ERIKA MICHELE DOS SANTOS ARAUJO

Caracterização de lesões de mancha branca naturais

São Paulo

2021

ERIKA MICHELE DOS SANTOS ARAUJO

Caracterização de lesões de mancha branca naturais

Versão Corrigida

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia (Dentística) para obter o título de Doutor em Ciências.

Orientador: Profa. Dra. Adriana Bona Matos

São Paulo

2021

Catálogo da Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Araujo, Erika Michele dos Santos.

Caracterização de lesões de mancha branca naturais / Erika Michele dos Santos Araujo ; orientador Adriana Bona Matos -- São Paulo, 2021.

91 p. : fig., tab. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) -- Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de concentração: Dentística. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão corrigida.

1. Esmalte dentário. 2. Cárie dentária. 3. Desmineralização. I. Matos, Adriana Bona. II. Título.

Fábio Jastwebski – Bibliotecário - CRB8/5280

Araujo EMS. Caracterização de lesões de mancha branca naturais. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovado em: 08/10/2021

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). Alessandra Pereira de Andrade

Instituição: Universidade São Francisco

Aprovada

Prof(a). Dr(a). Anderson Zanardi de Freitas

Instituição: Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares

Aprovada

Prof(a). Dr(a). Cristina de Mattos Pimenta Vidal

Instituição: Universidade de Iowa

Aprovada

A **Deus**, por tudo que sou e tudo que conquistei em minha vida.

Aos meus pais **Alexssandra e Ernani** por todo esforço, incentivo, apoio e amor.
Espero um dia poder retribuir tudo que vocês fizeram e fazem por mim. Amo vocês!

À minha avó **Irene**, e às minhas tias-avós **Maria** (*in memoriam*) **Porfiria e**

Raimunda, por todo seu cuidado, amor, carinho e dedicação.

À minha **família**, em especial aos meus irmãos **Erick e Hayram**, por toda a torcida
e apoio de sempre.

Às minhas amigas/irmãs **Fernanda e Júlia** que dividiram todos esses anos ao meu
lado, desde a graduação. Muito obrigada por tudo!

Ao meu namorado, **Christian**, por todo o apoio, amor, carinho e incentivo que tem
me dado durante esse último ano. I love you!

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo e ao diretor Prof. Dr. Rodney Garcia Rocha e Vice-Diretor Prof. Dr. Giulio Gavini.

Ao chefe do departamento de Dentística, Prof. Dr. Celso Luiz Caldeira e o Prof. Dr. Fernando Neves Nogueira, Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Dentística.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) pelo apoio e incentivo financeiro para o desenvolvimento deste trabalho – Código de financiamento 001 (Processo nº: 88882.376626/2019-01). Agradeço também o financiamento do meu Doutorado Sanduíche desenvolvido na Universidade de Iowa (Processo nº: 88887.371119/2019-00).

Aos professores do Departamento de Dentística da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, por todo o conhecimento, pelas parcerias e experiências compartilhadas durante todo o meu período no mestrado e doutorado.

Aos funcionários do Departamento de Dentística: Aldo, David, Leandro, Selma, e Silvana, obrigada por todo o apoio!

À minha orientadora no exterior, Cristina Vidal, por me receber tão bem na *University of Iowa*. Agradeço por todo conhecimento compartilhado, apoio, oportunidade, confiança e cuidado. Obrigada por tudo!

Aos professores e funcionários do *Department of Operative Dentistry*, muito obrigada por me receberem tão bem.

Ao Prof. Dr. Anderson Zanardi de Freitas (IPEN) por todo o ensinamento e apoio na utilização do OCT e do Raman.

Aos meus colegas do Departamento de Dentística, muito obrigada por esses 5 anos juntos, por todo o companheirismo, e pelos momentos de alegria e até de ansiedade que compartilhamos. Desejo sucesso a todos.

Às minhas amigas da *Sunset Home*, Cris (Uly, claro) e Flaviana, com quem tive a felicidade de dividir momentos de muita alegria enquanto estive em Iowa. Vocês fizeram eu me sentir em casa, obrigada por tudo!

À todos que contribuíram direta e indiretamente para o desenvolvimento e conclusão desse trabalho, os meus sinceros agradecimentos!

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À minha orientadora, **Adriana Bona Matos**, com quem pude compartilhar esses 5 anos de muito aprendizado, parceria, apoio e confiança. Agradeço por ter tido a oportunidade de trabalhar, aprender e construir essa amizade com você. Obrigada por todos os conselhos, palavras de apoio e incentivo, pelos momentos de alegria e até de ansiedade que dividimos durante esses anos. Agradeço por ter você como orientadora e amiga! Conte comigo sempre.

RESUMO

Araujo EMS. Caracterização de lesões de mancha branca naturais [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2021. Versão Corrigida.

O objetivo deste estudo foi caracterizar e comparar o esmalte sadio humano e lesões de mancha branca (ICDAS 2) em diferentes aspectos. Dezessete espécimes foram caracterizados por meio fluorescência com o Diagnodent[®], Fluorescência quantitativa induzida pela luz (QLF[®]), quanto aspectos ópticos pela Tomografia de Coerência Óptica (OCT), propriedades mecânicas com a Microdureza seccional e avaliação do conteúdo inorgânico e orgânico com a Espectroscopia Raman. A ANOVA e teste de Tukey, foram utilizados com 5% como nível de significância. O Diagnodent[®] identificou 75% das superfícies como hígidas, 7% cárie em esmalte, 10% lesão até junção esmalte-dentina e 7% cárie em dentina. Para o QLF[®], a perda de conteúdo mineral ΔQ (%mm²) foi de 15,37%mm² e a diferença de fluorescência (ΔF) foi de 11,68%. O aparelho OCT captou uma média de profundidade de lesões de 174,43 μ m, e um coeficiente de atenuação sem diferença significativa ($p>0,005$). A microdureza demonstrou uma diferença significativa ($p<0,005$) quando comparados os fatores: camada superficial e corpo do esmalte (hígido e lesão), porém não existe diferença significativa ($p>0,005$), quando comparados esses dois sítios dentro do mesmo substrato. O espectro Raman demonstrou as 4 bandas vibracionais do fosfato (ν_1 , ν_2 , ν_3 , ν_4) com maior intensidade no esmalte hígido, sendo o maior pico em 960,3 cm^{-1} (ν_1). Em 1071 cm^{-1} , a intensidade foi maior para o esmalte hígido, correspondendo a banda do fosfato (ν_3) e não o carbonato tipo B. O conteúdo orgânico foi visto em 1295 cm^{-1} e em 1450 cm^{-1} , com maior intensidade nas lesões. A variabilidade de características dos substratos estudados interferiu diretamente na caracterização destes pelos métodos propostos.

Palavras-chave: Esmalte dentário. Cárie dentária. Desmineralização.

ABSTRACT

Araujo EMS. Characterization of natural white spot lesions [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2021. Versão Corrigida.

This study aimed to characterize and compare the sound enamel and white spot lesions (WSL) ICDAS 2 using different aspects. Seventeen teeth were characterized by fluorescence by DIAGNOdent® and Quantitative light-induced fluorescence (QLF®), optical characteristics using Optical coherence tomography (OCT), mechanical characteristics using Transversal Microhardness, and the inorganic and organic content were evaluated using the Raman Spectroscopy. The ANOVA and Tukey's test was used considering the level of significance of 5%. The DIAGNOdent® readings identified 75% of the surfaces as sound enamel, 7% as enamel caries, 10% as caries on the dentin-enamel junction, and 7% as dentin caries. The QLF readings showed the ΔQ (ΔF integrated by lesion area) of -15,37%mm² and the fluorescence loss (ΔF) -11,68%. The OCT showed the mean lesion depth of 174,43 μm and the attenuation coefficient without significant difference between the substrates. The microhardness showed a significant difference ($p < 0.05$) when compared: outer layer and body of the substrates (sound enamel and WSL), however, when the outer layer and the body of the same substrate are not significantly different ($p > 0.05$). The Raman spectra showed 4 vibrational bands of phosphate (ν_1 , ν_2 , ν_3 , ν_4), where the highest peak was in 960.3 cm^{-1} (ν_1). The intensity of the peak 1071 cm^{-1} was higher for sound enamel, which demonstrates the phosphate band instead of the B-type carbonate. The spectra showed the organic composition at 1295 cm^{-1} and 1450 cm^{-1} , with higher intensity for lesions. The variability of characteristics interfered directly with the characterization of the substrates by the methods performed.

Keywords: Dental enamel. Dental caries. Demineralization.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 4.1 -Representação esquemática do delineamento experimental	41
Figura 4.1 - Fita em posição na área de leitura	42
Figura 4.2 - DIAGNOdent® posicionado para leituras.....	43
Figura 4.3 - Espécime posicionado para a leitura com o QLF®	45
Figura 4.4 - Imagem obtida após análise no software do aparelho	45
Figura 4.5 - Aparelho OCT e imagem obtida e analisada pelo Software Image J	46
Figura 4.6 - Equação de modelo de decaimento exponencial	47
Figura 4.7 - Software utilizado para avaliação do coeficiente de atenuação óptica ..	48
Figura 4.8 - Corte dos espécimes	49
Figura 4.9 - Leitura no Microdurômetro da lesão de mancha branca	50
Figura 4.10 -Espectroscopia Raman.....	51
Figura 5.1 - Gráfico referente a média dos valores de intensidade do substrato hígido e cariado	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1 - Resumo dos resultados da leitura da fluorescência com o uso do DIAGNOdent®	53
Tabela 5.2- Estatística descritiva dos valores obtidos pelo QLF®	54
Tabela 5.3 - Média $\pm$ desvio padrão do coeficiente de atenuação óptica(μm^{-1}) do esmalte hígido e da lesão de mancha branca	56
Tabela 5.4 - Média $\pm$ desvio padrão da dureza das diferentes camadas superficiais	57
Tabela 5.5- Média $\pm$ desvio padrão das amostras analisadas (esmalte hígido e corpo da lesão de mancha branca	57
Tabela 5.6 - Parâmetros avaliados para o substrato hígido e cariado, utilizando os valores de intensidade(u.a) dos picos(cm^{-1})	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A-scan	Sinal original do ensaio por ultrassom
ANOVA	Análise de Variância
CCP-ACP	Caseína Fosfato de Cálcio Amorfo
DES-RE	Processo de desmineralização e remineralização
ICDAS	Sistema Internacional de Detecção e Avaliação de Cárie
IPEN	Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares
KgF	Quilograma-força
KHN	Número de dureza knoop
mm ²	Milímetro quadrado
mW	Miliwatt
NIH	<i>National Institutes of Health</i>
nm	Nanometro
OCT	Tomografia de Coerência Óptica
QLF [®]	Quantificação da Fluorescência Induzida pela Luz
u.a	Unidades arbitrárias
µm	Micrometro

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
ΔQ	Perda de Fluorescência Integrada
ΔF	Perda de Fluorescência
cm^{-1}	Números de onda
I	Intensidade detectada
I_0	Intensidade da fonte luminosa
α	coeficiente de atenuação óptica total
z	Profundidade analisada
C	Constante

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	25
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	27
3	PROPOSIÇÃO.....	39
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	41
5	RESULTADOS	53
6	DISCUSSÃO.....	61
7	CONCLUSÃO	71
	REFERÊNCIAS	73
	ANEXOS	87

1 INTRODUÇÃO

As lesões de mancha branca estão relacionadas a processos de desmineralização e remineralização observados dentro da cavidade oral. Deve-se considerar ainda que, a deposição de biofilme dental, a ineficiência na sua remoção e a ingestão de carboidratos fermentáveis são fatores que predispõe à formação de lesões iniciais de cárie. Ao longo do tempo, os ácidos produzidos pelo biofilme bacteriano aumentam a acidez deste e a do meio e irão se difundir para o interior do esmalte dental ocasionando a dissolução parcial dos cristais de hidroxiapatita e a perda de cálcio e fosfato do dente. Esse fenômeno poderá ser retardado ou até paralisado pela ação da saliva, com a deposição de minerais e a elevação do pH, tornando o meio menos crítico para a estrutura dental (Robinson et al., 2000; Fejerskov & Kidd, 2008; Fejerskov et al., 2015).

Microscopicamente a lesão incipiente será observada como uma área de desmineralização de subsuperfície abaixo do biofilme dentário. O corpo da lesão de subsuperfície é caracterizado por uma perda entre 30 e 50% do seu conteúdo mineral, porém com a manutenção de uma camada superficial mais mineralizada ou aparentemente intacta (Fejerskov et al., 2015). Clinicamente, a lesão ativa, apresenta-se como uma mancha branca opaca, devido à mudança do índice de refração do esmalte após a perda mineral, perdendo desta forma, a translucidez observada no esmalte hígido (Featherstone, 1999). Após muitos processos de desmineralização e remineralização, esta desmineralização pode ser paralisada, e a superfície irá apresentar uma recristalização (Ten Cate; Arends, 1980). Deste modo, ela passa a ser observada como uma camada brilhante, porém com uma “cicatriz branca” em seu interior, pela ineficiência da penetração de íons e materiais mineralizantes no interior do tecido (Richards et al., 1977).

Com o advento da odontologia minimamente invasiva, que busca o diagnóstico e tratamento das lesões no seu estágio inicial, as características morfológicas, ópticas, químicas e micromecânicas das lesões de mancha branca são de suma importância para melhor conhecimento do processo carioso, promovendo uma base crítica para uma indicação de tratamento adequado (Huang et al., 2007). Assim, torna-se fundamental a manutenção de uma caracterização atual das estruturas e particularidades existentes no

esmalte dental sadio e na lesão de mancha branca.

Conhecer as características das lesões de mancha branca se torna relevante para uma correta identificação e tratamento das mesmas (Deyhle et al., 2014). A combinação de diferentes metodologias permite suprir ou minimizar algumas limitações de determinados métodos e auxilia no maior entendimento das características das lesões (Lippert et al., 2004; Sadyrin et al., 2020). A caracterização pode ser feita por meio de alguns métodos de diagnóstico como a Fluorescência induzida pela luz (QLF) mensura a autofluorescência dental e pode detectar diferenças na desmineralização de lesões incipientes (Stookey, 2005; Pretty, 2006; Lippert et al., 2011; Gomez, 2015; Gokce et al., 2017); a Tomografia por coerência óptica, que mapeia a lesão de cárie, determina sua profundidade, a birrefringência e coeficiente de atenuação da lesão (Amaechi et al., 2003; Ko et al., 2005; Sowa et al., 2011; Cara et al., 2012; Cara et al., 2014; Mandurah et al., 2013; Quitero et al., 2019); a análise química e dos componentes microestruturais do esmalte dental também são de suma importância. Pode-se lançar mão da Espectroscopia Raman para o mapeamento químico destas lesões (Kinoshita et al., 2008; Almahdy et al., 2012; Carvalho et al., 2013; Mohanty et al., 2013; Salehi et al., 2013; Ramakrishnaiah et al., 2015; Timchenko et al., 2015; Akkus et al., 2016; Buchwald et al., 2017; Buchwald, Buchwald, 2019; Sadyrin et al., 2020).

Em suma, metodologias mais recentes estão disponíveis para caracterização de lesões de mancha branca e já vem sendo utilizadas para a avaliação de tratamentos remineralizantes e restauradores, bem como a sua perspectiva de durabilidade ao longo dos anos. Ressalta-se que o conhecimento aprofundado das características do esmalte dental e das lesões naturais que acometem esse substrato influenciará diretamente na reprodutibilidade e confiabilidade dos estudos *in situ* e *in vivo*. Deste modo, estudos que utilizem metodologias mais modernas que caracterizem e comparem, de modo simultâneo, tais substratos por meio de avaliações químicas, morfológicas e físicas ainda são essenciais.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Esmalte dental

O esmalte dental é o tecido mais mineralizado do corpo humano, sua estrutura é formada por aproximadamente 95-97% de conteúdo mineral, constituído pelos cristais de hidroxiapatita (Robinson, 1995). A sua porção mineral é constituída por 2% de carbonato, 1% de zinco, sódio, magnésio e potássio, 2-3% de água, 0,01-0,05% de flúor e sua porção orgânica de 1% de lipídios e proteínas (Robinson et al., 2000; Hicks et al., 2004). A distribuição dos componentes minerais, da água e do material orgânico não é uniforme no substrato (Robinson et al., 1971; Robinson et al., 1983), mas será dependente de outras características relacionadas à anatomia e microestrutura do esmalte, como os seus espaços interprismáticos (Robinson et al., 1995). A composição majoritariamente mais mineralizada do esmalte dental lhe garante propriedades físicas que são similares às da hidroxiapatita, tais como, alta translucidez, módulo de elasticidade e a sua dureza (Robinson et al., 2000; Fejerskov et al., 2015; Hicks et al., 2004)

Os cristais de hidroxiapatita são bastões com aproximadamente 50nm de largura e 25nm a 1mm de comprimento, que quando agrupada em cerca de 1000 cristais, irá compor os prismas de esmalte - a maior parte da estrutura do esmalte dental (Daculsi et al., 1984; Fejerskov et al., 1984; Robinson et al., 1995). Cada prisma de esmalte apresenta-se como uma estrutura de 50µm de diâmetro que se estende da superfície do esmalte até a junção amelodentinária. As mudanças na angulação e na disposição desta estrutura irão determinar os limites entre os prismas adjacentes e entre o prisma e o material interprismático. Essa região interprismática é encontrada no interior dos prismas de esmalte, rica em proteínas e água, esta é a região menos mineralizada da estrutura prismática, por conta da orientação dos cristais (Robinson et al., 1995; Hicks et al., 2004).

Essas regiões fazem com que o esmalte dental, que macroscopicamente aparenta ser uma estrutura compacta e rígida, apresente espaços (poros) entre os seus cristais que serão então preenchidos pela água e pelo material orgânico presente no substrato (Gwinnett, 1992). Os poros do esmalte dental, representam as principais vias de difusão

do substrato, que funciona como uma membrana semipermeável (Fejerskov et al., 2015). Esta relação entre o substrato dental e o meio bucal é dinâmica e permite a realização de trocas iônicas e de água por vias de difusão por meio dos microporos presentes (Silverstone 1970; de Sousa et al., 2013).

A porção orgânica do esmalte dental consiste em proteínas de esmalte que são de natureza não colágena - os lipídios e os carboidratos (Ten cate, 2001). Como proteínas, estarão presentes as amelogeninas, enamelinas e as ameloblastinas. Essa composição orgânica, compreende apenas 1% do esmalte, que circunda seus cristais (Gwinnett 1992; Featherstone, 1999) e desempenha um papel importante no seu comportamento químico e físico (Smith, 1998). A água compreende 3% em volume e $\frac{1}{4}$ deste está diretamente relacionado a hidratação do esmalte dental (Carlstrom et al., 1963).

De acordo com sua composição, o esmalte dental pode ser classificado em dois diferentes tipos: esmalte aprismático e prismático; a inter-relação entre estas estruturas determinará a aparência transversal dos prismas de esmalte (Boyde et al., 1988, Robinson et al., 1995). A região aprismática é onde os cristais de hidroxiapatita encontram-se uniformemente arranjados, paralelos entre si e perpendicularmente dispostos na superfície (Silverstone et al., 1981). A presença da camada aprismática na superfície do esmalte foi reportada por diversos autores (Ripa et al., 1966; Whittaker, 1982; Robinson et al., 1995), no entanto a sua presença pode variar entre 50-70% ou até 20% ou menos no esmalte permanente. Por conta da organização dos cristais, tal disposição irá tornar a superfície mais mineralizada que a subsuperfície do esmalte (Robinson et al., 1971).

Já na região prismática é onde ocorrem as variações nas orientações destes cristais (Fava et al., 1997). Esta variação garante a característica anisotrópica do esmalte dental, onde a distribuição de forças mastigatórias, que podem gerar fraturas, irão ser impedidas de se prologarem quando atingirem a região onde os grupos de prismas se cruzam, além disso, essas características irão melhorar as propriedades físicas do substrato (Habelitz et al., 2001).

Deste modo, o esmalte dental é um sólido microporoso com alto módulo de elasticidade mas que se caracteriza como um material friável, (Gwinnett, 1992; Gianinni et al., 2004) o que o torna um substrato heterogêneo e complexo. Logo, suas

características e propriedades devem ser consideradas para entender o seu comportamento na cavidade oral, principalmente por este substrato estar sujeito constantemente a fenômenos como a desmineralização-remineralização bem como os esforços mecânicos.

2.2 Cárie dental e lesão de mancha branca

O *Global Burden of disease study* de 2017 estima que doenças que acometem a cavidade oral, como a cárie dental, afetam mais de 3,5 bilhões de pessoas no mundo. Dentro desta estimativa, a cárie em dente permanente é a mais prevalente, com 2,3 bilhões de pessoas no mundo acometidas pela doença (Peres et al., 2019). A cárie dental é uma doença crônica que envolve fatores genéticos, comportamentais (dieta, histórico de uso de medicações), culturais, sociais, biológicos (fluxo salivar) e ambientais na sua etiologia (Fejerskov et al., 2015; Phiton et al., 2015, Heymann; Grauer, 2013). A lesão é desenvolvida em consequência da adesão do biofilme na superfície dental. Após essa adesão inicial, a ingestão de carboidratos fermentáveis e a remoção do biofilme ineficientemente, fará com que o biofilme aderido se torne cariogênico. Esse processo irá desencadear uma cascata de fenômenos que acarretarão numa alteração da superfície dental (Fejerskov et al., 2015).

Esse biofilme dental é constituído primeiramente por proteínas salivares, lipídios e componentes do fluido gengival, que formam a película adquirida da superfície dental. Essa camada funcionará como um meio de adesão e coagregação de diferentes tipos de bactérias. Primeiramente será colonizado por bactérias, como *S. sanguis* e *S. oralis*. Estes microorganismos estarão aderidos à superfície formando microcolônias envolvidas pelo material extracelular, os polissacarídeos (Fejerskov et al., 2015). Esta película, agora colonizada inicialmente, estará susceptível à adesão e colonização por bactérias cariogênicas como o *S. mutans*, *S. sobrinus* e *Lactobacilos* (Mount, 2005), esses organismos não só secretam ácidos orgânicos resultantes da degradação de carboidratos fermentáveis para o meio bucal, como têm a capacidade de permanecer

neste ambiente ácido por todo o período de maturação do biofilme (Mount, 2005; Fejerskov et al., 2015; Quitero et al., 2019).

Com a secreção de ácido orgânicos para o meio bucal, como: os ácidos láctico, acético, fórmico e propiônico, ocorrerá a difusão destes para o interior do esmalte dental por meio dos poros presentes nessa estrutura. Desta forma, irá ocorrer um desequilíbrio no balanço dos minerais presentes no esmalte e o meio bucal por conta da diminuição do pH do meio bucal (Liu et al., 1998; Robinson et al., 2000; Featherstone et al., 2008; Kianoush et al., 2014; Al-Obaidi et al., 2018). Novos poros serão criados como consequência da dissolução parcial dos cristais de hidroxiapatita (Osborn, 1968; Silverstone et al., 1981; Cury; Tenuta, 2009).

O meio bucal geralmente se encontra em equilíbrio, ou seja, íons como o cálcio e o fosfato encontram-se disponíveis e saturados na saliva com relação ao esmalte dental, o que favorece a manutenção do estado cristalino do tecido quando o pH está maior do que 6,8 (Mount, 2005). Quando o desequilíbrio ocorre, a saliva, que possui uma importante função na manutenção do pH e limpeza do meio, irá agir no intuito de evitar a perda de minerais. Porém, se esses episódios de diminuição de pH forem frequentes e/ou duradouros, a saliva não atuará com o seu efeito protetor quando abaixo do pH crítico para a estrutura dental (pH 5,5) e assim ocorrerá a desmineralização (Featherstone 1999; Dawes 2003; Mount, 2005).

A lesão de mancha branca será o primeiro estágio da lesão de cárie dental. A prevalência destas lesões têm sido descritas como uma taxa que varia entre 15,5% e 40% (Heymann; Grauer, 2013), além disso, nos anos de 1986 e 2012 ocorreu um aumento na prevalência destas lesões em 29,2%, principalmente em pacientes que estão realizando tratamento ortodôntico (Sampson; Sampson, 2020). Clinicamente a sua aparência é opaca, isso se deve a um fenômeno óptico causado pela perda mineral e pela diferença do índice de refração da água e do ar que agora irão preencher esses espaços criados no esmalte dental. Com a criação destes canais, poderá ocorrer a difusão de água, saliva e ácido para o interior da lesão, e se houver a sua progressão, ocorrerá o alargamento dos canais, onde bactérias também poderão ser encontradas (Fejerskov et al., 2003; Ando et al., 2018; Cazzolla et al., 2018; Sampson; Sampson, 2020). Ademais, podem vir a apresentar uma fragilidade, principalmente em regiões de

fóssula e fissuras onde o esmalte está presente em uma espessura menor. Irá ocorrer o aumento da porosidade do esmalte, principalmente na região abaixo da camada superficial, o que facilitará a pigmentação do substrato e ainda que possua todas estas alterações citadas acima, o substrato ainda é passível de remineralização por meio da saliva ou por outros tratamentos remineralizantes (Mount, 2005).

Se ocorrer a progressão desta lesão e ação do processo de desmineralização e remineralização (DES-RE), a estrutura poderá apresentar uma camada mais mineralizada na superfície, e abaixo desta, estará a camada subsuperficial porosa, denominada corpo da lesão (Nelson et al., 1983; Pearce, 1983; Arends; Christoffersen, 1986; Featherstone, 1999). O desenvolvimento desta camada mais mineralizada ocorre por conta da presença do flúor que previne a dissolução dos minerais a base de apatita, repondo esta estrutura com a formação da fluorapatita na superfície do substrato (Larsen 1990; Fejerskov et al., 2015). Essa precipitação de minerais na superfície previamente desmineralizada forma cristais menos solúveis e torna o esmalte dental mais resistente à outros desafios cariogênicos (Nelson et al., 1983; Pearce, 1983; Arends; Christoffersen, 1986; Featherstone 1999). Assim como o flúor, a saliva atua no tamponamento do meio, fornecendo à estrutura dental os íons cálcio e fosfato que têm papel importante na remineralização da superfície (Buzalaf et al., 2011; Dawes, 2003).

No que diz respeito ao tempo, essas lesões tem um potencial de serem desenvolvidas em um curto período de até 4 semanas, porém são lesões visíveis clinicamente apenas após secagem da superfície (ICDAS 1) (Gorton & Featherstone, 2003; Fejerskov et al., 2015; Phiton et al., 2015). Após esse período, a lesão ativa no esmalte irá apresentar uma superfície esbranquiçada por conta do aumento da porosidade do esmalte, e a diminuição em sua translucidez. Essa perda de brilho superficial será causada pela irregularidade, agora presente na superfície, que tornará a reflexão da luz difusa (Fejerskov & Kidd, 2008; Tüfekçi et al., 2014; Paula et al., 2017).

Histologicamente as lesões de mancha branca apresentam 4 zonas, denominadas: camada superficial, corpo da lesão, zona escura e zona translúcida (Silverstone et al., 1981; Ingram; Silverstone, 1981; Robinson et al., 2000; Ando et al., 2018). A primeira camada, denominada camada superficial, mais mineralizada e constituída por 5% em volume de poros, é mais estruturada que o corpo da lesão (Holmen et al., 1985;

Silverstone, 1988) e comumente possui entre 20-30 μ m de espessura (Silverstone et al., 1981; Silverstone; Poole, 1968; Dawes, 2003; Worawongvasu, 2015). A camada seguinte é denominada corpo da lesão, situada entre a zona escura e a camada superficial. Nesta região foi onde ocorreu a maior descalcificação da estrutura dental, apresentando um volume de poros que varia entre 5% na periferia e 25% no corpo da lesão (Silverstone, 1973). A zona escura é a porção amarronzada ou mais escura da lesão quando observada em microscopia de luz transmitida. Essa região situa-se entre o corpo da lesão e a zona translúcida apresentando uma quantidade em volume dos poros variando entre 2-4% (Darling, 1985). A zona translúcida possui uma espessura que varia entre 5-100 μ m (Silverstone; Poole, 1968). Em estágios mais avançados da lesão, essa camada pode estar localizada mais abaixo, na parte interna da lesão, próxima à zona escura e a porção hígida do esmalte. A camada é constituída por poros de diferentes tamanhos que correspondem a 1% em volume desta camada (Silverstone, 1973; Darling, 1985), porém esta camada não pode ser vista a olho nu (Silverstone et al., 1988).

Dependendo da extensão da desmineralização no esmalte dental, as lesões incipientes de cárie poderão se estender a uma profundidade que varia entre 100-200 μ m, ou poderão acometer toda a região do esmalte, acometendo o primeiro terço da dentina, em lesões de até 1,5mm de profundidade, sem cavitação visível (White, 1995; Ko et al., 2005).

As lesões de mancha branca possuem diversas características e particularidades, logo, um correto diagnóstico é indispensável para o direcionamento correto do seu tratamento e/ou monitoramento. Este pode ser feito por meio de uma minuciosa inspeção visual, uso de aparatos como a quantificação da fluorescência induzida pela luz (QLF) e a transiluminação. Já o seu tratamento pode ser realizado com o uso de materiais que promovem a remineralização, pela atuação do flúor em procedimentos de consultório, bem como o flúor presente em dentifrícios ou enxaguatórios bucais, ou por uma outra intervenção terapêutica como o uso de vernizes fluoretados (Chang et al., 1997; Mattousch et al., 2007; Phiton et al., 2015; Godoi et al., 2019), caseína fosfato de cálcio amorfo, o CCP-ACP (Meyer-Lueckel et al., 2015) ou materiais resinosos como os infiltrantes resinosos - Icon[®] (DMG[®]) (Paris et al., 2020).

A paralisação da progressão da lesão incipiente de cárie é de suma importância para preservação do elemento dental. Se ocorrer uma cavitação, uma intervenção terapêutica mais invasiva será necessária, o que criará um ciclo restaurador que futuramente pode vir a desencadear a perda do elemento dental. A Odontologia minimamente invasiva vem sendo grandemente difundida nos últimos anos por buscar prevenir e tratar principalmente estas lesões em seu estado inicial. Para tanto, as estratégias de tratamento já existentes precisam ser testadas em sua durabilidade além de que, novas estratégias devem ser avaliadas em laboratório antes da sua aplicação em âmbito clínico. Dessa forma, o conhecimento das particularidades e características do tecido hígido e do tecido desmineralizado é fundamental para obtenção de dados robustos, prévios à realização de estudos *in situ* e/ou clínicos posteriores.

2.2 Métodos de análise da lesão de mancha branca

Diversas são as metodologias utilizadas para analisarem as diferentes características de particularidades dos substratos dentais. Neste estudo, decidimos lançar mão de metodologias de análise que pudessem comparar características como a fluorescência, a profundidade das lesões, a dureza, bem como a composição química das amostras, e sempre que possível comparar o esmalte hígido com a lesão de mancha branca. As propriedades ópticas do esmalte são alteradas quando essa estrutura é acometida por um processo de desmineralização, logo, com a necessidade do diagnóstico em estágios iniciais da desmineralização do esmalte dental algumas metodologias foram criadas.

Neste interim, o DIAGNOdent surgiu como uma ferramenta que complementava o diagnóstico visual e radiográfico de lesões, por meio da emissão de uma fluorescência do tecido dental (Shi et al., 2000a; Shi et al., 2000b; Mendes; Nicolau, 2004; Pretty, 2006; Braga et al., 2010; Pontes et al., 2017). Este aparelho utiliza um laser de diodo com comprimento de onda de 655 nm, que quando em contato com a superfície do dente, irá emitir uma luz vermelha. Essa luz laser irá interagir com as porfirinas bacterianas

presentes no interior do substrato dental, será refletida e captada pelo aparelho (Shi et al., 2000a; Shi et al., 2000b; Pretty, 2006; Braga et al., 2010). E, cada leitura irá gerar um número de pico, que em conjunto com uma tabela de análise numérica nos dará uma informação a respeito da condição do substrato dental: hígido, lesão em esmalte, lesão em junção esmalte-dentina, lesão em dentina (Carvalho et al., 2013).

Após alguns estudos, pode-se observar que a presença de alterações na superfície ou ainda de cálculo, saliva e biofilme dental, poderiam acarretar em erro de leitura do aparelho (Shi et al., 2000a). Os mesmos autores Shi et al. (2001b), também verificaram ao analisar lesões de manchas brancas na superfície dental, que este aparelho apresentava uma moderada sensibilidade e especificidade.

A Fluorescência quantitativa induzida pela luz (QLF) é uma metodologia que detecta lesões de cáries incipientes, bem como serve como ferramenta de monitoramento de progressão e regressão da lesão de cárie (Stookey, 2005; Pretty, 2006). Essa metodologia funciona por meio de um fenômeno de fluorescência. A estrutura dental possui a sua autofluorescência representada pela presença de fluoróforos localizados na região de junção entre o esmalte e a dentina (Ko et al., 2015), e esse esmalte, quando é irradiado por uma luz no comprimento visível, a luz azul, irá fazer com que a autofluorescência dental seja detectada pelo aparelho. Esta fluorescência é filtrada por meio de um filtro (540 nm) que está acoplado a uma câmera intraoral e como resultado poderemos observar no software do aparelho, a estrutura dental na cor verde (Stookey, 2005; Pretty, 2006).

As regiões desmineralizadas do tecido, estarão presentes como áreas mais escuras, onde ocorreu a perda de mineral, e consequentemente a perda de fluorescência da estrutura. Como parâmetros de resultado o aparelho gera um valor de perda de fluorescência ($\Delta F\%$), um valor de área (mm^2) e um valor de perda de fluorescência integrada sobre o tamanho da lesão ($\Delta Q = \Delta F \times \text{mm}^2$) (Stookey, 2005; Pretty, 2006). Essa metodologia é muito utilizada para o monitoramento de tratamentos remineralizantes em lesões incipientes de cáries, e foi observada que ela tem alta sensibilidade, com capacidade de captar áreas de desmineralização que não são visíveis a olho nu. Além disso, foi observado uma correlação de resultados de perda de fluorescência, perda de mineral quando comparada a outras metodologias como a de

obtenção de perda mineral e profundidade das lesões (Al-Khateeb et al., 1998; Ando et al., 1997; Hall et al., 1997; Ando et al., 2003).

A tomografia de coerência óptica (OCT) é uma técnica não destrutiva, não ionizante que fornece imagens seccionais de alta resolução em tempo real de estruturas que são espalhadoras de luz (Huang et al., 1991; Cara et al., 2012; Cara et al., 2014). Essa metodologia vem sendo utilizada para detecção de lesões iniciais de cárie (Mujat et al., 2003; Popescu et al., 2008; Sowa et al., 2011; Shimada et al., 2015).

Durante esse processo de obtenção das imagens, cada sinal de OCT irá corresponder a uma varredura axial da amostra, que é denominada A-scan, e sua amplitude é proporcional a intensidade da luz que foi retroespalhada em função da profundidade (Popescu et al., 2008). Diversos estudos vêm sendo desenvolvidos com esta tecnologia para avaliação de lesões de manchas brancas naturais e artificiais, (Wang et al., 1999; Popescu et al., 2008; Sowa et al., 2011; Mandurah et al., 2013; Espigares et al., 2015) pela sua capacidade de avaliação da severidade, profundidade (Manesh et al., 2009; Azevedo et al., 2011; Quitero et al., 2019), e evolução das lesões acometendo o elemento dental. Amaechi et al. (2003), analisou a perda mineral do esmalte dental e correlacionou com outro método também utilizado em nosso estudo, o QLF®, encontrando uma correlação entre estes. Cara et al. (2014) analisou o sinal de intensidade de luz retroespalhada OCT em lesões de mancha branca artificiais, e comparou estes dados com a microdureza do substrato, encontrando uma correlação entre as duas metodologias, demonstrando que a metodologia OCT possui o potencial de detectar desmineralização dos tecidos, e quantificar o espalhamento do tecido neste substrato. Desta forma, se torna um método indicado para a análise da profundidade das lesões de manchas brancas que compõe a nossa amostra, bem como relacionar o espalhamento desta intensidade de luz retroespalhada nos diferentes substratos.

Para a avaliação da propriedade mecânica dos substratos, foi escolhida uma metodologia que fornece informações sobre a dureza do esmalte dental. A microdureza Knoop é uma técnica que fornece uma análise quantitativa perda de mineral, quando utilizada para análise do substrato dental (Meredith et al., 1996). É uma técnica destrutiva, sem uso clínico, mas que demonstra ótimos resultados e correlações com outras metodologias em estudos que buscam avaliar os tecidos desmineralizada, lesões

naturais, lesões artificiais bem como a progressão e/ou regressão de lesões (Caldwell et al., 1957; Vieira et al., 2005; Lippert, Lynch, 2014; Alkattan et al., 2018; Zhang et al., 2019). Essa metodologia pode ser realizada na superfície do esmalte dental ou em um corte longitudinal, de acordo com o substrato a ser avaliado.

Craig e Peyton (1957) estabeleceram os valores médios de referência para a dureza do esmalte dental entre 272-440 KHN, e até hoje esses valores são utilizados como referência em estudos *in vitro* e *in situ*. Quando relacionada com metodologias que quantificam o conteúdo mineral como a Fluorescência quantitativa induzida pela luz (QLF) e a Microradiografia transversal, estas metodologias se correlacionam.

Gomez et al. (2014) avaliou a remineralização do esmalte dental de lesões naturais de cárie com o uso de dentifrícios, e pôde fazer a correlação entre os dados de perda de fluorescência e minerais obtidas com o QLF, bem como a dureza com a microdureza. Lippert (2014) realizou um estudo no qual avaliou a Microdureza (Knoop e Vickers) e correlacionou com dados obtidos pela microradiografia transversal de lesões artificiais de cárie.

Como método de avaliação do conteúdo mineral, a Espectroscopia Raman é um dos métodos que vem sendo largamente utilizado para o diagnóstico de cárie em estágio inicial. Esta metodologia tem como vantagens ser um método não invasivo, não destrutivo e que não requer o preparo do espécime. Nesta análise é possível visualizar a presença de alguns componentes orgânicos e inorgânicos no substrato dental, que serão determinados por seus respectivos picos (cm^{-1}) e intensidades (Mohanty et al., 2013; Timchenko et al., 2015; Sadyrin et al., 2020). Estudos como o de Kozloff et al. (2004) comparou características histológicas, com medidas de OCT, bem como a Espectroscopia Raman. Seus achados demonstraram que os picos observados pela metodologia Raman confirmam o diagnóstico de lesão de cárie e se correlacionam com os resultados obtidos pelas outras metodologias. Ko et al. (2006) analisou o esmalte dental por meio do Raman, e seus resultados mostraram que esta metodologia tem uma alta sensibilidade e especificidade ao avaliar lesões incipientes de cárie (Ramakrishnaiah et al., 2015).

Como é sabido, durante o processo de desmineralização o esmalte dental irá perder íons para o meio bucal, ou ainda poderão formar novos íons precipitados na superfície

do esmalte. Essa mudança será vista como uma alteração da morfologia dos cristalitos e/ou sua mudança de orientação, agora desorganizada (Buchwald; Buchwald, 2019). Desta forma, uma metodologia que possa observar e quantificar estas mudanças estruturais e químicas é de grande importância no estudo de lesões de cárie que acometem o esmalte dental.

Em síntese, diversos são os métodos utilizados para a caracterização dos substratos dentais. A utilização de métodos que avaliem, compare e se possível se correlacionem, serão de grande valia para o contínuo aprendizado no que diz respeito às características e particularidades do esmalte dental. Desta forma, se torna possível o desenvolvimento de métodos de diagnóstico e tratamentos para estas lesões, ainda em seu estado inicial.

3 PROPOSIÇÃO

Gerais

Caracterizar lesões de mancha branca em faces dentais lisas de dentes humanos nos seus aspectos físicos e químicos, bem como, compará-las com o esmalte sadio.

Específicas

- Comparar características físicas dos diferentes substratos dentais, esmalte hígido e lesões de mancha branca naturais, quanto a fluorescência, coeficiente de atenuação por meio da Tomografia por Coerência Óptica, profundidade das lesões e quanto às características mecânicas por meio da Microdureza longitudinal.
- Comparar características químicas dos diferentes substratos dentais, esmalte hígido e lesões de mancha branca naturais, por meio da Espectroscopia Raman.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Atendimento às normas de bioética

Este projeto foi submetido à aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo por envolver o uso de 29 dentes humanos (molares e pré-molares), que foram doados pelo Biobanco de dentes (Anexo A) da mesma instituição com número de parecer: 3.742.709, datado em: 03/12/2019 (Anexo B).

4.2 Delineamento experimental

Este estudo foi realizado utilizando dentes naturais usando como critério de inclusão a presença de uma lesão de mancha branca (ICDAS 2) e esmalte adjacente hígido.

Quadro 4.1 – Representação esquemática do delineamento experimental

Unidade experimental	29 dentes
Fatores de variação	Esmalte hígido
	Esmalte com lesão de mancha branca
Variáveis de resposta	<ul style="list-style-type: none"> • Fluorescência • Profundidade das lesões • Coeficiente de atenuação • Microdureza knoop • Composição química

Fonte: A autora.

4.3 Obtenção e seleção de amostra

Foram utilizados 29 elementos dentários (molares e pré-molares) humanos que apresentavam lesão de mancha branca em face lisa. Selecionados após criteriosa inspeção visual, levando em consideração lesões com ICDAS™ 2 (Pitts; Ekstrand, 2013) ou seja, lesões que acometem o esmalte que se caracterizam como visível opacidade, sem cavitação e/ou exposição visível da dentina. Estes dentes foram limpos com curetas periodontais e também foi realizada profilaxia com pedra pomes e água, e ao final, foram estocados em refrigerador a 4°C.

Como critério de inclusão, os dentes deveriam apresentar em uma face (livre ou proximal) uma lesão de mancha branca natural e na sua face homóloga uma estrutura de esmalte hígida.

As lesões de cárie foram avaliadas quanto ao seu tamanho, e após esta etapa, foi padronizada uma janela de leitura para todos os dentes, com uma área de leitura de 4mm² (Figura 4.1). Para padronização desta área, foi utilizada uma fita adesiva que individualizou a área de interesse que foi então avaliada utilizando todas as metodologias propostas.

Figura 4.1 – Fita em posição na área de leitura

Fonte: A autora.

4.4 Leitura inicial

4.4.1 *DIAGNOdent*®

Como metodologia de seleção da amostra as lesões foram analisadas com o dispositivo de caneta *DIAGNOdent* (Kavo, Biberach, Alemanha) acoplada em um dispositivo que permitia a posição perpendicular do aparelho no momento da leitura (Figura 4.2).

Figura 4.2 – *DIAGNOdent* posicionado para leituras

Fonte: A autora.

O aparelho foi calibrado na face hígida de cada dente, e 5 leituras foram realizadas no corpo da lesão (Figura 4.2). Foram obtidas médias dos valores de fluorescência e estes foram interpretados de acordo com a escala desenvolvida pelo fabricante (Alsabek et al., 2019; Luczaj-Cepowicz et al., 2019), onde:

- 0–13: Hígido
- 14–20: Cárie de esmalte

- 21–29: Cárie na junção dentina-esmalte
- $x > 29$: Cárie de dentina

4.4.2 Fluorescência quantitativa induzida pela luz- QLF[®]

Dezessete espécimes foram avaliados com relação ao conteúdo mineral do esmalte dental por meio do método de fluorescência do tecido dental com o auxílio do equipamento QLFTM System (Inspektor Reserch Systems BV, Amsterdam, NL). Para a obtenção das imagens, os dentes foram secos com auxílio da seringa tríplice com jato de ar aplicado na região da lesão por 10 segundos padronizado para todos os dentes. Após esse procedimento, os dentes foram posicionados perpendicularmente à ponta da peça de mão do aparelho com distância padronizada por meio do aparato que fazia o suporte da caneta (Figura 4.3), com a distância definida por meio da imagem obtida pela câmera. Foi levado em consideração o foco para a obtenção da melhor imagem possível a ser analisada pelo software posteriormente.

As imagens obtidas foram analisadas por meio do Software InspektorTMPRO (Inspektor Dental Care, Amsterdam, NL) quanto à área da lesão (mm^2); a profundidade da lesão, que foi expressa com relação ao percentual de perda de fluorescência do esmalte dental (ΔF em %); e o ΔQ (mm^2 %), que é o índice final relacionado ao valor de perda mineral do substrato analisado ($\Delta Q = \Delta F \times \text{área}$) (Pretty, 2006).

Figura 4.3 – Espécime posicionado para a leitura com o QLF®

Fonte: A autora.

Ao término de cada leitura, determinamos a área da lesão inserindo uma área de referência, esmalte hígido na proximidade, para a avaliação dos parâmetros citados acima por meio do software do aparelho. Como resultado qualitativo o aparelho apresenta uma imagem como abaixo (Figura 4.4):

Figura 4.4 – Imagem obtida após análise no software do aparelho

Fonte: A autora.

4.4.3 Tomografia por coerência óptica (OCT)

As dezessete amostras foram umedecidas com água destilada para evitar o ressecamento antes da análise da profundidade da lesão por meio da Tomografia de coerência óptica. Uma fonte luminosa do aparelho (OCP930RS Thorlabs Inc) com comprimento de onda de 930 nm e 2 mW de potência foi utilizado (Cara et al., 2014). Após a análise foram obtidas imagens de toda a extensão da área da lesão delimitada anteriormente com a fita em posição. A resolução axial foi de 4,0 μm e foi considerado um índice de refração de 1,6 referente ao esmalte dental, já que o equipamento apresenta uma resolução nominal de 6,0 μm no ar e resolução lateral de 6,0 μm .

E, para a avaliação da profundidade da lesão, a área pré-determinada (4 mm²) foi dividida em 5 linhas, determinadas com a distância de 300 μm entre elas antes das leituras (Figura 4.5). Após as leituras, todas imagens foram avaliadas por meio do Software Image J (NIH). Neste software, 5 linhas perpendiculares foram utilizadas para mensurar a profundidade das lesões, obtendo ao final uma média de valores para cada imagem.

Figura 4.5 – Aparelho OCT e imagem obtida e analisada pelo Software Image J

Fonte: A autora.

4.4.3.1 Tomografia de coerência óptica (OCT) - Análise do coeficiente de atenuação do esmalte hígido e a lesão de mancha branca

Para o cálculo do coeficiente de atenuação óptica dos dezessete espécimes foram utilizados os arquivos obtidos por meio da leitura feita anteriormente para avaliação da profundidade. Para tanto, as mesmas 5 linhas pré-determinadas dentro da janela de avaliação (4 mm²) foram novamente analisadas. Para obtenção do valor quantitativo do coeficiente de atenuação, foi utilizado um modelo de decaimento exponencial da intensidade da luz detectada (retroespalhada), de acordo com a equação (Figura 4.6):

Figura 4.6– Equação de modelo de decaimento exponencial

$$I(z) = I_0 \cdot e^{-2\alpha \cdot z} + C$$

Fonte: Cara et al. (2014)

Onde o I é o valor da intensidade detectada, o I_0 é o valor da intensidade da fonte luminosa, α é o coeficiente de atenuação óptica total, z é a profundidade analisada e C é uma constante utilizada em decorrência do ruído de fundo do sinal.

O coeficiente de atenuação final de cada amostra foi obtido através da média aritmética dos valores de coeficiente de atenuação provenientes das 5 imagens analisadas, após avaliação por meio de um software desenvolvido no IPEN (Figura 4.7).

Figura 4.7 – Software utilizado para a avaliação do coeficiente de atenuação óptica

Fonte: Cara, 2012

4.5 Preparo dos espécimes

Este estudo realizou metodologias destrutivas e não destrutivas dos substratos avaliados, logo, após as avaliações iniciais de fluorescência e OCT as raízes foram removidas com corte horizontal 2 mm abaixo da junção coroa raiz. Em seguida, as coroas dentais foram fixadas com auxílio de cera pegajosa em um bloco confeccionado com resina acrílica e seccionadas no sentido vestibulo lingual com auxílio de um disco diamantado acoplado à peça de mão (Figura 4.8).

Figura 4.8 – Corte dos espécimes - Remoção da porção radicular e separação da coroa

Fonte: A autora.

4.6 Secção das lesões artificiais e polimento dos espécimes

Para avaliação da microdureza, os fragmentos foram então seccionados longitudinalmente próximo à área da lesão, e então foram polidos até que a região da lesão estivesse visível a olho nu. Os espécimes seccionados foram polidos com uso de discos de lixa com granulação de #1200-4000. No intervalo das trocas entre cada lixa, os espécimes foram limpos por meio de banhos em cuba ultrassônica contendo água deionizada, por 5 minutos (Toledano et al., 2014). Para a avaliação da microdureza, a face oposta dos fragmentos referentes a cada grupo (esmalte hígido e lesão de mancha branca) foram polidos para a obtenção de amostras planas, requisito indispensável para o uso do aparelho.

4.7 Microdureza longitudinal/seccional

A microdureza foi avaliada por meio do Microdurômetro (HMV-G21DT, Shimadzu Co., Tokyo, Japan), com carga estática de 25KgF, durante 10 segundos utilizando o edentador piramidal Knoop. Na porção central da área desmineralizada foram realizadas entre 3-5 edentações, com distância de 100µm entre elas. Esse mapeamento foi

o comprimento de onda de 633 nm, potência de 100 mW, 90 aquisições de 1 segundo cada, resolução espectral de $0,7\text{ cm}^{-1}$ e *pinhole* 200 μm utilizando uma grade de leitura de 600 linhas/mm e objetiva de 10x. Para análise dos picos referentes ao conteúdo inorgânico do esmalte dental foi determinado um *range* de análise de 400 a 1500 cm^{-1} , no intuito de avaliar a presença dos minerais característicos da estrutura como o fosfato (PO_4^{3-}) e o carbonato (CO_3^{2-}). Antes do início de todas as leituras, a face foi submetida a um *photobleaching* utilizando a potência máxima do aparelho por 5 minutos. Esse procedimento foi necessário no intuito de diminuir a fluorescência emitida pelo substrato, que poderia influenciar diretamente os dados obtidos durante a leitura. Foram realizados 3 pontos de leitura na lesão de mancha branca, e outros 3 pontos de leitura para o esmalte hígido.

Após obtenção do gráfico foi feita a correção da linha de base, a normalização pela média e o Alisamento- polinômio grau 3 – 8 pontos utilizando o software LabSpec 6 (HORIBA, Scientific France SAS, France).

Outros parâmetros foram analisados após a avaliação das intensidades de pico, como a Largura a meia altura (FWHM) do pico em 960cm^{-1} e o *ratio* referente à composição orgânica e inorgânica do substrato ($960\text{cm}^{-1}/1450\text{cm}^{-1}$)

Figura 4.10 – Espetroscopia Raman – Avaliação da composição química (inorgânica e orgânica) dos substratos estudados

Fonte: A autora.

4.9 Análise dos dados

Para a análise dos dados obtidos foi utilizado o software Minitab 19 (Minitab Inc Pensilvânia, EUA). Os experimentos produziram resultados qualitativos e quantitativos. Os dados quantitativos foram analisados estatisticamente iniciando-se com a análise da distribuição do resíduo para aferição de normalidade e homogeneidade dos dados, utilizando o teste de Shapiro-Wilks. Nos casos de distribuição normal, foram utilizados testes estatísticos paramétricos.

O teste paramétrico de escolha foi a Análise de Variância, e teste auxiliar de comparação por Tukey entre as médias, adotando-se 5% como nível de significância. Os dados qualitativos foram descritos detalhadamente.

5 RESULTADOS

Os dados obtidos foram analisados em duas partes: a análise qualitativa (diagnóstico por meio da avaliação da fluorescência com o aparelho Diagnodent®) e análise quantitativa (Fluorescência quantitativa induzida pela luz, profundidade da lesão em µm, coeficiente de atenuação óptica, microdureza longitudinal e análise de conteúdo mineral).

5.1 Diagnodent

Todas as amostras foram analisadas quanto a sua fluorescência por meio do aparelho Diagnodent®, com a média resultante de 5 pontos de leituras por lesão. Os dados qualitativos estão descritos na tabela 5.1.

Tabela 5.1 – Resumo dos resultados da leitura da fluorescência com o uso do Diagnodent® - Dados brutos

Dente/amostra	Leituras (Valor numérico)	Diagnóstico
1	10/ 4/ 10/ 11/ 11	Hígido
2	3/ 4/ 4/ 4/ 6/ 4	Hígido
3	3/ 3/ 4/ 4/ 4	Hígido
4	13/ 10/ 9/ 10	Hígido
5	34/ 35/ 39/ 10/ 11	Junção dentina- esmalte
6	6/ 6/ 6/ 2/ 5	Hígido
7	12/ 11/ 6/ 11/ 10	Hígido
8	10/ 11/ 13/ 9/ 13	Hígido
9	12/ 10/ 9/ 12/ 6	Hígido
10	6/ 2/ 2/ 12/ 2	Hígido
11	14/ 13/ 17/ 11/ 10	Hígido
12	2/ 2/ 1/ 5/ 1	Hígido
13	12/ 14/ 22/ 11/ 10	Cárie de esmalte
14	5/ 11/ 6/ 7/ 5	Hígido
15	1/ 2/ 2/ 6/ 5	Hígido
16	10/ 11/ 6/ 5/ 12	Hígido
17	41/ 32/ 9/ 48/ 50	Cárie de dentina

18	8/ 9/ 12/ 8/ 9	Hígido
19	15/ 18/ 16/ 20/ 23	Cárie de esmalte
20	26/ 16/ 27/ 33/ 36	Junção dentina- esmalte
21	8/ 9/ 10/ 5/ 11	Hígido
22	11/ 8/ 3/ 2/ 8	Hígido
23	3/ 2/ 0/ 4/ 3	Hígido
24	8/ 2/ 2/ 3/ 10	Hígido
25	3/ 4/ 4/ 5/ 5	Hígido
26	43/ 37/ 37/ 20/ 34	Cárie de dentina
27	2/ 2/ 2/ 2/ 2	Hígido
28	22/ 23/ 24/ 19/ 24	Junção dentina- esmalte
29	5/ 5/ 4/ 3/ 3	Hígido

Fonte: A autora.

5.2 QLF®

Os dados obtidos por meio da quantificação de conteúdo mineral por método de fluorescência expressos em ΔQ $-\%mm^2$, área (mm^2), e ΔF $(-\%)$ estão descritos na tabela abaixo (Tabela 5.2).

Tabela 5.2 – Estatística descritiva dos valores obtidos pelo QLF®

Parâmetros	Média $\pm$ Desvio padrão	Coefficiente de variação (%)
ΔQ $(-\%mm^2)$	$-15,37 \pm 14,78$	96,14
Área (mm^2)	$1,041 \pm 0,739$	70,97
ΔF $(-\%)$	$-11,68 \pm 6,33$	54,20

Fonte: A autora.

O ΔQ indica a perda de fluorescência integrada sobre o tamanho da lesão, em média, 15%mm² do total da área analisada. Os valores de ΔQ descritos acima apresentam um coeficiente de variação elevado. Esses valores foram calculados multiplicando o valor da perda de fluorescência (ΔF) pela área desmineralizada (mm²). Como esta área desmineralizada não é padronizada (CF = 71%) dentro da área delimitada de 4mm² pois as lesões possuem dimensões diferentes, esses dados apresentam esta variabilidade acentuada.

Os valores de ΔQ (%mm²), em média, da perda de conteúdo mineral pelos tecidos foi de 15,37%mm² quando comparado ao esmalte hígido e a diferença de fluorescência entre o tecido hígido e o tecido desmineralizado foi de 11,68%.

As medidas de fluorescência indicam que ocorre uma perda de fluorescência no tecido quando ele passa por um processo de desmineralização.

5.3 Tomografia de Coerência Óptica (OCT)

5.3.1 Profundidade das lesões

Após a leitura de 5 linhas no espécime, 5 imagens foram avaliadas por meio do Software Image J. Nesta imagem foram determinadas 5 linhas verticais que foram demarcadas a partir da camada superficial do esmalte, até o fundo da lesão. Como resultado, obtivemos uma média de profundidade em μm de $174,43 \pm 7,52$. Onde a maior profundidade média da lesão foi de 240,70 μm e a menor média foi de 115,74 μm com um coeficiente de variação de 17,25%.

5.3.2 Coeficiente de atenuação óptica

Quanto ao coeficiente de atenuação óptica, não existe diferença entre os valores de coeficiente de atenuação óptica quando comparada a região hígida e região de mancha branca do esmalte ($p=0,711$) (Tabela 5.3).

Tabela 5.3 – Média $\pm$ desvio padrão do coeficiente de atenuação óptica (μm^{-1}) do esmalte hígido e da lesão de mancha)

Coeficiente de atenuação	Média $\pm$ Desvio padrão	Coeficiente de variação (%)
Esmalte hígido	$-1,500 \pm 0,849^a$	56,61
Lesão de mancha branca	$-1,411 \pm 0,495^a$	35,08

*médias que não compartilham uma letra são significativamente diferentes

Fonte: A autora.

5.4 Microdureza longitudinal

Para a análise dos dados obtidos após a leitura da microdureza Knoop foram determinadas duas avaliações principais: a análise da dureza longitudinal da camada superficial do esmalte (região hígida e lesão de mancha branca) em uma distância de até $50\mu\text{m}$ da superfície externa do dente, além da análise da dureza do esmalte hígido e do corpo da lesão de mancha branca. Primeiramente, o teste ANOVA um fator foi realizado para comparar as duas camadas superficiais, esmalte hígido e lesão de mancha branca. O teste Anova demonstrou que existe diferença ($p=0,000$) entre os valores de dureza sendo a camada superficial do esmalte hígido mais dura do que a camada superficial da lesão de mancha branca (Tabela 5.4).

Tabela 5. 4– Média $\pm$ desvio padrão da dureza das diferentes camadas superficiais

Microdureza (Knoop)	Média $\pm$ Desvio padrão	Coeficiente de variação (%)
Camada superficial-Hígido	316,4 $\pm$ 73,9 ^a	23,35
Camada superficial-Lesão de mancha branca	166,7 $\pm$ 94,5 ^b	56,67

*médias que não compartilham uma letra são significativamente diferentes

Fonte: A autora.

O mesmo teste foi realizado para comparar o corpo do esmalte hígido com o da lesão de mancha branca, e demonstrou que existe maior dureza ($p=0,000$) do esmalte hígido do que da lesão de mancha branca (Tabela 5.5).

Tabela 5.5 – Média $\pm$ desvio padrão das amostras analisadas (esmalte hígido e lesão de mancha).

Microdureza (Knoop)	Média $\pm$ Desvio padrão	Coeficiente de variação (%)
Hígido	328,54 $\pm$ 37,72 ^a	11,48
Lesão de mancha branca	131,8 $\pm$ 56,6 ^b	42,95

*médias que não compartilham uma letra são significativamente diferentes

Fonte: A autora.

Quando o teste foi realizado para comparar a diferença de média entre os valores de dureza da camada superficial e do esmalte sadio, bem como comparar a camada superficial ($p=0,564$) e o corpo da lesão ($p=0,215$), não existiu diferença entre os valores da dureza quando comparado os diferentes sítios do mesmo substrato.

Adicionalmente, foram feitas comparações entre a camada superficial (até 50 μ m) e outras profundidades avaliadas, tanto para o esmalte hígido, quanto para a lesão de mancha branca. Para o esmalte hígido, a comparação da camada superficial (50 μ m) e 100 μ m não mostrou diferença significativa ($p=0,369$), seguida da comparação com 200 μ m (0,983), 300 μ m ($p=0,423$), 400 μ m ($p=0,665$) e 500 μ m ($p=0,739$),

respectivamente. Quando a lesão de mancha branca foi avaliada, seguindo os mesmos parâmetros citados acima, não houve diferença significativa entre o valor de dureza da camada superficial (50µm) quando comparada a profundidade de 100µm ($p=0,411$), 200µm ($p=0,130$), 300µm ($p=0,110$), 400µm (0,463) e 500µm (0,622) respectivamente.

5.5 Espectroscopia Raman

A análise da composição química foi realizada na superfície dos substratos e os dados obtidos foram processados e normalizados. A normalização dos dados foi feita utilizando o valor de média final de todo o espectro obtido para cada dente, e ao final elaborou-se um gráfico do valor médio de todos os dentes - representado abaixo (figura 5.1).

Figura 5.1 – Gráfico referente a média de valores de intensidade do substrato hígido e cariado - Bandas vibracionais referentes ao conteúdo inorgânico, fosfato ($v1$, $v2$, $v3$, $v4$), e bandas vibracionais relacionadas ao conteúdo orgânico, amida III e grupamento CH_2 .

Fonte: A autora.

O gráfico representa todas as bandas do intervalo de leitura que compreende de 400 a 1500 cm^{-1} . Dentro deste intervalo de leitura foram observados o íon fosfato (PO_4^{-3}) em 4 diferentes modos vibracionais, representados por ν_1 , ν_2 , ν_3 e ν_4 , e os picos referente a todos estes modos foram observados no espectro.

O maior pico observado no gráfico está localizado em 960,3 cm^{-1} , tanto para o substrato hígido quanto para o substrato cariado. Essa banda se refere ao modo de estiramento simétrico do fosfato (ν_1) e como ilustrado no gráfico, a intensidade do pico para o esmalte cariado foi 40% menor que o esmalte hígido. As bandas relacionadas a outros modos vibracionais também foram observadas como: a banda em 1071 cm^{-1} relacionada ao estiramento assimétrico do fosfato (ν_3), a banda 579 cm^{-1} relacionada ao modo de estiramento do fosfato (ν_4) e as bandas 431 cm^{-1} e 446 cm^{-1} referentes ao modo de vibração de flexão simétrica do fosfato (ν_2). A intensidade destas bandas referentes ao íon fosfato, apresenta maior valor para o substrato hígido quando comparado ao substrato cariado. Ademais, foram verificados outros 2 picos referentes ao conteúdo orgânico dos substratos, um pico em 1295 cm^{-1} referente a amida III e outro pico em 1450 cm^{-1} referente ao conteúdo lipídico, sendo estes dois últimos com maior intensidade na superfície do esmalte cariado.

Além da análise dos picos citados acima, alguns outros parâmetros foram avaliados para os dados obtidos, que podem ser observados na Tabela 5.6.

Tabela 5.6 – Parâmetros avaliados para o substrato hígido e cariado, utilizando os valores de intensidade (u.a) dos picos (cm^{-1})

Parâmetro	Hígido	Cariado
Cristalinidade ($1/960\text{cm}^{-1}$)	0,07	0,08
Proporção conteúdo inorgânico e orgânico ($960\text{cm}^{-1}/1450\text{cm}^{-1}$)	16,65	19,16

Fonte: A autora.

6 DISCUSSÃO

Este estudo foi desenvolvido no intuito de caracterizar o esmalte dental hígido e o esmalte dental com lesão de mancha branca em diversos aspectos. O esmalte dental apresenta características que o tornam um substrato complexo e dinâmico com grande variabilidade de características. Quando desmineralizado, seu conteúdo mineral, sua organização prismática bem como suas propriedades ópticas são alteradas. O conhecimento dessas características, além das formas de tratamento disponíveis para evitar a progressão destas lesões, faz com que a caracterização destes tecidos ainda seja importante. Como resultado, o conteúdo mineral do esmalte desmineralizado, a organização prismática e as propriedades ópticas dos tecidos foram alteradas.

Nesse estudo, o aparelho DIAGNOdent (Kavo, Biberach, Alemanha) foi utilizado como avaliação inicial das amostras. A luz laser (655nm) foi absorvida por metabólitos, como as porfirinas bacterianas presentes no substrato, e ocorreu a emissão e a captação da fluorescência vermelha pelo aparelho (Shi et al., 2000; Mendes; Nicolau, 2004; Pretty, 2006; Braga et al., 2010; Pontes et al., 2017; Luczaj-Cepowicz et al., 2019). Os resultados obtidos por esta metodologia apontaram que 75% das superfícies analisadas eram hígidas, 10% eram lesões que acometiam até junção esmalte-dentina, 7% eram cárie em esmalte e outros 7% eram cárie em primeiro terço de dentina.

Ao compararmos com as características clínicas apresentadas pelos substratos analisados, no nosso estudo, o método não se mostrou eficiente ao analisar lesões incipientes de cárie. Esta metodologia identificou que a maior parte destas superfícies eram hígidas, porém, clinicamente eram superfícies com algum grau de desmineralização. Estudos (Shi et al., 2001a; Shi et al., 2001b; Lussi, Francescut, 2003; Tranaeus et al., 2004; Reis et al., 2004) demonstraram que esta metodologia era eficiente para diagnosticar lesões incipientes em faces livres, porém têm demonstrado que este aparelho tem uma baixa sensibilidade quando comparado com as lesões que estão acometendo a junção esmalte dentina ou até a dentina. Além disso, a metodologia não elucida informações sobre a severidade e profundidade das lesões, bem como os resultados não apresentam uma correlação com a perda mineral dos tecidos quando comparados a outros métodos de diagnóstico (Fried et al., 2002; Mendes et al., 2005).

Outros autores demonstraram que o aparelho tem uma boa performance quando utilizado para diagnóstico de lesões que já acometem a dentina (Pretty, 2006; Braga et al., 2010). Assim, para este estudo, a ferramenta não se mostrou eficiente para caracterização dos substratos estudados.

Como um segundo método de análise da fluorescência do tecido dental, a Quantificação da fluorescência induzida pela luz (QLF®) fez a análise das variações do conteúdo mineral do tecido desmineralizado. Esta é uma ferramenta utilizada para diagnóstico de lesões de cárie ainda em estágio inicial, para monitoramento do seu comportamento, além de fazer uma correlação entre a perda mineral do tecido e a sua perda de fluorescência (Fried et al., 2002; Stookey 2005; Pretty, 2006; Maia et al., 2016). Este método analisa o tecido hígido e o tecido desmineralizado comparando suas diferenças ópticas (Lippert et al., 2011; Gomez, 2015; Gokce et al., 2017).

Quando desmineralização acontece, ocorre a diminuição da autofluorescência do substrato dental, levando em consideração 2 razões principais: a primeira é que a presença da lesão de cárie irá acarretar um efeito de espalhamento, fazendo com que ocorra uma menor excitação do substrato pela luz irradiada. A segunda razão é quando ocorre a excitação pela luz na região desmineralizada, qualquer fluorescência emitida pelos fluoróforos será espalhada de volta assim que tenta passar pela estrutura da lesão, logo, a imagem observada apresentará uma cor escura, delimitando a área desmineralizada (Van der veen, Josselin de Jong, 2000; Mujat et al., 2003; Pretty, 2006). Estudos como o de Shi et al. (2001a) indicam que a metodologia QLF apresenta boa correlação dos seus resultados com as mudanças de conteúdo mineral quando comparada a metodologias como a microradiografia. Além disso, outros estudos (Gmür et al., 2006; Pretty, 2006) demonstram que a detecção clínica de uma lesão de mancha branca estaria relacionada a um valor de $\Delta Q = -100 \text{ \%mm}^2$, e o aparelho já consegue captar mudanças neste parâmetro a partir de $\Delta Q = -1 \text{ \%mm}^2$ o que demonstra a sua sensibilidade de análise.

No que diz respeito à sua utilização em estudos laboratoriais, o valor de ΔF , quando utilizada solução desmineralizante para o desenvolvimento de lesões de mancha branca artificiais, este valor estava em torno de $\Delta F = -20$ a 25% , acima do valor apresentado por pelas lesões naturais neste estudo. Porém, por estas lesões artificiais

precisarem ser obtidas em um período mais curto, 7 dias, o processo de desmineralização precisa ser mais agressivo (Gokce et al., 2017), o que acarreta uma perda de fluorescência maior que a encontrada em lesões naturais.

O valor de coeficiente de variação para o parâmetro ($\Delta Q\%mm^2$) observado neste estudo foi bem acentuado, por conta da variação de tamanho de área captado pelo aparelho. Desta forma, observamos que esta metodologia pode ser muito bem aplicada em regiões de faces livres dos dentes, avaliando a progressão ou regressão da desmineralização em âmbito clínico e, é eficiente para a distinção da fluorescência emitida pelo esmalte sadio e a lesão de mancha branca.

Após a avaliação da perda de minerais, os espécimes foram avaliados quanto a profundidade das lesões, com o uso da Tomografia de coerência óptica (OCT). Diversos trabalhos têm sido realizados com aparelho OCT para diagnóstico de lesões iniciais de cárie devido às propriedades ópticas que são alteradas após o processo de desmineralização (Otis et al., 2000; Azevedo et al., 2011; Manesh et al., 2009; Espigares et al., 2015; Macey et al., 2021; Fried et al., 2021). O OCT realizou a análise, e o valor médio encontrado ao final das leituras de todas as lesões, foi de 174,42 μm , valor este, dentro do estimado para lesões de mancha branca sem aparência visível clinicamente. Stookey (2005) e Min et al. (2015) afirmam que estas lesões são visíveis a olho nu quando atingem uma profundidade entre 300-500 μm . Ao realizarmos o corte transversal das lesões, e após as leituras de dureza, pudemos verificar que a profundidade média da área desmineralizada era em torno de 500 μm .

O aparelho possui um alcance em profundidade de até 1 mm quando novo, porém este valor pode diminuir ao longo dos anos em que se encontra em uso (Sowa et al., 2011). Desta forma, é possível que a quantidade de luz tenha sido insuficiente para penetrar em profundidade as lesões avaliadas, já que pode ocorrer um espalhamento de luz na superfície. Além disso, fatores como o coeficiente de absorção e a interação entre o tecido e o comprimento de onda podem ter influenciado na diminuição do alcance em profundidade (Popescu et al., 2008; Sowa et al., 2011).

Outra metodologia utilizada para caracterizar comparativamente o esmalte dental foi analisar o coeficiente de atenuação óptica medido a partir de imagens obtidas com o OCT. Este coeficiente de atenuação é um parâmetro que quantifica a interação entre a

luz e os componentes presentes no interior dos substratos analisados (A-scan). Para tanto, foi utilizado como parâmetros de medição o primeiro pico referente à mudança da refletividade da luz quando em contato com a superfície do esmalte dental e a posterior extinção deste sinal (Mujat et al., 2003; Popescu et al., 2008; Sowa et al., 2011; Cara et al., 2012; Cara et al., 2014).

Os valores médios de coeficiente de atenuação óptica dos tecidos avaliados não apresentaram diferença estatisticamente significativa. A metodologia de avaliação de coeficiente de atenuação ainda não apresenta um consenso no que diz respeito ao aumento ou diminuição deste coeficiente em esmalte desmineralizado. Alguns estudos como o de Cara et al. (2012) (que utilizou lesões artificiais de cárie) e Mujat (2003), encontraram um valor maior de coeficiente de atenuação para o esmalte desmineralizado quando comparado ao tecido hígido. O maior valor apresentado pelo tecido desmineralizado, se deve à desorganização dos prismas, à criação e ao alargamento de poros no esmalte dental. A presença da desorganização e destes espaços vazios no interior do tecido, aumenta o número de interfaces com que a luz incidida irá interagir, aumentando assim o espalhamento da luz e consequentemente o valor do coeficiente.

Já outros autores, como Popescu et al. (2008) e Sowa et al. (2011) ao analisarem a lesão de mancha branca natural e o esmalte hígido, encontraram um menor valor de coeficiente de atenuação óptica. Eles afirmam que a maior desmineralização apresentada pelas lesões naturais faz com que ocorra uma maior perda de minerais e o aparecimento de porosidades maiores. Essas duas características irão aumentar a probabilidade de que a luz incidida no tecido e não interaja com nenhuma estrutura (centros de dispersão de luz) no interior da lesão, logo o espalhamento da luz no tecido será menor.

No entanto, no nosso estudo, observamos um efeito distinto. Acreditamos que a variabilidade da amostra analisada possa ter influenciado este resultado. Os dentes escolhidos para este estudo apresentavam as características necessárias para as análises, porém a sua origem e seu tempo de armazenamento (por terem sido advindos de um banco de dentes), prévio ao estudo, são desconhecidos. Esta amostra pode ter sido submetida à algum processo de desmineralização, sem alterações visíveis na superfície, porém, foram captadas por esta metodologia, tornando os valores de

coeficiente de atenuação próximos aos valores de coeficiente das lesões de mancha branca.

Cara et al. (2014), ao analisar lesões artificiais de cárie por meio do coeficiente de atenuação óptica, observou que este método possui elevado grau de sensibilidade e especificidade, porém não foi possível obter esse resultado ao avaliarmos a nossa amostra. Acreditamos que uma amostra maior, bem como o conhecimento a fundo da origem e características das amostras analisadas poderão trazer resultados mais consistentes.

Todas as metodologias discutidas acima tinham como vantagem para o nosso estudo a não destruição dos espécimes. Para a análise da microdureza, escolhemos a metodologia na qual a dureza é analisada na face seccional/longitudinal, logo, sem nenhum preparo da superfície do esmalte. Para esta avaliação foi necessária a realização de um corte transversal e polimento destas amostras, para obtenção de uma área de leitura adequada, além de um bom paralelismo da amostra, requisito obrigatório para o uso do aparelho.

A dureza do esmalte está relacionada à composição mineral do substrato, portanto, para a análise de um substrato desmineralizado o teste de microdureza é largamente utilizado (Rafiei et al., 2020). No que diz respeito a esta metodologia, a dureza Knoop foi escolhida por se mostrar o método mais utilizado pelos estudos, onde a edentação obtida é mais longa e menos profunda, o que evita a quebra do substrato avaliado, bem como as suas arestas, mais definidas, tornam a determinação da área de avaliação no software do aparelho mais fáceis (Meredith et al., 1996)

Diversos autores (Caldwell et al., 1957; Vieira et al., 2005; Rehder Neto et al., 2009; Lippert, Lynch, 2014; Alkattan et al., 2018; Zhang et al., 2019; Sorkhdini et al., 2021) até hoje utilizam esta metodologia para a determinação da propriedade mecânica dos substratos analisados. Craig e Peyton (1958), avaliaram o esmalte dental sadio e realizaram o maior número de edentações no substrato para definirem um valor de referência de dureza Knoop para o esmalte e dentina. O valor de referência encontrado estava definido entre 272-404 KHN (Gutiérrez-Salazar; Reys-Gasga, 2003). O nosso estudo demonstrou que o valor de média da estrutura hígida estava dentro deste

intervalo, bem como o valor para o esmalte com a lesão de mancha branca apresentava um valor inferior a 272 KHN, determinando a desmineralização do substrato.

Ao compararmos as camadas superficiais dos dois substratos, pudemos observar que houve diferença quando comparada à camada hígida e à camada desmineralizada, com um valor para o hígido 52% maior que o valor da camada superficial do cariado. Porém, ao compararmos estas camadas superficiais ao substrato abaixo da distância máxima definida para a leitura (50µm), não foi observada uma diferença entre estes, tanto para o esmalte hígido, quanto para o esmalte cariado.

Diversos trabalhos (Hodge et al., 1933 apud Craig and Peyton, 1958; Cadwell et al., 1936; Craig and Peyton, 1958; Davison, 1974) relatam que a superfície mais externa do esmalte dental apresenta uma maior dureza do que o esmalte mais interno, porém não foi possível observar esta diferença ao realizarmos a leitura na face longitudinal do esmalte. Nosso estudo encontrou substratos (camada superficial e corpo do esmalte) com valores estatisticamente iguais de dureza como visto por Craig e Peyton (1958).

A discrepância entre os achados foi explicada primeiramente por Gustafson e Kling (1948) e Klinger (1940) que indicam que esta diferença pode estar relacionada a variação da direção das edentações dentro do mesmo dente. Contudo, Davidson et al. (1974), afirma que a orientação das edentações não tem influência direta sobre os valores de dureza. No nosso estudo, todas as edentações foram realizadas em uma mesma direção, paralela à camada superficial do esmalte. Outros estudos encontram uma mínima diferença na dureza quando comparada a região de cúspide, a camada superficial com outras regiões do esmalte dental, porém, estes valores de durezas são menores que o desvio-padrão, logo essa afirmação é questionável (Gutiérrez-Salazar, Reys-Gasga, 2003).

Meredith et al. (1996) afirmou que a dureza do esmalte pode variar a medida em que ele é avaliado em profundidade e que existe uma variação dos valores de dureza quando comparada a superfície do esmalte e a junção amelodentinária adjacente. Este fato se deve à variação do conteúdo orgânico e inorgânico no esmalte dental, pois a sua superfície no geral é constituída por maior conteúdo mineral, reflexo das suas dinâmicas trocas iônicas com a cavidade, enquanto a região mais profunda, é constituída por maior conteúdo orgânico, como as proteínas (Angmar et al., 1963; Robinson et al., 1971;

Kodaka et al., 1992) o que explicaria a taxa de diminuição da dureza entre as regiões, mesmo que este fato não tenha sido demonstrado em nosso estudo.

Alguns estudos como o de Feagin et al. (1969), Davidson et al. (1974) e Cuy et al. (2002) têm demonstrado a relação entre a microdureza e o conteúdo mineral do esmalte dental. Eles afirmam que a maior concentração de componentes como o cálcio e o fósforo irão contribuir para uma estrutura com maiores valores de dureza, e quando estes componentes se apresentam em menor concentração, o valor de dureza será menor.

Em análises microscópicas para avaliação histológica do substrato desmineralizado, bem como a análise do seu conteúdo mineral, é possível visualizar e avaliar a presença desta camada mais mineralizada, porém não intacta. Essa superfície apresenta como composição química, maior presença de cálcio, fosfato e flúor, o que a torna mais mineralizada e resistente à ação desmineralizante, ao passo que essa concentração diminui na camada subsuperficial, onde a concentração de carbonato, magnésio e cloreto é maior (Wheatherell et al., 1974; Robinson et al., 2000) - o que a torna menos mineralizada.

Outro aspecto importante a ressaltar, é que assim como o estudo de Craig e Peyton (1957), nosso estudo realizou as edentações na face longitudinal, o que variou de estudos como o de Caldwell et al. (1957) que encontrou maior dureza para a superfície do esmalte, utilizando a microdureza superficial como metodologia do estudo. A metodologia de análise superficial da dureza do esmalte é de grande valia quando avalia lesões de cáries artificiais, que comumente apresentam uma profundidade de desmineralização menor, porém quando se trata de lesões naturais com profundidade como as de 500µm, esta metodologia não é a mais adequada, o que torna necessário o uso da dureza longitudinal para complementar esta metodologia em alguns estudos (Lippert; Lynch 2014).

A espectroscopia Raman foi utilizada para avaliação do conteúdo inorgânico e orgânico do esmalte hígido e do esmalte cariado. As bandas obtidas neste estudo estão de acordo com as bandas apresentadas em estudos anteriores (Mohanty et al., 2013; Toledano et al., 2014; Sadyrin et al., 2020). O maior pico encontrado no espectro está relacionado ao modo de estiramento simétrico do fosfato (ν_1) em $960,3\text{cm}^{-1}$, sendo este o pico de maior intensidade em estudos que avaliam os tecidos mineralizados, como o

esmalte dental, dentina e tecido ósseo (Kinoshita et al., 2008; Almahdy et al., 2012; Mohanty et al., 2013; Timchenko et al., 2015; Akkus et al., 2016; Sadyrin et al., 2020). Para os substratos estudados, a intensidade do pico do fosfato (ν_1) mostrou ser 40% mais intensa para a superfície do esmalte hígido do que para o esmalte cariado, o que demonstra a maior presença do íon fosfato na superfície do esmalte hígido, caracterizando a sua maior mineralização. Na superfície do esmalte desmineralizado, este resultado demonstra a dissolução do íon fosfato, como observado pelo estudo de Mohanty et al. (2013), em que a intensidade do pico do fosfato ν_1 , diminuiu na região da lesão.

É sabido que o esmalte dental é composto por cristais de hidroxiapatita $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, e dentro da composição desta estrutura, ele pode ser constituído por outros íons, como o carbonato no processo de desmineralização. Neste estudo, podemos observar que os modos de vibração do íon fosfato, ν_1 , ν_2 , ν_3 e ν_4 , apresentaram maior intensidade para o substrato hígido, o que é explicado pela maior quantidade de fosfato nesta superfície (Kinoshita et al., 2008), quando comparado ao esmalte cariado.

O pico 1071 cm^{-1} se refere ao modo de vibração do fosfato (ν_3) e do carbonato tipo B (Salehi et al., 2013; Toledano et al., 2014; Timchenko et al., 2015). Para a determinação de qual modo de vibração estamos analisando, a análises de outras bandas vibracionais devem ser observadas. Se a maior intensidade é observada na região de outras bandas vibracionais do fosfato, podemos indicar que ele está sendo observado na região do pico de 1071 cm^{-1} . Por outro lado, se a intensidade é maior na região do carbonato tipo A (em 1104 cm^{-1}), podemos indicar que o modo vibracional se refere ao carbonato tipo B. Como o modo vibracional do fosfato foi observado neste estudo, consideramos que ele representa o modo vibracional do fosfato (ν_3), com maior intensidade de pico para o esmalte hígido, quando comparado a lesão de mancha branca.

Sugerimos que a análise da superfície da amostra, ainda que não intacta, ainda apresenta uma grande quantidade de fosfato por conta do processo de desmineralização inicial que da origem a lesão de mancha branca, e que não é homogêneo. Além disso, especulamos que em lesões mais profundas, a substituição do fosfato na malha prismática ocorre (Salehi et al., 2013; Toledano et al., 2014; Timchenko et al., 2015; Das Gupta et al., 2021) criando a hidroxiapatita carbonatada, que é mais suscetível à ataque

ácido e é responsável pelas mudanças cristalográficas da estrutura prismática (Mohanty et al., 2013). Em estudos anteriores que analisavam substratos mineralizados (Shah, 2020, Shah 2021) foi verificado que na região desmineralizada ocorre a sobreposição da banda do carbonato sob a banda do fosfato, o que não ocorreu em nosso estudo.

Assim como Sadyrin et al. (2020) observamos um pico na região de 1295 cm^{-1} - 1300 cm^{-1} , que coincide com a amida III ($=\text{CH}$) (Mohanty et al., 2013). A presença desta banda pode ter sido evidenciada por conta do processo de desmineralização do tecido dental. As proteínas, como a amelogenina, que contém um grupo amida III em sua composição, pode ser encontrada nos espaçamentos presentes entre os cristalitos do esmalte (Sadyrin et al., 2020). Logo, em uma superfície que se encontra desmineralizada e consequentemente com um maior número de poros, a presença deste material orgânico pode ter sido facilmente captada pela Espectroscopia Raman.

Além da intensidade das bandas e da posição da banda do fosfato (ν_1), outros parâmetros também foram avaliados: como a cristalinidade do tecido por meio da largura total a meia altura ou *full width at half maximum* (FWHM), a qualidade mineral avaliada pela razão entre os picos $960,3/1071\text{ cm}^{-1}$, e a proporção da fase orgânica pela fase inorgânica calculada pela razão do pico do $960,3\text{ cm}^{-1}$ pelo 1450 cm^{-1} (Das Gupta et al., 2021).

A largura total a meia altura (FWHM) da banda foi calculada pela razão: $1/960,3\text{ cm}^{-1}$, que demonstra o nível de cristalinidade e a quantidade de defeitos presentes nos cristais de hidroxiapatita (Toledano et al., 2014; Das Gupta et al., 2021; Marin et al., 2020). Para este estudo, o valor de FWHM foi maior para o tecido cariado, o que demonstra a maior desorganização dos cristais de hidroxiapatita e menor cristalinidade após o processo de desmineralização do tecido (Toledano et al., 2014).

Além destas análises minerais, foi feita uma avaliação da proporção das fases inorgânicas e orgânicas dos substratos ($960,3\text{ cm}^{-1}/1450\text{ cm}^{-1}$). Para esta avaliação o valor da razão foi maior para o tecido cariado pois este irá apresentar um maior conteúdo orgânico por conta da perda mineral do substrato no processo de desmineralização. Ainda que a quantidade de conteúdo orgânico do esmalte dental não seja comparável ao conteúdo inorgânico, após a desmineralização desta estrutura, ocorre uma substituição gradual destes dois componentes, por conta da criação e alargamentos dos poros o que

vai tornar mais fácil a exposição e consequentemente captação do conteúdo de proteínas e lipídios do esmalte dental (Ramakrishnaiah et al., 2015).

Uma das limitações do estudo está relacionada ao tamanho da amostra, bem como a sua origem. No entanto, os métodos não invasivos de avaliação ainda assim foram capazes de distinguir o esmalte sadio da lesão de mancha branca. A caracterização desses substratos é crucial para o desenvolvimento futuro de lesões de manchas brancas artificiais, no intuito da obtenção de um substrato que mimetize as lesões naturais, e assim contribua para o desenvolvimento de materiais e tratamentos restauradores inovadores.

7 CONCLUSÃO

O esmalte sadio e as lesões de mancha branca possuem diferentes características (ópticas, morfológicas, químicas e físicas) que foram caracterizadas utilizando a maioria das metodologias utilizadas neste estudo. No entanto, a variabilidade das características interferiu diretamente na caracterização dos substratos. O entendimento destas propriedades é essencial para melhor compreender a progressão das lesões iniciais de cárie em esmalte e assim propor terapias mais eficazes para o seu tratamento. Novos estudos devem ser desenvolvidos para explorar as propriedades dos substratos demonstrado neste estudo.

REFERÊNCIAS¹

- Akkus A, Akkus A, Roperto R, Akkus O, Porto T, Teich S, Lang L. Evaluation of mineral content in healthy permanent human enamel by Raman spectroscopy. *J Clin Exp Dent*. 2016; Dec 1;8(5):e546-e549. doi: 10.4317/jced.53057.
- Al-Khateeb S, Forsberg CM, de Josselin de Jong E, Angmar-Månsson B. A longitudinal laser fluorescence study of white spot lesions in orthodontic patients. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 1998 Jun;113(6):595-602. doi: 10.1016/s0889-5406(98)70218-5.
- Al-Obaidi R, Salehi H, Desoutter A, Bonnet L, Etienne E, Terrer E, et al. Chemical & Nano-mechanical Study of Artificial Human Enamel Subsurface Lesions. *Sci rep*. 2018 Mar; 8, 4047. doi:10.1038/s41598-018-22459-7.
- Alkattan R, Lippert F, Tang Q, Eckert GJ, Ando M. The influence of hardness and chemical composition on enamel demineralization and subsequent remineralization. *J Dent*. 2018 Aug;75:34-40. doi: 10.1016/j.jdent.2018.05.002.
- Almahdy A, Downey FC, Sauro S, Cook RJ, Sherriff M, Richards D, Watson TF, Banerjee A, Festy F. Microbiochemical analysis of carious dentine using Raman and fluorescence spectroscopy. *Caries Res*. 2012 Jun;46(5):432-40. doi: 10.1159/000339487.
- Alsabek L, Al-Nerabieah Z, Bshara N, Comisi JC. Retention and remineralization effect of moisture tolerant resin-based sealant and glass ionomer sealant on non-cavitated pit and fissure caries: Randomized controlled clinical trial. *J Dent Jul*. 2019 Jul;86:69-74. doi: 10.1016/j.jdent.2019.05.027.
- Amaechi BT, Podoleanu A, Higham SM, Jackson DA. Correlation of quantitative light-induced fluorescence and optical coherence tomography applied for detection and quantification of early dental caries. *J Biomed Opt* 2003 Oct;8 (4):642–7. doi:10.1117/1.1606685.
- Ando M, Hall AF, Eckert GJ, Schemehorn BR, Analoui M, Stookey GK. Relative ability of laser fluorescence techniques to quantitate early mineral loss in vitro. *Caries Res*. 1997;31(2):125-31. doi: 10.1159/000262387.
- Ando M, Schemehorn BR, Eckert GJ, Zero DT, Stookey GK. Influence of enamel thickness on quantification of mineral loss in enamel using laser-induced fluorescence. *Caries Res*. 2003 Jan-Feb;37(1):24-8. doi: 10.1159/000068229.

¹ De acordo com Estilo Vancouver.

Ando M, Shaikh S, Eckert G. Determination of Caries Lesion Activity: Reflection and Roughness for Characterization of Caries Progression. *Oper Dent*. 2018 May/Jun;43(3):301-6. doi: 10.2341/16-236-L.

Angmar B, Carlstrom D, Glas JE. Studies on the ultrastructure of dental enamel. IV. The mineralization of normal human enamel. *J Ultrastruct Res*. 1963 Feb;8:12-23. doi: 10.1016/s0022-5320(63)80017-9.

Arends J, Christoffersen J. Invited Review Article: The Nature of Early Caries Lesions in Enamel. *J Dent Res*. 1986 Jan;65(1):2-11. doi:10.1177/00220345860650010201.

Azevedo CS, Trung LCE, Simionato MRL, Freitas AZ, Matos AB. Evaluation of caries-affected dentin with optical coherence tomography. *Braz. Oral Res*. 2011 Oct; 25(5): 407-13. doi:10.1590/S1806-83242011000500006.

Boyde A, Fortelius M, Lester KS, Martin LB. Basis of the structure and development of mammalian enamel as seen by scanning electron microscopy. *Scanning Microsc*. 1988 Sep;2(3):1479-90.

Braga MM, de Benedetto MS, Imparato JC, Mendes FM. New methodology to assess activity status of occlusal caries in primary teeth using laser fluorescence device. *J Biomed Opt*. 2010 Jul-Aug;15(4):047005. doi: 10.1117/1.3463007.

Buchwald T, Buchwald Z. Assessment of the Raman spectroscopy effectiveness in determining the early changes in human enamel caused by artificial caries. *Analyst*. 2019 Feb 21;144(4):1409–19. doi:10.1039/c8an01494a.

Buchwald T, Okulus Z, Szybowicz M. Raman spectroscopy as a tool of early dental caries detection—new insights. *J Raman Spectrosc*. 2017; 48, 1094–1102. doi: 10.1002/jrs.5175.

Buzalaf MAR, Pessan JP, Honório HM, Ten Cate JM. Mechanisms of action of fluoride for caries control. *Monogr Oral Sci*. 2011; 22:97-114. doi: 10.1159/000325151.

Caldwell RC, Muntz ML, Gilmore RW, Pigman W. Microhardness studies of intact surface enamel. *J Dent Res*. 1957 Oct; 36(5):732-8. doi: 10.1177/00220345570360051401.

Cara ACB, Zezell DM, Ana PA, Deana AM, Amaral MM, Vieira Junior ND, Freitas AZ. Comparative analysis of optical coherence tomography signal and microhardness for demineralization evaluation of human tooth enamel. In: J Popp, W Drexler, VV.

Cara ACB, Zezell DM, Ana PA, Maldonado EP, Freitas AZ. Evaluation of two quantitative analysis methods of optical coherence tomography for detection of enamel demineralization and comparison with microhardness. *Lasers Surg Med*. 2014; 46, 666– 71. doi:10.1002/lsm.22292.

Carlstrom D, Glas JE, Angmar B. Studies on the ultrastructure of dental enamel. V. The state of water in human enamel. *J Ultrastruct Res.* 1963 Feb; 8:24-9. doi: 10.1016/s0022-5320(63)80018-0.

Carvalho FB, Barbosa AFS, Zanin FAA, Brugnera Júnior, Silveira Júnior L, Pinheiro ALB. Use of laser fluorescence in dental caries diagnosis: a fluorescence x biomolecular vibrational spectroscopic comparative study. *Braz Dent J.* 2013; Mar; 24(1): 59-63. doi:1590/0103-6440201302123.

Cazzolla AP, De Franco AR, Lacaita M, Lacarbonara V. Efficacy of 4-year treatment of icon infiltration resin on postorthodontic white spot lesions. *BMJ Case Rep.* 2018 Jul;18;2018:bcr2018225639. doi: 10.1136/bcr-2018-225639.

Chang HS, Walsh LJ, Freer TJ. Enamel demineralization during orthodontic treatment. Aetiology and prevention. *Aust Dent J.* 1997 Oct;42(5):322-7. doi: 10.1111/j.1834-7819.1997.tb00138.x.

Craig RG, Peyton FA. The Microhardness of Enamel and Dentin. *Journal of Dental Research.* 1958 Aug;37(4):661-8. doi:10.1177/00220345580370041301.

Cury JA; Tenuta, LMA. Enamel remineralization: controlling the caries disease or treating early caries lesions?. *Braz Oral Res.* 2009; 23(1): 23-30.

Cuy JL, Mann AB, Livi KJ, Teafora MF, Weihs TP. Nanoindentation mapping of the mechanical properties of human molar tooth enamel. *Arch Oral Biol.* 2002 Apr;47(4):281-91. doi: 10.1016/s0003-9969(02)00006-7.

Daculsi, G, Menanteau J, Kerebel LM, Mitre D. Enamel Crystals: size, shape, length and growing process. High resolution TEM and biochemical study. In Fearnhead, RW; Suga, S. *Tooth enamel.* Amsterdam: Elsevier Science Publishers; 1984.p.14-8.

Darling AL. Studies of the early lesion of enamel caries with transmitted light, polarized light and microradiography. Its nature, mode of spread, points of entry and its relation to enamel structure. *Br Dent J.* 1985, 105, 117–35. doi:10.1007/978-1-349-16547-6_6.

Das Gupta S, Killenberger M, Tanner T, Rieppo L, Saarakkala S, Heikkilä J, Anttonen V, Finnilä MAJ. Mineralization of dental tissues and caries lesions detailed with Raman microspectroscopic imaging. *Analyst.* 2021 Mar 8;146(5):1705-13. doi: 10.1039/d0an01938k.

Davidson CL, Hoekstra IS, Arends J. Microhardness of sound, decalcified and etched tooth enamel related to the calcium content. *Caries Res.* 1974;8(2):135-44. doi: 10.1159/000260101.

Dawes C. What is the critical pH and why does a tooth dissolve in acid? *J Can Dent Assoc.* 2003 Dec;69(11):722-4.

De Sousa FB, Dias SJ, Sampaio VS. Natural enamel caries: a comparative histological study on biochemical volumes. *Caries Res.* 2013;47(3):183-92. doi: 10.1159/000345378. Epub 2012 Dec 5. Erratum in: *Caries Res.* 2013;47(5):428.

Deyhle H, White SN, Bunk O, Beckmann F, Müller B. Nanostructure of carious tooth enamel lesion. *Acta Biomater.* 2014 Jan;10(1):355-64. doi: 10.1016/j.actbio.2013.08.024.

Espigares J, Sadr A, Hamba H, Shimada Y, Otsuki M, Tagami J, Sumi Y. Assessment of natural enamel lesions with optical coherence tomography in comparison with microfocus x-ray computed tomography. *J Med Imaging (Bellingham).* 2015 Jan;2(1):014001. doi: 10.1117/1.JMI.2.1.014001.

Fava M, Watanabe L, Fava-de-moraes F, Costa LRRS. Prismless enamel in human non-erupted deciduous molar teeth: a scanning electron microscopic study. *Rev Odontol Univ São Paulo.* 1997 Oct ; 11(4). doi:10.1590/S0103-06631997000400003.

Feagin F, Koulourides T, Pigman W. The characterization of enamel surface demineralisation, remineralisation and associated hardness changes in human and bovine material. *Arch Oral Biol.* 1969 Dec;14(12): 1407-17. doi: 10.1016/0003-9969(69)90258-1.

Featherstone JD. Dental caries: a dynamic disease process. *Aust Dent J.* 2008 Sep;53(3):286-91. doi: 10.1111/j.1834-7819.2008.00064.x.

Featherstone JD. Prevention and reversal of dental caries: role of low level fluoride. *Community Dent Oral Epidemiol.* 1999 Feb;27(1):31-40. doi: 10.1111/j.1600-0528.1999.tb01989.x.

Fejerskov O, Josephsen K, Nyvad B. Surface ultrastructure of unerupted mature human enamel. *Caries Res.* 1984;18(4):302-14. doi: 10.1159/000260781.

Fejerskov O, Nyvad B, Kidd EAM. Clinical and histological manifestations of dental caries. In Fejerskov O, Kidd EAM, editors. *Dental Caries. The disease and its clinical management.* Copenhagen: Blackwell Munksgaard. 2003; p. 71–99.

Fejerskov O, Kidd EAM (ed.) *Dental caries: the disease and its clinical management.* 2nd edition. Oxford: Wiley-Blackwell; 2008.

Fejerskov O., Nyvad B, Kidd E. (eds) *Dental caries: the disease and its clinical management.* 3rd Edn. Oxford, Wiley-Blackwell; 2015.

Freitas MCCA, Nunes LV, Comar LP, Rios D, Magalhães AC, Honório HM, Wang L. In vitro effect of a resin infiltrant on different artificial caries-like enamel lesions. *Arch Oral Biol.* 2018 Nov; 95:118-24.

Fried D, Xie J, Shafi S, Featherstone JD, Breunig TM, Le C. Imaging caries lesions and lesion progression with polarization sensitive optical coherence tomography. *J Biomed Opt.* 2002 Oct;7(4):618-27. doi: 10.1117/1.1509752.

Fried WA, Abdelaziz M, Darling CL, Fried D. High Contrast Reflectance Imaging of Enamel Demineralization and Remineralization at 1950-nm for the Assessment of Lesion Activity. *Lasers Surg Med.* 2021 Jan;13:10.1002/lsm.23371. doi: 10.1002/lsm.23371.

Giannini M, Soares CJ, de Carvalho RM. Ultimate tensile strength of tooth structures. *Dent Mater.* 2004 May;20(4):322-9. doi: 10.1016/S0109-5641(03)00110-6.

Gmür R, Giertsen E, van der Veen MH, de Josselin de Jong E, ten Cate JM, Guggenheim B. In vitro quantitative light-induced fluorescence to measure changes in enamel mineralization. *Clin Oral Investig.* 2006 Sep;10(3):187-95. doi: 10.1007/s00784-006-0058-z.

Godoi FA, Carlos NR, Bridi EC, Amaral FLB, França FMG, Turssi CP et al . Remineralizing effect of commercial fluoride varnishes on artificial enamel lesions. *Braz. Oral Res.* 2019; 33: e044. doi:<https://doi.org/10.1590/1807-3107bor-2019.vol33.0044>.

Gokce G, Savas S, Kucukyilmaz E, Veli I. Effects of toothpastes on white spot lesions around orthodontic brackets using quantitative light-induced fluorescence (QLF) : An in vitro study. *J Orofac Orthop.* 2017 Nov;78(6):480-6. doi: 10.1007/s00056-017-0106-0.

Gomez J, Pretty IA, Santarpia RP 3rd, Cantore B, Rege A, Petrou I, Ellwood RP. Quantitative light-induced fluorescence to measure enamel remineralization in vitro. *Caries Res.* 2014;48(3):223-7. doi: 10.1159/000354655.

Gomez J. Detection and diagnosis of the early caries lesion. *BMC Oral Health.* 2015;15 Suppl 1(Suppl 1):S3. doi: 10.1186/1472-6831-15-S1-S3.

Gorton J, Featherstone JD. In vivo inhibition of demineralization around orthodontic brackets. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2003 Jan;123(1):10-4. doi: 10.1067/mod.2003.47.

Gustafson G, Kling O. Micro-hardness measurements in the human dental enamel. *Odontol, Tidskr.* 1948; 56: 23.

Gutiérrez-Salazar MP, Reyes-Gasga J. Microhardness and chemical composition of human tooth. *Mater Res.* 2003 Jun;6(3), 367-73. doi: 10.1590/S1516-14392003000300011.

Gwinnett AJ. Structure and composition of enamel. *Oper Dent.* 1992;Suppl 5:10-7.

Habelitz S, Marshall SJ, Marshall GW Jr, Balooch M. Mechanical properties of human dental enamel on the nanometre scale. *Arch Oral Biol.* 2001 Feb;46(2):173-83. doi: 10.1016/s0003-9969(00)00089-3.

Hall AF, DeSchepper E, Ando M, Stookey GK. In vitro studies of laser fluorescence for detection and quantification of mineral loss from dental caries. *Adv Dent Res*. 1997 Nov;11(4):507-14. doi: 10.1177/08959374970110041901.

Heymann GC, Grauer D. A contemporary review of white spot lesions in orthodontics. *J Esthet Restor Dent*. 2013 Apr;25(2):85-95. doi: 10.1111/jerd.12013.

Hicks J, Garcia-Godoy F, Flaitz C. Biological factors in dental caries enamel structure and the caries process in the dynamic process of demineralization and remineralization (part 2). *J Clin Pediatr Dent*. 2004 Winter;28(2):119-24. doi: 10.17796/jcpd.28.2.617404w302446411. Erratum in: *J Clin Pediatr Dent*. 2004 Spring;38(3):214.

Hodge, HC. Hardness Tests on Teeth. *J D Res*. 1936. 151:271.

Holmen L, Thylstrup A, Ogaard B, Kragh F. A polarized light microscopic study of progressive stages of enamel caries in vivo. *Caries Res*. 1985;19(4):348-54. doi: 10.1159/000260866.

Huang D, Swanson EA, Lin CP, Schuman JS, Stinson WG, Chang W, et al. Optical coherence tomography. *Science*. 1991 Nov 22;254(5035):1178-81. doi: 10.1126/science.1957169.

Huang TT, Jones AS, He LH, Darendeliler MA, Swain MV. Characterisation of enamel white spot lesions using X-ray micro-tomography. *J Dent*. 2007 Sep;35(9):737-43. doi: 10.1016/j.jdent.2007.06.001.

Ingram GS, Silverstone LM. A chemical and histological study of artificial caries in human dental enamel in vitro. *Caries Res*. 1981;15(5):393-8. doi: 10.1159/000260543. Jones RS, Fried D. Remineralization of enamel caries can decrease optical reflectivity. *J Dent Res*. 2006 Sep;85(9):804-8. doi: 10.1177/154405910608500905.

Kianoush N, Adler CJ, Nguyen KA, Browne GV, Simonian M, Hunter N. Bacterial profile of dentine caries and the impact of pH on bacterial population diversity. *PLoS One*. 2014 Mar 27;9(3):e92940. doi: 10.1371/journal.pone.0092940. PMID: 24675997; PMCID: PMC3968045.

Kinoshita H, Miyoshi N, Fukunaga Y, Ogawa T, Ogasawara T, Sano K. Functional mapping of carious enamel in human teeth with Raman microspectroscopy. *J Raman Spectrosc*. 2008;39(5):655-60. doi: 10.1002/jrs.1908.

Klinger A. Studies on enamel hardness. *Dent Record*. 1940; 60:291.

Ko AC, Choo-Smith LP, Hewko M, Leonardi L, Sowa MG, Dong CC, Williams P, Cleghorn B. Ex vivo detection and characterization of early dental caries by optical coherence tomography and Raman spectroscopy. *J Biomed Opt*. 2005 May-Jun;10(3):031118. doi: 10.1117/1.1915488.

Ko AC, Choo-Smith LP, Hewko M, Sowa MG, Dong CC, Cleghorn B. Detection of early dental caries using polarized Raman spectroscopy. *Opt Express*. 2006 Jan 9;14(1):203-15. doi: 10.1364/opex.14.000203.

Ko HY, Kang SM, Kim HE, Kwon HK, Kim BI. Validation of quantitative light-induced fluorescence-digital (QLF-D) for the detection of approximal caries in vitro. *J Dent*. 2015 May;43(5):568-75. doi: 10.1016/j.jdent.2015.02.010.

Kodaka T, Debari K, Yamada M, Kuroiwa M. Correlation between microhardness and mineral content in sound human enamel (short communication). *Caries Res*. 1992;26(2):139-41. doi: 10.1159/000261498.

Kozloff KM, Carden A, Bergwitz C, Forlino A, Uveges TE, Morris MD, et al. Brittle IV mouse model for osteogenesis imperfecta IV demonstrates postpubertal adaptations to improve whole bone strength. *J Bone Miner Res*. 2004 Apr;19(4):614-22. doi: 10.1359/JBMR.040111.

Larsen MJ. Chemical events during tooth dissolution. *J Dent Res*. 1990 Feb;69 Spec No:575-80; discussion 634-6. doi: 10.1177/00220345900690S114.

Lippert F, Butler A, Lynch RJ. Enamel demineralization and remineralization under plaque fluid-like conditions: a quantitative light-induced fluorescence study. *Caries Res*. 2011;45(2):155-61. doi: 10.1159/000325743.

Lippert F, Lynch RJ. Comparison of Knoop and Vickers surface microhardness and transverse microradiography for the study of early caries lesion formation in human and bovine enamel. *Arch Oral Biol*. 2014 Jul;59(7):704-10. doi: 10.1016/j.archoralbio.2014.04.005.

Lippert F, Parker DM, Jandt KD. In vitro demineralization/remineralization cycles at human tooth enamel surfaces investigated by AFM and nanoindentation. *J Colloid Interface Sci*. 2004 Dec 15;280(2):442-8. doi: 10.1016/j.jcis.2004.08.016. PMID: 15533417.

Liu L, Yue S, Jiang H, Lu T. Comparison of demineralization of different organic acid to enamel. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*. 1998 May;16(2):103-4, 113.
 Luczaj-Cepowicz E, Marczuk-Kolada G, Obidzinska M, Sidun J. Diagnostic validity of the use of ICDAS II and DIAGNOdent pen verified by micro-computed tomography for the detection of occlusal caries lesions-an in vitro evaluation. *Lasers Med Sci*. 2019 Oct;34(8):1655-63. doi: 10.1007/s10103-019-02762-z.

Lussi A, Francescut P. Performance of conventional and new methods for the detection of occlusal caries in deciduous teeth. *Caries Res*, 2003 Jan-Feb;37:2-7.

Macey R, Walsh T, Riley P, Hogan R, Glenny AM, Worthington HV, Clarkson JE, Ricketts D. Transillumination and optical coherence tomography for the detection and

diagnosis of enamel caries. *Cochrane Database Syst Rev*. 2021 Jan 27;1:CD013855. doi: 10.1002/14651858.CD013855.

Maia AM, de Freitas AZ, de L Campello S, Gomes AS, Karlsson L. Evaluation of dental enamel caries assessment using Quantitative Light Induced Fluorescence and Optical Coherence Tomography. *J Biophotonics*. 2016 Jun;9(6):596-602. doi: 10.1002/jbio.201500111.

Mandurah MM, Sadr A, Shimada Y, Kitasako Y, Nakashima S, Bakhsh TA, Tagami J, Sumi Y. Monitoring remineralization of enamel subsurface lesions by optical coherence tomography. *J Biomed Opt*. 2013 Apr;18(4):046006. doi: 10.1117/1.JBO.18.4.046006.

Manesh SK, Darling CL, Fried D. Nondestructive assessment of dentin demineralization using polarization-sensitive optical coherence tomography after exposure to fluoride and laser irradiation. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2009 Aug;90(2):802-12. doi: 10.1002/jbm.b.31349.

Marin E, Hiraishi N, Honma T, Boschetto F, Zanocco M, Zhu W, Adachi T, Kanamura N, Yamamoto T, Pezzotti G. Raman spectroscopy for early detection and monitoring of dentin demineralization. *Dent Mater*. 2020 Dec;36(12):1635-44. doi: 10.1016/j.dental.2020.10.005.

Mattousch T, Van der Veen M, Zentner A. Caries lesions after orthodontic treatment followed by quantitative light-induced fluorescence: a 2-year follow-up. *Eur J Orthod* 2007;29(3):294-8.

Mendes FM, Nicolau J. Utilization of laser fluorescence to monitor caries lesions development in primary teeth. *J Dent Child (Chic)*. 2004 May-Aug;71(2):139-42.

Mendes FM, Siqueira WL, Mazzitelli JF, Pinheiro SL, Bengtson AL. Performance of DIAGNOdent for detection and quantification of smooth-surface caries in primary teeth. *J Dent*. 2005 Jan;33(1):79-84. doi: 10.1016/j.jdent.2004.10.010.

Meredith N, Sherrieff M, Setchell DJ, Swanson SA. Measurement of the microhardness and Young's modulus of human enamel and dentine using an indentation technique. *Arch Oral Biol*. 1996 Jun;41(6):539-45. doi: 10.1016/0003-9969(96)00020-9.

Meyer-Lueckel H, Wierichs RJ, Schellwien T, Paris S. Remineralizing efficacy of a CPP-ACP cream on enamel caries lesions in situ. *Caries Res*. 2015;49(1):56-62. doi: 10.1159/000363073.

Min JH, Inaba D, Kwon HK, Chung JH, Kim BI. Evaluation of penetration effect of resin infiltrant using optical coherence tomography. *J Dent*. 2015 Jun;43(6):720-5. doi: 10.1016/j.jdent.2015.03.006.

Mohanty B, Dadlani D, Mahoney D, Mann AB. Characterizing and identifying incipient carious lesions in dental enamel using micro-Raman spectroscopy. *Caries Res*. 2013;47(1):27-33. doi: 10.1159/000342432.

Mount GJ. Defining, classifying, and placing incipient caries lesions in perspective. *Dent Clin North Am*. 2005 Oct;49(4):701-23. doi: 10.1016/j.cden.2005.05.012.

Mujat C, van der Veen MH, Ruben JL, ten Bosch JJ, Dogariu A. Optical path-length spectroscopy of incipient caries lesions in relation to quantitative light-induced fluorescence and lesion characteristics. *Appl Opt*. 2003 Jun 1;42(16):2979-86. doi: 10.1364/ao.42.002979.

Nelson DGA, Jongebloed WL, Arends J. Morphology of Enamel Surfaces Treated with Topical Fluoride Agents: SEM Considerations. *J Dent Res*. 1983;62(12):1201-8. doi:10.1177/00220345830620120501.

Osborn JW. Directions and interrelationship of prisms in cuspal and cervical enamel of human teeth. *J Dent Res*. 1968 May-Jun;47(3):395-402. doi: 10.1177/00220345680470030901.

Otis LL, Everett MJ, Sathyam US, Colston BW Jr. Optical coherence tomography: a new imaging technology for dentistry. *J Am Dent Assoc*. 2000 Apr;131(4):511-4. doi: 10.14219/jada.archive.2000.0210.

Paris S, Bitter K, Krois J, Meyer-Lueckel H. Seven-year-efficacy of proximal caries infiltration - Randomized clinical trial. *J Dent*. 2020 Feb;93:103277. doi: 10.1016/j.jdent.2020.103277.

Paula AB, Fernandes AR, Coelho AS, Marto CM, Ferreira MM, Caramelo F, et al. Therapies for White Spot Lesions-A Systematic Review. *J Evid Based Dent Pract*. 2017 Mar;17(1):23-38. doi: 10.1016/j.jebdp.2016.10.003.

Pearce EI. A microradiographic and chemical comparison of in vitro systems for the simulation of incipient caries in abraded bovine enamel. *J Dent Res*. 1983 Sep;62(9):969-74. doi: 10.1177/00220345830620091101.

Peres, MA, Macpherson, LMD, Weyant, RJ, Daly, B, Venturelli, R, Mathur, MR, Listl, S, Celeste, RK, Guarnizo-Herreno, CC, Kearns, C, et al. Oral diseases: a global public health challenge. *Lancet*. 2019 Jul;394(10194):249–60. doi: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)31146-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)31146-8).

Pithon MM, Santos Mde J, de Souza CA, Leão Filho JC, Braz AK, de Araujo RE, et al. Effectiveness of fluoride sealant in the prevention of carious lesions around orthodontic brackets: an OCT evaluation. *Dental Press J Orthod*. 2015 Nov-Dec;20(6):37-42. doi: 10.1590/2177-6709.20.6.037-042.oar.

Pitts NB, Ekstrand KR; ICDAS Foundation. International Caries Detection and Assessment System (ICDAS) and its International Caries Classification and Management System (ICCMS) - methods for staging of the caries process and enabling dentists to manage caries. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2013 Feb;41(1):e41-52. doi: 10.1111/cdoe.12025.

Pontes LRA, Novaes TF, Moro BLP, Braga MM, Mendes FM. Clinical performance of fluorescence-based methods for detection of occlusal caries lesions in primary teeth. *Braz Oral Res.* 2017 Nov 6;31:e91. doi: 10.1590/1807-3107BOR-2017.vol31.0091.

Popescu DP, Sowa MG, Hewko MD, Choo-Smith LP. Assessment of early demineralization in teeth using the signal attenuation in optical coherence tomography images. *J Biomed Opt.* 2008 Sep-Oct;13(5):054053. doi: 10.1117/1.2992129.

Pretty IA. Caries detection and diagnosis: novel technologies. *J Dent.* 2006 Nov;34(10):727-39. doi: 10.1016/j.jdent.2006.06.001.

Quitero MFZ, Siriani LK, Azevedo CS, Freitas AZ, Scaramucci T, Simionato MRL, Matos AB. Optical coherence tomography and polarized light microscopy for the evaluation of artificial caries: a preliminary study. *Gen Dent.* 2019 Jan-Feb;67(1):e1-e6.

Rafiei E, Fadaei Tehrani P, Yassaei S, Haerian A. Effect of CO₂ laser (10.6 µm) and Remin Pro on microhardness of enamel white spot lesions. *Lasers Med Sci.* 2020 Jul;35(5):1193-203. doi: 10.1007/s10103-020-02970-y.

Ramakrishnaiah R, Rehman GU, Basavarajappa S, Al Khuraif AA., Durgesh BH, Khan A S, Rehman IU. Applications of Ramanspectroscopy in dentistry: Analysis of tooth structure. *Appl. Spectrosc. Rev.* 2015, 50(4): 332–50. doi:10.1080/05704928.2014.986734.

Rehder Neto FC, Maeda FA, Turssi CP, Serra MC. Potential agents to control enamel caries-like lesions. *J Dent.* 2009 Oct;37(10):786-90. doi: 10.1016/j.jdent.2009.06.008.

Reis A, Zach VL, de Lima AC, de Lima Navarra MF, Grande RH. Occlusal caries detection, a comparison of Diagnodent and two conventional diagnostic methods. *J Clin Dent.* 2004;15:17-23.

Richards A, Larsen MJ, Fejerskov O, Thylstrup A. Fluoride content of buccal surface enamel and its relation to dental caries in children. *Arch Oral Biol.* 1977;22(7):425-8. doi: 10.1016/0003-9969(77)90122-4.

Ripa LW, Gwinnett AJ, Buonocore MG. The "prismless" outer layer of deciduous and permanent enamel. *Arch Oral Biol.* 1966 Jan;11(1):41-8. doi: 10.1016/0003-9969(66)90116-6.

Robinson C, Shore RC, Brookes SJ, Strafford S, Wood SR, Kirkham J. The chemistry of enamel caries. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2000;11(4):481-95. doi: 10.1177/10454411000110040601.

Robinson C, Weatherell JA, Hallsworth AS. Variation in composition of dental enamel within thin ground tooth sections. *Caries Res*. 1971;5(1):44-57. doi: 10.1159/000259731.

Robinson C, Kirkham J, Shore R. (Eds.). *Dental enamel: Formation to destruction* (1st ed.), 1995; CRC Press. doi: 10.1201/9781315150925.

Robinson C, Weathered JA, Hallsworth AS. Alterations in the composition of permanent human enamel during carious attack, in *Demineralisation and Remineralisation of the Teeth*. Leach, S. A. and Edgar, W. M., Eds., IRL Press, Oxford; 1983.

Sadyrin E, Swain M, Mitrin B, Rzhepakovsky I, Nikolaev A, Irkha V, Yogina D, Lyanguzov N, Maksyukov S, Aizikovich S. Characterization of Enamel and Dentine about a White Spot Lesion: Mechanical Properties, Mineral Density, Microstructure and Molecular Composition. *Nanomaterials* (Basel). 2020 Sep 21;10(9):1889. doi: 10.3390/nano10091889.

Salehi H, Terrer E, Panayotov I, Levallois B, Jacquot B, Tassery H, et al. Functional mapping of human sound and carious enamel and dentin with Raman spectroscopy. *J Biophotonics*. 2013 Oct;6(10):765-74. doi: 10.1002/jbio.201200095.

Sampson V, Sampson A. Diagnosis and treatment options for anterior white spot lesions. *Br Dent J*. Sep;229, 348–52. doi:10.1038/s41415-020-2057-x.

Shah FA. Characterization of Synthetic Hydroxyapatite Fibers Using High-Resolution, Polarized Raman Spectroscopy. *Appl Spectrosc*. 2021 Apr;75(4):475-79. doi: 10.1177/0003702820942540.

Shah FA. Towards refining Raman spectroscopy-based assessment of bone composition. *Sci Rep*. 2020 Oct 7;10(1):16662. doi: 10.1038/s41598-020-73559-2.

Shi XQ, Tranaeus S, Angmar-Månsson B. Comparison of QLF and DIAGNOdent for quantification of smooth surface caries. *Caries Res*. 2001a Jan-Feb;35(1):21-6. doi: 10.1159/000047426.

Shi XQ, Tranaeus S, Angmar-Månsson B. Validation of DIAGNOdent for quantification of smooth-surface caries: an in vitro study. *Acta Odontol Scand*. 2001b Apr;59(2):74-8. doi: 10.1080/000163501750157153.

Shi XQ, Welander U, Angmar-Månsson B. Occlusal caries detection with KaVo DIAGNOdent and radiography: an in vitro comparison. *Caries Res*. 2000 Mar-Apr;34(2):151-8. doi: 10.1159/000016583.

Shimada Y, Sadr A, Sumi Y, Tagami J. Application of optical coherence tomography (OCT) for diagnosis of caries, cracks, and defects of restorations. *Curr Oral Health Rep.* 2015;2(2):73-80. doi: 10.1007/s40496-015-0045-z.

Silverstone LM, Hicks MJ, Featherstone MJ. Dynamic factors affecting lesion initiation and progression in human dental enamel. Part I. The dynamic nature of enamel caries. *Quintessence Int.* 1988 Oct;19(10):683-711.

Silverstone LM, Poole DF. The effect of saliva and calcifying solutions upon the histological appearance of enamel caries. *Caries Res.* 1968;2(1):87-93. doi: 10.1159/000259547.

Silverstone LM, Wefel JS, Zimmerman BF, Clarkson BH, Featherstone MJ. Remineralization of natural and artificial lesions in human dental enamel in vitro. Effect of calcium concentration of the calcifying fluid. *Caries Res.* 1981;15(2):138-57. doi: 10.1159/000260512.

Silverstone LM. Structure of carious enamel, including the early lesion. *Oral Sci Rev.* 1973;3:100-60.

Silverstone LM. The histopathology of enamel lesions produced in vitro in teeth previously exposed to calcifying fluids. *Caries Res.* 1970;4(1):31-48. doi: 10.1159/000259624.

Smith CE. Cellular and Chemical Events During Enamel Maturation. *Crit Rev in Oral Biol Med.* 1998;9(2):128-161. doi:10.1177/10454411980090020101.

Sorkhdini P, Crystal YO, Tang Q, Lippert F. The effect of silver diamine fluoride in preventing in vitro primary coronal caries under pH-cycling conditions. *Arch Oral Biol.* 2021 Jan;121:104950. doi: 10.1016/j.archoralbio.2020.104950.

Sowa MG, Popescu DP, Friesen JR, Hewko MD, Choo-Smith LP. A comparison of methods using optical coherence tomography to detect demineralized regions in teeth. *J Biophotonics* 2011; 4: 814– 23.

Stookey GK. Quantitative light fluorescence: a technology for early monitoring of the caries process. *Dent Clin North Am.* 2005 Oct;49(4):753-70, vi. doi: 10.1016/j.cden.2005.05.009.

Ten Cate JM, Arends J. Remineralization of artificial enamel lesions in vitro: III. A study of the deposition mechanism. *Caries Res.* 1980;14(6):351-8. doi: 10.1159/000260477.

Ten Cate, AR. Oral histology: Development Structure and Function. 5^o ed. St Louis. Mosby, 2001.

- Timchenko V, Timchenko PE, Volova LT, Rosenbaum AY, Kulabukhova AY, Zherdeva LA, et al. Application of Raman spectroscopy method to the diagnostics of caries development. *J Biomed Photonics Eng.* 2015 Dec;1(3):201-5. doi: 10.18287/jbpe-2015-1-3-201.
- Toledano M, Aguilera FS, Cabello I, Osorio R. Masticatory function induced changes, at subnanostructural level, in proteins and mineral at the resin-dentine interface. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2014 Nov;39:197-209. doi: 10.1016/j.jmbbm.2014.07.025.
- Tranaeus S, Lindgren LE, Karlsson L, Angmar-Mansson B. In vivo validity and reliability of IR fluorescence measurements for caries detection and quantification. *Swed Dent J* 2004;28:173-82.
- Tüfekçi E, Pennella DR, Mitchell JC, Best AM, Lindauer SJ. Efficacy of a fluoride-releasing orthodontic primer in reducing demineralization around brackets: an in-vivo study. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2014 Aug;146(2):207-14. doi: 10.1016/j.ajodo.2014.05.016.
- Van der Veen MH, de Josselin de Jong E. Application of quantitative light-induced fluorescence for assessing early caries lesions. *Monogr Oral Sci.* 2000;17:144-62. doi: 10.1159/000061639.
- Vieira AE, Delbem AC, Sassaki KT, Rodrigues E, Cury JA, Cunha RF. Fluoride dose response in pH-cycling models using bovine enamel. *Caries Res.* 2005 Nov-Dec;39(6):514-20. doi: 10.1159/000088189.
- Wang XJ, Milner TE, de Boer JF, Zhang Y, Pashley DH, Nelson JS. Characterization of dentin and enamel by use of optical coherence tomography. *Appl Opt.* 1999 Apr 1;38(10):2092-6. doi: 10.1364/ao.38.002092.
- Weatherell JA, Robinson C, Hallsworth AS. Variations in the Chemical Composition of Human Enamel. *J Dent Res.* 1974;53(2):180-92. doi:10.1177/00220345740530020501.
- White DJ. The application of in vitro models to research on demineralization and remineralization of the teeth. *Adv Dent Res.* 1995 Nov;9(3):175-93; discussion 194-7. doi: 10.1177/08959374950090030101.
- Whittaker DK. Structural variations in the surface zone of human tooth enamel observed by scanning electron microscopy. *Arch Oral Biol.* 1982;27(5):383-92. doi: 10.1016/0003-9969(82)90147-9.
- Worawongvasu R. A scanning electron microscopic study of enamel surfaces of incipient caries. *Ultrastruct Pathol.* 2015;39(6):408-12. doi: 10.3109/01913123.2015.1060284.

Zhang J, Lynch RJM, Watson TF, Banerjee A. Chitosan-bioglass complexes promote subsurface remineralisation of incipient human carious enamel lesions. *J Dent*. 2019 May;84:67-75. doi: 10.1016/j.jdent.2019.03.006.

ANEXO A – Autorização Biobanco da FOU SP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
BIOBANCO DE DENTES DA FOU SP

Fundada em 1900
Em constante busca da excelência

AUTORIZAÇÃO

O *Biobanco da FOU SP* – Divisão de Dentes Humanos compromete-se a fornecer **30 amostras** de dentes humanos (molares e pré-molares com lesão de mancha branca) para a execução do trabalho de pesquisa intitulado: "Caracterização de lesões de mancha branca naturais e lesões desenvolvidas artificialmente" a ser realizado pela pesquisadora **Erika Michele dos Santos Araújo**, orientada pela **Profa. Dra. Adriana Bona Matos**, após a aprovação do protocolo de pesquisa pelo Comitê de Ética em Pesquisa.

São Paulo, 29 de outubro de 2019.

Prof(a) Dr(a) José Carlos Pettorossi Imparato
Responsável Laboratório

Prof. Dr. Décio dos Santos Pinto Junior
Coordenador do Biobanco da FOU SP

Av. Prof. Lineu Prestes, 2227 – São Paulo, SP – Cep 05508-000
www.fo.usp.br

ANEXO B – Parecer consubstanciado do CEP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**DADOS DA EMENDA**

Título da Pesquisa: Caracterização de lesões de mancha branca naturais e lesões desenvolvidas artificialmente

Pesquisador: Erika Michele Dos Santos Araújo

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 25123119.6.0000.0075

Instituição Proponente: Universidade de São Paulo - Faculdade de Odontologia

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.063.991

Apresentação do Projeto:

O projeto propõe estudar e caracterizar lesões de mancha branca em faces dentais lisas nos seus aspectos morfológicos, químicos e físicos. Serão utilizados 30 molares e pré-molares humanos cedidos pelo Biobanco da Faculdade de Odontologia - USP.

Os espécimes serão caracterizados por meio das seguintes métodos: Fluorescência quantitativa induzida pela luz (QLF), Diagnodent®, Microtomografia Computadorizada de Raios-X (μ CT), Tomografia de Coerência Óptica (OCT), Microdureza seccional, Espectroscopia Raman, Microscopia eletrônica de varredura+ EDS.

Objetivo da Pesquisa:

Caracterizar lesões de mancha branca em faces dentais lisas nos seus aspectos morfológicos, químicos e físicos, bem como, compará-las com esmalte sadio e com lesões de mancha branca artificiais produzidas por método químico.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos e benefícios descritos adequadamente.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa relevante para área de Dentística - no diagnóstico e tratamento de lesões de mancha branca.

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227 - 1º andar , sala 02 da administração
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 05.508-900
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-7960 **Fax:** (11)3091-7960 **E-mail:** cepfo@usp.br

Continuação do Parecer: 4.063.991

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Termos de apresentação e Autorização do Biobanco FOUSP foram anexados corretamente.

Recomendações:

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP-FOUSP relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final, utilizando-se da opção "Enviar Notificação" (descrita no Manual "Submeter Notificação", disponível na Central de Suporte - canto superior direito do site www.saude.gov.br/plataformabrasil).

Qualquer alteração no projeto original deve ser apresentada "emenda" a este CEP, de forma objetiva e com justificativas para nova apreciação.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Trata-se de uma emenda, na qual foi inserido mais 2 integrantes na equipe de pesquisadores.

Não há pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1560160_E1.pdf	19/05/2020 19:20:25		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_erika.docx	04/11/2019 13:59:28	Erika Michele Dos Santos Araújo	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	biobanco_erika.pdf	04/11/2019 13:59:10	Erika Michele Dos Santos Araújo	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA_erika.docx	04/11/2019 13:55:31	Erika Michele Dos Santos Araújo	Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rosto_erika1.pdf	04/11/2019 13:55:13	Erika Michele Dos Santos Araújo	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227 - 1º andar , sala 02 da administração
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 05.508-900
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-7960 **Fax:** (11)3091-7960 **E-mail:** cepfo@usp.br

USP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO
PAULO - FOSP

Continuação do Parecer: 4.063.991

SAO PAULO, 02 de Junho de 2020

Assinado por:
Alyne Simões Gonçalves
(Coordenador(a))

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227 - 1º andar , sala 02 da administração
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 05.508-900
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-7960 **Fax:** (11)3091-7960 **E-mail:** cepfo@usp.br