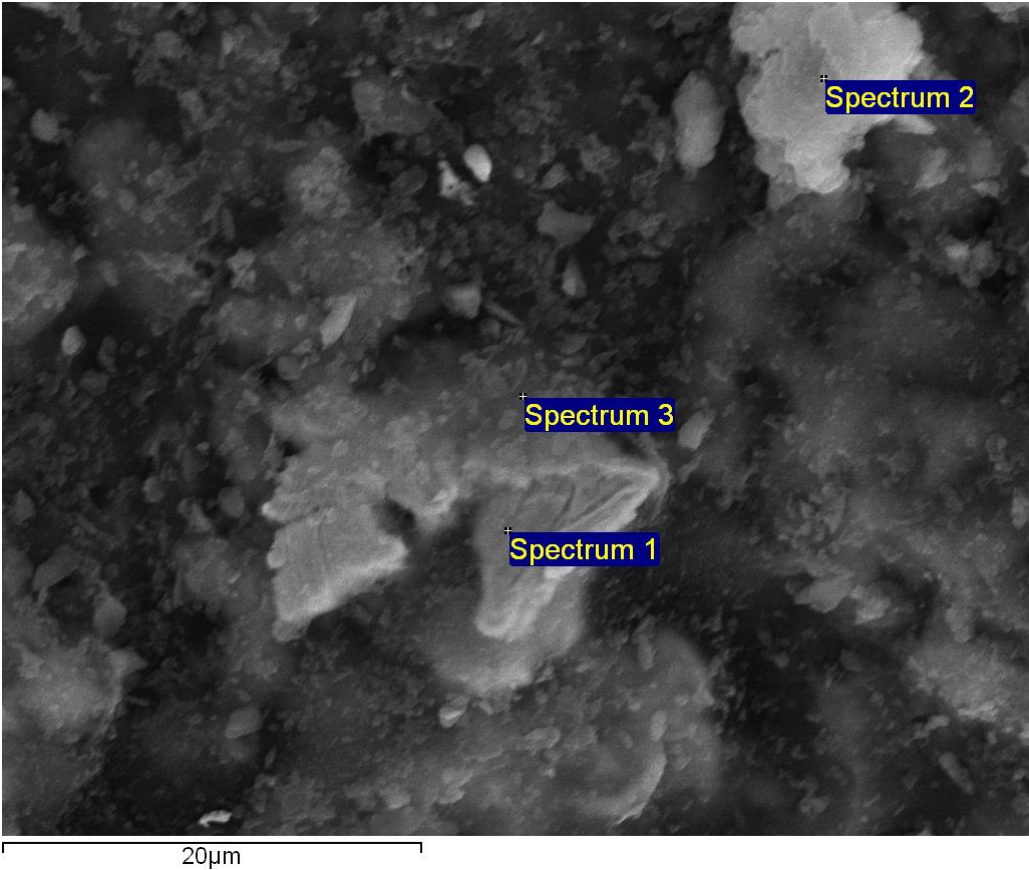


Fig.28

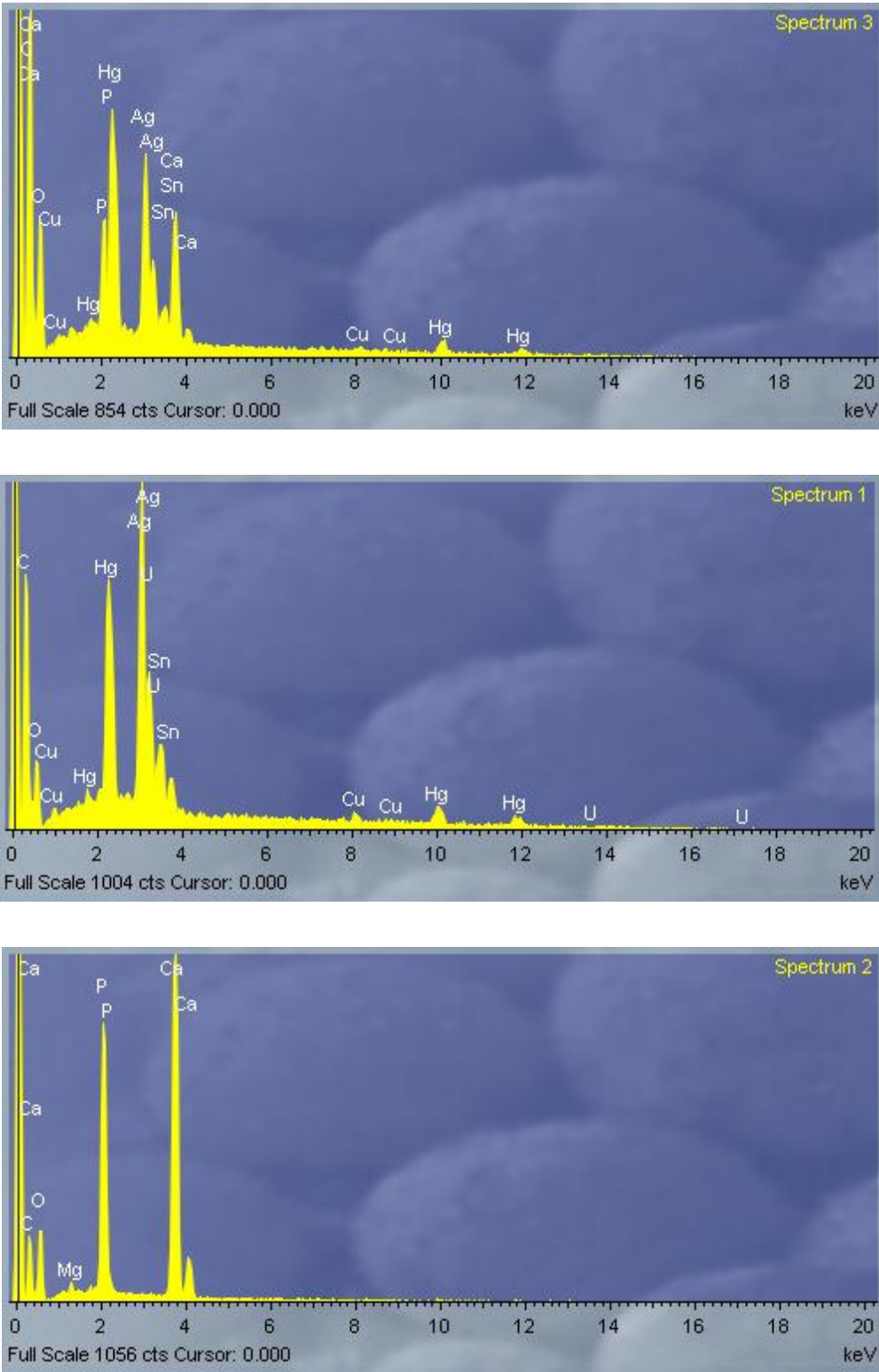


Fig.29

Discussão

Discussão

A aplicação da Microscopia Electrónica de Varrimento (SEM), acoplada à Microanálise por raio-X (XRM) (SEM-XRM), veio permitir neste trabalho uma qualificação dos elementos presentes e uma semi-quantificação desses elementos em amostras de dentes com restaurações de amálgama. Amálgamas estas que se mantiveram na boca por períodos de tempo entre médio e longo prazo(*vide MM*). A procura por metais e principalmente metais pesados nesta amostras foi determinante na escolha deste método dado a resultados prévios obtidos com esta análise em amálgamas dentários preparadas " *in vitro*" (Publicação), onde foi possível identificar a presença significativa de Hg.¹⁶

Esta metodologia permite determinar a presença, numa concentração superior a 0,1-0,2% (em massa), de metais pesados que pelo seu elevado número atómico são também possíveis de identificar" *in situ*" em imagens de alta resolução oferecidas pela microscopia electrónica. Em SEM-XRM os metais pesados aparecem como áreas brancas (imagens de electrões retrodifundidos). A microanálise por raio-X destes pontos permite analisar/ identificar o metal correspondente (espectros).

O estudo foi dividido em 3 partes sendo objectivo a determinação de resíduos de Hg nestas restaurações de amálgama no interior dos dentes que as continham, aproveitando para estudar o estado da estrutura desses amálgamas e quais os elementos químicos actualmente presentes nas suas composições tendo como referencia comparativa um trabalho sobre amálgama.

Podemos verificar do estudo da primeira parte dos resultados “in vivo” que os principais constituintes dos amálgamas que tínhamos detectado no estudo “in vitro” permanecem sendo a prata, estanho, cobre e mercúrio estando presentes em todas as amostras. Nas amostras “in vivo” o zinco aparece apenas em algumas e muitas vezes em quantidade residual. Presença de Hg muito significativa comprovado pela leitura dos espectros, em comparação com estudos de SEM-XRM já realizados anteriormente e tem um papel importante na manutenção das propriedades deste material em termos de resistência.³² As amálgamas “in vitro” mantêm de base os mesmos elementos químicos, a mesma organização espacial de ligações químicas com mercúrio e prata a estabelecerem ligações e a predominarem nos pontos mais claros; estanho ocupa as áreas a cinza e o cobre compartilha muitas vezes com o estanho este território ou forma uma área cinza escura. No entanto nos resultados deste trabalho actual verifica-se em termos de área global uma predominância da área cinzenta (rica em estanho) pela superfície total relativamente às áreas claras (com predominância do mercúrio) comparativamente ao estudo em amálgamas “in vitro” em que se verifica o contrário.

Dadas observações do aspecto estrutural e leitura dos espectros presume-se que o cobre se encontre já numa forma de óxido de cobre ou fosfato de cobre assim como o zinco. Isto vem corroborar outros estudos referentes aos fenómenos de corrosão e formação de depósitos de óxidos metálicos nestas restaurações, sendo indicativo de alguma antiguidade das restaurações.^{48,54,}

Neste estudo de SEM-XRM de amálgamas “in vivo” surge uma zona diferente de cor negra presente em todas as amostras rica em carbono, oxigénio, fósforo e cálcio estes últimos também se presume estarem na forma de fosfato de

cálcio. Esta nova área é designada de biofilme resultado da formação e calcificação da placa bacteriana.^{4,58} Verifica-se a presença nestes amálgamas de elementos novos não sendo elementos que normalmente fazem parte da composição destas ligas metálicas, o caso do cloro, sódio, magnésio e do enxofre mas cuja presença foi detectada nas amostras do grupo de controlo vindo de encontro ao que já foi referenciado noutros artigos que referem a sua detecção na estrutura dentária e tecidos adjacentes como fazendo parte da composição destes tecidos daí estar a sua presença nestas restaurações mais uma vez sustentada e em consonância com trabalhos recentes.^{49,55,59}

Outros tais como o Silício (Si), Ferro(Fe), Flúor(F), Tungsténio(Tg), Titânio(Ti), Alumínio(Al) menos significativos dada a sua pouca expressividade em termos de espectro e presença reduzida no número de amostras infere-se que a sua existência deve-se à provável contaminação resultante de contactos prévios durante a confecção da cavidade/restauração, devido à exposição na cavidade oral a colutórios e pastas dentífricas (por exemplo) ou a procedimentos durante a preparação das amostras.⁵⁷

No interior dos dentes na análise dos diferentes cortes correspondentes a áreas da câmara pulpar, dentina com exposição dos túbulos dentinários alguns até preenchidos pelas terminações dos odontoblastos, foram encontrados vários fragmentos de cor clara que pela microanálise revelaram ter na sua composição concentrações significativas de Hg. Também visível nesses espectros de microanálise é a presença da Ag, Sn, Cu e Zn todos são elementos que constituem os amálgamas dentários embora o zinco aqui detectado também possa pertencer a materiais algumas vezes usados nas restaurações dentárias como forramento prévio das cavidades tais como o

óxido zinco eugenol. A presença destes componentes nestas zonas principalmente na polpa dentária vem reafirmar trabalhos anteriores sobre a presença de metais pertencentes a restaurações metálicas em túbulos dentinários e gengiva.^{49,53,56,60,62} Deixando poucas dúvidas se é uma migração natural da restauração para o interior do dente ou se é efeito de alguma contaminação resultante do preparo das amostras.

Também aqui nestas zonas internas do dente foi constante a presença de enxofre e pela leitura dos espectros este elemento aparece em algumas amostras em concentrações elevadas noutras apenas residual. A existência de enxofre na presença de mercúrio em sistemas biológicos é importante dadas as ligações covalentes entre eles criando alterações no funcionamento dos organismos tais como: funcionalidade de receptores, sistema enzimático, etc.

Estruturalmente nestes amálgamas é notória a marca da utilização pelo aspecto espalmado, comprimido a falta de relevo na superfície que em algumas zonas chega a ser relativamente lisa. Também é visível a existência de riscos, poros, fissuras e até áreas com falta de material restaurador. Isto pode ser resultado da oclusão dentária, dos movimentos de arrastamento entre dentes nos processos mastigatórios, efeitos da escovagem. Foi possível detectar a criação de uma camada de material “contaminante”, um filme biológico que reveste e adere às superfícies dos amálgamas e muitas vezes tem a forma de placas fissuradas entre si deixando ver através dessas fissuras lá no fundo o que era a superfície original da restauração. A composição e presença deste biofilme é compreensível dada a permanência destas restaurações na cavidade oral em contacto com dentes, saliva, alimentos, microrganismos.^{4,58} A formação deste biofilme de acordo com outro artigo

mencionado nas referências bibliográficas mostra que as superfícies rugosas têm influência na formação inicial e aderência desta camada e que esta vai sofrendo um crescimento e maturação que levam ao desaparecimento das diferenças iniciais na sua composição.⁴

Em resumo os pontos principais a focar são: (i) presença considerável de metal pesado >0,1% em massa de Hg; (ii) foi detectado enxofre como elemento presente na nesses amálgamas sabendo que este não faz parte da composição original; (iii) cobre e zinco sob a forma de óxidos demonstrando que este material vai oxidando com a exposição e ao longo tempo; (iiii) as zonas mais claras onde a predominância do Hg é evidente parecem ser mais refinadas e reduzidas em termos de extensão de área; (iiiii) estruturalmente são restaurações muito marcadas pelo uso e contacto com elementos que transitam pela boca; (iiiii) no interior do dente foram encontrados vestígios de Hg entre outros elementos que constituem os amálgamas que restauravam esses dentes. Também nestas amostras do interior do dente foi detectado o enxofre.

Em conclusão foi utilizado um método rápido, não evasivo nem destrutivo na obtenção de resultados qualitativos e semi-quantitativos que permitiu obter dados acerca da presença de metais pesados nas amostras estudadas desde que estes se encontrem numa concentração superior a 0,1-0,2% em massa. É possível, deste modo, numa perspectiva médico-legal fazer uma análise da presença ou ausência de substâncias nocivas, tóxicas à saúde humana. Neste caso analisamos um material de restauração á muito usado na medicina

dentária e que alimenta alguma controvérsia em torno da sua utilização dado o risco da exposição ao Hg elemento que como verificamos compõe significativamente as restaurações de amálgama.^{30,41} Esse contacto pode vir da presença destas restaurações na boca que por efeitos de abrasão, erosão, PH, tratamentos dentários vai libertando os seus iões metálicos.^{5,52,61} tendo sido detectados alterações gengivais e do sistema imunológico dada a entrada e presença desses metais.^{49,53,56} Isto conduz também à sua ingestão, inalação dos seus vapores e a potencial migração pelo interior do dente (principalmente polpa dentária-altamente vascularizada) dos componentes do amálgama logo também de Hg, ou por exposição ocupacional dos profissionais da medicina dentária fazendo-se assim uma abordagem médico-legal no campo da toxicologia e no âmbito da medicina do trabalho.

Esta dissertação, apresentando um método inovador nesta área e de aplicabilidade reconhecida, contribuiu de um modo inequívoco com uma contribuição original para a importância da Odontologia Forense na Medicina legal.

(Este trabalho resultou numa publicação original neste momento, em fase final de preparação).

Perspectivas futuras

Perspectivas Futuras

(Texto da autora)

Como perspectivas futuras neste trabalho proponho duas situações a analisar no intuito de continuar a avaliar via dente uma potencial exposição aos metais especialmente ao Hg provenientes das restaurações metálicas desses dentes.

Uma seria estender os cortes realizados nos dentes restaurados a amálgama à região apical da raiz dentária onde também temos polpa radicular e inclusive na região do foramen apical onde existe já a união das fibras de tecido conjuntivo e do feixe vasculo-nervoso da polpa dentária do interior do dente com o ligamento periodontal (tecido envolvente da raiz do dente que faz a união deste ao osso alveolar sendo altamente vascularizada) e com vasos sanguíneos de maior calibre de ligação sistémica como as artérias maxilares através do ramo dental. Seria importante estabelecer uma relação entre a presença de elementos metálicos das restaurações como o Hg nestas zonas do dente estando tão próximos da entrada para a circulação sistémica do organismo. Para além de procurar a identificação desse metal pesado nestas áreas, seria de interesse quantificar em termos de concentração comparativamente ao encontrado na restauração do dente correspondente; verificar qual o estado químico deste mercúrio e analisar se é novamente presente o S dada a sua importância já explicada anteriormente neste trabalho. A outra situação será a utilização da dentição decídua como amostragem com os mesmos objectivos a que nos propusemos agora. Os amálgamas como já referido neste trabalho dadas as suas características como a resistência, rapidez e facilidade de manipulação na sua colocação em consulta são materiais muitas vezes escolhidos no tratamento de crianças com problemas de colaboração como por exemplo os autistas. Seriam usados para amostra dentes molares superiores, uma vez que a dentição decídua apresenta no geral câmaras pulpares de grandes dimensões muito vascularizadas, isso é ainda mais característico nos dentes molares aliado ao facto desses molares possuírem normalmente 3 raízes dentárias (tal como no adulto são

plurirradiculares), de curto tamanho sofrendo esfoliação destas para darem lugar à dentição definitiva em poucos anos. São dentes restaurados que vão estar na cavidade oral por um período de tempo mais reduzido e dadas as características apresentadas anteriormente seria de relevante importância realizar um estudo similar com o intuito de inferir se essas crianças se tornam expostas ao Hg por esta via e num espaço de tempo mais curto.

Bibliografia

Bibliografia

1. Edlich RF, Cross CL, Wack CA, Long WB 3rd, Newkirk AT. 2008, - *The food and drug administration agrees to classify mercury fillings*. J Environ Pathol Toxicol Oncol.;27(4):303-5.
2. Poland.Szopka K, Karczewska A, Kabała C.vis.edu, 2011 Feb.- *Mercury accumulation in the surface layers of mountain soils: A case study from the Karkonosze Mountains*. Chemosphere 25
3. André Filipe Gomes Soares Fontes. Outubro 2009.- *Complexos de Ga(III) de Ligandos macrocíclicos anfífilicos com relevância para a medicina nuclear*. Universidade do Minho, escola de Ciências. Mestrado em Química medicinal.
4. Deselic T, Guggenheim B, Schmidlin P.R. 2009.- *Multispécies biofilme formation on dental materials and adhesive patch*. Oral health Prev. Dent; 7(1)47-53.
5. Dietschi D, Argente A. 2011 Spring.- *A comprehensive and conservative approach for the restoration of abrasion and erosion. Part I: concepts and clinical rationale for early intervention using adhesive techniques* Eur J Esthet Dent 6(1):20-33.
6. Dutra MD, Monteiro MC, Câmara Vde M. 2010 Sep.- *Evaluation of central auditory processing in adolescents exposed to metallic mercury*. Pro Fono.; 22(3):339-44.
7. VeARRIER D, Greenberg MI. 2010 Nov-Dec. - *Care of patients who are worried about mercury poisoning from dental fillings*. J Am Board Fam Med. 23(6):797-8.
8. Geier DA, Carmody T, Kern JK, King PG, G. 2010 Nov.- *A significant relationship between mercury exposure from dental amalgams and urinary porphyrins: a further assessment of the Casa Pia children's dental amalgam trial*. Biometals 5
9. Lee R, Middleton D, Caldwell K, Dearwent S, Jones S, Lewis B, Monteilh C, Mortensen ME, Nickle R, Orloff K, Reger M, Risher J, Rogers HS, Watters M. 2010 Mar.- *A review of events that expose children to elemental mercury in the United States*. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Atlanta, GA 30341, USA. Cien Saude Colet.; 15(2):585-98.
10. Eyeson J, House I, Yang YH, Warnakulasuriya KA. 2010 Feb. - *Relationship between mercury levels in blood and urine and complaints of chronic mercury toxicity from amalgam restorations*. Br Dent J. 27;208(4):E7; discussion 162-3.
11. Ishitobi H, Stern S, Thurston SW, Zareba G, Langdon M, Gelein R, Weiss B. 2010 Feb.- *Organic and inorganic mercury in neonatal rat brain after prenatal*

exposure to methylmercury and mercury vapor. Environ Health Perspect.;118(2):242-8.

12. Ni M, Li X, Yin Z, Sidoryk-Węgrzynowicz M, Jiang H, Farina M, Rocha JB, Syversen T, Aschner M. 2011 Feb.- *Comparative study on the response of rat primary astrocytes and microglia to methylmercury toxicity.* Glia. 23. doi: 10.1002/glia.21153.

13. Dórea JG. 2011 Feb.- *Integrating Experimental (In Vitro and In Vivo) Neurotoxicity Studies of Low-doseThimerosal Relevant to Vaccines.* Neurochem Res. 25

14.LITVAK P., et al, 2003; - *Mercury Derived from Dental Amalgams and Neuropsychological Function.* Environmental Health Perspectives 111(5).

15. BARRON, Thomas 2004 - *Mercury in Our Environment.* CDA. Journal ; 32 (7): 556-563.

16. VASCONCELOS, Isabel C. R.; CARNEIRO DE SOUSA, M. J. P.C.; CUNHA, E.M.;2011- *Técnica de Microscopia Electrónica de Varrimento Aoplada à Microanálise por RaioX(SEM-XRM)aplicada ao estudo de Amálgamas dentários.*Cad.Cient.OMDnº10;8-15.

17. SZNOPEK, J.; GOONAN, T., June 2000 - *The Materials Flow of Mercury in the Economies of the United States and the World.* U.S. Geological Survey Circular 1197

18. YUMING, L.; SIEW, C. *et al.* 1998 - *Dental Amalgam: Update on Safety Concerns.* J Am Dent Assoc; 129: 494-503.

19.ANNUSAVICE, K. J.2003 - *Phillips' Science of Dental Materials.* St. Louis, Missouri: WB Saunders Company.

20. BERTHOLD, M. 2002 - *Restoratives: Trend Data Shows Shift in Use of Materials.* American Dental Association News ; 33 (11): 1,10-11.

21.SÁ, Carlos Pinto Moreira de, 2005 - *Caracterização morfológica, microestrutural e microanalítica de materiais por: microscopia electrónica de varrimento – SEM e microanálise por raios X - EPMA: EDS/WDS.* Porto: CEMUP.

22. CUNHA, Elisabete M., et al, 2003 - *High-resolution identification of mercury in particles in mouse kidney after acute lethal exposure. A study by Scanning Electron Microscopy coupled with X-ray Elemental Microanalysis.* BioMetals; 16: 583-590.

23.CUNHA, Elisabete M., et al;2004 - *Mercury intake by inflammatory phagocytes: in vivo cytology of mouse macrophages and neutrophils by X-ray*

elemental microanalysis coupled with scanning electron microscopy. Human & Experimental Toxicology;23: 447-453.

24. Díez S.; 2009 -*Human health effects of methylmercury exposure.* Rev. Environ Contam Toxicol. ;198:111-32.

25. MAHAFFEY, K. *et al* 2003 - *Blood Organic Mercury and Dietary Mercury Intake.* Environmental Health Perspectives ehp. 6587.

26. *Association of Metropolitan Sewerage Agencies (AMSA),* March 2002.- *Evaluation of Domestic Sources of Mercury.* Washington, DC.

27. EPA, Mercury Research Multi-Year Plan. FY 2005 Planning, 2003 - Final Version. Washington, DC: Office of Research and Development.

28. *American Dental Association, National Recruitment & Retention Report 2002 - End of Year 2001.* Chicago, Illinois: Department of Membership Information.

29. Richard T Kao; DDS PHD; Scott Dault BS; Teresa Pichay; July 2004 - *Understanding the mercury reduction issue, the impact of mercury on Environment and human Health.* CDA, Journal vol.32 no.7.

30. Leda Freitas de Jesus; Marden Samir Marinha ;Fátima Ramos Moreira; 2010 - *Amálgama Dentário: Fonte de contaminação por mercúrio para a odontologia e para o meio ambiente.* Cad.Saúde Colet.,Rio de Janeiro,18(4):509-15.

31. Jay A. Vendeven; Steve L. McGinnis; July.2004-*Cost Effectiveness of removing amalgam from Dental wastewater.* CDA. Journal. Vol.32. NO.7

32. Tomio Nonaka; Dionisio Vinha; Guilherme Brião Camacho; Geovani Luis Pandolfo; Apr.1998-*Alterações nas propriedades físicas do Amálgama Dental por perda de mercúrio durante a trituração mecânica.* Revista de Odontologia da Universidade de São Paulo. Vol12 n2 S. Paulo

33. Rafael Yangué Ballester; Roberto Adrian Markarian; Alessandro Dourado Loguercio; out./dez.2001-*Alteração dimensional de amálgama de prata e liga à base de gálio.* Pesq Odont Bras, V.15, n.4, p.341-347.

34. FIALHO, E.S.; SILVA, E. V.; GRAFF, C.S.; LOGERCIO, A.D.; CAMACHO, G.B.; BUSATO, A.L.S. jan./mar.2000.-*Avaliação da infiltração marginal de restaurações de amálgama: mercúrio versus gálio.* Pesq Odont Bras, V.14, n.1, p.59-63.

35. AL-Saleh, AL-sedairi-AA.; 2011 jul 15.- *Mercury burden in children: The impact of dental amalgam.* SCI Total Environ.; 409(16):3003-15.

36. Grigoletto J.C. et al. 2008.- *Exposição ocupacional por uso de mercúrio em odontologia: uma revisão bibliográfica*. Ciência e saúde Colectiva Rio de Janeiro, V.13, n.2, p.533-542
37. Oikawa, T.; Pinheiro, M.C.V.; Ferreira, L.B.; Toda, K.S.; Set.2007- *Avaliação dos teores de mercúrio na urina dos graduados em odontologia*. Revista Paraense de Medicina, Belém, V.21, n.3.
38. Hertz-Picciotto I; Green P.G.; Delwiche L.; Hansen R. ;Walker C.; Pessah I.N.; 2010 Jan- *Blood mercury concentration in a case-control study of children with and without autism*. Environ Health perspect.; 118(1):161-6.
39. Sharif M.O; Merry A.; Catleugh M; Tickle M.; Brunton P.; Dunne S.M.; Aggarwal V.R.; 2010 Feb 17- *Replacement versus repair of defective restorations in adults: amalgam*. Cochran Database Syst Rev.; (2):CD005970.
40. Oliveira M.T.; Pereira J.R.; Ghizoni J.S.; Bittencourt S.T.; Molina G.O.; 2010- *Effects from exposure to dental amalgam on systemic mercury levels in patients and dental school students*. Photomed Laser surg.; 28 suppl 2: S111-4.
41. Ligas para a restauração de amálgama versão 1.0 de 2003 do Prof. Doutor Fernando Mandarinó
42. Flávio Augusto Claro, Fábio Ribeiro Ito, Filipe Magalhães Bastos, Morgana Estefânea Ribeiro;- *Mercúrio no amálgama Odontológico: Riscos da exposição, toxicidade e métodos de controle -Revisão da literatura* Especialistas em Saúde Pública pela Universidade de Taubaté.
43. Prof.Dr. Jesus Djalma Pécora- *Guia Prático de resíduos de amálgama odontológico*. Lagro Projecto FAPESP 01/01065-1.
44. Prof.Dr .J. Pinto da Costa; Mestre Carlos Medeiros; Prof.Dra .M.J.Carneiro de Sousa Pinto da costa, Mestre Mónica Cunha, Prof.Dr. Manuel Brandão, Dr.Teixeira Gomes; Prof.Dr.Paulo Carneiro de Sá; Prof.Dra. Graça Lobo; Nov./Dez.2007- *Tóxicologia Forense*. ICBAS- Porto
45. Zeidá-Chuliá F; Gursay Uk; Kononen E; Gottfried C.; 2011 Jan 13- *A dental look at the autistic patient through orofacial pain*. Act. odontol Scand.
46. Mónica Elisabete da Silva Cunha; 2004 - *Método de detecção de mercúrio e outros metais (SEM-XRM), Importância Médico-Legal*. Mestrado em Medicina Legal - ICBAS Porto.
47. Mónica Elisabete da Silva Cunha; 2009 – *Efeitos biológicos do mercúrio* Doutoramento– ICBAS Porto
48. Armin W M.; 2007 Jul-Aug- *Comparative electrochemical investigation of the effect of aging on corrosion of dental amalgam*. Quintessence Int.; 38(7):e 417-24.

49. Koppang H S; Roushan A; Srafilzadeh A; Stolen So; Koppang R. ;2007 Mar – *Foreign body gingival lesions: distribution morphology, identification by X ray dispersive analysis and possible origin of foreign material.* J .Oral Pathol Med.;36(3):161-72.
50. Daou M H; Attin T; Göhring T N; 2009 - *Clinical success of compomer and amalgam restorations in primary molars. Follow up in 36 months.* Schweiz Monats Schr Zahnmed Aust Endod J.; 35(2):78-84.
51. Rodrigues Junior S A; Pin LF; Machado G; Della Bona A; Demarco FF.;2010 Jan-Feb.- *Influence of different restorative techniques on marginal seal of class II composite restorations.* J. Appl oral Sci.; 18(1):37-43
52. Gurgans, Kiremitici A; Yalcin F; Alpaslan T; Yazici E.; 2007 Spt-Out - *Effect of carbamide peroxide treatments on the metal ion release and microstructure of different dental amalgams.* OperDent.32(5):476-81.
53. Venclíkova Z, Benada O, Bártova J, Joska L, Mrklas L..Dent Mater J. 2007 Jan.-*Metallic pigmentation of human teeth and gingiva: morphological and immunological aspects.* Dent Mater J. 26(1):96-104
54. Mahler DB, Pham BV, Adey JD.; 2009 May-Jun-*Corrosion sealing of amalgam restorations in vitro.* Oper Dent. 34(3):312-20
55. Struzak-Wysokińska M, Kot I.; 1989 Feb.-*Age and content of certain mineral components in permanent teeth.* Czas Stomatol. 42(2):95-102
56. Joska L, Venclikova Z, Poddana M, Benada O.; 2009 Mar.-*The mechanism of gingiva metallic pigmentations formation.* Clin Oral Investig13(1):1-7.
57. Yavnai N. 2010 Apr.-*Toothpastes: ingredients, brands, categories and their utilization.* Refuat Hapeh Vehashinayim 27(2):19-27, 61
58. Mo SS, Bao W, Lai GY, Wang J, Li MY. 2010 Aug -*The microfloral analysis of secondary caries biofilm around Class I and Class II composite and amalgam fillings.* BMC Infect Dis17;10:241.
59. Sabel N, Dietz W, Lundgren T, Nietzsche S, Odelius H, Rythén M, Rizell S, Robertson A, Norén JG, Klingberg G.2009-*Elemental composition of normal primary tooth enamel analyzed with XRMA and SIMS.* Swed Dent J. 33(2):75-83
60. Malara P, Kwapulinski J, Malara B. 2006 Oct 1-*Do the levels of selected metals differ significantly between the roots on carious and non-carious teeth?* Sci Total Environ 1;369(1-3):59-68.

61. Honório HM, Rios D, Francisconi LF, Magalhães AC, Machado MA, Buzalaf MA. S 2008 Dec.-*Effect of prolonged erosive pH cycling on different restorative materials*. JOral Rehabil; 35(12):947-53.
62. Scholtanus JD, Ozcan M, Huysmans MC. 2009 May;-*Penetration of amalgam constituents into dentine*. J Dent.;37(5):366-73.
63. Diário da República I serie B 5780-(2), nº198:25/08/1999.Ministério da saúde e do ambiente portaria nº744-A/99 de 25 de Agosto
64. H.G.Burkitt;B.Young; J.W.Heath; P.J.DeaKin.Wheater Histologia fucional,3ª edição, guanabara koogan.
65. José Luis velayos;Humberto Díaz Santana.Anatomia de la cabeza com enfoque odontológico.Editorial médica Panamericana.
66. Keith L. Moore.Anatomia orientada para a prática clínica,3ª edição,Guanabara koogan.
67. João da silva Correia; Romance Unhas Negras. S. João da Madeira- Museu da Chapelaria.

Anexos

