

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC

CENTRO DE ENGENHARIA, MODELAGEM E CIÊNCIAS SOCIAIS APLICADAS

GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA

Sergio Luiz Machado dos Santos Junior

**Avaliação dos efeitos do laser de Er,Cr:YSGG na
desmineralização da dentina por Tomografia por Coerência
Óptica**



São Bernardo do Campo - SP

Novembro de 2017

Sergio Luiz Machado dos Santos Junior

**Avaliação dos efeitos do laser de Er,Cr:YSGG na
desmineralização da dentina por Tomografia por Coerência
Óptica**

Trabalho de Graduação III apresentado ao
Curso de Engenharia Biomédica da
Universidade Federal do ABC, como
requisito para obtenção do título de Bacharel
em Engenharia Biomédica

Orientadora: Prof. Dra. Patrícia Aparecida da Ana

São Bernardo do Campo - SP

Novembro de 2017

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca da Universidade Federal do ABC

Machado dos Santos Junior, Sergio Luiz

Título: Avaliação dos efeitos do laser de Er,Cr:YSGG na desmineralização da dentina por Tomografia por Coerência Óptica

53 Fls.

Orientador: Prof. Dra. Patrícia Aparecida da Ana

Trabalho de Graduação III – Universidade Federal do ABC, Bacharelado em Engenharia Biomédica

1.Dentina, 2. Laser, 3. Tomografia por coerência óptica, 4. Fluoreto, 5. Cárie

Sergio Luiz Machado dos Santos Junior

Avaliação dos efeitos do laser de Er,Cr:YSGG na desmineralização da dentina por Tomografia por Coerência Óptica

Este Trabalho foi realizado para a obtenção do grau de bacharel em Engenharia Biomédica pelo Curso de Graduação em Engenharia Biomédica da Universidade Federal do ABC.

São Bernardo do Campo – SP, de dezembro de 2017

Prof. Dra. Ana Paula Romani

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Patrícia Aparecida da Ana

Orientadora

Prof. Dra. Christiane Bertachini Lombello

Universidade Federal do ABC

Prof. Dr. Erick Dario León Bueno de Camargo

Universidade Federal do ABC

Agradecimentos

Aos professores por toda dedicação prestada para repassar todo conhecimento que adquiriram ao longo de suas carreiras, e por toda solicitude quando procurados para o esclarecimento de dúvidas.

À Profa. Dra. Patrícia Aparecida da Ana por todas suas orientações no desenvolvimento deste projeto e por todos conselhos dados ao longo destes anos em que trabalhamos juntos.

À mestranda Elizabete Ferreira pelo auxílio prestado nos preparos das amostras deste projeto.

À Central Multiusuário da Universidade Federal do ABC por permitir o uso dos equipamentos e materiais ali disponibilizados.

Ao IPEN-CNEN/SP pelo uso do laser empregado neste estudo.

À CAPES, por meio do projeto PROCAD/CAPES, possibilitando a aquisição de material de consumo empregado no presente estudo.

Aos professores que aceitaram participar da Banca de Defesa deste projeto.

Às minhas amigas Carla Faustino e Juliana Jucá por todos bons momentos em que passamos juntos durante estes anos.

À todo corpo discente da UFABC pelos bons momentos de estudo que tivemos para conclusão das matérias comum para as Engenharias

A todos que contribuíram de alguma forma para realização deste projeto, meus mais sinceros agradecimentos.

Resumo

Mesmo com formas de tratamento bastante conhecidas, as doenças que envolvem os tecidos duros da cavidade oral ainda são bastante prevalentes, o que demonstra a necessidade de se continuar a busca por novos métodos de diagnóstico e prevenção. A literatura apresenta bons resultados para prevenção das lesões, empregando-se lasers de alta intensidade atuando em sinergia com flúor fosfato acidulado. A técnica de tomografia por coerência óptica (OCT) fornece imagens transversais de estruturas através do imageamento óptico, tratando-se de um procedimento não invasivo e sem a utilização de radiação ionizante [3]. Neste sentido, este estudo objetiva avaliar o efeito do laser de Er,Cr:YSGG para prevenção do surgimento de lesões de cárie radicular, assim como avaliar o potencial do OCT no monitoramento do surgimento destas lesões. Para tal, foram preparadas 75 amostras de dentina radicular bovina, as quais foram distribuídas aleatoriamente (n=15) em 5 grupos experimentais, sendo eles: G1 (amostras sem nenhum tratamento), G2 (amostras tratadas com aplicação tópica de flúor fosfato acidulado - FFA), G3 (amostras irradiadas utilizando *laser* de Er,Cr:YSGG), G4 (amostras irradiadas utilizando *laser* de Er,Cr:YSGG, para posterior aplicação de FFA) e G5 (amostras com aplicação de FFA, para posterior irradiação com *laser* de Er,Cr:YSGG). Para simular o processo de desmineralização da dentina, foi realizado uma ciclagem de pH por 8 dias. Para análise e comparação dos resultados, foram adquiridas imagens OCT antes e após a ciclagem de pH, para que fossem calculados os coeficientes de atenuação óptica para avaliar a efetividade dos tratamentos. Os dados foram analisados estatisticamente (ANOVA + Tukey), ao nível de significância de 5%. Os resultados obtidos foram: G1: $-1,5381 \pm 0,0548 \text{ mm}^{-1}$; G2: $-1,6730 \pm 0,0685 \text{ mm}^{-1}$; G3: $-1,7706 \pm 0,0987 \text{ mm}^{-1}$; G4: $-1,6370 \pm 0,0302 \text{ mm}^{-1}$, e G5: $-1,8609 \pm 0,0666 \text{ mm}^{-1}$. Observou-se, assim, que a aplicação tópica de FFA apresenta um elevado poder cariostático, mas que quando empregado em sinergia com a irradiação laser, os resultados são mais significativos. Conclui-se então que a irradiação *laser*, quando utilizada com parâmetros adequados, apresenta efeitos na inibição do surgimento de cáries incipientes e que a técnica de OCT trata-se de uma boa alternativa para avaliar o efeito cariostático de diversos tratamentos propostos, porém, vale a pena ressaltar que há divergências de resultados na literatura e que estudos mais aprofundados são necessários para validar a metodologia.

Palavras-chave: Dentina, Laser, Tomografia por coerência óptica, Fluoreto, Cárie

Lista de Figuras

Figura 1: Estrutura do dente.	14
Figura 2: Lesão de cárie radicular.	16
Figura 3: Ilustração do processo de desmineralização e remineralização da dentina radicular. .	17
Figura 4: Destaque dos principais lasers que estão sendo utilizados na Odontologia e sua interação com alguns componentes biológicos (água e hidroxiapatita).	20
Figura 5: Componentes de um OCT.	22
Figura 6: Representação de um corte B-scan (2D), composto por diversos A-scan de profundidade.	24
Figura 7: Fenômenos de interação da luz com a matéria.	25
Figura 8: Procedimento adotado para realizar a ciclagem de pH.	30
Figura 9: OCT Thorlabs Callisto da Central Multiusuário da Universidade Federal do ABC. ..	31
Figura 10: Imagem ilustrativa para o esquema utilizado na medição das amostras no equipamento de OCT.	32
Figura 11: 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.....	32
Figura 12: Exemplo de um Gráfico Tons de cinza X Distância (pixels), obtido no software ImageJ para um determinado A-scan.	33
Figura 13: Exemplo de uma Tabela obtida para um Gráfico Tons de cinza X Distância (pixels), onde X representa o pixel e Y o tom de cinza dado para este pixel.	33
Figura 14: Gráfico apresentado pelo software Origin Pro 8 ao ser solicitado que seja feito o ajuste exponencial dos dados utilizando a equação $Exp2PMod1$	34
Figura 15: Resposta apresentada pelo software Origin Pro 8 ao ser solicitado que seja feito o ajuste exponencial dos dados utilizando a equação $Exp2PMod1$	35
Figura 16: Imagem de OCT representativa para o Grupo 1 (Controle), antes da ciclagem de pH.	36
Figura 17: Imagem de OCT representativa para o Grupo 2 (Flúor), antes da ciclagem de pH. .	36
Figura 18: Imagem de OCT representativa para o Grupo 3 (Laser), antes da ciclagem de pH. A seta amarela indica um ponto representativo da presença de ondulações provocadas pelo modo pulsado do laser.....	37
Figura 19: Imagem de OCT representativa para o Grupo 4 (Laser ->Flúor), antes da ciclagem de pH. A seta amarela indica um ponto representativo da presença de ondulações provocadas pelo modo pulsado do laser.....	37
Figura 20: Imagem de OCT representativa para o Grupo 5 (Flúor -> Laser), antes da ciclagem de pH. A seta amarela indica um ponto representativo da presença de ondulações provocadas pelo modo pulsado do laser.....	37
Figura 21: Gráfico demonstrativo de uma amostra onde são observadas interfaces no interior da amostra, conforme indicado pelas setas.	39
Figura 22: Imagem de OCT representativa para o Grupo 1 (Controle), após a ciclagem de pH.	39
Figura 23: Imagem de OCT representativa para o Grupo 2 (Flúor), após a ciclagem de pH.....	40
Figura 24: Imagem de OCT representativa para o Grupo 3 (Laser), após a ciclagem de pH. ...	40
Figura 25: Imagem de OCT representativa para o Grupo 4 (Laser -> Flúor), após a ciclagem de pH.....	40
Figura 26: Imagem de OCT representativa para o Grupo 5 (Flúor -> Laser), após a ciclagem de pH. As setas amarelas indicam a presença de interfaces no interior da amostra.....	41

Figura 27: Valores médios dos coeficientes de atenuação óptica para os diferentes grupos experimentais após a realização da ciclagem de pH. Barras evidenciam erro padrão. Letras distintas evidenciam médias estatisticamente diferentes de acordo com o teste de Tukey. 42

Lista de Tabelas

Tabela 1: Parâmetros scan utilizados no OCT para aquisição das imagens.....	31
Tabela 2: Tabela com os valores encontrados nas Análises Estatísticas para ANOVA e TUKEY.	42

Sumário

1. Introdução	11
2. Objetivos	13
3. Revisão da Literatura	14
3.1. Dentina	14
3.2. Cárie	14
3.3. Cárie Radicular.....	16
3.4. Aplicação de flúor para prevenção da cárie	17
3.5. <i>Laser</i> de alta intensidade para prevenção da cárie.	19
3.6. <i>Laser</i> de Er,Cr:YSGG	20
3.7. Tomografia por Coerência Óptica (OCT)	21
3.8. Interação do feixe do OCT com o tecido biológico	24
4. Material e Método	27
4.1. Delineamento experimental.....	27
4.2. Preparo das amostras	27
4.3. Tratamentos.....	28
4.4. Simulação do processo cariogênico <i>in vitro</i>	29
4.5. Avaliação das amostras por Tomografia por Coerência Óptica (OCT) e Análise estatística.....	31
5. Resultados e discussão	36
6. Conclusão	45
Referências Bibliográficas	46
Anexos.....	52
Anexo 1: Aprovação da CEUA (Comissão de Ética em Uso de Animais)	52

1. Introdução

O fato de a maioria das pessoas já ter apresentado alguma doença relacionada com a cavidade bucal, motivou o desenvolvimento de diversas pesquisas para propor novos métodos de tratamento, diagnóstico e prevenção destas lesões. Dentre as doenças bucais mais prevalentes, podemos destacar a cárie em primeiro lugar e em segundo a erosão dentária, que se trata do desgaste dentário ocasionado por sua desmineralização [1].

Durante as últimas décadas, observou-se que houve uma significativa diminuição na incidência de cárie no Brasil por causa do maior conhecimento que se tem dos seus processos de desenvolvimento, além das diversas medidas preventivas que foram implementadas no cotidiano das pessoas, tais como: melhora na higiene bucal, dieta adequada, fluoretação da água, enxaguantes bucais mais eficientes e maior facilidade de acesso aos dentistas. Apesar disso, segundo dados do Ministério da Saúde de 2010 (Pesquisa Nacional Bucal – SB Brasil 2010), observa-se que mais de 50% das crianças com 5 anos de idade já apresentaram lesão de cárie, porém ao analisar os índices para população adulta e idosa percebe-se que a incidência vem diminuindo com o passar dos anos, mas que ainda se trata de um dos principais motivos que levam a perda dentária [2][3][4].

A cárie radicular é aquela que ocorre na região do dente que fica exposta devido a uma recessão gengival promovida pela falta de uma higiene bucal adequada, permitindo que bactérias específicas colonizem a região periodontal [5]. Ainda que os hábitos higiênicos das pessoas estejam mudando, não é o suficiente para a extinção da cárie, desta forma, fica evidente a necessidade do desenvolvimento novas técnicas para prevenção e diagnóstico precoce da lesão.

Estudos recentes estão sendo realizados para avaliar os efeitos da radiação *laser* na resistência dos tecidos duros, uma vez que a irradiação de alta intensidade tem a capacidade promover alterações químicas e estruturais na composição da dentina [6]. Segundo a literatura, temperaturas maiores que 100°C e inferiores a 400°C ocasionam a perda de água e carbonato no esmalte do dente, e que o laser de Er:Cr:YSGG, quando usado com os parâmetros adequados, provoca um alto aquecimento superficial, podendo promover estas alterações cristalográficas, as quais são capazes de aumentar a resistência do dente à desmineralização[7][8]. Desta forma,

percebe-se que o emprego de métodos fotônicos podem se tornar nosso principal colaborador na prevenção do desenvolvimento desta doença.

Detectar lesões de cárie em seus estágios iniciais é muito importante para que seja possível programar estratégias para prevenção e tratamento da lesão. Uma crítica dos especialistas está relacionada aos métodos atuais utilizados para avaliar e diagnosticar a desmineralização dental, pois se trata de uma lesão que não é passível de ser vista a olho nu e que, na maioria dos casos, os pacientes não demonstram sinais de sintomas específicos e de incomodo [9][10]. Além disso, essa dificuldade atual em diagnosticar precocemente essas lesões, estimulou a busca por novas metodologias de diagnóstico.

A Tomografia por coerência óptica (OCT – *OpticalCoherenceTomography*) é uma técnica utilizada para obtenção imagens de forma não invasiva e que permite fornecer imagens transversais de estruturas, através de um imageamento óptico sem utilizar radiação ionizante (raios-x). Diversos estudos comprovam a aplicabilidade do OCT na odontologia para diagnosticar cárie e tal capacidade motivou o presente projeto [11][12][16][17][42].

O OCT trata-se de uma técnica na qual uma fonte de luz *laser* varre o comprimento de uma amostra durante um determinado intervalo de tempo para a obtenção de uma imagem transversal. A resolução do equipamento OCT está na faixa de 10 – 15 μm , sendo esta resolução maior do que a dos equipamentos de tomografia computadorizada e raios-x convencionais. O princípio utilizado para avaliar a desmineralização da dentina por OCT é mostrado como um aumento na intensidade do sinal devido à dispersão múltipla da luz incidente no esmalte desmineralizado, ocasionado pela maior porosidade local [13].

Quanto à aplicabilidade clínica na Odontologia do OCT até o momento, observa-se que o equipamento pode ser utilizado para gerar imagens de cárie, fratura e erosão dentária. No entanto, apesar de as imagens obtidas permitirem um diagnóstico mais eficiente de lesões de cárie, o sistema OCT aplicado e este tipo de estudo clínico ainda está em fase de desenvolvimento e pesquisa.

2. Objetivos

O presente projeto tem como objetivo avaliar os efeitos da irradiação laser do Er,Cr:YSGG na dentina de dentes bovinos, bem como avaliar a aplicabilidade da Tomografia por Coerência Óptica (OCT – *Optical Coherence Tomography*) na evolução de lesões de cárie.

3. Revisão da Literatura

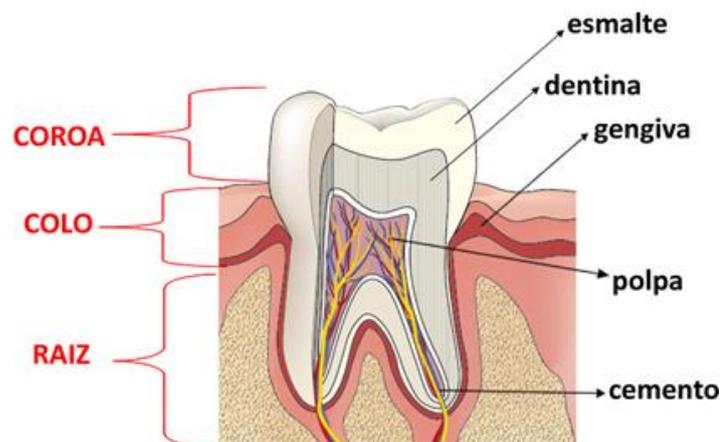
3.1. Dentina

A dentina, diferentemente do esmalte (tecido avascular e acelular), faz parte do complexo dentino-pulpar e caracteriza-se como um tecido vivo capaz de desencadear reações defensivas a injúrias externas [21]. Em seu estágio maduro, 50% da dentina é composta por uma matriz inorgânica, 30% por uma matriz orgânica e os outros 20% é composto por água [22].

Os túbulos dentinários formam uma rede de canais que ligam a dentina da polpa com o esmalte, para que seja possível ocorrer a difusão de nutrientes na entre as estruturas. Esses túbulos são ocupados pelos prolongamentos das células tubulares, denominadas odontoblastos, e são delimitados pela dentina peritubular (mais calcificada). No interior dos túbulos observa-se a predominância de uma dentina entrelaçada por fibrilas de colágeno, onde são depositados os cristais de apatita (dentina intertubular). Esta característica tubular da dentina é responsável por elevar o grau de permeabilidade deste tecido mineralizado, porém bactérias podem se alojar nestes pequenos canais e intensificar o desenvolvimento cariioso[23].

A principais estruturas do dente podem ser observadas na Figura 1.

Figura 1: Estrutura do dente.



Fonte: disponível em: <<http://loe.com.br/a-formacao-do-dente/>>.

3.2. Cárie

A cárie é uma doença infecciosa, multifatorial e dinâmica, que pode ser descrita como sendo resultado de uma dissolução química do dente por eventos metabólicos que ocorrem no biofilme que recobre a região afetada (placa dentária) [24]. Estes processos metabólicos da microbiota

cariogênica, levam à produção de ácidos que levam a queda do pH bucal e que ocasionam a perda de cálcio e fosfato nos tecidos do esmalte, dentina e cimento[5].

Sabe-se que na saliva humana coexistem milhões de bactérias, algumas delas apresentando alta capacidade para sobreviver em ambientes ácidos. Este biofilme bacteriano se deposita, preferencialmente, em regiões que são submetidas a desgastes mecânicos frequentes, a exemplo da gengiva dos sulcos e fissuras da superfície oclusal dos dentes [5].

Dentre os principais fatores responsáveis pelo desenvolvimento cariogênico, tem-se: 1) a colonização do dente por bactérias cariogênicas; 2) a presença de um biofilme e de um substrato de açúcares na superfície do dente, provenientes da dieta e da má higiene bucal; 3) um hospedeiro susceptível ao desenvolvimento da lesão. Tal doença pode acometer pessoas de qualquer idade, mas devido à má alimentação e a higienização inadequada da boca, ela se torna mais prevalente em crianças e adolescentes [25].

De forma resumida, descrevem-se os processos bioquímicos do desenvolvimento da cárie como sendo uma metabolização de açúcares (sacarose, frutose, maltose, lactose), transformando-os em ácidos orgânicos. Estes ácidos são capazes de se difundir pelo tecido dentário adjacente à região colonizada pelo biofilme, devido a dissociação de íons hidrogênio (H^+) que acabam interagindo com os compostos básicos presentes na saliva, promovendo assim a queda do pH bucal. Caso o pH atinja valores inferiores ao pH crítico, o meio torna-se insaturado para a hidroxiapatita, resultando em uma liberação de íons cálcio e fosfato da superfície do esmalte e da dentina[6][26].

O pH crítico é aquele no qual a saliva fica saturada para a apatita do tecido e é sabido que para o esmalte seu valor é de 5,5 e para a dentina é de 6,5. Com a queda do pH, a saliva torna-se subsaturada para apatita se comparado a dentina, desta forma os íons fosfato (PO_4^{3-}) ligam-se aos íons H^+ livres e formam HPO_4^{2-} , o qual poderá voltar a dissociar-se em íons devido à presença de água na saliva. Com a diminuição do pH bucal, o meio fica mais solúvel aos fosfatos de cálcio, fazendo com que a superfície do dente continue liberando íons fosfato, de tal forma a manter o equilíbrio químico [3][5][26].

Com a ação do tampão salivar, o pH bucal pode voltar a ficar superior ao pH crítico, permitindo que ocorra a reposição dos minerais perdidos na desmineralização, porém este processo não é 100% eficiente já que alguns íons podem ser ingeridos ou distanciar-se da região desmineralizada. Este círculo vicioso de processos de desmineralização e remineralização

levam a perdas progressivas de minerais, que podem atingir um estágio clínico visível, no qual se observa o aparecimento de manchas brancas e cavitações na superfície do dente e o aparecimento de uma lesão amarelada e amolecida na dentina [3][5].

3.3.Cárie Radicular

A incidência da cárie radicular tende a ser maior na população idosa devido a diversos fatores, tais como: má higiene bucal, inflamação local, cirurgias periodontais, tabagismo e até mesmo por fatores fisiológicos [27][28 [29].

Sabe-se que o cemento que se expõe pela retração gengival, fica altamente suscetível ao acúmulo bacteriano e, conseqüente, a perda mineral ocasionada pelas reações metabólicas das bactérias do biofilme. As lesões geralmente são observadas na junção amelo-cementária e que quando cavitadas, apresentam-se rasas e claras [30]. Um exemplo de cárie radicular está exposto na Figura 2.

Figura 2: Lesão de cárie radicular.



Fonte: [30].

A cárie radicular pode apresentar manifestações clínicas de diversos tamanhos, tons (amarelo-acastanhadas) e texturas, podendo estar presente em toda superfície radicular. Este tipo de lesão pode ser classificado como ativa ou inativa (interrompida). A cárie radicular ativa é representada por uma área superficial amolecida, com uma forma bem definida, um tom amarelado ou marrom-claro e recoberta por um biofilme bacteriano. A lesão em seu estado ativo pode ser inativada através de procedimentos clínicos utilizando o flúor. Por sua vez, a cárie radicular inativa apresenta uma superfície lisa, brilhante, uniforme, com uma tonalidade castanho-escuro ou preta e não apresenta nenhum depósito bacteriano visível. A cárie

interrompida continuará neste estágio clínico ao menos que não ocorra uma higienização local adequada [5][27][31].

O desenvolvimento deste tipo de lesão acontece de forma lenta, por causa da facilidade com que a saliva pode ficar retida na região, desta forma permitindo que seu efeito tampão e enzimático (antimicrobianos) atuem sobre os microrganismos presentes e seus produtos metabólicos. Segundo a literatura, acredita-se que a perda mineral na superfície radicular ocorra com o pH ao redor de 6,7, no entanto, o artigo da Aamdal-Scheie *et al.* sugere que este pH crítico seja similar ao da superfície do esmalte dental [30].

O processo de desmineralização e remineralização do dente está ilustrado na Figura 3.

Figura 3: Ilustração do processo de desmineralização e remineralização da dentina radicular.



Fonte: [30].

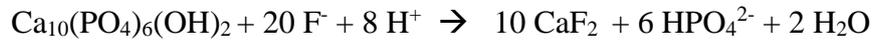
3.4. Aplicação de flúor para prevenção da cárie

A aplicação do flúor nos sistemas de abastecimento se tornou uma das metodologias mais adotadas para controlar o avanço da incidência de cárie na população, visto que por se tratar de um país emergente, grande porcentagem da população não tem acesso a atendimento odontológico adequado [26][59]. Entretanto, grande atenção e controle é necessário para que não aumente o risco da ocorrência de fluorose [26].

Os principais mecanismos de atuação do flúor são [60]:

- 1) Impedir a proliferação e o metabolismo das bactérias presentes na região bucal, provocado pela difusão de moléculas de ácido fluorídrico para dentro da bactéria.

- 2) Inibir o processo de desmineralização, através da formação de fluoreto de cálcio (CaF_2) na superfície do dente. Em caso de queda de pH, o íon fluoreto será disponibilizado na reação apresentada abaixo.



- 3) Formação de fluorapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$) no processo de remineralização.

O fluoreto de cálcio pode ficar adsorvido (fracamente ligado) sobre a dentina e é considerado o principal agente cariostático dos produtos utilizados para aplicação tópica. Devido a sua lenta dissolução frente a quedas bruscas de pH, ele se comporta como um reservatório de flúor na cavidade bucal. Por sua vez, a o flúor da fluorapatita está fortemente ligado, dificultando assim a dissolução do cristal e, conseqüente, perda de apatita na dentina [61][62].

Vale a pena ressaltar que a saliva também age na dissolução do fluoreto de cálcio, levando a uma perda progressiva do cristal no decorrer do tempo. Em função disto, a aplicação tópica de compostos fluoretados devem apresentar uma certa periodicidade, para que seja mantido o efeito anti-cárie [26].

A desmineralização do dente ocorre devido a metabolização dos carboidratos fermentáveis (sacarose, frutose, maltose e lactose) presentes na região bucal, ocasionando a formação de ácidos orgânicos e queda do pH. Desta forma, o meio torna-se insaturado para a hidroxiapatita e leva a liberação de íons cálcio e fosfato (processo de desmineralização), conforme a equação química abaixo [3].



Com o aumento do pH, o processo de remineralização da dentina se inicia e os íons flúor presentes se ligam aos íons cálcio e fosfato, levando a formação da fluorapatita, conforme observado nas equações químicas abaixo [26]. Pode ser observado que a presença do fluoreto de cálcio leva a formação de apatitas menos solúveis e inibi a formação de compostos fosfatados mais ácidos e solúveis [63].



Além disso, o flúor presente na cavidade bucal proporciona a formação de ácido fluorídrico (HF). A difusão desta substância e sua dissociação em íons H^+ e F^- no interior da bactéria, influencia na atividade de algumas enzimas, com destaque para enalose, responsável pelo metabolismo de carboidratos, processo essencial para sobrevivência e proliferação bacteriana [26].

3.5. *Laser* de alta intensidade para prevenção da cárie.

Estudos atuais demonstram a eficácia do uso dos *lasers* de alta intensidade como método alternativo para prevenção da cárie [32][33][34]. O *laser* de alta intensidade, quando utilizado na região espectral do infravermelho pode provocar alterações químico-estruturais na composição do dente devido ao aumento da temperatura local. Sabe-se que a eliminação do carbonato da matriz mineral, ocorre quando as temperaturas alcançam os $100^\circ C$, podendo este ser totalmente eliminado caso a temperatura chegue aos $1100^\circ C$ [35].

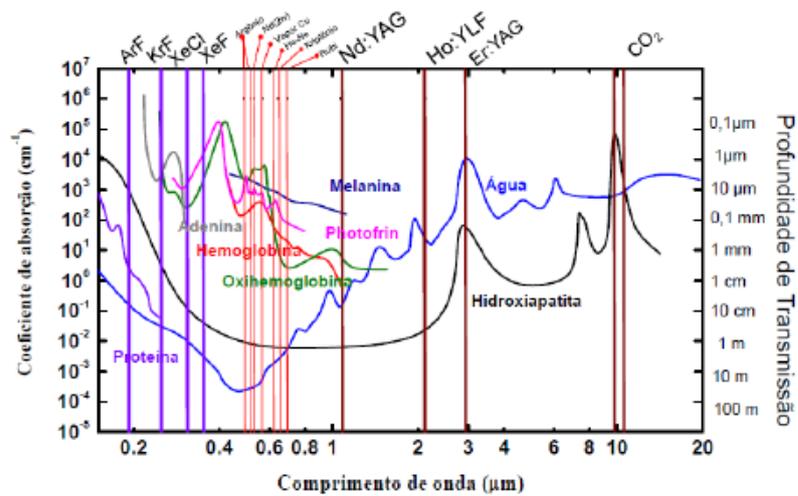
Para que possam ser utilizados os *lasers* para esta aplicação, é necessário ajustar os parâmetros em valores adequados para que não ocorra a carbonização das estruturas, proporcionadas pelo alto aquecimento. Fatores tais como o comprimento de onda, potência, modo de emissão (pulsado ou contínuo), tempo de duração do pulso, energia emitida por pulso, taxa de repetição, fluência (densidade de energia), e características do feixe devem ser analisados e avaliados para cada tipo de procedimento desejado. Além disso, fatores relacionados ao tecido irradiado, a exemplo das propriedades ópticas e térmicas do tecido, índice de refração, coeficiente de absorção (μ_a) e o coeficiente de espalhamento (μ_s), também podem influenciar no resultado obtido [36].

A irradiação *laser* pode ser absorvida, espalhada, refletida ou transmitida pelo tecido, e para que não ocorra efeitos indesejados, deve-se utilizar comprimentos de onda que possam ser absorvidos pela estrutura do tecido dental (hidroxiapatita, proteínas e água). É sabido que quanto maior for o coeficiente de absorção para um determinado comprimento de onda, maior será o efeito térmico causado (aquecimento). Segundo a lei de Beer-Lambert, o coeficiente de absorção é inversamente proporcional ao potencial de penetração da luz *laser* no tecido, logo, os *lasers* que emitem na região do infravermelho, na região espectral de 3 micrômetros (*laser* de érbio) são os que apresentam maior aplicabilidade para o tema proposto [37][38].

Uma explicação sugerida para elucidar a ação que os *lasers* de alta intensidade possuem na prevenção da cárie, é que devido ao elevado aquecimento local, eles podem acarretar

amodificações químico-estruturais na dentina, de tal forma que ocorra a remoção de componentes orgânicos e a formação de microespaços, nos quais podem ocorrer a deposição de íons de cálcio liberados pela desmineralização[26][32]. Na Figura 4 são observados os principais lasers utilizados na Odontologia.

Figura 4: Destaque dos principais lasers que estão sendo utilizados na Odontologia e sua interação com alguns componentes biológicos (água e hidroxiapatita).



Fonte: [26].

Para permitir o uso dos *lasers* de alta intensidade na Odontologia, é recomendado o uso tópico de substância fotoabsorvedoras capazes de proporcionar o aquecimento superficial local e impedir que ocorra a transmissão do calor para as regiões adjacentes, diminuindo a probabilidade de ocorrência de danos pulpares indesejados [33][37][39].

3.6. Laser de Er,Cr:YSGG

Quando aplicado, *laser* Er,Cr:YSGG (óxido de gálio, escândio e ítrio dopado com cromo e érbio) apresenta forte interação pela água e pela hidroxila presente na hidroxiapatita, sendo capaz de provocar o aquecimento local necessário para proporcionar as alterações na micro-estrutura superficial da dentina, necessárias para prevenção da cárie. Para evitar que ocorra efeitos indesejados, a exemplo da ablação, os parâmetros utilizados devem estar abaixo do “limiar de ablação” [26].

Em 1996 Fried *et al.* observou uma redução de aproximadamente 60% de perda mineral do esmalte dental quando utilizado com fluência de 12,7 J/cm² e uma redução de 25% quando utilizado com 7,8 j/cm² [64]. No ano 2000, Da-Guang *et al.* verificou que a irradiação com o

laser poderia promover uma forma de rearranjo nos cristais de apatita presentes no esmalte [65]. Outro estudo verificou que quando utilizado sob determinados parâmetros, a irradiação pode reduzir de forma significativa a dissolução de cálcio de amostras desmineralizadas com ácido láctico 0,1 M por um período de 24 horas [8].

Diversos estudos[8][26][64][65] tem tentado comprovar o potencial cariostático do laser de Er,Cr:YSGG contra a perda mineral, porém nota-se que não há um consenso da literatura quanto a sua eficiência e eficácia e, tampouco, dos parâmetros que devem ser aplicados para promover este fim. Desta forma, fica evidente a necessidade da realização de estudos para comprovar se o equipamento pode ser aplicado para esta finalidade.

3.7. Tomografia por Coerência Óptica (OCT)

A Tomografia por Coerência Óptica (OCT – Optical Coherence Tomography) foi desenvolvida no ano de 1991 por Huang *et al.*, cuja proposta tratava-se da obtenção de uma imagem tomográfica baseada no fenômeno de interferometria de baixa coerência. Inicialmente, a técnica de interferometria era aplicada como uma metodologia para que detecção de falhas em fibras ópticas [14][15].

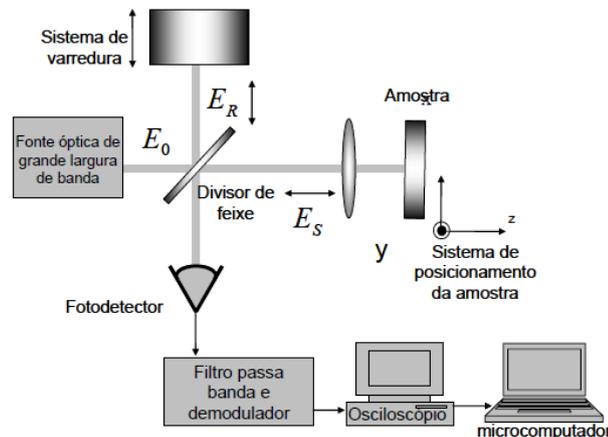
Atualmente existem diversas técnicas de diagnóstico de cárie, porém o OCT pode ser aplicado em uma região de atuação (resolução x profundidade) onde as outras técnicas não conseguem atuar. A microscopia confocal apresenta excelente resolução e baixa penetração, o ultrassom apresenta baixa resolução e uma excelente penetração e o OCT se enquadra dentro destas faixas.

O número de publicações relacionadas à técnica de OCT vem aumentando a cada dia, principalmente na oftalmologia, pois através desta tecnologia é possível formar imagens de retina ou fundo de olho *in vivo*. Além da oftalmologia, outras áreas como a odontologia, dermatologia e cardiologia também observaram um grande potencial nesta nova técnica, uma vez que ela é capaz de prover imagens muito semelhantes à dos cortes histológicos; por se tratar de uma técnica não invasiva; podendo ser aplicada *in vivo*; por não utilizar radiação ionizante; por não precisar preparar a amostra para iniciar o procedimento e além dos benefícios relacionados ao baixo custo e simplicidade de uso [16][17][18][19].

A imagem de OCT é obtida através de um mapeamento feito em uma amostra, utilizando uma determinada fonte de luz. No procedimento ocorre a captação de um sinal de interferometria no sentido de propagação de um feixe de luz, onde a profundidade atingida é de

aproximadamente 2 mm e com uma resolução de microns. Na Figura 5 encontram-se os componentes principais de um equipamento de OCT.

Figura 5: Componentes de um OCT.



Fonte: [19].

O princípio de funcionamento do OCT segue o mecanismo do interferômetro de Michelson, no qual uma fonte de luz inicial é direcionada para um espelho divisor de feixe, que tem por função dividir a onda incidente em duas componentes iguais, sendo que uma destas será direcionada para a amostra localizada na direção de propagação do feixe inicial, e a outra componente será direcionada para um espelho móvel (sistema de varredura), localizado a 90° . Estas duas componentes serão refletidas pela amostra e pelo espelho, respectivamente, e recombinadas no espelho divisor de feixe. Conforme as duas componentes do feixe inicial retornam para o divisor de feixe, diferentes tipos de interações entre eles podem acontecer. No caso de os percursos do feixe referência e do feixe retro-espelhado pela amostra forem os mesmos, estes serão recombinados e irá ocorrer uma interferência construtiva. O feixe resultante desta recombinação será captado no fotodetector [20][48].

Pode-se dizer que a imagem de OCT é formada pela captação dos sinais interferométricos pelo fotodetector. É importante ressaltar que o tempo de voo dos fótons de referência e dos retro-refletidos no espelho, deve ser o mesmo dos fótons que são retro-espelhados pela amostra [20]. Em outras palavras, o equipamento irá calcular o atraso da luz retro-espelhada pela amostra em comparação com a luz refletida no sistema de varredura

Coerência óptica pode ser definida como a correlação existente entre as fases das ondas que compõem um determinado feixe de luz, já a coerência temporal avalia a correlação no sentido

de propagação das ondas. A luz monocromática trata-se de uma fonte de luz perfeitamente coerente que mantém a relação de fase entre suas componentes de onda, ou seja, ela é composta por uma luz de um único comprimento de onda que se propaga em uma única direção [49][50].

Em um feixe de luz com larga banda espectral, as ondas que compõem o feixe apresentam diferentes comprimentos de onda e frequências de propagação, desta forma, à medida que as ondas se propagam, a diferença entre as fases das ondas cresce. Contudo, ao analisar a coerência deste tipo de feixe para pequenas distâncias de propagação, pode-se dizer que a luz é coerente, uma vez que as ondas ainda estão em fase. No entanto, para distâncias grandes, as fases das ondas mudam e resultam em uma interferência aleatória entre elas, sendo difícil de se obter algum tipo de informação. Segundo a literatura, a distância de propagação limite para que as ondas de um feixe de luz de larga banda espectral ainda estejam em fase, é denominado comprimento de coerência (lc), sendo este calculado pela Equação (1), onde λ é igual ao comprimento da onda central e $\Delta\lambda$ é a largura da banda espectral [49][50].

$$lc \propto \frac{\lambda^2}{\Delta\lambda} \quad (1)$$

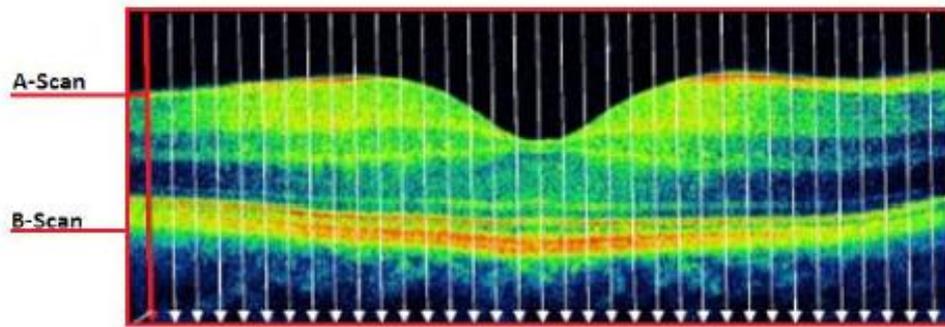
Vale a pena ressaltar que quanto maior for a largura da banda espectral do feixe, menor será o comprimento de coerência. Deste modo, pode-se concluir que em um sistema de OCT as melhores opções para uso são as fontes de luz monocromáticas e as fontes de luz de baixa banda espectral, como o *laser*. Em sua grande maioria, os *lasers* emitem em soma por apenas comprimento de onda, porém alguns apresentam uma banda espectral de aproximadamente 10 nm [52].

Para obtenção de sinais para toda profundidade de um determinado ponto da amostra, o espelho de referência é transladado múltiplas e sucessivas vezes, até que ocorra a detecção da intensidade do sinal para cada ponto axial desta região da amostra. Este perfil de detecção é denominado *A-scan*. Em seguida, o feixe de luz é focado em outro ponto transversalmente ao ponto inicial, e repete-se todo procedimento para medir a intensidade do sinal no eixo axial deste novo ponto, obtendo-se assim um novo *A-scan*. Esta análise é repetida sucessivamente até que o sistema faça a varredura de todo corte de interesse na amostra.

A soma de todos *A-scan* de um determinado corte de interesse corresponde em um *B-scan*, que representa uma imagem de corte 2D da amostra, conforme pode ser observado na Figura 6 [52]. Utilizando softwares que permitam fazer a associação de diferentes imagens

bidimensionais, consegue-se realizar uma reconstrução para obtenção de imagens tridimensionais [44].

Figura 6: Representação de um corte B-scan (2D), composto por diversos A-scan de profundidade.



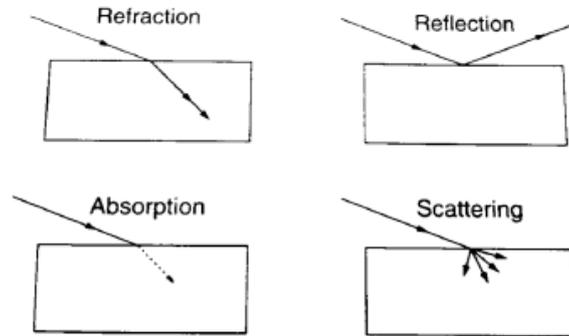
Fonte: [52].

Cada tecido biológico apresenta um determinado coeficiente de espalhamento, sendo variável conforme a composição química e estrutura atômica dos átomos do material. Uma estrutura que apresenta um baixo coeficiente de espalhamento, permite que a luz seja completamente transmitida e resulta em uma onda retro-espelhada de baixa amplitude, sendo representado um pixel preto na imagem. Em contrapartida, um material que apresenta um alto valor de coeficiente de espalhamento, reflete grande parte da luz incidente (onda retro-espelhada de grande amplitude), sendo representado por um pixel branco na imagem. Conforme varia-se a amplitude da luz retro-espelhada, um determinado tom na escala de cinza é atribuído ao sinal captado pelo fotodetector [50][51].

3.8. Interação do feixe do OCT com o tecido biológico

A luz pode sofrer 5 diferentes fenômenos quando entram em contato com a matéria, sendo eles: reflexão, refração, absorção, transmissão e espalhamento, conforme pode ser observado na Figura 7 [53].

Figura 7: Fenômenos de interação da luz com a matéria.



Fonte: [53].

Quando a luz passa de um meio para um outro distinto, uma parte da radiação é refletida e outra é transmitida pelo material. Na refração, o percurso que a luz irá percorrer no novo meio depende do índice de refração do material, podendo este ser calculado pelo quociente entre a velocidade de propagação da luz no vácuo pela velocidade de propagação da luz no material, conforme a Equação 2 [53][54].

$$n = \frac{c}{v} \quad \text{Equação (2)}$$

Esta diferença nas velocidades de propagação da luz no meio, pode ser observada pela alteração no ângulo de propagação do feixe quando a luz atravessa de um meio para outro. O valor deste ângulo pode ser calculado pela Lei de Snell (Equação 3), onde θ_1 e θ_2 são os ângulos de propagação com a normal nos meios 1 e 2, respectivamente; v_1 e v_2 são as velocidades de propagação nos meios 1 e 2, respectivamente; n_1 e n_2 são os índices de refração dos meios 1 e 2, respectivamente [53][54].

$$\frac{\text{sen}\theta_1}{\text{sen}\theta_2} = \frac{n_2}{n_1} = \frac{v_2}{v_1} \quad \text{Equação (3)}$$

Na reflexão, quando a luz incidente se depara na interface entre meios com índices de refração diferentes, a luz retorna ao meio inicial. Segundo as Leis de Fresnel, quando a luz incidente encontra-se a 90° em relação a superfície do meio, maior será a absorção da luz pelo material [53][55].

No caso da luz incidente se deparar com uma superfície lisa, na qual considera-se que os tamanhos das irregularidades superficiais sejam menores que o comprimento de onda da luz incidente, ocorre a reflexão especular, onde os raios refletidos pela superfície encontram-se paralelos entre si. No entanto, quando a luz se depara com uma superfície rugosa com

irregularidades maiores que o comprimento de onda da luz incidente, ocorre a reflexão difusa. Neste tipo de reflexão os ângulos de incidência do feixe não são os iguais, uma vez que o eixo normal de incidência varia conforme a irregularidade da superfície no local. Desta forma, os feixes refletidos não se encontram paralelos entre si. Em suma, nos tecidos biológicos é observado o fenômeno de reflexão difusa, devido as diferentes estruturas (moléculas, organelas, proteínas, etc.) que compõem o meio [56][57].

No fenômeno de absorção, quando a frequência da radiação incidente é igual ou muito próxima da frequência de absorção das partículas do meio, ocorre o fenômeno de ressonância e conseqüente absorção desta energia, a qual será convertida em energia cinética, calor ou utilizada em alguma reação química no meio. Esta capacidade de um meio absorver radiação está relacionada com fatores microscópicos, tais como a composição química, e com fatores macroscópicos como a espessura e concentração do material. É sabido que a água e as proteínas presentes no meio biológico, não são bons absorvedores de radiação com comprimento de onda entre 600 nm e 1.200 nm, sendo esta radiação pouco atenuada no tecido biológico [56][57].

A Tomografia por coerência Óptica (OCT) segue o princípio de Michelson, onde é utilizada uma fonte de luz, no comprimento de onda aproximado ao do infravermelho, por se tratar de uma região que sofre menor absorção pela água, um dos principais componentes dos tecidos biológicos.

O espalhamento ocorre quando a frequência da radiação incidente não é próxima à frequência natural das partículas. Neste caso, os átomos do meio capturam a energia da radiação incidente e alteram seu estado vibracional. Esta energia capturada será novamente reemitida em diferentes direções na forma de fótons. Como o tecido biológico apresenta uma grande quantidade de elementos espalhadores, este fenômeno pode ser considerado como o mais predominante na interação da luz com o meio biológico [53].

4. Material e Método

4.1. Delineamento experimental

Foi realizado um estudo *in vitro* cego com 75 blocos de dentina radicular de 4 x 2 x 2 mm, provenientes de 38 dentes incisivos bovinos. Os blocos de dentina foram distribuídos de forma aleatória em 5 grupos experimentais (n=15): G1 – sem tratamento (grupo controle negativo), G2 – grupo tratado com flúor fostato acidulado (FFA – 1,23% F, pH 3,3 – 3,9, por 4 minutos – controle positivo), G3 – grupo irradiado com Laser de Er,Cr:YSGG sob intensidade de energia de 6 J/cm², G4 – grupo irradiado com Laser + FFA, G5 – grupo tratado com FFA + irradiado com Laser. Após os tratamentos, as amostras foram avaliadas por Tomografia por Coerência Óptica (OCT). Em seguida, as amostras foram submetidas a um desafio cariogênico *in vitro*, utilizando a metodologia de ciclagem de pH com duração de 8 dias, com o propósito de simular o início de lesões cariogênicas em dentina radicular. Para análise dos resultados, foram feitos os cálculos dos coeficientes de atenuação óptica, após a ciclagem de pH dos grupos experimentais, por meio da OCT. A análise estatística foi executada empregando-se análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste *post hoc* de Tukey, ao nível de significância de 5%. Para tal, foram considerados os tratamentos como fatores de variação, os blocos de dentina como unidades experimentais e o coeficiente de atenuação óptica como variável resposta.

4.2. Preparo das amostras

Foram utilizados no total 38 dentes incisivos inferiores bovinos, em substituição aos dentes humanos, uma vez que testes bioquímicos comprovam sua similaridade. Com a aprovação da Comissão de Ética em Uso de Animais da Universidade Federal do ABC, protocolado sob o CEUA de número 3055120915, os dentes foram coletados de um frigorífico.

Os dentes obtidos foram lavados utilizando água corrente e detergente aniônico e seus indutos orgânicos foram removidos através do processo de raspagem ultrassônica e profilaxia com pedra-pomes, a escova usada foi do tipo Robinson® utilizando-a em baixa rotação. Até o momento do experimento, as amostras foram conservadas em meio úmido (algodão estéril umedecido com água deionizada e timol) em uma temperatura média de +4°C.

Utilizando a superfície vestibular e lingual de cada um dos dentes, foram preparados dois blocos de dentina no tamanho 4 x 2 x 2 mm (por dente), realizando a secção por meio de um disco de corte diamantado sob refrigeração (modelo do disco: Accutom, Strues, UK), de tal forma que fossem obtidas as 75 amostras necessárias para o desenvolvimento do projeto. Os blocos de dentina foram planejados utilizando lixas de granulação 400, 600 e 1200 (modelo

das lixas: CarbimedPaperDiscs, 30-5108-320, Buehler, IL, USA) e polidos com pasta de polimento de diamante com granulação de 1 μm (modelo da pasta: METADI Diamond suspension, Color PolishingWater-spray base 40-6530, Buehler, IL, USA), disco de papel feltro auto-adesivo (modelo do disco: PolishingCloth, METADI, Buehler 40-7618, IL, USA) em lixadeira-politriz APL-4 (modelo da lixadeira: Arotec S.A. Ind. Com., SP, Brasil). Ao realizar esta etapa sob controle de um micrômetro digital, removeu-se uma camada de aproximadamente 100 μm de superfície.

4.3.Tratamentos

As amostras preparadas foram distribuídas de forma aleatória em 5 grupos experimentais, contendo 15 amostras cada.

- Grupo 1: amostras sem nenhum tratamento (grupo controle negativo);
- Grupo 2: amostras tratadas com aplicação tópica de flúor fosfato acidulado - FFA (grupo controle positivo);
- Grupo 3: amostras irradiadas utilizando laser de Er,Cr:YSGG;
- Grupo 4: amostras irradiadas utilizando laser de Er,Cr:YSGG, para posterior aplicação de FFA;
- Grupo 5: amostras com aplicação de FFA, para posterior irradiação utilizando laser de Er,Cr:YSGG.

Para os grupos 2, 4 e 5, utilizou-se o gel de flúor fosfato acidulado (Flúor Gel, Dentsply, Brasil, 1,23% de flúor, pH 3,6 – 3,9), cujo qual foi mantido em contato com as superfícies das amostras por um período de 4 minutos. Após este tempo, o gel foi removido com lavagem com água destilada e deionizada por um período de 30 segundos para posterior secagem utilizando papel absorvente.

O *laser* de Er,Cr:YSGG foi ofertado pelo Laboratório de Biofotônica do IPEN-CNEN/SP, sendo que modelo utilizado foi o WaterLase iPlus 2.0 (Biolase Technology Inc., San Clemente, CA). As irradiações foram feitas utilizando ponta de safira tipo Z6 (600 μm de diâmetro), sem o uso de spray ar-água, e com uma distância padronizada de 1 mm da superfície da dentina. Para evitar erros experimentais, verificou-se a energia emitida pelo *laser* por um medidor de energia (FieldMaster GS + Detetor LM45, Coherent, USA), antes de que as irradiações fossem feitas.

Para a realização das irradiações, o *laser* foi utilizado com taxa de repetição de 20 Hz, potência de 0,25 W (valor médio), energia por pulso de 8,36 mJ e com uma densidade de energia de 6 J/cm². Durante o procedimento não foi utilizado nenhum sistema de refrigeração. Em um deslocador automático micrométrico X-Y-Z (Model ESP300, Newport Corporation, CA, USA), a fibra óptica do *laser* de Er,Cr:YSGG, mais os suportes ópticos de sustentação, foram posicionados e ajustados com uma velocidade de 7,6 mm/s, com a finalidade de padronizar a forma com que as irradiações eram realizadas.

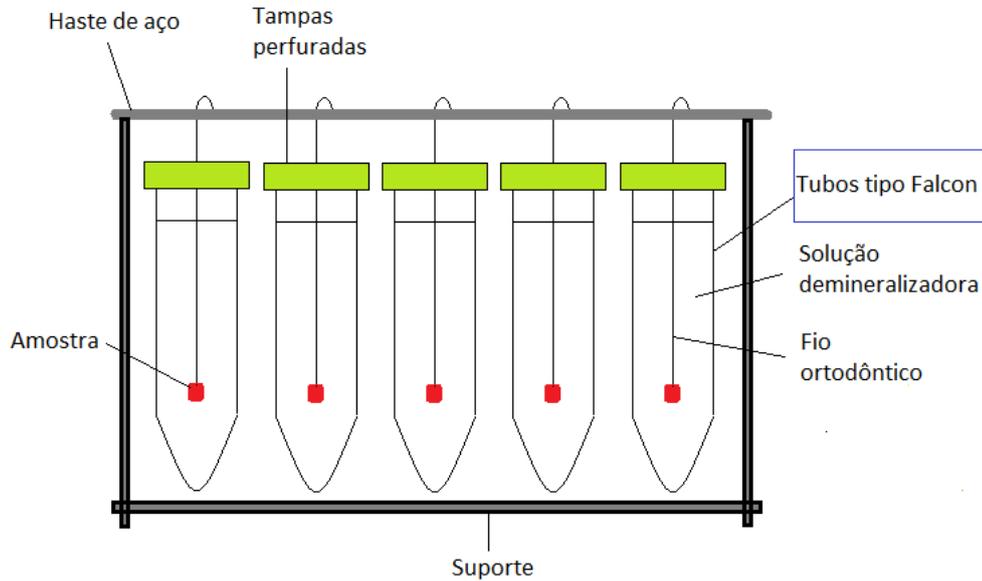
Após os tratamentos, as amostras obtidas foram guardadas em ambiente úmido sob refrigeração de + 4 °C até que as primeiras imagens de OCT fossem adquiridas (pré-ciclagem de pH).

4.4. Simulação do processo cariogênico *in vitro*

Com o intuito de padronizar o experimento, foi necessário realizar uma delimitação na área das amostras que foram submetidas à ciclagem de pH. Utilizando etiquetas autoadesivas (Pimaco, RJ, Brasil), foram confeccionadas máscaras com 2 x 4 mm para que fossem posicionadas nas superfícies das amostras, de tal forma a realizar a delimitação proposta. Para proteger o restante das amostras, foram passadas duas camadas de verniz ácido resistente e um posterior recobrimento com cera (Lysanda, SP, Brasil). Na remoção do adesivo delimitador, foi utilizado água destilada e um explorador, de tal forma que ficasse exposto 8 mm² de dentina.

Depois de protegidas, as amostras foram posicionadas com a aplicação de cera em suportes confeccionados com fios ortodônticos de 0,08 mm de diâmetro (Morelli, SP, Brasil), tais suportes foram presos e numerados em tampas de tubo Falcon de 50 ml (Cralplast, SP, Brasil). Utilizando os fios ortodônticos, as amostras foram alocadas de tal forma que ficassem totalmente imersas nas soluções de ciclagem de pH. Com o uso de brocas diamantadas (KG Sorensen 1111F, SP Brasil) as tampas Falcon foram perfuradas para que os fios ortodônticos passassem por estes furos, para que fossem atados a uma haste de aço, de tal forma que permitisse que os grupos de amostras fossem trocados de solução no mesmo instante (Figura 8).

Figura 8: Procedimento adotado para realizar a ciclagem de pH.



Preparou-se 4 litros de solução desmineralizadora e 2 litros de solução remineralizadora, seguindo o modelo de Ten Cate & Duijsters (1982), modificada por Queiroz *et al.*, 2004 [46] [47]. A solução desmineralizadora foi produzida com 1,4 mM de cálcio; 0,91 mM de fosfato; 0,06 $\mu\text{g F/mL}$ e tampão acetato 0,05 M e pH 5,0. A solução remineralizadora foi produzida com 1,5 mM de cálcio; 0,9 mM de fosfato; 150 mM de KCl; 0,05 $\mu\text{g F/mL}$; tampão Tris 0,01 M e pH 7,0 e timol a 0,1%.

As amostras foram submersas na solução desmineralizadora (DES) por um período de 2 horas. Em seguida, cada amostra foi lavada por 10 segundos utilizando água deionizada e secas com papel absorvente. Posteriormente, as amostras foram submersas em solução remineralizadora (RES) por um período de 22 horas. Após cada ciclo, as amostras retornaram às mesmas soluções para padronização dos resultados. A ciclagem teve duração de 8 dias, porém no quarto dia as soluções foram trocadas e no último dia as amostras ficaram 24 horas submersas na RES, segundo protocolo de Ten Cate & Duijsters, 1982 modificada por Queiroz *et al.*, 2004 [46] [47]. Durante todo o procedimento, as amostras foram mantidas em estufa com temperatura controlada de 37°C e só foram removidas para realizar a troca de solução.

4.5. Avaliação das amostras por Tomografia por Coerência Óptica (OCT) e Análise estatística

Na avaliação das amostras foi utilizado o equipamento de OCT Callisto (Thorlabs, New Jersey, USA), representado na Figura 9, pertencente a Central Multiusuário da Universidade Federal do ABC (CEM-UFABC). O equipamento opera em um domínio espectral com uma fonte de luz que emite no comprimento de onda de 930 nm, 1,2 kHz, resolução lateral de 8 μm , resolução axial de < 7,0 μm , profundidade máxima de imageamento de 1,6 mm e Probe para obtenção de imagens 3D.

Figura 9: OCT Thorlabs Callisto da Central Multiusuário da Universidade Federal do ABC.



Para padronização dos resultados, utilizou-se os mesmos parâmetros de imagem em todas aquisições. Os parâmetros utilizados encontram-se dispostos na Tabela 1.

Tabela 1: Parâmetros scan utilizados no OCT para aquisição das imagens.

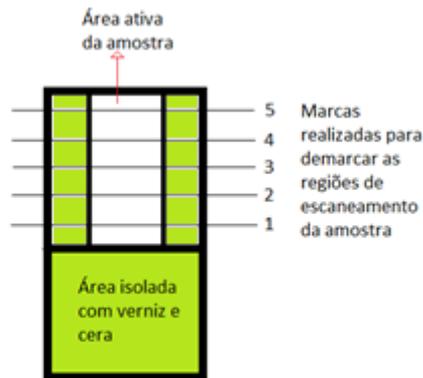
Parâmetros de Scan			
	X	Z	
Tamanho	2000	300	pixel
FOV	3,04	1	mm
Tamanho do pixel	1,52	3,34	μm

Para aquisição das imagens, cada amostra foi posicionada no equipamento sob uma pequena quantidade de massa de modelar, de tal forma que fosse possível deixá-la planificada perante a câmera, além de diminuir o risco da amostra alterar de posição. O esmalte previamente utilizado para delimitação da área de 8 mm^2 foi mantido, a fim de evitar seu contato com a massa de modelar e a contaminação da amostra.

De cada amostra foram realizados 5 escaneamentos, igualmente espaçados em 500 μm de distância, de tal forma que pudesse ser avaliada a efetividade do tratamento em toda superfície

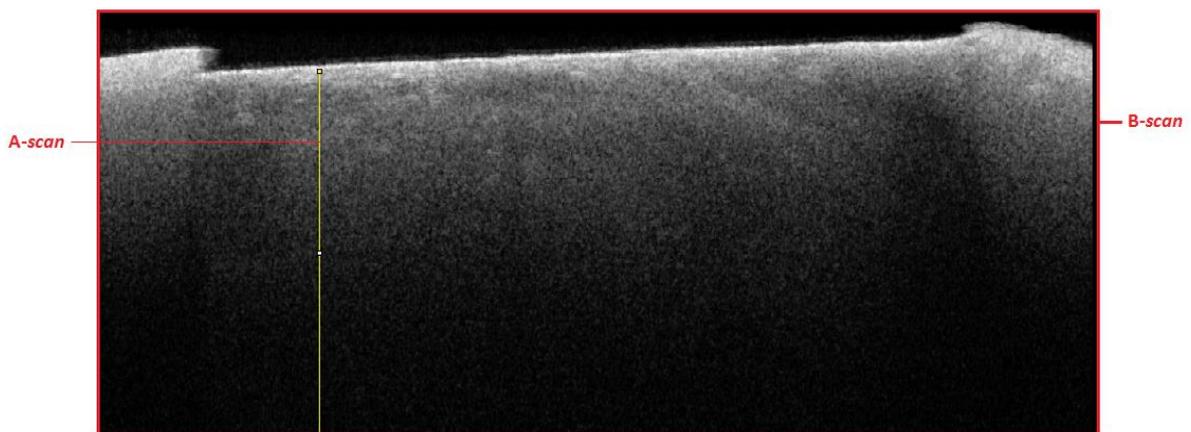
da amostra, conforme pode ser observado na Figura 10. Cada um destes 5 escaneamentos equivale a uma imagem *B-scan* da amostra adquirida.

Figura 10: Imagem ilustrativa para o esquema utilizado na medição das amostras no equipamento de OCT.



Com o auxílio do *software* ImageJ (JAVA based image processing, National Institutes of Health) utilizado para visualização e análise das imagens, foram capturadas 5 *A-scan* de cada imagem *B-scan*. Durante a delimitação da região *A-scan*, grande cuidado foi dado para que não fossem capturados os pixels negros do ar, conforme pode ser observado no Figura 11.

Figura 11: 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.



De cada *A-scan* analisado, o *software* ImageJ fornecia um Gráfico (Tons de cinza x Distância (pixels)) e uma Tabela com os dados organizados. Na Figura 12 é possível observar o Gráfico e na Figura 13 a Tabela com os dados, onde X representa o pixel e Y o tom de cinza

atribuído para este pixel. O valor de Y está compreendido entre 255 (pixel branco) e 0 (pixel preto).

Figura 12: Exemplo de um Gráfico Tons de cinza X Distância (pixels), obtido no software ImageJ para um determinado A-scan.

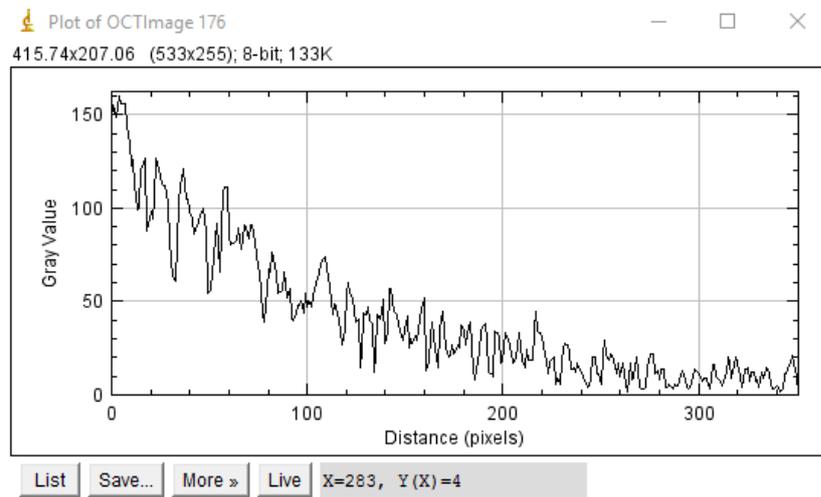


Figura 13: Exemplo de uma Tabela obtida para um Gráfico Tons de cinza X Distância (pixels), onde X representa o pixel e Y o tom de cinza dado para este pixel.

X	Y
0	147
1	155
2	149
3	154
4	160
5	156
6	156
7	156
8	144
9	135
10	123
11	126
12	112
13	99
14	100
15	121
16	124
17	127

Para que os dados pudessem ser analisados no *software* Origin Pro 8 (Copyright 1991 – 2007, OriginLab Corporation, Version 8E), manteve-se a mesma resolução para todas as imagens para que os valores dos pixels fossem convertidos para uma escala de profundidade, de tal forma que a cada pixel a profundidade aumentava em $3,34 \times 10^{-3}$ mm. Para tal, foi utilizado o *software* Microsoft Excel 2016.

Os dados obtidos e convertidos para unidades de profundidade x tom de cinza, foram analisados no *software* Origin Pro 8. Para tal, foi realizado um ajuste exponencial dos dados, utilizando a função Exp2PMod1, representada pela Equação 4.

$$y = ae^{bx} \quad (\text{Equação 4})$$

Segundo Maia *et al* 2015, o coeficiente de atenuação óptica pode ser calculado por uma equação (Equação 5) similar à Lei de Beer-Lambert, onde $I(z)$ representa a intensidade do pixel em função da profundidade z e μ representa o coeficiente de atenuação óptica[58].

$$I(z) = I_0 e^{-2\mu z} \quad (\text{Equação 5})$$

Comparando as Equações 4 e 5, observa-se que ambas são semelhantes, a não ser pelo fato de que na Equação 5 o μ está sendo multiplicado por -2. Isto ocorre pois nos equipamentos de OCT o detector encontra-se acima da amostra, paralelamente a fonte *laser*, logo o feixe percorre duas vezes (ida e volta) o percurso na amostra. Desta forma, para que fosse obtido o coeficiente de atenuação óptica, era necessário dividir o b da Equação 4 por -2, conforme pode ser observado na Equação 6.

$$\mu = \frac{b}{-2} \quad (\text{Equação 6})$$

Na Figura 14 é observado um exemplo de ajuste exponencial para um determinado *A-scan* obtido no experimento e na Figura 15 está representado um exemplo de resposta que o *software* Origin Pro 8 fornece ao solicitar que seja feito o ajuste exponencial.

Figura 14: Gráfico apresentado pelo software Origin Pro 8 ao ser solicitado que seja feito o ajuste exponencial dos dados utilizando a equação Exp2PMod1.

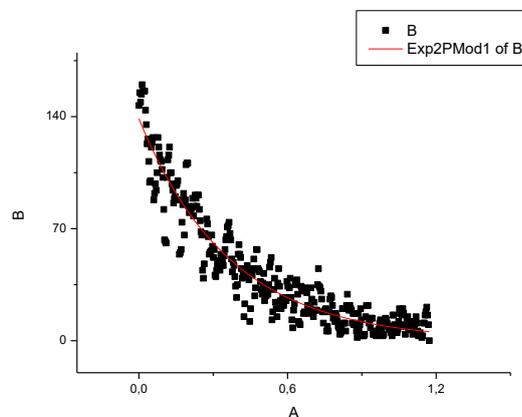
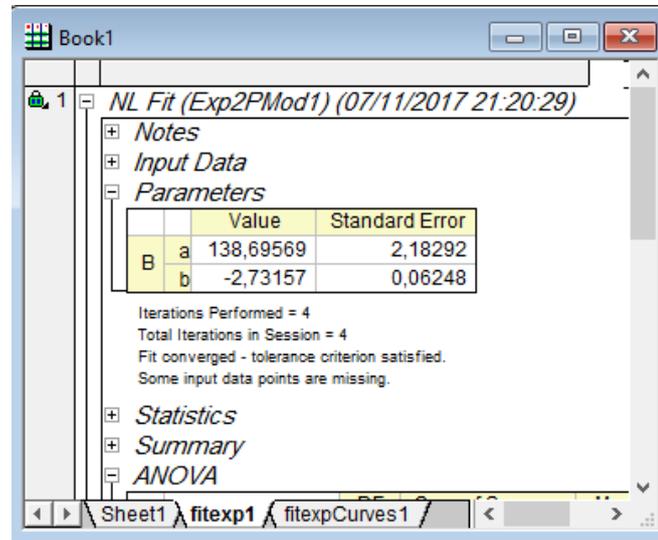


Figura 15: Resposta apresentada pelo software Origin Pro 8 ao ser solicitado que seja feito o ajuste exponencial dos dados utilizando a equação *Exp2PMod1*.



Pode ser observado na Figura 15 que o software já apresenta o valor de b da Equação 4. Desta forma, para cada análise, era capturado o valor de b e copiado para uma Tabela elaborada no software Microsoft Excel 2016, a fim de organizar os dados e calcular o coeficiente de atenuação óptica resultante para cada imagem *B-scan* e seu respectivo desvio padrão experimental. Como cada amostra era representada por 5 imagens *B-scan*, o coeficiente de atenuação médio para cada amostra foi obtido calculando a média dos coeficientes obtidos para cada *A-scan*.

Para análise estatística foi utilizado o software Biostat 5.0. Os tratamentos adotados foram considerados como fatores de variação; os blocos de dentina foram considerados unidades experimentais; a área e o coeficiente de atenuação óptica das lesões foram considerados como variável de resposta, com nível de significância de 5%. Nesta etapa foi realizada a Análise de Variância e também o teste *Post Hoc* de Tukey.

5. Resultados e discussão

Após o preparo e tratamento das amostras, foram adquiridas imagens dos 5 grupos experimentais. Nas Figuras 16, 17, 18, 19 e 20, é possível observar uma imagem representativa para cada um dos grupos.

Figura 16: Imagem de OCT representativa para o Grupo 1 (Controle), antes da ciclagem de pH.

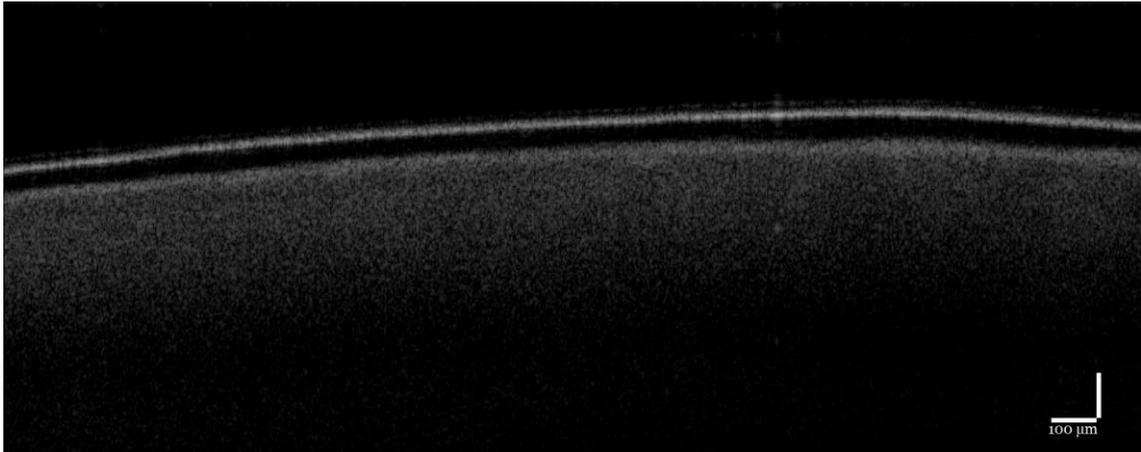


Figura 17: Imagem de OCT representativa para o Grupo 2 (Flúor), antes da ciclagem de pH.

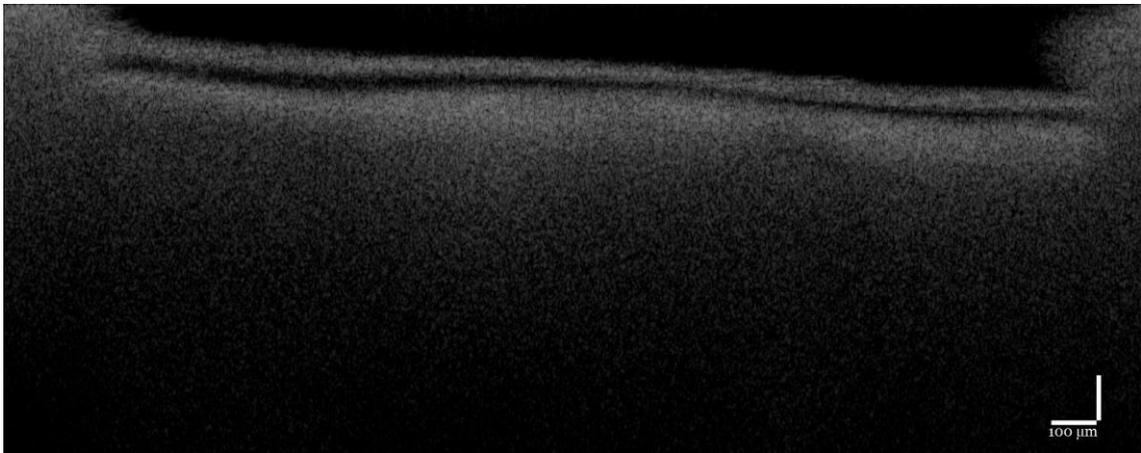


Figura 18: Imagem de OCT representativa para o Grupo 3 (Laser), antes da ciclagem de pH. A seta amarela indica um ponto representativo da presença de ondulações provocadas pelo modo pulsado do laser.

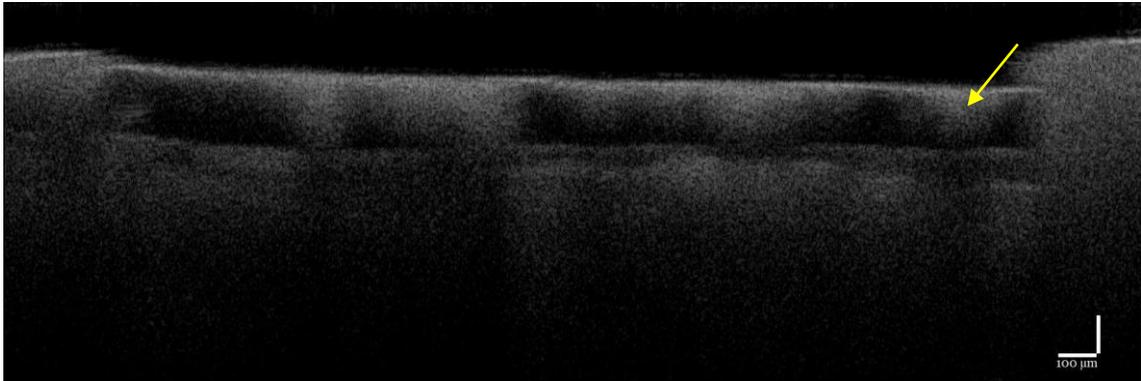


Figura 19: Imagem de OCT representativa para o Grupo 4 (Laser ->Flúor), antes da ciclagem de pH. A seta amarela indica um ponto representativo da presença de ondulações provocadas pelo modo pulsado do laser.

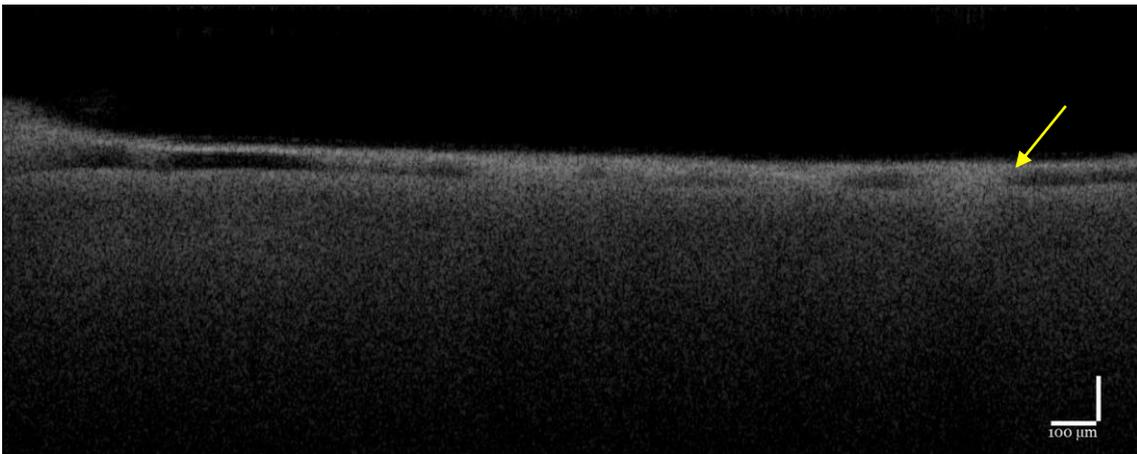
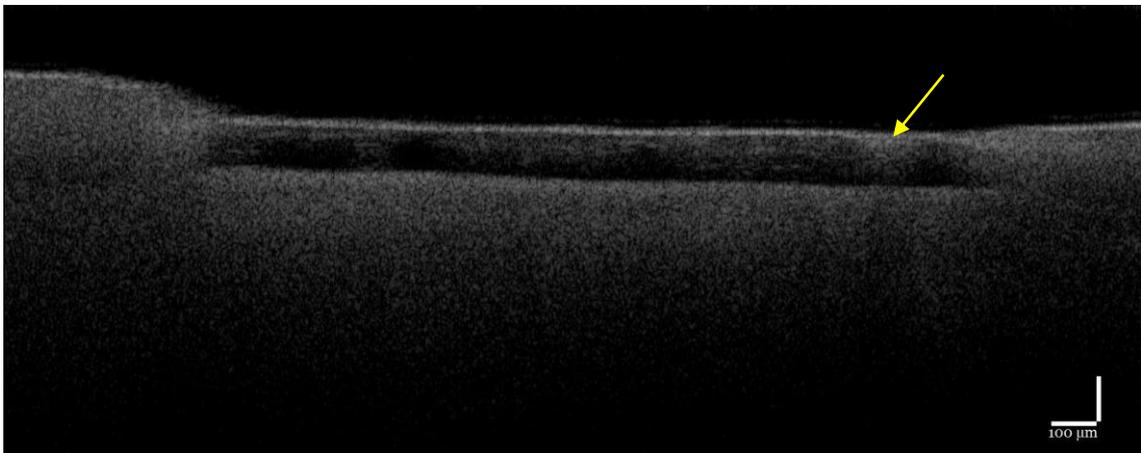


Figura 20: Imagem de OCT representativa para o Grupo 5 (Flúor -> Laser), antes da ciclagem de pH. A seta amarela indica um ponto representativo da presença de ondulações provocadas pelo modo pulsado do laser.

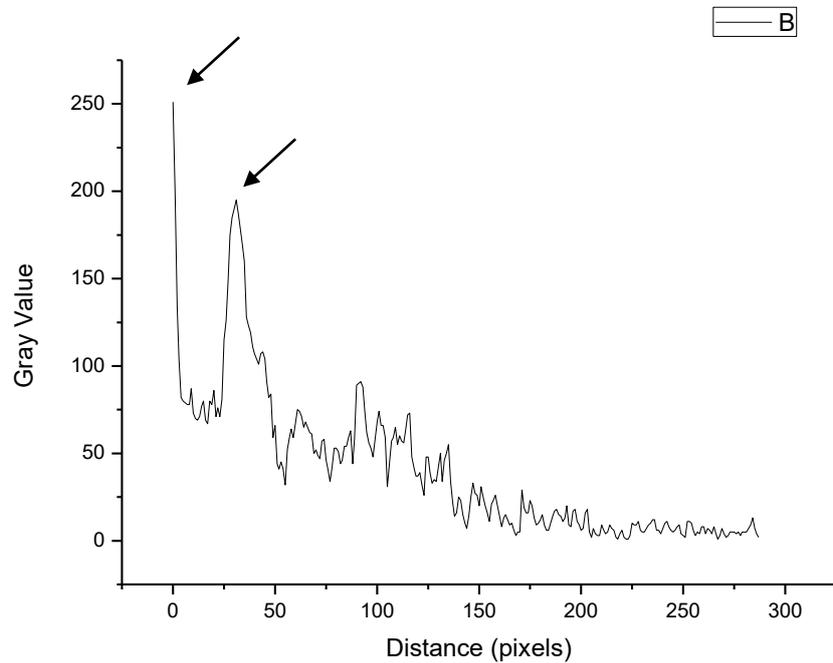


Como pode ser observado nas imagens anteriores, em todos os grupos experimentais é percebida um grande espaço escuro abaixo das superfícies das amostras. Tal fato pode ser explicado por uma possível desidratação superficial das amostras, que levou à formação de uma superfície ressecada e com um índice de refração diferente ao da parte mais interna da amostra. Este espaço preenchido por pixels pretos entre a superfície mais externa e a mais interna da dentina pode ser explicado pelo “destacamento” da superfície e pela presença de ar nesta região, como se a superfície mais externa estivesse se desprendendo da dentina mais interna. Apesar de as amostras terem sido mantidas em ambiente úmido, verificou-se que isto não foi suficiente para que não ocorresse a desidratação superficial. Enquanto que na dentina hidratada os túbulos dentinários estão preenchidos por água (índice de refração igual a 1,33), na dentina desidratada estes túbulos estão preenchidos por ar (índice de refração igual a 1) [68].

Nas imagens representativas dos grupos G3, G4 e G5 são observadas pequenas ondulações abaixo da camada mais superficial (indicado pelas setas amarelas nas Figuras 18, 19 e 20) e isto ocorre devido modo pulsado utilizado no equipamento *laser* para irradiar as amostras. As imagens também demonstram que o efeito da radiação não é homogêneo frente a toda área irradiada, podendo isto ser explicado pela diferença no tempo em que cada região ficou exposta ao feixe e da interação com o material biológico. Conforme já explicado anteriormente na revisão bibliográfica, os *lasers* são capazes de promover alterações químicas e estruturais na dentina devido ao efeito térmico, alterando assim a forma com que a luz irá se espalhar e refletir quando em contato com a região.

O coeficiente de atenuação óptica é calculado a partir da análise do sinal captado pelo OCT, levando-se em consideração o decaimento exponencial do sinal em função da profundidade. Conforme pode ser observado na Figura 21, não foi possível realizar um ajuste exponencial, visto que não há um decaimento constante do sinal e, por este motivo, não foram calculados os coeficientes de atenuação óptica para as amostras antes da realização da ciclagem de pH.

Figura 21: Gráfico demonstrativo de uma amostra onde são observadas interfaces no interior da amostra, conforme indicado pelas setas.



Após realizar o desafio cariogênico nas amostras, foram extraídas imagens transversais das amostras utilizando o mesmo equipamento OCT. Nas Figuras 22, 23, 24, 25 e 26, constam uma imagem representativa para cada um dos grupos experimentais.

Figura 22: Imagem de OCT representativa para o Grupo 1 (Controle), após a ciclagem de pH.

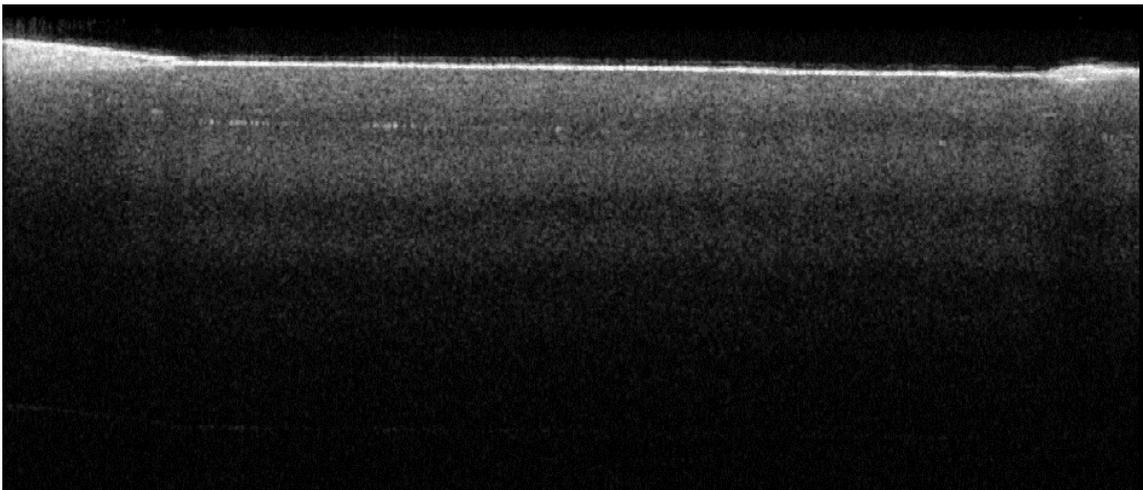


Figura 23: Imagem de OCT representativa para o Grupo 2 (Flúor), após a ciclagem de pH.

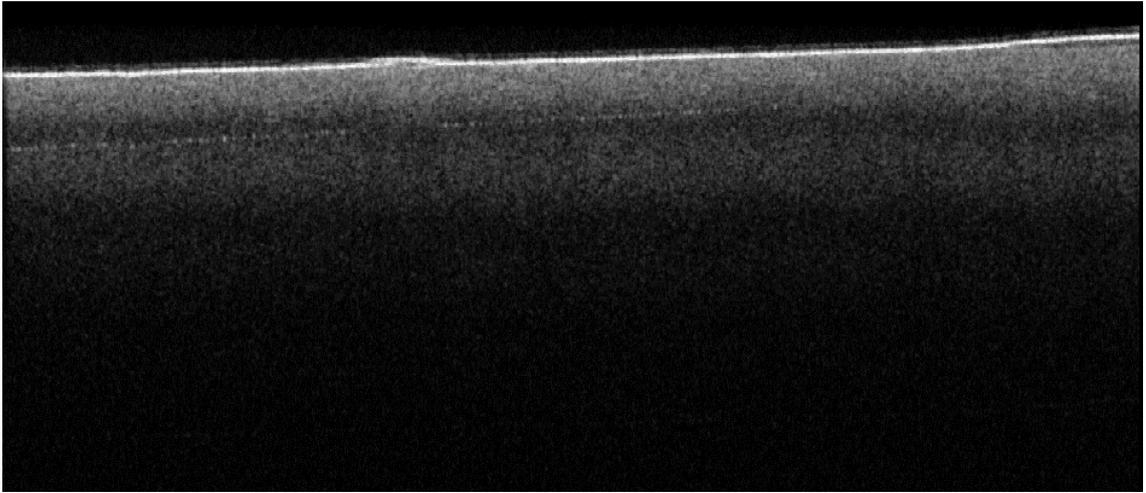


Figura 24: Imagem de OCT representativa para o Grupo 3 (Laser), após a ciclagem de pH.

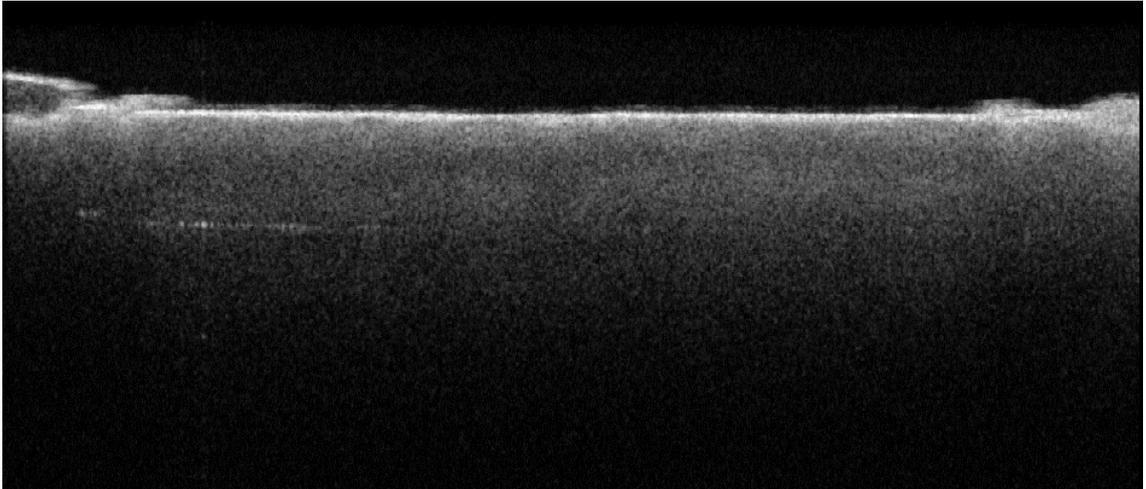


Figura 25: Imagem de OCT representativa para o Grupo 4 (Laser -> Flúor), após a ciclagem de pH.

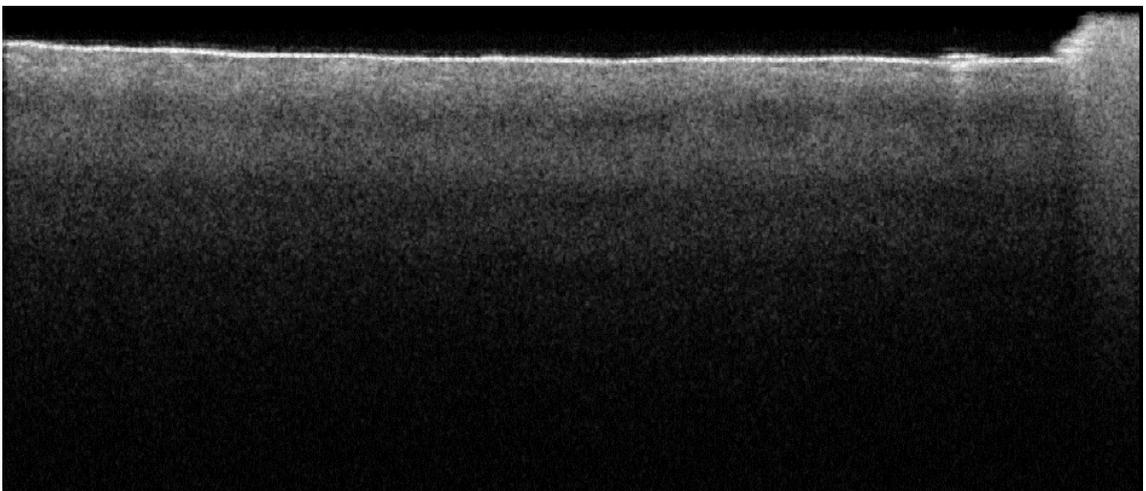
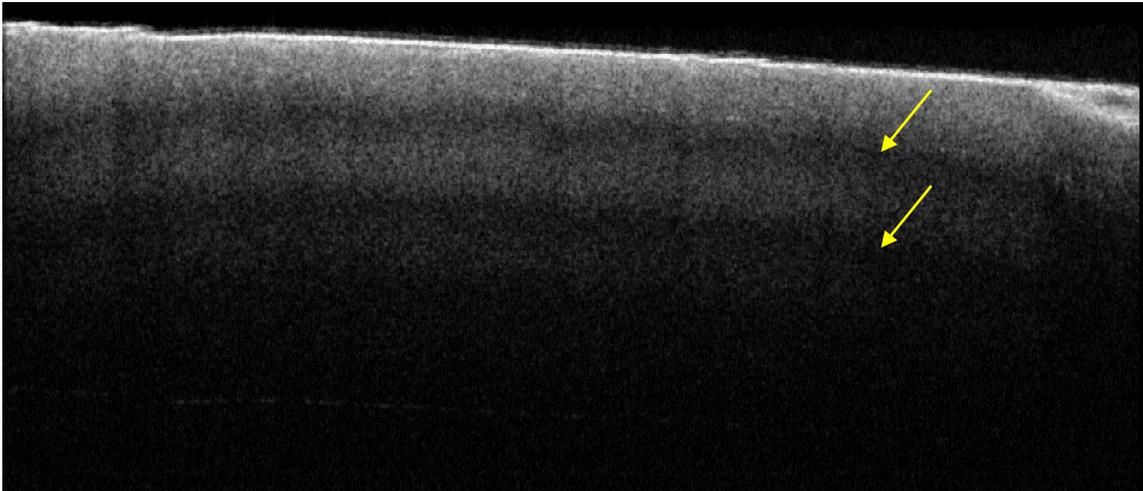


Figura 26: Imagem de OCT representativa para o Grupo 5 (Flúor -> Laser), após a ciclagem de pH. As setas amarelas indicam a presença de interfaces no interior da amostra.

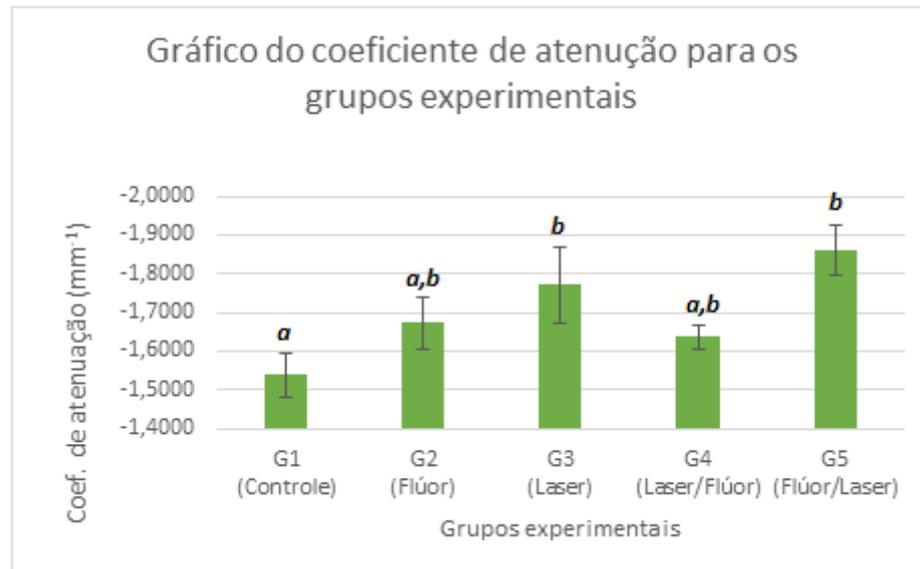


Ao realizar uma breve comparação entre as imagens obtidas pré e pós ciclagem de pH, é observado que, após a realização do desafio cariogênico, não foi mais observada a grande interface superficial advinda da desidratação das amostras. Como o ataque ácido faz com que haja uma perda de material superficial, tal fato pode explicar a ausência da superfície desidratada pois os espaços, anteriormente preenchidos com hidroxiapatita, foram preenchidos por água.

Analisando as imagens obtidas após a ciclagem de pH, verificou-se que, em algumas amostras, são observadas interfaces na imagem do interior da dentina, conforme pode ser percebido pelas setas amarelas na Figura 26. Isso ocorre devido ao processo de desmineralização provocado pelo desafio cariogênico, uma vez que ele cria espaços vazios na estrutura da dentina, fazendo com que haja um maior espalhamento de luz [67].

Como em todas as imagens percebe-se a presença de um pico de sinal na parte mais superficial das amostras, ocasionado pela alta refletividade da luz ao atravessar do meio externo (ar) para o meio interno (dentina), esta região não foi considerada no cálculo do coeficiente de atenuação óptica. Após os cálculos, foram obtidos os coeficientes de atenuação óptica para os diferentes grupos experimentais após a ciclagem de pH, conforme apresentado na Figura 27.

Figura 27: Valores médios dos coeficientes de atenuação óptica para os diferentes grupos experimentais após a realização da ciclagem de pH. Barras evidenciam erro padrão. Letras distintas evidenciam médias estatisticamente diferentes de acordo com o teste de Tukey.



Para realização da análise estatística foram removidos os *outliers* de cada grupo experimental, caso eles existissem, e executou-se os testes de normalidade e homogeneidade das variâncias, de tal forma que fosse possível executar as análises de ANOVA e TUKEY. Os resultados encontrados foram dispostos na Tabela 2.

Tabela 2: Tabela com os valores encontrados nas Análises Estatísticas para ANOVA e TUKEY.

FONTES DE VARIAÇÃO	GL	SQ	QM
Tratamentos	4	0,442	0,111
Erro	39	0,69	0,018
F =	6,2488		
(p) =	0,0008		
Média (Coluna 1) =	-1,5244		
Média (Coluna 2) =	-1,6914		
Média (Coluna 3) =	-1,7505		
Média (Coluna 4) =	-1,6456		
Média (Coluna 5) =	-1,8135		
Tukey:	Diferença	Q	(p)
Médias (1 a 2) =	0,1669	3,8624	ns
Médias (1 a 3) =	0,2261	4,9461	< 0.01
Médias (1 a 4) =	0,1212	2,5567	ns
Médias (1 a 5) =	0,2891	6,6892	< 0.01
Médias (2 a 3) =	0,0591	1,3255	ns

Médias (2 a 4) =	0,0457	0,9865	ns
Médias (2 a 5) =	0,1222	2,9043	ns
Médias (3 a 4) =	0,1049	2,1542	ns
Médias (3 a 5) =	0,063	1,4127	ns
Médias (4 a 5) =	0,1679	3,6222	ns

Os valores médios dos coeficientes de atenuação óptica obtidos para os grupos experimentais foram os seguintes e seus respectivos desvio padrão são: G1: $-1,5381 \pm 0,0548 \text{ mm}^{-1}$; G2: $-1,6730 \pm 0,0685 \text{ mm}^{-1}$; G3: $-1,7706 \pm 0,0987 \text{ mm}^{-1}$; G4: $-1,6370 \pm 0,0302 \text{ mm}^{-1}$, e G5: $-1,8609 \pm 0,0666 \text{ mm}^{-1}$. O sinal negativo indica o decaimento exponencial das medidas do sinal.

Em módulo (sem considerar o sinal negativo do decaimento exponencial) o grupo que apresentou o menor coeficiente de atenuação após a ciclagem de pH foi o G1 (Controle). Isto ocorre porque o ataque ácido leva a formação de espaços vazios na estrutura da dentina, ocasionada pela maior perda mineral. A presença de espaços faz com que ocorra uma maior penetração do feixe laser na amostra, sem que ele interaja com os centros espalhadores. Desta forma, é observado um menor espalhamento de luz na superfície e uma maior penetração da luz em profundidade na amostra.

O grupo que apresentou o maior módulo de coeficiente de atenuação foi o G5 (Flúor/Laser). Neste grupo, foi observado uma menor perda mineral após o ataque cariogênico e isso pode ser explicado pela aplicação tópica de flúor e uma seguinte irradiação com *laser*, levando à maior formação de fluoreto de cálcio na superfície da amostra em comparação com os demais grupos experimentais. O efeito térmico provocado pelo *laser*, promoveu uma maior aderência da camada de fluoreto de cálcio, diminuindo sua perda após o processo de ciclagem de pH e prolongando por maior tempo o efeito cariostático promovido pelo flúor.

A aplicação do FFA para uma posterior aplicação do laser (G5) promoveu uma menor perda mineral se comparado com o grupo em que ocorreu a irradiação laser previamente à aplicação do FFA (G4). O grupo G4 apresentou uma relativa diminuição na perda mineral em comparação com o grupo G1, entretanto, tal resultado não foi tão expressivo quanto comparado com os demais grupos.

Devido à escassez de estudos que quantificam o coeficiente de atenuação óptica para a desmineralização da dentina, há uma divergência na literatura sobre a diminuição do coeficiente

de atenuação óptica de amostras desmineralizadas quando comparadas com amostras sadias. Os resultados apresentados neste estudo condizem com os apresentados por Popescu *et al.*, por Sowa *et al.* e por Maia *et al.* 2015, porém são contrários aos apresentados por Mujat *et al.* 2003 e De Cara *et al.* 2012.

Embora seja observado que a aplicação tópica de FFA e que a irradiação *laser* sejam capazes de aumentar a resistência ao desafio cariogênico, o estudo demonstrou que a associação do FFA para uma posterior irradiação *laser* sob parâmetros adequados, apresenta melhores resultados na inibição da formação de uma lesão de cárie incipiente. Estudos sugerem que a irradiação *laser* aumenta a difusibilidade do flúor, deixando-o mais susceptível a absorção deste íon pela estrutura do dente [70][71]. Outro estudo sugere que a irradiação leva a formação de microespaços na estrutura superficial e que estes funcionam como depósitos de íons liberados pela desmineralização, os quais participariam do processo de remineralização do dente [73]. Estudos mais recentes sugerem que a irradiação *laser* é capaz de promover maior retenção de fluoreto e, conseqüentemente, aumentado o efeito cariostático por um maior período de tempo [66].

Em outro trabalho, é sugerido que o *laser* é capaz de melhorar a incorporação do FFA quando aplicado topicamente na superfície do dente, e que este efeito é potencializado quando a irradiação ocorre antes da aplicação do FFA [72]. Em contrapartida, este estudo diverge quanto a este resultado, visto que o coeficiente de atenuação óptico em valor absoluto foi maior quando a irradiação *laser* ocorre posteriormente a aplicação do FFA.

6. Conclusão

A técnica de OCT trata-se de uma metodologia inovadora para realizar a aquisição de imagens da superfície do dente, com resolução suficiente para identificar algumas alterações estruturais. Além disso, a técnica se demonstrou uma excelente alternativa para quantificar a perda mineral do dente, podendo servir como uma ferramenta para acompanhar o aparecimento ou progressão da lesão de cárie. Por se tratar de uma técnica não invasiva, pode ser utilizada *in vivo* nas clínicas de odontologia.

O estudo comprova que a avaliação do coeficiente de atenuação óptica é adequado para avaliar a eficiência de diferentes tratamentos para inibir o processo de desmineralização da dentina.

Foi observado que a aplicação tópica de flúor fosfato acidulado seguida da irradiação laser ainda pode ser considerado como um dos melhores tratamentos anti-cárie, porém verifica-se a necessidade de aprofundar estudos que avaliem e quantifiquem o efeito anti-cariostático do flúor agindo em sinergia com a irradiação laser.

Referências Bibliográficas

- [1] BARTLETT, D. W.; **The role of erosion in tooth wear: aetiology, prevention and management.** International Dental Journal., 2005.
- [2] BRASIL. **Ministério da Saúde. Notícias.** Portal da Saúde/SUS, 18 de agosto de 2013. Disponível em: Acesso em: 03 de janeiro de 2014.
- [3] CURY, J.A.; **Uso do flúor e controle da cárie como doença.** In: BARATIERI, L.N. et al. Odontologia restauradora - Fundamentos e possibilidades, Santos - SP, 2001.
- [4] MARTHALER, T.M.; **Changes in dental caries 1953-2003.**, Carie Res., v. 38, p. 173-181, 2004.
- [5] FEJERSKOV, O.; KIDD, E.; **Cárie dentária: a doença e seu tratamento clínico.**, Santos – SP, 2011.
- [6] GERALDO-MARTINS, V.R.; LEPRI, C.P.; FARAONI-ROMANO, J.J.; **The combined use of Er, Cr:YSGG and fluoride to prevent root dentin demineralization.** J.Appl. Oral Sci., v.22(5), p.459-64, 2014.
- [7] KURODA, S.; FOWLER, B O.; **Compositional, structural, and phases changes in in vitro laser-irradiated human tooth enamel.**, Calcif. Laser Tissue. Int.; v-36; p 361-369, 1984.
- [8] HOSSAIN, M.; KIMURA, Y.; NAKAMURA, Y.; YAMADA, Y.; KINOSHITA, J.I.; MATSUMOTO, K. **A study on acquired acid resistance of enamel and dentin irradiated by Er,Cr:YSGG laser.**, J Clin Laser Med Surg, v. 19, n.3, p. 159-163, 2001.
- [9] AMARAL, S. D. M. et al. **Lesões não cáries: o desafio do diagnóstico multidisciplinar.** Arquivos Internacionais de Otorrinolaringologia, p. 96-102, 2012.
- [10] COMAR, L. P. et al. **Dental erosion: an overview on definition, prevalence, diagnosis and therapy.**, Braz Dent Sci, v. 16, n. 1, p. 6-17, 2013.
- [11] 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, 031118, 2005.
- [12] PEREIRA, D. L.; **Uso de técnicas Ópticas no Monitoramento dos efeitos do laser de Nd:YAG sobre Erosão Dentária,** 2014.
- [13] FUJIMOTO, J. G.; **Optical coherence tomography for ultrahigh resolution in vivo imaging.**, Nat Biotechnol, 2003.
- [14] 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.

- [15] 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.
- [16] 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. App. Physics, v.99, 024960, 2006.
- [17] 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. App. Physics, v.99, 024960, 2006.
- [18] 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.
- [19] MICHELSON, A.A.; **Studies In Optics.** 1º Edição, Mineola, NY: Editora Dover, 1995.
- [20] FREITAS, A.Z. **Caracterização de Tecidos Biológicos através de Tomografia por Coerência Óptica.**, Tese (Doutorado) – Instituto Pesquisas Energéticas e Nucleares São Paulo, São Paulo, 2007.
- [21] HUANG, G.T.; **Dental pulp and dent tissue engineering and regeneration: advancement and challenge.** Front. Biosc., v. 3, p. 788-800, 2011.
- [22] GOLDBERG, M.; **Dentin: structure, composition and mineralization.** Front. Biosc., v. 3, p. 711-735, 2011.
- [23] NANCI, A.; **Histologia oral.** [trad.] Marcelo Sampaio Narciso, Elsevier, Rio de Janeiro, 2013.
- [24] FEATHERSTONE, J.D.B.; **The science and practice of caries prevention.** J.A.D.A., v. 131, p. 887-899, 2000.
- [25] FEATHERSTONE, J.D.B.; **Remineralization, the natural caries repair process - the need for new approaches.** Adv. Dent., Res., v. 21, p. 4-7, 2009. On line version: <<http://adr.sagepub.com/content/21/1/4>>.
- [26] 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.
- [27] RAVALD N.; STARKHAMMAR JOHANSSON C.; **Tooth loss in periodontally treated patients. A long-term study of periodontal disease and root caries.** J. Clin. Periodontol., v. 39, p. 73-79, 2012.
- [28] WHIRW, B.A.; CAPLAN, D.J.; WEINTRAUB, J.A.; **A quarter century of changes in oral health in the United States.** Journal of Dental Education., v. 58, 1995.

- [29] BURGUES, J.O.; **Treating root-surface caries**. Dent. Clin. N. Am., v. 46, 2002, p. 385-404, 2002.
- [30] CONCEIÇÃO, E.N.; **Dentística: Saúde e Estética**. Segunda edição, Artmed, 2007.
- [31] ARNOLD, W. H.; **Micromorphological and micronanalytical characterization of stagnating and progressin and root caries lesions**. Archives of Oral Biology. v. 52, p. 591-597, 2007.
- [32] ANA, P.A.; BACHMANN, L.; ZECELL, D.; **Lasers efeccts on enamel for caries prevention**. Laser Physics, v. 16, p. 865-875, 2006.
- [33] FEATHRSTONE, J.D.B.; **Changes in acid resistance of dentin irradiated by a CW 10,6 µm CO2 laser**. [ed.] Rechmann P; Fried D, p. 684305, 2008.
- [34] SAUNDERS, R.H; HANDELMAN, S.L.; **Effect of hiposalivatory medications on saliva flow rates and dental caries in adult aged 65 and older**. Spec. Care Dentist., v. 12, p. 116-21, 1992.
- [35] ZECELL, 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.
- [36] ZECELL, D.M.; RIBEIRO, M.S.; MALDONADO, E.P.; **Apostila da disciplina - Interação da Luz Laser com tecidos biológicos: aplicações**. Curso Mestrado Profissionalizante "Lasers em Odontologia", IPEN, 2007.
- [37] FEATHRSTONE, J.D.B.; **Changes in acid resistance of dentin irradiated by a CW 10,6 µm CO2 laser**. [ed.] Rechmann P; Fried D. , p. 684305, 2008.
- [38] OLIVEIRA, M.E.; **Avaliação de diferentes parâmetros para irradiação do esmalte dental com o laser de CO2, visando a redução da desmineralização**. Tese (Doutorado em Odontologia, área de concentração: Dentística). Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.
- [39] FEATHERSTONE, J.D.B.; **CO2 laser inhibition of artificial caries-like lesion progression in dental enamel**. J. Dent. Res., v. 7, p. 1397-403, 1998.
- [40] DUARTE, F.J.; **Laser Pulse Phenomena and Applications**, InTech, Optical Coherence Tomography: Development and Applications, p. 409-432, 2010.
- [41] FERCHER, A.F.; DREXTER, W.; HITZENBERGER, C.K.; LASSER, T.; **Optical coherence tomography – principles and applications**. Rep. Prog. Phys., v. 66, p.239-303, 2003.
- [42] POPESCU, D.P.; SOWA, M. G.; HEWKO, M. D.; CHOO-SMITH, L. P.; **Assessment of early demineralization in teeth using the signal attenuation in optical coherence tomography images**. *J. Biomed. Opt.*, v.13, n.3, 054053, 2008.

- [43] AZEVEDO, C.S.; TRUNG, L.C.E.; SIMIONATO, M.R.L.; FREITAS, A.Z.; MATOS, A.B.; **Evaluation of caries-affected dentin with optical coherence tomography.** *Braz. Oral Res.*, v.25, n.5, p.407-13, 2011.
- [44] COLSTON, B.W.; EVERETT, M.J.; DA SILVA, L.B.; OTIS, L.L.; STROEVE, P.; NATHIEL, 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.
- [45] FRIED, D.; XIE, J.; SHAFI, S.; FEATHERSTONE, J.D.B.; BREUNING, T.M.; LE, C.; **Imaging caries lesions and lesion progression with polarization sensitive optical coherence tomography.** *J. Biomed. Opt.*, v. 7, n. 4, p. 618-624, 2002.
- [46] TEN CATE J.M.; DUIJSTERS, P.P.E.; **Alternating Demineralization and remineralization of artificial enamel lesions,** *Caries Res.* V 16; p.201-210, 1982.
- [47] 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 Odontologia - Área de concentração em Cariologia). Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba, 2004.
- [48] 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.
- [49] 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.
- [50] BREZINSKI, M. E. **Optical Coherence Tomography: Principles and Applications.** Elsevier Inc. 2006.
- [51] 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.
- [52] 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.
- [53] PRASAD, P., N. **Introduction to Biophotonics.** John Wiley & Sons. New Jersey, 2003.
- [54] ZILIO, S., C. **Óptica Moderna Fundamentos e Aplicações.** Instituto de Física de São Paulo. Universidade de São Paulo. 2009.
- [55] GUTIÉRREZ-REYES, E.; GARCÍA-VALENZUELA, A.; BARRERA, R. G. **Overview of an effective-medium approach to the reflection and refraction of light at a turbid colloidal half-space.** *Basic Solids State Physics*, Vol 249, Issue 6, pp 1140-1147, 2012.

- [56] 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.
- [57] SILVA, D. C. M. da. **Reflexão especular e difusa.** *Brasil Escola.* Disponível em: <<http://brasilecola.uol.com.br/fisica/reflexao-especular-difusa.htm>>. Acesso em: 04 nov. 2017.
- [58] MAIA, A. M. A., FREITAS, A. Z., **Evaluation of dental enamel caries assesment using Quantitative Light Induced Fluorescence and Optical Coherence Tomography,** Wiley Online Library, *Journal of Biophotonics*, 2015.
- [59] NARVAI, P. C., **Vigilância sanitária da fluoretação das águas de abastecimento público no município de São Paulo, Brasil, no período de 1990-1999,** Tese (Livre Docência), Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.
- [60] FEATHERSTONE, J. D. B., **Prevention and reversal of dental caries: role of low level fluoride.** *Comm. Dent. Oral Epidemiol*, v. 27, 1999.
- [61] FERJESKOV, O.; KIDD, E., **Cárie Dentária: a doença e seu tratamento clínico,** Editora Santos, São Paulo, 2005.
- [62] LARSEN, M. J.; BRUN, C., **A química da cárie dentária e o flúor – mecanismo de ação.** In: THYLSTRUP, A., FEJERSKOV, O., *Cardiologia Clínica*, Livraria Editora Santos, São Paulo, 1995.
- [63] LEGEROS, R. Z., **Calcium phosphates in demineralization/remineralization processes,** *J. Clin. Dent*, v. 10, 1999.
- [64] FRIED, D.; FEATHERSTONE, J. D. B.; VISURI, S. R.; **The caries inhibition potential of Er:YAG and Er,Cr:YSGG laser irradiation.** In: WIGDOR, H.A., *Lasers in Dentistry II*, Bellingham, 1996.
- [65] DA-GUANG, Y.; KIMURA, Y.; **Morphological and atomic analytical studies on enamel and dentin irradiated by erbium, chromium:YSGG laser,** *J. Clin. Laser Med. Surg*, 2000.
- [66] HOSSAIN, M.; KIMURA, Y.; **Acquired acid resistance of enamel and dentin by CO₂ laser irradiation with sodium fluoride solution,** *J. Clin. Laser Med. Surg.*, v.20, 2002.
- [67] DE CARA, A., C.; **Avaliação do processo de desenvolvimento de desmineralização em esmalte dental humano utilizando a técnica de Tomografia por Coerência Óptica,** Dissertação de Mestrado do Curso de Engenharia Biomédica, Universidade Federal do ABC, São Paulo, 2012
- [68] BRITO, A., M., M.; **Efeitos químico-estruturais promovidos pelo laser de Nd:YAG associado ou não ao fluoreto, quando empregado para progressão de lesões de cárie radicular,** Dissertação de Mestrado do Curso Biotecnologia, Universidade Federal do ABC, Santo André, 2014.

- [69] MUJAT, C.; VAN DER VEEN, M.H.; RUBEN, J.L.; TEN BOSCH, J.J.; DOGARIU, A.; **Optical path-length spectroscopy of incipient caries lesions in relation to quantitative light induced fluorescence and lesions characteristics.** *Appl. Opt.*, v.42, n.16, p. 2079-2086, 2003.
- [70] SOWA, M.G.; POPESCU, D.P.; FRIESEN, J.R.; HEWKO, M. D.; CHOO-SMITH, L. P.; **A comparison of methods using optical coherence tomography to detect demineralized regions in the teeth.** *J. Biophotonics*, v.4, n.11-12, p.814-823, 2001.
- [71] HICKS, J.; WINN, D.; **In vivo caries formation in enamel following argon laser irradiation and combined fluoride and argon laser treatment: a clinical pilot study.** *Quintessence Int.*, v. 35, 2004.
- [72] TAGOMORI, S.; MORIOKA, T.; **Combined effects of laser and fluoride on acid resistance of human dental enamel,** *Caries Res.*, v. 54, 1989.
- [73] YOKOYAMA, K.; KIMURA, Y.; **Preventive effects of tooth fracture by pulsed Nd:YAG laser irradiation with diamine silver fluoride solution,** *J. Clin. Laser Med. Surg.*, v. 19, 2001

Anexos

Anexo 1: Aprovação da CEUA (Comissão de Ética em Uso de Animais).



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



Santo André, 23 de setembro de 2015
CEUAx N 3055120915

Ilmo(a). Sr(a).
Responsável: Patrícia Aparecida Da Ana
Disc ou Centro: Ceca
Equipe envolvida: Elizabete Dos Santos Ferreira Silva - *executor* (ufabc); Ilka Tiemy Kato Frates - *colaborador* (ufabc); Nia (orientador)

Título do projeto: "Estudo in vitro dos efeitos do laser de Er,Cr:YSGG na dentina quando empregado para prevenção da cárie radicular".

Parecer Consubstanciado da CEUA UFABC

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Fundação Universidade Federal do ABC, na reunião de 22/09/2015, ANALISOU e APROVOU o protocolo de estudo acima referenciado. A partir desta data, é dever do pesquisador:

1. Comunicar toda e qualquer alteração do protocolo.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do protocolo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.
4. **Relatórios parciais** de andamento deverão ser enviados **anualmente** à CEUA até a conclusão do protocolo.

Atenciosamente,

Profa. Dra. Renata Simões
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal do ABC



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 3055120915, under the responsibility Patrícia 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 "Estudo in vitro dos efeitos do laser de Er,Cr:YSGG na dentina quando empregado para prevenção da cárie radicular", protocolado sob o CEUAx nº 3055120915, sob a responsabilidade de Patrícia 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