

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC
CENTRO DE ENGENHARIA, MODELAGEM E CIÊNCIAS SOCIAIS APLICADAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA

Sergio Luiz Machado dos Santos Junior

**Acompanhamento da progressão de lesões incipientes de
cárie em dentina radicular por métodos ópticos**

São Bernardo do Campo – SP

Fevereiro/2018

Sergio Luiz Machado dos Santos Junior

**Acompanhamento da progressão de lesões incipientes de cárie em dentina
radicular por métodos ópticos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica da Universidade Federal do ABC – UFABC, como requisito para obtenção do título de Mestre em Engenharia Biomédica, sob orientação da Profa. Dra. Patricia Aparecida da Ana e Co-orientação do Prof. Dr. Nasser Ali Daghasanli

São Bernardo do Campo - SP

Fevereiro/2018

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca da Universidade Federal do ABC

Machado dos Santos Junior, Sergio Luiz

Título: Acompanhamento da progressão de lesões incipientes de cárie em dentina radicular por métodos ópticos

132 Fls.

Orientador: Prof. Dra. Patrícia Aparecida da Ana

Mestrado em Engenharia Biomédica – Universidade Federal do ABC

1.Dentina, 2. Cárie radicular, 3. Fitoterápico, 4. Remineralização 5. Fluorescência, 6. Espectroscopia 7.Tomografia por Coerência Óptica

Este exemplar foi revisado e alterado em relação à versão original, de acordo com as observações levantadas pela banca no dia da defesa, sob responsabilidade única do autor e com a anuência de seu orientador.

Santo André, 21 de Março de 2018.

Assinatura do autor: Luiz Luiz Machado

Assinatura do orientador: Salvador de

Sergio Luiz Machado dos Santos Junior

**Acompanhamento da progressão de lesões incipientes de cárie em dentina
radicular por métodos ópticos**

Defesa de Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica da Universidade Federal do ABC – UFABC, como requisito para obtenção do título de Mestre em Engenharia Biomédica, sob orientação da Profa. Dra. Patricia Aparecida da Ana e Co-orientação do Prof. Dr. Nasser Ali Daghashtani

São Bernardo do Campo – SP, de fevereiro de 2018

Prof. Dra. Sônia Maria Malmonge

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Patrícia Aparecida da Ana

Orientadora

Prof. Dra. Christiane Bertachini Lombello

Universidade Federal do ABC

Prof. Dr. Moisés Oliveira Santos

Universidade do Estado do Amazonas

Agradecimentos

Agradeço a todos que contribuíram de alguma forma neste projeto, já que durante toda essa trajetória, adquirimos conhecimento, experiências e construímos relacionamentos.

À Universidade Federal do ABC e a Coordenação do curso de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica, representada pela Dra. Sônia Maria Malmonge.

À Dra. Patricia Aparecida da Ana, orientadora deste projeto, por toda sua dedicação frente aos desafios encontrados até aqui e por compartilhar seu conhecimento conosco. Agradeço pela sua compreensão nos momentos difíceis que encontramos até então.

Ao Dr. Nasser Ali Daghashtanli, co-orientador deste projeto, por sua colaboração e ensinamentos que ofereceu para o desenvolvimento do projeto.

Agradeço ao Projetos PROCAD-CAPES (071/2013-88881.068505/2014-01) e INCT CNPq INFO (Instituto Nacional de Fotônica 465763/2014-6)

Agradeço aos professores do curso por todo conhecimento passado nas aulas teóricas e práticas que tivemos nestes anos, e que estão sendo de total importância para formação dos mestrados.

À Central Multiusuário da UFABC, pelo uso dos equipamentos.

À UFABC pela bolsa de mestrado concedida.

Agradeço ao meu amigo Felipe Lima por todo apoio que me deu nos momentos difíceis que passei neste período, sempre me incentivando a continuar com meus objetivos

Aos meus colegas de curso que me apoiaram e que dividiram momentos bons e ruins ao longo deste percurso.

Um especial agradecimento à minha família e amigos, por terem me apoiado de forma incondicional nesta jornada.

Por fim, desejo um muito obrigado a todos que acreditaram em meu esforço.

Obrigado a todos!!

*“Em algum lugar, alguma
coisa incrível está esperando para
ser conhecida. ”*

Carl Sagan

RESUMO

Apesar dos esforços no desenvolvimento de soluções que permitam o controle da progressão de lesões de cárie, a alta prevalência de cárie radicular no Brasil mostra a necessidade de novas formas de diagnóstico e prevenção. É importante que sejam pensadas estratégias de prevenção e tratamento que sejam aceitas pela população, ao mesmo tempo que sejam acessíveis em disponibilidade e preço. Os fitoterápicos consistem em preparações de vegetais que apresentam compostos medicinais que podem auxiliar no combate ou na cura de uma doença. É sabido que as plantas *Vitis vinífera* (semente de uva) e *Camellia sinensis* (chá verde) apresentam em sua composição compostos polifenólicos (proantocianidinas) que são capazes de promover ligações cruzadas nas fibras de colágeno da dentina, e assim dificultando a perda de material inorgânico (hidroxiapatita) no processo de desmineralização, desta forma, podendo indicar sua aplicação no controle do desenvolvimento de lesões de cáries incipientes. Por outro lado, também há a necessidade do uso de métodos diagnósticos que permitam diagnosticar precocemente e que permitam efetuar o acompanhamento de lesões incipientes, de forma não invasiva, em tempo real e com alta sensibilidade e especificidade. Neste trabalho, buscou-se verificar o efeito de dois extratos naturais (*Vitis vinífera* e *Camellia sinensis*) em superfícies dentinárias desmineralizadas *in vitro* empregando-se um Sistema de Imagens por Fluorescência (SIF), Espectroscopia de Absorção no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) e Tomografia por Coerência Óptica (OCT). Para tal, 40 amostras de dentina radicular foram desmineralizadas e aleatoriamente distribuídas em 4 grupos experimentais distintos: Grupo 1: sem tratamento; Grupo 2: tratamento com flúor fosfato acidulado; Grupo 3: tratamento com extrato de *Vitis vinífera*; Grupo 4: tratamento com extrato de *Camellia sinensis*. Após os tratamentos, a ativação da remineralização foi simulado por meio de ciclagem de pH com duração de 8 dias. Os efeitos dos tratamentos foram avaliados por meio de SIF, FTIR e OCT. Ao avaliarmos as imagens obtidas pelo SIF, verificou-se que após a ciclagem de pH os grupos tratados com flúor (G2) e com *Camellia sinensis* (G4) apresentaram maior fluorescência que os grupos tratados com *Vitis vinífera* (G3) e que o grupo controle (G1). Na análise FTIR o Grupo tratado com flúor (G2) foi o que apresentou espectro com maior intensidade de material orgânico e inorgânico. Os Grupos tratados com os fitoterápicos (G3 e G4) apresentaram maior intensidade se

comparado com o grupo sem tratamento, porém ainda se mostrando menos efetivo que o tratamento por flúor. Na análise feita por OCT, foi possível perceber que o Grupo tratado com flúor (G2) foi o que apresentou maior coeficiente de atenuação óptica e os grupos sem tratamento (G1) e os grupos tratados com fitoterápicos (G3 e G4) não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre si. Os G3 e G4 se mostraram equivalentes e com alguma significância na prevenção da cárie, porém ainda sendo menos indicado que o tratamento por fluoretação. De acordo com a metodologia empregada e os resultados obtidos no presente estudo, é possível concluir que os agentes fitoterápicos (*Vitis vinífera* e *Camellia sinensis*) auxiliam no controle da progressão de cáries incipientes, porém de forma menos expressiva que o flúor fosfato acidulado (FFA). Ainda assim, as técnicas de imageamento por fluorescência e tomografia por coerência óptica tratam-se de ferramentas promissoras para monitoramento da remineralização da cárie radicular.

Palavras-chave: Dentina, Cárie Radicular, Fitoterápico, Remineralização, Fluorescência, Espectroscopia, Tomografia por Coerência Óptica.

ABSTRACT

Despite the efforts in developing solutions to control the progression of lesion cavities, the high prevalence of root cavities in Brazil shows the need for new forms of diagnosis and prevention. Prevention and treatment strategies which are accessible, available, affordable and accepted by local population important. Phytoterapics consist of herbal preparations containing medicinal compounds that may aid in combating or curing a disease. It is known that *Vitis vinifera* (grape seed) and *Camellia sinensis* (green tea) plants have polyphenolic compounds (proanthocyanidins) which are able to promote cross-linking in the dentin collagen fibers, thus hindering the loss of inorganic material (hydroxyapatite) in the demineralization process. This may indicate its application in the development of lesions of incipient cavities. On the other hand, there is also a need for the use of diagnostic methods that allow early diagnosis and allow the monitoring of incipient lesions, in a non-invasive way, in real time and with high-sensitivity and specificity. The aim of this study is to verify the effect of two natural extracts (*Vitis vinifera* and *Camellia sinensis*) on in-vitro demineralised dentin surfaces using a Fluorescence Imaging System (FIS), Fourier-Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) and Optical Coherence Tomography (OCT). To this end, 40 samples of root dentin were demineralized and randomly distributed in four different experimental groups: Group 1: without treatment; Group 2: acidulated fluorine phosphate treatment; Group 3: treatment with *Vitis vinifera* extract; Group 4: treatment with extract of *Camellia sinensis*. After the treatments, the activation of remineralization was simulated by means of pH cycling with duration of 8 days. The effects of the treatments were evaluated by SIF, FTIR and OCT. After the pH cycling, the groups treated with fluoride (G2) and *Camellia sinensis* (G4) presented higher fluorescence than the groups treated with *Vitis vinifera* (G3) and that the control group (G1). In the FTIR analysis, the group treated with fluorine (G2) had the highest intensity of organic and inorganic material. Groups treated with phytotherapics (G3 and G4) presented higher intensity when compared to the group without treatment, but still less effective than treatment with fluoride. In the analysis by OCT, the group treated with fluoride (G2) presented the highest optical attenuation coefficient than the groups without treatment (G1) and the groups treated with phytotherapics (G3 and G4) presented no statistically significant difference. G3 and G4 were equivalent with some significance in cavities prevention, but still less so than fluoridation treatment. According to the methodology used and the results obtained in

the present study, one concludes that phytotherapeutic agents (*Vitis vinifera* and *Camellia sinensis*) help control the progression of incipient caries, but in a less expressive way than acidulated phosphate fluoride (FFA). Nevertheless, the techniques of fluorescence imaging and optical coherence tomography are promising tools for monitoring the caries remineralization.

Keywords: Dentin, Root Caries, Phytotherapeutic, Remineralization, Fluorescence, Spectroscopy, Optical Coherence Tomography

Lista de Figuras

Figura 1: Média do CPO/ceo e respectivos componentes segundo faixa etária.	22
Figura 2: Tecidos associados aos dentes posteriores e inferiores.	28
Figura 3: Estrutura química básica dos flavonóides.	45
Figura 4: Fenômenos de interação da luz com o tecido biológico. (a) reflexão; (b) espalhamento; (c) retro-espalhamento; (d) transmissão; (e) absorção e mecanismo de decaimento após absorção com emissão de fótons, fosforescência ou (f) fluorescência.	50
Figura 5: Esquema ilustrativo do fenômeno de fluorescência.	50
Figura 6: Estados excitados singlete e triplete responsáveis pela ocorrência dos fenômenos de Fluorescência e Fosforescência, respectivamente.	51
Figura 7: Diagrama de Jablonski.	52
Figura 8: Principais componentes de um equipamento de Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR).	57
Figura 9: Esquema básico de um Interferômetro de Michelson.	58
Figura 10: Esquema simplificado de um equipamento ATR-FTIR.	59
Figura 11: Espectro da dentina bovina hígida saudável não tratada obtido por um equipamento ATR-FTIR.	59
Figura 12: Componentes básicos de um equipamento de Tomografia por Coerência Óptica (OCT).	63
Figura 13: Representação de um corte bidimensional (2D) B-scan, composto por diversos cortes A-scan de profundidade.	65
Figura 14: Fenômenos de interação da luz com o material biológico.	66
Figura 15: Esquema do Sistema desenvolvido pela Universidade da Califórnia (U.S.A). Composto por: 1 – Polarizador; 2- Placa de onda; 3 – Lente de colimação; 4 – Filtro passa-banda e 5 – Fotodetector.	70
Figura 16: Fluxograma com as diferentes fases experimentais do trabalho.	73
Figura 17: Representação da área reativa das amostras.	75
Figura 18: Imagem de uma amostra com a delimitação de sua região ativa.	75
Figura 19: Fotos das amostras do Grupo 1 (sem tratamento).	77
Figura 20: Fotos das amostras do Grupo 2 (tratamento com FFA).	77
Figura 21: Fotos das amostras do Grupo 3 (tratamento com extrato de <i>Vitis vinífera</i>).	77
Figura 22: Fotos das amostras do Grupo 4 (tratamento com extrato de <i>Camellia sinensis</i>).	78
Figura 23: Foto dos líquidos preparados com os extratos de <i>Vitis vinífera</i> (4) e <i>Camellia sinensis</i> (5), respectivamente.	78
Figura 24: Representação do Sistema de Imagens por Fluorescência.	79
Figura 25: Fotografia do Sistema de Imagens por Fluorescência utilizado nos experimentos. ..	80
Figura 26: Representação de uma imagem obtida pelo Sistema de Imagens por Fluorescência (SIF), com indicação do que se refere a amostra, cera, cerâmica e fita crepe.	82
Figura 27: Imagem ilustrativa em que mostra a seleção de uma ROI.	82
Figura 28: Histograma apresentado pelo software para uma determinada ROI selecionada.	83
Figura 29: Exemplo de um espectro plotado com os dados obtidos pelo equipamento ATR-FTIR para uma determinada amostra.	85
Figura 30: Exemplo de um baseline traçado em um espectro, considerando as 6 bandas de interesse neste projeto.	86

Figura 31: Exemplo de um espectro obtido após efetuada a subtração para que as bandas coincidissem com o zero do eixo das ordenadas.....	87
Figura 32: OCT Thorlabs Callisto pertecente a Central Multiusuário da Universidade Federal do ABC - São Bernardo do Campo.	88
Figura 33: Imagem ilustrativa para demonstrar as regiões, igualmente espaçadas em 5 μm , onde foram realizados os escaneamentos nas amostras.	88
Figura 34: Imagem B-scan de uma determinada amostra, com a delimitação de uma região A-scan feita no software ImageJ. Lembrando que em cada imagem B-scan, foram feitos 5 escaneamentos A-scan.....	89
Figura 35: Exemplo do Gráfico (Tom de cinza X Distância) fornecido pelo software ImageJ para um determinado A-scan analisado para uma amostra.	89
Figura 36: Exemplo de uma Tabela obtida para um Gráfico fornecido pelo software ImageJ para um determinado A-scan analisado para uma amostra, onde X representa o pixel e Y o tom de cinza atribuído para este pixel.	90
Figura 37: Valores médios das intensidades de fluorescência obtidos para as amostras imediatamente após os tratamentos. As barras indicam o desvio padrão. Para análise estatística empregou-se o teste não paramétrico de Kruska-Wallis, tendo em vista que a distribuição foi não normal e foi verificado que não há diferença estatisticamente significativa entre os grupos.	93
Figura 38: Valores médios das intensidades de fluorescência obtidos para as amostras imediatamente após os tratamentos. As barras indicam o desvio padrão. Para análise estatística empregou-se o teste não paramétrico de Kruska-Wallis, tendo em vista que a distribuição foi não normal e o teste Student-Newman-Keuls para contraste com nível de significância de 5%. Letras diferentes indicam médias estatisticamente significativamente diferentes.	94
Figura 39: Espectro de absorção do FFA utilizado para tratar o Grupo 2, estudado na região compreendida entre 4000 - 500 cm^{-1} , obtido por ATR-FTIR. Para identificação das bandas considerar que: A - OH da água; B - Lipídeos; C - Polissacarídeos; D - Amida 2; E - Fosfolipídios e Polissacarídeos; F - Oligossacarídeos e G - Vibrações de torção fora do plano molecular.....	95
Figura 40: Espectro de absorção do extrato de Vitis vinífera utilizado para tratar o Grupo 3, estudado na região compreendida entre 4000 - 500 cm^{-1} , obtido por ATR-FTIR. Para identificação das bandas considerar que: A - OH da água e grupos funcionais das proantocianidinas; B - Lipídeos; C - Polissacarídeos; D - Picos característicos dos grupos funcionais das proantocianidinas; E - Fosfolipídios e Polissacarídeos; F - Oligossacarídeos e G - Vibrações de torção fora do plano molecular.....	95
Figura 41: Espectro de absorção do extrato de Camellia sinensis utilizado para tratar o Grupo 3, estudado na região compreendida entre 4000 - 500 cm^{-1} , obtido por ATR-FTIR. Para identificação das bandas considerar que: A - OH da água e grupos funcionais das proantocianidinas; B - Lipídeos; C - Polissacarídeos; D - Picos característicos dos grupos funcionais das proantocianidinas; E - Fosfolipídios e Polissacarídeos; F - Oligossacarídeos e G - Vibrações de torção fora do plano molecular.....	96
Figura 42: Espectro obtido na região de 700 - 4000 cm^{-1} para o grupo G1 (sem tratamento), antes que fosse realizada a ciclagem de pH.	97
Figura 43: Espectro obtido na região de 700 - 4000 cm^{-1} para o grupo G2 (tratado com FFA), antes que fosse realizada a ciclagem de pH.	98
Figura 44: Espectro obtido na região de 700 - 4000 cm^{-1} para o grupo G3 (tratado com Vitis vinífera), antes que fosse realizada a ciclagem de pH.....	98

Figura 45: Espectro obtido na região de 700 - 4000 cm ⁻¹ para o grupo G4 (tratado com <i>Camellia sinensis</i>), antes que fosse realizada a ciclagem de pH.....	99
Figura 46: Espectro obtido na região de 700 - 4000 cm ⁻¹ para o grupo G1 (sem tratamento), após realizada a ciclagem de pH.	99
Figura 47: Espectro obtido na região de 700 - 4000 cm ⁻¹ para o grupo G2 (tratado com FFA), após realizada a ciclagem de pH.	100
Figura 48: Espectro obtido na região de 700 - 4000 cm ⁻¹ para o grupo G3 (tratado com <i>Vitis vinífera</i>), após realizada a ciclagem de pH.....	100
Figura 49: Espectro obtido na região de 700 - 4000 cm ⁻¹ para o grupo G4 (tratado com <i>Camellia sinensis</i>), após realizada a ciclagem de pH.	101
Figura 50: Gráfico que faz a comparação entre as áreas sob a banda de absorção do ν_2 carbonato pré-ciclagem de pH, após normalização pela banda do fosfato. As barras informam o desvio padrão encontrado para cada grupo. Letras diferentes indicam médias estatisticamente significativamente diferentes ($p < 0,05$) após realização do teste de Kruskal-Wallis e Student-Newman-Keuls.....	101
Figura 51: Gráfico que faz a comparação entre as áreas sob a banda de absorção da Amida 3 pré-ciclagem de pH, após normalização pela banda do fosfato. As barras informam o desvio padrão encontrado para cada grupo. Neste caso não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p = 0,1143$) após realização do Teste de Kruskal-Wallis.....	102
Figura 52: Gráfico que faz a comparação entre as áreas sob a banda de absorção do ν_3 e ν_4 carbonato pré-ciclagem de pH, após normalização pela banda do fosfato. As barras informam o desvio padrão encontrado para cada grupo. Letras diferentes indicam médias estatisticamente significativamente diferentes ($p < 0,05$) após realização do teste de Kruskal-Wallis e Student-Newman-Keuls.....	102
Figura 53: Gráfico que faz a comparação entre as áreas sob a banda de absorção da Amida 2 + carbonato pré-ciclagem de pH, após normalização pela banda do fosfato. As barras informam o desvio padrão encontrado para cada grupo. Neste caso não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p = 0,1551$) após realização do Teste de Kruskal-Wallis.....	103
Figura 54: Gráfico que faz a comparação entre as áreas sob a banda de absorção da Amida 1 pré-ciclagem de pH, após normalização pela banda do fosfato. As barras informam o desvio padrão encontrado para cada grupo. Neste caso não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p = 0,1648$) após realização do Teste de Kruskal-Wallis.....	103
Figura 55: Gráfico que faz a comparação entre as áreas sob a banda de absorção do ν_2 carbonato pós-ciclagem de pH, após normalização pela banda do fosfato. As barras informam o desvio padrão encontrado para cada grupo. Neste caso não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p = 0,8690$) após realização do Teste de Kruskal-Wallis.....	104
Figura 56: Gráfico que faz a comparação entre as áreas sob a banda de absorção da Amida 3 pós-ciclagem de pH, após normalização pela banda do fosfato. As barras informam o desvio padrão encontrado para cada grupo. Neste caso não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p = 0,1139$) após realização do Teste de Kruskal-Wallis.....	104
Figura 57: Gráfico que faz a comparação entre as áreas sob a banda de absorção do ν_3 e ν_4 carbonato pós-ciclagem de pH, após normalização pela banda do fosfato. As barras informam o desvio padrão encontrado para cada grupo. Neste caso não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p = 0,3265$) após realização do Teste de Kruskal-Wallis.....	105
Figura 58: Gráfico que faz a comparação entre as áreas sob a banda de absorção da Amida 2 + carbonato pós-ciclagem de pH, após normalização pela banda do fosfato. As barras informam o	

desvio padrão encontrado para cada grupo. Neste caso não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p = 0,1284$) após realização do Teste de Kruskal-Wallis.....	105
Figura 59: Gráfico que faz a comparação entre as áreas sob a banda de absorção da Amida 1 pós-ciclagem de pH, após normalização pela banda do fosfato. As barras informam o desvio padrão encontrado para cada grupo. Neste caso não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p = 0,1563$) após realização do Teste de Kruskal-Wallis.....	106
Figura 60: Imagem representativa adquirida por OCT para o G1 (sem tratamento), após ciclagem de pH.....	106
Figura 61: Imagem representativa adquirida por OCT para o G2 (tratado com FFA), após ciclagem de pH.....	107
Figura 62: Imagem representativa adquirida por OCT para o G3 (tratado com extrato de Vitis vinífera), após ciclagem de pH.....	107
Figura 63: Imagem representativa adquirida por OCT para o G1 (tratado com extrato de Camellia sinensis), após ciclagem de pH.	107
Figura 64: Valores médios calculados para os coeficientes de atenuação óptica para os diferentes grupos experimentais, após a realização da ciclagem de pH. As barras evidenciam o desvio padrão. Letras distintas evidenciam médias estatisticamente diferentes após realização do teste de TUKEY.	109

Lista de tabelas

Tabela 1: Percentual em volume e peso da composição química da dentina e do esmalte.	29
Tabela 2: Consequências para a dentina e esmalte quanto alterações no pH do meio, presença ou ausência de flúor e efeitos físico-químicos relacionados.	40
Tabela 3: Principais moléculas biológicas que são capazes de emitir fluorescência e seus comprimentos de onda de excitação e emissão.	54
Tabela 4: Bandas de absorção associadas ao fosfato (PO_4^{3-}) presentes na dentina.	60
Tabela 5: Bandas de absorção associadas ao carbonato (CO_3^{2-}) presentes na dentina.	61
Tabela 6: Bandas de absorção associadas na região espectral de $4000 - 2500 \text{ cm}^{-1}$ em dentina.	61
Tabela 7: Bandas de absorção associadas na região espectral de $1750 - 1180 \text{ cm}^{-1}$ em dentina.	61
Tabela 8: Delineamento experimental.	74
Tabela 9: Valores dos ranges e dos picos das bandas considerados no experimento.	85
Tabela 10: Parâmetros scan utilizados no OCT para aquisição das imagens.	88
Tabela 11: Valores médios encontrados para os coeficientes de atenuação óptica para cada grupo experimental, bem como seus respectivos valores de desvio padrão.	108
Tabela 12: Tabela com os valores encontrados nas análises estatísticas realizadas por ANOVA e TUKEY.	108

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
PNS	Pesquisa Nacional de Saúde
MS	Ministério da Saúde
PNPIC	Política Nacional de Práticas Integrativas Complementares
SUS	Sistema Único de Saúde
CEUA	Comissão de Ética de Uso Animal da Universidade Federal do ABC
CEM	Central Multiusuário
UFABC	Universidade Federal do ABC
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
UNIMONTES	Universidade de Montes Claros
SIF	Sistema de Imagens por Fluorescência
LIF	<i>Light Induced Fluorescence</i>
LED	<i>Light Emitting Diode</i>
FTIR	Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier
ATR	Reflexão Total Atenuada
OCT	Tomografia por Coerência Óptica
PS-OCT	<i>Polarization Sensitivity – Optical Coherence Tomography</i>
OCDR	<i>Optical Coherence Domain Reflectometry</i>
FFA	Flúor Fosfato Acidulado
FA	Fluorapatita
HA	Hidroxiapatita
AF	Apatita Fluoretada
CFO	Conselho Regional de Odontologia
GSE	<i>Grape Seed Extract</i>
PA	Proantocianidina
MMP	Metaloproteinases de matriz
\emptyset	Rendimento quântico
n	Número de onda
λ	Comprimento de onda
cm	centímetro
nm	Nanômetro
dB	Decibéis

k	Número de onda
θ	Ângulo de incidência
n	Índice de refração
d_p	Profundidade de penetração
f	Frequência de propagação
lc	Comprimento de coerência
c	Velocidade de propagação da luz no vácuo
v	Velocidade de propagação da luz no material
θ_x	Ângulo de propagação
z	Profundidade
I	Intensidade do pixel
μ	Coeficiente de atenuação óptica
ROI	<i>Region of Interest</i>
DES	Solução desmineralizadora
RES	Solução remineralizadora

Sumário

1. Introdução	21
2. Objetivos	27
3. Revisão da Literatura	28
3.1 Tecidos duros dentários	28
3.1.1 Estrutura anatômica do dente	28
3.1.2 Composição química do dente	29
3.1.3 Dentina	33
3.2 Etiologia da cárie	35
3.3 Papel do flúor no combate a cárie	38
3.4 Fitoterapia na Odontologia	42
3.4.1 <i>Camellia sinensis</i> (chá verde) e <i>Vitis vinífera</i> (semente de uva)	44
3.4.2 Forma de atuação da <i>Vitis vinífera</i> e da <i>Camellia sinensis</i> na dentina	45
3.5 Técnicas ópticas de para diagnóstico precoce e acompanhamento de lesões incipientes de cárie	48
3.5.1 Sistemas de Imagens por Fluorescência	48
3.5.2 Espectroscopia de absorção no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)	55
3.5.3 Tomografia por Coerência Óptica (OCT)	62
4. Materiais e Métodos	72
4.1 Delineamento Experimental	72
4.2 Preparo das amostras	74
4.3 Tratamentos das amostras	76
4.4 Simulação do processo de ativação da remineralização <i>in vitro</i>	79
4.5 Avaliação pelo Sistema de Imagens por Fluorescência (SIF)	79
4.6 Avaliação por Espectroscopia de Absorção no Infravermelho por Transformada de Fourier (ATR-FTIR)	84
4.7 Avaliação por Tomografia por Coerência Óptica (OCT)	87
5. Resultados	93
5.1 Fluorescência	93
5.2 ATR-FTIR	94
5.2.1 Avaliação da composição química dos extratos naturais	94
5.2.2 Avaliação da composição química das amostras	97

5.3 OCT	106
6. Discussão dos Resultados	110
7. Conclusão	117
8. Referências Bibliográficas	118
Anexos	134

1. Introdução

Grande parte da população já apresentou alguma doença que estivesse relacionada com a cavidade bucal, e tal fato motivou que pesquisadores pelo mundo todo desenvolvessem projetos para aprimorar os métodos atuais de diagnóstico, tratamento e prevenção destas enfermidades (BARTLET, 2005).

É observado que a ocorrência de cárie dentária vem diminuindo ao longo do tempo (BRASIL, 2010; PETERSEN, 2003; BRASIL, 2004). Uma das causas deste fenômeno é o maior conhecimento que se tem hoje do processo de desenvolvimento desta lesão, somado à grande diversidade de medidas preventivas que estão sendo implementadas na vida das pessoas, tais como: melhorias na higiene bucal, alimentação adequada, processo de fluoretação da água que chega aos domicílios, desenvolvimento de enxaguantes bucais e dentifrícios mais eficientes, além de uma maior acessibilidade da população de baixa renda aos profissionais odontólogos. Ainda que os dados sejam satisfatórios, informes do Ministério da Saúde de 2010 (Pesquisa Nacional Bucal – SB Brasil 2010) apontam que mais de 50 % da população com menos de 5 anos de idade apresentam ou já apresentaram lesão de cárie. Contudo, ao analisar dados para população adulta, verifica-se que houve uma redução se comparado com os dados de 2003 (BRASIL, 2010; CURY, 2001; MARTHALER, 2004; BRASIL, 2004).

Em 2013 o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) e o Ministério da Saúde (MS) fizeram uma parceria para realizar um estudo de base domiciliar, nominada Pesquisa Nacional de Saúde 2013 (PNS-2013). Os dados mostraram que homens, idosos, pretos e pardos, pessoas sem instrução, pessoas com nível fundamental incompleto, residentes de área rural, residentes da região Nordeste, foram os participantes que apresentaram os menores indicadores de higiene bucal como adequado, além dos valores mais baixos quanto a auto percepção de saúde bucal avaliadas como boa ou muito boa (IBGE, 2015). Os resultados evidenciam a necessidade do desenvolvimento de políticas públicas para atender a população carente com difícil acesso aos meios preventivos.

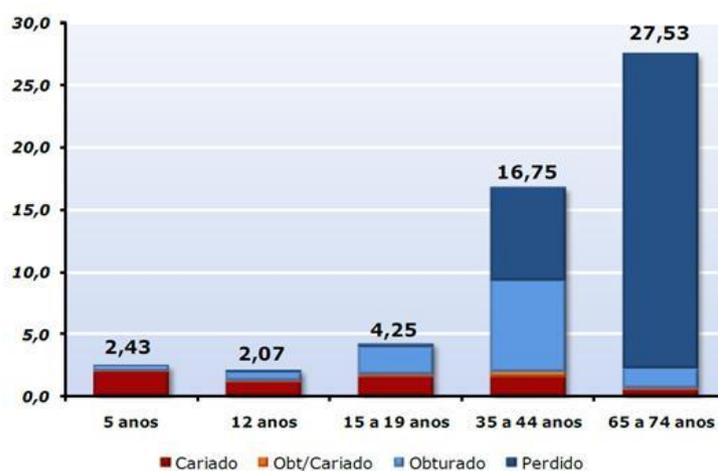
A cárie, é uma doença infecciosa que afeta diretamente a relação existente entre a desmineralização e remineralização do dente, de tal forma que, havendo um desbalanceamento nesta proporção, é observada uma perda progressiva da estrutura dentária (FEJERSKOV, 2005). Alguns autores verificaram que a incidência de cárie, principalmente em dentição decídua, há uma tendência de decréscimo, principalmente

em países desenvolvidos, como os Estados Unidos da América, Noruega, Inglaterra e Alemanha (FERRAZZANO, 2009; BRASIL, 2010; HAUGEJORDEN; BIRKELAND, 2002; DYE; THORNTON-EVANS, 2010).

O Índice CPO-D, formulado por Klein e Palmer no ano de 1937, ainda é o método mais utilizado para avaliar e quantificar a presença de cárie em dente permanente para população adulta. A sigla pode ser entendida como a soma dos dentes **C**ariados (sem tratamento), **P**erdidos (devido à cárie) e **O**bturados/Restaurados (tratados). Seu termo análogo para dentição decídua ou temporária é o índice ceo-d, onde inclui-se dentes cariados, com extração indicada ou obturados (NARVAI; FRAZÃO, 2008) [102].

Realizando uma breve análise dos levantamentos nacionais, observa-se que houve uma diminuição dos índices CPO/ceo na população. Nos indivíduos com faixa etária de 12 anos, o valor caiu de 6,7 dentes (2003) para 2,1 dentes (2010); nos indivíduos com faixa etária de 35 a 44 anos, o valor caiu de 21,8 (1986) para 20,1 (2003), e chegando a marca de 16,75 (2010). Na figura abaixo (Figura 1), são mostrados os dados das médias dos índices CPO e ceo para as diferentes faixas de idade no Brasil em 2010 (BRASIL, 2010).

Figura 1: Média do CPO/ceo e respectivos componentes segundo faixa etária.



Fonte: (BRASIL, 2010).

Vale a pena ressaltar que não somente fatores físicos e biológicos interferem no comportamento da saúde bucal, mas que também fatores sociais, psicológicos e financeiros possuem o seu papel, de tal forma que estratégias de diagnóstico, prevenção e tratamento devam ser desenvolvidas para que estejam acessíveis a toda população,

independentemente da classe social que ela compõe (NICO *et al.*, 2016; GORMAN, 1967).

Segundo dados do IBGE, a expectativa de vida das pessoas nascidas no Brasil em 2015 subiu de 72,4 anos em 2014 para 75,5 anos em 2015 e, os dados da Pesquisa Nacional de Saúde de 2013 apontam pessoas com 60 anos ou mais ainda apresentam os menores valores de auto percepção de saúde bucal como boa ou muito boa e, por este motivo, cresce a necessidade de se realizar métodos preventivos para cárie, de tal forma a evitar a ocorrência de edentulismo (perda de dentes parcial ou total) nos idosos (LITT; REISINE, 1993; PAVAN, 2010; IBGE, 2015; PORTAL BRASIL, 2015).

Considerando-se as diferentes regiões anatômicas do dente que podem ser acometidas pelo processo cariioso, vale destacar a cárie coronária e a radicular. A cárie coronária se desenvolve na coroa do dente, basicamente na superfície dental onde ocorre a mastigação, composta por esmalte e dentina. A cárie radicular acomete a região da raiz quando exposta devido à retração da gengiva, ou seja, ocorrem no cimento e na dentina radicular, sendo estes mais vulneráveis aos desafios cariogênicos (GORMAN, 1967). A prevalência de cárie radicular é de 15,2 % nos adultos e 27,2% nos idosos (excluindo-se os edêntulos) da região Sudeste do Brasil (BATISTA *et al.*, 2014).

Ainda que o acesso aos métodos preventivos para cárie tenha apresentado uma taxa de crescimento e que os hábitos de higiene bucal da população tenham melhorado no decorrer dos anos, ainda há a necessidade de elaborar e desenvolver técnicas modernas que permitam o diagnóstico precoce desta lesão, além de técnicas preventivas mais eficazes (FEJERSKOV; KIDD, 2005).

A fitoterapia é um ramo da ciência que estuda a forma com que plantas ou parte delas podem ser utilizadas para o tratamento de doenças (ASSIS, 2009). Sua utilização está cada vez mais recorrente, pois proporciona o tratamento a um custo mais acessível para a população carente e, assim diminuindo os gastos para os serviços públicos de saúde (MONTEIRO, 2014). Por possuir 25% da flora mundial, o Brasil se destaca como um país privilegiado para realização de procedimentos fitoterápicos como um meio alternativo das metodologias convencionais, mas somente no ano de 2006 foi estabelecida uma política para regulamentar a utilização de plantas medicinais (Portaria nº971, Decreto, nº 5813, 2006), que aprovou a PNPIC (Política Nacional de Práticas Integrativas Complementares) no SUS (Sistema Único de Saúde). Na odontologia, tal prática foi reconhecida e regulamentada no ano de 2008, através da Resolução de nº

082/2008-CFO (EVANGELISTA *et al.*, 2013).

No entanto, a inserção da Fitoterapia em procedimentos odontológicos está ocorrendo devagar e com os devidos cuidados, pois muitos profissionais que podem empregar este procedimento possuem diversas dúvidas a respeito do tema e da sua eficiência, já que não há um aprofundamento adequado nos atuais cursos de graduação e treinamentos adicionais para os estudantes (MOLINA *et al.*, 2008). Um estudo realizado na Universidade de Montes Claros (UNIMONTES) com alunos de Medicina, Enfermagem e Odontologia, apontou que 70,8% dos alunos entrevistados são favoráveis a inserção de conteúdo de Fitoterapia na graduação. Dentre os motivos apontados para analisar o interesse pela disciplina, 35,67% gostariam de ampliar o conhecimento, 16,56% gostariam de avaliar a evidência científica acerca das plantas medicinais, 11,46% gostariam de avaliar a eficácia no tratamento e cura, 7,00% consideram uma metodologia de fácil acesso e econômica e 29,29% responderam outros motivos. Quando perguntados sobre o conhecimento sobre a Política Nacional de Práticas Integrativas de Complementares (PNPIC), aprovada em 2006 pelo Ministério da Saúde, onde ele legitima o uso de plantas medicinais voltado a medicina humanizada, constatou-se que 85,0% dos ingressantes e 77,0% dos concluintes nos cursos desconheciam tal prática (FEITOSA, 2016).

O extrato da semente de uva (*Vitis vinífera*) e o extrato do chá verde (*Camellia sinensis*) apresentam uma grande quantidade de compostos polifenólicos, com destaque para as proantocianidinas. Sabe-se que as proantocianidinas apresentam diversas aplicabilidades farmacológicas, incluindo: cardioprotetora, antitumoral, bactericida, anti-inflamatória e antioxidante (YUN, 2004; BAGCHI; SEM, 2003). Por este motivo, tais agentes fitoterápicos foram considerados neste projeto.

A Óptica e a Biofotônica também estão cada vez mais em foco de inúmeros estudos, uma vez que estas técnicas têm trazido avanços tecnológicos significativos na Odontologia. Diversas tecnologias que utilizam da óptica estão em atual uso nos procedimentos odontológicos e outras estão em estágio de experimentação para futura aplicação. O grande desafio nesta área é realizar os testes para elaboração de protocolos de utilização seguros e para produção de equipamentos em grande escala a baixo custo, de tal forma que eles estejam disponíveis para os profissionais e para os pacientes.

Além da prevenção da ocorrência de cárie, detectá-la em estágios iniciais é de grande importância para realização de tratamentos adequados para paralisar a lesão e prevenir que ela chegue em fases avançadas. A desmineralização do dente em estágios

iniciais trata-se de uma lesão que não pode ser vista a olho nu e que, em boa parte dos casos, os pacientes não apresentam sintomas de incômodo (PEREIRA, 2014).

Dentre os métodos convencionais que são utilizados para detectar lesões de cárie, encontram-se: inspeção visual, sondagem táctil e o uso de imagens radiográficas. Sabe-se que estas metodologias apresentam alta especificidade para detecção de tecido sadio, mas apresentam baixa sensibilidade para detecção de tecido cariado, principalmente quando se encontram em estágios iniciais, assim evidenciando uma limitação em seu uso (CABRAL, 2006; BJELKHAGEN; SUNDSTROM, 1982).

Uma técnica utilizada para detecção da cárie é o Sistema de Imageamento por Fluorescência (SIF), que se trata da visualização da fluorescência emitida pelos constituintes biológicos encontrados no dente de forma não invasiva. Este fenômeno ocorre em algumas moléculas, denominadas fluoróforos, as quais quando iluminadas por uma fonte de luz, emitem radiação na forma de luz. Uma de suas vantagens é a resposta rápida e possibilidade de coleta de informações em tempo real, por meio de equipamentos que não utilizam radiação ionizante. A fluorescência pode ser utilizada para detecção de múltiplas alterações nos tecidos duros dentais, tais como: manchas, presença bacteriana e presença de desmineralização (CABRAL, 2006). Neste Projeto foi utilizado um Sistema de Imagem por Fluorescência (SIF), desenvolvido em cooperação com o Prof. Emery C. C. Lins da Universidade Federal de Pernambuco, de tal forma que fosse possível avaliar a efetividade deste sistema para detecção de lesões de cárie.

A Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) vem sendo amplamente aplicada para análise de materiais orgânicos, permitindo identificar os componentes químicos da amostra, além de fornecer informações estruturais do material (RABELO *et al.*, 2010). A técnica de FTIR que utiliza o efeito da reflexão atenuada (ATR) é indicada para análise de amostras, independentemente de sua espessura, por possibilitar a aquisição de espectros qualitativos (SILERSTEIN; WEBTER, 2005). Este equipamento pode ser utilizado para diversas finalidades, seja para caracterizar tecido dental duro irradiado (BACHMAN; DIEBOLDER, 2007), para diferenciar tecido saudáveis dos tecidos cancerígenos (BOSKEY; MENDELSON, 2005) ou para avaliar a perda mineral devido a desmineralização local (BRITO, 2014). Contudo, ainda se trata de uma técnica relativamente nova e que possui diversas aplicabilidades que podem ser exploradas (BOSKEY; CAMACHO, 2007).

A Tomografia por Coerência Óptica, do inglês *Optical Coherence Tomography*

(OCT), trata-se de uma técnica não invasiva para obtenção de imagens transversais e estruturais de superfícies, através métodos ópticos e sem utilizar radiação ionizante (raios-x). Atualmente, diversos estudos vem sendo feitos para elaborar metodologias de análise de imagens e verificar a aplicabilidade do OCT na Odontologia para diagnosticar cárie e erosão dentária (KO et al., 2005; PEREIRA, 2014; CABRAL, 2006; MORAES, 2012; OLIVEIRA, 2011; FRIED; XIE, 2002).

Considerando que ainda estão sendo realizados estudos para verificar a aplicabilidade dos fitoterápicos para de paralisar a progressão das lesões de cáries incipientes, torna-se importante avaliar a eficácia do uso de extratos da *Vitis vinífera* e da *Camellia sinensis* para este fim, além de verificar se as técnicas de Imageamento por Fluorescência e Tomografia por Coerência Óptica são alternativas validas para realizar o diagnóstico precoce da lesão e para acompanhar sua progressão

2. Objetivos

Em virtude da grande prevalência de lesões incipientes de cárie radicular, e da necessidade de paralização e diagnóstico precoce das mesmas, este estudo teve como objetivo avaliar novos métodos de prevenção e monitoramento de lesões incipientes de cárie radicular.

Os objetivos secundários deste estudo foram:

1 - Avaliar a eficácia de dois extratos que possuem agentes fitoterápicos compostos de uva (*Vitis vinífera*) e de chá verde (*Camellia sinensis*) no controle da progressão de lesões incipientes de cárie radicular;

2 - Avaliar se as técnicas de imageamento por fluorescência e tomografia por coerência óptica são efetivas na determinação do surgimento e no monitoramento da progressão destas lesões.

3. Revisão da Literatura

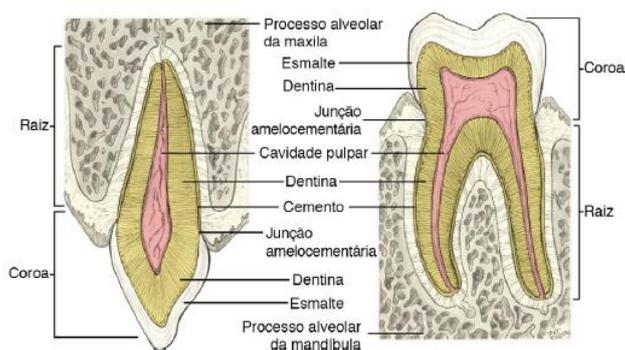
Neste capítulo, procurou-se fazer uma descrição dos tecidos duros dentais, com destaque para a dentina, e da etiologia da cárie e suas formas de prevenção. A literatura foi revisada com relação aos efeitos dos fitoterápicos *Vitis vinífera* e *Camellia sinensis* (semente de uva e chá verde, respectivamente) na progressão de cáries incipientes. Considerações foram feitas a respeito das técnicas ópticas (Fluorescência, Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier e Tomografia por Coerência Óptica) para análise composicional e estrutural da dentina.

3.1 Tecidos duros dentários

3.1.1 Estrutura anatômica do dente

De modo geral, o dente pode ser dividido em duas partes, a coroa representada pela parte visível e mais externa, e a raiz, representada pela parte oculta na gengiva (CABRAL, 2006; MADEIRA; RIZZOLO, 2016). Pode-se dizer que a coroa possui dentina recoberta por esmalte dental e que a raiz possui dentina recoberta por cimento. A parte mais interna da dentina recobre a chamada cavidade pulpar do dente. A região de encontro entre o esmalte da coroa e o cimento da raiz é denominado junção amelocementária (JAC) (BALOGH-BATH; FEHRENBACH, 2012). A polpa dental é a parte interna da coroa e que faz a comunicação com o organismo pelo canal radicular. O periodonto trata-se da unidade funcional, composta pela gengiva, cimento, ligamento periodontal e osso alveolar, sendo estes responsáveis por realizar a inserção do dente na mandíbula (MADEIRA; RIZZOLO, 2016). Na Figura 2 está representado um dente molar.

Figura 2: Tecidos associados aos dentes posteriores e inferiores.



Fonte: (BALOGH-BATH; FEHRENBACH, 2012).

O esmalte do dente pode ser caracterizado como um tecido altamente mineralizado, duro, friável, inerte, acelular, avascular, que recobre o dente e fornece proteção a coroa dentária (NANCI, 2013). A formação do esmalte é controlada por células chamadas ameloblastos e o processo ocorre em duas principais fases: fase de secreção e fase de maturação. Na primeira ocorre a secreção de proteínas da matriz do esmalte (amelogenina, ameloblastina e enamelinina), já na segunda fase ocorre a remoção do material orgânico e uma deposição de fosfato de cálcio (BERKOVITZ *et al.*, 2004).

Por sua vez, a dentina é a parte mineralizada do complexo dentina-polpa, que delimita a câmara central pulpar e o canal radicular (NANCI, 2013). A formação da dentina ocorre por células denominadas odontoblastos, as quais são responsáveis por secretar a matriz orgânica, formada por fibras de colágeno do tipo I e uma substância fundamental amorfa. A matriz inorgânica da dentina é constituída, em sua grande maioria, por hidroxiapatita, porém em uma concentração mais baixa que a do esmalte (BERKOVITZ *et al.*, 2004). Devido à alta quantidade de colágeno na dentina, ela sustenta o esmalte e consegue compensar sua característica friável (fragmentável) (NANCI, 2013).

Os tecidos duros dentais, de forma geral, possuem características composicionais e estruturais que permitem ao dente fornecer resistência química a ácidos provenientes da dieta e produzidos por microrganismos cariogênicos. Alterações em sua composição ou estrutura podem deixá-los frágeis, e até comprometer sua funcionalidade (NANCI, 2013).

3.1.2 Composição química do dente

Em suma, os tecidos duros dentais são constituídos por matriz inorgânica, matriz orgânica e água. Dentre eles, é observado uma diferença na quantidade e disposição de cada componente. Na Tabela 1 é possível observar a porcentagem em volume e peso para a dentina e para o esmalte.

Tabela 1: Percentual em volume e peso da composição química da dentina e do esmalte.

	Dentina		Esmalte	
	% em volume	% em peso	% em volume	% em peso
Matriz Inorgânica	48	69	92	97
Matriz Orgânica	29	20	2	1
Água	23	11	6	2

Fonte: (FEJERSKOV; KIDD, 2005; ZECELL; BACHMANN, 2005).

A matriz inorgânica consiste essencialmente por fosfato de cálcio e está presente no esmalte, na dentina, no cimento, no osso, em cálculo dental e diversas calcificações. São minerais compostos por íons de cálcio (Ca^{2+}), ortofosfatos (PO_4^{3-}), metafosfatos/pirofosfatos ($\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$), podendo conter hidrogênio (H^+) e hidroxila (OH^-) (RABELO, 2009; LEGEROS, 1999).

Durante o desenvolvimento dos tecidos, no pH 7,4 dos fluidos tissulares, a hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) é o mineral mais estável e, por este motivo, ocorre sua deposição nesta fase. No entanto, quando ocorre a erupção dentária, a apatita presente na porção externa do esmalte e da dentina fica sujeita a uma grande variação de pH devido a dieta e pela presença do biofilme (FEJERSKOV; KIDD, 2005). Desta forma, de acordo com o pH local, outras três formas de fosfato de cálcio podem precipitar como cristais separados ou podem recobrir os componentes minerais da dentina e do esmalte, e isso se deve a maior estabilidade de cada cristal a um diferente valor de pH. Para valores de pH acima de 4,3 a hidroxiapatita é estável, porém, devido à presença de íons de flúor e magnésio, pode ocorrer a formação de outras formas mais estáveis, como o fosfato tricálcio ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) e a fluorapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$) (FEJERSKOV; KIDD, 2005; RABELO, 2009).

As apatitas biológicas geralmente formam cristais com formato de agulha ou de placa, no entanto a célula unitária da hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) apresenta conformação hexagonal quando em conjunto, formando uma trama estrutural de cristal. Cada trama estrutural é composta pela parte interna do cristal, pela superfície do cristal e pela capa de hidratação. Nessas estruturas podem ser observados diferentes íons substituintes, os quais ficam adsorvidos por atração eletrostática ou associados de certa forma a capa de hidratação, assim alterando a rede cristalina e suas propriedades cristalográficas (FEJERSKOV; KIDD, 2005; NANCI, 2013; RABELO, 2009).

As apatitas biológicas geralmente são deficitárias de cálcio, o que leva a inclusão de íons carbonato, sódio, flúor, magnésio, potássio, cloro, cobre, e outros, fazendo com que se torne uma composição impura deste mineral. Na grande maioria dos casos, o íon substituinte é o carbonato, formando assim a hidroxiapatita carbonatada ($(\text{Ca},\text{Mg},\text{Na},\text{X})_{10}(\text{PO}_4,\text{HPO}_4,\text{CO}_3)_6(\text{OH},\text{Cl})_2$), onde X equivale a inclusão de outros íons (ANA, 2007). Esse padrão de variabilidade iônica é usado como artifício para

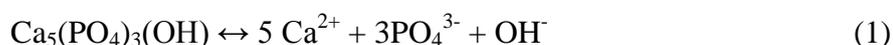
alterar a estrutura dos cristais através de uma exposição a um meio rico em fluoreto (FEJERSKOV; KIDD, 2005; RABELO, 2009).

Estas alterações na composição cristalina provocam efeito na solubilidade, uma vez que alteram a dimensão dos cristais (ANA, 2007; RABELO, 2009). A literatura aponta que a presença do íon CO_3^{2-} é o principal causador de distorções na rede cristalina devido a criação de microstressés e defeitos, influenciando assim na solubilidade do cristal (RABELO, 2009). Vale a pena ressaltar que o carbonato é o principal íon perdido no processo de desmineralização, sendo assim excluído em partes do processo de remineralização (ANA, 2007; RABELO, 2009).

A incorporação de flúor nos cristais promove um aumento na espessura e no tamanho dos cristais, além de acarretar uma menor deficiência de cálcio e a uma menor solubilidade (FEJERSKOV; KIDD, 2005; ANA, 2007; RABELO, 2009).

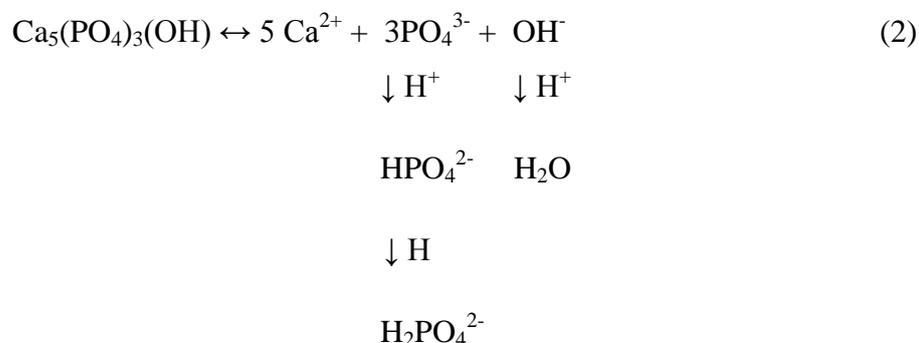
A solubilidade pode ser descrita como uma determinada quantidade de sólido que se dissolve por unidade de volume de solução. A dissolução em água pura geralmente ocorre de forma rápida, mas à medida que os íons constituintes dos cristais são liberados e se acumulam na solução, a solubilidade vai diminuindo, até que ocorra a dissolução total deste sólido e diz que a solução está saturada para o mineral. Lembrando que apesar da solução estar saturada, ainda ocorre a troca lenta entre a solução e o cristal (RABELO, 2009).

Levando-se em consideração o princípio do produto de solubilidade (constante a uma dada temperatura), foi determinado para a hidroxiapatita que quando uma unidade de massa do sólido é dissolvida, são liberados cinco íons cálcio, três íons fosfato trivalentes, além de uma hidroxila, conforme a equação química abaixo (1) (RABELO, 2009):



A solubilidade da hidroxiapatita e de outros fosfatos de cálcio são altamente afetados pelo valor de pH da água em que serão dissolvidos. Observa-se que conforme os íons PO_4^{3-} e OH^- somados aos íons Ca^{2+} se depositam na solução e a tornam saturada, a dissolução da hidroxiapatita é cessada. Porém, caso um ácido seja adicionado ao meio, os íons PO_4^{3-} e OH^- irão combinar-se com os íons H^+ do ácido, formando HPO_4^{2-} e H_2O ,

retirando assim uma porção destes íons da solução, conforme a equação química (2) (RABELO, 2009).



É importante lembrar que caso ocorra um excesso de íons na solução de dissolução, menos de outros íons serão liberados, uma vez que o valor de solubilidade é constante para uma determinada temperatura. Isto explica o porquê da maior solubilidade da hidroxiapatita quando um agente de ligação (a exemplo dos ácidos) é adicionado a solução, uma vez que os íons Ca^{2+} serão retirados do meio e acarretará a uma contínua dissolução da hidroxiapatita (FEJERSKOV; KIDD, 2005).

Sob parâmetros e condições adequadas, novos cristais de hidroxiapatita podem precipitar da solução e/ou pequenos cristais podem crescer em espessura e tamanho. Para tal, a solução deve estar supersaturada para hidroxiapatita ou deve ocorrer um aumento do pH, o que levará a uma maior concentração de PO_4^{3-} e OH^- . Contudo as soluções supersaturadas são instáveis e com a formação de um cristal, poderá ocorrer a formação de novos cristais até que a solução volte a ficar saturada. Por este princípio é possível explicar o processo de remineralização de uma superfície de lesão cariosa (FEJERSKOV; KIDD, 2005).

Considerando o ambiente bucal, os cristais de hidroxiapatita do esmalte e da dentina são dissolvidos devido à presença de ácidos advindos da dieta, gástricos, advindos do biofilme ou até mesmo medicinais, uma vez que a saliva e os fluidos orais tornam-se insaturados, devido a ligação dos íons liberados na dissolução com os íons H^+ provenientes da dissociação do ácido. Na maior parte do tempo a saliva encontra-se supersaturada em relação a hidroxiapatita e para os demais cristais nativos da dentina e do esmalte e, por este motivo, os tecidos duros dos dentes não se dissolvem constantemente sob parâmetros e condições normais, a não ser em casos de o ambiente

estiver acidificado (geralmente ocasionado pela presença de biofilme bacteriano) (FEJERSKOV; KIDD, 2005).

3.1.3 Dentina

Diferentemente do esmalte que é um tecido avascular e acelular e não responde às injúrias externas, a dentina é formada por células (odontoblastos) e faz parte do complexo dentino-pulpar, caracterizando-se como um tecido vivo que consegue responder as injúrias externas (HUANG, 2011). Trata-se de um tecido denso, elástico, duro, avascular, mas que apresenta certa sensibilidade devido à presença de túbulos agrupados, os quais são compostos pelos prolongamentos dos odontoblastos. O corpo dos odontoblastos encontram-se dispostos de forma alinhada ao longo da superfície interna da dentina, formando os limites periféricos da polpa dentária, proporcionando a capacidade da dentina de passar por reparos (NANCI. 2013).

Os túbulos dentinários são pequenos canalículos que são preenchidos pelos prolongamentos dos odontoblastos e por fluídos, que ligam a camada da dentina da polpa com a junção do esmalte, permitindo que ocorra a difusão de nutrientes pela dentina através desta rede. A extremidade pulpar apresenta um diâmetro maior e segue um trajeto retilíneo e cheio de ramificações na dentina radicular, já na dentina coronal apresentam formato de S e estão dispostos em aglomerados. Sua disposição está diretamente relacionada com o trajeto percorrido pelos odontoblastos no processo de dentinogênese (NANCI. 2013).

A dentina peritubular delimita os túbulos e é mais calcificada e com menor quantidade de colágeno. A dentina intertubular (localizada entre os túbulos) é formada por uma rede de fibras de colágeno fortemente entrelaçadas e é onde os cristais de apatita ficam depositados. Estas fibras estão dispostas de forma aleatória em um plano quase que perpendicular aos túbulos. Por sua vez, a dentina interglobular é composta por uma região de calcificação deficiente e está presente principalmente na coroa de pessoas que, por algum motivo, tiveram deficiência de vitamina D ou que foram expostos a elevadas quantidades de fluoreto no processo de formação da dentina (NANCI. 2013).

Esta característica tubular da dentina é de suma importância para elevar seu grau de permeabilidade, porém isso também pode levar a uma intensificação do processo

carioso, já que as bactérias do biofilme podem se depositar nestes espaços dos túbulos. A dentina terciária (dentina de reparação) possui a capacidade de vedar os túbulos em sua extremidade pulpar, em casos de desintegração ou retração dos prolongamentos dos odontoblastos, protegendo a polpa de infecções (NANCI, 2013).

A parte mineral da dentina é composta por pequenos cristalitos de hidroxiapatita hexagonais, na forma de placas uniformes (3-30 nm de corte transversal e aproximadamente 50 nm de comprimento), localizadas no interior, na periferia e entre as fibras de colágeno. Essa conformação em forma de placas resulta em uma maior área superficial, deixando a fase mineral mais reativa. No esmalte os cristalitos são mais extensos e possuem uma área superficial menor, deixando-os menos reativos (FEJERSKOV; KIDD, 2005). Essa característica mais reativa da dentina, leva a uma maior quantidade de íons diferentes de cálcio, fosfato e hidroxila na sua composição, tornando a hidroxiapatita carbonatada da dentina mais solúvel quando exposta meio oral (FEJERSKOV; KIDD, 2005; NANCI, 2013).

A parte orgânica da dentina é composta por cerca de 90% de colágeno, com destaque para o tipo I e menores quantidades dos tipos III e V, além inclusões fracionais de outras proteínas e lipídios da matriz (NANCI, 2013). Este colágeno do tipo I funciona como uma espécie de arcabouço que dispõe uma boa parte do mineral da dentina nos poros e orifícios das fibras. As proteínas não colagênicas ficam dispostas nos espaços existentes entre as fibras de colágeno e ficam acumuladas pela periferia dos túbulos dentinários. Estas proteínas não colagênicas podem funcionar como inibidoras, estabilizadoras e/ou promotoras na deposição de minerais, sendo que sua atuação varia conforme sua localização (FEJERSKOV; KIDD, 2005; NANCI, 2013).

A estrutura da matriz de colágeno no dente encontra-se em formato de tripla hélice, com 300 nm de comprimento e 1,5 nm de diâmetro, aproximadamente (NANCI, 2013). Se dispõe de forma bem estruturada com três cadeias polipeptídicas entrelaçadas, unindo os cristalinos de apatita, com alguns podendo estar precipitados dentro da estrutura da hélice. Existem também vários outros componentes não colágenos que influenciam na propriedade da matriz. A exemplo pode-se citar as fosforoproteínas, fosfolipídeos e as proteoglicanas, que atuam como nucleadores e controlam a formação do mineral durante o processo de dentiogênese (NANCI, 2013).

É possível dizer que a cadeia de colágeno e os cristalitos de apatita possuem uma relação de sinergismo ou mútua proteção, já que a parte mineral só pode ser dissolvida perante uma forma de ataque ácido e a parte orgânica fica protegida frente ao ataque

enzimático das proteinases, uma vez que os cristalitos de apatita protegem a matriz de colágeno (NANCI, 2013). Essa estrutura interligada da matriz de colágeno com os cristalitos de apatita faz com que haja a necessidade eventos químicos somados a ações proteolíticas, por parte dos microrganismos que compõe o biofilme, para que ocorra a remoção da matriz colagenosa no processo de progressão de uma lesão de cárie (FEJERSKOV; KIDD, 2005; NANCI, 2013).

A dentina é recoberta pelo cimento, tecido conjuntivo mineralizado e avascular firmemente preso a dentina, composto por matriz de colágeno e hidroxiapatita (NANCI, 2013). Em casos de retração gengival ou cirurgia periodontal, ocorre a exposição da raiz, perdendo a proteção do sob o cimento. Como o cimento apresenta baixa resistência, quando exposto ele acaba sendo removido pela escovação. Neste caso, a dentina radicular e/ou o cimento ficam expostos ao meio oral e susceptíveis aos processos de desenvolvimento da cárie (FEJERSKOV; KIDD, 2005; NANCI, 2013).

Na dentina, o desenvolvimento da lesão de cárie ocorre de forma mais rápida, devido a sua menor mineralização, pela presença de cristalinos menores e mais reativos, devido a sua característica tubular e pela necessidade da presença do flúor para sofrer remineralização. A cárie quando desenvolvida nessa região, é denominada cárie radicular (FEJERSKOV; KIDD, 2005; NANCI, 2013).

Vale a pena ressaltar que quando *in vivo*, a polpa do dente irá responder a boa parte dos estímulos provenientes do processo cariioso, realizando a produção de dentina e deposição de minerais dentro dos túbulos dentinários, fato que não ocorre no processo *in situ*. Desta forma, esse poder de resposta faz com que a taxa de progressão da lesão de cárie seja menor quando *in vivo* (FEJERSKOV; KIDD, 2005). Contudo, essa proteção pode não ser eficaz o suficiente ou rápida o bastante para proteger a dentina destes processos.

3.2 Etiologia da cárie

A cárie nada mais é do que o resultado da dissolução química da estrutura dentária causada pela produção de ácidos pela microbiota cariogênica (biofilme), levando a perda de cálcio e fosfato nos tecidos mineralizados da dentina, esmalte e cimento (FEJERSKOV; KIDD, 2005). Trata-se de uma doença infecciosa, multifatorial e dinâmica e os 4 principais fatores que determinam seu desenvolvimento são (FEJERSKOV; KIDD, 2005):

- 1) Presença de bactérias acidogênicas na região dos dentes (biofilme);
- 2) Presença do substrato com nutrientes (açúcares fermentáveis de baixo peso molecular), geralmente advindos da dieta;
- 3) Hospedeiro susceptível ao desenvolvimento da lesão;
- 4) Tempo de interação entre os fatores.

Vale lembrar que fatores socioeconômicos e o estresse do hospedeiro também contribuem para o desenvolvimento e progressão da lesão, pois estes estão diretamente relacionados com fatores externos que podem influenciar no desenvolvimento da lesão, a exemplo da higienização adequada e dieta (FEJERSKOV; KIDD, 2005; FEATHERSTONE, 2000; WINSTON; BHASKAR, 1998).

Com a adsorção de proteínas, lipídeos e fluídos gengivais sobre a superfície do tecido duro dos dentes, é formada uma camada proteínica com cerca de 1 a 10 μm de espessura. Esta camada torna-se um ambiente propício para a colonização de bactérias específicas, inicialmente pelas bactérias *Streptococcus actinomyces* e algumas bactérias Gram-negativas. Com o aumento e espessamento deste biofilme inicial, a concentração de oxigênio local cai e o meio torna-se propício para adesão e proliferação de novas bactérias, as quais são capazes de sobreviver em ambientes ácidos, a exemplo das bactérias *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* e *Lactobacillus* (SHEN *et al.*, 2004). Na grande maioria dos casos, o biofilme é formado nas regiões próximas à gengiva e na região dos sulcos e fissuras da superfície oclusal dos dentes (FEJERSKOV; KIDD, 2005).

As bactérias *S.mutans* produzem enzimas denominadas glicosiltransferases que, através de sua ação na sacarose, são capazes de produzir polissacarídeos insolúveis, este produto irá facilitar a aderência de bactérias em superfícies lisas. A sacarose também serve como uma reserva energética para multiplicação e proliferação destas bactérias. Nesta região a concentração de cálcio, fosfato e flúor é menor e acaba por dificultar o processo de remineralização dentária (CURY, 2001).

Há vários anos pesquisas vem sendo realizadas para verificar e comprovar o uso de agentes químicos no combate ao desenvolvimento do biofilme (FEJERSKOV; KIDD, 2005). Desta forma, tem-se sugerido o uso do digluconato de clorexidina, por sua capacidade de reduzir a formação da placa bacteriana, ou até mesmo deste agente trabalhando em sinergia com o flúor para controlar o desenvolvimento da cárie (CURY, 2001; TEM CATE, 2009). De forma simplificada, o flúor teria por função diminuir o pH crítico e o digluconato de clorexidina atuaria como agente antimicrobiano (TEM

CATE, 2009). Entretanto o uso da clorexidina é questionável, pois pode apresentar resultados transitórios e pode causar na morte de organismos benígnos para a microbiota bucal (FEJERSKOV; KIDD, 2005; ANA, 2007; ZHANG *et al.*, 2006).

Resumidamente, os processos bioquímicos envolvidos no desenvolvimento da cárie consistem na metabolização dos açúcares de baixo peso molecular (sacarose, frutose, maltose, lactose) pelas bactérias do biofilme, formando os ácidos orgânicos. Estes ácidos irão dissociar-se em íons hidrogênio (H^+) e serão difundidos para o interior do dente e, desta forma, podendo interagir com componentes básicos da saliva. Com esse aumento da concentração de H^+ , ocorre a queda do pH bucal e, caso esse valor atinja o pH crítico, o meio tornar-se insaturado para hidroxiapatita, fazendo com que haja a liberação de íons fosfato e cálcio pelo esmalte e pela dentina (CURY, 2001; ANA, 2007). O pH crítico pode ser descrito como o valor no qual a saliva fica saturada se comparado com a apatita do dente, é sabido que para o esmalte seu valor é de 5,5 e para a dentina de 6,5 (FEJERSKOV; KIDD, 2005). Quando a saliva atinge valores abaixo do pH crítico, a saliva torna-se subsaturada em relação a dentina. Neste caso os íons fosfato (PO_4^{3-}) da dentina ligam-se aos íons H^+ da saliva, formando HPO_4^{2-} e $H_2PO_4^{2-}$, os quais podem dissociar-se novamente. Com a queda contínua do pH, o meio torna-se solúvel para os fosfatos, levando a uma perda contínua deste íon pela superfície do dente até que a solução volte a ficar saturada (MARTHALER, 2004; FEJERSKOV; KIDD, 2005; ANA, 2007).

Vale ressaltar que nos fluidos orais e na saliva há uma quantidade considerável de cálcio e fosfato e que em condições fisiológicas adequadas, eles encontram-se supersaturados em relação a hidroxiapatita e fluorapatita do dente (FEJERSKOV; KIDD, 2005). Quando o pH bucal fica acima dos valores do pH crítico devido à ação tampão da saliva, isto permitirá que ocorra uma reposição dos minerais perdidos pelo esmalte e pela dentina durante a desmineralização. No entanto, a atividade tamponante da saliva não é totalmente eficiente e alguns íons podem se distanciar da região afetada pela desmineralização, não estando disponíveis para uma reposição. Este desbalanceamento nas taxas de desmineralização e remineralização do dente, provoca perdas progressivas de material mineral pelo esmalte e pela dentina até que o caso clínico se torne visível, com o aparecimento de manchas brancas e cavitações no esmalte e manchas amareladas amolecidas na dentina (MARTHALER, 2004; FEJERSKOV; KIDD, 2005; ANA, 2007).

Como já dito anteriormente, o cimento e a dentina são formados por cristais de hidroxiapatita menores e mais reativos e com a queda do pH o processo cariioso se desenvolve mais rapidamente. Este motivo explica a grande necessidade de desenvolver metodologias que previnam a formação ou a progressão da cárie nestes tecidos.

3.3 Papel do flúor no combate a cárie

É sabido que o desenvolvimento da cárie decorre da formação do biofilme sobre os dentes e da ingestão frequente de açúcar, sendo as principais medidas preventivas o controle periódico da placa dental bacteriana e o consumo controlado de carboidratos fermentáveis. A aplicação de flúor tem se tornado o método preventivo de maior impacto, embora seu uso não impeça o desenvolvimento da lesão e sim a sua progressão (CURY, 2001). Estudos comprovam que a aplicação tópica do flúor deva apresentar uma certa periodicidade para que seja possível modificar as propriedades do esmalte e da dentina, de tal forma que o efeito anti-cárie seja mantido (TENUTA; CURY, 2010; CLARKSON; LOUGHLIN, 2000).

Durante vários anos, grande enfoque foi dado no desenvolvimento de uma estratégia que pudesse alterar a estrutura cristalina dos dentes, para que fossem mais resistentes aos desafios do meio ambiente. O fosfato e o flúor apresentam propriedades antagônicas, uma vez que durante a desmineralização e remineralização estes compostos saem e entram naturalmente na estrutura dos dentes e, por este motivo, ainda despertam grande atenção dos pesquisadores (CURY, 2001).

O termo flúor vem sendo usado como uma forma genérica para definir as formas deste composto, sendo elas: química iônica (fluoreto), ionizável (monofluorofosfato de sódio – MPF) e a forma não ionizável (ligado covalentemente). Pode ser utilizado na forma de géis, espumas, dentifrícios, bochechos e alguns vernizes fluoretados. Sua atuação visa diminuir a solubilidade dos tecidos minerais bucais, através de sua incorporação para formar apatita fluoretada no processo de remineralização (CURY, 2001). Desta forma, vale lembrar que ele não evita o aparecimento da lesão e sim paralisa a progressão de cáries incipientes. Seu efeito pode ser parcial e há a necessidade de uma aplicação periódica dos compostos (CLARKSON; LOUGHLIN, 2000).

Há algum tempo predominou o conceito de que quando incorporado à estrutura cristalina do dente formava a fluorapatita (FA), sendo esta menos solúvel que a

hidroxiapatita (HA), assim explicando o aconselhamento a ingestão de água fluoretada e o uso de flúor sistêmico. Contudo, quando o flúor é ingerido durante o processo de formação dos dentes, ocorre a incorporação de apenas 10% na substituição de HA por FA. Neste aspecto, é considerado que não ocorre a formação de FA e sim de apatita fluoretada (AF) (CURY, 2001).

O conceito de pH crítico está relacionado com a capacidade da saliva em proteger a estrutura mineral dos dentes, por ela apresentar cálcio e fosfato na sua composição. Porém, essa capacidade é altamente dependente do pH, onde variações de pH advindas da dieta ou da conversão dos açúcares fermentáveis em ácido pela placa dental, irão determinar esse limite da capacidade da saliva em proteger o dente e lembrando que a dentina é muito mais sensível a variação de pH do que o esmalte. Considerando que nos dias atuais a população está exposta ao flúor, vale ressaltar que sua presença na saliva altera as propriedades físico-químicas em relação ao pH crítico para dissolução dos dentes (CURY, 2001).

Na Tabela 2 é possível observar as relações existentes entre o pH do meio e a presença ou ausência de flúor na composição da saliva, o efeito na estrutura mineral dos dentes e as possíveis consequências clínicas para o esmalte e a dentina (CURY, 2001). Vale destacar que enquanto o pH crítico para o esmalte é de 5,5 para a dentina o valor é de 6,5, demonstrando que esta é menos resistente a variações de pH que o esmalte. Outro aspecto que deve ser enfatizado é que o pH crítico não pode ser considerado o mesmo quando há ou não a presença de flúor no meio bucal. Analisando os valores para a dentina, percebe-se que com a ingestão de água fluoretada e com o uso de dentifício fluoretado regularmente, o pH só será crítico para a dentina quando estiver na faixa de $5,5 > 4,5$, enquanto que caso esses compostos fluoretados não estivessem sendo utilizados seu valor estaria na faixa de $6,6 > 5,5$. É importante ressaltar que a presença de flúor não evita a dissolução de HA ou FA, porém ocorre uma reposição de cálcio e fosfato na forma de FA superficialmente (CURY, 2001).

Tabela 2: Consequências para a dentina e esmalte quanto alterações no pH do meio, presença ou ausência de flúor e efeitos físico-químicos relacionados.

pH	Flúor no meio	Efeito Físico-Químico para			Consequências		
		Dissolução de minerais mais solúveis *	Dissolução de HAP e AF	Formação de FA	Dissolução de FA	Esmalte	Dentina
7,0	Não	Não	Não	Não	Não	Re	Re
7,0	Sim	Não	Não	Sim	Não	Re+	Re+
<6,6>5,5	Não	Sim	Não	Não	Não	Re	Des
<6,6>5,5	Sim	Sim	Não	Sim	Não	Re+	Des-
<5,5>4,5	Não	Sim	Sim	Não	Não	Des	Des+
<5,5>4,5	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Des-	Des
<4,5	Indiferente	Sim	Sim	Não	Sim	Cárie aguda/erosão	

*Apatita Carbonatada e fosfato amorfo, Re = Remineralização; Re+ = Remineralização ativada; Des = Desmineralização; Des- = Desmineralização reduzida; Des+ = Desmineralização aumentada.

Fonte: (CURY, 2001).

Os três principais mecanismos de atuação do flúor são (CURY, 2001; ANA, 2007):

- 1) Inibir o processo de desmineralização, através da formação de cristais de fluoreto de cálcio (CaF_2), os quais ficam depositados na superfície e disponibilizam o íon fluoreto durante a desmineralização, além de alterar o pH crítico;
- 2) Potencializa a remineralização, por meio da formação de apatita fluoretada ou fluorapatita;
- 3) Inibe o metabolismo das bactérias do biofilme após sua difusão para o interior bacteriano, uma vez que a formação e dissociação de moléculas de ácido fluorídrico inibem as atividades de enzimas essenciais para bactéria (enalose que realiza a metabolização de carboidratos).

Com a exposição dos tecidos minerais ao flúor iônico, pode ocorrer sua adsorção na forma de cristais de fluoreto de cálcio (CaF_2), na forma de fluorapatita

(Ca₁₀(PO₄)₆F₂) ou na forma de fluorapatita carbonatada (Ca₁₀(PO₄)₆(OH)F) (CURY, 2001; FEJERSKOV; KIDD, 2005).

Os cristais de fluoreto de cálcio (CaF₂) apresentam lenta dissolução e alta retenção no meio bucal e atuam como um reservatório de flúor, o qual será posteriormente utilizado no processo de remineralização. Sua reação de precipitação está descrita na equação química (3) abaixo (FEJERSKOV; KIDD, 2005; ANA, 2007).



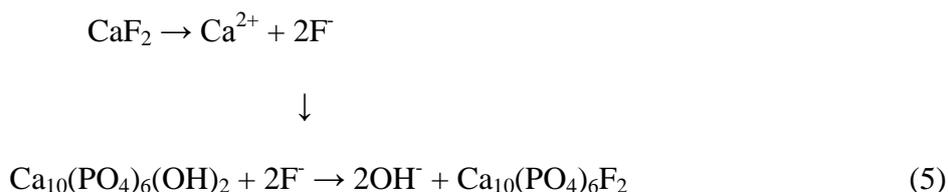
O flúor fosfato acidulado (FFA) é mais reativo que o neutro, porém apesar de haver uma tendência de formar mais fluoreto de cálcio em função do tempo e da frequência de aplicação, sabe-se que dentro do intervalo de 1 – 4 minutos, não há diferença de efeito (CURY, 2001).

A apatita fluoretada (AF) é formada quando a concentração de flúor é baixa e o meio está ácido (CURY, 2001). Abaixo pode ser observada a equação química (4) de formação da AF.



Após a formação da apatita fluoretada (AF), está ficara depositada nas camadas mais externas do esmalte e da dentina, somente sendo perdida após o desgaste ou dissolução de todo mineral. Seu processo de formação é lento e não acompanha o desgaste normal do dente, contudo o conteúdo de flúor na superfície dental aumenta no decorrer do tempo (CURY, 2001).

Por sua vez, a formação de fluorapatita (Ca₁₀(PO₄)₆F₂) trata-se do maior efeito preventivo no que está relacionado a aplicação do flúor, já que são cristais maiores, mais estáveis e menos solúveis que a hidroxiapatita. O processo de formação da fluorapatita está descrito na equação (5) abaixo (CURY, 2001; ANA, 2007).



Para que ocorra a formação de fluorapatita é necessário que os fluidos orais, a saliva e o fluido da placa bacteriana estejam supersaturados para este composto, ou seja, quando o pH está superior a 4,5. Para valores de pH abaixo de 4,5 o ambiente torna-se insaturado para a fluorapatita e para a fluoridroxiapatita, as quais acabam se dissolvendo (CURY, 2001; ANA, 2007). Quanto a sua solubilidade, a fluorapatita é menos solúvel se comparado com a apatita fluoretada, sendo esta menos solúvel que a hidroxiapatita carbonatada (RABELO, 2009).

3.4 Fitoterapia na Odontologia

Nos dias atuais, a principal forma utilizada para inibir a formação de placa dental é com o uso de compostos fluoretados; porém, quando utilizados em altas concentrações, podem desencadear efeitos colaterais, como por exemplo a fluorose, alterações no paladar, surgimento de manchas nos dentes, dentre outros (GEBRAN; GEBERT, 2002). Com isso, fica evidente a necessidade de desenvolver novos agentes químicos que possam proteger os dentes contra a formação da lesão de cárie.

De certa forma, as plantas sempre fizeram parte da vida dos seres humanos, seja para alimentação ou até mesmo para tratamento de enfermidades. Segundo dados da literatura, cerca de 40% dos medicamentos disponíveis no mercado foram elaborados e/ou produzidos com plantas naturais e, por este motivo, tem-se observado o amplo interesse no desenvolvimento de fitoterápicos pela indústria farmacêutica (MONTEIRO, 2014).

Os chamados “fitoterápicos” consistem de preparações vegetais padronizadas, as quais são compostas por misturas de uma ou mais substâncias presentes em diferentes espécies de planta (DI STASI, 2007). Estes compostos podem ser utilizados nas mais diversas formas, como cápsulas, comprimidos, pomadas, géis, soluções aquosas e infusões, também conhecidas como chás (FRANCISCO, 2010).

Muita atenção vem sendo dada para produção de medicamentos e compostos medicinais a base plantas naturais, tanto que na década de 70, a Organização Mundial da Saúde (OMS) criou o “Programa de Medicinas Tradicionais”. No Brasil, o Ministério da Saúde vê um potencial enorme no desenvolvimento de fitoterápicos, por possuir uma vasta variedade de espécies vegetais e por ter tecnologia para se obter a validação científica necessária. Além de que a probabilidade deste mercado crescer é enorme, visto que a comercialização destes produtos atrai o mercado consumidor, por se

tratarem de uma alternativa de baixo custo (BRASIL, 2006; PERUMALLA; HETTIARACHCHY, 2011).

No ano de 2008, o Conselho Federal de Odontologia (CFO) regulamentou o exercício da Fitoterapia no Brasil, contudo muitos profissionais odontológicos ainda possuem dúvidas a respeito do tema e evitam utilizar a fitoterapia como um método alternativo aos tradicionais. No entanto, diversas ações vêm sendo tomadas para mudar este cenário, como a formação de Conselhos, grupos de pesquisa e abertura de cursos de Pós-Graduação voltados para área (MONTEIRO, 2014).

O estudo com chás é importante para tentar comprovar se eles podem ser utilizados para inibir o crescimento bacteriano e sua aderência na superfície dental, assim reduzindo a produção de ácidos e alguns polissacarídeos extracelulares (FRANCISCO, 2010). Em um estudo realizado por Ditterich *et al.* (2007), foi avaliado a atividade antimicrobiana de alguns dentifrícios onde foram adicionados algum componente terapêutico, tais como: Sorriso Herbal® (própolis), Colgate Herbal® (camomila), Gessy® (extrato de juá), Malvatricin® anti placa e anti-tártaro (tintura de malva), Sorriso® (juá e própolis) e Paradontax® (tintura de mirra e camomila). Como resultado ele observou que o *Stafilococcus aureus* e a *Escherichia coli* apresentaram sensibilidade a estes dentifrícios e apresentou que para os microorganismos Gram-positivos e Gram-negativos a ação inibitória é similar.

A *Vitis vinífera* é considerada como uma das culturas de frutas que é mais cultivada em todo mundo (ADÁMEZ *et al.*; 2012). O extrato de semente de uva (Grape Seed Extract – GSE) é um subproduto derivado da semente de uva, o qual é extraído, seco e purificado para sua obtenção. Considera-se que possui propriedades terapêuticas e medicinais devido as altas taxas de concentração de compostos fenólicos em sua composição, onde incluem as proantocianidinas, as antocianinas, resveratrol, flavonóis e os ácidos fenólicos (DHILLON *et al.*, 2015). Na literatura é demonstrado que o extrato de semente de uva possui atividade antibacteriana contra diversos tipos de bactérias (ADÁMEZ *et al.*, 2012; JAYAPRAKASHA *et al.*, 2003; MIRKARIMI *et al.*, 2013), como a *Streptococcus mutans*, considerada como o principal agente causador da cárie (ADÁMEZ *et al.*; 2012).

A *Camellia sinensis*, popularmente conhecida como chá verde, é uma das bebidas estimulantes mais consumidas no mundo e, durante séculos, foi utilizada como um medicamento (DUARTE; MENARIM, 2006). O chá verde apresenta cerca de 30% os compostos fenólicos como seus principais componentes, a exemplo das

proantocianidinas, catequinas, as teaflavinas e os flavonoides (SCHIMITZ, 2005). Desta forma, o chá verde poderia ser considerado como uma alternativa no tratamento da progressão de lesão de cáries incipientes.

Dentro deste contexto, verifica-se que se faz necessário identificar as espécies de plantas que apresentem ação farmacológica comprovada ou que tenham alguma substância biologicamente ativa para produção de fitoterápicos de baixo custo e mais acessíveis para população.

3.4.1 *Camellia sinensis* (chá verde) e *Vitis vinifera* (semente de uva)

A *Camellia sinensis* é amplamente utilizada para produção de chás por seus efeitos emagrecedores, no tratamento e prevenção de doenças vasculares, como agente para diminuição do colesterol, além de trazer benefícios para cavidade oral (MORAES *et al.*, 2016).

Os chás são feitos através de uma infusão de folhas, flores e raízes e são ingeridos no mundo todo como alternativa aos tratamentos convencionais. Nas últimas décadas, grande atenção foi dedicada para realizar pesquisas com esta planta, já que possui propriedades antioxidantes, antimicrobianas e anticarcinogênicas (NISHIYAMA *et al.*, 2010). Seus chás podem ser classificados em 3 grandes tipos, dependendo do seu grau de fermentação, sendo eles: chá verde não fermentado (~20%), chá preto fermentado (~78%) e semifermentado chá oolong (~2%) (ARAGHIZADEH *et al.*, 2013).

Os polifenóis presentes no chá são responsáveis pelos efeitos na saúde das pessoas, com destaque para as protoantocianidinas, na estrutura de catequinas. Os 4 principais tipos deste polifenol são: Epigallocatequina-3-galato, Epigallocatequina, Epicatequina-3-galato e Epicatequina. Além dos polifenóis, este chá apresenta carotenoides, tocoferóis e vitamina C, que também apresentam caráter antioxidante (FERRAZZANO, 2009; ZHAO, 2014). Estudos recentes apontam que o consumo de chá verde pode acarretar a efeitos satisfatórios no controle e prevenção de cáries dentárias e no combate a erosão dentária (FERRAZZANO, 2009; NAROTZKI, 2011).

O extrato da *Vitis vinifera*, popularmente conhecida como semente da uva, pode ser obtida pelos subprodutos dos processos de fabricação do vinho e do suco de uva. Sabe-se que o extrato apresenta grande quantidade de compostos polifenólicos, em especial as protoantocianidinas em sua forma dimérica, trimérica, tetramérica, além de

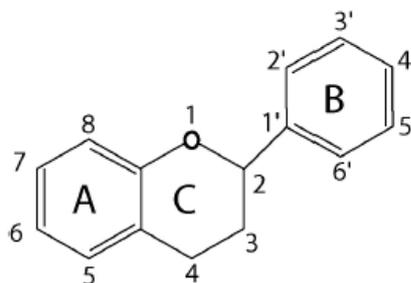
outras formas oligoméricas. Segundo a literatura, extratos da *Vitis vinifera* podem desencadear efeitos positivos em raízes artificiais cariadas, por promoverem uma estabilização nos tecidos compostos por colágeno, além de promoverem a remineralização do tecido (ZHAO, 2014).

Os flavonoides presentes na semente de uva incluem as flavona-3-ol incolores, a exemplo das catequinas, epicatequinas e seus ésteres constituídos por glucose e ácido galáctico, as flavonas coloridas (queratecina) e as antocianidinas azuis e vermelhas. Além destes, a semente da uva também é composta por ácidos fenólicos e compostos relacionados, sendo que os que se apresentam em maior abundância são: ácido cumárico, ferúlico, cafeico, clorogênico, neoclorogênico e os ácidos benzoicos (SHI; DI, 2000)

3.4.2 Forma de atuação da *Vitis vinifera* e da *Camellia sinensis* na dentina

Como já descrito anteriormente, a semente de uva e o chá verde são compostos que apresentam grande quantidade de compostos fenólicos e flavonóides em sua composição (DHILLON et al., 2015; SCHIMITZ, 2005). Os flavonóides são considerados polifenóis devido a sua estrutura química, composta por 15 átomos de carbono como parte do seu núcleo fundamental ($C_6 - C_3 - C_6$), sendo este formado por dois anéis aromáticos benzeno (indicados por A e B) ligados por um anel heterocíclico oxigenado do tipo pirona ou pirano (indicado por C) (WOLLGAST; PALLARONI, 2001). A estrutura química pode ser observada na Figura 3.

Figura 3: Estrutura química básica dos flavonóides.



Fonte: (WOLLGAST; PALLARONI, 2001).

Os flavonóides apresentam uma grande variedade de efeitos benéficos na saúde humana, incluindo ações anticarcinogênica, antioxidante, anti-trombótica, antiinflamatória, antimicrobiana, analgésica e dentre outras (WOLLGAST;

PALLARONI, 2001). Dentre os flavonóides de maior interesse encontram-se as proantocianidinas (PAs), e são encontradas em praticamente todo reino vegetal, mais especificamente nos vacúolos das células que compõem os tecidos das plantas (DIXON *et al.*, 2005).

As proantocianidinas (PAs) nada mais são do que oligômeros ou polímeros de unidades monoméricas de flavon-3-ol (DIXON *et al.*, 2005; IKEGAMI *et al.*, 2007). As PAs podem ser divididas em várias classes e o que irá definir isso é o padrão de hidroxilação (substituição) da molécula flavan-3-ol. Sua estrutura apresenta uma grande gama de variedade e não é dependente apenas do tipo do núcleo flavan-3-ol, mas também do seu grau de polimerização, além do tipo de radical que foi substituído e sua posição de substituição (DIXON *et al.*, 2005).

As proantocianidinas encontradas na semente de uva e no chá verde apresentam uma vasta gama de atividades farmacológicas e biológicas, incluindo sua função cardioprotetora, antiinflamatória, antioxidante, antitumoral e bactericida (DUARTE; MENARIM, 2006; BAGCHI *et al.*, 2003; SINGH; TYAGI, 2004)

Estes compostos são considerados *cross-linkers* (agentes formadores de ligações cruzadas) naturais e a propriedade que possuem para prevenção da progressão de cárie é sua capacidade de promover a fixação da matriz de colágeno da dentina, através da formação de novas ligações cruzadas (*cross-links*). A vantagem destes compostos para esta aplicação é que reagentes de ligações cruzadas como o glutaraldeído, o fomaldeído e componentes epóxi (*cross-linkers* sintéticos) apresentaram toxicidade e instabilidade com o tempo, limitando o seu uso *in vivo*. Entre as substâncias capazes de promover ligações cruzadas, ao mesmo tempo que apresentam biocompatibilidade e estabilidade com o tempo, estão as proantocianidinas (CASTELLAN, 2011; CASTELLAN, 2010; DELGADO; SCHEFFEL, 2015). Testes sobre a utilização de proantocianidinas em cáries dentais estão sendo feitos, pois estas substâncias apresentam propriedades antioxidantes no combate a este tipo de lesão. Sabe-se que as maçãs, cacau, cranberry, chá verde, bilberry e semente de uva apresentam grande quantidade de polifenóis em sua estrutura (JEON, 2011).

As proantocianidinas são capazes de promover ligações cruzadas, além de apresentarem biocompatibilidade e estabilidade, permitindo seu uso como agentes fitoterápicos (WALTER, 2008; CASTELLAN, 2010). Uma das características relevantes da proantocianidina é sua capacidade de promover melhorias mecânicas na dentina desmineralizada, aumentando sua rigidez e, conseqüentemente, diminuindo sua

degradação por enzimas específicas, tais como as que são ativadas durante o processo cariogênico (MMPs) (KERESKI, 2012).

A degradação contínua das fibras de colágeno expostas devido ao processo de desenvolvimento da cárie, é um dos principais fatores que contribuem para a progressão da lesão (NANCI, 2013). Sob determinadas condições clínicas, os fluidos salivares podem permear este colágeno que está exposto e sem proteção, permitindo que ocorra um ataque enzimático a estas fibras colágenas (GUO et al., 2008; KOSTORYZ; DHARMALA, 2009). Sabe-se que essa deterioração e remodelação das fibras de colágeno pode ser acelerada por certas enzimas proteolíticas endopeptidases, cálcio e zinco-dependentes, conhecidas como metaloproteinases de matriz (MMPs) e que estão presentes na saliva (TEZVERGIL-MUTLUAY; AGEE, 2010).

As enzimas MMPs são produzidas pelos odontoblastos em sua forma de pró-enzima inativa. As MMPs denominadas como gelatinases em sua forma dos tipos 2-MMP (Gelatinase A) e 9-MMP (Gelatinase B), e as colagenases em sua forma 8-MMP são responsáveis por deteriorar rapidamente o colágeno do tipo I (HANNAS; PEREIRA, 2007). O principal fator que promove a ativação destas pró-enzimas é o baixo valor de pH (VISSE; NAGASE, 2003; TJADERHANE *et al.*, 2013), a exemplo em casos de desmineralização da dentina.

Uma crescente frente de pesquisa vem sendo realizada para deixar o dente mais resistente a esse processo de degradação enzimática. Um possível meio de se obter essa biomodificação é através da aplicação de agentes capazes de formar ligações cruzadas (*cross-linkers*) no colágeno dentinário, desta forma melhorando suas propriedades mecânicas e deixando a dentina menos susceptível a degradação das proteases dentinárias (BEDRAN-RUSSO *et al.*, 2007).

Como já dito anteriormente as proantocianidinas (PA) são *cross-linkers* capazes de aumentar o número de ligações intra-moleculares, inter-moleculares e interfibrilares (SUNG *et al.*, 2003), que tornam o colágeno mais rígido e resistente a ação as metaloproteinases da matriz (MMPs) (SESEOGULLARI-DIRIHAN *et al.*, 2015). Além disso, estes agentes *cross-linkers* também podem inativar as MPPs (SCHEFFEL *et al.*, 2014).

Assim, a premissa deste projeto é que com o aumento da rigidez da matriz dentinária ocasionado pela aplicação de agentes *cross-linker*, permitiria que a as fibras de colágeno ficassem mais fortemente ligadas e dificultariam a perda de material

mineral no processo de progressão de cáries incipientes, ao mesmo tempo que dificultaria a ação das proteases MMPs.

3.5 Técnicas ópticas de para diagnóstico precoce e acompanhamento de lesões incipientes de cárie

3.5.1 Sistemas de Imagens por Fluorescência

Realizar um diagnóstico precoce da cárie permite que protocolos preventivos e tratamentos minimamente invasivos sejam planejados para ser o menos traumático possível para o paciente, de tal forma que não seja necessário realizar tratamentos onerosos ou invasivos (PINHEIRO, 2004). A Fluorescência Induzida por Luz (*Light Induced Fluorescence* – LIF) é considerada como uma proposta alternativa para detecção de cárie, por permitir uma quantificação de forma não invasiva (CABRAL, 2006).

O Sistema de Imageamento por Fluorescência (SIF) pode ser utilizado para este propósito pois tecidos duros respondem de forma diferente à luz, segundo sua composição química e estrutural. Além de se tratar de um processo não-invasivo e não destrutivo, apresenta vantagens sobre os procedimentos que utilizam raios-x, por não utilizar radiação ionizante. Basicamente, um Sistema de Imagem por Fluorescência (SIF) é composto por uma câmera científica CCD (Dispositivo de Carga Acoplada), uma lente objetiva, um sistema de iluminação que induza a fluorescência do material, um elemento para seleção espectral e um computador (LINS, 2009). Na análise das imagens busca-se avaliar as diferenças nas intensidades de fluorescência de uma amostra e um controle, utilizando alguns processamentos de imagens que possam melhorar a qualidade das imagens adquiridas, como por exemplo o uso de filtros ópticos (CABRAL, 2006).

A Fluorescência é um fenômeno óptico que consiste na absorção de energia por uma molécula em sua estrutura eletrônica, de tal forma que os elétrons passem de seu estado fundamental para o estado excitado, o qual é menos estável. Na busca por uma maior estabilidade eletrônica, esses elétrons excitados retornam para seu estado fundamental e liberam essa energia em excesso na forma de radiação. A quantidade de energia liberada é dependente da diferença de energia entre o estado excitado e o fundamental, sendo uma característica particular de cada molécula. Esta emissão de

energia tem duração de nanossegundos e pode ser utilizada para caracterizar a molécula (VO-DINH, 2003).

A literatura relata que a aquisição de imagens de fluorescência de amostras de dentes pode fornecer informações importantes sobre o processo de desenvolvimento da cárie (LINS, 2009; CABRAL, 2006). Este método para aquisição de imagem combina técnica de espectroscopia com aquisição de imagens digitais, as quais permitem realizar análises de sinais ópticos através das informações espaciais e espectrais (distribuição bidimensional de intensidades) (LINS, 2009).

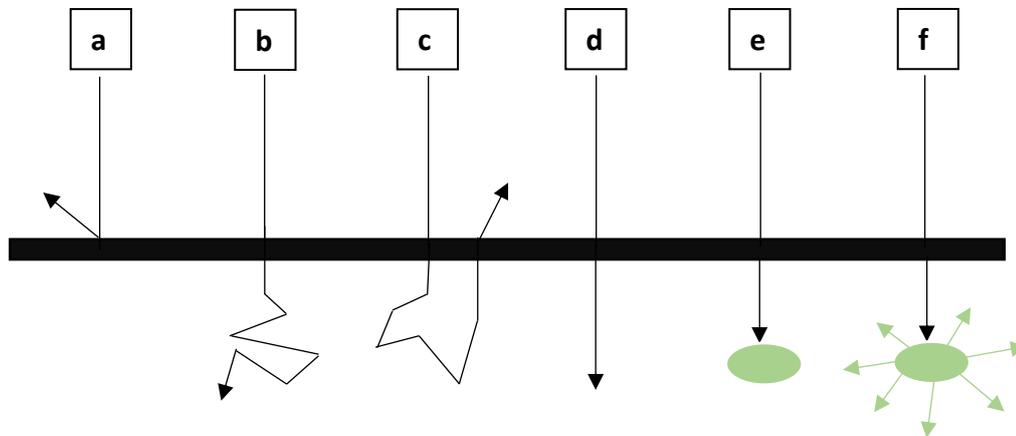
A combinação de efeitos colorimétricos intrínsecos e extrínsecos irá determinar a cor dos dentes. A cor intrínseca pode ser associada com as propriedades de absorção e reflexão da luz pelo material, já a cor extrínseca está relacionada com a absorção de determinados materiais corantes, a exemplo do café e do chá, na camada mais superficial do esmalte e da dentina (TEN BOSCH; COOPS 1995).

O dente transmite a luz em todas direções e a luz que chega aos olhos do observador é o resíduo da transmissão difusa que ocorre no interior do dente. Em outras palavras, a luz percorre trajetos irregulares através da estrutura dental até que emergja pela superfície (VAN DER BURGT *et al.*, 1990). Na dentina as características inerentes aos túbulos dentinários contribuem significativamente para dispersão da luz, enquanto que no esmalte verifica-se que esta propriedade está relacionada com os cristais de hidroxiapatita (VAARKAMP *et al.*, 1995).

Um estudo realizado com 28 dentes, nos quais foi removido o esmalte, confirmou que a cor do dente está fortemente relacionada com a cor da dentina e que o esmalte possui um papel secundário nesta característica, principalmente quando utilizado fontes de comprimento de onda azul (TEN BOSCH; COOPS 1995). Neste caso o esmalte se comporta como um objeto translúcido, onde durante a passagem da luz azul permite visualizar a dentina (CHU *et al.*, 2004).

Quando a luz encontra um tecido dentário, quatro fenômenos de interação podem ocorrer, sendo eles: (a) reflexão, (b) espalhamento, (c) retroespalhamento, (d) transmissão e (e) absorção. Caso ocorra o fenômeno de absorção pelo material, podem ocorrer dois mecanismos de decaimento: a emissão da fosforescência ou da fluorescência (f) (CABRAL, 2006; SKOOG *et al.*, 1998). Os fenômenos de interação estão representados na Figura 4.

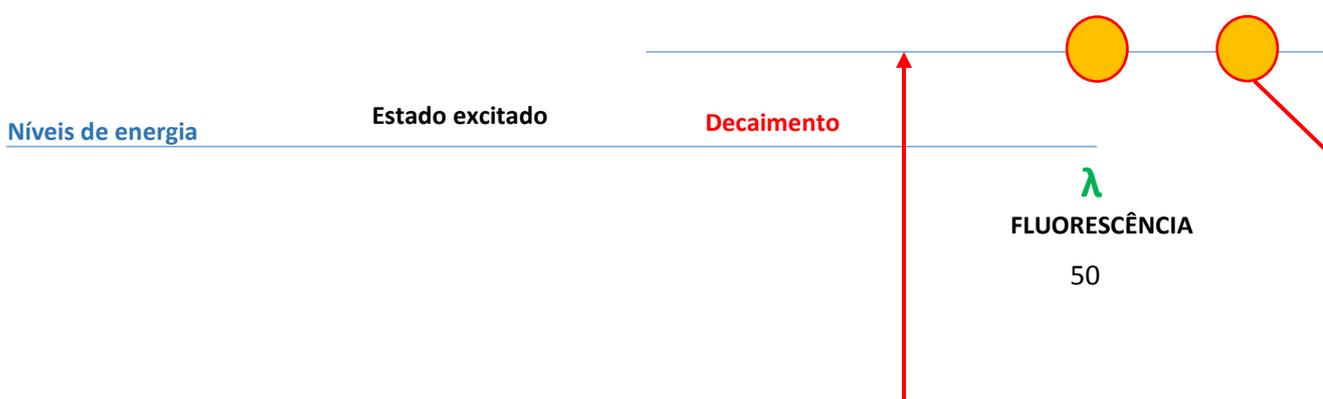
Figura 4: Fenômenos de interação da luz com o tecido biológico. (a) reflexão; (b) espalhamento; (c) retro-espalhamento; (d) transmissão; (e) absorção e mecanismo de decaimento após absorção com emissão de fótons, fosforescência ou (f) fluorescência.

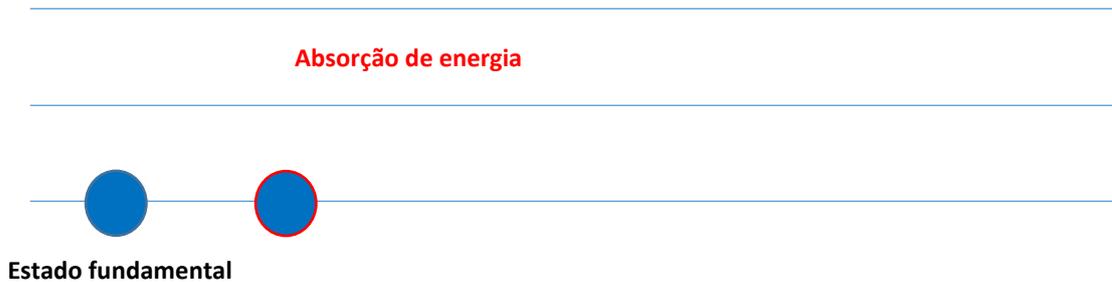


O espalhamento pode ser entendido como um processo no qual o fóton altera sua direção enquanto se propaga no material biológico, mas não perde sua energia. Por sua vez, a absorção corresponde ao processo no qual a luz é absorvida pelo material biológico e convertida em outras formas de energia. A aparência visual do dente irá depender do fenômeno de interação que ocorre entre a luz e o tecido biológico, mais precisamente se a luz foi espalhada ou absorvida (CABRAL, 2006).

Quando ocorre a absorção da radiação eletromagnética, os elétrons passam para algum estado mais elevado de energia (estado excitado), processo conhecido como excitação. Posteriormente o elétron poderá decair um ou mais níveis de energia, ou até mesmo retornar para seu estado fundamental. Neste decaimento o elétron irá liberar energia, podendo esta ser na forma de energia luminosa. O tempo de vida de emissão desta energia irá determinar se está ocorrendo o fenômeno de fosforescência ou fluorescência. A energia emitida durante o processo de decaimento corresponderá a cor da fluorescência que será observada no material (CABRAL, 2006; SKOOG *et al.*, 1998). Na Figura 5 é possível observar um esquema básico do processo de fluorescência.

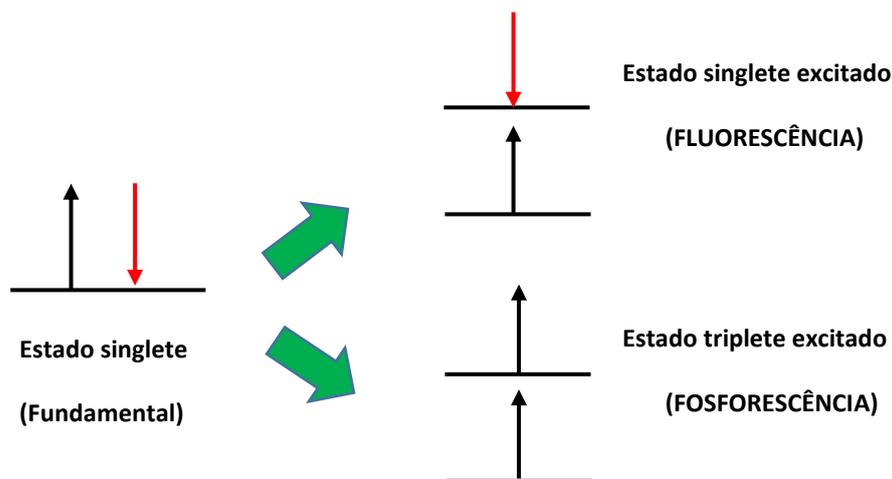
Figura 5: Esquema ilustrativo do fenômeno de fluorescência.





Quando uma molécula absorve um quantum (luz) ela pode passar de seu estado fundamental singlete para seu estado excitado singlete, sendo este um estado energeticamente mais rico que o estado fundamental. No processo de excitação eletrônica, o que determinará se o elétron vai para o estado excitado singlete ou triplete é o spin do elétron excitado comparado com o spin de seu elétron companheiro. Caso o par de elétrons sejam antiparalelos, o elétron excitado passará para o estado singlete, mas se eles forem paralelos, ele passará para o estado triplete. Em temperatura ambiente, boa parte dos elétrons das moléculas se encontram no nível vibracional mais baixo de seu estado fundamental; porém, com a absorção de energia (luz), alguns elétrons passam para estados vibracionais mais energéticos ou para outros estados excitados (CAL, 2008; SKOOG *et al.*, 1998). Um esquema dos processos de transição pode ser observado na Figura 6.

Figura 6: Estados excitados singlete e triplete responsáveis pela ocorrência dos fenômenos de Fluorescência e Fosforescência, respectivamente.



Quando o elétron excitado sofre decaimento de um estado excitado singlete para um estado fundamental de mesma multiplicidade, ocorre a emissão de luz por fluorescência, e o espectro de emissão irá depender de qual nível vibracional do estado fundamental que será

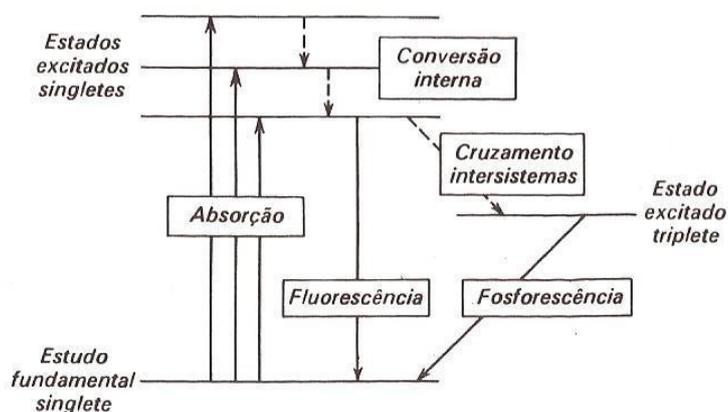
populado. Por sua vez, quando o decaimento ocorre de um estado excitado tripleto para um estado fundamental de diferente multiplicidade, ocorre a emissão de luz por fosforescência (CAL, 2008; SKOOG *et al.*, 1998).

A magnitude destes dois tipos de decaimento irá depender das constantes de velocidade do processo e do rendimento quântico (Φ). Este rendimento quântico mencionado nada mais é do que a razão entre o número de moléculas que sofre decaimento e quantidade total de moléculas que foram excitadas (Equação 1). Outra forma de calcular o rendimento quântico é fazendo a razão entre o número de moléculas que descaíram por um determinado processo luminescente ou fotoquímico pelo número total de fótons absorvidos, já que estes determinam a quantidade de elétrons que serão excitados (CAL, 2008; SKOOG *et al.*, 1998).

$$\Phi = \frac{\text{fótons emitidos}}{\text{fótons absorvidos}} \quad (\text{Equação 1})$$

Na Figura 7, estão representados os dois fenômenos luminescentes no Diagrama de Jablonski.

Figura 7: Diagrama de Jablonski.



Fonte: (NAROTZKI, 2011).

A detecção por fluorescência do tecido dentário é possível, pois quando o tecido é desmineralizado, ocorrem alterações ópticas na região. No tecido cariado, acontece um maior espalhamento da luz incidente se comparado ao tecido sadio, e tal fato deve-se a diferença nos índices de refração quando o tecido está em cada uma das condições. No tecido sadio, há uma maior predominância da hidroxiapatita ($n = 1,62$), já no tecido cariado há uma maior quantidade de água ($n = 1,33$), levando a um maior espalhamento

de luz. Este fenômeno no tecido cariado ocasiona uma menor intensidade de fluorescência se comparado ao tecido sadio, porém ao utilizar comprimentos de onda de excitação superiores a 500 nm, a lesão de cárie apresentará maior fluorescência (EKSTRAND, 2004; KIDD; FEJERSKOV, 2004; BUCHALLA, 2005).

Para luz no comprimento de onda do vermelho ($633 \text{ nm} < \lambda < 655 \text{ nm}$) é considerado que o aumento da fluorescência no tecido cariado deve-se mais aos metabólitos bacterianos do que a desintegração da rede cristalina (HIBST; GALL, 1998). Estudos sugerem que a placa bacteriana fluoresce quando excitada neste comprimento de onda e que isso pode ocorrer devido à presença de porfirinas na região (TAUBINSKY; ALEXANDROV, 2000; HIBST; PAULUS, 2001). Os fosfatos de cálcio constituintes da hidroxiapatita não demonstram ser os responsáveis pela emissão quando excitados no vermelho (HIBST; PAULUS, 2001).

Sabe-se que o comprimento de onda da banda de fluorescência emitida é maior se comparado ao da fonte de excitação. Desta forma, ao utilizar uma fonte de excitação no ultravioleta se observa fluorescência no violeta/azul, com a excitação no azul gera uma fluorescência no azul/verde/amarela, já ao utilizar uma fonte de excitação vermelha ocorre fluorescência no vermelho/infravermelho próximo (CARBAL, 2006). Segundo a literatura, ao utilizar uma fonte de excitação ultravioleta com $\lambda < 400 \text{ nm}$ os principais componentes que fluorescem são com os compostos inorgânicos (esmalte/hidroxiapatita sintética), alguns componentes orgânicos (produtos de bactérias, fluoróforos desconhecidos e alguns compostos protéicos (tirosina, piridina e triptofano) (HAFSTROM-BJORKMAN *et al.*, 1991; MENDES, 2005; BACHMANN, 2007).

Relatos mostram que podem ser identificadas diferenças entre a fluorescência do dente sadio e cariado, sendo essas possivelmente ocasionadas por alterações ópticas nas estruturas destes tecidos e na forma com que eles interagem com a luz (espalhamento/transmissão/absorção) (BRITO, 2014). Sugere-se que para detecção de lesões de cárie iniciais, utilize fontes de excitação no 488 nm (azul), com um filtro de barreira de até 540 nm, dando origem a uma fluorescência no verde. Estudos apontam que, utilizando estes parâmetros, a fluorescência observada no tecido sadio é maior se comparada ao tecido cariado, pois este emite menos fluorescência quando excitado a um $\lambda > 540 \text{ nm}$ (CABRAL, 2006; HAFSTROM-BJORKMAN *et al.*, 1991; BRITO, 2014; ANGMAR-MANSSON; TEM BOSCH, 2001). Conclui-se então que essa perda de fluorescência se deva a perda de material inorgânico

Os diferentes fluoróforos biológicos encontrados absorvem fótons de formas

diferentes, dependendo do comprimento de onda utilizado. Dentre as moléculas biológicas fluorescentes, encontram-se os aminoácidos, proteínas, enzimas, vitaminas, lipídios e porfirinas. Pelo fato de a cárie ser composta por uma estrutura complexa com diversos elementos absorvedores e alguns derivados de produtos bacterianos, pode-se dizer que cada um destes componentes contribui de certa forma na aquisição do sinal (CABRAL, 2006; BORISOVA *et al.*, 2006).

Define-se como cromóforo as moléculas de origem orgânica que são capazes de absorver luz (BANERJE; BOYDE, 1998). Os fluoróforos podem ser definidos como os cromóforos capazes de reemitir parte da luz que foi absorvida, emitindo fluorescência (CABRAL, 2006; RAMANUJAM, 2000). Na Tabela 3 é possível observar as principais moléculas biológicas que são capazes de emitir fluorescência.

Tabela 3: Principais moléculas biológicas que são capazes de emitir fluorescência e seus comprimentos de onda de excitação e emissão.

Fluoróforos endógenos		λ Excitação (nm)	λ Emissão (nm)
Aminoácidos	Triptofano	280	350
	Tirosina	275	300
	Fenilalanina	260	280
Proteínas estruturais	Colágeno	325	400, 405
	Elastina	290,0325	340, 400
Enzimas e Coenzimas	Flavinas	450	535
	NADH	290, 351	440, 460
	NADPH	336	464
Vitaminas	A	327	510
	K	335	480
	D	390	480
Vitamina B ₆ e compostos	Piridoxina	332, 340	400
	Piridoxamina	335	400
	Piridoxal	330	385
	Ácido Piridóxico	315	425
	Fosfato piridoxal 5	330	400
	Vitamina B ₁₂	275	305
Lipídios	Fosfolipídios	436	540, 560
	Lipofucsina	340 - 395	540, 430 - 460
Porfirinas	Porfirinas	400 - 450	630, 690

Fonte: (RAMANUJAM, 2000).

Os componentes inorgânicos (hidroxiapatita e esmalte) fluorescem quando excitados com luz no comprimento de onda do ultravioleta ($\lambda < 400$ nm). Alguns

compostos orgânicos como produtos bacterianos e alguns componentes de origem protéica (tirosina, triptofano e pirimidina) também fluorescem quando excitados neste comprimento de onda (RAMANUJAM, 2000; TAUBINSKY; ALEXANDROV, 2000).

Quando um tecido cariado é irradiado com uma fonte de luz violeta e azul que emitem no comprimento de onda (λ) compreendido entre 407 nm e 488 nm, observa-se uma diminuição na fluorescência ocasionada pela mudança na estrutura da superfície da dentina devido ao processo de desmineralização (BORISOVA *et al.*, 2006).

Alguns autores sugerem que os fluoróforos responsáveis pela fluorescência quando excitado no azul são decorrentes da presença de aminoácidos triptofano e tirosina, coenzimas NADH, NADPH, flavinas, colágeno e elastina. A fluorescência vermelha observada é advinda da presença de porfirinas endógenas (protoporfirinas IX) (KONIG; HIBST, 1993; KONIG; FLEMMING, 1998). As porfirinas são produzidas por diversas bactérias presentes na cavidade bucal (RAMANUJAM, 2000). As bactérias *Prevotella intermedia*, *Actinomyces odontolyticus*, *Corynebacterium spp.*, *Candida albicans* e *Pseudomonas aeruginosa* sintetizam porfirinas fluorescentes (CABRAL, 2006; KONIG; HIBST, 1993).

As bactérias *S. mutans* e os *Lactobacilos* não fluorescem de forma significativa no processo inicial de lesão de cárie, sendo que os primeiros fluorescem intensamente no verde e os lactobacilos não apresentam fluorescência no vermelho (CABRAL, 2006; KONIG; HIBST, 1993).

3.5.2 Espectroscopia de absorção no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

Na espectroscopia do infravermelho utiliza-se o número de onda (k) para classificar as ondas eletromagnéticas, uma vez que esta característica é diretamente proporcional à energia e frequência da onda e também pelo fato de possuir uma ordem de grandeza de representação fácil (BENETTI, 2010). Na teoria, o k representa a quantidade de vezes que uma onda irá atingir uma mesma fase em uma específica distância de propagação (Equação 2), no entanto na prática ele pode ser calculado pela Equação 3.

$$k = \frac{2\pi}{\lambda} \quad (\text{Equação 2})$$

$$k = \frac{1}{\lambda} \quad (\text{Equação 3})$$

Uma técnica de espectroscopia é aquela na qual se utiliza da interação de uma radiação eletromagnética com a matéria, com a finalidade de se obter informações químicas e físicas sobre a amostra analisada, podendo ser divididas em duas técnicas diversas, a espectroscopia por emissão e a espectroscopia por absorção. Na espectroscopia de emissão, os átomos da amostra são excitados por uma fonte térmica ou elétrica e quando estes átomos decaem para seu estado estável, emitem essa energia que foi absorvida, sendo esta utilizada para caracterizar o material. Por sua vez, na espectroscopia por absorção, a amostra é posicionada para receber de uma fonte a radiação eletromagnética com um comprimento de onda específico. Neste caso, a caracterização é feita realizando uma análise comparativa entre a radiação transmitida ou refletida pela amostra, com a radiação emitida pela fonte. Vale a pena ressaltar que o sinal que será analisado (transmitido ou refletido), irá depender do equipamento e da composição química da amostra (BENETTI, 2010; DYER, 1969).

Para decidir qual técnica deve ser utilizada em cada caso, diversos fatores devem ser levados em consideração, como o tipo de material ou de substância que será analisado, quais informações são necessárias obter desta amostra e qual radiação eletromagnética que será utilizada. Em casos de análises de compostos orgânicos, é indicado a utilização da espectroscopia por absorção da radiação no infravermelho, uma vez que há vários compostos que possuem banda de absorção (DYER, 1969; SKOOG *et al.*, 1998).

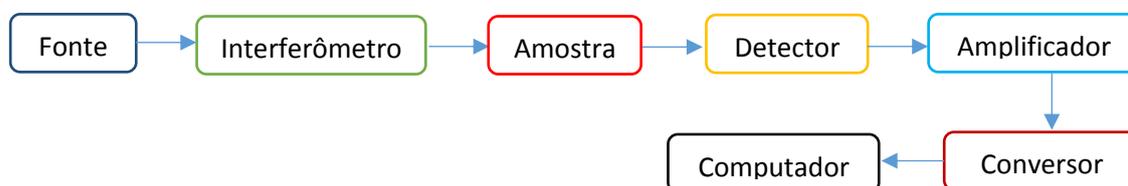
Sabe-se que as moléculas e os átomos que compõem um material apresentam uma frequência natural de vibração. Para que ocorra a absorção da radiação, a frequência da radiação incidente deve ser igual à frequência da vibração molecular (BENETTI, 2010). Com o surgimento de um campo elétrico ocasionado pela vibração molecular (alteração no momento dipolo da molécula), caso uma radiação eletromagnética incidente tenha a mesma frequência da vibração molecular, os campos elétricos formados pela alteração de dipolo e pela radiação incidente irão interagir e ocorrerá uma transferência de energia entre ambos, ou seja, a absorção (SKOOG *et al.*, 1998). Como a radiação infravermelha não possui a energia necessária para alterar o nível energético da

molécula, esta radiação pode ser utilizada na espectroscopia por absorção (SKOOG *et al.*, 1998).

Desde a década de 80, diversos avanços tecnológicos foram feitos nos equipamentos de Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) e seu uso tem se tornado cada vez mais recorrente, pois, esta metodologia apresenta algumas vantagens sobre os demais equipamentos, como uma melhor relação sinal-ruído, coleta de dados mais rápida e uma maior resolução (SKOOG *et al.*, 1998).

De forma simplificada, o funcionamento dos equipamentos de FTIR consistem na emissão de uma radiação, por uma fonte, a qual irá passar um interferômetro antes que atinja a amostra. A radiação que será transmitida ou refletida irá atingir o detector, e o modo utilizado é dependente do tipo do equipamento que será empregado. O sinal captado pelo detector irá passar por amplificador e passará por uma conversão para sinal analógico, posteriormente será enviado para um computador onde ocorrerá a Transformada de Fourier (STUART, 1997). Os principais componentes de um equipamento FTIR pode ser observado na Figura 8.

Figura 8: Principais componentes de um equipamento de Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR).

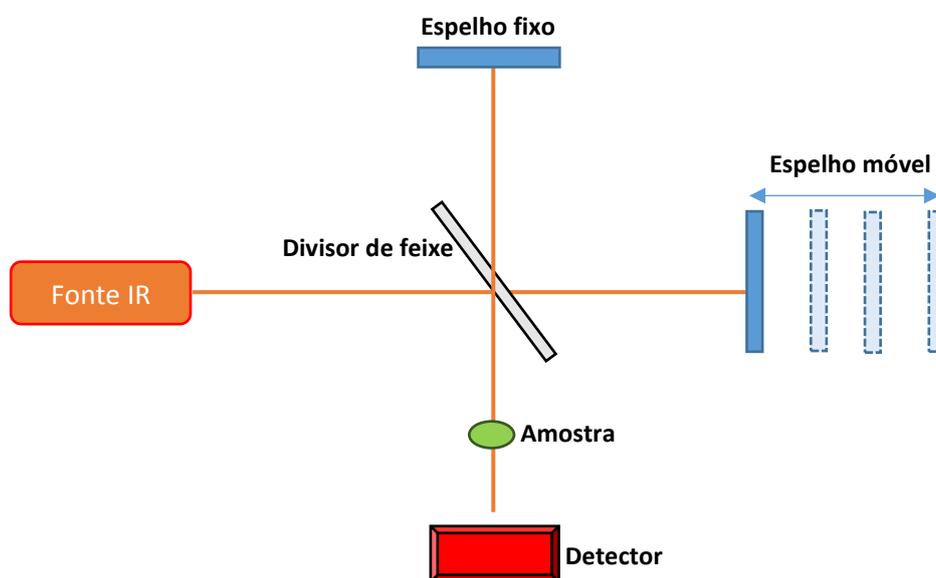


Boa parte dos equipamentos de FTIR utilizam interferômetros baseados no modelo de Michelson (SKOOG *et al.*, 1998). Este componente é formado por dois espelhos planos posicionados um perpendicularmente ao outro, sendo que um é fixo e o outro móvel, além de um espelho semi-reflexivo (*beamsplitter*) que permite a passagem de somente uma parcela do feixe incidente e fica localizado na bissetriz destes dois espelhos citados anteriormente. A fonte de radiação emite um feixe inicial com um determinado comprimento de onda λ que passará pelo *beamsplitter*, onde será dividido em duas componentes iguais, sendo que cada parcela será transmitida para um dos espelhos perpendicularmente posicionados. Vale ressaltar que cada feixe irá percorrer um caminho óptico diferente, visto que a distância entre o *beamsplitter* e o espelho

móvel é variável. Estes dois espelhos (móvel e plano) irão refletir os feixes de volta para o *beamsplitter*, onde serão recombinados para formar um “novo” feixe. Como cada feixe percorreu um caminho óptico diferente, haverá uma diferença de fase entre cada porção do feixe ao se reencontrarem no *beamsplitter*, e a interação entre eles pode ser construtiva ou destrutiva. Este feixe recombinante que será direcionado para amostra (STUART, 1997). Um esquema básico de um Interferômetro de Michelson pode ser observado na Figura 9.

A interação no *beamsplitter* entre as parcelas de luz do feixe móvel e do espelho fixo será construtiva quando a diferença de fase for $n\lambda$, sendo n um número inteiro. Quando n não for inteiro a interação entre os feixes será destrutiva (SKOOG *et al.*, 1998). O feixe que atinge o detector irá fornecer um interferograma, ou seja, um gráfico com a intensidade do feixe em função da posição do espelho móvel. A Transformada de Fourier é aplicada no interferograma para obtenção do espectro (BENETTI, 2010).

Figura 9: Esquema básico de um Interferômetro de Michelson.



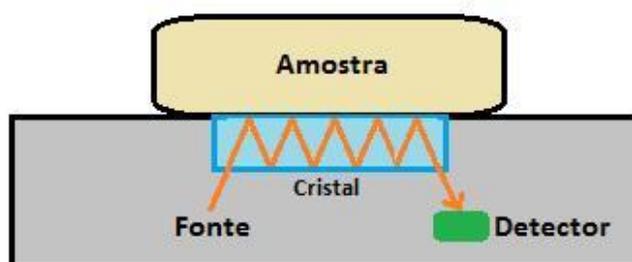
Dentre as diferentes técnicas de análises com FTIR, tem-se a de reflexão total atenuada (ATR) que permite obter espectros qualitativos e quantitativos de amostras sólidas de diversas espessuras. Em resumo, a técnica irá detectar a radiação refletida que

se propaga de um meio menos denso para um meio de maior densidade. É sabido que pequena parcela dessa radiação incidente será absorvida pela amostra, sendo esta conhecida como onda evanescente. Inicialmente o feixe irá se propagar por um meio de alto índice de refração, podendo ser um cristal de ZnSe, Ge ou até mesmo de diamante. A proporção do feixe que será refletido depende de seu ângulo de incidência, pois ao atingir um ângulo crítico, o feixe é refletido totalmente (varia conforme o material do cristal). Devido a absorção parcial da radiação incidente, a radiação refletida é atenuada e, a partir de uma análise comparativa entre ambas, é possível identificar as bandas de absorção do material da amostra (SILERSTEIN; WEBSTER, 2005; STUART, 1997). Na Figura 10 é possível observar um esquema de um equipamento ATR-FTIR.

A profundidade de penetração do feixe e da análise irá depender do comprimento de onda do feixe incidente (λ), do ângulo de incidência do feixe com a amostra (θ), do índice de refração do cristal que está sendo utilizado no equipamento (n_2) e do índice de refração da amostra (n_1), conforme pode ser observado na Equação 4, onde d_p é a profundidade de penetração (SKOOG *et al.*, 1998).

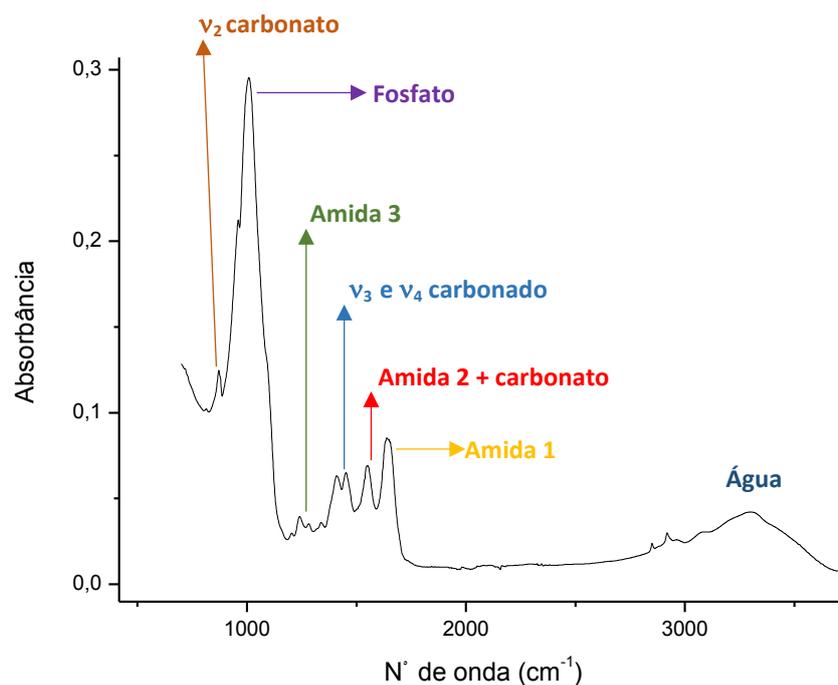
$$d_p = \frac{\lambda/n_1}{2\pi[\sin\theta - (n_1/n_2)^2]^{1/2}} \quad (\text{Equação 4})$$

Figura 10: Esquema simplificado de um equipamento ATR-FTIR.



Um espectro obtido por espectroscopia ATR-FTIR está apresentado na Figura 11, onde também é possível observar as principais bandas vibracionais na região do infravermelho para os componentes da dentina bovina hígida saudável.

Figura 11: Espectro da dentina bovina hígida saudável não tratada obtido por um equipamento ATR-FTIR.



Nas Tabelas de 4 a 7 podem ser observadas as principais bandas de absorção associadas aos diferentes componentes da dentina.

Tabela 4: Bandas de absorção associadas ao fosfato (PO_4^{3-}) presentes na dentina.

Vibração	Frequência de vibração aproximada (cm^{-1})
	Dentina
Deformação angular simétrica no plano (v_2)	471
	470/467
Deformação angular assimétrica no plano (v_4)	563
	603
	755
	606
	559
Estiramento assimétrico (v_3)	1280 - 950
v_1	470/467

Fonte: (BENETTI, 2010).

Tabela 5: Bandas de absorção associadas ao carbonato (CO_3^{2-}) presentes na dentina.

Vibração	Frequência de vibração aproximada (cm-1)
	Dentina
Deformação angular assimétrica no plano (v2)	872
Estiramento assimétrico (v3)	1410
	1452
	1509
	1547
	1540

Fonte: (BENETTI, 2010).

Tabela 6: Bandas de absorção associadas na região espectral de 4000 - 2500 cm^{-1} em dentina.

Composto	Vibração	Frequência de vibração aproximada (cm-1)
		Dentina
OH estrutural	Libração	749
H2O adsorvida	Deformação angular assimétrica fora do plano (v2)	1648
H2O adsorvida	Estiramento simétrico	-
OH estrutural	Estiramento	3580
H2O ou Amida A	v1 + 2 v2	3318
H2O	v1 + 2 v2	3200
H2O	v3	3410
Amida B		3066
C -H	Estiramento	2961
		2931
		2875
Grupo OH	-	-

Fonte: (BENETTI, 2010).

Tabela 7: Bandas de absorção associadas na região espectral de 1750 - 1180 cm^{-1} em dentina.

Composto	Vibração	Frequência de vibração aproximada (cm-1)
		Dentina
Amida 3	Libração	1224
Carbonato + Amida 2 N - H C - N	Deformação angular assimétrica fora do plano (v2)	1393 1442 1540
Água + Amida 1 C = O	Estiramento simétrico	1700 - 1550
Estrutura do Colágeno	Estiramento	1338/1335 1288/1281 1204/1201
CH3	Abano	1315
CONH (Amida 3) CN NH	- Estiramento Deformação	1245/1234 (L)

Fonte: (BENETTI, 2010).

3.5.3 Tomografia por Coerência Óptica (OCT)

A Tomografia por Coerência Óptica (OCT – Optical Coherence Tomography) trata-se de uma técnica interferométrica de alta resolução, capaz de adquirir imagens tomográficas em tempo real, sem contato com o material, *in vivo* e permite realizar uma análise qualitativa e quantitativa do tecido que está sendo observado. A vantagem do OCT frente as mais diversas técnicas que são utilizadas para realizar o diagnóstico de lesões de cárie, é que esta técnica pode ser aplicada em uma região de atuação (resolução x profundidade) na qual as demais não podem, não utiliza radiação ionizante, não necessita preparar a amostra para iniciar, possui baixo custo e uma facilidade de uso (OTIS *et al.*, 2000; MICHELSON, 1995; FREITAS *et al.*, 2006; MANESH *et al.*, 2009; COLSTON; SATHYAM, 1998; STANDISH *et al.*, 2010).

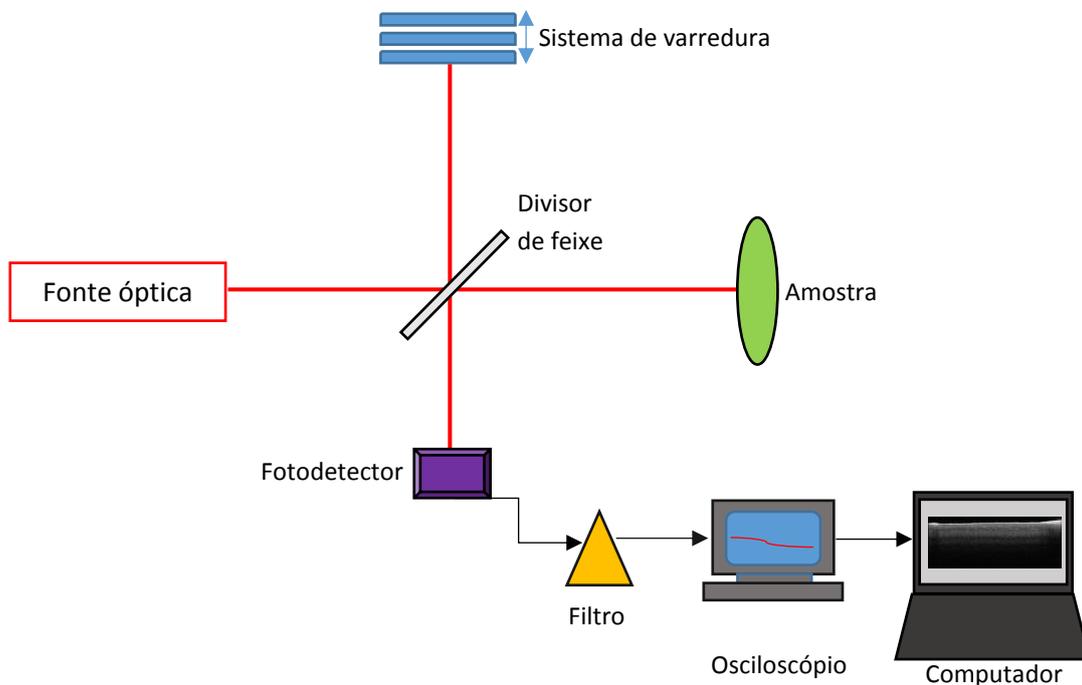
Foi desenvolvida no ano de 1991 por Huang *et al.*, onde a proposta consistia em realizar a aquisição de imagens tomográficas através do uso do fenômeno de interferometria de baixa coerência (HUANG *et al.*, 1991; TAKADA *et al.*, 1987).

Na análise de tecidos duros dentais, geralmente, são utilizados equipamentos que emitem no comprimento de onda entre 840 e 1310 nm, propiciando uma análise em profundidade de penetração entre 0,6 e 2 mm e com uma resolução variável entre 10 e 17µm (HALLA; GIRKIN, 2004). Para que seja possível retirar informações sobre o

material que está sendo observado, é necessário encontrar uma propriedade física que seja capaz de alterar a amplitude, a polarização do sinal ou a fase da amostra. É sabido que as fibras colágenas possuem comportamento birrefringente, na qual a radiação sofre o fenômeno de dupla refração. Esse comportamento leva a alterações no sinal proveniente do material, o qual será recombinação com o feixe de referência do equipamento de OCT. Segundo a literatura materiais que apresentam essas polarizações das birrefringências podem ser analisados por meio da reflectometria de baixa coerência, e seus valores comparados entre tecido sadio e o desmineralizado (FREITAS, 2007).

A obtenção das imagens de OCT são realizadas através de um mapeamento da amostra, utilizando uma fonte de luz. Um sistema óptico irá irradiar a amostra com uma fonte de luz e recolherá a luz retro-refletida ao longo do eixo de direção de propagação do feixe incidente no material (FREITAS, 2006; FREITAS 2007). Na Figura 12 encontram-se os principais componentes de um equipamento de OCT.

Figura 12: Componentes básicos de um equipamento de Tomografia por Coerência Óptica (OCT).



O princípio de funcionamento do equipamento OCT é baseado no interferômetro de Michelson, onde uma fonte de luz emite um feixe inicial direcionado para um espelho divisor de feixe. Neste espelho o feixe incidente será dividido em duas

componentes iguais, sendo que uma delas será direcionada para a amostra posicionada na direção de propagação do feixe inicial, e a outra componente será direcionada para o sistema de varredura (espelho móvel), localizado a 90°. Estas duas componentes do feixe inicial serão refletidas pela amostra e pelo sistema de varredura, respectivamente, e serão posteriormente recombinadas no divisor de feixe. Diferentes tipos de interação podem ocorrer entre as componentes, no caso de os percursos percorridos pelo feixe do sistema de varredura (feixe referência) e do feixe retro-espalhado pela amostra forem iguais, estes serão recombinados e a interferência será construtiva, no entanto, caso os percursos sejam diferentes, a interação será destrutiva. O feixe resultante desta recombinação das componentes será captado pelo fotodetector (FREITAS, 2007; SUBHASH, 2011).

A imagem adquirida pelo equipamento é formada pela captação dos sinais interferométricos pelo fotodetector. Vale a pena ressaltar que o tempo de voo dos fótons que são retro-espalhado pela amostra deve ser o mesmo que os dos fótons do feixe de referência. De maneira simplificada, o equipamento será responsável por calcular o atraso do feixe retro-espalhado pela amostra em comparação com o feixe de referência refletido pelo sistema de varredura (FREITAS, 2007).

A correlação existente entre as fases das ondas que compõem um feixe de luz é definida como coerência óptica, já a correlação existente no sentido de propagação das ondas é definida como coerência temporal. Uma luz monocromática é aquela na qual uma fonte de luz perfeitamente coerente mantém a relação de fase existente entre suas componentes de onda, em outras palavras, a luz monocromática é aquela composta por uma luz de apenas um comprimento de onda e que se propaga em uma única direção (AMARAL, 2012; BREZINSKI, 2006).

Um feixe de luz com larga banda espectral é composto por ondas que apresentam diferentes comprimentos de onda (λ) e frequências de propagação (f), de tal forma que a medida que as ondas se propagam, a diferença de fase entre elas aumenta. Contudo, ao analisarmos a coerência de fase entre essas ondas para uma pequena distância de propagação, pode-se considerar que a luz é coerente e que as ondas ainda estão em fase. Entretanto, para distâncias longas, as ondas não se encontram em fase e resultam em uma interferência aleatória entre elas, tornando-se complicado a obtenção de alguma informação delas. A literatura aponta que a distância de propagação limite para que as ondas de um feixe de larga banda espectral ainda permaneçam em fase, é conhecida como comprimento de coerência (l_c), podendo ser calculado pela Equação 5,

onde λ é o comprimento da onda central e $\Delta\lambda$ é equivalente a largura da banda espectral (AMARAL, 2012; BREZINSKI, 2006). De tal forma que quanto maior for o $\Delta\lambda$ menor será o lc .

$$lc \propto \frac{\lambda^2}{\Delta\lambda} \quad (\text{Equação 5})$$

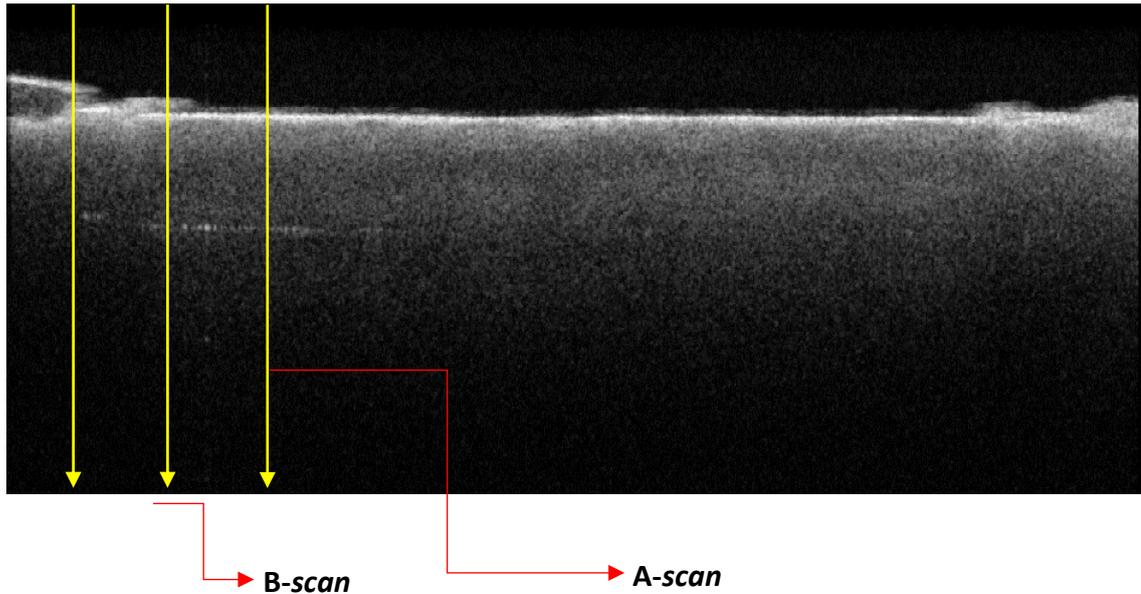
Analisando a Equação 5 pode-se concluir que em um sistema OCT as melhores alternativas para uso são as fontes de luz monocromáticas e as com baixa banda espectral, a exemplo do *laser*. A grande maioria dos *lasers* emitem em suma por apenas um comprimento de onda, no entanto alguns modelos apresentam banda espectral de 10 nm, aproximadamente (CORAZZA, 2005).

A obtenção dos sinais para toda uma profundidade de um determinado ponto da amostra é possível através translação múltipla e sucessivas vezes do espelho de referência, até que ocorra a captação da intensidade do sinal para cada ponto axial da região da amostra. Este perfil de detecção é conhecido como *A-scan*. Posteriormente o feixe de luz é fixado em um novo ponto, transversalmente ao ponto inicial, e repete-se todo procedimento para aquisição de um novo *A-scan*. Este procedimento é repetido sucessivamente até que o equipamento faça a varredura de todo corte de interesse da amostra (CORAZZA, 2005).

A imagem de um corte 2D da amostra é obtida através da soma de todos *A-scan* obtidos para esta região de interesse (CORAZZA, 2005), conforme pode ser observado na Figura 13. Utilizando softwares específicos para reconstrução e análise de imagens, é possível fazer a associação de diferentes imagens *B-scan* até que se obtenha uma imagem tridimensional da amostra (COLSTON *et al.*, 1998).

Figura 13: Representação de um corte bidimensional (2D) B-scan, composto por diversos cortes A-scan de profundidade.



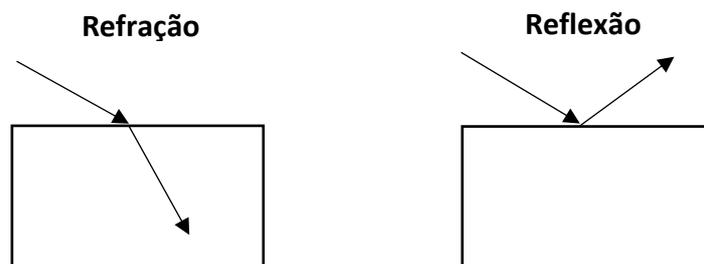


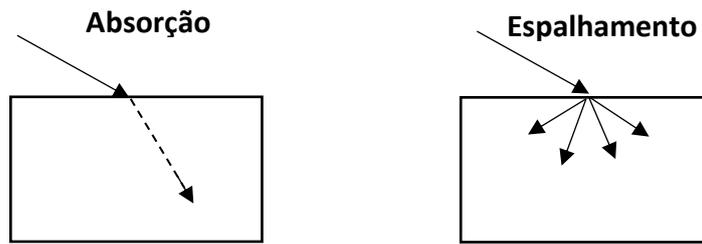
Sabe-se que cada material biológico apresenta um coeficiente de espalhamento específico, sendo variável conforme a composição química e a estrutura atômica dos átomos que o compõem. Materiais com baixo coeficiente de espalhamento permitem que a luz seja completamente transmitida e resultam em uma onda retro-refletido de baixa amplitude, representado por um pixel preto na imagem. Em contrapartida, materiais com alto valor de coeficiente de espalhamento refletem grande parte da luz incidente e resultam em uma onda retro-refletido de grande amplitude, representado por um pixel branco na imagem. Um determinado tom na escala de cinza é atribuído ao sinal captado pelo fotodetector (BREZINSKI, 2006; ABTAHIAN; JANG, 2012).

3.5.3.1 Interação do feixe do OCT com o tecido biológico

Quando em contato com o material biológico, a luz pode sofrer 5 fenômenos diversos: reflexão, refração, absorção, transmissão e espalhamento (PRASAD, 2003), conforme pode ser observado na Figura 14.

Figura 14: Fenômenos de interação da luz com o material biológico.





Quando a luz passa de um meio para outro diverso, observa-se que parte da radiação é refletida e outra parte é transmitida pelo meio. No fenômeno de refração, o percurso que a luz irá percorrer no novo meio é dependente do índice de refração (n) deste material, podendo ser calculado pelo quociente entre a velocidade de propagação da luz no vácuo (c) pela velocidade de propagação da luz no material (v), conforme a Equação 6 (PRASAD, 2003; ZILIO, 2009).

$$n = \frac{c}{v} \quad (\text{Equação 6})$$

A diferença na velocidade de propagação da luz ao mudar de meio pode ser observada pela alteração no ângulo de propagação do feixe. O valor no novo ângulo de propagação pode ser calculado pela Lei de Snell (Equação 7), onde θ_1 e θ_2 referem-se respectivamente aos ângulos de propagação nos meios 1 e 2; v_1 e v_2 referem-se respectivamente as velocidades de propagação nos meios 1 e 2; n_1 e n_2 referem-se respectivamente aos índices de refração dos meios 1 e 2 (ABTAHIAN; JANG, 2012; PRASAD, 2003).

$$\frac{\text{sen}\theta_1}{\text{sen}\theta_2} = \frac{n_2}{n_1} = \frac{v_2}{v_1} \quad (\text{Equação 7})$$

Na reflexão, quando a luz incidente atingir a interface entre os meios com índices de refração diferentes, ela retornará ao meio inicial. Pela Lei de Fresnel, quando a luz incidente atingir a interface entre os meios com um ângulo de 90° , maior será a absorção da luz pelo material (PRASAD, 2003).

Quando a luz incidente se depara com uma superfície lisa, na qual os tamanhos das irregularidades superficiais são menores que o comprimento de onda da luz incidente, observa-se o fenômeno de reflexão especular, onde os raios refletidos encontram-se paralelos entre si. Entretanto, quando a luz incidente se depara com uma superfície rugosa com os tamanhos das irregularidades maiores que o comprimento de onda da luz incidente, observa-se o fenômeno de reflexão difusa. Neste tipo de reflexão, os ângulos de incidência da luz incidente não são iguais, visto que o eixo normal varia conforme a irregularidade local, fazendo com que os feixes refletidos não estejam paralelos entre si. No tecido biológico é observado o fenômeno de reflexão difusa, em decorrência das diferentes estruturas (moléculas, organelas, proteínas, etc) que compõem o material (SILVA; NUNEZ; SUZUKI, 2017).

Por sua vez, no fenômeno de absorção, caso a frequência da radiação da luz incidente seja igual ou muito próxima da frequência de absorção das partículas que compõem o meio, ocorrerá ressonância entre a luz e as moléculas, e uma consequente absorção desta energia. Esta energia absorvida poderá ser convertida em energia cinética, calor ou poderá ser utilizada em alguma reação química. A capacidade de um meio ser absorvedor para uma determinada radiação está relacionada com fatores microscópicos, como sua composição química, além dos fatores macroscópicos, como a espessura e concentração do material. Segundo a literatura, a água e as proteínas presentes no tecido biológico não são bons absorvedores para radiação com comprimento de onda entre 600 nm e 1.200 nm, sendo esta radiação pouco atenuada nestes materiais. A Tomografia por Coerência Óptica (OCT), geralmente, utiliza fontes de luz com comprimento de onda aproximado ao do infravermelho, por se tratar de uma região que é pouco absorvida pela água, um dos principais componentes dos materiais biológicos (SILVA; NUNEZ; SUZUKI, 2017).

O fenômeno de espalhamento ocorre quando a frequência da radiação incidente não é igual ou próxima da frequência natural de vibração das partículas do meio. Neste caso, os átomos constituintes irão capturar a energia da radiação incidente e alterar seu estado vibracional, sendo posteriormente reemitida em diferentes direções na forma de fótons. O tecido biológico apresenta uma ampla quantidade de elementos espalhadores em sua composição, desta forma, este fenômeno pode ser considerado como o predominante na interação da luz com o meio biológico (PRASAD, 2003).

3.5.3.2 Diferentes metodologias utilizadas para análise dos dados (coeficiente de dispersão e coeficiente de atenuação óptica).

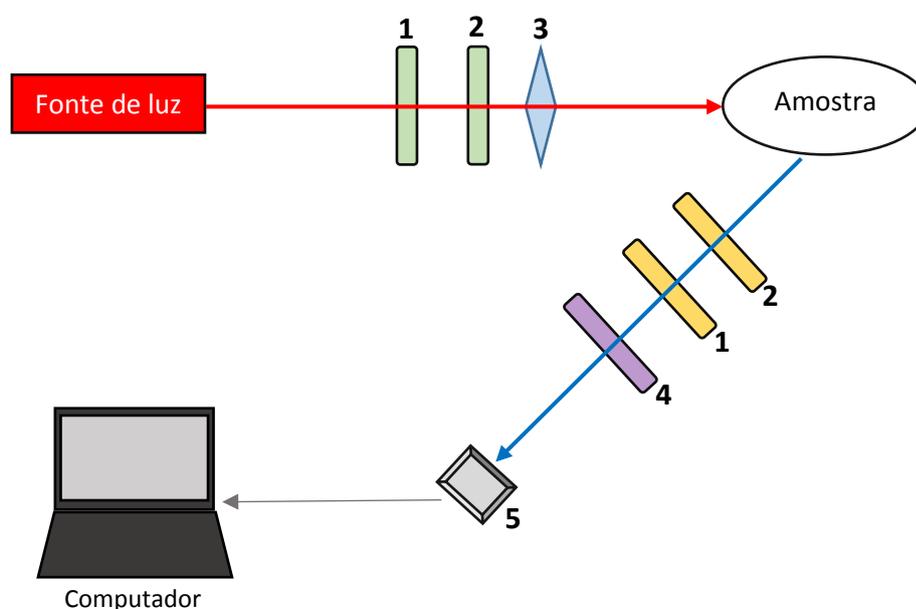
O Lawrence Livermore National Laboratory da Universidade da Califórnia (U.S.A) foram os pioneiros em utilizar o OCT para aplicações dentárias. Devido as desvantagens das técnicas tradicionais para detecção de lesões de cárie, eles desenvolveram um equipamento que utiliza da técnica de polimetria para detecção destas lesões com base na despolarização da luz incidente, realizando uma comparação dos estados de polarização da luz antes e depois que ela interagir com o material (MATTHEW *et al.*, 2002)

O dispositivo desenvolvido neste laboratório utiliza um sistema PS-OCT (Polarization Sensitivity – Optical Coherence Tomography) a fim de identificar regiões de desmineralização no dente, através da detecção de mudanças na forma com que a luz é dispersa no tecido sadio e no tecido cariado. Este equipamento faz uma combinação da técnica de Tomografia por Coerência Óptica com a técnica de Reflectometria de Domínio de Coerência Óptica (*Optical Coherence Domain Reflectometry – OCDR*). Os sistemas OCDR/OCT são capazes de fornecer imagens sobre o estado de polarização de uma amostra em função da profundidade. Sabe-se que o processo de desmineralização promove alterações nas propriedades de espalhamento do tecido. Estas alterações irão ocasionar uma despolarização da luz incidente que será captada pelo sistema elaborado. O sistema mede a despolarização da luz retro-refletido e compara com a polarização conhecida luz incidente (referência) (MATTHEW *et al.*, 2002)

Na Figura 15 está representado um modelo do sistema elaborado pela Universidade da Califórnia. Nele, a amostra será irradiada por uma fonte de luz de baixa coerência. O polarizador e o colimador irão permitir que a luz do feixe incidente fique polarizada e a placa de onda irá proporcionar que o estado de polarização da luz seja ajustado, e então conhecido para posterior análise. A luz dispersa e refletida pela amostra passará por uma placa de onda e por um polarizador, para que seu estado seja detectado. Um filtro passa-banda é utilizado para selecionar a banda de comprimento de onda, a fim de realizar uma discriminação ótima entre o tecido sadio e o cariado. Esta luz então será captada pelo fotodetector. As imagens serão processadas no computador e

então uma imagem será gerada com a quantidade de despolarização em cada região da amostra (MATTHEW *et al.*, 2002)

Figura 15: Esquema do Sistema desenvolvido pela Universidade da Califórnia (U.S.A).
Composto por: 1 – Polarizador; 2- Placa de onda; 3 – Lente de colimação; 4 – Filtro passa-banda e 5 – Fotodetector.



Em resumo, a amostra será irradiada por uma luz polarizada com seu estado de polarização conhecido e, então a luz retro-refletido pela amostra será detectada e analisada por polarimetria óptica pelo sistema OCDR/OCT a fim de determinar seu grau de polarização. O coeficiente de dispersão calculado será utilizado para detectar mudanças na microestrutura do tecido e que talvez possam ser indicativos da doença. O pressuposto utilizado na avaliação é de que a luz dispersa no esmalte ou na dentina permanece polarizada e que a luz dispersa no tecido desmineralizado se torna despolarizada. A luz utilizada no equipamento está no visível ou no infravermelho próximo ($\lambda > 700 \text{ nm}$) (MATTHEW *et al.*, 2002)

Neste experimento foi utilizado o modelo de análise proposto por Maia *et al.* 2015, onde é calculado o coeficiente de atenuação óptica que quantifica o decaimento exponencial da intensidade do sinal em função da profundidade da amostra. O pressuposto desta análise leva em consideração as diferentes composições químicas e estruturais da dentina sadia e da dentina cariada. Como na dentina cariada há uma maior quantidade de elementos espalhadores que na dentina sadia, a luz retro-espalhada pela dentina cariada será maior que àquela retro-espalhada pelo tecido sadio. Desta forma,

espera-se que o módulo do coeficiente de atenuação óptica (sem considerar o sinal negativo do decaimento exponencial) para a dentina sadia será, relativamente, maior que o da dentina cariada devido à maior quantidade de constituintes absorvedores nesta. O método utilizado para efetuar o cálculo deste coeficiente será explicado mais adiante.

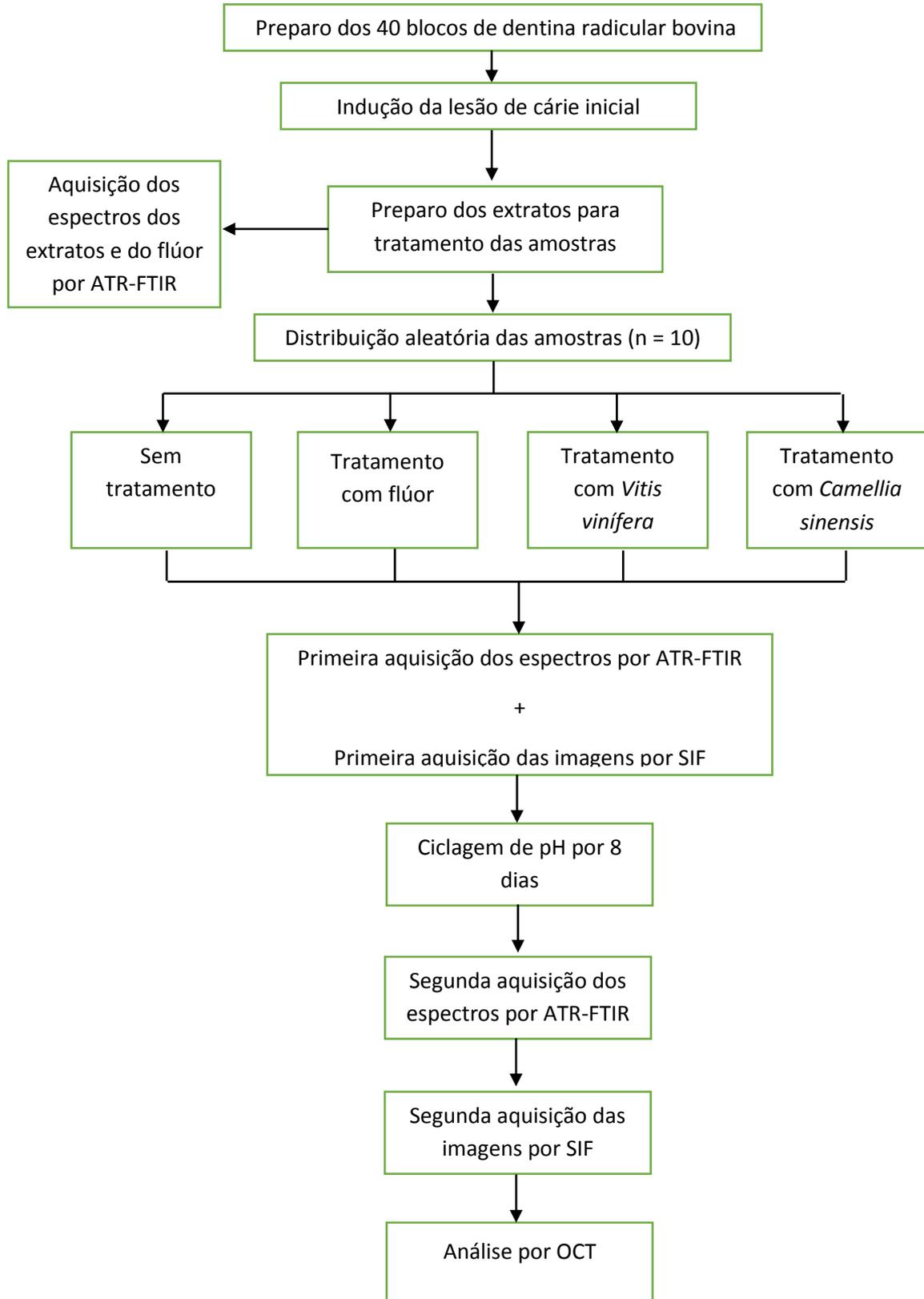
4. Materiais e Métodos

4.1 Delineamento Experimental

Para realização dos experimentos *in vitro* cego, utilizou-se 40 blocos de dentina radicular bovina, as quais foram previamente desmineralizadas para realização da simulação de uma lesão incipiente de cárie. Posteriormente, as amostras foram distribuídas de forma aleatória em 4 grupos experimentais (n = 10): **G1** – grupo sem tratamento (controle negativo); **G2** – amostras tratadas com flúor fosfato acidulado (FFA – 1,23% F, pH 3,3 - 3,9, durante 4 min – grupo controle positivo); **G3** – amostras tratadas com extratos de *Vitis vinifera* durante 1 hora ; **G4** – amostras tratadas com extrato de *Camellia sinensis* durante 1 hora. Foram retirados os espectros dos extratos e do flúor pela técnica de Espectroscopia de Absorção no Infravermelho por Transformada de Fourier (ATR-FTIR) e preparou-se os chás para tratar as amostras. Após os tratamentos, foram retirados os espectros das amostras por ATR-FTIR e as primeiras imagens de fluorescência pelo Sistema de Imagens por Fluorescência (SIF) para que os resultados pré-ciclagem de pH pudessem ser comparados com os pós-ciclagem de pH. Na sequência, as amostras dos grupos G2, G3, e G4 foram submetidas ao desafio cariogênico *in vitro*, para simular a ativação da remineralização das lesões, sendo o grupo G1 mantido para fins de comparação. O processo teve duração total de 8 dias e foi feito através da ciclagem de pH. Após efetuada a ciclagem de pH, foram retirados novamente os espectros por ATR-FTIR, as amostras foram submetidas novamente a análise de fluorescência por SIF e também foram adquiridas imagens por Tomografia por Coerência Óptica (OCT) para que fossem calculados os coeficientes de atenuação óptica para cada grupo experimental. A análise estatística foi realizada individualmente para cada metodologia de análise aplicada (ATR-FTIR, SIF e OCT), após verificados os pressupostos de independência, homogeneidade e normalidade dos dados amostrais, com nível de significância de 5%. Em todos processos executados os blocos de dentina radicular bovina foram considerados como unidades experimentais, os tratamentos propostos foram considerados como fatores de variação e como variáveis de resposta tem-se a intensidade de fluorescência, a variação composicional e o coeficiente de atenuação óptica. Na Tabela 8 podem ser observados os fatores em estudo do projeto

e no Fluxograma (Figura 16) estão evidenciadas as diferentes fases de execução do presente trabalho.

Figura 16: Fluxograma com as diferentes fases experimentais do trabalho.



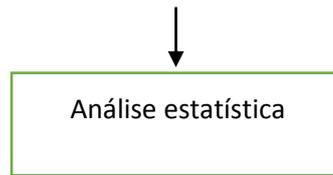


Tabela 8: Delineamento experimental.

Fatores em estudo	
Unidades experimentais	Blocos de dentina radicular bovina
Fatores de variação	Aplicação de Flúor
	Aplicação de extrato de <i>Vitis vinífera</i>
	Aplicação de extrato de <i>Camellia sinensis</i>
Variáveis de resposta	Intensidade de Fluorescência
	Composição Química
	Coeficiente de Atenuação Óptica

4.2 Preparo das amostras

Foram utilizados 40 dentes incisivos inferiores bovinos, os quais foram adquiridos em frigoríficos após aprovação da Comissão de Ética de Uso Animal da Universidade Federal do ABC, sob protocolo CEUA-1362120915 (Anexo 1).

Inicialmente, os dentes foram lavados com água corrente e detergente aniônico. Para que seus indutos orgânicos fossem removidos, realizou-se a raspagem ultrassônica e profilaxia com pedra-pomes e água, utilizando uma escova tipo Robinson[®] em baixa rotação. Para perfeita preservação das amostras, estas foram mantidas em ambiente úmido (em algodão estéril umedecido com água deionizada com timol) sob refrigeração a +4° C até a realização dos experimentos (WHITE, 1987).

Para obtenção dos blocos de dentina de 4 x 2 x 2 mm, foi utilizado um disco de corte em caneta de alta rotação. Os blocos foram planejados com lixas de granulação 400, 600 e 1200 (Carbimed Paper Discs, 30-5108-320, Buehler, IL, USA) e polidos com pasta de polimento de diamante com granulação de 1 µm (METADI Diamond suspension, Color Polishing Water-spray base 40-6530, Buehler, IL, USA) e disco de papel feltro auto-adesivo (Polishing Cloth, METADI, Buehler 40-7618, IL, USA) com lixadeira-politriz APL-4 (Arotec S.A. Ind. Com., SP, Brasil).

Após o preparo dos blocos, limitou-se uma região ativa da amostra de 8 mm², com auxílio de etiquetas (Pimaco, Brasil) produzidas com a metragem solicitada e fixadas com cera 7 (Technew, Brasil), o restante foi recoberto com duas camadas de

verniz ácido resistente de cor vermelha (Risqué, Brasil), conforme pode ser observado na Figura 17. Na Figura 18 pode ser visto uma foto de uma amostra com a delimitação de sua região ativa.

Figura 17: Representação da área reativa das amostras.

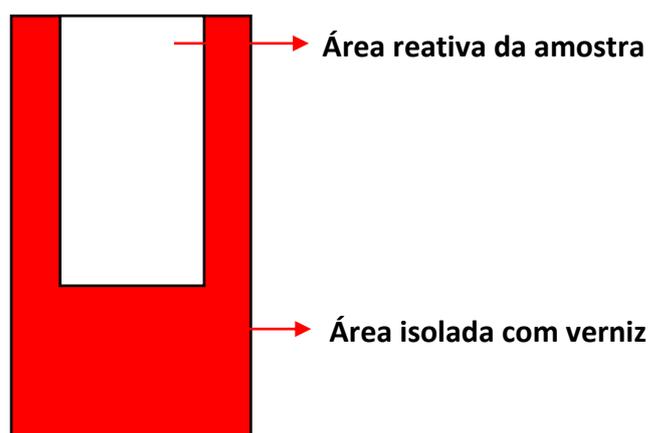
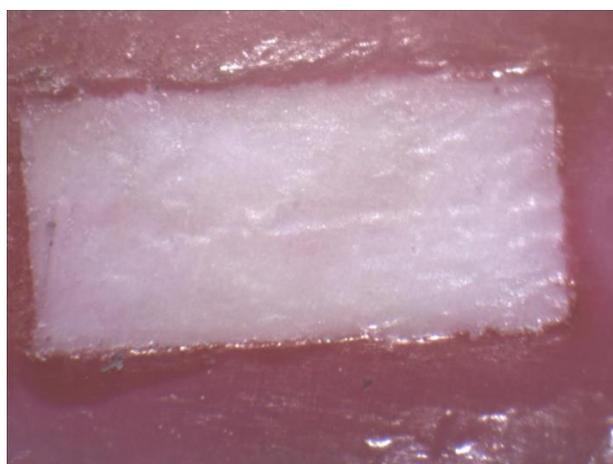


Figura 18: Imagem de uma amostra com a delimitação de sua região ativa.



Com todos os blocos de dentina já prontos, induziu-se uma lesão de cárie superficial inicial. Para tal, cada amostra foi mantida individualmente em solução desmineralizadora (2 mL de solução/mm² de substrato exposto) durante 32 horas e a 37 °C, segundo instruções de Queiroz (2004). A solução desmineralizadora foi preparada com 1,4 mM de cálcio, 0,91 mM de fosfato e 0,06 µg F⁻/mL, em tampão acetato 0,05 M com pH 5,0. Após o processo, as amostras foram limpas com água destilada e deionizada, secas com papel absorvente e mantidas em ambiente úmido sob

refrigeração até o passo seguinte (QUEIROZ, 2014).

4.3 Tratamentos das amostras

As amostras foram distribuídas de forma aleatória em 4 grupos experimentais, a saber:

Grupo 1 (G1): amostras sem tratamento (grupo controle negativo);

Grupo 2 (G2): amostras com aplicação tópica de flúor fosfato acidulado - FFA (grupo controle positivo);

Grupo 3 (G3): amostras com aplicação tópica de extrato de *Vitis vinífera* (semente de uva);

Grupo 4 (G4): amostras com aplicação tópica de extrato de *Camellia sinensis* (chá verde);

Para as amostras do grupo G1, não foi feito nenhum tratamento específico para que pudesse ser realizado o controle negativo do projeto.

Para as amostras do grupo G2, utilizou-se o gel de flúor fosfato acidulado (Flúor Gel, Dentsply, Brasil, 1,23% de flúor, pH 3,6 – 3,9), o qual foi mantido sobre as superfícies das amostras por 4 minutos. Posteriormente, o gel foi removido com o auxílio de um cotonete e os blocos foram lavados com água destilada e deionizada por 30 segundos e secos com papel absorvente (TEM CATE; DUIJSTERS, 1982).

Para as amostras dos Grupos 3 e 4, dissolveu-se separadamente os extratos da *Vitis vinífera* e da *Camellia sinensis* (GNC Herbal Plus®) a uma concentração de 6,5% (m/v) em água Milli- Q (Millipore, Bedford, MA, EUA). Em seguida, as amostras de G3 foram imersas na solução *Vitis vinífera* e as amostras de G4 foram imersas na solução de *Camellia sinensis*, pelo tempo pré-determinado de 1 hora (J.DENT, 2010). Após os tratamentos, as amostras foram lavadas individualmente com água destilada e deionizada por 1 minuto, e secas com filtro de papel absorvente

Nas Figuras 19, 20, 21 e 22 podem ser observadas as fotos das amostras após a realização dos tratamentos, para os Grupos G1, G2, G3 e G4, respectivamente. Na Figura 23 é possível observar uma foto com os líquidos preparados com o extrato de *Vitis vinífera* e com o extrato de *Camellia sinensis*, respectivamente

Figura 19: Fotos das amostras do Grupo 1 (sem tratamento).



Figura 20: Fotos das amostras do Grupo 2 (tratamento com FFA).



Figura 21: Fotos das amostras do Grupo 3 (tratamento com extrato de Vitis vinífera).

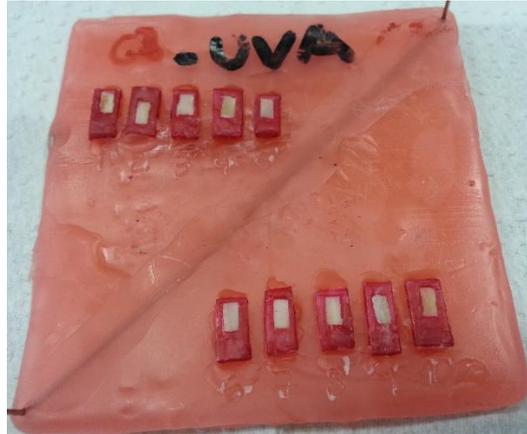
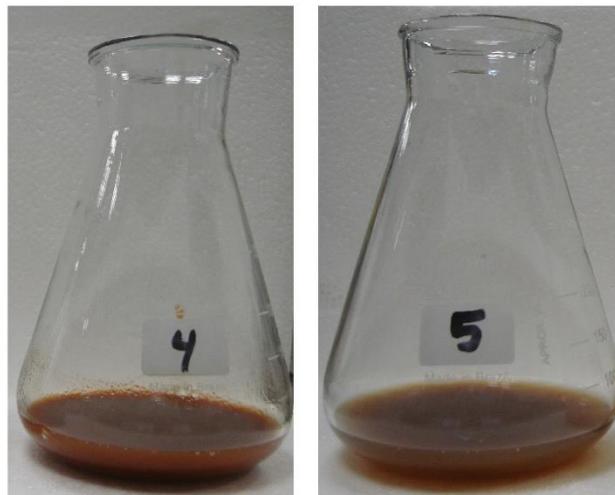


Figura 22: Fotos das amostras do Grupo 4 (tratamento com extrato de *Camellia sinensis*).



Figura 23: Foto dos líquidos preparados com os extratos de *Vitis vinífera* (4) e *Camellia sinensis* (5), respectivamente.



4.4 Simulação do processo de ativação da remineralização *in vitro*

Para este processo, realizou-se o método de ciclagem de pH por 8 dias, a fim de simular o processo de ativação da remineralização *in vitro*, de acordo com Queiroz *et al.* (2004).

A cada dia, os blocos foram imersos por 2 horas em 6,25 mL/mm² de solução desmineralizadora e imersos por 22 horas em 3.12 mL/mm² de solução remineralizadora, sob temperatura de 37 °C. Dentre as trocas de soluções, as amostras eram individualmente lavadas com água destilada e deionizada por 1 minuto e secas com papel absorvente. Para evitar saturação das soluções, as mesmas foram trocadas no 4º dia de ciclagem (PINHEIRO, 2004).

A saber, a solução desmineralizadora é composta por 1,4 mM de cálcio, 0,91 mM de fosfato, 0,06 µg F/mL, pH 5,0, enquanto que a solução remineralizadora é composta de 1,5 mM de cálcio, 0,9 mM de fosfato, 150 mM de KCl, 0,05 µg F/mL, 0,1 M de tampão Tris, pH 7,0.

4.5 Avaliação pelo Sistema de Imagens por Fluorescência (SIF)

Para análise das alterações na fluorescência da dentina após os tratamentos e após a ciclagem de pH, foi utilizado um Sistema de Imagens por Fluorescência (SIF) em cooperação com o Prof. Emery C. C. C. Lins, da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), cuja representação do modelo é mostrada na Figura 24.

Figura 24: Representação do Sistema de Imagens por Fluorescência.

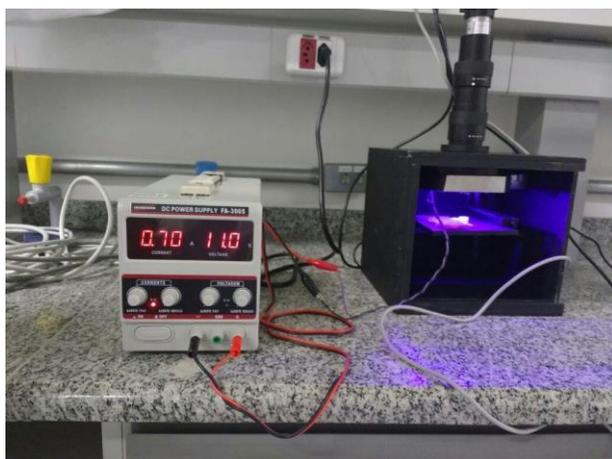


Fonte: (LINS, 2009).

O sistema é composto por uma câmera científica modelo MVBlueFox 121C (Matrix Vision GmHb, Alemanha) em conjunto com uma lente objetiva com amplificação de até 10x, modelo #54-363 (Edmund Optics, EUA) para ajuste do campo de visão com a melhor resolução possível. A iluminação é feita por LEDs que emitem em banda larga de 350 nm a 1900 nm. Posicionou-se uma roda eletromecânica de filtros ópticos modelo CFW-1-8 (Finger Lakes Instrumentation, EUA) no caminho óptico da câmera antes da focalização da lente, para permitir a captura de imagens no espectro do verde em $550\text{nm} \pm 10\text{nm}$, a principal banda de emissão da hidroxiapatita. Na Figura 25 pode ser observado o sistema utilizado nos experimentos.

Para padronização da emissão dos diodos, antes da aquisição das primeiras imagens, foi realizado a aferição da potência óptica que estava sendo emitida pelos LEDs, através de um medidor de potência (FieldMaxII, Coherent, USA). O procedimento foi repetido a cada 10 imagens adquiridas. Para a aquisição das imagens, as amostras foram posicionadas duas a duas (lado a lado) em uma marca feita na placa de suporte das amostras, para garantir a posição padronizada das amostras e que a energia recebida pelas amostras em cada aquisição tivesse uma pequena variação.

Figura 25: Fotografia do Sistema de Imagens por Fluorescência utilizado nos experimentos.



Uma cerâmica de uso odontológico E-max foi empregada como referência para possibilitar um estudo comparativo entre as intensidades de fluorescência observadas em todas as imagens obtidas.

Para uma maior padronização do procedimento, os principais cuidados que foram tomados em relação às amostras são: em relação ao tamanho das regiões de exposição à

ciclagem das amostras (4x2mm); garantir que as amostras não desidratem (durante armazenamento as amostras devem ser colocadas junto a algodão úmido e durante a aquisição de imagens as amostras não devem ser deixadas sobre as bancadas, além de tentar minimizar o tempo da captura das imagens, pois a exposição à luz do LED aumenta a temperatura das amostras); garantir agilidade entre o tempo de preparo das amostras, seu tratamento e ciclagem, de modo a evitar contaminações e proliferação de fungos nas amostras.

Visto que a desidratação influencia na fluorescência das amostras, executou-se a aquisição das imagens imediatamente após a retirada das amostras do ambiente umedecido. Cada amostra foi retirada e seca com papel absorvente para que fossem posicionadas no interior do equipamento SIF. Logo após a captura das imagens, as amostras eram repostas no ambiente úmido no qual estavam sendo mantidas.

A captura das imagens foi feita utilizando o software *wxPropView* (*driver version 2.5.17.1054*) utilizado no programa *Labview*®. O reconhecimento da câmera pelo *software* era confirmado pela tela aberta do item “mvBlueFox-211-C”. O reconhecimento proporcionava que a configuração da câmera fosse feita no programa *Matrix Vision Hardware Configuration Tool* (Matrix Vision GmbH, USA), onde era possível ajustar o ganho da câmera para 10 dB e tempo de exposição para 10^6 μ s. Com as amostras já posicionadas, a caixa era fechada, as imagens eram adquiridas e salvas em formato *bitmap*.

Para realizar uma comparação, as imagens foram obtidas imediatamente após os tratamentos de cada grupo e ao final da ciclagem de pH. Neste trabalho, uma nova metodologia de análise dos dados foi proposta.

Na análise das imagens coloridas obtidas no formato .bmp, estas foram carregadas em um software GIMP (GNU *Image Manipulation Program*, release 2.8.22) e convertidas em imagens em escala de cinza. Foram levadas como regiões de interesse (ROI – Region Of Interest), as regiões ativas das amostras submetidas à ciclagem de pH e aos tratamentos. Como referência, utilizou-se o ROI de uma cerâmica de uso odontológico E-max. O ROI foi padronizado com uma geometria quadrada de tamanho fixo de 80 x 80 pixels, para que fossem obtidos os histogramas.

Para análise dos dados foi verificado o valor de brilho da imagem no pico do gráfico, ou seja, o valor de brilho com maior número de contagem de pixels na ROI, seu valor foi registrado e foram calculadas suas médias e desvios padrões relacionados. Os valores obtidos nas amostras de dentina foram divididos pelo valor de brilho da

cerâmica, a fim de minimizar os efeitos advindos da variação da fonte de tensão e para normalização dos dados.

A análise de brilho parte da hipótese que há uma relação entre o brilho na imagem e a fluorescência da amostra, de modo que, quanto maior o brilho, maior é a fluorescência daquela amostra e, quanto maior a desmineralização, menor é o brilho das imagens (BRITO, 2014).

No software da câmera é possível configurar os parâmetros de ganho em dB e o tempo de exposição, os quais foram padronizados de modo que a ROI possua brilho. Todas as capturas foram feitas com os mesmos parâmetros e com o mesmo *zoom* na imagem. Além disso, todas as fontes de iluminação diferentes da iluminação do próprio sistema, como a luz do laboratório, foram desligadas para que não influenciassem a medida.

Na Figura 26 é mostrado um exemplo de imagem capturada com filtro de $550\text{nm} \pm 10\text{nm}$, na qual 5 amostras de dentina são dispostas em cima de uma cera tipo 7, de modo a ficar na mesma altura que a cerâmica de referência para que ambas tenham o mesmo foco dado o *zoom* da câmera:

Figura 26: Representação de uma imagem obtida pelo Sistema de Imagens por Fluorescência (SIF), com indicação do que se refere a amostra, cera, cerâmica e fita crepe.



A imagem é então convertida para a escala de tons de cinza e selecionada uma ROI de tamanho fixo, como mostrado na Figura 27.

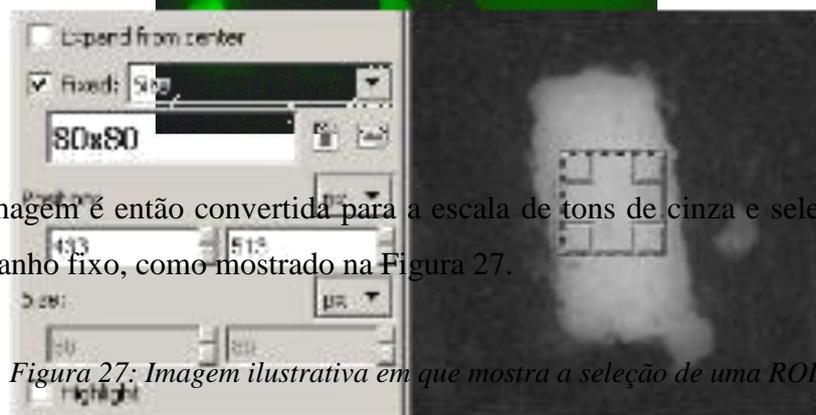
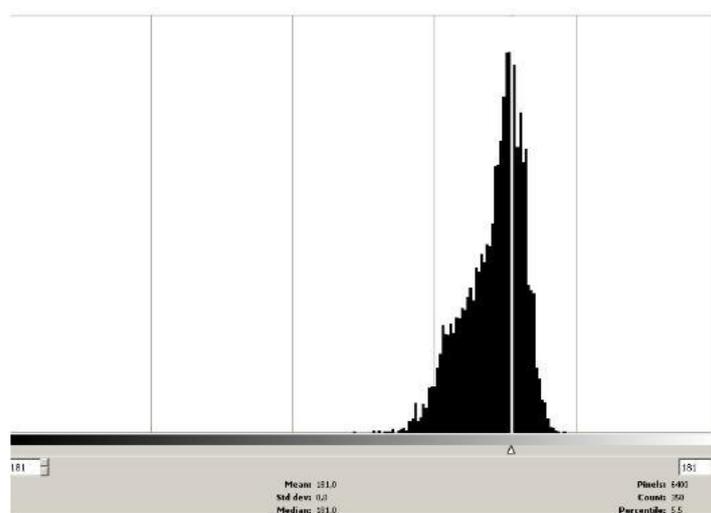


Figura 27: Imagem ilustrativa em que mostra a seleção de uma ROI.

A partir dessa seleção foi feito o histograma da ROI e localizado o ponto na escala de tons de cinza onde há a maior contagem de pixels. O próprio software já traz as informações dos eixos x (valor do tom de cinza em 8 bits, de 0 a 255) e eixo y (contagem de pixels), como mostrado na Figura 28.

Figura 28: Histograma apresentado pelo software para uma determinada ROI selecionada.



Esse procedimento foi repetido para todas as amostras antes e depois da ciclagem de pH.

A normalização dos dados foi feita através da Equação 8.

$$Intensidade_{normalizada} = \frac{Pico\ Intensidade\ amostra}{Pico\ Intensidade\ cerâmica} \quad (\text{Equação 8})$$

A análise estatística foi efetuada considerando-se os valores já normalizados.

Para tal, foram consideradas, como unidades experimentais, os blocos de dentina radicular bovina, a variável resposta são os tons de cinza (entre 0 e 255) do pico do histograma, no eixo x, e a sua contagem de pixels, no eixo y; e o fator de variação foi considerado o tratamento. O nível de significância adotado foi de 5%. Para as análises, foi utilizado o software BioStat 5.0, empregando-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido de Student-Newman-Keuls, quando necessário.

Esse procedimento foi repetido para todas as amostras antes e depois da ciclagem de pH.

4.6 Avaliação por Espectroscopia de Absorção no Infravermelho por Transformada de Fourier (ATR-FTIR)

Para análise composicional das amostras, empregou-se a Espectroscopia de Absorção no Infravermelho por Transformada de Fourier – FTIR. Em todas as amostras, a técnica utilizada foi a ATR-FTIR por permitir uma análise não destrutiva e por permitir que a análise fosse realizada em vários momentos do estudo. Esta técnica foi considerada como a mais indicada por proporcionar a avaliação de regiões mais superficiais, já que possui uma profundidade de penetração de aproximadamente 0,66 μm , por utilizar um cristal de diamante ao invés do cristal de Seleneto de Zinco (ZnSe), que proporciona uma profundidade de penetração da ordem de 2 μm (dados calculados). Este valor pode ser calculado pela Equação 4.

Os experimentos foram conduzidos no sistema de microespectroscopia instalado no Laboratório de Biofotônica e Óptica Biomédica da Universidade Federal do ABC – São Bernardo do Campo. O equipamento consiste em um Microespectrômetro FTIR 610 acoplado ao Espectrômetro FTIR 660 (Varian Inc., EUA). O equipamento é utilizado em ambiente controlado com temperatura de 17°C e umidade de 40%, a fim de evitar que estes fatores influenciem na obtenção dos dados.

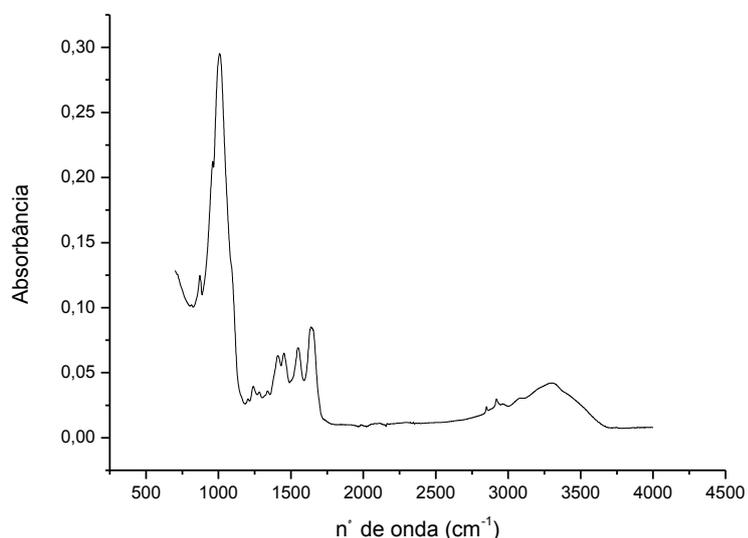
Para aquisição dos dados, realizaram-se medições em um único ponto central de cada amostra, sendo que em cada leitura foram feitos 80 *scans* com resolução de 4 cm^{-1} , com tomada de *background* a cada 5 amostras, na região entre 700 a 4000 cm^{-1} (Zezell *et al.*). Utilizou-se um programa específico do espectrômetro (Varian Resolutions Pro., Varian Inc., EUA) para realizar o registro e conversão dos espectros. Os dados foram salvos e arquivados no formato *.csv*.

A visualização dos espectros foi feita com auxílio do programa OriginPro

(versão 8.0 - Origin®, OriginLab Corp., USA), de tal forma que fosse possível realizar uma análise qualitativa descritiva e semi-quantitativa dos grupos experimentais. Sabe-se que os picos de bandas dos componentes da matriz orgânica e inorgânica dos tecidos duros dentais, estão compreendidas entre 800 e 1720 cm^{-1} , salve pequenas variações observadas dependendo da característica de cada equipamento, da técnica utilizada e do tecido dentário utilizado (Zezell *et al.*).

Inicialmente foi plotado um gráfico com os dados adquiridos para cada amostra. Um exemplo pode ser observado na Figura 29.

Figura 29: Exemplo de um espectro plotado com os dados obtidos pelo equipamento ATR-FTIR para uma determinada amostra.



O espectro de uma amostra não tratada (amostra controle) foi adquirido para que fossem identificadas as principais bandas de absorção, a fim de definir a melhor forma de análise. Após identificadas, considerou-se como range e pico das bandas os seguintes valores (Tabela 9).

Tabela 9: Valores dos ranges e dos picos das bandas considerados no experimento.

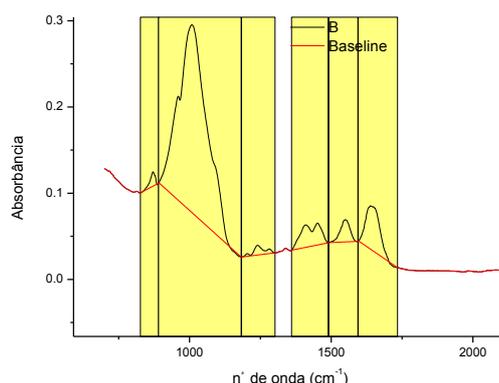
Range e pico das bandas	
ν_2 carbonato	826 a 888 cm^{-1}
Fosfato	888 a 1185 cm^{-1}
Amida 3	1185 a 1300 cm^{-1}

ν_3 e ν_4 carbonato	1300 a 1516 cm^{-1}
Amida 2 + carbonato	1516 a 1590 cm^{-1}
Amida 1	1590 a 1720 cm^{-1}
Água	2500 a 3664 cm^{-1}

Para realização de uma análise semi-quantitativa entre os grupos experimentais, foi necessário realizar a normalização das bandas pela banda do fosfato. A normalização foi feita calculando as áreas sob as bandas de absorção de interesse e, posteriormente, foram divididas pela área sob a banda do fosfato, uma vez que este trata-se do componente mais estável da dentina. Este procedimento é efetuado para que sejam removidas as variações decorrentes do sinal infravermelho durante a execução dos experimentos (CORRÊA-AFONSO. 2012).

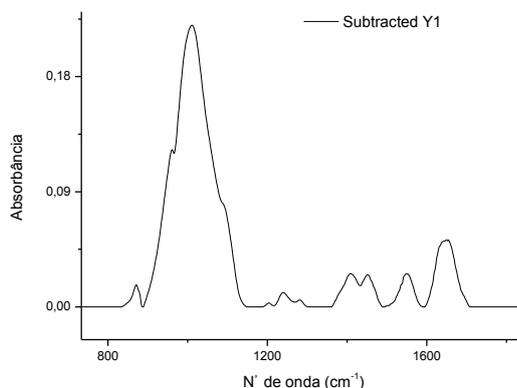
A grande dificuldade em realizar o cálculo das áreas das bandas, está no fato de ocorrer uma sobreposição de bandas, tornando difícil verificar onde inicia e onde termina a área de uma banda. Foi escolhido o método de integração para o efetuar o cálculo das áreas. Para tal, foi traçado um *baseline* nas bandas de interesse, conforme a Figura 30.

Figura 30: Exemplo de um *baseline* traçado em um espectro, considerando as 6 bandas de interesse neste projeto..



Após traçados os *baseline*, é efetuada a subtração deste ajuste, fazendo com que as bandas de interesse selecionadas fiquem com sua base coincidente com o zero do eixo das ordenadas (Figura 31), tornando possível calcular a área sob a banda através de uma integral da área sob a curva.

Figura 31: Exemplo de um espectro obtido após efetuada a subtração para que as bandas coincidisse com o zero do eixo das ordenadas.



Com as áreas das bandas calculadas, efetuou-se a divisão dos valores encontrados pelo valor da área da banda do fosfato, a fim de normalizar os dados. Para normalização dos dados, foi utilizada a Equação 9.

$$\text{Área}_{normalizada} = \frac{\text{Área da banda de interesse}}{\text{Área da banda do fosfato}} \quad (\text{Equação 9})$$

A análise estatística foi efetuada considerando-se os valores já normalizados. Para tal, foram consideradas, como unidades experimentais, os blocos de dentina radicular bovina, a variável resposta os valores das áreas normalizadas para cada banda de interesse dos espectros, a saber: ν_2 carbonato, Amida 3, ν_3 e ν_4 carbonado, Amida 2 + carbonato e Amida 1; e o fator de variação foi considerado o tratamento. O nível de significância adotado foi de 5%. Para as análises, foi utilizado o software BioStat, empregando-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido de Student-Newman-Keuls, quando necessário.

4.7 Avaliação por Tomografia por Coerência Óptica (OCT)

Foi utilizado o equipamento de OCT Callisto (Thorlabs, New Jersey, USA), pertencente a Central Multiusuário da Universidade Federal do ABC (CEM-UFABC). Uma foto do equipamento pode ser observada na Figura 32.

Figura 32: OCT Thorlabs Callisto pertencente a Central Multiusuário da Universidade Federal do ABC - São Bernardo do Campo.



Para que as aquisições das imagens fossem padronizadas, foram utilizados os mesmos parâmetros de imagem em todas aquisições. Os parâmetros aplicados encontram-se na Tabela 10.

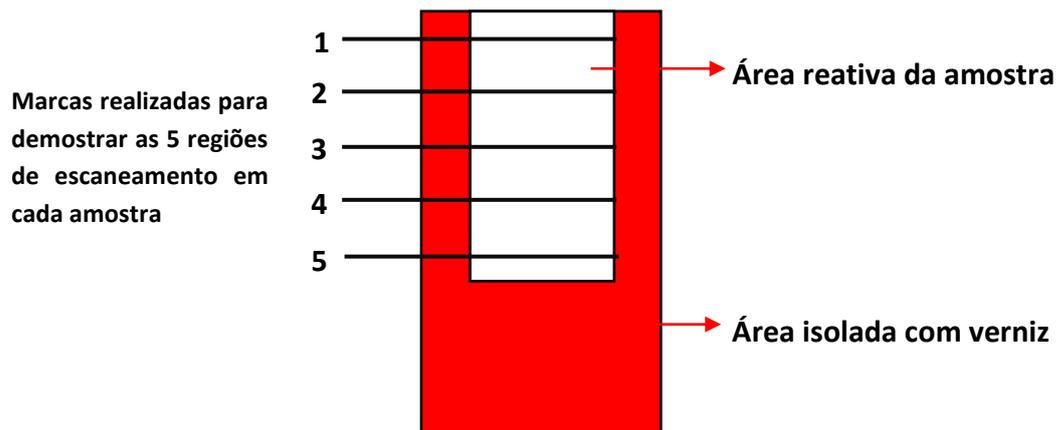
Tabela 10: Parâmetros scan utilizados no OCT para aquisição das imagens.

Parâmetros de Scan			
	X	Y	
Tamanho	2000	512	pixel
Campo de visão (FOV)	4,69	1,71	mm
Tamanho do pixel	2,35	3,34	µm

Cada amostra foi posicionada no equipamento sob uma pequena quantidade de massa de modelar, a fim de deixá-la planificada perante a câmera e também para evitar que a amostra alterasse de lugar. O esmalte aplicado para delimitar a área ativa de 8 mm² foi mantido, evitando assim que a amostra entrasse em contato direto com a massa de modelar.

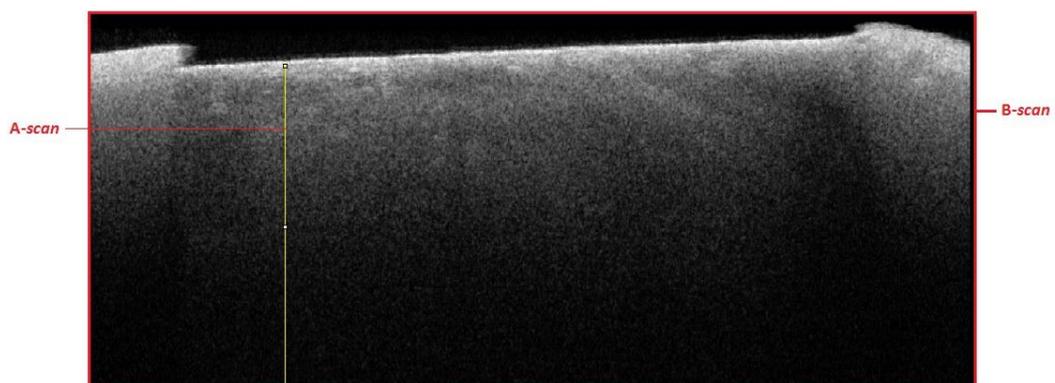
Em cada amostra foram efetuados 5 escaneamentos igualmente espaçados a uma distância de 500 µm, para que fosse possível avaliar a efetividade do tratamento em toda superfície ativa da amostra, conforme pode ser observado na Figura 33.

Figura 33: Imagem ilustrativa para demonstrar as regiões, igualmente espaçadas em 5 µm, onde foram realizados os escaneamentos nas amostras.



O software ImageJ (JAVA based image processing, National Institutes of Health) foi utilizado para visualização e análise das imagens. Para tal foram capturados 5 dados *A-scan* de cada imagem *B-scan* adquirida com o OCT. Durante a delimitação da região *A-scan* a ser analisada, tomou-se cuidado para que não fossem capturados os pixels pretos do ar, conforme pode ser observado na Figura 34.

Figura 34: Imagem *B-scan* de uma determinada amostra, com a delimitação de uma região *A-scan* feita no software ImageJ. Lembrando que em cada imagem *B-scan*, foram feitos 5 escaneamentos *A-scan*.



Para cada *A-scan* o software fornecia um Gráfico (Tom de cinza x Distância), além de uma Tabela com os dados organizados, onde X representa o pixel e Y o tom de cinza atribuído para este pixel, com $0 < Y < 255$. Um exemplo do Gráfico e da Tabela fornecidos encontram-se nas Figuras 35 e 36, respectivamente.

Figura 35: Exemplo do Gráfico (Tom de cinza X Distância) fornecido pelo software ImageJ para um determinado *A-scan* analisado para uma amostra.

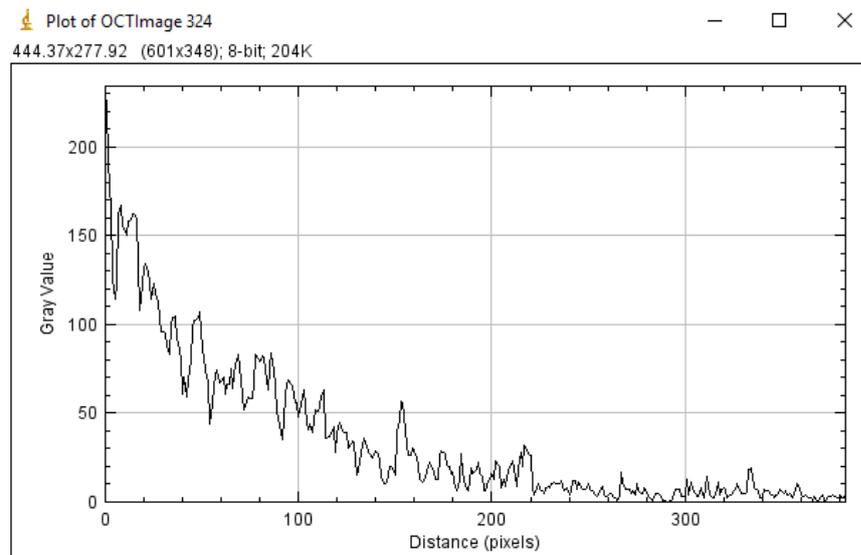


Figura 36: Exemplo de uma Tabela obtida para um Gráfico fornecido pelo software ImageJ para um determinado A-scan analisado para uma amostra, onde X representa o pixel e Y o tom de cinza atribuído para este pixel.

X	Y
0	234
1	219
2	173
3	169
4	125
5	114
6	123
7	162
8	167
9	156
10	152
11	150
12	158
13	159
14	160

É importante destacar que a resolução de todas as imagens foi mantida, de tal forma que os valores de pixel pudessem ser convertidos para uma escala de profundidade, sendo que a cada pixel a profundidade aumentava até o máximo de $3,34 \times 10^{-3}$ mm. Para conversão dos dados foi utilizado o *software* Microsoft Excel 2016.

Com os dados já convertidos utilizou-se o *software* Origin Pro 8 para realizar o cálculo do coeficiente de atenuação óptica. Foi efetuado um ajuste exponencial dos

dados utilizando a função Exp2PMod1, representada na Equação 10.

$$y = ae^{bx} \quad (\text{Equação 10})$$

Segundo Maia *et al.* 2015, o coeficiente de atenuação óptica pode ser calculado pela Equação 11, onde $I(z)$ representa a intensidade do pixel em função da profundidade z e μ representa o coeficiente de atenuação óptica (MAIA; FREITAS, 2015).

$$I(z) = I_0 e^{-2\mu z} \quad (\text{Equação 11})$$

Realizando uma breve comparação entre as Equações 10 e 11, verifica-se à similaridade entre ambas, a não ser pela diferença de o μ estar sendo multiplicado por -2 na Equação 11. Esta multiplicação por -2 pode ser explicada pelo fato de nos equipamentos de OCT o detector estar posicionado acima da amostra, paralelamente a fonte *laser*. Por este motivo, para que o feixe efetue a varredura na amostra e retorne ao detector, ele irá percorrer duas vezes a amostra (ida e volta). Levando isso em consideração, para que fosse obtido o coeficiente de atenuação óptica foi necessário dividir o b da Equação 10 por -2, conforme demonstrado na Equação 12. O sinal negativo do μ indica o decaimento exponencial do sinal.

$$\mu = \frac{b}{-2} \quad (\text{Equação 12})$$

Após efetuado o ajuste exponencial no Origin 8 Pro, o valor de b era fornecido e em seguida copiado para uma Tabela elaborada no *software* Microsoft Excel 2016, a fim de calcular o coeficiente de atenuação óptica (μ) e para que os dados fossem mantidos organizados. Para cada B-scan foram obtidos 5 valores de μ (1 para cada A-scan adquirido da amostra). A média do coeficiente de atenuação óptica para cada amostra foi calculado realizando a média desses 5 valores de μ e também seu respectivo desvio padrão experimental.

A análise estatística foi efetuada no *software* Biostat 5.0. Os blocos de dentina foram adotados como unidades experimentais; os tratamentos foram considerados como fatores de variação; o coeficiente de atenuação óptica das lesões foram considerados

como variável de resposta, com nível de significância de 5%. Foi realizada a Análise de Variância e também o teste *Post Hoc* de Tukey.

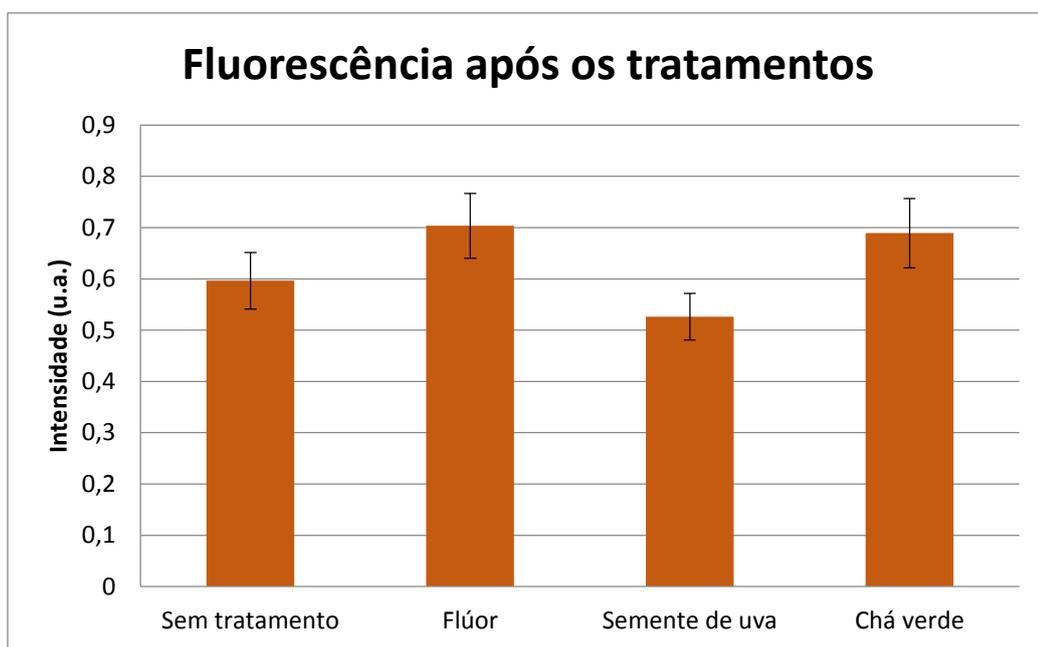
5. Resultados

5.1 Fluorescência

Ao iluminar com radiação no comprimento de onda de 405 nm, verificou-se que a dentina bovina fluoresce na região do verde, compreendida entre 492 nm e 577 nm.

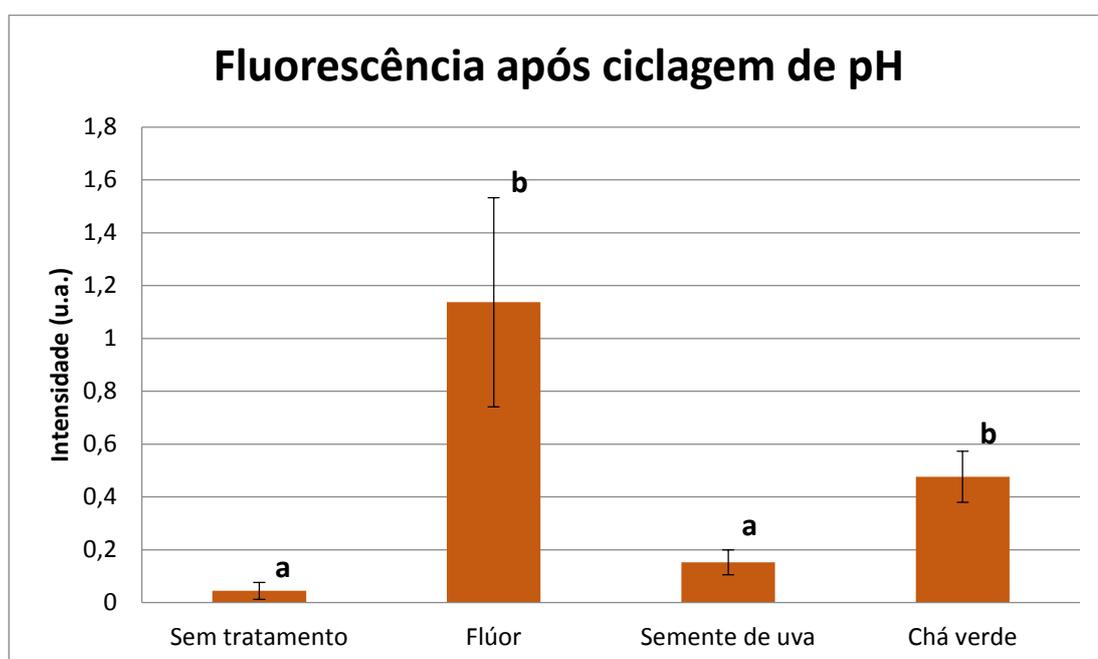
Os valores médios das intensidades de fluorescência após a realização dos tratamentos obtidos para os grupos experimentais e seus respectivos desvio padrão, foram: G1: $0,5963 \pm 0,0550$; G2: $0,7036 \pm 0,0632$; G3: $0,5262 \pm 0,0676$ e G4: $0,6891 \pm 0,0454$, conforme representado no gráfico abaixo (Figura 37).

Figura 37: Valores médios das intensidades de fluorescência obtidos para as amostras imediatamente após os tratamentos. As barras indicam o desvio padrão. Para análise estatística empregou-se o teste não paramétrico de Kruska-Wallis, tendo em vista que a distribuição foi não normal e foi verificado que não há diferença estatisticamente significativa entre os grupos.



Por sua vez, os valores médios das intensidades de fluorescência após a realização da ciclagem de pH obtidos para os grupos experimentais e seus respectivos desvio padrão, foram: G1: $0,04467 \pm 0,0318$; G2: $1,1371 \pm 0,3957$; G3: $0,1525 \pm 0,0963$ e G4: $0,4766 \pm 0,0467$, conforme representado no gráfico abaixo (Figura 38).

Figura 38: Valores médios das intensidades de fluorescência obtidos para as amostras imediatamente após os tratamentos. As barras indicam o desvio padrão. Para análise estatística empregou-se o teste não paramétrico de Kruska-Wallis, tendo em vista que a distribuição foi não normal e o teste Student-Newman-Keuls para contraste com nível de significância de 5%. Letras diferentes indicam médias estatisticamente significativamente diferentes.



5.2 ATR-FTIR

5.2.1 Avaliação da composição química dos extratos naturais

Nas Figuras 39, 40 e 41 podem ser observados os espectros do Flúor Fostato Acidulado (FFA), do extrato de *Vitis vinífera* e do extrato de *Camellia sinensis*, respectivamente. Estes espectros foram adquiridos com o equipamento de ATR-FTIR para região de 4000 a 500 cm^{-1} . Verifica-se que nos espectros podem ser observadas as distintas bandas de absorção correspondentes aos diferentes elementos que compõem o material. Para identificação das bandas foi tomado como fonte o trabalho de Movasaghi *et al.* (2008).

Figura 39: Espectro de absorção do FFA utilizado para tratar o Grupo 2, estudado na região compreendida entre 4000 - 500 cm^{-1} , obtido por ATR-FTIR. Para identificação das bandas considerar que: **A** - OH da água; **B** - Lipídeos; **C** - Polissacarídeos; **D** - Amida 2; **E** - Fosfolipídios e Polissacarídeos; **F** - Oligossacarídeos e **G** - Vibrações de torção fora do plano molecular.

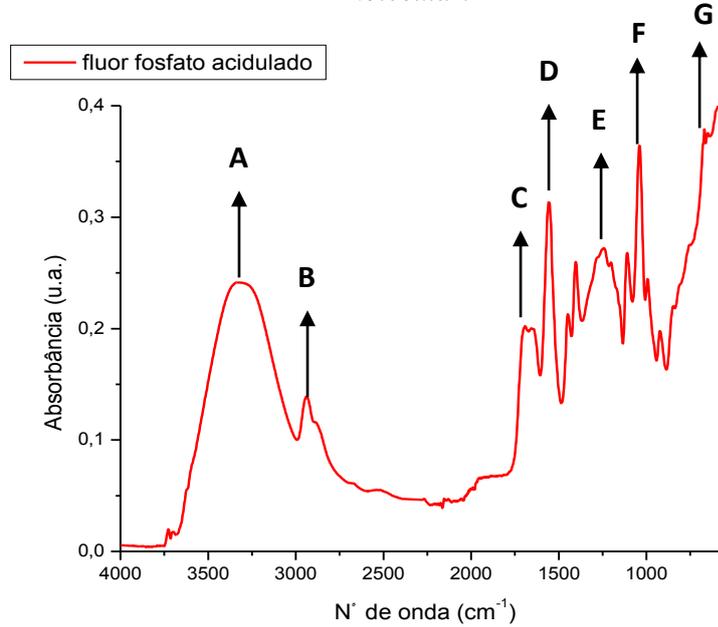


Figura 40: Espectro de absorção do extrato de *Vitis vinífera* utilizado para tratar o Grupo 3, estudado na região compreendida entre 4000 - 500 cm^{-1} , obtido por ATR-FTIR. Para identificação das bandas considerar que: **A** - OH da água e grupos funcionais das proantocianidinas; **B** - Lipídeos; **C** - Polissacarídeos; **D** - Picos característicos dos grupos funcionais das proantocianidinas; **E** - Fosfolipídios e Polissacarídeos; **F** - Oligossacarídeos e **G** - Vibrações de torção fora do plano molecular.

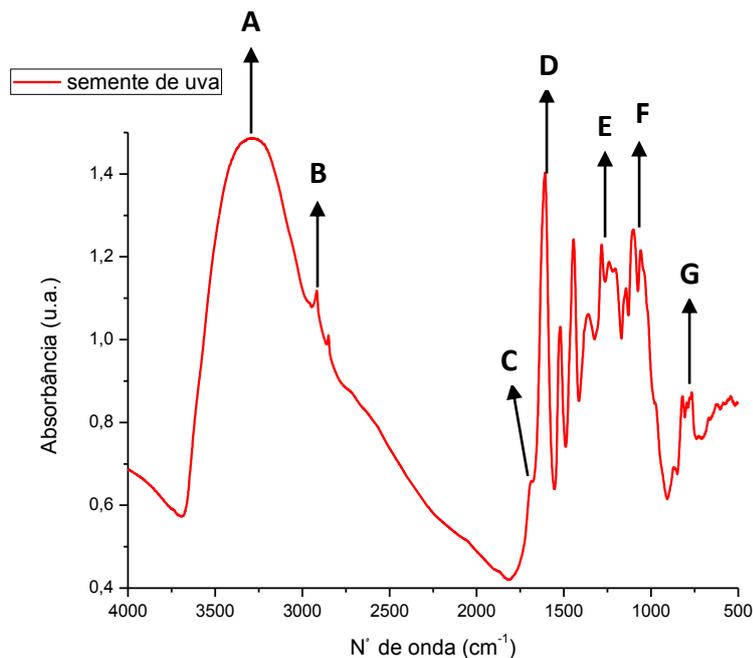
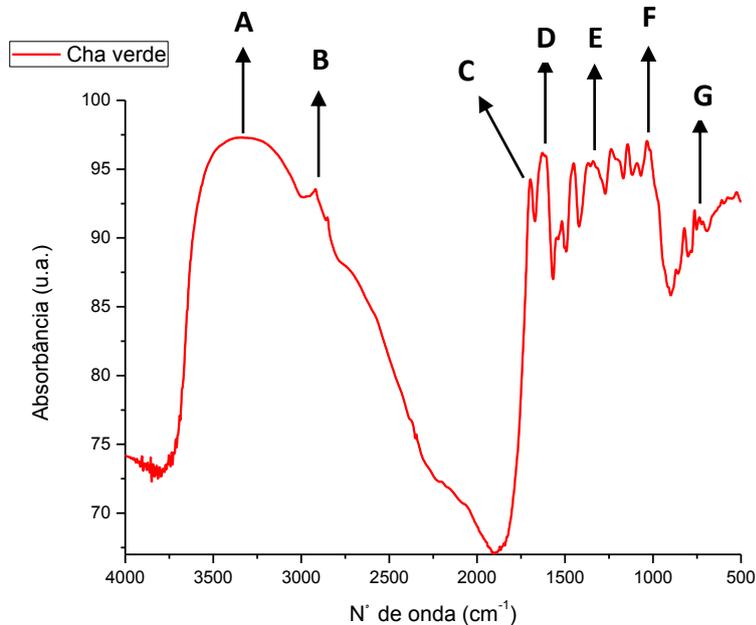


Figura 41: Espectro de absorção do extrato de *Camellia sinensis* utilizado para tratar o Grupo 3, estudado na região compreendida entre 4000 - 500 cm^{-1} , obtido por ATR-FTIR. Para identificação das bandas considerar que: **A** - OH da água e grupos funcionais das proantocianidinas; **B** - Lipídeos; **C** - Polissacarídeos; **D** - Picos característicos dos grupos funcionais das proantocianidinas; **E** - Fosfolipídios e Polissacarídeos; **F** - Oligossacarídeos e **G** - Vibrações de torção fora do plano molecular.



Definiu-se como:

Região A: Apresenta intensa banda de absorção compreendida entre 3700 e 3200 cm^{-1} . Segundo Movasaghi *et al.* (2008) pode-se inferir que esta banda está relacionada com o grupo -OH associado a água e a alguns grupos funcionais presentes nas estruturas das proantocianidinas presente nos extratos.

Região B: Apresenta intensa banda de absorção compreendida entre 3000 e 2700 cm^{-1} . Segundo Movasaghi *et al.* (2008) pode-se inferir que esta banda está relacionada com as ligações C-H presente nos lipídeos.

Região C: Pode ser observado um pico, relativamente, expressivo nos espectros dos extratos de *Vitis vinífera* e *Camellia sinensis* na região de pico próxima a 1730 cm^{-1} . Segundo Movasaghi *et al.* (2008) pode-se inferir que este pico está relacionado com as ligações C=O presente nos polissacarídeos.

Região D: Apresenta intensa banda de absorção compreendida entre 1700 e 1400 cm^{-1} . Segundo Movasaghi *et al.* (2008) é possível encontrar picos característicos das proantocianidinas em 1608 cm^{-1} , 1521 cm^{-1} e 1444 cm^{-1} , podendo

estar relacionado ao estiramento da ligação C=C presente nos anéis aromáticos de alguns polímeros de proantocianidinas presente nos extratos.

Região E: Apresenta intensa banda de absorção compreendida entre 1400 e 1200 cm^{-1} . Segundo Movasaghi *et al.* (2008) pode-se inferir que esta banda está relacionada com os fosfolipídios, polissacarídeos e ao estiramento C-OH dos fenóis.

Região F: Apresenta intensa banda de absorção compreendida entre 1200 e 900 cm^{-1} . Segundo Movasaghi *et al.* (2008) pode-se inferir que esta banda está relacionada com oligossacarídeos e algumas deformações CH de compostos aromáticos.

Região G: Apresenta intensa banda de absorção compreendida entre 900 e 500 cm^{-1} . Segundo Movasaghi *et al.* (2008) pode-se inferir que esta banda está relacionada uma região de vibrações de torção fora do plano molecular das ligações C-H de proteínas.

5.2.2 Avaliação da composição química das amostras

Nas Figuras 42, 43, 44 e 45 pode ser observado um espectro representativo obtido para cada grupo após os tratamentos, mas antes da ciclagem de pH, para os Grupos G1, G2, G3 e G4 respectivamente.

Figura 42: Espectro obtido na região de 700 - 4000 cm^{-1} para o grupo G1 (sem tratamento), antes que fosse realizada a ciclagem de pH.

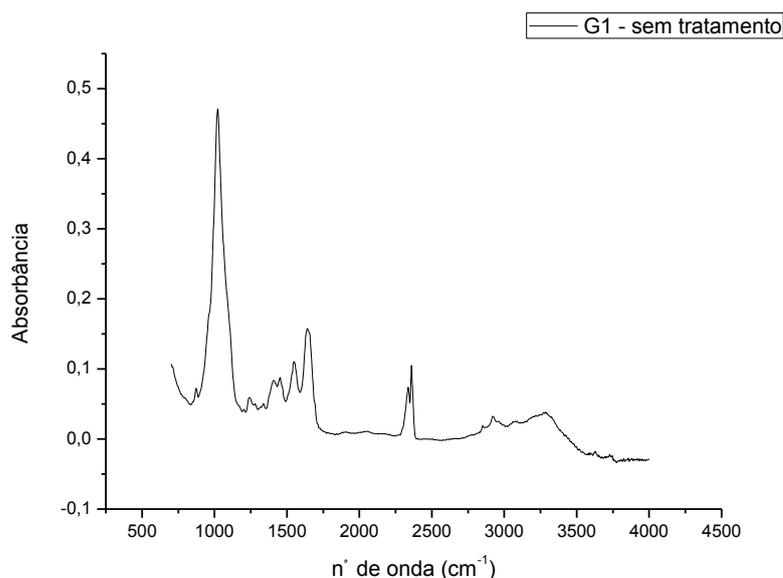


Figura 43: Espectro obtido na região de 700 - 4000 cm^{-1} para o grupo G2 (tratado com FFA), antes que fosse realizada a ciclagem de pH.

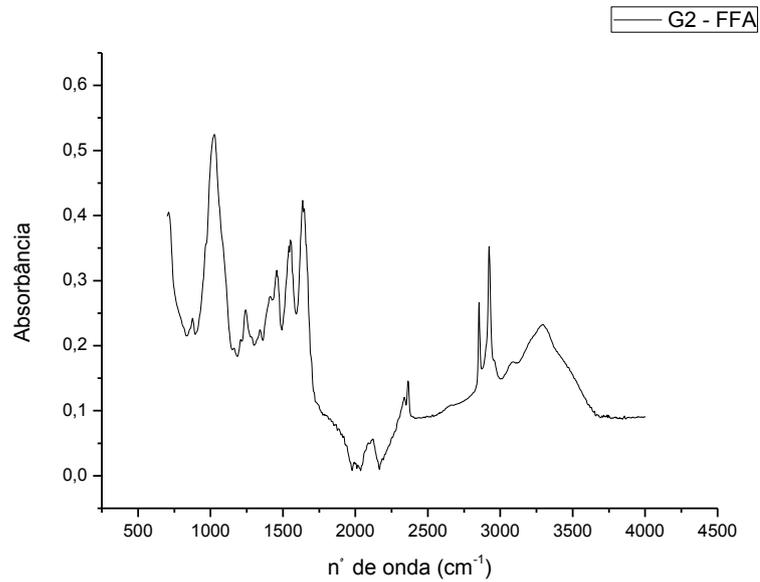


Figura 44: Espectro obtido na região de 700 - 4000 cm^{-1} para o grupo G3 (tratado com *Vitis vinífera*), antes que fosse realizada a ciclagem de pH.

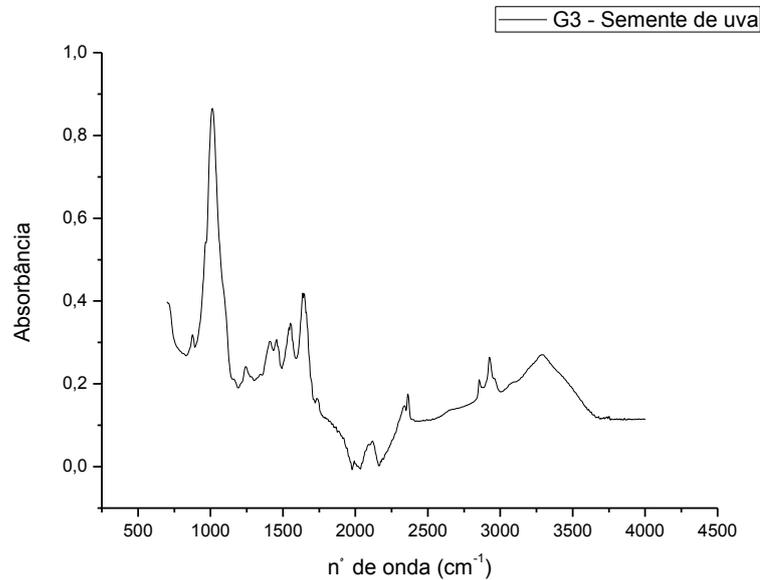
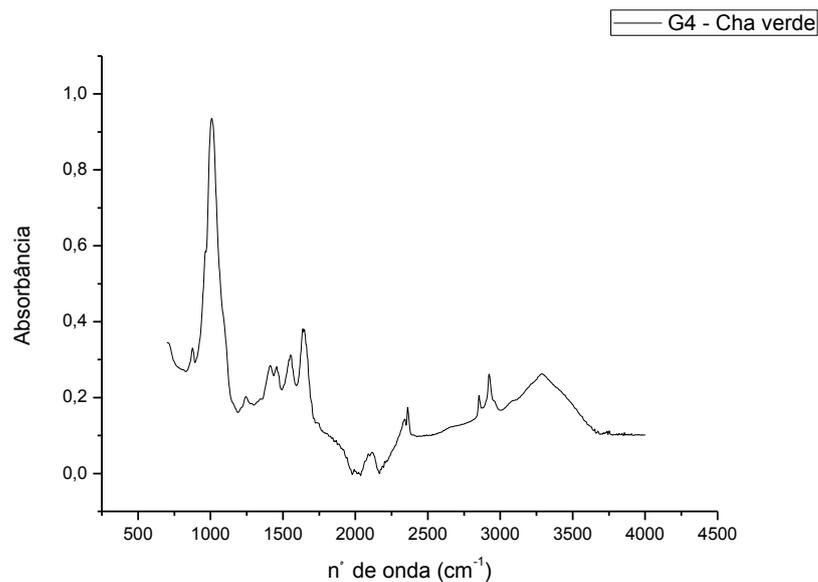


Figura 45: Espectro obtido na região de 700 - 4000 cm^{-1} para o grupo G4 (tratado com *Camellia sinensis*), antes que fosse realizada a ciclagem de pH.



Por sua vez, nas Figuras 46, 47, 48 e 49 pode ser observado 1 espectro representativo obtido após os tratamentos e após a ciclagem de pH, para os Grupos G1, G2, G3 e G4 respectivamente.

Figura 46: Espectro obtido na região de 700 - 4000 cm^{-1} para o grupo G1 (sem tratamento), após realizada a ciclagem de pH.

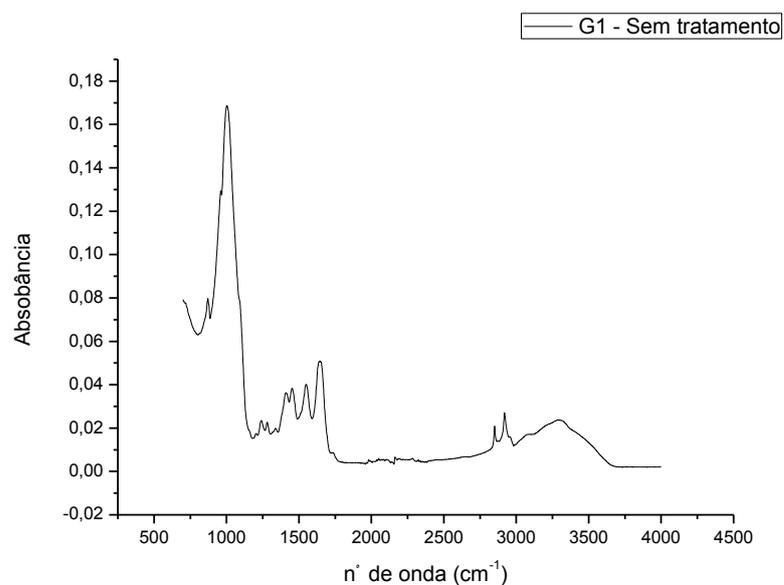


Figura 47: Espectro obtido na região de 700 - 4000 cm^{-1} para o grupo G2 (tratado com FFA), após realizada a ciclagem de pH.

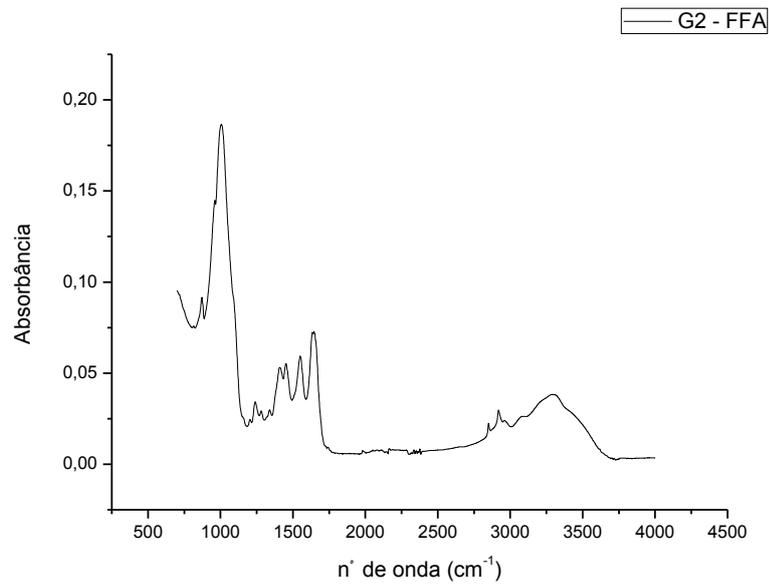


Figura 48: Espectro obtido na região de 700 - 4000 cm^{-1} para o grupo G3 (tratado com *Vitis vinífera*), após realizada a ciclagem de pH.

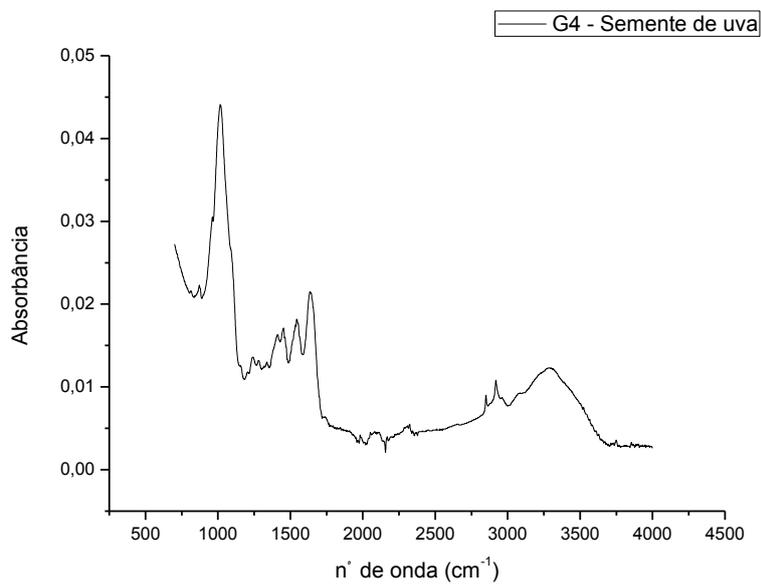
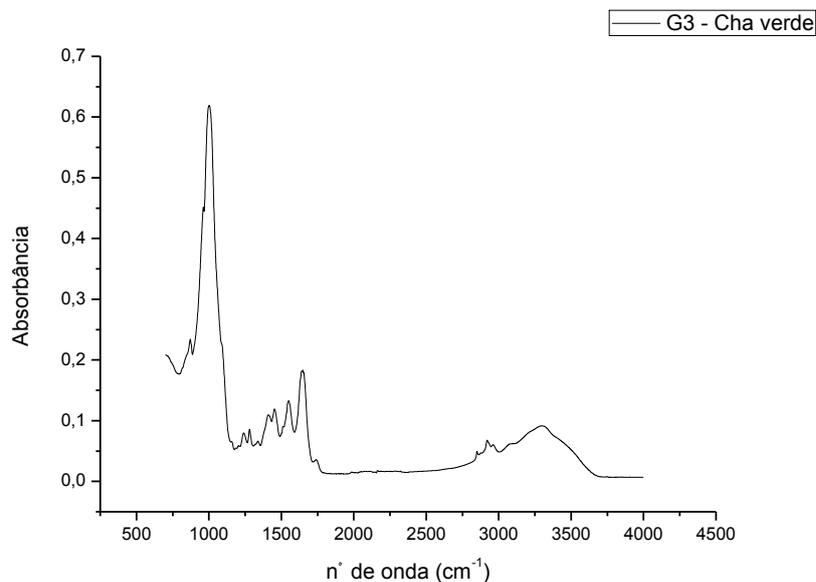


Figura 49: Espectro obtido na região de 700 - 4000 cm^{-1} para o grupo G4 (tratado com *Camellia sinensis*), após realizada a ciclagem de pH.



Os gráficos das Figuras 50, 51, 52, 53 e 54 mostram os resultados obtidos após realizada a análise composicional semi-quantitativa das amostras pré-ciclagem de pH, obtidos efetuando a razão entre os valores das áreas sob as referidas bandas de interesse em relação à área calculada para banda do fosfato

Figura 50: Gráfico que faz a comparação entre as áreas sob a banda de absorção do ν_2 carbonato pré-ciclagem de pH, após normalização pela banda do fosfato. As barras informam o desvio padrão encontrado para cada grupo. Letras diferentes indicam médias estatisticamente significativamente diferentes ($p < 0,05$) após realização do teste de Kruskal-Wallis e Student-Newman-Keuls.

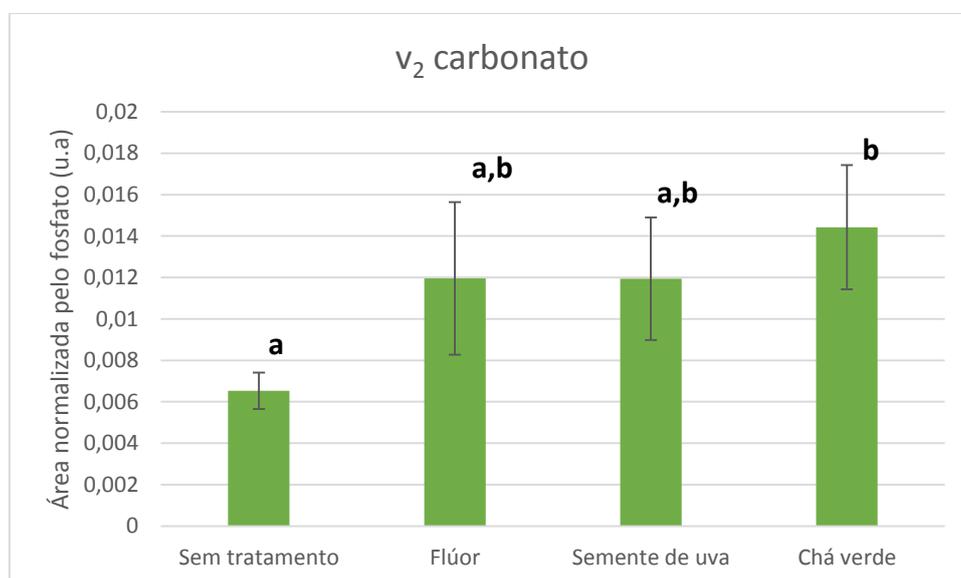


Figura 51: Gráfico que faz a comparação entre as áreas sob a banda de absorção da Amida 3 pré-ciclagem de pH, após normalização pela banda do fosfato. As barras informam o desvio padrão encontrado para cada grupo. Neste caso não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p = 0,1143$) após realização do Teste de Kruskal-Wallis

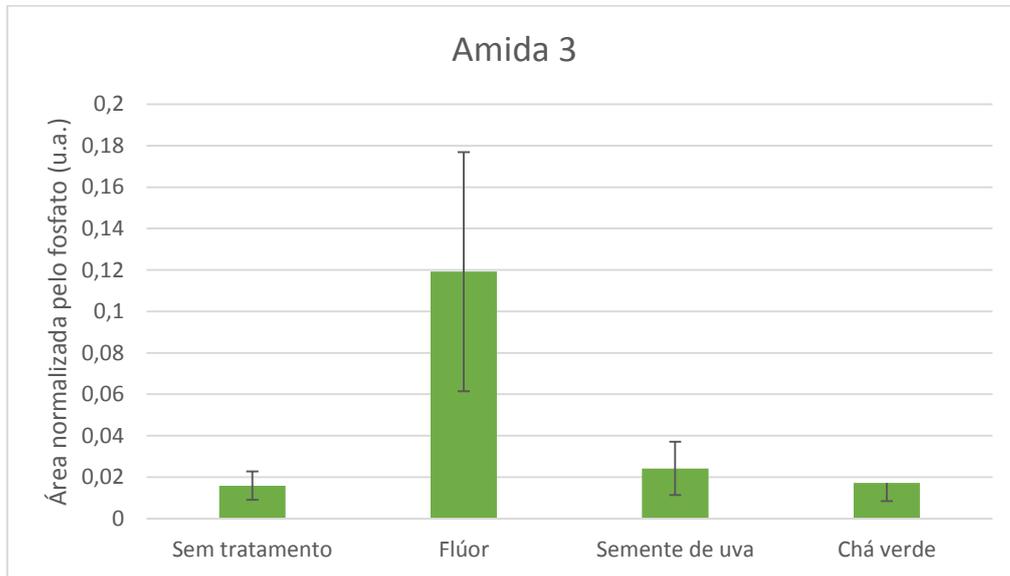


Figura 52: Gráfico que faz a comparação entre as áreas sob a banda de absorção do ν_3 e ν_4 carbonato pré-ciclagem de pH, após normalização pela banda do fosfato. As barras informam o desvio padrão encontrado para cada grupo. Letras diferentes indicam médias estatisticamente significativamente diferentes ($p < 0,05$) após realização do teste de Kruskal-Wallis e Student-Newman-Keuls.

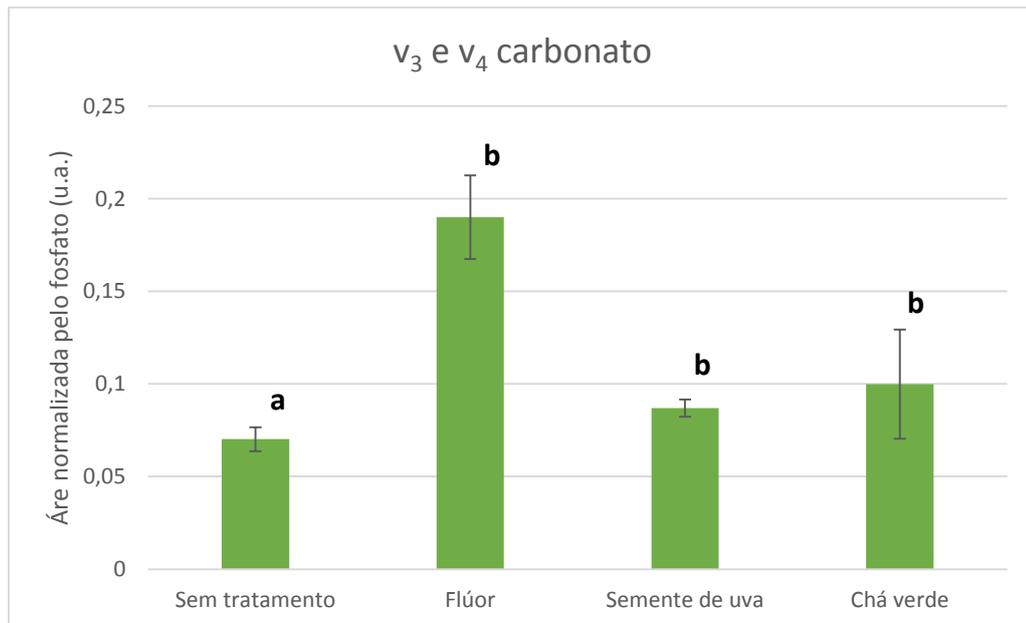


Figura 53: Gráfico que faz a comparação entre as áreas sob a banda de absorção da Amida 2 + carbonato pré-ciclagem de pH, após normalização pela banda do fosfato. As barras informam o desvio padrão encontrado para cada grupo. Neste caso não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p = 0,1551$) após realização do Teste de Kruskal-Wallis.

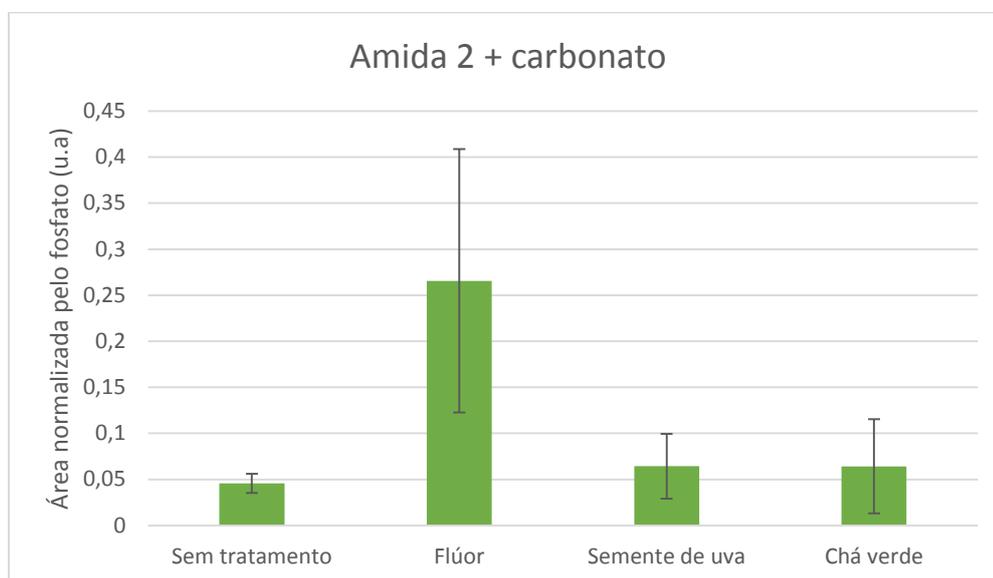
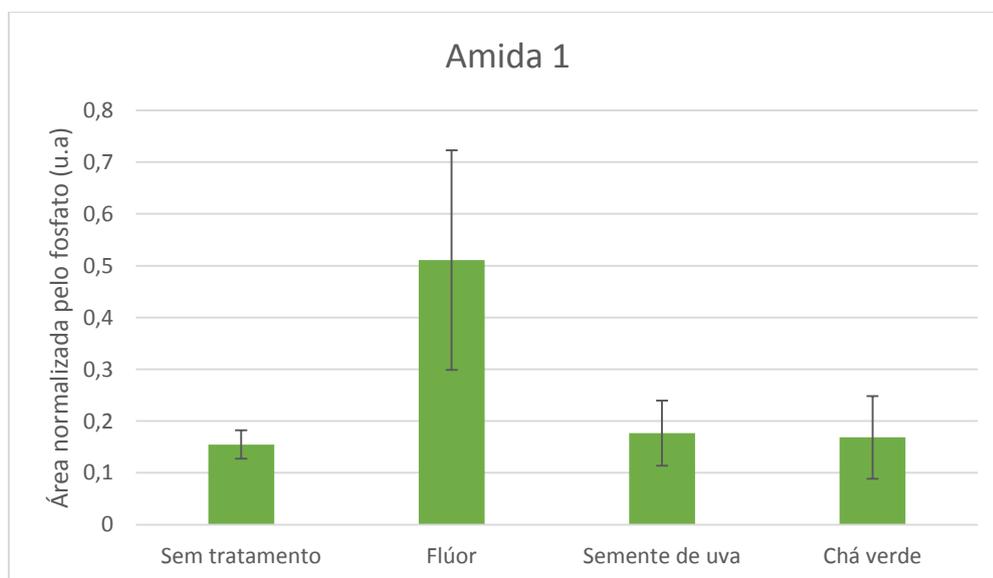


Figura 54: Gráfico que faz a comparação entre as áreas sob a banda de absorção da Amida 1 pré-ciclagem de pH, após normalização pela banda do fosfato. As barras informam o desvio padrão encontrado para cada grupo. Neste caso não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p = 0,1648$) após realização do Teste de Kruskal-Wallis



Os gráficos das Figuras 55, 56, 57, 58 e 59 mostram os resultados obtidos após realizada a análise composicional semi-quantitativa das amostras pós-ciclagem de pH, obtidos efetuando a razão entre os valores das áreas sob as referidas bandas de interesse

em relação à área calculada para banda do fosfato

Figura 55: Gráfico que faz a comparação entre as áreas sob a banda de absorção do v_2 carbonato pós-ciclagem de pH, após normalização pela banda do fosfato. As barras informam o desvio padrão encontrado para cada grupo. Neste caso não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p = 0,8690$) após realização do Teste de Kruskal-Wallis.

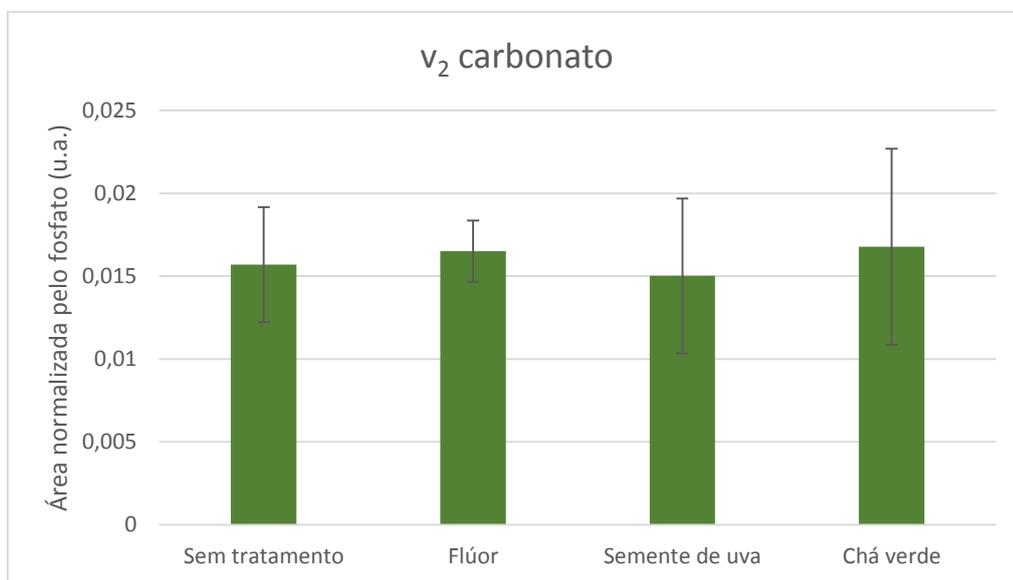


Figura 56: Gráfico que faz a comparação entre as áreas sob a banda de absorção da Amida 3 pós-ciclagem de pH, após normalização pela banda do fosfato. As barras informam o desvio padrão encontrado para cada grupo. Neste caso não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p = 0,1139$) após realização do Teste de Kruskal-Wallis.

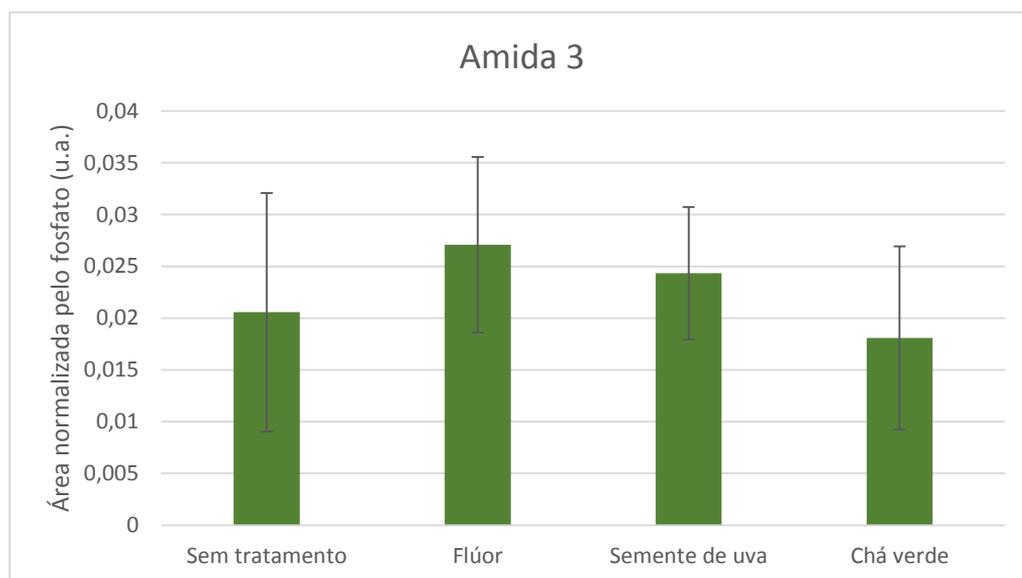


Figura 57: Gráfico que faz a comparação entre as áreas sob a banda de absorção do ν_3 e ν_4 carbonato pós-ciclagem de pH, após normalização pela banda do fosfato. As barras informam o desvio padrão encontrado para cada grupo. Neste caso não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p = 0,3265$) após realização do Teste de Kruskal-Wallis.

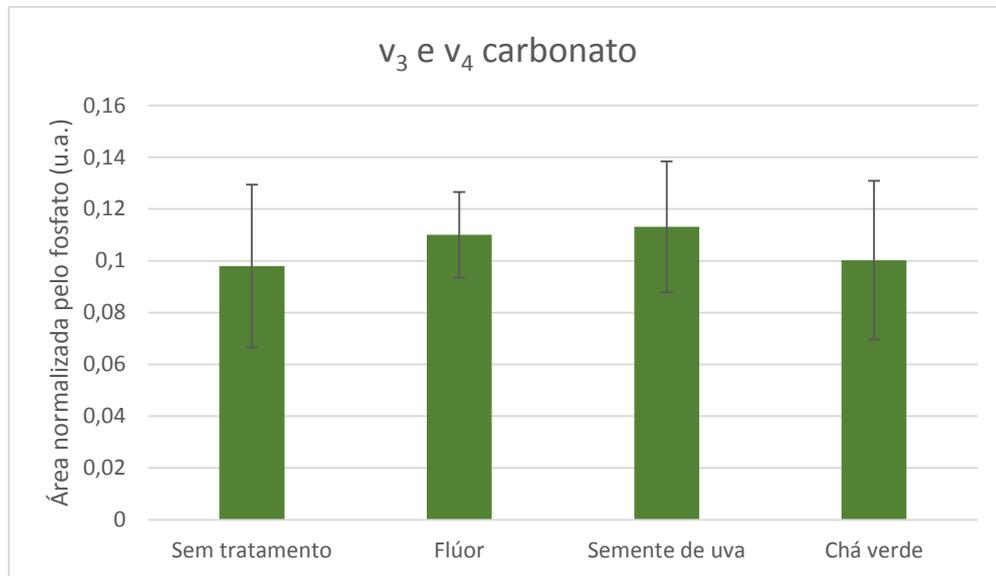


Figura 58: Gráfico que faz a comparação entre as áreas sob a banda de absorção da Amida 2 + carbonato pós-ciclagem de pH, após normalização pela banda do fosfato. As barras informam o desvio padrão encontrado para cada grupo. Neste caso não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p = 0,1284$) após realização do Teste de Kruskal-Wallis.

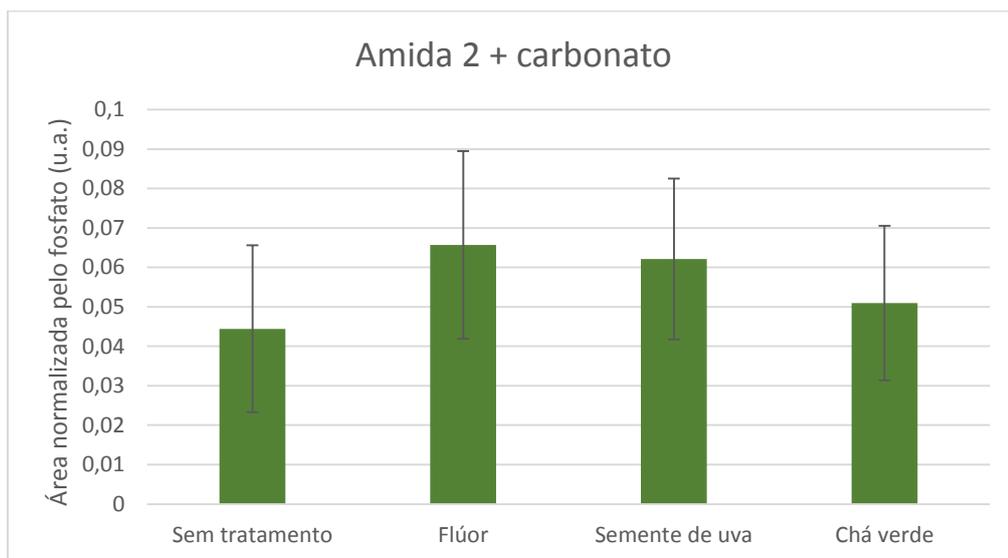
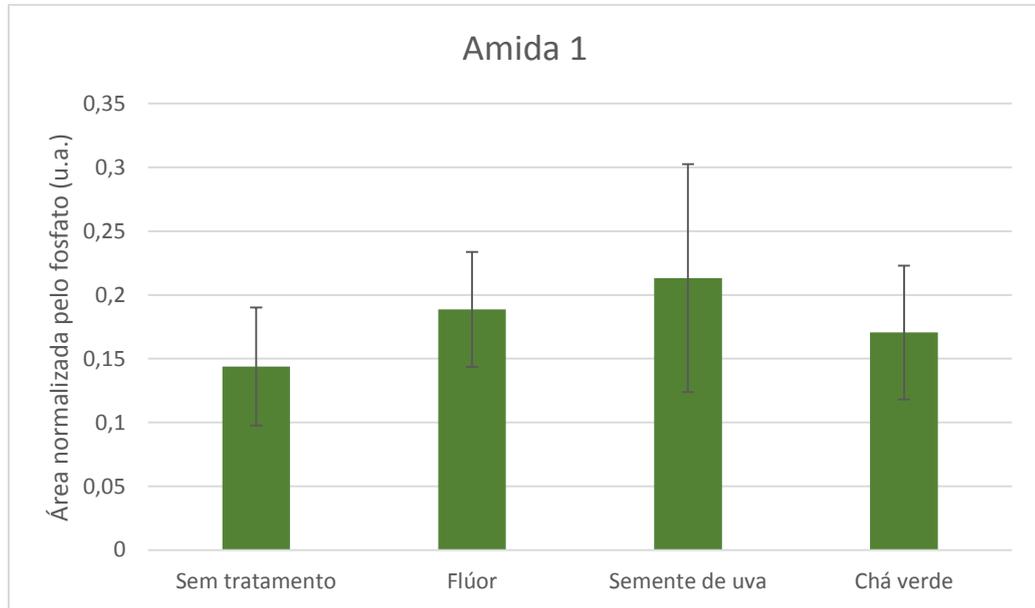


Figura 59: Gráfico que faz a comparação entre as áreas sob a banda de absorção da Amida 1 pós-ciclagem de pH, após normalização pela banda do fosfato. As barras informam o desvio padrão encontrado para cada grupo. Neste caso não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p = 0,1563$) após realização do Teste de Kruskal-Wallis



5.3 OCT

Não foi realizado análise do OCT pré-ciclagem de pH pois somente seria avaliado o tratamento. No entanto, para análise de Fluorescência e ATR-FTIR é possível verificar se houve adsorção dos componentes advindos dos tratamentos.

Após a ciclagem de pH realizada nas amostras, foram adquiridas imagens dos 4 grupos experimentais. Nas Figuras 60, 61, 62 e 63 é possível observar uma imagem representativa para os grupos G1, G2, G3 e G4, respectivamente.

Figura 60: Imagem representativa adquirida por OCT para o G1 (sem tratamento), após ciclagem de pH.

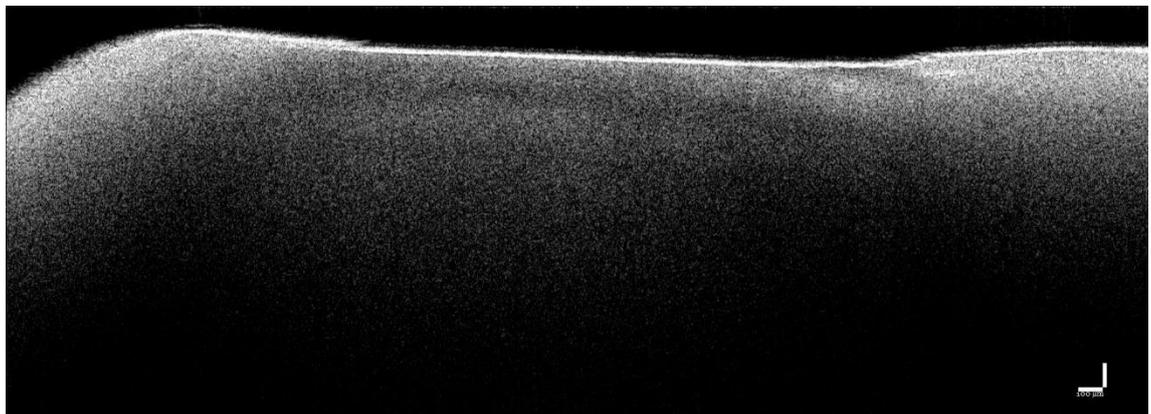


Figura 61: Imagem representativa adquirida por OCT para o G2 (tratado com FFA), após ciclagem de pH.

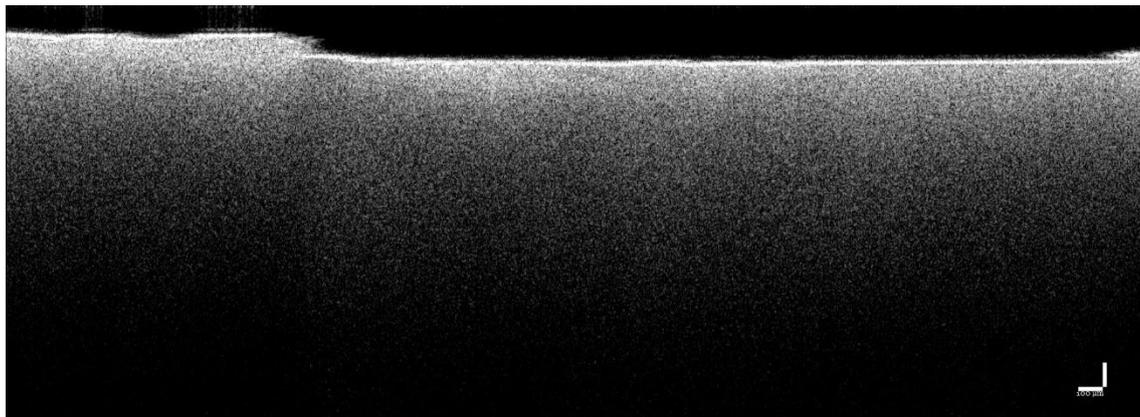


Figura 62: Imagem representativa adquirida por OCT para o G3 (tratado com extrato de Vitis vinífera), após ciclagem de pH.

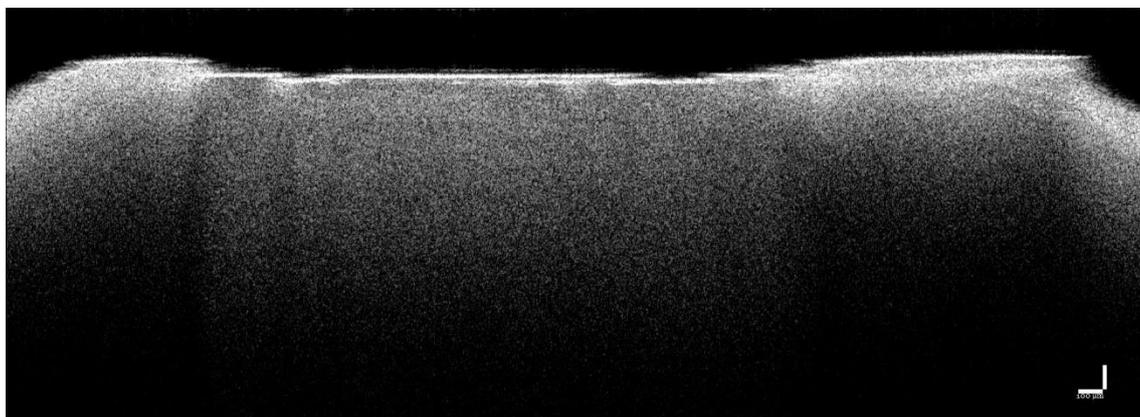
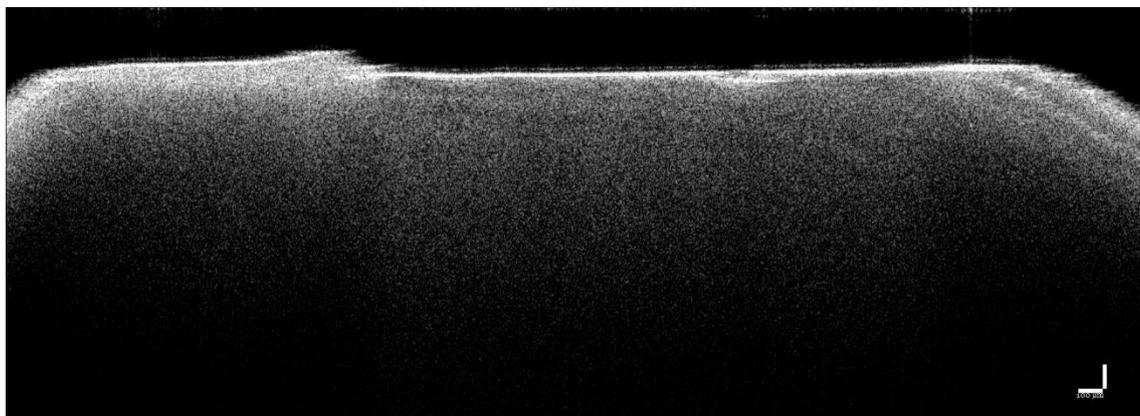


Figura 63: Imagem representativa adquirida por OCT para o G1 (tratado com extrato de Camellia sinensis), após ciclagem de pH.



O coeficiente de atenuação óptica foi calculado através da análise do sinal captado pelo OCT, a partir do decaimento exponencial do sinal em função da profundidade. Os valores médios dos coeficientes de atenuação calculados para os grupos experimentais e seus respectivos desvio padrão, foram: G1: $-1,0378 \pm 0,0288$; G2: $-1,3221 \pm 0,0381$; G3: $-1,0370 \pm 0,1352$ e G4: $-1,1103 \pm 0,1166$, conforme apresentado na Tabela 11. O sinal negativo encontrado indica o decaimento exponencial das medidas do sinal.

Tabela 11: Valores médios encontrados para os coeficientes de atenuação óptica para cada grupo experimental, bem como seus respectivos valores de desvio padrão.

Grupo experimentais	Coefficiente de atenuação (mm^{-1})	Desvio Padrão
G1 (Controle)	-1,0378	0,0288
G2 (Flúor)	-1,3221	0,0381
G3 (Vitis vinifera)	-1,0371	0,0311
G4 (Camellia sinensis)	-1,1103	0,1166

Para que fosse possível realizar a análise estatística dos dados, removeu-se os pontos fora da curva (*outliers*) que foram observados em cada grupo experimental, caso eles existissem. Executou-se o teste de normalidade e homogeneidade das variâncias, a fim de executar as análises de ANOVA e TUKEY. Os resultados da análise estatística podem ser observados na Tabela 12.

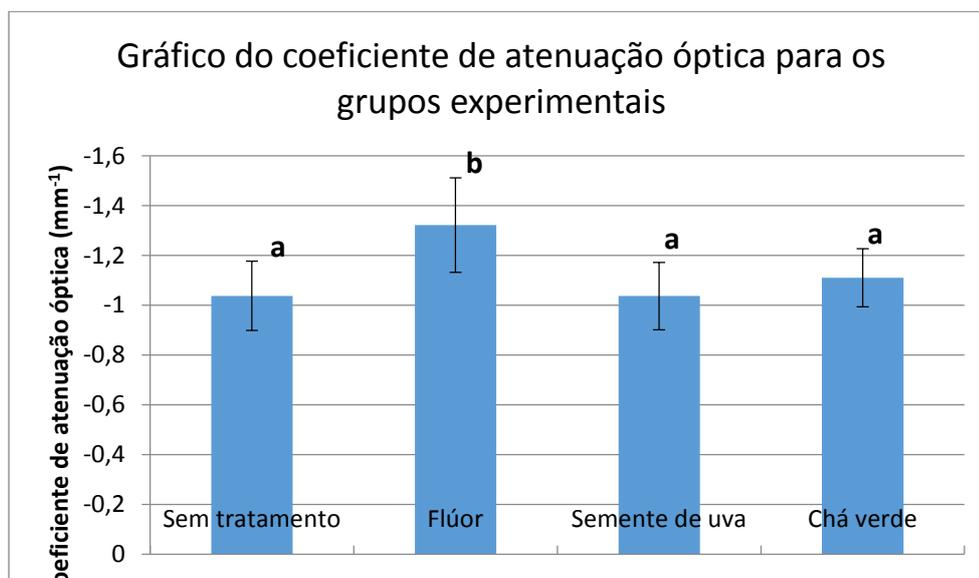
Tabela 12: Tabela com os valores encontrados nas análises estatísticas realizadas por ANOVA e TUKEY.

ANOVA			
FONTES DE VARIACÃO	GL	SQ	QM
Tratamentos	3	0,472	0,157
Erro	29	0,649	0,022
F =	7,0347		
(p) =	0,0014		
Média (Coluna 1) =	-1,0378		
Média (Coluna 2) =	-1,3221		

Média (Coluna 3) =	-1,0371		
Média (Coluna 4) =	-1,1103		
TUKEY	Diferença	Q	(p)
Médias (1 a 2) =	0,2843	5,5325	< 0.01
Médias (1 a 3) =	0,0007	0,0138	ns
Médias (1 a 4) =	0,0725	1,3717	ns
Médias (2 a 3) =	0,2851	5,5467	< 0.01
Médias (2 a 4) =	0,2118	4,121	< 0.05
Médias (3 a 4) =	0,0733	1,3855	ns

Após os cálculos dos coeficientes de atenuação óptica e realização da análise estatística, foi plotado o gráfico da Figura 64.

Figura 64: Valores médicos calculados para os coeficientes de atenuação óptica para os diferentes grupos experimentais, após a realização da ciclagem de pH. As barras evidenciam o desvio padrão. Letras distintas evidenciam médias estatisticamente diferentes após realização do teste de TUKEY.



6. Discussão dos Resultados

Dentre os protocolos usados para mimetizar bioquimicamente o processo de progressão de cáries incipientes, o método de ciclagem de pH ainda é o mais utilizado para realização de pesquisas, principalmente nos estudos que avaliam o efeito do fluoreto (F^-) no processo de desmineralização e remineralização de esmalte e dentina. Neste estudo foi utilizado o modelo de ciclagem de pH modificado por Queiroz (2004), no qual é utilizado uma solução desmineralizadora (DES) e uma solução remineralizadora (RES), ambas com uma composição específica para propiciar a ocorrência dos processos bioquímicos.

Neste contexto, este estudo foi elaborado para avaliar o potencial dos fitoterápicos e do flúor fosfato acidulado (FFA) no controle ao processo de progressão de lesões de cárie incipientes, para avaliar a efetividade dos tratamentos e para monitorar as alterações químico-estruturais promovidas pelos tratamentos. Desta forma, foram propostas três técnicas ópticas que possibilitassem esse fim.

Devido a capacidade da técnica de fluorescência em fornecer informações sobre os eventos físico-químicos no processo de desmineralização da dentina (VON-DINH, 2003), foram adquiridas imagens de fluorescência das amostras antes e após o processo de ciclagem de pH para avaliar os tratamentos propostos no combate a progressão de lesões de cárie. Estudos apontam que imagens de fluorescência para tecidos dentários cariados com emissão na região espectral do verde, são capazes de propiciar a visualização e diferenciação entre áreas saudáveis e lesionadas (ANGMAR-MANSSON, 2001; LINS, 2009), uma vez que a intensidade de fluorescência está diretamente relacionada com a presença de material inorgânico (hidroxiapatita).

Como especificado na metodologia apresentada, para avaliação da fluorescência e para elaboração dos gráficos apresentados, foi efetuado uma normalização da intensidade de fluorescência obtidas para as amostras pela intensidade observada na cerâmica de referência, uma vez que este procedimento exclui qualquer variação do sinal ocasionado por fatores externos.

Com os dados obtidos pela análise por fluorescência foi possível observar que, imediatamente após tratamentos, os resultados para os diferentes grupos foram considerados estatisticamente iguais, ou seja, a aplicação do flúor, do extrato de *Vitis vinífera* e do extrato de *Camellia sinensis* não influenciaram na fluorescência das

amostras quando comparado com o grupo controle (G1 – sem tratamento). Considerando que o comprimento de onda utilizado para excitação induz a fluorescência dos componentes minerais da dentina, composto em suma por hidroxiapatita carbonatada, os resultados evidenciam que os tratamentos não propiciaram a adsorção de componentes que são excitados neste comprimento de onda.

Analisando o resultado obtido por análise de fluorescência após a ciclagem de pH, verifica-se que este processo leva a formação de espaços vazios na estrutura da dentina, ocasionado pela perda mineral. Estes espaços vazios fazem com que a luz apresente uma maior penetração nas amostras, sem que haja a interação com os centros espalhadores. Desta forma, nos grupos G1, G3 e G4 foi observado um menor espalhamento de luz na superfície e uma, conseqüente, maior penetração do feixe em profundidade nas amostras.

Após realizada a ciclagem de pH verificou-se que o grupo tratado com FFA (G2) e o grupo tratado com extrato de *Camellia sinensis* apresentaram fluorescência estatisticamente superior aos demais grupos (G1 e G3), os quais não se diferenciaram entre si. A maior intensidade de fluorescência observada no grupo tratado com FFA pode ser explicada pela interação química entre o gel de FFA com a dentina, por meio da formação de glóbulos de fluoreto de cálcio e de fluorapatita. As presenças dos glóbulos de fluoreto de cálcio são responsáveis pelo efeito cariostático deste agente e, por este motivo, pode resultar em alterações na fluorescência da dentina. No caso do grupo tratado com extrato de *Camellia sinensis* pode ser inferido que, devido à presença das proantocianidinas em sua composição, sua aplicação levou a formação das ligações cruzadas entre as fibras de colágeno, deixando assim o material inorgânico mais firmemente preso e dificultando sua perda no processo de desmineralização da ciclagem de pH.

Também pode ser verificado que com exceção do grupo tratado com FFA (G2), todos os demais grupos apresentaram queda significativa na intensidade de fluorescência quando comparado com as intensidades antes da ciclagem de pH. Fazendo uma comparação entre os gráficos apresentados nas Figuras 37 e 38 é possível observar que com o desenvolvimento da lesão de cárie inicial, ocorreu redução significativa no índice de fluorescência do grupo controle (G1- sem tratamento), caindo de uma média de $0,5963 \pm 0,0550$ u.a. para $0,0446 \pm 0,0318$ u.a., indicando que o processo de ciclagem de pH ocorreu de forma eficiente. Nestas mesmas Figuras podemos perceber que houve uma discreta remineralização no grupo tratado com flúor, passando de uma

média de $0,7036 \pm 0,0632$ u.a. para $1,1372 \pm 0,3957$ u.a. Considerando que a queda na intensidade de fluorescência indica perda de material inorgânico da dentina (hidroxiapatita), pode-se inferir que a aplicação do FFA levou a uma maior preservação da dentina no processo de progressão de lesão de cárie incipiente, além da formação de fluorapatita no processo de remineralização. Apesar disto, vale a pena ressaltar que após a análise estatística efetuada pelo teste de Kruska-Wallis, seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls, não foi observado diferença estatisticamente significativa entre os grupos G2 e G4, considerando um nível de significância de 5 %.

Comparando o grupo controle (G1 – sem tratamento) com o grupo tratado com extrato de *Vitis vinífera* (G3), pode ser observado que em ambos os casos houve queda na intensidade de fluorescência após a ciclagem de pH. A intensidade de fluorescência do grupo G3, caiu de $0,5262 \pm 0,0454$ u.a para $0,1526 \pm 0,0467$ u.a. Isto indica que o tratamento com semente de uva não proporcionou efeito significativo no combate a perda de material inorgânico no processo de progressão da lesão de cárie, como foi observado nos grupos G2 e G4. Apesar da presença das proantocianidinas na *Vitis vinífera*, verifica-se que para este extrato possua um efeito cariostático, talvez seja necessário aplica-lo várias vezes para que se obtenha o efeito desejado.

Essa perda de fluorescência observada nos grupos (com exceção do grupo tratado com FFA) é esperada, pois no processo de ciclagem de pH parte do mineral presente na dentina sofre dissolução quando as amostras são inseridas na solução desmineralizadora (DES). Vale lembrar que essa solução possui pH 5,0, ou seja, abaixo do pH crítico para a dentina de 6,5 (FEJERSKOV; KIDD, 2005), propiciando a dissolução dos cristais de hidroxiapatita até que seja atingida a condição de saturação. Essa condição é obtida quando a amostra é imersa na solução remineralizadora (RES) de pH igual a 7, onde é induzida a precipitação de cristais sobre a região desmineralizada. Como o tempo de submersão na solução DES é superior ao tempo que a amostra fica submergida na solução RES, é esperado que a quantidade de desmineralização seja maior, levando a uma progressão de perda mineral.

Embora seja observado que os estudos dos fitoterápicos para prevenção de progressão de cárie incipiente venha aumentando nos últimos anos, percebe-se que o flúor se mantém como uma das metodologias mais consagradas para este fim, além de possuir um baixo custo.

Um estudo relatou que a estrutura dos túbulos dentinários seria o principal agente espalhador na dentina, deixando as fibras colágenas e os cristais de

hidroxiapatita como papel secundário (ZIPJ; TEM BOSCH, 1991). Esta informação é relevante, pois uma teoria sugere que no esmalte cariado ocorre um maior espalhamento de luz, uma vez que os índices de refração entre o tecido sadio e cariado são diferentes. Quando o tecido está sadio, a quantidade de hidroxiapatita ($n = 1,62$) é superior à de água ($n = 1,33$), no entanto quando o tecido está cariado a proporção de água aumenta nos espaços inter cristalinos em substituição a hidroxiapatita perdida, levando a um maior espalhamento de luz (EKSTRAND, 2004; CABRAL, 2006). Dessa forma, o aumento na quantidade de água na estrutura da dentina leva a um maior espalhamento de luz e induz uma baixa intensidade de fluorescência, uma vez que a luz que chega aos compostos fluorescentes mais internos é mais menor (CABRAL, 2006; MENDES, 2005; ANGMAR-MANSSON; TEM BOSCH, 2001; MENDONÇA, 2001). Entretanto, deve ser considerado que a estrutura e composição do esmalte e da dentina são diferentes. O esmalte é quase homogêneo com alta concentração de hidroxiapatita agrupadas em forma de prismas, já a dentina apresenta em sua composição 48% em volume de cristais de hidroxiapatita, localizadas entre fibras de colágeno (30% em volume). Esta diferença pode levar a alterações físico-químicas e ópticas, alterando o seu comportamento no fenômeno de fluorescência. Contudo, fica evidente a necessidade de realizar estudos adicionais onde seja possível comparar os dois tecidos sob uma mesma condição de excitação.

Sob essa perspectiva, vale considerar que quando o tecido está desmineralizado, seja ele esmalte ou dentina, o mesmo irá apresentar menor intensidade de fluorescência se comparado ao tecido sadio, pois ele apresenta uma menor quantidade de material inorgânico e uma maior quantidade de água, considerada como sendo uma substância espalhadora.

A análise composicional da dentina após um processo de desmineralização inicial e após os tratamentos propostos para controlar a progressão desta lesão, foi realizada através de uma monitoração semi-quantitativa de componentes presentes na matriz dentinária, utilizando a técnica de Espectroscopia de Absorção no Infravermelho por transformada de Fourier (ATR-FTIR) (BENETTI, 2010; ZECELL; BACHMANN, 2005). Vale lembrar que a técnica de ATR-FTIR empregada neste projeto avalia regiões com profundidade de até $0,66 \mu\text{m}$, desta forma os resultados evidenciados refletem a apenas análise superficial.

Os espectros obtidos demonstram que não houve o aparecimento ou o desaparecimento de novas bandas de absorção após o processo de ciclagem de pH,

confirmando relatos da literatura (ANA, 2014).

Observando as intensidades das bandas de interesse para grupo controle (G1 – sem tratamento), verifica-se que houve um relativo aumento da proporção das bandas de ν_2 carbonato, Amida 3 e ν_3 e ν_4 carbonato após o processo de ciclagem de pH, podendo evidenciar que houve um aumento na proporção de destes compostos em relação ao fosfato. Isso indica que o processo de desmineralização promove uma maior perda de fosfato em relação aos componentes citados. Também pode ser observado neste grupo (G1) que houve um pequeno aumento na quantidade amidas após a ciclagem de pH, porém não de forma tão expressiva quanto os demais. O aumento na proporção de amida, reflete em uma maior exposição de conteúdo orgânico, evidenciando uma maior exposição de colágeno após a perda mineral. Essa análise é verificada na literatura, onde relata a presença de cristais de hidroxiapatita carbonatada localizadas entre as fibras de colágeno do tipo I (NANCI, 2013). Com a perda de hidroxiapatita no processo de desmineralização, ocorre uma maior exposição das fibras de colágeno, fazendo com que ocorra um aumento na proporção deste componente em relação ao fosfato.

Verifica-se no grupo tratado com FFA (G2), imediatamente após o tratamento e antes da ciclagem de pH, que a proporção das bandas de amidas 1 e 2 apresentam-se maior em comparação com o grupo controle (G1). Isso pode ser explicado pela aplicação do gel de FFA contendo compostos detectáveis nos mesmos comprimentos de onda das amidas presentes na matriz orgânica da dentina e que ficaram adsorvidos na superfície, elevando assim a proporção destas bandas em relação a do fosfato.

Outra banda que também apresentou aumento na sua proporção, imediatamente após os tratamentos, para os grupos G2 (FFA), G3 (extrato de *Vitis vinífera*) e G4 (extrato de *Camellia sinensis*) quando comparados com o grupo sem tratamento (G1), foi a banda do ν_3 e ν_4 carbonato (1300 a 1516 cm^{-1}). Isto pode inferir que a aplicação dos extratos levou a adsorção das proantocianidinas presentes na Região D dos espectros dos fitoterápicos utilizados. Avaliando a aplicação do FFA, pode-se inferir que houve a adsorção de fosfolipídeos e polissacarídeos presentes na Região E, ou até mesmo de Amida 2 (Região D) do espectro obtido para o FFA.

Para as demais bandas (Amida 3, Amida 2 + carbonato e Amida 1) não foi observado aumento na proporção dos grupos experimentais quando comparados com o grupo controle imediatamente após os tratamentos, levando-se em consideração o teste não paramétrico de Kruska-Wallis, com nível de significância de 5%.

Avaliando os espectros obtidos para os grupos experimentais após a ciclagem de

pH, é verificado que nos grupos tratados com FFA, *Vitis vinífera* e *Camellia sinensis* não houve queda significativa na proporção de carbonato após o processo de cárie. Isto indica que apesar de o carbonato ligado a hidroxiapatita apresentar uma ligação menos estável (CURY, 2001; TENUTA; CURY, 2010), ele não foi facilmente perdido no processo de desmineralização. Também pode ser verificado que não foi observado um aumento na proporção de amidas para estes grupos. O processo de progressão da cárie leva a uma maior exposição de material orgânico devido à perda de material inorgânico (hidroxiapatita). Isso pode inferir que a aplicação do FFA levou a uma precipitação de glóbulos de fluoreto de cálcio no processo de desmineralização, que propiciaram a formação de fluorapatita no processo de remineralização, inibindo a perda significativa de material inorgânico. Para os grupos tratados com os extratos, pode-se inferir que as proantocianidinas presentes, levaram a formação de ligações cruzadas nas fibras de colágeno que dificultaram a perda de hidroxiapatita no processo de desmineralização

A avaliação das imagens obtidas por OCT pelo coeficiente de atenuação óptica do sinal, permite uma avaliação qualitativa da eficiência dos tratamentos no controle da progressão de lesões de cárie, visto que a presença ou não de material inorgânico, influenciam na intensidade do sinal captado pelo detector (OTIS *et al.*, 2000; FREITAS *et al.*, 2006).

Pela análise do coeficiente de atenuação óptica obtido pelo método de OCT, observa-se que o grupo tratado com FFA apresentou diferença estatisticamente significativa quando comparado com os demais grupos, levando-se em consideração os testes de ANOVA e TUKEY, com nível de significância de 5 %. O grupo tratado com FFA apresentou, em módulo (sem considerar o sinal negativo do decaimento exponencial), maior coeficiente de atenuação óptica, indicando a presença de uma maior quantidade de material inorgânico, o que levou a um menor espalhamento da luz. Essa maior quantidade de material orgânico é decorrente da formação de fluorapatita no processo de remineralização e tal resultado condiz com a literatura (Maia *et al.*, 2015). O grupo controle (G1 – sem tratamento) foi o que apresentou menor módulo do coeficiente de atenuação óptica e tal fato pode ser explicado pela maior perda de material inorgânico no processo de desmineralização, o que leva a formação de espaços vazios na estrutura da dentina e que causam maior espalhamento da luz. Os grupos G3 (extrato de *Vitis vinífera*) e G4 (extrato de *Camellia sinensis*) não apresentaram diferença estatisticamente significativa se comparado com o G1. Isto indica que apesar da presença das proantocianidinas nos fitoterápicos propiciarem a formação de ligações

cruzadas entre as fibras de colágeno, isto não foi suficiente para conter a perda mineral no processo de desmineralização. Neste projeto foi realizada a imersão por apenas 1 hora nos extratos de *Vitis vinífera* (G3) e *Camellia sinensis* (G4), indicando que talvez fosse necessário aplicar os fitoterápicos com uma maior periodicidade ao invés de uma única vez para que alcance o efeito desejado.

7. Conclusão

De acordo com os dados obtidos neste estudo, conclui-se que os extratos de *Vitis vinífera* e *Camellia sinensis* possuem grupos característicos das protantocianidias em sua composição, os quais podem ser promotores de ligações cruzadas nas fibras de colágeno presente na dentina.

No entanto, pela análise por fluorescência apenas os grupos tratados com FFA e com extrato de *Camellia sinensis* obtiveram o efeito esperado no controle a progressão de lesão de cáries incipientes.

Na análise composicional ficou comprovado que houve adsorção dos componentes do FFA, do extrato de *Vitis vinífera* e do extrato de *Camellia sinensis* na superfície da dentina, levando a alterações nas proporções das bandas no combate a progressão da lesão

A avaliação do coeficiente de atenuação óptica obtido pela técnica de OCT se demonstrou como uma boa alternativa para avaliar a eficiência dos tratamentos.

Desta maneira pode ser concluído que se levando em consideração os dados obtidos nas 3 metodologias de análise, fica claro que a aplicação de FFA é a melhor alternativa para tratamento da progressão de cáries incipientes. No entanto, verifica-se também que a aplicação dos fitoterápicos possuem um papel na formação de ligações cruzadas nas fibras de colágeno, indicando que se usados em maior periodicidade podem levar ao efeito esperado.

Vale ressaltar que estudos aprofundados são necessários para averiguar a aplicabilidade dos fitoterápicos no controle da evolução de cáries incipientes e se, quando aplicados junto com o FFA, atuam sinergia e proporcionam resultados mais satisfatórios, se comparados com os resultados obtidos somente com a aplicação de FFA.

8. Referências Bibliográficas

ABTAHIAN, F., JANG, I-K. Optical Coherence Tomography: Basics, current applications and future potential. *Current Opinion in Pharmacology*, Vol 12, Issue 5, pp 583-591, 2012.

ADÁMEZ, J. D.; SAMINO, E. G.; SÁNCHEZ, E. V.; GONZÁLEZ-GÓMEZ D.; In vitro estimation of the antibacterial activity and antioxidant capacity of aqueous extracts from grape-seeds (*Vitis vinifera* L.). *Food Control*. 2012.

AMARAL, M. M.; Análise de Sinais de Tomografia por Coerência Óptica: Equação Lidar e métodos de Inversão. 2012. 97 f. Tese (Doutorado em Ciência na Área de Tecnologia Nuclear - Materiais) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2012.

ANA, P.A. Estudo in vitro da resistência à desmineralização e da retenção de flúor em esmalte dental irradiado com laser de Er,Cr:YSGG. Tese (Doutorado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear - Materiais). Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2007.

ANA, P.A. et al. FT-Raman spectroscopic analysis of Nd:YAG and ER,Cr:YSGG laser irradiated enamel for preventive purposes. *Laser Phys.*, v. 24, 2014.

ANGMAR-MANSSON, B.; TEN BOSH, J.J. Quantitative light induced fluorescence (QLF): a method for assessment of incipient caries lesions. *Dentomaxillofac. Radiol.*, v. 30, p. 298-307, 2001.

ARAGHIZADEH, A.; KOHANTEB, J.; FANI, M. M.; Inhibitory Activity of Green Tea (*Camellia sinensis*) Extract on Some Clinically Isolated Cariogenic and Periodontopathic Bacteria. *Medical Principles and Practice*. Basel, p. 368-372, 2013.

- ASSIS, C.; Plantas medicinais na odontologia; Rev bras odontol; 2009.
- BACHMAN, L.; DIEBOLDER, R.; Infrared Absorption Bands of Enamel and Dentin Tissues from Human and Bovine Teeth; Applied Spectroscopy Reviews, v.38, 2007.
- BACHMANN, L. et al. Fluorescence Spectroscopy of Biological Tissues - A review. Applied Spectroscopy Reviews., v. 41, n. 6, p. 575-590, 2007.
- BAGCHI, D.; SEN, C. K.; Molecular Mechanisms of Cardioprotection by Novel Grape Seed Proanthocyanidin Extract; Mutat Res.; 523; 2003.
- BAGCHI, D.; SEN, C; K.; RAY, S. D.; Molecular mechanisms of cardioprotection by a novel grape seed proanthocyanidin extract; Mutat Res.; 2003.
- BALOGH-BATH, M.; FEHRENBACH, M. J.; Anatomia, Histologia e Embriologia dos Dentes e das Estruturas Orofaciais, tradução da 3ª Edição, Editora Saunders Elsevier, Rio de Janeiro, 2012.
- BANERJE, A.; BOYDE, A.; Autofluorescence and mineral content of carious dentine: scanning optical and backscattered electron microscopic studies; Caries Res; v. 32; 1998.
- BARTLET, D. W.; The role of erosion in tooth wear: etiology, prevention and management. International Dental Journal, n. 55, p. 277-284, 2005.
- BATISTA, M. J.; RANDO-MEIRELLES, M. P.; SOUSA, M. L. R.; Prevalência da cárie radicular na população adulta e idosa da região Sudeste do Brasil. Rev PanamSaludPublica; v. 35; Washington; 2014.
- BEDRAN-RUSSO, A. K.; PEREIRA, P. N.; DUARTE, W. R.; DRUMMOND, J. L.; YAMAUCHIY, M.; Application of crosslinkers to dentin collagen enhances the ultimate tensile strength. J Biomed Mater Res B Appl Biomater.

2007.

BENETTI, C.; Estudo in-vitro dos efeitos do laser de Er,Cr:YSGG em tecido ósseo por espectroscopia ATR-FTIR. Dissertação (Mestrado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear-Materiais). Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2010.

BERKOVITZ, B. K. B.; HOLLAND, G. R.; MOXHAN, B. J.; Anatomia, Embriologia e Histologia Bucal, 3ª Edição, Artmed, São Paulo, 2004.

BJELKHAGEN, H.; SUNDSTROM, F; Early detection of enamel caries by luminescence excited by visible laser light; Swed Dent J; v.6, 1982.

BORISOVA, E.; UZUNOV, T.; AVRAMOC, L.; Laser-induced autofluorescence study of caries model in vitro; Lasers Med Sci; v. 21; 2006.

BOSKEY, A.; CAMACHO, N. P.; FT-IR Imaging, of Native and Tissue-engineered bone and cartilage; Biomaterials, v.28; 2007.

BOSKEY, A.; MENDELSON, R.; Infrared Analysis of Bone in Health and Disease; Journal of Biomedical Optics; v.10; 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde (MS). Projeto SB Brasil 2003: condições de saúde bucal da população brasileira 2002-2003. Resultados principais. Brasília: MS; 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Notícias. Portal da Saúde/SUS; Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/>>; Acesso em: 21 set. 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Projeto SB Brasil 2010 - Pesquisa Nacional de Saúde Bucal. Brasília (DF); Disponível em: <<http://dab.saude.gov.br/cnsb/sbbrasil/index.html>>. Acesso em: 13 nov. 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS Brasília: Ministério da Saúde, 2006.

BREZINSKI, M. E. Optical Coherence Tomography: Principles and Applications. Elsevier Inc. 2006.

BRITO, A. M. M., Efeitos químico-estruturais promovidos pelo laser de Nd:YAG, associados ou não ao fluoreto, quando empregado para prevenção da progressão de lesões de cárie radicular, Dissertação de Mestrado para Engenharia Biomédica, Universidade Federal do ABC, Santo André, 2014.

BUCHALLA, W. Comparative fluorescence spectroscopy shows differences in non cavitated enamel lesions. Caries Res, v. 39, p. 150 – 156, 2005.

CABRAL, R. M. R, Detecção de lesões de cárie por fluorescência: Correlação entre a Histologia e os resultados obtidos com DIAGNOdent e Espectroscopia, Doutorado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear-Materiais, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2006.

CAL, L.R. Síntese de bisporfirinas contendo o espaçador 2,2'-bipiridina: modelos na elaboração de sensores luminescentes de íons metálicos. Universidade de São Paulo - [S.l.]. 2008.

CASTELLAN, C. S.; Estudo da matriz orgânica dentinária modificada por agentes naturais ricos em proantocianidina e seu uso para aumentar a efetividade de restaurações adesivas, Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

CASTELLAN, C. S.; Long-term stability of dentin matrix following treatment with various natural collagen cross-linkers; Journal of Mechanical Behavior of Biomedical Materials; p. 1343-1350; 2011.

CASTELLAN, C. S.; Mechanical characterization of proanthocyanidin–dentin

matrix interaction. *Dental Materials*. [s.i.], p. 968-973, 2010.

CHU, S.J.; DEVIGUS, A.; MIELESZKO, A. J. Elements affecting color; *Fundamentals of color: shade matching and communication in esthetic dentistry*. Chicago: Quintessence, 2004.

CLARKSON, J.J.; LOUGHLIN, Mc. Role of fluoride in oral health promotion. *Int. Dent. J.*, v. 50, p. 119-128, 2000.

COLSTON, B. W.; SATHYAM, U. S.; *Dental OCT; Optics Express*; 1998.

COLSTON, B.W.; EVERETT, M.J.; DA SILVA, L.B.; OTIS, L.L.; STROEVE, P.; NATHEL, H.; *Imaging of hard- and soft-tissue structure in the oral cavity by optical coherence tomography. Appl. Opt.*, v.37, n.16, p.3582-5, 1998.

CORAZZA, A. V. Fotobiomodulação comparativa entre o Laser e LED de baixa intensidade na angiogênese de feridas cutâneas de ratos. 2005. 89f. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia) – Escola de Engenharia de São Carlos, São Carlos. 2005.

CORRÊA-AFONSO, A. M. et al.; FTIR and SEM analysis of CO2 laser irradiated human enamel; *Archives of Oral Biology*; v.57; 2012.

CURY, J. A.; *Uso do flúor e controle da cárie como doença*. In: BARATIERI, L.N. et al. *Odontologia restauradora - Fundamentos e possibilidades*. São Paulo: Santos; 2001.

DELGADO, C. C.; SCHEFFEL, D. L. S.; *Redução da atividade proteolítica da dentina após curtos períodos de aplicação de proantocianidina*, *Revista de Odontologia da UNESP, Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP*, Araraquara, 2015

DHILLON, J.; BATRA, M.; SINGH, H.; KAUR, R.; *Antibacterial effect of grape seed extract against streptococcus mutans*. *Asia Pac Dent J*. 2015.

DI STASI, L.C. Plantas medicinais: verdades e mentiras: o que os usuários e os profissionais de saúde precisam saber. São Paulo: UNESP, 2007.

DIXON, R. A.; XIE, D-Y.; SHARMA, S. B.; Proanthocyanidins – a final frontier in flavonoid research? *New Phytol.*; 2005.

DUARTE, M. R.; MENARIM, D. O. Morfodiagnose da anatomia folicular e caulinar de *Camellia sinensis* Kuntze, Theaceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, São Paulo, v. 16, n. 4, 2006.

DYE, B. A.; THORNTON-EVANS. G.; Trends in oral health by poverty status as measured by Healthy People 2010 Objectives. *Public Health Report*. 2010.

DYER. J. R.; Aplicações da espectroscopia de absorção em compostos orgânicos. *Tras. Sob a direção de Aurora Giora Albanese*. Editora Edgard Blucher, São Paulo, 1969.

EKSTRAND, K. R.; Improving clinical visual detection – potential for caries clinical trials. *J dent Res*, v. 83, n. Spec No C, p. C67-C71, 2004.

EVANGELISTA, S.S; SAMPAIO, F.C.; PARENTE, R.C.; BANDEIRA, M. F. C. L.; Fitoterápicos na odontologia: estudo etnobotânico na cidade de Manaus; Universidade Federal do Amazonas-UFAM; *Rev. Bras. Pl. Med*; v.15, n.4, p. 513-519, Campinas; 2013.

FEATHERSTONE, J.D.B; The science and practice of caries prevention. *J.A.D.A.*, v. 131, p. 887-899, 2000.

FEITOSA, M. H. A.; Inserção do Conteúdo Fitoterapia em Cursos da Área de Saúde. *Rev. bras. educ. med.* [online]; vol.40; 2016

FEJERSKOV, O.; KIDD, E.; Cárie dentária: a doença e seu tratamento clínico; 1º ed.; São Paulo; 2005.

FERRAZZANO, G.; Anti-cariogênic effects of polyphenols from plant stimulant beverages (cocoa, coffee, tea); *Fitoterapia* 80; p. 255-262; 2009.

FRANCISCO, K.S.F. Fitoterapia: Uma opção para o tratamento odontológico. *Revista Saúde*, v. 4, n.1, p. 18-24, 2010.

FREITAS, A. Z. Caracterização de tecidos biológicos através de tomografia por coerência óptica, IPEN-USP, São Paulo, 2007.

FREITAS, A. Z; ZECELL, D. M; VIEIRA, N. D; RIBEIRO, A. C.; GOMES, A. S. L. Imaging carious human dental tissue with optical coherence tomography. *J Appl Phys*, v.99, n.2, 2006.

FRIED, D.; XIE, J.; Imaging caries lesions and lesions progression with polarization sensitive Optical Coherence Tomography; *Journal of Biomedical Optics* 7(4); 2002.

GEBRAN, M. P., GEBERT, A. P O., Controle químico e mecânico de placa bacteriana, Universidade Tuiuti, Paraná, 2002.

GORMAN, W. J.; Prevalence and etiology of gingival recession; *J Periodontol.* 1967.

GUO, X.; WANG, Y.; SPENCER, P.; Effects of water content and initiator composition on photopolymerization of model BisGMA/HEMA resin; *Dent Mater*; 2008.

HAFSTROM-BJORKMAN, U.; SUNDSTROM, F.; TEN BOSCH, J.J. Fluorescence in dissolved fractions of human enamel. *Acta Odont. Scand.*, v. 49, n.3, p. 133-138, 1991.

HALL A, GIRKIN JM. A Review of Potencial New Diagnostic Modalities for Caries Lesions, *J Dent Res*, 2004.

HANNAS, A. R.; PEREIRA, J. C.; The role of matrix metalloproteinases in the oral environment; *Acta Odontol Scand.*; 2007.

HAUGEJORDEN, O.; BIRKELAND, J.; Evidence for reversal of the caries decline among Norwegian children. *Int J Paediatr Dent.* 2002.

HIBST, R.; GALL, R.; Development of a diode laser-based fluorescence caries detector; *Caries Res*; v. 32; 1998.

HIBST, R.; PAULUS, R.; Detection of occlusal caries by laser fluorescence: Basic and Clinical investigations; *Med Laser Appl.* V.16; 2001.

HUANG, D; SWANSON, E.A.; LIN, C.P.; SCHUMAN, J.S.; STINSON, W.G.; CHANG, W.; HEE, M.R.; FLOTTE, T.; GREGORY, K.; PULIAFITO, C.A.; FUJIMOTO, J.G.; Optical Coherence Tomography. *Science*, v.254, n.5035, p.1178, 1991.

HUANG, G.T; Dental pulp and dent tissue engineering and regeneration: advancement and challenge; *Front. Bios c.*; v. 3; p. 788-800; 2011.

IKEGAMI, A.; EGUCHI, S.; KITAJIMA, A.; Identification of genes involved in proanthocyanidin biosynthesis of persimmon (*Diospyros kaki*) fruit; *Plant Sci.*; 2007.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Pesquisa Nacional de Saúde: 2013: acesso e utilização dos serviços de saúde, acidentes e violências: Brasil, grandes regiões e unidades da federação. Rio de Janeiro: IBGE; 2015.

JAYAPRAKASHA, G. K.; SELVI, T.; SAKARIAH, K.K.; Antibacterial and antioxidant activities of grape (*Vitis vinifera*) seed extracts. *Food Res Int.* 2003.

JEON, J.-G.; Natural Products in Caries Research: Current (Limited) Knowledge, Challenges and Future Perspective. Caries Research. Basel, p. 243-263; 2011.

KERESKI, A. S.; Prevenção e tratamento de lesões cárias associadas ao tratamento ortodôntico. 2012. 36 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

KIDD, E. A. M.; FEJERSKOV, O. What constitutes dental caries? Histopathology of carious enamel and dentin related to the action of cariogenic biofilms, J Dent Res, v. 83, n. Spec No C, p. C35-C38, 2004.

KO, A. C-T.; CHOO-SMITH, L-P.; HEWKO, M.; LEONARDI, L.; SOWA, M.G.; DONG, C.C.S.; WILLIAMS, P.; CHEGHORN, B. Ex vivo detection and characterization of early dental caries by optical coherence tomography and Raman spectroscopy; J. Biomed. Opt.; v.10; n.3; 2005.

KONIG, K.; FLEMMING, G.; Laser-induced autofluorescence spectroscopy of dental caries; Cell Mol Biol.; v. 44; 1998.

KONIG, K.; HIBST, R.; Laser-induced autofluorescence of carious regions of human teeth and caries-involved bacteria; SPIE; v. 2080; 1993.

KOSTORYZ, E. L.; DHARMALA, K.; Enzymatic biodegradation of HEMA/bisGMA adhesives formulated with different water content; J. Biomed Mater Res. B. Appl Biomater; 2009.

LEGEROS, R. Z.; Calcium phosphates in desmineralization/remineralization. J. Clin. Dent., v. 10, n. 2, p. 65-73, 1999.

LINS, E.C.C.C.; Espectroscopia da fluorescência na citricultura. Tese (Doutorado em Física). Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São

Paulo, 2009.

LITT M, REISINE S. Social and psychological theories and their use for dental practice. *International Dental Journal*; 43(3); p. 279-287; 1993.

MADEIRA, M. C, RIZZOLO, R. J. C, Livro Anatomia do dente, 8ª edição, Editora Sarvier, 2016.

MAIA, A. M. A, FREITAS, A. Z., Evaluation of dental enamel caries assessment using Quantitative Light Induced Fluorescence and Optical Coherence Tomography, Wiley Online Library, *Journal of Biophotonics*, 2015.

MANESH, S. K., DARLING, C. L., FRIED, D., Nondestructive assessment of dentin desmineralization using polarization-sensitive optical coherence tomography after exposure to fluoride and laser irradiation, *J. Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2009.

MARTHALER, T. M.; Changes in dental caries 1953-2003; *Caries Res.*; v.38; 2004.

MATTHEW, J. E.; BILLY, W. C.; UJWAL, S. S.; LUIZ, B. S.; FRIED, D.; Optical Detection Dental Disease Using Polarized Light; The Regents of University of California, CA (US), 2002.

MENDES, F.M. Avaliação do uso de corantes fluorescentes associados ao Diagnodent para detecção de perda mineral decorrente da cárie dentária. Tese (Doutorado). Universidade de São Paulo. 2005.

MENDONÇA, M.A.L.C. Laser e diagnóstico de cáries: estado da arte e avaliação in vitro das diferenças de fluorescência entre esmalte sadio, cariado e desmineralizado. Dissertação (Mestrado Profissionalizante na área de Lasers em Odontologia). IPEN, São Paulo, 2001.

MICHELSON, A.A.; *Studies In Optics*. 1ª Edição, Mineola, NY: Editora Dover,

1995.

MIRKARIMI, M.; AMIN-MARASHI, S. M.; BARGRIZAN, M.; ABTAHI, A.; FOOLADI I.; ALI, A.; The antimicrobial activity of Grape Seed Extract against two important 35 oral Pathogens. Zahedan J Res Med Sci. 2013.

MOLINA, F. P.; MAJEWSKI, M.; PERRELA, F. A.; OLIVEIRA, L. D.; JUNQUEIRA, J. C.; JORGE, A. O. C.; Própolis, sálvia, calêndula e mamona: atividade antifúngica de extratos naturais sobre cepas de *Candida albicans*. Ciênc odontol Bras, 2008.

MONTEIRO, M. H. D. A.; Fitoterapia na odontologia: levantamento dos principais produtos de origem vegetal para saúde bucal.; [TCC - Especialização]. Rio de Janeiro: Instituto de Tecnologia em Fármacos/Farmanguinhos, Fundação Oswaldo Cruz, 2014.

MORAES, M. C. D., Análise in vitro da progressão de lesões de erosão em dentina após irradiação com laser de Nd:YAG e flúor através de Tomografia por Coerência Óptica (OCT), Dissertação de Mestrado, IPEN-USP, 2012.

MORAES, M.D.R.; CARNEIRO, J.R.M.; PASSOS, V.F.; SANTIAGO S.L.; Effect of green tea as a protective measure against dental erosion in coronary dentine. Brazilian Oral Research, vol. 30, nº. 1, São Paulo, 2016.

MOVASAGHI, Z.; REHMAN, S.; REHMAN, I.; Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy of Biological Tissues; Applied Spectroscopy Reviews; University of London, Londres. 2008.

NANCI, Antonio. ten Cate; Histologia oral. [trad.] Marcelo Sampaio Narciso. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013.

NAROTZKI, B.; Green tea: A promising natural product in oral health. Archives of Oral Biology. [s.i.], p. 429-435; 2011.

NARVAI, P. C.; FRAZÃO, P. Saúde bucal coletiva. Luiz RR, Costa AJL, Nadanovsky P. Epidemiologia e bioestatística em Odontologia. São Paulo: Atheneu, p. p21-48, 2008.

NICO, L. S.; ANDRADE, S. S.C. A.; MALTA, D. C; Self-reported oral health in the Brazilian adult population: results of the 2013 National Health Survey; Ciênc. saúde coletiva vol.21 no.2 Rio de Janeiro; 2016.

NISHIYAMA, M.F., COSTA, M.A.F., COSTA, A.M., Chá verde brasileiro (Camellia sinensis var assamica): efeitos do tempo de infusão, acondicionamento da erva e forma de preparo sobre a eficiência de extração dos bioativos e sobre a estabilidade da bebida, Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, 2010.

OLIVEIRA, R. V. D.; Análise da progressão e da reversão de lesões artificiais de cárie através de espectroscopia Raman e tomografia de coerência óptica. 2011. 63 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2011.

OTIS, L. L; EVERETT, M. J.; SATHYAM, U. S.; COLSTON, B. W. Optical Coherence Tomography: a new imaging technology for dentistry. JADA, v. 131, p. 511-514, 2000.

PAVAN, S.; Biomimetic Approach for Root Caries Prevention Using a Proanthocyanidin-Rich Agent. Caries Research. Basel, p. 443-447. jun. 2010.

PEREIRA, D. L., Uso de técnicas ópticas no monitoramento dos efeitos do laser de Nd:YAG sobre erosão dentária, Dissertação de Mestrado em Engenharia Biomédica, Universidade Federal do ABC, Santo André, 2014.

PERUMALLA, A. V. S.; HETTIARACHCHY, N. S.; Green tea and grape seed extracts: Potential applications in food safety and quality. Food Research International. Fayetteville, p. 827-839; 2011.

PETERSEN, P.; Changing Oral Health Profiles of Children in Central and

Eastern Europe-Challenges for the 21st Century. Community Dent Health. 2003.

PINHEIRO, I. V. A.; Use of laser fluorescence (DIAGNOdent™) for in vivo diagnosis of occlusal caries: a systematic review. J. Appl. Oral Sci., Bauru, v. 12, n. 3; 2004.

Portal Brasil, Expectativa de vida no Brasil sobre para 75,5 anos em 2015, Disponível em: < <http://www.brasil.gov.br/governo/2016/12/expectativa-de-vida-no-brasil-sobe-para-75-5-anos-em-2015>>. Acesso em: Maio 2017.

PRASAD, P., N. Introduction to Biophotonics. John Wiley & Sons. New Jersey, 2003.

QUEIROZ, C.S. Modelos de estudos in vitro para avaliar o efeito do fluoreto na desmineralização e remineralização do esmalte e dentina. Tese (Doutorado em Cariologia). Faculdade de Odontologia da Unicamp, Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba, 2004.

RABELO, J.S.; Hidroxiapatita sintética nanoestruturada e esmalte dental aquecidos e irradiados por laser Er,Cr:YSGG. Caracterização por FTIR e por DRX. Dissertação (Mestrado). Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2009.

RABELO, J. S; BENETTI, C; ANA, P., A; Changes in Dental Enamel oven Heated or Irradiation with Er, Cr: YSGG laser. Analysis by FTIR. Laser Physics, v.20, 2010.

RAMANUJAM, N.; Fluorescence spectroscopy in vivo; Encyclopedia of Analytical Chemistry; Chichester; 2000.

SCHEFFEL, D. L. S.; HEBLING, J.; SCHEFFEL, R. H.; AGEE, K. A.; CADENARO, M.; TURCO, G.; Stabilization of dentin matrix after cross-linking treatments, in vitro. Dent Mater. 2014.

SCHEFFEL, D. L. S.; HEBLING, J.; SCHEFFEL, R. H.; AGEE, K. A.; TURCO, G.; COSTA, C. A. S.; Inactivation of matrix-bound MMPs by cross-linking agents in acid etched dentin. *Oper Dent*. 2014.

SCHIMITZ, W.; O chá verde e suas ações como quimioprotetor. *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde*, Londrina, v. 26, n. 2, 2005.

SESEOGULLARI-DIRIHAN, R.; MUTLUAY, M. M.; VALLITTU, P.; PASHLEY, D. H.; TEZVERGIL-MUTLUAYT, A.; Effect of pretreatment with collagen crosslinkers on dentin protease activity. *Dent Mater*. 2015.

SHEN, S.; SAMARANAYAKE, L.P.; YIP, Hak-Kong. In vitro grown, acidogenicity and cariogenicity of predominant human root caries flora. *Journal of Dentistry.*, v. 32, p. 667-678, 2004.

SHI, B.; DI, Y. *Plant polyphenol*; Beijing: Science Press; 2000.

SILERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F. X.; *Spectrometric Identification of Organic Compounds. Infrared Spectrometry*. USA: John Wiley & Sons, 2005.

SILVA, D. de F. T.; NUNEZ, S., C.; SUZUKI, L., C.; RIBEIRO, M., S. Dosimetria na terapia com laser em baixa intensidade. Disponível em: <<http://repositorio.ipen.br:8080/xmlui/handle/123456789/23032>> Acesso em: 11 out. 2017.

SINGH, R. P.; TYAGI, A. K.; Grape seed extract inhibits advances human prostate tumor growth and angionesis and upregulates insulin-like growth binding protein; *Int. J. Cancer*; 2004

SKOOG, D. A.; HOOLER, F. J.; NIEMAMT. A.; *Principles of Instrumental Analysis*; 5° Ed; 1998.

SONG, K-B; CHOI, U-H; Detection of incipient carious lesions formed on human teeth in vitro using ultraviolet laser; *Phtomed Laser Sur*; v.23; 2005.

STANDISH, B.A.; LEE, K.K.C.; MARIAMPILLAI, A.; MUNCE, N.R.; LEUNG, M.K.K.; YANG, V.X.D.; VITKIN, I.A.; In vivo endoscopic multi-beam optical coherence tomography. *Phys. Med. Biol.*, v. 55, n.3, p. 615, 2010.

STUART, B.; *Biological Applications of Infrared Spectroscopy*. 1 Ed. John Wiley & Sons, Inlaterra, 1997.

SUBHASH, H. M. Full-Field and single-Shot Full-Field Optical Coherence Tomography: a Novel Technique for biomedical Imaging Applications. *Advances in Optical Technologies*, Vol 2012, 2011.

SUNG, H. S.; CHANG, W. H.; MA, C. Y.; LEE, M. H.; Crosslinking of biological tissues using genipin and/or carbodiimide. *J Biomed Mater Res*. 2003.

TAKADA, I.; YOKOHAMA, I.; CHIDA, K.; AND NODA, J.; New measurement system for fault location in optical waveguide devices based on an interferometric technique. *Appl. Opt.*, v.26, pp. 1603-1606, 1987.

TAUBINSKY, I. M.; ALEXANDROV, M. T.; Prospects for applying fluorescence spectroscopy to diagnose the hard tissues of a tooth; *Crit Ver Biomed Eng.*; V. 28; 2000.

TEN BOSCH, J.J.; COOPS, J.C. Tooth color and reflectance as related to light scattering and enamel hardness. *J. Dent. Res.*, Washington, v. 74, n. 1, 1995.

TEN CATE J. M.; DUIJSTERS, P. P. E.; Alternating demineralization and remineralization of artificial enamel lesions. *Caries Res.*, 16:201-10, 1982.

TEN CATE, J.M.; The need for antibacterial approaches to improve caries control. *Advances in Dental Research.*, v. 21, p. 8-9, 2009.

TENUTA, L.M.A.; CURY, J.A. Fluoride: its role in dentistry. *Braz. Oral Res.*, v. 24, Spec Iss 1, p. 9-17, 2010.

TEZVERGIL-MUTLUAY, A.; AGEE, K. A.; The requirement of zinc and calcium ions for functional MMP activity in demineralized dentin matrices; *Dent Mater*; 2010.

TJADERHANE, L.; NASCIMENTO, F. D.; BRESCHI, L.; Optimizing dentin bond durability: control of collagen degradation by matrix metalloproteinases and cystine cathepsins; *Dent Mater*; 2013.

VAARKAMP, J.; TEN BOSCH, J.J.; VERDONSCHOT, E.H. Propagation of light through human dental enamel and dentine. *Caries Res.*, Basel, v. 29, n. 1, p. 8-13, 1995.

VAN DER BURGT, T.P.; TEN BOSCH, J.J.; BORSBOOM, P.C.F.; KORTSMIT, W.J.P.M. A comparison of new and conventional methods for quantification of tooth color. *J. Prosthet. Dent.*, St Louis, v. 63, n. 2, p. 155- 162, Feb., 1990.

VISSE, R.; NAGASE, H.; Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function and biochemistry; *Circ Res.*; 2003.

VO-DINH, T. *Biomedical Photonics Handbook*. CRC Press, 2003.

WALTER, R.; Effects of Natural Cross-Linkers on the Stability of Dentin Collagen and the Inhibition of Root Caries in vitro. *Caries Research*. Basel, p. 263-268; 2008.

WHITE, D.J. Reactivity of fluoride dentifrices with artificial caries. *Caries Res*, v. 21, n. 2, p. 126-40, 1987.

WINSTON, A.E.; BHASKAR, S. Caries prevention in the 21st century. *J.A.D.A.*, v. 129, 1998.

WOLLGAST, J.; PALLARONI, L.; Analysis of procyanidins in chocolate by reversed-phase highperformance liquid chromatography with electrospray ionization mass spectromic and tandem mass spectrometric detection; J Chromatogr; 2001.

YUN, J.H.; Inhibitory effects of green tea polyphenol (-)- epigallocatechin gallate on the expression of matrix metalloproteinase- 9 and on the formation of osteoclasts. J. Periodontal Res., v. 39, 2004.

ZEZELL, D.M.; BACHMANN, L. Estrutura e composição do esmalte e da dentina: tratamento térmico e irradiação com lasers emissores no infravermelho. 1.ed. São Paulo: Livraria da Física, 2005.

ZHANG, Q.; VAN'T HOF; M.A.; TRUIN, G.J. Caries-inhibiting effect of chlorhexidine varnish in pits and fissures. J. Dent. Res., v. 85, p. 469-72, 2006.

ZHAO, W.; The preventive effect of grape seed extract on artificial enamel caries progression in a microbial biofilm-induced caries model. Journal of Dentistry. [s.i.], p. 1010-1018; 2014.

ZILIO, S., C. Óptica Moderna Fundamentos e Aplicações. Instituto de Física de São Paulo. Universidade de São Paulo. 2009.

ZIPJ, J.R.; TEN BOSCH, J.J. Angular dependence of HeNe laser light scattering by bovine and human dentine. Arch. Oral Biol., v. 36, p. 283-289, 1991.

Anexos

Anexo 1



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Fundação Universidade Federal do ABC
Comissão de Ética em Uso de Animais



Santo André, 23rd September 2015

CERTIFIED

We certify that the Research "", protocol number CEUAX 1362120915, under the responsibility Patricia Aparecida Da Ana, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Ethic Committee in the Use of Animals of Federal University of ABC, and was approved in the meeting of day September 22, 2015.

Certificamos que o protocolo do Projeto de Pesquisa intitulado "REMINERALIZAÇÃO DE CÁRIES RADICULARES POR AGENTES FITOTERAPÊUTICOS DISTINTOS", protocolado sob o CEUAX nº 1362120915, sob a responsabilidade de Patricia Aparecida Da Ana, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais do Fundação Universidade Federal do ABC, e foi aprovado na reunião de 22 de setembro de 2015.

yours faithfully,

Renata Simões
Coordinator of the Ethics Committee on Animal Use
Federal University of ABC