INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES

Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS PROMOVIDOS PELA RADIAÇÃO AZUL NA REMINERALIZAÇÃO
DO ESMALTE DENTÁRIO IN VITRO**

ILKA TIEMY KATO

Tese apresentada como parte dos requisitos
para a obtenção do Grau de Doutor em
Ciências na Área de tecnologia Nuclear –
Materiais.

Orientador: Niklaus Ursus Wetter

Co-Orientador: Denise Maria Zezell

SÃO PAULO

2009

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES

Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS PROMOVIDOS PELA RADIAÇÃO AZUL NA REMINERALIZAÇÃO
DO ESMALTE DENTÁRIO IN VITRO**

Ilka Tiemy Kato

Tese apresentada como parte dos requisitos
para a obtenção do Grau de Doutor em
Ciências na Área de tecnologia Nuclear –
Materiais.

Orientador: Niklaus Ursus Wetter

Co-Orientador: Denise Maria Zezell

SÃO PAULO

2009

DEDICATÓRIA

À minha **família** (meu pai **Sezo**, minha mãe **Regina**, minhas irmãs **Flávia** e **Renata** e minha avó **Sadae**)

POR SEREM A BASE DA MINHA VIDA.

Pelo amor incondicional, pelos exemplos de vida, por me incentivarem a estudar, pela paciência principalmente nos momentos difíceis e pelo apoio dado a mim... sempre.

Sem dúvida nenhuma, tudo o que eu conquistei não seria acontecido sem participação de vocês.

Ao Renato, meu amor, meu melhor amigo, meu maior crítico e incentivador.

Obrigada por espantar meus medos, me trazer paz e felicidade... por torcer pelo meu sucesso e acreditar em mim.

Especialmente nesta fase você foi um grande exemplo de força, perseverança e amor.

Agradeço a Deus por ter te conhecido.

Ao meu tio Luiz Kenji Kato, por ter me aconselhado quando eu estava sem rumo.

Ao meu cunhadinho, Vi

Por contribuir para a felicidade da minha família.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao meu orientador, meu mestre, **Prof. Dr. Niklaus Ursus Wetter**, que com sabedoria me guiou durante todo o curso de pós-graduação. Obrigada pelos conhecimentos transmitidos, pelas críticas que me impulsionaram, pela paciência e pelos incentivos dedicados a mim durante estes anos de convívio.

À minha co-orientadora Profa. **Dra. Denise Maria Zezell**, por ter me mostrado todos os detalhes que não podiam me faltar nesta fase de formação como pesquisadora. Obrigada pela dedicação que teve comigo desde a minha chegada ao IPEN, por ter me aceito como orientanda e me incluído em seu grupo de trabalho. Guardarei para sempre os exemplos e ensinamentos que me transmitiu.

À Profa. Dra. Martha Simões Ribeiro, uma grande amiga. Obrigada pelos inúmeros conselhos, pelos inesquecíveis momentos de descontração e discussão e pelo grande apoio nos momentos difíceis.

À Melissa e ao André, que foram mais que amigos... se tornaram irmãos com a convivência muito próxima. Obrigada pelo carinho e por terem nos recebido durante tanto tempo.

À Doralice Xavier (Dorinha), uma das pessoas mais belas que já conheci... por todo amor que transmite e por toda dedicação que tem com as pessoas que ama.
Obrigada de coração.

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) e ao Centro de Lasers e Aplicações (CLA), especialmente na pessoa da Dra. Sonia L. Baldochi e do Prof. Dr. Nilson Dias Vieira Jr., por permitir a utilização de suas dependências e equipamentos.

Ao Prof. Dr. Fausto Medeiros Mendes, sempre pronto a me ajudar, pela participação em diversos momentos do curso, pelos conselhos, críticas e discussões que auxiliaram na definição deste estudo.

Ao Prof. Dr. Anderson Zanardi de Freitas por ter aceitado a colaboração neste estudo e por toda a paciência durante os ensaios e a análise dos resultados de OCT.

À Dra. Patrícia Aparecida da Ana, pelas sugestões no exame de qualificação e por todo auxílio com a metodologia.

Ao Dr. Alessandro Deana, pela ajuda durante as análises estatísticas.

À Profa. Dra. Sonia L. Baldochi, pelos conselhos dados desde o início da pós-graduação e pelas contribuições no seminário de área.

Ao Marcos Raele, pelo auxílio durante a realização das medidas de OCT.

À Profa. Dra. Lília Coronato Courrol, pelas sugestões no seminário de área.

Ao Prof. Dr. Laercio Gomes e ao Prof. Dr. Luciano Bachmann, pelos ensinamentos e sugestões na análise de espectros.

Ao Prof. Dr. Jorge Sarkis, pelos ensaios preliminares de análise química das soluções.

Ao Laboratório de Espectroscopia Vibracional Biomédica da UNIVAP, especialmente ao Prof. Dr. Airton Abrahão Martin e Profa. Dra. Ana Maria do Espírito Santo, pelos ensaios de FT-Raman realizados no início deste projeto.

Ao Maurício, Elisa, Miho, Marcos e Alder pelos esclarecimentos, pelo apoio e pela colaboração na parte experimental.

Ao Prof. Dr. Norberto Nobuo Sugaya, por ter me aceitado como aluna e como estagiária e por todos os ensinamentos passados desde a graduação.

À Profa. Dra. Claudete Rodrigues Paula, por ter me recebido em seu laboratório e em seu curso.

À Shimadzu do Brasil, especialmente ao Rui, Edson e Tiago, por permitir a utilização do equipamento de microdureza e pelo auxílio técnico.

À Arotec, especialmente ao Uriel, por permitir a utilização de embutidora metalográfica e pelo auxílio técnico.

Ao Departamento de Materiais Dentários da FOUSP, por permitir a utilização do microdurômetro.

À Profa. Sônia R. H. Mello Castanho e à técnica Sandra Maria Cunha, do Centro de Ciência e Tecnologia de Materiais do IPEN, pelos primeiros ensaios de FTIR.

Aos amigos Adriana, Aécio, China pelo apoio em momentos difíceis, pelos conselhos e sugestões e pelos inesquecíveis momentos de descontração.

Ao amigo Eriques, por todo o apoio, sugestões e ensinamentos.

Ao Prof. Chrispim, pelos ensinamentos e pelas revisões de texto e apresentações em inglês.

Aos colegas de laboratório, Paulo, Fabíola, Jonas, Marco Ferrari, Renato, Tiago, Gustavo pelo agradável convívio, pelo apoio e carinho e por toda a ajuda com os equipamentos do laboratório.

Aos colegas do laboratório de Biofotônica Cacau, Carol, Carolzinha, Claudinha, Felipe, Juca, Moises, Quinto, Tiago e Vivi pelas idéias, pelo auxílio com experimentos (especialmente de FTIR) e pelas experiências e agradáveis momentos compartilhados.

Aos colegas e amigos do CLA, Agnaldo, Antônio, Cris, Daiane, Dani, Daniel, Marcelo, Priscila e Silvinha, pelo agradável convívio, discussões, prévias e seminários que me ensinaram muito.

Ao Nildemar, René, Celso (CCTM) e à Sarita (Marinha) pela realização de experimentos ao microscópio eletrônico de varredura.

À Andréa, Elza, Sueli e Tito, pela paciência e orientações dadas diversas vezes.

À Ilze, Vera, Aninha, Fernando, Magali, Renata e Gislene pela valiosa ajuda em todos os momentos do curso.

À Solange, Tort, Valdir, Paulinho e Marcos, pelo auxílio com equipamentos e confecção de peças.

Aos agentes Luis e Rubens, pelo bom humor e pela disposição em ajudar.

Às minhas amigas e aos meus amigos Paulinha, Erika, Lai, Lídia, Paula, Marcos, Hideo, Tony por me apoiarem mesmo estando tão ausente.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

À Fapesp e CAPES pelo apoio financeiro.

Aos todos os técnicos e funcionário do CLA.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram com pensamentos ou atos para a realização deste trabalho.

Muito Obrigada.

“Para crer, não basta ver; é preciso, sobretudo, compreender.”

Allan Kardec

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS PROMOVIDOS PELA RADIAÇÃO AZUL NA REMINERALIZAÇÃO DO ESMALTE DENTÁRIO IN VITRO

Ilka Tiemy Kato

RESUMO

Este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar os efeitos da luz azul na remineralização do esmalte. Adicionalmente foi desenvolvida uma metodologia de análise para a avaliação de alterações minerais do esmalte dental por meio da tomografia por coerência óptica. Lesões foram formadas em amostras de esmalte dental bovino por meio da imersão em solução tampão de acetato subsaturado (2 mL/mm² e 6,25 mL/mm²) por 32 h. As amostras foram irradiadas com um LED azul com emissão em 455±20 nm, potência de 110 mW, irradiância de 1,4 W/cm², tempo de irradiação de 10 s e exposição radiante de 13,8 J/cm². Posteriormente, as amostras foram submetidas à ciclagem de pH durante oito dias à 37 °C para induzir a remineralização. A avaliação do conteúdo mineral foi realizada por meio do teste de dureza seccional e por tomografia por coerência óptica (OCT). Na avaliação por dureza observou-se que as amostras do grupo irradiado apresentaram menor conteúdo mineral que as amostras do grupo não irradiado. A diferença entre os grupos foi mais evidente nas amostras submetidas à formação de lesão em maior volume de solução desmineralizadora. Por meio da técnica de OCT foram observadas diferenças significativas entre o sinal do esmalte hígido e desmineralizado. Após a remineralização, as amostras irradiadas apresentaram menor conteúdo mineral que as não irradiadas; porém, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos. Com base nos resultados deste estudo, pode-se concluir que a irradiação com luz azul ($\lambda=455\text{nm}$) promoveu a inibição da remineralização do esmalte dental. A metodologia empregada nas análises por OCT permitiu a avaliação quantitativa da perda mineral no esmalte; porém, este resultado não foi alcançado na avaliação da remineralização.

EFFECTS OF BLUE LIGHT IRRADIATION ON DENTAL ENAMEL REMINERALIZATION *IN VITRO*

Ilka Tiemy Kato

ABSTRACT

This study aimed to investigate the effects of blue radiation on dental enamel remineralization. In addition, a methodology of analysis was developed to evaluate alterations of enamel mineral content by optical coherence tomography. Artificial lesions were formed in bovine dental enamel slabs by immersing the samples in undersaturated acetate buffer (2 mL/mm² e 6.25 mL/mm²). The lesions were irradiated with blue LED ($\lambda=455\pm20\text{nm}$), with radiant power of 110 mW, irradiance of 1.4 W/cm², radiant exposure of 13.8 J/cm² and exposure time of 10 s. Remineralization was induced by pH-cycling model during 8 days. Cross-sectional hardness and optical coherence tomography (OCT) were used to assess mineral changes after remineralization. Hardness data showed that non-irradiated enamel lesions presented higher mineral content than irradiated ones and this difference was more evident in lesions formed in higher solution volume. The analysis of OCT signal also demonstrated that the mineral content of non-irradiated group was higher than in irradiated one; however, no significant difference was observed. Furthermore, significant differences in OCT sign were detected between sound and demineralized enamel. Based on the results obtained in the present study it can be concluded that blue radiation caused an inhibition of enamel remineralization. The methodology adopted for OCT analysis allowed the quantification of enamel mineral loss; however, the remineralization process could not be evaluated by this technique.

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO.....	20
2 OBJETIVOS.....	24
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	25
1.1 Esmalte dental.....	25
1.2 Desmineralização e remineralização do esmalte dental.....	27
1.3 O uso da luz azul da prevenção da formação da lesão de cárie em esmalte.....,.....	30
3.1 Tomografia por coerência óptica no esmalte dental.....	32
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	35
1.4 Aspectos éticos.....	35
4.1 Delineamento experimental.....	35
4.2 Preparação das amostras.....	35
4.3 Análise dos efeitos da luz azul na remineralização do esmalte dental.....	37
4.3.1 Avaliação por dureza seccional.....	40
4.3.2 Avaliação por tomografia por coerência óptica.....	44
4.4 Análise estatística.....	50
5 RESULTADOS.....	51
1.5 Análise dos efeitos da luz azul na remineralização do esmalte dental.....	51
5.1.1 Avaliação por dureza seccional.....	51
5.1.1.1 Ensaio 1.....	51
5.1.1.2 Ensaio 2.....	55
5.1.2 Avaliação por tomografia por coerência óptica.....	61
6 DISCUSSÃO.....	67
7 CONCLUSÕES.....	78
ANEXO A - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO IPEN/CNEN-SP.....	79
APÊNDICE A – DADOS DA ANÁLISE DE DUREZA DO ENSAIO 1.....	80

APÊNDICE B - PERFIL DE DUREZA DAS AMOSTRAS DE CADA GRUPO DO ENSAIO 2....	81
APÊNDICE C - DADOS DA ANÁLISE DE DUREZA DO ENSAIO 2.....	83
APÊNDICE D - SINAL DE OCT EM FUNÇÃO DA PROFUNDIDADE NOS TRÊS MOMENTOS DE ANÁLISE.....	84
APÊNDICE E – VALORES DE COEFICIENTE DE ATENUAÇÃO CALCULADOS COM BASE NOS DADOS DE OCT.....	85
APÊNDICE F - MEDIDAS DA CONCENTRAÇÃO DE CÁLCIO NAS SOLUÇÕES.....	86
APÊNDICE G - ANÁLISES COMPOSICIONAIS POR FTIR.....	88
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	94

LISTA DE FIGURAS

Página

FIGURA 1 - Amostras isoladas com verniz resistente a ácidos e cera 7 com exposição da área padronizada de 4x2 mm ² . A – bloco de 4x2 mm ² . B – bloco de aproximadamente 5x5 mm ²	37
FIGURA 2 - Posicionamento da amostra em relação ao LED durante a irradiação.	39
FIGURA 3 - Diagrama da ciclagem de pH utilizada neste estudo.	40
FIGURA 4 - (A) Fotografia do microdurômetro utilizado nos testes de dureza. (B) Imagem do programa utilizado para o cálculo do valor de dureza. Nesta figura são mostradas duas barras (em vermelho) utilizadas para determinar o comprimento do eixo horizontal da indentação.	41
FIGURA 5 - Ilustração da disposição das indentações realizada nas amostras de esmalte no teste de dureza seccional.	42
FIGURA 6 - Gráfico representativo da área entre o traçado do perfil de dureza e a projeção do valor de dureza do esmalte sadio (ΔS).	43
FIGURA 7 - Ilustração das amostras de esmalte fixadas na placa de acrílico.....	44
FIGURA 8 – Fotografia do arranjo montado para as medidas por OCT.....	45
FIGURA 9 - Sistema utilizado para controlar a movimentação do deslocador de passo, composto por um controlador de movimento e um computador.....	46
FIGURA 10 - Fotografia da radiação infravermelha proveniente do sistema de OCT incidindo sobre uma amostra.	46
FIGURA 11 - Ilustração do posicionamento dos eixos de varredura na amostra em relação à direção de incidência do feixe de luz.	47
FIGURA 12 - Sinal de OCT obtidos de uma amostra de esmalte bovino hígido. Apenas a região cinza escura representa o sinal proveniente do esmalte.	47
FIGURA 13 - Software desenvolvido para a análise das imagens de OCT. Na imagem da amostra, em azul, é mostrada a região de análise delimitada por dois traços verticais. No gráfico localizado abaixo da imagem são apresentados os valores médios dos sinais de OCT em função da profundidade (em branco) e a curva que representa o ajuste da função	

de decaimento exponencial (em vermelho). No lado direito localizam-se os parâmetros que podem ser alterados na análise.....	48
FIGURA 14 - Imagem de uma amostra com as indentações realizadas no teste de dureza com ponta knoop.....	51
FIGURA 15 - Gráficos dos perfis de dureza para as amostra de cada grupo. Os dados correspondem aos valores de KHN em função da profundidade analisada.	52
FIGURA 16 - Relação entre o valor de dureza (KHN) em função da profundidade de cada amostra do grupo RE e seu par do grupo LED+RE (ensaio 1). Os dados representam as médias e as barras, os respectivos valores de erro padrão. O símbolo (*) indica que o dado marcado é diferente do valor um ($p<0,05$), segundo a análise realizada por meio do t-test.	53
FIGURA 17 – Intervalo de confiança (95%) dos valores de área entre o traçado do perfil de dureza e a projeção do valor de dureza do esmalte sadio (ΔS) dos grupos avaliados no ensaio 1.....	54
FIGURA 18 - Relação entre o valor da área entre o traçado do perfil de dureza e a projeção do valor de dureza do esmalte sadio (ΔS) das amostras do grupo RE em função de seu par do grupo LED+RE (ensaio 1).....	55
FIGURA 19 - Perfil médio de dureza das amostras de cada grupo avaliado no ensaio 2. Os dados correspondem às médias de dureza (KHN) em função da profundidade de análise e as barras são os valores de erro-padrão.....	56
FIGURA 20 - Relação entre o valor de dureza (KHN) do grupo RE e do grupo LED+RE em uma determinada profundidade. Os dados representam as médias e as barras, os valores de erro padrão. O símbolo (*) denota que o dado indicado é diferente do valor um ($p<0,05$), segundo análise realizada com o t-test.....	58
FIGURA 21 - Comparação dos valores de área entre o traçado do perfil de dureza e a projeção do valor de dureza do esmalte sadio (ΔS) dos grupos avaliados no estudo. Cada coluna representa a média da área de um grupo e as barras representam seus respectivos erros padrão. Valor de p foi calculado com o teste Bonferroni.	59
FIGURA 22 - Comparação dos percentuais de mudança de dureza em função da profundidade (% KHN) dos grupos submetidos à ciclagem de pH. Os dados correspondem ao valor médio e as barras representam seus respectivos erros-padrão. O símbolo (*)	

denota que o dado do grupo RE é diferente do dado do grupo LED+RE ($p < 0,05$), segundo análise realizada com o t-test.	60
FIGURA 23 - Intervalo de confiança (95%) dos valores de percentual de mudança de dureza (% ΔS) dos grupos submetidos à ciclagem de pH.	60
FIGURA 24 - Imagens de OCT nos três momentos de análise (de cima para baixo, esmalte hígido, desmineralizado e remineralizado) para uma amostra de cada grupo.	62
FIGURA 25 - Perfis do sinal de OCT em função da profundidade obtidos em uma amostra hígida, após a desmineralização e após a remineralização. Linhas pontilhadas correspondem ao ajuste de função do tipo decaimento exponencial.	63
FIGURA 26 - Coeficiente de atenuação dos grupos RE e LED+RE nos momentos inicial (hígido), após a desmineralização (desmineralizado) e após a remineralização (remineralizado). As colunas correspondem às médias e as barras representam os valores de erro-padrão.	64
FIGURA 27 - Percentual de mudança do sinal de OCT após a desmineralização (% $SINAL_{desmineralização}$), em função da profundidade avaliada. Os dados correspondem ao valor médio e as barras representam seus respectivos erros-padrão.	65
FIGURA 28 - Percentual de mudança do sinal de OCT após a remineralização (% $SINAL_{remineralização}$) em função da profundidade. Os dados correspondem ao valor médio e as barras representam seus respectivos erros-padrão.	66

LISTA DE TABELAS

Página

TABELA 1 - Valores médios de dureza (KHN) dos grupos DE, RE e LED+RE em função da profundidade analisada e seus respectivos desvio-padrão (DP) e erro-padrão (EP). Entre 40 µm e 90 µm o valor médio de KHN de cada grupo é seguido de letras. Em mesma profundidade (linhas da tabela), letras distintas evidenciam médias significativamente diferentes, segundo a análise feita com o teste Bonferroni ($p < 0,05$)......	57
--	----

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

ATR - *Attenuated Total Reflectance* (Reflexão Total Atenuada)

Ca - cálcio

cm² - centímetro quadrado

cm⁻¹ - centímetro recíproco

CO₂ - dióxido de carbono

CO₃ - carbonato

DP - desvio-padrão

EP - erro-padrão

FTIR - *Fourier Transform Infrared Spectroscopy* (Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier)

F - flúor

g - grama

HPO₄ - ortofosfato

HCl - ácido clorídrico

h - hora

HNO₃ - ácido nítrico

J - joule

Kgf - quilograma força

L - litro

La₂O₃ - óxido de lantânio

LED - *Light Emmiting Diode* (Diodo Emissor de Luz)

m - metro

Mg - magnésio

min - minuto

mL - mililitro

mm - milímetro

mM - milimolar

mmol - milimol

mW - miliwatt

Na - sódio

NaF - Fluoreto de sódio

nm - nanometro

OCT - *Optical Coherence Tomography* (Tomografia por Coerência Óptica)

OH - hidroxila

p (ou p-valor) - probabilidade de significância ou nível descritivo

vol - volume

P - fósforo

pH - potencial hidrogeniônico

PO₄ - fosfato

r - coeficiente de correlação

R² - coeficiente de determinação

rpm - rotações por minuto

s - segundo

vol - volume

W - watt

µg - micrograma

µm - micrometro

°C - graus Celsius

% - percentual

λ - comprimento de onda

1 INTRODUÇÃO

Grandes avanços no campo odontológico foram alcançados nas últimas décadas graças à união de diversas áreas profissionais na busca pelo conhecimento das doenças da cavidade oral e no desenvolvimento de terapêuticas. A introdução de novas técnicas de análise, assim como o aprimoramento das existentes possibilitou a investigação destes assuntos sob diferentes aspectos e impulsionou o desenvolvimento destas áreas de pesquisa. Além da constante busca por novas modalidades terapêuticas, esta multidisciplinaridade também estimula o aprofundamento do conhecimento sobre as terapias já existentes. Em meio às doenças que acometem as estruturas dentais, muitos esforços foram e continuam a ser direcionados para a prevenção e a reparação de danos ocasionados pelos processos patológicos de perda mineral nos dentes.

Dentre as estruturas dentais, o esmalte constitui a porção mais superficial da coroa dentária e é o tecido mais mineralizado do corpo humano. Em sua maior parte é formado por cristais de apatita e o restante é composto por água e por matriz orgânica¹. De forma semelhante às outras apatitas biológicas, a apatita do esmalte não é considerada uma hidroxiapatita pura em virtude da inclusão de impurezas^{2, 3, 4, 5}. Estas alterações acarretam em mudanças na cristalinidade e nas dimensões dos cristais e tem importante efeito na solubilidade do esmalte^{2, 4}.

Morfologicamente o esmalte dental é caracterizado por prismas formados pelo agrupamento de cristais de apatita. Transversalmente estes prismas apresentam a forma de arco, comumente denominado “buraco de fechadura”⁶ e estão dispostos desde a região mais interna do esmalte até a região próxima à superfície do dente⁴. Entre os cristais e os prismas existem espaços, denominados espaços intercristalinos e interprismáticos, respectivamente¹. Estas regiões, que são preenchidas por água e material orgânico⁷, constituem a principal via de difusão neste tecido⁸.

Apesar de ser um tecido acelular, o esmalte dental não se comporta como um material inerte no ambiente bucal, e ao contrário, mantém constantes trocas minerais com os fluidos circundantes (saliva, fluido do biofilme e porção líquida situada ao redor

dos cristais). Sobre a sua superfície encontra-se aderido um biofilme microbiano responsável por flutuações no pH, que resultam no ganho ou perda de minerais⁹.

Em situações onde o pH está próximo ao neutro, os fluidos apresentam-se supersaturados em relação à concentração de cálcio e fosfato, que são os principais elementos presentes na apatita dental. Esta situação favorece a precipitação mineral no esmalte (remineralização)¹⁰. Contudo, após a ingestão de alimentos, carboidratos fermentáveis presentes no ambiente oral são metabolizados pelos microorganismos do biofilme e, como resultado, ocorre a produção de ácidos orgânicos e consequente queda do pH¹¹. Sob certas condições de concentração ácida, o pH cai abaixo de 5,5 (nível crítico para a apatita dental), os fluidos circundantes tornam-se subsaturados provocando um desequilíbrio entre o meio e a apatita dental. Desta forma, o esmalte sofre dissolução e perda de parte da estrutura mineral (desmineralização)¹⁰.

A permanência do pH nos valores críticos pode durar de 20 minutos a algumas horas dependendo das características do indivíduo e do tipo de alimento consumido¹². Após este período, o pH retorna ao normal, sobretudo pela ação tampão de bicarbonato/carbonato presentes na saliva¹³. Quando os fluidos são neutralizados, a supersaturação do meio é restabelecida favorecendo o retorno de minerais para o tecido parcialmente desmineralizado⁵.

A ocorrência dos episódios de desmineralização e remineralização necessariamente não ocasiona a formação de uma lesão na estrutura dental. Desta forma, são necessários diversos episódios de perda do equilíbrio entre os minerais do dente e o fluido circundante que resultem em perda mineral maior que a precipitação⁹. Com o decorrer do tempo observa-se a destruição da estrutura dental, cuja manifestação clínica inicial é caracterizada por uma opacidade localizada conhecida como mancha branca¹⁴.

Quando diagnosticada antes da formação de uma cavidade, a lesão de cárie pode ser revertida sem a necessidade de um tratamento restaurador^{9, 15}. A evolução da perda mineral, a paralisação deste processo ou a remineralização da estrutura afetada depende do balanço entre os fatores protetores e causadores da doença¹⁶. Desta forma, o prognóstico do tratamento de uma lesão formada não depende somente do

diagnóstico precoce, mas também da adoção de medidas preventivas que possibilitem a manutenção do equilíbrio fisiológico entre os minerais do dente e os fluidos orais⁹.

Embora as proteínas presentes no esmalte em formação sejam conhecidas¹⁷, a composição da porção orgânica do esmalte maturado ainda é um assunto controverso na literatura^{6, 18, 19}. Acredita-se que estes componentes sejam moléculas remanescentes da matriz extracelular que permaneceram ligadas aos cristais de apatita¹⁹; porém, a sua composição não é totalmente conhecida. Contudo sabe-se que a interação entre os componentes orgânicos e os inorgânicos do esmalte afeta a precipitação e a dissolução de minerais. No processo de formação das lesões de cárie, a remoção desta matriz promove o aumento da desmineralização do esmalte dental^{8, 20, 21}. Entretanto, a fixação de proteínas e a denaturação da matriz orgânica diminui a perda mineral^{20, 22}. Em lesões de cárie é sugerido que a exposição de proteínas no esmalte, após a dissolução de parte da porção mineral, inibe o crescimento dos cristais e, portanto, a remineralização^{12, 23}. Esta inibição poderia ser explicada pela ligação entre componentes inorgânicos e orgânicos do esmalte, resultando na diminuição de deposição mineral nos cristais de hidroxiapatita²⁴. Por outro lado, a remoção desta porção orgânica favorece a remineralização²⁵.

Dentre as terapias utilizadas para prevenir a desmineralização do esmalte, a radiação tem sido amplamente estudada e uma grande variedade de comprimentos de onda, do visível ao infravermelho, foi avaliada para esta aplicação^{26, 27}. Na região azul do espectro eletromagnético destacam-se os estudos que demonstraram o potencial preventivo desta radiação utilizando o laser de argônio ($\lambda=488$ nm e 514 nm)^{28, 29, 30}. Neste contexto, também foi relatado que a associação desta radiação ao flúor concentrado pode alterar a interação entre este agente tópico e a estrutura dental³¹, aumentar a sua retenção no esmalte³², além de aumentar os efeitos preventivos da radiação^{30, 33}.

A luz azul, especialmente a proveniente de diodos emissores de luz (LED), é uma radiação amplamente utilizada na odontologia para polimerização de materiais resinosos³⁴, durante o clareamento dental³⁵ e, mais recentemente, como ferramenta para diagnóstico^{36, 37}. Em razão destas aplicações, muitos trabalhos direcionados ao

estudo das características dos materiais em que esta luz é aplicada foram desenvolvidos, assim como trabalhos que investigaram se os equipamentos provocam danos térmicos aos tecidos dentais ³⁸. Como consequência, na literatura são reportados diversos parâmetros adequados e seguros de irradiação, de acordo com cada aplicação. Entretanto, os estudos que investigaram as consequências da aplicação desta radiação no esmalte dental restringiram-se em avaliar os efeitos na desmineralização ^{28, 30} e na retenção de flúor ³², e poucos utilizaram o LED como fonte de radiação ²⁹.

Apesar de, na maior parte dos procedimentos, a aplicação da luz ser destinada à irradiação de um material, os tecidos dentais são frequentemente irradiados. Neste contexto é importante ressaltar que o esmalte parcialmente desmineralizado pode ser irradiado durante um procedimento odontológico e o comportamento desta estrutura frente à remineralização pode ser alterado. Entretanto, não foram encontrados relatos de avaliação da remineralização do esmalte desmineralizado e irradiado com luz azul. Além disso, a hipótese de que esta radiação interage com componentes orgânicos do esmalte ³⁹ e as evidências de que os processos de desmineralização e remineralização são influenciados por estes compostos ^{8, 40} motivam a realização de estudos nesta área.

2 OBJETIVOS

Com base nas informações apresentadas anteriormente, este estudo teve como objetivo geral investigar os efeitos da irradiação com luz azul na remineralização do esmalte dental. Para alcançar o objetivo proposto, este estudo teve como metas:

1. Avaliar alterações na dureza e no sinal de OCT do esmalte dental irradiado e submetido à remineralização,
2. Desenvolver uma metodologia de análise por meio da tomografia por coerência óptica para a avaliação de alterações minerais do esmalte dental.

3 REVISÃO DE LITERATURA

Para facilitar o entendimento do tema proposto, este capítulo foi dividido nos seguintes tópicos:

- Esmalte dental
- Desmineralização e remineralização do esmalte
- O uso da luz azul na prevenção da formação da lesão de cárie em esmalte
- Tomografia por coerência óptica no esmalte dental

1.1 Esmalte dental

O esmalte dental, estrutura que recobre a coroa do órgão dental, é um tecido acelular altamente mineralizado derivado do ectoderma ¹⁷. Durante sua formação, ou amelogênese, os ameloblastos secretam uma matriz extracelular ⁴¹ rica em material orgânico (proteínas e lipídeos) ^{42, 43}. No processo de maturação, esta matriz extracelular é degradada e, em sua maioria, substituída por minerais na forma de cristais ⁷. Após este estágio do desenvolvimento, o esmalte passa a ser composto em volume por 87% de cristais de apatita, 11,5% por água e 1,5% por matriz orgânica e sua espessura varia aproximadamente de 0,1 mm na porção cervical até 2 mm na região oclusal ¹. Embora presuma-se que os componentes orgânicos do esmalte maturado sejam moléculas remanescentes da matriz extracelular ¹⁹, a sua composição não é totalmente conhecida, e na literatura esse assunto ainda é controverso ^{6, 18, 19}. Em virtude da deficiência técnica em se extrair os componentes orgânicos de um tecido altamente mineralizado, os achados normalmente correspondem a fragmentos protéicos (aminoácidos ou peptídeos) ¹⁸ e um percentual do conteúdo lipídico ⁴⁴. Apesar destas dificuldades, investigações bioquímicas mostraram que esta matriz apresenta cerca de 60% de conteúdo protéico, em sua maioria composta por proteínas insolúveis ⁶, e 40% de compostos lipídicos, principalmente triglicérides e colesterol ⁴⁴. Dentre os aminoácidos ou peptídeos

encontrados, alguns possuem carboidratos (glicoproteínas)^{18, 45}, lipídeos (lipoproteínas)^{44, 45} e grupamentos fosfato (fosfoproteínas)^{18, 46}.

Os cristais de apatita encontrados no esmalte não são hidroxiapatitas estequiométricas $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ em razão da presença de impurezas como carbonato, sódio, flúor, magnésio, cloro, potássio, cobre, ferro, manganês, enxofre e chumbo entre outros íons⁴⁷. Considerando-se as alterações mais frequentes neste material, uma definição mais adequada para a apatita do esmalte seria $(\text{Ca})_{4,56}(\text{Mg})_{0,03}(\text{Na})_{0,11}(\text{HPO}_4)_{0,10}(\text{CO}_3)_{0,23}(\text{PO}_4)_{2,66}(\text{OH},\text{F})_{0,65}$ ⁵.

Dentre os componentes da hidroxiapatita estequiométrica, os cristais da apatita do esmalte possuem, em peso, aproximadamente 37% de cálcio, 52% de fosfato e 3% de hidroxila⁴⁸. A maior parte das substituições na apatita do esmalte ocorre nos íons hidroxila (OH^-), seguido pelo cálcio e pelo fosfato⁴. Cerca de 30% dos ânions hidroxila são substituídos por outros íons como carbonato, flúor ou cloro⁴⁹. A incorporação de carbonato, que ocorre durante a formação do esmalte, confere um aumento na solubilidade desta apatita², além de alterar a cristalinidade, tamanho e forma dos cristais. O esmalte maturado apresenta uma quantidade substancial deste íon (2% a 6% em peso) e, por este motivo, estas apatitas biológicas são comumente descritas como apatita carbonatada⁵⁰. Em média 10% a 15% do carbonato presente no esmalte são provenientes da substituição da hidroxila e o restante é decorrente da substituição do fosfato³. Ambas as formas de incorporação do carbonato originam outras substituições para o balanceamento das cargas, como por exemplo, do cálcio pelo sódio⁴.

A incorporação de íons flúor na apatita do esmalte ocorre durante a fase de formação, bem como após a erupção dental⁵¹. Esta inclusão é decorrente da substituição parcial dos íons hidroxila⁵¹, originando a apatita fluoretada¹². Ao contrário da inclusão de carbonato, a incorporação de flúor aumenta o tamanho e a espessura dos cristais, além de diminuir a deficiência de cálcio e a solubilidade do esmalte⁵².

Os cristais da apatita biológica, unidades estruturais básicas da porção mineral do esmalte, possuem a forma de bastões com simetria hexagonal em corte transversal¹ e dimensões de 50 nm de largura e de 25 nm a 1mm de comprimento. O conjunto destes nanobastões, conhecido como prisma, contém aproximadamente 1000 cristais e

compõem a estrutura da maior parte do esmalte dental. Transversalmente estes prismas apresentam a forma de arco, comumente denominado “buraco de fechadura”, com a cabeça direcionada para oclusal ou incisal e a cauda orientada para a junção esmalte-cimento⁶. Estas estruturas possuem diâmetro de 4-5 μm e estão dispostas desde a região mais interna do esmalte até a região próxima à superfície do dente⁴. Os espaços interprismáticos, com dimensões de 0,1 μm , e os espaços intraprismáticos ou intercristalinos, com 1-2 nm¹, são preenchidos por água e material orgânico⁷ e constituem a principal via de difusão do esmalte dental⁸.

A porção mais externa do esmalte dental, conhecida como camada aprismática, difere morfológicamente das regiões mais internas por não apresentar os cristais de apatita agrupados em prismas⁵³. Nesta região os cristais encontram-se uniformemente arranjados, paralelos entre si e orientados perpendicularmente à superfície do esmalte⁵⁴. A espessura desta camada varia de aproximadamente 4 a 8 μm no esmalte permanente, sendo a região cervical a área mais espessa⁵⁵.

1.2 Desmineralização e remineralização do esmalte dental

A desmineralização e a remineralização do esmalte dental são dois processos distintos que ocasionam a troca de minerais da estrutura dental com o meio circundante quando há alterações no pH. Sob certas condições de concentração ácida e valor de pH ocorre a dissolução de porções dos cristais e a perda mineral do esmalte dental (desmineralização). Por outro lado, quando o pH está acima do valor crítico para a dissolução do esmalte, os minerais tendem a ser depositados na estrutura dental (remineralização)¹.

Dentre as formas de desmineralização do esmalte dental, uma das mais comuns é ocasionada por alterações na composição do biofilme aderido sobre o esmalte, com conseqüente variação no pH, que geram ciclos de perda e ganho mineral e podem levar à formação da lesão de cárie⁵. Na presença de carboidratos fermentáveis pelos microrganismos do biofilme, monossacarídeos (glicose, frutose, galactose) e dissacarídeos (sacarose, maltose e lactose), ocorre a produção de ácidos orgânicos e queda do pH¹¹. Em geral estes produtos do metabolismo bacteriano são compostos por ácido láctico,

acético e propiônico^{15, 56}. Estes ácidos se difundem pelo fluido do biofilme e para o interior das porosidades do esmalte e, à medida que percorrem estas vias de difusão, ocorre a sua dissociação e produção de íons hidrogênio. Estes íons dissolvem parcialmente a porção mineral, provocando a liberação de minerais para a porção aquosa do esmalte que, posteriormente, se difundem para fora da estrutura dental⁵⁷. Durante os estágios iniciais de perda mineral ocorre a dissolução preferencial de apatitas contendo carbonato e magnésio^{58, 59}. Morfologicamente a desmineralização do esmalte dental que acarreta a formação da lesão de cárie pode ocorrer pela dissolução mineral na periferia ou no centro dos cristais⁶⁰.

O aumento da concentração de ácidos nos fluidos orais promove a queda do pH para valores considerados críticos para a dissolução do esmalte (em torno de 5,5). Nesta situação, os fluidos circundantes apresentam-se com a mesma saturação, em relação à apatita dental, que o esmalte⁶¹. Na medida em que a concentração ácida se torna suficiente para causar a queda de pH para valores abaixo do nível crítico, instala-se o processo de desmineralização. Durante este processo, os fluidos apresentam-se subsaturados em relação aos elementos da apatita dental⁶². À medida que ocorre a dissolução dos cristais, os minerais que são liberados nos fluidos circundantes passam a contribuir para a diminuição deste processo aumentando o grau de saturação dos fluidos⁶³. Concomitantemente, a ação tampão de bicarbonato/carbonato, fosfato e proteínas presentes na saliva neutralizam os ácidos produzidos pelos microorganismos, elevando o pH a valores próximos ao neutro^{13, 64}. Cada um destes sistemas possui uma capacidade tampão diferente em função do pH e a concentração destas substâncias varia conforme a taxa de produção de saliva⁶⁵. Entre os três, o bicarbonato é considerado o principal sistema tampão atuante durante as alterações de pH provocadas pela ingestão de alimentos⁶⁴.

Após a neutralização dos ácidos resultantes do metabolismo de degradação de carboidratos pelos microorganismos, o pH nos fluidos do ambiente circundante ao dente aumenta e estes líquidos tornam-se supersaturados em relação à apatita dental⁴⁸. Neste contexto, ocorre a difusão de cálcio e fosfato, que são fornecidos pela saliva e fluido do biofilme, para estrutura dental¹. Algumas proteínas salivares também são

responsáveis pela capacidade de remineralização nos fluidos que circundam o dente uma vez que auxiliam na manutenção da supersaturação de minerais, em especial o cálcio, nestes fluidos^{13, 64}.

Morfológicamente a deposição mineral destinada ao reparo de áreas que foram desmineralizadas durante a formação da lesão de cárie pode ocorrer pela restauração dos cristais parcialmente dissolvidos, formação de novos cristais ou crescimento daqueles que não foram afetados pelo processo de dissolução. Comumente a remineralização é uma mistura destes processos que podem ser observados em todas as áreas de uma lesão de cárie⁶⁰.

Em síntese, a formação da lesão de cárie no esmalte é uma seqüela da perda do equilíbrio entre os minerais do dente e o fluido circundante, como consequência de inúmeros episódios de desmineralização e remineralização, que resultam em perda de minerais da estrutura dental⁹. A primeira manifestação clínica desta lesão é caracterizada por uma opacidade localizada conhecida como mancha branca¹⁴. Com a progressão predominante da desmineralização observa-se a destruição da estrutura dental, que pode culminar em um quadro irreversível de formação de uma cavidade⁵. Por outro lado a remineralização é um processo natural de reparação das estruturas dentais não cavitadas acometidas pela dissolução mineral^{1, 19} que depende da manutenção do pH em condições que favoreçam a supersaturação mineral do meio^{5, 10}. Desta forma, fica evidente que o estabelecimento deste processo e o controle dos episódios de desmineralização estão intimamente relacionados^{1, 66, 67} e, por este motivo, as estratégias direcionadas ao controle da desmineralização comumente apresentam resultados favoráveis à remineralização^{5, 15, 68}.

Um aspecto importante dos processos de des-remineralização é que a dissolução dos cristais de apatita do esmalte é um processo mais rápido que a precipitação mineral nos defeitos formados⁶⁹; fato que pode estar relacionado aos relatos que lesões de cárie naturais apresentam certa resistência à remineralização¹⁹. Este aspecto sugere que a total remineralização de uma lesão pode ser difícil de ser alcançada^{70, 71}. Entretanto, o sucesso no tratamento de lesões não cavitadas pode ser alcançado pela paralisação na progressão da lesão, originando as lesões de cárie

paralisadas^{9, 71}. Na literatura é relatado que estas lesões apresentam maior resistência à desmineralização subsequente⁷². Este comportamento poderia ser explicado pelas mudanças químicas causadas pelos processos de desmineralização e remineralização. O carbonato perdido durante a desmineralização não é repostado na remineralização e, em virtude da presença de F⁻ no ambiente oral, a porção mineral depositada tende a apresentar maior concentração deste elemento^{73, 74}. Desta forma, o mineral depositado durante a remineralização de uma lesão é quimicamente menos solúvel^{5, 74}.

1.3 O uso da luz azul da prevenção da formação da lesão de cárie em esmalte

Considerando-se os processos de desmineralização e remineralização, estudos utilizaram a luz azul com o objetivo de alterar o processo de formação da lesão cáriosa e a retenção de flúor. Na grande maioria das pesquisas foi utilizado o laser de argônio como fonte de luz que, em geral, possui o comprimento de onda de emissão entre 457,9 nm a 514,5 nm. Várias condições de irradiação foram descritas, bem como diferentes resultados foram alcançados.

O primeiro estudo com enfoque em cariologia foi realizado em 1977 por Goodman e Kaufman. Após a exposição ao laser com comprimento de onda de 514,5 nm, potência de 4 W, no modo contínuo, foi observado que amostras de pó de esmalte misturadas ao fluoreto de sódio (NaF) apresentaram um aumento no tamanho dos cristais e na incorporação de flúor. Os autores também relataram que amostras de esmalte dental tratadas com a associação deste laser e o agente de flúor apresentaram diminuição da perda de cálcio e fósforo³¹.

A partir deste relato, outros estudos passaram a ser desenvolvidos nesta linha de pesquisa. A maior parte das investigações foi realizada *in vitro*, porém também há relatos de pesquisas *in vivo*.

Basicamente os estudos desenvolvidos com o laser de argônio podem ser agrupados em duas categorias, segundo as condições de irradiação: pesquisas com potência e exposição radiante mais alta e pesquisas com parâmetros mais baixos. Na primeira condição, foi relatado que a irradiação de amostras de esmalte com potência de 2 W, exposição radiante de 100 J/cm², tempo de irradiação de 10 s e irradiância de 10

W/cm² promoveu 34% de diminuição na profundidade das lesões ⁷⁵. Entretanto, parâmetros semelhantes (2 W, 10 s, 100 J/cm² e diâmetro de feixe de 3 mm) foram utilizados em outro estudo e não foi observada diferença entre as amostras irradiadas e não irradiadas ⁷⁶. Por outro lado, foram relatados resultados de inibição da desmineralização entre 31% a 44% em amostras irradiadas com potência entre 231 mW e 270 mW, exposição radiante entre 11,5 J/cm² e 13,5 J/cm², tempo de irradiação de 10 s e irradiância entre 1,2 W/cm² e 1,35 W/cm² ^{28, 77}.

Baseado nestas pesquisas realizadas *in vitro*, estudos em humanos foram conduzidos para avaliar a formação de lesões de cárie em elementos dentais com indicação para extração. Bandas ortodônticas foram fixadas nos dentes para promover o acúmulo de biofilme e induzir a desmineralização. Em todos os estudos os dentes irradiados apresentaram lesões menos profundas que os não irradiados; contudo, com os parâmetros 325 mW, 100 J/cm² e 60 s ⁷⁸ foram alcançados resultados superiores aos obtidos com 250 mW, 12 J/cm² e 10 s ^{30, 79}.

O comprimento de onda emitido pelos equipamentos utilizados nestes estudos varia da região do azul ($\lambda = 488$ nm) e do azul e verde ($\lambda = 488$ nm e 514,5 nm); porém, existem evidências de que os efeitos são causados, sobretudo, pela emissão no azul ^{28, 78}.

Além do laser de argônio, a luz azul proveniente de diodos emissores de luz também foi pesquisada quanto à prevenção à desmineralização. Westerman *et al.* compararam os efeitos promovidos por ambas as fontes de luz azul no esmalte dental. As condições de irradiação utilizadas com o laser (231 mW, 11,5 J/cm², 10 s e 1,2 W/cm²) foram diferentes das usadas com o led (460 mW/cm², 20 s) e apenas o esmalte irradiado com o laser apresentou uma diminuição significativa na profundidade das lesões formadas ²⁹.

Apesar dos comprimentos de onda utilizados nos estudos descritos anteriormente apresentarem baixa absorção e alto espalhamento no esmalte dental ⁸⁰, alterações na superfície do esmalte caracterizadas pela presença de glóbulos com dimensões de 0,5 a 2 μ m e porosidades com diâmetro inferior a 1 μ m foram descritas após a irradiação com 231 mW, 10 s e 11,5 J/cm² e com 2 W, 10 s e 100 J/cm². Ainda que

mudanças morfológicas tenham sido induzidas por ambas as condições, as alterações foram observadas mais frequentemente na segunda condição³⁹.

3.1 Tomografia por coerência óptica no esmalte dental

Concomitantemente à busca por novas terapias para as doenças que afetam as estruturas dentais, muitos esforços foram dedicados ao aprimoramento e desenvolvimento de novas técnicas para identificação de alterações minerais destes tecidos. Atualmente pode-se observar um crescente interesse por métodos não destrutivos, baseados nas propriedades ópticas das estruturas dentais e capazes de não apenas detectar, mas também quantificar estas alterações. Entre estes métodos ópticos pode-se citar a tomografia por coerência óptica.

A OCT é uma técnica de diagnóstico por imagem que utiliza a coerência temporal da luz na produção de imagens em seção transversal com alta resolução espacial⁸¹. Este método apresenta a vantagem de permitir a análise não invasiva de microestruturas internas de tecidos tanto *in vitro*^{82, 83} como *in vivo*⁸⁴, produzindo imagens em tempo real. A profundidade de análise depende da interação entre a luz e o tecido analisado. Em geral utiliza-se comprimentos de onda na região do infravermelho próximo e, desta forma, a região avaliada pode variar de 2 cm em tecidos transparentes⁸⁵ a poucos milímetros em tecidos altamente espalhadores, como as estruturas dentais⁸³.

No sistema de OCT, a luz proveniente da fonte óptica é dividida em dois feixes: um é conduzido até o espelho de referência e o outro, até a amostra. A combinação da radiação retro-refletida oriunda do braço de referência com a radiação retro-espalhada pelo objeto em estudo forma padrões de interferência no detector e geram os sinais de OCT⁸². Os sinais provenientes de diferentes profundidades na amostra são gerados pela movimentação do espelho de referência no sentido longitudinal. Com base na posição onde se observa a interferência e no comprimento do braço de referência, determina-se o caminho óptico do braço da amostra. Desta forma, a luz detectada contém informações sobre a localização espacial das estruturas dentro do material analisado⁸². Para se determinar a real profundidade do tecido analisado é

necessário dividir o valor de profundidade óptica medido pelo índice de refração da estrutura⁸³.

Nos primeiros relatos do uso do método de OCT na odontologia, em 1998, foi demonstrado que esta técnica permitia a diferenciação entre as estruturas dentais e entre estas e o tecido mole adjacente. Por meio de medidas realizadas na região amelo-cementária (no final da coroa dentária) observou-se a identificação das interfaces entre a gengiva e o dente e entre o esmalte e a dentina⁸³. Desde então, diversos estudos foram realizados para viabilizar a aplicação deste método no diagnóstico de alterações minerais dos tecidos dentais^{86, 87, 88}.

As propriedades ópticas do esmalte dental são notoriamente modificadas pelas alterações decorrentes da formação da lesão de cárie^{89, 90}. Em razão do sinal de OCT depender do retro-espalhamento da radiação incidente na amostra, é esperado que mudanças no conteúdo mineral do esmalte sejam detectadas por este método. Foi demonstrado que após a desmineralização, a estrutura dental apresenta um aumento do retro-espalhamento da luz e, portanto, um aumento da intensidade do sinal detectado⁸⁷. Por outro lado, após a remineralização houve redução do retro-espalhamento e do sinal obtido⁸⁸.

Os dados obtidos pelo sistema de OCT permitem tanto a análise qualitativa como quantitativa das alterações da estrutura dental. Em imagens produzidas no esmalte com perda mineral notou-se o aumento da intensidade do sinal nas áreas desmineralizadas por meio do contraste entre as cores do tecido sadio e alterado⁸⁴. Apesar de ser possível identificar alterações na estrutura dental pela visualização das imagens, esta análise não permite a quantificação das mudanças observadas.

Uma das formas de análise quantitativa descrita na literatura é a obtenção do valor integrado do sinal de OCT na área de interesse. Os dados de intensidade do sinal são plotados em função da profundidade analisada e, neste perfil, é calculada a área abaixo da curva. Esta metodologia foi descrita na avaliação de mudanças minerais ocasionadas tanto pelo processo de desmineralização⁹¹ quanto de remineralização⁸⁸ por meio da comparação com os valores obtidos no tecido sadio e no tecido com alteração no conteúdo inorgânico. Foi observado que o processo de perda mineral promove o

aumento do valor integrado do sinal de OCT em relação ao hígido, ao passo que após a deposição mineral observa-se a diminuição deste valor, quando comparado ao obtido no esmalte com lesão antes da remineralização.

Recentemente foi proposta a utilização da atenuação do sinal de OCT para o diagnóstico de lesões de cárie inicial. Os dados obtidos pela varredura da área da lesão no esmalte dental foram plotados em função da profundidade analisada e foi realizado um ajuste de função baseado na lei de Beer-Lambert para estimar o coeficiente de atenuação do sinal⁸⁶.

4 MATERIAL E MÉTODOS

1.4 Aspectos éticos

Este plano de trabalho foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do IPEN/CNEN-SP, Parecer-Projeto nº 12/CEPA-IPEN/SP (ANEXO A). Os elementos dentais utilizados no estudo foram obtidos em frigoríficos localizados no estado de Minas Gerais.

4.1 Delineamento experimental

Neste estudo foram utilizadas 84 amostras de esmalte dental bovino hígido como unidades experimentais. Os fatores em estudo foram o esmalte dental (1 nível) e uma condição de irradiação (1 nível). As amostras foram submetidas à desmineralização (formação de lesão) pela imersão em solução tampão de acetato subsaturada em relação aos componentes inorgânicos do esmalte bovino. A irradiação das amostras desmineralizadas foi realizada com luz azul ($\lambda=455$ nm) e a remineralização foi induzida em ciclagem de pH pela imersão dos blocos de esmalte em solução remineralizadora e desmineralizadora. A avaliação da remineralização foi feita pelo teste de dureza seccional e por tomografia por coerência óptica (OCT). Nos testes de dureza, as variáveis respostas utilizadas foram o valor de dureza (KHN), a relação entre os valores de dureza das amostras irradiadas e não irradiadas (KHN_{RE}/KHN_{LED+RE}), o valor de área entre o traçado do perfil de dureza e a projeção do valor de dureza do esmalte sadio (ΔS), o percentual de mudança da dureza em cada profundidade avaliada (%KHN) e o percentual total de mudança de dureza (% ΔS). Para os ensaios de OCT, as variáveis respostas usadas foram o coeficiente de atenuação e o percentual de mudança no sinal de OCT causado pela desmineralização e pela remineralização.

4.2 Preparação das amostras

Após a extração, os incisivos bovinos hígidos foram lavados com água deionizada e detergente neutro (Extran, Merck, Brasil); limpos com auxílio de curetas para remoção de tecido mole, escova de Robinson em baixa rotação, pedra pomes (SS

White, Brasil) e água destilada e deionizada. Para evitar alterações nos componentes orgânicos do esmalte, a limpeza dos elementos dentais e das amostras foi realizada sem aquecimento e sem o uso de reagentes químicos. A face vestibular destes dentes foi observada em um microscópio estereoscópico (modelo 521, ASR Scientific, Brasil) com aumento de 20x para a exclusão dos elementos dentais que apresentavam trincas, manchas ou qualquer outro tipo de defeito. Durante todo o estudo os dentes e as amostras foram armazenados em frascos limpos com algodão estéril umedecido com água destilada e deionizada contendo 4,3 mmol/L timol⁹² e refrigerados a 5 °C.

Para os ensaios de avaliação da remineralização por análise de dureza e OCT foram preparados blocos de esmalte dental com dimensões de 4x2 mm⁹³ por meio do seccionamento de dentes com disco diamantado (série 15 HC, Buehler, USA) em cortadeira (Accutom 5, Struers, UK) sob refrigeração. Após o corte, os espécimes foram limpos com escova de Robinson em baixa rotação, pedra pomes e água destilada e deionizada e foram secos com papel absorvente. Em seguida, as amostras foram cobertas com um verniz resistente a ácidos (esmalte de unha) e, após a secagem, por uma camada de cera 7, mantendo apenas a superfície de esmalte de 8 mm² sem o recobrimento (FIGURA 1A). Neste trabalho também foi utilizada outra cortadeira (Isomet, Buehler, IL, USA) que não possibilitava o corte das amostras nas dimensões desejadas. Por este motivo, parte dos espécimes foi preparada com dimensões aproximadas de 5x5 mm. Para a delimitação da área da lesão foram confeccionadas máscaras de etiquetas auto-adesivas (Pimaco, RJ, Brasil) de 4x2 mm. Estas máscaras foram posicionadas sobre a superfície das amostras e, em seguida, os blocos de esmalte foram recobertos com um verniz resistente a ácidos. Desta forma, a área de esmalte exposta em cada amostra foi de 8 mm². Após a secagem foi aplicada uma camada de cera 7 sobre o verniz (FIGURA 1B). Ao término deste procedimento, as etiquetas foram removidas e as amostras foram limpas com cotonete umedecido em água destilada e deionizada para a remoção de eventuais resíduos de adesivo. A limpeza da superfície dos blocos de esmalte foi conferida em microscópio óptico.

FIGURA 1 - Amostras isoladas com verniz resistente a ácidos e cera 7 com exposição da área padronizada de 4x2 mm². A – bloco de 4x2 mm. B – bloco de aproximadamente 5x5 mm².

4.3 Análise dos efeitos da luz azul na remineralização do esmalte dental

Nesta etapa experimental foram realizados dois ensaios laboratoriais que diferiram quanto à metodologia de formação das lesões. No ensaio 1 foram utilizadas 24 amostras dependentes (de cada dente foi obtida uma amostra para cada grupo) submetidas à formação de lesão por imersão em menor volume de solução desmineralizadora (2 mL/mm²). As amostras foram distribuídas nos grupos RE, amostras submetidas à remineralização e LED+RE, amostras irradiadas com luz azul ($\lambda=455$ nm) e submetidas à remineralização (n=12 por grupo). O ensaio 2 foi conduzido com 40 amostras independentes (provenientes de diferentes elementos dentais) distribuídas de forma aleatória entre os grupos e submetidas à formação de lesão por imersão em maior volume da solução (6,25 mL/mm²). As amostras deste ensaio foram distribuídas nos grupos HÍGIDO, composto por amostras sem nenhum tipo de alteração; DE, amostras desmineralizadas que não foram submetidas a nenhum tratamento adicional; RE, amostras com lesão submetidas à remineralização e LED+RE, amostras com lesão, irradiadas com luz azul ($\lambda=455$ nm) e submetidas à remineralização (n=10 por grupo). Em ambos os ensaios, os parâmetros de irradiação e a indução de remineralização foram realizadas com a mesma metodologia.

Primeiramente, os blocos de esmalte dental foram desmineralizados em solução tampão ácida 50% saturada em relação ao conteúdo mineral do esmalte para formação de lesão⁹⁴. A solução foi preparada com tampão de acetato 0,05 M contendo

1,28 mM Ca, 0,74 mM P, 0,03 μg F/mL em pH 5,0⁹³ e 4,3 mmol/L timol foi adicionado como bacteriostático⁹². No preparo desta solução foram utilizados ácido acético (CH_3COOH), nitrato de cálcio [$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$], potássio hidrogenofosfato (KH_2PO_4) e fluoreto de sódio (NaF) (Merck KGaA, Germany). O pH foi aferido com o auxílio de um medidor de pH (modelo 720A+, Thermo Scientific Orion), sob agitação e para o ajuste foi usado hidróxido de sódio (NaOH, Merck KGaA, Germany). As amostras foram imersas na solução na proporção de 2 mL/mm² no ensaio com amostras dependentes e 6,25 mL/mm² no ensaio com amostras independentes. As amostras devidamente isoladas foram fixadas em hastes confeccionadas em fio ortodôntico com o auxílio de cera tipo 7. Estas hastes foram presas nas tampas dos recipientes plásticos de modo que as amostras ficassem imersas na solução. Os recipientes contendo os espécimes foram mantidos por 32 h à 37°C em uma incubadora (Marconi Equipamento para Laboratório Ltda., Brasil), sem agitação⁹³. Após este período, as amostras foram retiradas da solução, lavadas com água destilada e deionizada e levemente secas com papel absorvente. Em seguida os espécimes foram removidos das hastes e armazenados em ambiente úmido.

As amostras do grupo (LED+RE) foram irradiadas com parâmetros semelhantes aos reportados na literatura com o laser de argônio para inibição da desmineralização²⁸. Foi utilizado um LED com emissão $\lambda=455$ nm (Blue Star 1, Microdont, Brasil). A potência de saída do equipamento foi medida na área central do feixe de luz em um medidor de potência com precisão de ± 1 mW (Sensor head PS19 and Analyzer Field Master, Coherent, USA). Uma máscara com uma abertura de 4x2 mm (mesmas dimensões da amostra) foi fixada na frente da saída do feixe para permitir a medição da potência que seria entregue na amostra. Os parâmetros utilizados foram: 110 mW de potência, 1,38 W/cm² de irradiância, tempo de irradiação de 10 s e exposição radiante de 13,75 J/cm².

Durante as irradiações, a peça de mão do equipamento foi fixada em suportes ópticos e foi posicionada de forma que a abertura de saída do feixe de luz fosse mantida a 1 mm de distância da superfície da amostra a ser irradiada, perpendicularmente à mesma. As amostras foram fixadas em placa de acrílico com cera pegajosa e posicionadas no centro da abertura de saída da luz (FIGURA 2).

FIGURA 2- Posicionamento da amostra em relação ao LED durante a irradiação.

Após a irradiação, as amostras dos grupos RE e LED+RE foram submetidas à ciclagem de pH para induzir a remineralização (FIGURA 3). Os blocos de esmalte foram imersos em 25 mL de solução remineralizadora (tampão Tris 0,1 M, 1,5 mM Ca, 0,9 mM P, 150 mM KCl, 0,05 μg F/mL em pH 7,0) ⁹⁵ por 22 horas ⁹³ e em 50 mL da solução desmineralizadora utilizada na formação da lesão por aproximadamente 2 horas ⁹³. A solução remineralizadora foi preparada com nitrato de cálcio $[\text{Ca}(\text{NO}_3)_2]$, potássio hidrogenofosfato (KH_2PO_4), cloreto de potássio (KCl), tampão tris (hidroximetil) aminometano $[\text{H}_2\text{NC}(\text{CH}_2\text{OH})_3]$ e fluoreto de sódio (NaF) (Merck KGaA, Germany) e para o ajuste do pH foi usado ácido clorídrico (HCl) (Merck KGaA, Germany). Ambas as soluções continham 4,3 mmol/L timol como bacteriostático ⁹². O ciclo de exposição das amostras a períodos alternados de desmineralização e remineralização foi repetido durante 8 dias a uma temperatura constante de 37 °C. Antes da mudança de solução, os blocos de esmalte foram lavados com água destilada e deionizada e foram levemente secos com papel absorvente. As soluções foram trocadas no quarto dia de ciclagem.

FIGURA 3 - Diagrama da ciclagem de pH utilizada neste estudo.

4.3.1 Avaliação por dureza seccional

Ao término da ciclagem, os blocos de esmalte foram fixados em placas de acrílico e foram seccionados em cortadeira com disco diamantado sob refrigeração. Em seguida, uma das metades de cada amostra foi embutida em resina acrílica (Vipicril Plus, Vipi Ind. Com. Ltda, Brasil) com a face seccionada voltada para baixo. O embutimento foi realizado em embutidora metalográfica (PRE 30Mi, Arotec Ind. e Com. Ltda, Brasil) sob aquecimento à 125 °C durante 3 minutos, com pressão mantida entre 120 Kgf/cm² e 150 Kgf/cm², seguido por resfriamento até 55 °C. Nesta fase experimental foram incluídas 10 amostras de esmalte hígido para a determinação do perfil de dureza desta estrutura dental.

Após o embutimento, os corpos de prova foram planificados em lixadeira/politriz sob rotação de 125 rpm (PFL, Fortel Ind. e Com. Ltda, Brasil), com auxílio de lixas de carbureto de silício de granulometria decrescente (grana P800, P2500 e P4000, Buehler, USA) e água como irrigante, até a exposição da face seccionada das amostras. Em seguida foi realizado o polimento com suspensão de diamante monocristalino em base aquosa de 1 µm (Metadi diamond suspension, Buehler, USA) em pano de polimento (G-Cloth, Buehler, USA) sob baixa rotação. A limpeza dos corpos de prova foi feita com fluido de limpeza (Ultramet 2, Buehler, USA) em cuba ultrasônica (USC 1600, Unique Ind. e Com. de Produtos Eletrônicos Ltda, Brasil) durante 5 minutos e seguido da lavagem com água destilada e deionizada e da secagem com papel absorvente.

Após o polimento, as amostras foram submetidas ao teste de dureza seccional em microdurômetro com ponta Knoop (HMV-2 series, Shimadzu Scientific Instruments, Japão) ligado a um computador (FIGURA 4A). Esta técnica apresenta uma alta correlação (0,91) com o conteúdo mineral do esmalte dental⁹⁶ e é comumente empregada para avaliar mudanças minerais nesta estrutura^{97, 98, 99}. No teste de microdureza são realizadas indentações nas amostras com uma ponta de diamante de formato piramidal e com o valor de força (Kg) e tempo de indentação previamente estabelecidos. No presente estudo, a imagem da marca formada na amostra foi visualizada em computador e o comprimento do eixo mais longo (horizontal) foi determinado por meio do posicionamento de duas barras nas extremidades deste eixo (FIGURA 4B). Em seguida, o valor de dureza knoop é calculado pelo programa do equipamento, com base na equação:

$$DK = \frac{1,451 \times F}{d^2}$$

Nesta equação, F é a força utilizada no teste e pode ser convertido em newton por $F \text{ (N)} = \text{peso (kg)} \times 9,8 \text{ (m/s}^2\text{)}$ e d é o comprimento da indentação no longo eixo com unidade expressa em milímetro.

FIGURA 4 - (A) Fotografia do microdurômetro utilizado nos testes de dureza. (B) Imagem do programa utilizado para o cálculo do valor de dureza. Nesta figura são mostradas duas barras (em vermelho) utilizadas para determinar o comprimento do eixo horizontal da indentação.

As análises das amostras em microdurômetro foram conduzidas com a realização de três linhas de indentações em toda a extensão de esmalte desmineralizado, na região central da amostra. As medidas foram iniciadas a 10 μm da superfície do esmalte e foram feitas 14 indentações (até 140 μm) com distância de 10 μm entre cada marcação. Outras quatro indentações foram realizadas em sequência no esmalte hígido, espaçadas em 20 μm , para determinar o valor médio de dureza do esmalte sadio de cada amostra (FIGURA 5). Os testes foram realizados com carga estática de 25 g por 5 s.

FIGURA 5 - Ilustração da disposição das indentações realizada nas amostras de esmalte no teste de dureza seccional.

O valor de dureza apresenta uma relação direta com a quantidade de minerais do esmalte, ou seja, quanto maior a dureza, maior o conteúdo mineral no material. Em cada amostra foram obtidos os valores médios de dureza em função da distância da superfície de esmalte e estes dados foram divididos (normalizados) pelo valor médio de dureza da área de esmalte sadia obtida na própria amostra. Os dados de dureza knoop normalizados, expressos como KHN, foram plotados em função da profundidade de análise (perfil de dureza). Para cada amostra foi obtida a área entre o traçado do perfil de dureza e a projeção do valor de dureza do esmalte sadio (ΔS), que representa a quantidade de minerais ausentes no esmalte e pode ser relacionada à área da lesão¹⁰⁰ (FIGURA 6). A área sobre a curva é utilizada para avaliar o grau de desmineralização, pois quanto menor a dureza numa determinada profundidade e quanto mais profunda a lesão (valor de dureza correspondente ao esmalte sadio for obtido em maior profundidade) maior a área sobre a curva.

FIGURA 6 - Gráfico representativo da área entre o traçado do perfil de dureza e a projeção do valor de dureza do esmalte sadio (ΔS).

Os percentuais de mudança da dureza (%KHN) dos grupos RE e LED+RE (grupos tratados) em função da profundidade da lesão, considerando o valor do esmalte sadio como 100%, podem ser obtidos pela subtração entre o percentual de KHN do grupo tratado em relação ao hígido e o percentual de KHN do grupo DE em relação ao hígido. Estes valores foram calculados segundo a equação:

$$\%KHN = \left(\frac{KHN_{TRATADO}}{KHN_{HÍGIDO}} - \frac{KHN_{DE}}{KHN_{HÍGIDO}} \right) \times 100 \quad (1)$$

Com base nos valores de ΔS foram obtidos também os valores de percentual total de mudança da dureza (% ΔS) dos grupos RE e LED+RE com base na equação¹⁰¹:

$$\%\Delta S = \frac{\left(\Delta S_{DE} - \Delta S_{HÍGIDO} \right) - \left(\Delta S_{TRATADO} - \Delta S_{HÍGIDO} \right)}{\left(\Delta S_{DE} - \Delta S_{HÍGIDO} \right)} \times 100 \quad (2)$$

Nesta equação, ΔS_{DE} representa a área do grupo DE, $\Delta S_{HÍGIDO}$ corresponde ao esmalte sadio e $\Delta S_{TRATADO}$ representa os valores dos grupos RE e LED+RE.

Outra informação utilizada para avaliar os dados de dureza foi a relação entre KHN_{RE} e KHN_{LED+RE} em função da profundidade de análise.

4.3.2 Avaliação por tomografia por coerência óptica

Nos experimentos de avaliação da remineralização do esmalte irradiado com a luz azul também foram realizadas análises por OCT. Vinte blocos de esmalte obtidos de dez dentes bovinos (duas amostras por elemento dental) foram distribuídos nos grupos RE e LED+RE. As amostras foram fixadas em placas de acrílico (2,5 x 5,4 mm) com resina (FIGURA 7) uma vez que ambos os materiais foram previamente testados e não apresentaram nenhuma alteração após 32 horas de permanência em solução desmineralizadora à 37 °C. Após a polimerização da resina, as amostras foram planificadas e polidas em lixadeira/politriz sob rotação de 125 rpm (PFL, Fortel Ind. e Com. Ltda, Brasil), com auxílio de lixas de carbureto de silício de granulometria decrescente (grana P2500 e P4000, Buehler, USA) e água como irrigante. Ao término do polimento as amostras foram limpas com fluido de limpeza em cuba ultrasônica por 5 min e a lavadas com água destilada e deionizada. Em seguida as amostras foram cobertas com verniz resistente a ácidos e por uma camada de cera 7, mantendo apenas a superfície de esmalte exposta.

FIGURA 7 - Ilustração das amostras de esmalte fixadas na placa de acrílico.

A formação de lesão nas amostras foi induzida com a solução desmineralizadora anteriormente descrita, na proporção 2 mL/mm². As placas de acrílico com as amostras foram colocadas em recipientes contendo a solução e foram mantidas durante 32 h em uma incubadora a 37 °C. Após este período as amostras foram lavadas com água destilada e deionizada e foram secas com papel absorvente. Os espécimes do grupo LED+RE foram irradiados com um LED com emissão em $\lambda=455$ nm, potência de 110

mW, $1,38 \text{ W/cm}^2$ de irradiância, tempo de irradiação de 10 s e exposição radiante de $13,75 \text{ J/cm}^2$. As amostras foram submetidas à ciclagem de pH para induzir a remineralização, seguindo a mesma metodologia descrita na secção anterior, durante 8 dias em temperatura constante de 37°C .

Em razão da técnica de OCT não ser destrutiva, foi possível realizar o acompanhamento longitudinal do processo de mudanças minerais induzidas neste ensaio. Todas as amostras foram analisadas antes e após a desmineralização (hígido e desmineralizado), e ao final da indução de remineralização (remineralizado). Para garantir que as medidas fossem realizadas sempre na mesma área em cada amostra, a sonda do OCT foi fixada em uma mesa óptica e as placas de acrílico foram posicionadas sobre um deslocador de passo XY (Newport Corporation, EUA) em um arranjo fixo (FIGURA 8).

FIGURA 8 – Fotografia do arranjo montado para as medidas por OCT.

A movimentação do deslocador de passo foi realizada com o auxílio de um controlador de movimento (ESP 300, Newport Corporation, EUA) ligado a um computador (FIGURA 9). Na primeira medida de cada amostra, realizada no esmalte hígido, foi definida a área do espécime a ser analisada. A posição do deslocador foi registrada e, desta forma, pode-se reproduzir o posicionamento previamente escolhido em todos os momentos do estudo.

FIGURA 9 - Sistema utilizado para controlar a movimentação do deslocador de passo, composto por um controlador de movimento e um computador.

O sistema de OCT (OCP930SR, Thorlabs, EUA) utilizado tem como fonte de luz um led superluminescente com emissão em 930 nm, potência de 2 mW, e resolução lateral e longitudinal no ar de 6,2 μm (FIGURA 10).

FIGURA 10 - Fotografia da radiação infravermelha proveniente do sistema de OCT incidindo sobre uma amostra.

As imagens foram produzidas com varreduras longitudinais (Z) de 976,2 μm e laterais (X) de 1,5 mm, sempre na mesma região da amostra (FIGURA 11).

FIGURA 11 - Ilustração do posicionamento dos eixos de varredura na amostra em relação à direção de incidência do feixe de luz.

Os dados de OCT obtidos de uma amostra de esmalte dental possuem como característica um pico intenso na região inicial em virtude da reflexão especular causada pela diferença entre o índice de refração do ar ($n=1$) e do esmalte dental ($n=1,62$), como observado na FIGURA 12^{82, 91}. Este pico divide o sinal em duas regiões, a primeira, localizada à esquerda do pico, corresponde ao ar e a segunda, após o pico, representa o esmalte. O sinal correspondente à região do ar foi desprezado durante a análise dos dados.

FIGURA 12 - Sinal de OCT obtidos de uma amostra de esmalte bovino hígido. Apenas a região cinza escura representa o sinal proveniente do esmalte.

Em cada momento de análise foi gerado um conjunto de sinais de OCT que compõe a imagem da amostra. Estes dados foram analisados por um programa desenvolvido no Labview pelo Prof. Anderson Zanardi de Freitas (FIGURA 13). Este software realiza as análises de diversos dados de forma automática e permite a seleção das regiões de interesse na análise por meio da escolha de parâmetros como a profundidade máxima a ser analisada, camada a partir da superfície a ser desprezada e porção do sinal abaixo da superfície a ser desprezada em função de uma porcentagem de atenuação do sinal.

FIGURA 13 - Software desenvolvido para a análise das imagens de OCT. Na imagem da amostra, em azul, é mostrada a região de análise delimitada por dois traços verticais. No gráfico localizado abaixo da imagem são apresentados os valores médios dos sinais de OCT em função da profundidade (em branco) e a curva que representa o ajuste da função de decaimento exponencial (em vermelho). No lado direito localizam-se os parâmetros que podem ser alterados na análise.

As formas de análises dos sinais gerados em cada momento e a interpretação dos resultados obtidos basearam-se nas alterações que ocorrem no retro-espalhamento da luz e, portanto, na intensidade do sinal detectado após a desmineralização⁸⁷ e a remineralização⁹¹.

A primeira forma de análise proposta baseou-se na determinação do coeficiente de atenuação das amostras em cada medida. Em cada imagem foram selecionados os dados da superfície da amostra até 120 µm de profundidade (eixo Z) e de uma janela de 800 varreduras laterais (eixo X), correspondendo a 1200 µm. A determinação dos valores do eixo Z, que representa a profundidade da amostra, foi obtida por meio da divisão da profundidade óptica medida pelo índice de refração do esmalte dental ($n=1,62$). Com base nestes dados, foram determinados os valores médios (média aritmética) dos sinais oriundos de uma mesma profundidade. Deste conjunto de dados, foi realizado um ajuste de função do tipo decaimento exponencial $f(x) = A \cdot e^{B \cdot x} + C$, o que gerou os coeficientes ajustados (representados por B na função).

Na segunda forma de análise foram utilizados os mesmos dados selecionados para a análise anterior. Com base nestes dados foram obtidos os sinais médios em função da profundidade, para cada amostra, nos três momentos avaliados. Primeiramente foram determinados os percentuais de mudança do sinal de OCT, em função da profundidade analisada, causadas pela desmineralização (%SINAL_{desmineralização}). Estes valores foram calculados segundo a equação:

$$\% \text{ SINAL}_{\text{desmineralização}} = \left(\frac{\text{SINAL}_{\text{desmineralizado}} - \text{SINAL}_{\text{hígido}}}{\text{SINAL}_{\text{hígido}}} \right) \times 100 \quad (3)$$

Para avaliar a remineralização do esmalte dental por meio no sinal de OCT foram obtidos os percentuais de mudança do sinal (%SINAL_{remineralização}) dos grupos RE e LED+RE, em função da profundidade da amostra, utilizando-se a equação:

$$\% \text{ SINAL}_{\text{remineralização}} = \left(\frac{\text{SINAL}_{\text{desmineralizado}} - \text{SINAL}_{\text{remineralizado}}}{\text{SINAL}_{\text{hígido}}} \right) \times 100 \quad (4)$$

Ambas as equações foram determinadas considerando os valores medidos no esmalte hígido como 100%.

4.4 Análise estatística

Com base nos dados obtidos nos experimentos foram calculadas as médias e os valores de desvio padrão e erro padrão. Nos experimentos realizados com o teste de dureza foram obtidas as variáveis resposta KHN, KHN_{RE}/KHN_{LED+RE} , ΔS , %KHN e % ΔS . Estes dados foram analisados pelo teste de Shapiro-Wilk W para verificar se a distribuição dos dados poderia ser considerada normal¹⁰² e pelo teste de Brown-Forsythe para verificar se as variâncias dos grupos poderiam ser tratadas como homogêneas. Para verificar se os valores da relação entre KHN_{RE} e KHN_{LED+RE} eram diferentes do valor um foi utilizado t-test para uma amostra. Os dados de KHN e ΔS foram analisados pelo teste anova, seguido do teste Bonferroni para a comparação das médias. A comparação dos valores de %KHN e % ΔS foi realizada pelo t-test para duas amostras. Em todos os testes a hipótese nula foi recusada quando a probabilidade de rejeitar a hipótese nula e ela estar correta (valor de p) foi inferior a 0,05.

Nos ensaios de OCT, foram obtidos os valores de coeficiente de atenuação e os percentuais de mudança no sinal do OCT (% SINAL). Estes dados também foram analisados pelo teste de Shapiro-Wilk W para verificar se a distribuição dos dados poderia ser considerada normal¹⁰² e pelo teste de Brown-Forsythe para verificar se as variâncias dos grupos poderiam ser tratadas como homogêneas. A comparação entre os coeficientes de atenuação foi realizada pelo teste anova para medidas pareadas, seguido do teste Bonferroni e, para os dados de %SINAL, a análise foi feita pelo t-test para duas amostras. O nível de significância adotado em todos os testes foi de 5%.

5 RESULTADOS

Os resultados obtidos em cada tipo de análise realizada neste estudo foram descritos em seções diferentes.

1.5 Análise dos efeitos da luz azul na remineralização do esmalte dental

5.1.1 Avaliação por dureza seccional

Na FIGURA 14 é mostrada a imagem de uma amostra com algumas indentações realizadas em sequência, com distância de 10 μm entre elas.

FIGURA 14 - Imagem de uma amostra com as indentações realizadas no teste de dureza com ponta knoop.

5.1.1.1 Ensaio 1

No ensaio de remineralização realizado com as amostras desmineralizadas em menor volume de solução (2 mL/mm²) foi possível observar, no microscópio óptico acoplado ao durômetro, que uma mesma amostra continha áreas com diferentes graus de desmineralização. Esta variação na desmineralização também foi visualizada em diferentes amostras de um mesmo grupo. Estes achados foram confirmados pela dispersão dos valores de dureza obtidos nas amostras e puderam ser confirmados especialmente pelas análises dos dados em função da profundidade avaliada (FIGURA 15).

FIGURA 15 - Gráficos dos perfis de dureza para as amostras de cada grupo. Os dados correspondem aos valores de KHN em função da profundidade analisada.

Os dados de dureza (KHN) deste experimento foram analisados quanto à relação entre o valor de dureza de cada amostra do grupo RE (não irradiado) e seu par do grupo LED+RE (irradiado) em uma determinada profundidade. Neste caso deve-se considerar que quanto maior o valor de dureza, maior o conteúdo mineral e, portanto, se a relação é maior que 1, a amostra do grupo RE apresenta maior conteúdo mineral que a amostra do outro grupo. Observa-se na FIGURA 16 que a diferença no conteúdo mineral entre os grupos foi considerada significativa (t-test, $p < 0,05$) em 20 μm e 50 μm e, que nestas regiões, as amostras do grupo irradiado apresentaram menor conteúdo mineral que os espécimes não irradiados.

FIGURA 16 - Relação entre o valor de dureza (KHN) em função da profundidade de cada amostra do grupo RE e seu par do grupo LED+RE. Os dados representam as médias e as barras, os respectivos valores de erro padrão ($n=12$ por grupo). O símbolo (*) indica que o dado marcado é diferente do valor um ($p < 0,05$), segundo a análise realizada por meio do t-test.

Apesar da relação dos dados de dureza em função da profundidade da lesão indicar que em duas regiões houve um comportamento diferente entre as amostras dos dois grupos, na análise dos valores de área entre o traçado do perfil de dureza e a projeção do valor de dureza do esmalte sadio (APÊNDICE A) não foi detectada nenhuma

diferença entre os dois grupos ($p=0,11$). Este resultado indica não foi possível observar diferença entre a quantidade total de mineral ausente na lesão das amostras irradiadas e não irradiadas. A FIGURA 17 ilustra o intervalo de confiança em 95% dos dados de ΔS obtidos nos grupos RE e LED+RE.

FIGURA 17 – Intervalo de confiança (95%) dos valores de área entre o traçado do perfil de dureza e a projeção do valor de dureza do esmalte sadio (ΔS) dos grupos RE e LED+RE ($n=12$ por grupo).

Embora não tenha sido observada diferença nos valores de ΔS , outra forma de análise foi realizada nestes dados para melhorar a interpretação dos resultados. Na FIGURA 18 é mostrada a relação entre o valor de ΔS de cada amostra do grupo RE e seu par do grupo LED+RE. Nesta forma de análise, se o valor desta relação é inferior ao valor um, há menor conteúdo mineral no grupo LED+RE que no RE. No gráfico, além de ter sido observado uma grande variação no comportamento das amostras, notou-se que em 50% das comparações os blocos de esmalte do grupo LED+RE apresentaram-se pelo menos 10% mais desmineralizados.

FIGURA 18 - Relação entre o valor da área entre o traçado do perfil de dureza e a projeção do valor de dureza do esmalte sadio (ΔS) das amostras do grupo RE em função de seu par do grupo LED+RE.

5.1.1.2 Ensaio 2

No segundo experimento de dureza, no qual as amostras foram submetidas à formação de lesão em maior volume de solução ($6,25 \text{ mL/mm}^2$), observou-se um padrão de desmineralização mais homogêneo e menor dispersão dos dados (APÊNDICE B). Com base nos perfis médios de dureza (FIGURA 19) observou-se que os valores de KHN das camadas superficiais e profundas são similares nos grupos DE, RE e LED+RE, indicando ausência de alteração mineral nestas regiões. Também foi possível verificar que entre $40 \mu\text{m}$ e $90 \mu\text{m}$ os valores de dureza eram maiores no grupo RE que no grupo LED+RE, e ambos eram maiores que o grupo DE. Apesar das amostras de esmalte hígido não terem sido submetidas a nenhum processo que pudesse causar alteração do conteúdo mineral, observou-se que os valores de dureza obtidos eram diferentes em cada profundidade analisada. Pelo perfil médio destas amostras notou-se que os valores de KHN aumentaram em cada camada avaliada, a partir da superfície do esmalte. Estes dados foram utilizados para a obtenção dos percentuais de mudança nos valores de dureza.

FIGURA 19 - Perfil médio de dureza das amostras de cada grupo avaliado no ensaio 2. Os dados correspondem às médias de dureza (KHN) em função da profundidade de análise e as barras são os valores de erro-padrão (n=10 por grupo). Dados do grupo RE marcados com asteriscos apresentaram diferença significativa ($p<0,05$) em relação aos valores do grupo LED+RE, em mesma profundidade.

Na TABELA 1 são apresentados os dados de KHN para as amostras dos grupos DE, RE e LED+RE, em cada camada avaliada e seus respectivos valores de desvio-padrão e erro-padrão. As diferenças entre os valores de KHN dos grupos DE (lesões não submetidas à remineralização), RE e LED+RE foram observadas na porção mediana das lesões, entre 40 μm e 90 μm . Em todas as profundidades avaliadas desta região notou-se diferenças significativas ($p<0,05$) entre as amostras do grupo RE e DE; fato que demonstra a ocorrência de deposição mineral nesta área dos espécimes do grupo RE, durante a ciclagem de pH. Entretanto, na comparação entre os grupos LED+RE e DE foi observada diferença significativa ($p<0,05$) apenas em 60 μm de profundidade. Além disso, quando o grupo RE foi comparado ao grupo LED+RE, foram obtidas diferenças significativas ($p<0,05$) entre os valores de dureza medidos entre 40 μm e 70 μm (FIGURA 19 e TABELA 1).

TABELA 1 - Valores médios de dureza (KHN) dos grupos DE, RE e LED+RE em função da profundidade analisada e seus respectivos desvio-padrão (DP) e erro-padrão (EP). Entre 40 μm e 90 μm o valor médio de KHN de cada grupo é seguido de letras. Em mesma profundidade (linhas da tabela), letras distintas evidenciam médias significativamente diferentes, segundo a análise feita com o teste Bonferroni ($p < 0,05$).

Profundidade (μm)	DE			RE			LED+RE		
	KHN	DP	EP	KHN	DP	EP	KHN	DP	EP
10	0,10	0,03	0,01	0,10	0,03	0,01	0,10	0,03	0,01
20	0,10	0,03	0,01	0,10	0,03	0,01	0,11	0,04	0,01
30	0,11	0,04	0,01	0,15	0,04	0,01	0,14	0,05	0,01
40	0,14 ^a	0,05	0,02	0,30 ^b	0,13	0,04	0,19 ^a	0,07	0,02
50	0,20 ^a	0,07	0,02	0,48 ^b	0,11	0,04	0,30 ^a	0,08	0,03
60	0,29 ^a	0,09	0,03	0,61 ^c	0,13	0,04	0,44 ^b	0,12	0,04
70	0,44 ^a	0,12	0,04	0,71 ^b	0,11	0,03	0,56 ^a	0,12	0,04
80	0,58 ^a	0,15	0,05	0,77 ^b	0,12	0,04	0,65 ^{a,b}	0,14	0,05
90	0,69 ^a	0,15	0,05	0,83 ^b	0,1	0,03	0,75 ^{a,b}	0,12	0,04
100	0,84	0,13	0,04	0,88	0,13	0,04	0,83	0,10	0,03
110	0,88	0,11	0,03	0,90	0,09	0,03	0,87	0,06	0,02
120	0,93	0,10	0,03	0,96	0,08	0,03	0,91	0,07	0,02
130	0,99	0,03	0,01	0,96	0,05	0,02	0,93	0,07	0,02
140	0,98	0,03	0,01	1,00	0,03	0,01	0,97	0,05	0,02
160	1,01	0,04	0,01	0,99	0,02	0,01	1,00	0,02	0,01

Neste experimento os dados também foram analisados quanto à relação entre os valores de dureza (KHN) do grupo RE e do grupo LED+RE em cada profundidade avaliada (FIGURA 20). De forma semelhante ao ensaio 1, foi observado que o valor desta

relação foi superior a um em algumas regiões; porém, no segundo experimento estes achados foram obtidos em mais regiões (entre 40 e 70 μm).

FIGURA 20 - Relação entre o valor de dureza (KHN) do grupo RE e do grupo LED+RE em uma determinada profundidade. Os dados representam as médias e as barras, os valores de erro padrão (n=10 por grupo). O símbolo (*) denota que o dado indicado é diferente do valor um ($p<0,05$), segundo análise realizada com o t-test.

Os resultados observados nos perfis de dureza corroboram com os obtidos pela análise dos valores de área entre o traçado do perfil de dureza e a projeção do valor de dureza do esmalte sadio (APÊNDICE C). O valor médio alcançado no grupo RE foi significativamente diferente do grupo DE ($p<0,001$) e do LED+RE ($p<0,01$), ao passo que no grupo LED+RE não foi observada diferença em relação ao grupo DE (FIGURA 21). Estes dados demonstram que, após a indução de remineralização, o conteúdo mineral das amostras do grupo irradiado era inferior ao das amostras não irradiadas.

FIGURA 21 - Comparação dos valores de área entre o traçado do perfil de dureza e a projeção do valor de dureza do esmalte sadio (ΔS) dos grupos avaliados no estudo. Cada coluna representa a média da área de um grupo e as barras representam seus respectivos erros padrão (n=10 por grupo). Valor de p foi calculado com o teste Bonferroni.

Os percentuais médios de mudança de dureza em função da profundidade da lesão (%KHN) confirmam que a deposição mineral nas amostras não irradiadas foi superior à das amostras irradiadas. Na região entre 40 μm e 70 μm foram observadas diferenças significativas entre os dois grupos ($p < 0,05$). As amostras do grupo RE apresentaram aumento de 21,1%, 33,2%, 37,3% e 29,7% nas profundidades 40 μm , 50 μm , 60 μm e 70 μm , respectivamente, ao passo que nas amostras do grupo LED+RE estes valores foram de 6,8%, 11,3%, 16,8% e 13,5% (FIGURA 22). A diferença entre os percentuais dos dois grupos para cada um dos sítios descritos foi de 14,3%, 21,9%, 20,5% e 16,2%. Apesar da diferença nos valores de deposição mineral, pôde-se observar que o comportamento de deposição mineral foi semelhante em ambos os grupos.

FIGURA 22 - Comparação dos percentuais de mudança de dureza em função da profundidade (% KHN) dos grupos submetidos à ciclagem de pH. Os dados correspondem ao valor médio e as barras representam seus respectivos erros-padrão (n=10 por grupo). O símbolo (*) denota que o dado do grupo RE é diferente do dado do grupo LED+RE ($p < 0,05$), segundo análise realizada com o t-test.

Com base nos valores de ΔS das amostras dos quatro grupos analisados, foram calculados os valores de percentual total de mudança da dureza (% ΔS) para as amostras submetidas à ciclagem de pH (APÊNDICE C). Os valores médios ($\pm$ erro padrão) obtidos nos grupos RE e LED+RE foram $32\% \pm 5,4\%$ e $8,5\% \pm 5,5\%$, respectivamente, e a diferença entre estes valores foi significativa ($p = 0,0067$). Na FIGURA 23 é mostrado o intervalo de confiança em 95% dos dados de percentual de mudança de dureza (% ΔS) dos grupos submetidos à ciclagem de pH.

FIGURA 23 - Intervalo de confiança (95%) dos valores de percentual de mudança de dureza (% ΔS) dos grupos submetidos à ciclagem de pH (n=10 por grupo).

5.1.2 Avaliação por tomografia por coerência óptica

Na FIGURA 24 é mostrada uma sequência de imagens de OCT obtidas antes e após a desmineralização e após a remineralização, para uma amostra do grupo não irradiado (RE) e irradiado (LED+RE). Observou-se diferença no contraste entre as cores branco e preto nas imagens obtidas após os processos de alteração mineral promovidos nas amostras. A diferença na intensidade do sinal retro-espalhado nas amostras pôde ser observada pelas cores branca, que representa um sinal de maior intensidade, e preta que corresponde ao sinal de menor intensidade. As primeiras imagens das duas fileiras correspondem à imagem das amostras antes da desmineralização (esmalte hígido). Nestas imagens foi observado um sinal intenso na interface ar/esmalte e uma rápida diminuição do sinal à medida que a radiação se propaga em camadas mais profundas da amostra. Após a desmineralização (imagens do meio), notou-se uma reflexão intensa na interface, similar à do esmalte hígido; porém, a intensidade do sinal nas camadas abaixo da superfície das amostras de ambos os grupos aumentou, indicando perda mineral. Por outro lado, visualmente não foi possível identificar diferenças entre as imagens obtidas nas amostras desmineralizadas e remineralizadas (últimas imagens) e entre as imagens dos dois grupos. Por este motivo foram realizadas análises quantitativas dos sinais de OCT medidos.

FIGURA 24 - Imagens de OCT nos três momentos de análise (de cima para baixo, esmalte hígido, desmineralizado e remineralizado) para uma amostra de cada grupo.

Para todas as amostras analisadas foram obtidos sinais médios de OCT em função da profundidade da amostra (APÊNDICE D). Na FIGURA 25 são mostrados os perfis obtidos em uma amostra do grupo RE (não irradiado) para ilustrar a atenuação do sinal de OCT no esmalte hígido, no esmalte submetido à desmineralização e à remineralização. Nesta figura também são mostrados os ajustes realizados em cada perfil. No esmalte hígido observou-se um sinal intenso na interface ar/esmalte e este sinal diminuiu rapidamente com o aumento da profundidade da amostra. Nos perfis obtidos do esmalte submetido à desmineralização e à remineralização também foi observado um sinal intenso na interface da amostra com o ar; porém, notou-se um aumento do retro-espalhamento da luz nas camadas abaixo da superfície, o que diminuiu a atenuação do sinal. O comportamento observado nas demais amostras utilizadas neste estudo foi muito similar ao descrito na amostra da FIGURA 25.

FIGURA 25 - Perfis do sinal de OCT em função da profundidade obtidos em uma amostra hígida, após a desmineralização e após a remineralização. Linhas pontilhadas correspondem ao ajuste de função do tipo decaimento exponencial.

Na FIGURA 26 são apresentados os valores médios dos coeficientes de atenuação para cada grupo avaliado nos três momentos de análise. Por meio destes valores pôde-se observar que os coeficientes referentes às análises realizadas após a desmineralização (desmineralizado) e após a remineralização (remineralizado) são menores que o coeficiente medido no esmalte hígido, em ambos os grupos. Estes dados demonstram que a atenuação do sinal era maior no esmalte hígido, quando comparada à atenuação obtida nesta amostra nos outros dois momentos. Entretanto, não foram observadas diferenças entre os valores medidos no esmalte desmineralizado e no remineralizado, em ambos os grupos ($p > 0,05$). Além disso, na comparação entre os coeficientes do grupo RE e LED+RE em todos os momentos avaliados não foram observadas diferenças significativas.

FIGURA 26 - Coeficiente de atenuação dos grupos RE e LED+RE nos momentos inicial (hígido), após a desmineralização (desmineralizado) e após a remineralização (remineralizado). As colunas correspondem às médias e as barras representam os valores de erro-padrão (n=10 por grupo).

Além do coeficiente de atenuação, outro tipo de análise foi utilizada para a interpretação dos dados obtidos pelo sistema de OCT. Com base nos dados de OCT obtidos nas amostras antes e após a desmineralização, foi calculado o percentual de mudança no sinal de OCT após a desmineralização para cada profundidade analisada (FIGURA 27). Esta avaliação está relacionada ao percentual de desmineralização obtido em cada região avaliada. Anteriormente foi mostrado que, em geral, houve aumento da intensidade do sinal de OCT após a desmineralização, quando comparado ao sinal do esmalte hígido (FIGURA 25); portanto, quanto maior o aumento do sinal, maior a perda mineral. Em ambos os grupos observou-se que nos primeiros 10 μm as alterações minerais são menores que 15%. O percentual de mudança é maior nas camadas abaixo desta região e este valor decresce com o aumento da profundidade.

FIGURA 27 - Percentual de mudança do sinal de OCT após a desmineralização (%SINAL_{desmineralização}), em função da profundidade avaliada. Os dados correspondem ao valor médio e as barras representam seus respectivos erros-padrão (n=10 por grupo).

Os percentuais de mudança do sinal de OCT medidos após a ciclagem de pH, também foram obtidos para todas as amostras (FIGURA 28). Esta informação representa o percentual de remineralização obtido nas profundidades avaliadas. Para este dado, quanto maior a redução no sinal do OCT após a remineralização, maior o percentual de mudança. Em geral, os percentuais de remineralização obtidos no grupo RE foram em torno de 2%. Com exceção das camadas superficiais (aproximadamente os primeiros 10 μm), os valores médios obtidos mostraram que no grupo não irradiado houve maior redução no sinal de OCT após a remineralização. Entretanto, não foram observadas diferenças significativas entre os dois grupos ($p > 0,05$). De forma semelhante aos dados de dureza, nesta avaliação de percentual de mudança do sinal de OCT em função da profundidade observou-se também uma grande dispersão dos dados.

FIGURA 28 - Percentual de mudança do sinal de OCT após a remineralização (%SINAL_{remineralização}) em função da profundidade. Os dados correspondem ao valor médio e as barras representam seus respectivos erros-padrão (n=10 por grupo).

6 DISCUSSÃO

Alguns procedimentos odontológicos frequentemente realizados em consultório requerem a utilização de uma fonte de radiação com emissão na região azul do espectro eletromagnético. Entre as aplicações mais comuns desta radiação pode-se citar a polimerização de materiais resinosos e a ativação de materiais usados no clareamento dental. Nestes procedimentos a utilização da luz é destinada à irradiação de um material inserido ou depositado sobre as estruturas dentais e não possui a finalidade de causar alterações nestes tecidos. Entretanto, na maioria das vezes, a irradiação destas estruturas não pode ser evitada e a aplicação de luz azul no esmalte parcialmente desmineralizado pode ocorrer.

Diversos equipamentos estão disponíveis no mercado, os quais se diferem pelo tipo de fonte de radiação, faixa de emissão e intensidade de luz. As fontes mais utilizadas são as lâmpadas halógenas, o arco de plasma, os diodos emissores de luz e o laser de argônio ¹⁰³. Estes equipamentos apresentam uma grande diversidade de parâmetros e comumente são utilizados com taxas de exposição radiante de até 3 W/cm² ^{38, 104}. Conforme a indicação, o tempo de exposição recomendado pode variar de poucos segundos a um minuto ^{105, 106} e a aplicação pode ser realizada mais de uma vez. Desta forma, é importante ressaltar que além da condição de irradiação utilizada no presente estudo (110 mW de potência, 1,38 W/cm² de irradiância, tempo de irradiação de 10s) ter sido escolhida com base em trabalhos que avaliaram os efeitos da radiação azul na desmineralização do esmalte ^{28, 77}, estes parâmetros também se enquadram na faixa usada para alguns procedimentos odontológicos.

A proposição deste estudo baseou-se na hipótese de que a luz azul interage com componentes orgânicos do esmalte e nas evidências de que os processos de desmineralização e remineralização são influenciados por estes compostos. Desta forma, a utilização de amostras dentais sem qualquer tipo de alteração foi imprescindível. Em virtude da dificuldade de obtenção de dentes humanos hígidos que não tivessem sido submetidos a nenhum tratamento químico ou térmico prévio, optou-se pelo uso do dente bovino. Além da facilidade na aquisição, os dentes bovinos apresentam menor

variabilidade na composição e possuem maior área de esmalte e menor curvatura na superfície¹⁰⁷, o que facilitou a preparação de amostras planas para as análises por OCT. Estas características justificam sua ampla utilização nos estudos dos processos de desmineralização e remineralização do esmalte dental^{93, 107, 108, 109}. Contudo, as apatitas do esmalte bovino e do humano diferem quanto ao conteúdo de carbonato (em peso 4,06% e 3,04%, respectivamente)¹¹⁰, quanto ao produto de solubilidade ($3,9 \times 10^{-55}$ e $5,4 \times 10^{-53} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente)¹¹¹ e quanto à porosidade (maior porosidade no esmalte bovino)¹¹²; características que exercem influência no processo de des-remineralização. Foi demonstrado que a perda mineral no esmalte bovino é maior que no humano^{112, 113} e a profundidade da lesão formada no esmalte bovino é aproximadamente duas vezes maior¹¹⁴. Apesar disso, as lesões de cárie artificiais formadas no esmalte humano e no bovino apresentam semelhanças morfológicas¹¹⁴ e, portanto, se a metodologia empregada considerar as diferenças entre estas estruturas, os resultados obtidos com os dentes bovinos podem ser comparados aos dos dentes humanos^{115, 116}.

Além da escolha do tipo de elemento dental a ser utilizado neste estudo, vale ressaltar que alguns cuidados na manipulação e armazenamento das amostras também foram adotados. Os espécimes de esmalte foram selecionados após visualização em microscópio óptico para excluir áreas de trincas e manchas. Em seguida, as amostras foram cuidadosamente limpas para evitar a contaminação microbiana e foram armazenadas em ambiente úmido com uma substância bacteriostática (timol)⁹², sob refrigeração constante ($+5^{\circ} \text{ C}$), durante todo o estudo para evitar o crescimento microbiano e as eventuais trocas minerais que pudessem ocorrer sob armazenamento em água. Desta forma, pode-se melhorar a padronização dos espécimes e a confiabilidade na metodologia empregada.

Em relação ao método de indução do processo de remineralização, no presente estudo foi utilizado um modelo de ciclagem de pH para avaliar *in vitro* os efeitos da radiação azul na deposição mineral do esmalte. Nesta metodologia, o substrato (esmalte) é submetido a períodos alternados de desmineralização e remineralização por certo período de tempo. A exposição à solução desmineralizadora, composta por um tampão ácido subsaturado em relação ao cálcio e fosfato em pH baixo, simula os vários

momentos de decréscimo de pH⁹³. Por outro lado, os períodos de supersaturação em pH próximo ao neutro que favorecem a deposição mineral na estrutura dental são mimetizados pela imersão em solução remineralizadora, contendo cálcio e fosfato em um grau de saturação semelhante àquele da saliva e em pH neutro⁹⁵. Desta forma, entre os métodos *in vitro* usados para estudar a perda e o ganho mineral de estruturas dentais, os modelos de ciclagem de pH simulam de maneira mais adequada as variações de saturação de minerais e de pH ao qual a estrutura dental é frequentemente exposta no ambiente bucal⁹⁵. Por este motivo, esta metodologia é amplamente utilizada para avaliar a desmineralização e a remineralização de estruturas dentais *in vitro*^{27, 100, 101}. Além disso, este tipo de modelo contribui para gerar dados que podem ser utilizados no delineamento de estudos clínicos¹¹⁷.

A técnica de dureza foi um dos métodos de análise escolhidos em razão desta técnica ser amplamente utilizada para avaliar de forma indireta as alterações minerais em estruturas dentais^{93, 99, 101}. Após o estudo desenvolvido por Featherstone *et al.*⁹⁶, muitos pesquisadores passaram a converter os valores de dureza em valor de conteúdo mineral (%vol.), com base na relação estabelecida pelos autores entre o valor de dureza e a porcentagem mineral medida por microrradiografia. Entretanto, anos mais tarde, Kielbassa *et al.*¹¹⁸ demonstraram uma relação diferente entre estes dados para as amostras utilizadas em seu estudo. Em virtude da divergência entre estes trabalhos, no presente trabalho optou-se por apresentar os dados de dureza sem a conversão para um valor de conteúdo mineral. Os resultados foram descritos de forma semelhante à realizada nos estudos que utilizaram os dados convertidos, valendo-se dos relatos que demonstraram a existência de alta correlação ($r=0,91$) entre o valor de dureza medido e o conteúdo mineral presente no esmalte^{96, 118}. Desta forma, a interpretação dos dados foi baseada na relação direta entre o valor de dureza e o conteúdo mineral.

Neste estudo observou-se que os valores de dureza no esmalte hígido não foram semelhantes em todas as profundidades analisadas. Por este motivo, os dados obtidos em esmalte sadio foram utilizados para avaliar o percentual de remineralização das amostras dos grupos RE e LED+RE (FIGURA 22 e FIGURA 23). Observações similares foram relatadas em um estudo que empregou metodologia semelhante na preparação

das amostras para o teste de dureza. Neste trabalho os autores também utilizaram a área entre o traçado da lesão e a projeção do esmalte sadio das amostras híginas na obtenção do percentual de remineralização ¹¹⁹. No esmalte sem perda mineral não são relatadas alterações de composição e estrutura que justifiquem grandes variações dos valores de dureza na seção transversal, especialmente nos primeiros 100 µm a partir da superfície. Desta forma, a variação de dureza observada nas amostras híginas pode ter sido causada pela deformação do material de embutimento e da porção próxima à borda da amostra durante a indentação. Embora esta deformação possa ter ocorrido, não foram observadas trincas ou fraturas após os testes que sugerissem danos nos blocos de esmalte.

No segundo ensaio de dureza, observou-se que nas amostras não irradiadas ocorreu remineralização preferencialmente na região mediana (40 µm a 90 µm). Nas camadas superficiais não foi observado diferença nos valores de dureza entre os espécimes do grupo DE e RE. Para verificar se estes resultados estavam relacionados à metodologia utilizada no teste de dureza (baixa deposição mineral que não pôde ser mensurada pelo teste realizado), em algumas amostras também foram feitas medições com carga de 10 g. Entretanto, não foram observadas diferenças em relação aos valores de dureza obtidos com 25 g. Desta forma, considerou-se que nesta região não houve remineralização. A ausência de deposição mineral nas camadas superficiais pode ter sido causada pelos episódios de desmineralização da ciclagem de pH. Os minerais depositados na superfície durante a permanência em solução remineralizadora podem ter sido removidos durante os períodos de imersão em solução desmineralizadora. Além disso, a baixa concentração de flúor adicionada à solução remineralizadora e o tempo de ciclagem de pH também podem ter contribuído para os resultados observados. Foi demonstrado que esta concentração de flúor, quando comparado à ausência deste elemento, não promove um aumento significativo na remineralização das camadas mais próximas à superfície ¹¹⁹. Como consequência, a porosidade da superfície do esmalte desmineralizado é mantida durante a ciclagem de pH permitindo a difusão e a deposição mineral em regiões mais profundas da lesão ¹²⁰. Resultados similares foram observados por ten Cate *et al.* após 7 dias de imersão em solução remineralizadora ⁶⁹ e 15 dias de

ciclagem de pH ¹²¹. Contudo é esperado que a exposição prolongada das amostras à solução remineralizadora induza a deposição mineral nas camadas superficiais ⁶⁹.

Nos ensaios de avaliação da remineralização do esmalte por meio do teste de dureza foi possível observar que a irradiação com luz azul ($\lambda=455\text{nm}$), nos parâmetros utilizados neste estudo, inibiu de forma significativa a deposição mineral nesta estrutura. Nas amostras com maior perda mineral observou-se que, em média, a diferença entre o percentual total de remineralização (% Δ S) do esmalte não irradiado e irradiado foi de 23,5%. Embora a radiação aplicada no esmalte parcialmente desmineralizado tenha alterado a quantidade mineral depositada nas lesões, não foi observada modificações no perfil de remineralização (FIGURA 22)

Parâmetros similares aos empregados no presente estudo foram utilizados em investigações dos efeitos promovidos pela irradiação ($\lambda=488\text{ nm}$) na desmineralização do esmalte ^{28, 30}. Nestes estudos foi observado que o esmalte irradiado apresentou redução na perda mineral. No entanto, estes efeitos não foram notados quando a energia entregue no esmalte foi inferior (intensidade de 460 mW/cm^2 no LED e tempo de exposição de 20 s) ²⁹ à utilizada no presente estudo ($1,38\text{ W/cm}^2$, 10 s e $13,75\text{ J/cm}^2$). Este fato sugere que existem parâmetros limiares para que as alterações na estrutura dental ocorram.

A inibição da remineralização das lesões de esmalte irradiadas foi observada nos dois ensaios de dureza; porém, este efeito foi mais evidente nas amostras desmineralizadas em maior volume de solução (ensaio 2). Neste ensaio observou-se que os valores de dureza foram mais homogêneos, conseqüentemente, a dispersão dos dados em cada grupo foi menor (TABELA 1 e APÊNDICE B). Este fato pode ter contribuído para a diferença obtida entre os dois experimentos.

Outro método de análise inicialmente proposto para este estudo foi a mensuração de cálcio presente nas soluções (APÊNDICE F). As medidas foram realizadas por meio da espectroscopia de absorção atômica em soluções utilizadas na formação de lesão e na ciclagem de pH. No entanto, esta forma de avaliação foi descontinuada, pois os valores de cálcio obtidos na solução remineralizadora recém preparada apresentaram

uma grande variação, o que dificultou a análise da variação no conteúdo de cálcio após a ciclagem de pH.

Além do teste de dureza, diversas técnicas de análise são utilizadas para avaliar as alterações minerais de estruturas dentais; entre elas, a microrradiografia, a análise química de cálcio e fósforo inorgânico dissolvidos e a microscopia de luz polarizada⁹⁹. Apesar de estas técnicas serem consideradas métodos de referência para este tipo de análise, atualmente destaca-se o crescente interesse por métodos não destrutivos baseados nas propriedades ópticas das estruturas dentais. Neste contexto pode-se incluir a tomografia por coerência óptica. Além da possibilidade da aplicação *in vivo*^{84, 122}, esta técnica apresenta a vantagem de permitir a análise longitudinal em ensaios realizados *in vitro*^{82, 88}.

No presente estudo, a metodologia de preparação das amostras para as análises por OCT adotada teve o objetivo de standardizar as medidas. As amostras foram fixadas e planificadas e isso permitiu que o ângulo de incidência de luz fosse mantido em aproximadamente 90°. Desta forma, foi possível evitar que as diferenças na morfologia de superfície e no ângulo de incidência interferissem na refletividade e na profundidade de penetração da luz¹²³.

O coeficiente de atenuação foi um dos métodos utilizados para a avaliação quantitativa do sinal de OCT no presente trabalho. Apesar de esta metodologia ter sido recentemente proposta por Popescu *et al.*, a forma como este coeficiente foi obtido diferiu nos dois estudos. Ambos os trabalhos utilizaram uma função para o ajuste dos dados baseada na lei de Lambert-Beer; porém, no presente estudo foi adicionado um fator de correção do sinal obtido (representado por C) que representa o ruído de fundo do sistema (background). Entretanto, no estudo realizado por Popescu *et al.* não é descrita a realização deste tipo de correção⁸⁶.

Na avaliação por OCT, tanto por análise visual das imagens como pelos dados de coeficiente de atenuação, foi possível observar as mudanças no conteúdo mineral provocadas pela desmineralização. Nos dados obtidos no presente estudo observou-se que o processo de perda mineral causou o aumento do retro-espalhamento da luz incidente e, conseqüentemente, o aumento na intensidade do sinal de OCT detectado.

Este comportamento também foi observado em outros estudos que avaliaram lesões formadas *in vitro*⁹¹ e lesões de cárie naturais⁸⁴. Os coeficientes de atenuação obtidos mostram que atenuação do sinal de OCT é maior no esmalte sadio que no tecido com lesão. Em outras palavras, a quantidade de luz que foi retro-espalhada e detectada nas primeiras camadas no esmalte hígido era alta e depois caiu rapidamente, ao passo que, no esmalte com lesão, esta intensidade se manteve alta nas camadas abaixo da superfície. A diminuição dos valores de coeficiente de atenuação no esmalte desmineralizado também foi relatada no estudo realizado por Popescu *et al.* com amostras de esmalte humano hígido e lesões de cárie naturais⁸⁶.

O esmalte dental é considerado um meio túrbido devido a sua composição e estrutura. O espalhamento da radiação neste tecido é atribuído aos cristais de apatita e aos prismas⁹⁰. No esmalte com lesão, além dos cristais e prismas que permaneceram inalterados, existem regiões com diferentes graus de perda mineral e variadas quantidades de poros de diferentes tamanhos¹⁹ que agem como centros espalhadores⁹⁰. Quando a luz penetra num material com esta complexidade estrutural, ocorrem mudanças no espalhamento da luz⁹⁰ e esta passa a ter interações adicionais com as novas estruturas. Popescu *et al.*⁸⁶ sugeriram que no esmalte desmineralizado podem ocorrer dois tipos de interação que resultam no aumento do sinal que chega no detector, quando comparado à estrutura sadia. O primeiro consiste no retro-espalhamento que acontece na interface esmalte/porosidade em virtude da mudança do índice de refração. Além desta interação, também pode ocorrer uma efetiva redução do espalhamento quando a luz atravessa o interior dos poros sem ser desviada. Por outro lado, este efeito garante que a luz retro-espalhada proveniente das regiões mais profundas da amostra alcance o detector. Desta forma, estes dois processos resultam no aumento da detecção de sinal proveniente de camadas mais profundas das amostras com lesão.

Os valores de percentual de mudança do sinal de OCT após a desmineralização complementaram as informações obtidas pelos coeficientes de atenuação. Com esta metodologia de análise foi possível observar as variações na perda mineral promovidas pelo processo de desmineralização em diferentes profundidades. De forma semelhante à técnica de dureza, este tipo de avaliação fornece informações de

conteúdo mineral em diversas regiões de uma amostra; porém, apresenta a vantagem de permitir que o processo de perda mineral seja monitorado. Além disso, vale ressaltar que o tempo de medida na técnica de OCT é menor e a preparação das amostras é mais simples.

Na avaliação das imagens de OCT e dos valores de coeficiente de atenuação não foram observadas diferenças entre o esmalte desmineralizado e remineralizado. A ausência de alterações no sinal pode estar relacionada ao baixo percentual de remineralização induzido pelo modelo de ciclagem de pH adotado. Segundo Darling *et al.*, a atenuação da radiação infravermelha no esmalte com perda mineral entre 20% e 50% é similar ⁹⁰. Nos dados de OCT obtidos após a desmineralização, notou-se que a perda mineral máxima nas amostras foi de 50%. Em estudo conduzido com uma metodologia de ciclagem de pH semelhante à utilizada no presente estudo, foi observado 9,6% de remineralização por meio do teste de dureza ¹²⁴. Desta forma, a variação do conteúdo mineral pode não ter sido suficiente para alterar as características de espalhamento da radiação nas lesões após a remineralização. A dificuldade na detecção deste processo também foi relatada por Jones *et al.* ⁸⁸. Os autores observaram alterações na intensidade do sinal de OCT após a remineralização nas camadas superficiais; porém, no corpo da lesão, o aumento do conteúdo mineral foi detectado apenas pela microrradiografia.

No processo de remineralização, o aumento do conteúdo mineral pode ser causado pela restauração dos cristais parcialmente dissolvidos, formação de novos cristais ou crescimento daqueles que não foram afetados pelo processo de dissolução ⁶⁰. Contudo, os cristais formados ou restaurados podem variar de tamanho e apresentar formas diferentes, não restabelecendo a mesma estrutura cristalina do esmalte hígido ¹²⁵. Além disso, o grau de mudanças na estrutura cristalina varia conforme a quantidade de minerais incorporados durante a remineralização. Desta forma, se a deposição mineral for pequena, o sinal de OCT pode não ser alterado devido a dois fenômenos. Na remineralização, a diminuição do tamanho e do número de porosidades ¹²⁵ pode ocasionar a redução no sinal detectado em virtude do menor espalhamento da luz pelos poros. Por outro lado, é esperado o aumento do espalhamento da radiação causada pela interação da luz com as estruturas cristalinas formadas durante a remineralização. Estes

dois fenômenos ocorrendo simultaneamente poderiam resultar na ausência de alterações do sinal de OCT.

Embora tenha sido demonstrado que o processo de desmineralização acarreta no aumento do retro-espalhamento^{84, 123} e que existe uma alta correlação entre o grau de perda mineral e a intensidade do sinal de OCT ($r=0,96$)⁹¹, as alterações causadas pelo processo de deposição mineral no retro-espalhamento da radiação infravermelha não estão estabelecidas. Em 2006, Jones *et al.* relataram que a intensidade do sinal de OCT no esmalte dental aumenta após a remineralização¹²⁶. Contudo, no mesmo ano, estes pesquisadores demonstraram que o sinal detectado no esmalte parcialmente remineralizado era menor⁸⁸. Apesar de os estudos diferirem quanto à metodologia de formação da lesão, o que resultou em lesões com conteúdo mineral e profundidade diferentes, em ambos os trabalhos a remineralização foi induzida com o mesmo tipo de solução e por igual período de tempo. Estes resultados sugerem que mais estudos precisam ser desenvolvidos para elucidar os efeitos da deposição mineral no retro-espalhamento de luz.

Os percentuais de mudança do sinal de OCT após a remineralização mostraram que os valores médios obtidos nas amostras não irradiadas são maiores que os obtidos nas amostras irradiadas (FIGURA 28). Embora não haja diferença significativa entre os valores, esta análise indicou uma tendência à menor remineralização no grupo irradiado. Estes dados corroboram com os obtidos no teste de dureza, no qual foi observada uma significativa redução da remineralização.

O efeito de inibição na deposição mineral observado no presente estudo pode ser relacionado às alterações induzidas na perda mineral do esmalte pela irradiação em 488 nm com parâmetros similares^{28, 30}. Em ambos os casos, a luz azul promoveu mudanças em componentes do esmalte dental que alteraram os processos de desmineralização e remineralização desta estrutura.

Segundo Spitzer & Bosch¹²⁷ a região espectral do azul é pouco absorvida pelos componentes inorgânicos do esmalte dental humano e bovino, ao passo que parte da matriz orgânica absorve a radiação com comprimento de onda inferior a 300nm. Contudo, o material orgânico utilizado nestes ensaios de absorção foi extraído do esmalte

por meio da dissolução ácida com 0,01M HCl; metodologia que causou a fragmentação das moléculas orgânicas e pode ter alterado as propriedades de absorção deste material. Estas dificuldades na extração da matriz orgânica do esmalte maturado são comumente reportadas¹⁸ e elas justificam a falta de conhecimento sobre estes componentes.

Alterações morfológicas observadas no esmalte irradiado com o laser de argônio com parâmetros similares aos utilizados no presente estudo (231 mW, 11,5 J/cm², 10 s, 1,2 W/cm²) foram atribuídas à interação da luz com o material orgânico³⁹. Os autores sugeriram que a irradiação promoveu alteração ou eliminação destes compostos. Entretanto, se o material orgânico fosse eliminado, a resistência à desmineralização do esmalte irradiado com laser de argônio ($\lambda=488$ nm) não aumentaria²⁸, e sim diminuiria^{8, 20}. Da mesma forma, a irradiação teria aumentado a remineralização do esmalte no presente estudo²⁵.

Neste contexto, o mecanismo de ação que poderia explicar os resultados alcançados é a mudança na interação entre o material orgânico e o inorgânico, ocasionada por efeitos fotoquímicos da radiação nos componentes orgânicos. A radiação incidente poderia causar rearranjos estruturais nas moléculas orgânicas e, como consequência, alterar a interação com a parte inorgânica. No presente estudo foram realizadas algumas análises por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) para investigar se a irradiação com luz azul promoveu alterações nos compostos orgânicos do esmalte (APÊNDICE G). Com base nos espectros obtidos observou-se que as bandas comumente descritas nas análises do esmalte (modos vibracionais do fosfato, carbonato, amidas e C-H) não sofreram alterações decorrentes da irradiação. Contudo, não foi possível obter espectros que permitissem a caracterização da região entre 2300 cm⁻¹ e 1900 cm⁻¹, no qual são descritas algumas bandas de absorção de compostos químicos que incluem o elemento carbono¹²⁸ e, portanto, estariam relacionadas ao material orgânico do esmalte. O vapor de água ambiente também pode apresentar banda de absorção neste intervalo espectral¹²⁹ e, apesar de a umidade ter sido controlada e mantida em torno de 40%, observou-se que os espectros apresentavam ruído, o que impossibilitou a obtenção destas bandas de absorção.

Os efeitos da radiação azul em moléculas orgânicas também poderiam alterar a interação entre os constituintes do esmalte por meio da excitação de sítios livres de ligação destes componentes. Como consequência, esta transferência de energia ocasionaria a ligação de moléculas orgânicas aos sítios livres dos cristais de apatita, estabilizando a sua estrutura. Visto que o processo de remineralização também depende do crescimento de cristais ⁶⁰, a ausência de sítios para a ligação de minerais causaria a inibição da deposição mineral. Além disso, se a quantidade de material orgânico exposto nas amostras dos dois ensaios de dureza foi desigual, este mecanismo explicaria as diferenças observadas entre os dois ensaios de dureza. Os efeitos fototérmicos podem ser desconsiderados neste estudo uma vez que o aumento de temperatura alcançado na estrutura dental após a irradiação em condições semelhantes ³⁸ é inferior ao necessário para alterar termicamente moléculas protéicas ¹³⁰.

Embora os achados do presente estudo não correspondam ao que se almeja para aplicação clínica, deve-se considerar que a radiação azul também pode diminuir a desmineralização do esmalte. Desta forma, o efeito inibidor de trocas minerais do esmalte dental com o meio circundante pode ser clinicamente útil para evitar a progressão de uma lesão. Entretanto, outros estudos precisam ser desenvolvidos para avaliar estes efeitos.

A luz azul é uma fonte de radiação amplamente utilizada na prática clínica odontológica. Em geral os parâmetros de irradiação adequados para as aplicações podem variar bastante, sobretudo por causa da grande diversidade de equipamentos com diferentes especificações. Entretanto, poucos são os conhecimentos relatados a respeito dos efeitos desta radiação sobre os constituintes do esmalte dental, especialmente a matriz orgânica. Por estes motivos é importante ressaltar que os resultados obtidos indicam que a luz azul não é inócua para os componentes do esmalte dental e alterações na deposição mineral podem ser induzidas. Adicionalmente aos resultados obtidos neste estudo, as evidências de que o material orgânico influencia o processo de desmineralização e remineralização encorajam o desenvolvimento de pesquisas nesta área.

7 CONCLUSÕES

Com base nas condições empregadas para o desenvolvimento do presente estudo pode-se concluir que:

- a irradiação com luz azul ($\lambda=455\text{nm}$) promoveu a inibição da remineralização do esmalte dental desmineralizado;
- a metodologia empregada nas análises por OCT permitiu a avaliação quantitativa da perda mineral no esmalte; porém, este resultado não foi alcançado na avaliação da remineralização.

ANEXO A - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO IPEN/CNEN-SP **Parecer - Projeto Nº 12/CEPA-IPEN/SP**

Com base nos pareceres apresentados pelos relatores, o protocolo de pesquisa **AVALIAÇÃO DOS EFEITOS PROMOVIDOS PELA RADIAÇÃO EMITINDO NO AZUL NO ESMALTE DENTÁRIO** de responsabilidade do pesquisador **NIKLAUS URSUS WETTER** foi considerado **APROVADO**.

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados, a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou finais, dependendo da duração do projeto) referentes ao andamento da pesquisa. Após o término da pesquisa, uma cópia do trabalho, em CD ou disquete, deve ser encaminhada a este CEPA.

São Paulo, 23 de NOVEMBRO de 2006

Prof. Dra. Nanci do Nascimento
Coordenadora do CEPA-IPEN

2ª via

IPEN-CNEN/SP
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ANIMAL
Av Prof Lineu Prestes, 2242 - Cidade Universitária - CEP 05508-000 - São Paulo - SP
Telefone: (011) 3816-9229 - Fax (011) 3816-9232
E-mail: nnascime@ipen.br

APÊNDICES

APÊNDICE A – DADOS DA ANÁLISE DE DUREZA DO ENSAIO 1

Na tabela abaixo são apresentados os valores da área entre o traçado do perfil de dureza e a projeção do valor de dureza do esmalte sadio (ΔS) das amostras dos grupos RE e LED+RE.

AMOSTRA	RE	LED+RE
1	25,8	35,0
2	37,4	53,4
3	46,5	56,1
4	38,0	27,7
5	39,9	38,9
6	33,6	33,1
7	28,9	38,9
8	31,7	30,7
9	54,0	56,6
10	47,9	52,5
11	56,8	54,4
12	53,0	59,8
Média	41	45
DP	10	12

APÊNDICE C - DADOS DA ANÁLISE DE DUREZA DO ENSAIO 2

Na tabela abaixo são apresentados os valores da área entre o traçado do perfil de dureza e a projeção do valor de dureza do esmalte sadio (ΔS) das amostras dos grupos Hígido, DE, RE e LED+RE e os valores de percentual de mudança de dureza ($\% \Delta S$) dos grupos RE e LED+RE.

AMOSTRA	$\Delta S_{\text{HÍGIDO}}$	ΔS_{DE}	ΔS_{RE}	$\Delta S_{\text{LED+RE}}$	$\% \Delta S_{\text{RE}}$	$\% \Delta S_{\text{LED+RE}}$
1	14,2	60,7	49,8	62,4	27,2	-0,4
2	15,4	53,0	42,8	56,5	42,6	12,5
3	23,3	56,5	42,0	53,7	44,2	18,7
4	16,0	51,4	50,7	67,2	25,1	-10,9
5	22,0	74,2	53,1	42,6	20,0	42,8
6	16,6	78,8	32,9	68,2	64,1	-13,1
7	11,4	55,8	40,2	63,8	48,3	-3,3
8	14,4	60,2	54,4	61,5	17,1	1,6
9	20,1	65,8	57,2	57,3	11,0	10,7
10	11,4	65,9	53,0	50,2	20,2	26,3
Média	16,5	62,2	47,6	58,4	32	8
SD	4,1	9,0	7,7	8,0	17	17

APÊNDICE D - SINAL DE OCT EM FUNÇÃO DA PROFUNDIDADE NOS TRÊS MOMENTOS DE ANÁLISE

Conjunto de sinais de OCT, em função da profundidade, para cada amostra dos grupos RE e LED+RE. Os gráficos da primeira linha correspondem às amostras hígidas, na segunda, após a desmineralização e na última, após a remineralização.

APÊNDICE E – VALORES DE COEFICIENTE DE ATENUAÇÃO CALCULADOS COM BASE NOS DADOS DE OCT

amostra	Valores de coeficiente de atenuação					
	RE			LED+RE		
	hígido	desmineralizado	remineralizado	hígido	desmineralizado	remineralizado
1	0,1810	0,0132	0,0058	0,1810	0,0272	0,0309
2	0,1732	0,0160	0,0156	0,1905	0,0173	0,0174
3	0,1997	0,0181	0,0207	0,1773	0,0166	0,0139
4	0,1380	0,0133	0,0140	0,1846	0,0244	0,0167
5	0,1569	0,0229	0,0249	0,1730	0,0161	0,0118
6	0,1717	0,0266	0,0340	0,1686	0,0265	0,0272
7	0,1878	0,0233	0,0213	0,2017	0,0237	0,0195
8	0,1741	0,0243	0,0122	0,1991	0,0270	0,0249
9	0,1945	0,0181	0,0157	0,1945	0,0199	0,0149
10	0,1735	0,0249	0,0224	0,1543	0,0172	0,0077
média	0,1750	0,0201	0,0187	0,1825	0,0216	0,0185
DP	0,0180	0,0049	0,0078	0,0148	0,0046	0,0072
EP	0,0057	0,0016	0,0025	0,0047	0,0015	0,0023

amostra	Coeficiente de determinação R ² (qualidade do ajuste)					
	RE			LED+RE		
	hígido	desmineralizado	remineralizado	hígido	desmineralizado	remineralizado
1	0,9385	0,9320	0,9647	0,9385	0,900	0,886
2	0,8830	0,9468	0,9402	0,9286	0,877	0,902
3	0,9238	0,9213	0,9197	0,9508	0,920	0,931
4	0,8975	0,9271	0,9220	0,9508	0,853	0,832
5	0,9427	0,9358	0,9188	0,9569	0,877	0,881
6	0,9447	0,9210	0,9138	0,9384	0,956	0,935
7	0,9297	0,9278	0,9283	0,9268	0,951	0,958
8	0,9375	0,9420	0,9803	0,9274	0,872	0,866
9	0,9166	0,9183	0,9205	0,9166	0,945	0,949
10	0,9478	0,9412	0,9387	0,9549	0,914	0,953

APÊNDICE F - MEDIDAS DA CONCENTRAÇÃO DE CÁLCIO NAS SOLUÇÕES

Foram realizadas algumas análises por meio da espectrometria de absorção atômica por chama para determinar a concentração de cálcio nas soluções DES e RE utilizadas na formação da lesão e na ciclagem de pH⁹⁹. Nesta técnica, a detecção do cálcio é mais precisa em concentrações até 3 µg/mL, pois a curva de detecção de cálcio é exponencial.

Para a determinação de cálcio nas soluções desmineralizadora e a remineralizadora utilizou-se lantânio a 1%¹³¹ para quebrar as ligações do cálcio com outros compostos. O reagente utilizado foi o óxido de lantânio (La₂O₃, Specpure, Johns Matthey Chemicals Limited, London). Primeiro foi feito a calcinação do La₂O₃ à 850°C por 3 horas para eliminar o CO₂ que foi absorvido pelo reagente (absorção de CO₂ e incorporação de CO₃ no composto). Após o resfriamento, a solução de lantânio a 1% foi preparada com 1,173 g de La₂O₃ calcinado dissolvido em 2 mL de ácido nítrico (HNO₃) a 65% sobre uma chapa aquecida à 100 °C e em seguida foi acrescido 98 mL de água destilada e deionizada. As amostras foram preparadas com 0,06 mL de cada solução, diluído em 3,14 mL de ácido nítrico a 2% e 0,8 mL de solução de lantânio a 1%.

A calibração da curva analítica foi realizada com padrões de 0,5, 1, 2 e 3 µg/mL de cálcio. As soluções padrões foram preparadas por meio da diluição de uma solução padrão SPEX (concentração de 1000 µg/mL) em ácido nítrico a 2% (Spex Plasma Standard, Spex Chemical, New Jersey, USA). As medidas foram realizadas com fluxo de ar de 13,5 L/min e de acetileno de 2 L/min.

Na tabela abaixo é apresentada a quantidade inicial de cálcio medido nas soluções (média±desvio-padrão). O valor informado representa a média de quatro amostras preparadas a partir da mesma solução. Observou-se que a variação das medidas na solução remineralizadora foi em torno 10% da média.

Solução analisada	Quantidade esperada (µg/mL)	Quantidade medida (µg/mL)
Demineralizadora	51,2	49,8±0,39
Remineralizadora	60	51,1±5,1

Após a avaliação da concentração inicial das soluções, foram realizadas análises de algumas soluções utilizadas na formação da lesão e na ciclagem de pH. Entretanto, as medidas da solução remineralizadora continuaram a apresentar grande variação, impossibilitando a avaliação da quantidade de cálcio depositada na amostra e, por este motivo, esta análise foi descontinuada.

APÊNDICE G - ANÁLISES COMPOSICIONAIS POR FTIR

A espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) é uma técnica de análise que utiliza a radiação da região do infravermelho para a determinação ou medição de compostos de uma amostra. Esta técnica baseia-se na detecção de vibrações moleculares específicas das ligações químicas e, para isso, depende da absorção da radiação emitida. Quando existe ressonância entre a frequência de vibração de uma ligação e da radiação incidente ocorre absorção e, conseqüentemente, a amplitude de vibração aumenta. Esta energia absorvida é detectada e gera a banda de absorção em um determinado comprimento de onda¹³².

As análises por FTIR foram conduzidas para verificar se a irradiação com luz azul promove alterações em componentes do esmalte dental, em particular na matriz orgânica. Foram preparadas lâminas de 100 a 130 µm de espessura. Os elementos dentais foram previamente observados no microscópio óptico para a escolha de dentes sem trincas ou outro tipo de alteração. As coroas dentárias, previamente separadas da porção radicular, foram fixadas em placas de acrílico com cera pela face lingual. As placas foram fixadas na cortadeira de modo que o corte fosse realizado paralelamente à face vestibular do dente. Fatias de esmalte de aproximadamente 400 µm foram obtidas por meio do corte do dente com disco diamantado. Após o corte as amostras eram novamente analisadas no microscópio óptico para verificar se amostras apresentavam uma área mínima de 4x4 mm sem presença de trincas. A ausência de rachaduras era importante para evitar que as amostras se fragmentassem durante o desgaste. Para a preparação das lâminas, estas fatias foram coladas em lamínula de vidro com uma pequena quantidade de éster de cianoacrílico (Super bonder, Henkel, Brasil). A lamínula foi fixada em blocos de acrílico com cera para facilitar o desgaste da fatia de esmalte, como pode ser observado na figura abaixo. Inicialmente as amostras foram desgastadas com lixa de carbureto de silício e água como irrigante em lixadeira/politriz, sob rotação de 125 rpm. Posteriormente o desgaste foi realizado manualmente até a obtenção da espessura desejada.

Fotografia ilustrativa da preparação da amostra de esmalte para análise por FTIR. A fatia de esmalte foi colada sobre uma lamínula de vidro previamente fixada em um cilindro de resina acrílica antes de ser desgastada.

Neste estudo foi utilizado o espectrômetro de infravermelho (Nicolet 6700, Thermo Fisher Scientific Inc, EUA) com o acessório *smart orbit* para que as análises fossem realizadas pela técnica de reflexão total atenuada (ATR). A resolução foi mantida em 8 cm^{-1} e a região espectral analisada foi de 4000 cm^{-1} a 400 cm^{-1} .

Espectrômetro de infravermelho com o acessório *smart orbit* que foi utilizado para a análise pela técnica de reflexão total atenuada.

As fatias de esmalte de $100 - 130\text{ }\mu\text{m}$ de espessura foram cortadas em dimensões de aproximadamente $1,5\text{ mm}$ de largura e 3 mm de comprimento para permitir a padronização do posicionamento da amostra no acessório. As lâminas foram

desmineralizadas com a mesma solução descrita para a formação de lesão nos blocos de esmalte (item 4.3), na proporção de 2 mL/mm² de área exposta, por um período de 14 h à 37 °C. Nestas amostras, ambas as faces das fatias ficaram expostas à solução ácida e, por este motivo, o tempo de permanência na solução desmineralizadora foi inferior ao utilizado no experimento de avaliação da remineralização (item 4.3). Após a desmineralização, as amostras foram irradiadas ($\lambda=455$ nm) com as mesmas condições descritas nas seções anteriores. As análises foram conduzidas antes e depois da desmineralização e após a irradiação.

Posicionamento da amostra no acessório durante a análise de FTIR.

Em todos os espectros foi feita a correção da linha base. Cada espectro foi dividido em cinco regiões contínuas, em cada região foi traçada uma linha passando pela base das bandas (linha base) e em seguida foi realizada a subtração.

Na figura abaixo é mostrado um espectro de absorbância do esmalte dental bovino, com a identificação das bandas características deste tecido.

Espectro de absorção do esmalte dentário bovino hígido no infravermelho e a identificação das respectivas bandas.

Os espectros obtidos em uma amostra antes e após a desmineralização (hígido e desmineralizado, respectivamente) e após a irradiação (irradiado) são apresentados na figura abaixo. As bandas descritas anteriormente foram visualizadas em todas as análises. Por meio da comparação entre os espectros obtidos em uma mesma amostra notou-se que não houve modificação no posicionamento dos picos e na largura das bandas (*full width at half maximum*), indicando que não houve mudanças nos componentes do esmalte e na estrutura do material^{133, 134}.

Espectros de absorção obtidos no esmalte hígido, após a desmineralização e após a irradiação da amostra.

Nos gráficos seguintes são mostrados os espectros de duas amostras na região entre 2300 cm^{-1} e 1900 cm^{-1} , para cada momento de avaliação. Neste intervalo espectral foram descritas algumas bandas de absorção de compostos químicos que incluem o elemento carbono¹²⁸ e, portanto, estariam relacionadas ao material orgânico do esmalte. Notou-se a presença de bandas com intensidade de absorbância baixa, similar àquelas de ligações C-H. Por meio da comparação entre os espectros, observaram-se semelhanças e diferenças entre os momentos de avaliação, assim como entre as amostras. Entretanto, a água também possui uma banda de absorção nesta região^{128, 129} e, em virtude da presença de umidade no ambiente (mantida em torno de 40% por desumidificador), os espectros apresentaram ruído impossibilitando a caracterização das bandas orgânicas.

Espectros de absorção de duas amostras de esmalte bovino. A – amostras hígidas, B – amostras desmineralizadas, C – amostras desmineralizadas e irradiadas, D – bandas de ligações C-H em amostras hígidas.

Espectros de absorção de cada amostra antes e após a desmineralização (hígido e desmineralizado, respectivamente) e após a irradiação (irradiado). A - amostra 1, B - amostra 2.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 ARENDS, J.; TEN CATE, J.M. Tooth enamel remineralization. **J. Cryst. Growth**, v. 53, n. 1, p. 135-147, 1981.
- 2 NELSON, D.G. The influence of carbonate on the atomic structure and reactivity of hydroxyapatite. **J. Dent. Res.**, v. 60 n. Spec No C, p. 1621-1629, 1981.
- 3 ELLIOTT, J.C.; HOLCOMB, D.W.; YOUNG, R.A. Infrared determination of the degree of substitution of hydroxyl by carbonate ions in human dental enamel. **Calcif. Tissue Int.**, v. 37, n. 4, p. 372-375, 1985.
- 4 SIMMER, J.P.; FINCHAM, A.G. Molecular mechanisms of dental enamel formation. **Crit. Rev. Oral Biol. Med.**, v. 6, n. 2, p. 84-108, 1995.
- 5 AOBA, T. Solubility properties of human tooth mineral and pathogenesis of dental caries. **Oral Dis.**, v. 10, n. 5, p. 249-257, 2004.
- 6 FRANK, R.M. Tooth enamel: current state of the art. **J. Dent. Res.**, v. 58, n. Spec Issue B, p. 684-694, 1979.
- 7 PAINE, M.L.; WHITE, S.N.; LUO, W.; FONG, H.; SARIKAYA, M.; SNEAD, M.L. Regulated gene expression dictates enamel structure and tooth function. **Matrix Biol.**, v. 20, n. 5-6, p. 273-292, 2001.
- 8 FEATHERSTONE, J.D.; ROSENBERG, H. Lipid effect on the progress of artificial carious lesions in dental enamel. **Caries Res.**, v. 18, n. 1, p. 52-55, 1984.
- 9 FEJERSKOV, O. Changing paradigms in concepts on dental caries: consequences for oral health care. **Caries Res.**, v. 38, n. 3, p. 182-191, 2004.
- 10 LARSEN, M.J.; BRUUN, C. A química da cárie dentária e o flúor - mecanismo de ação. In: A. THYLSTRUP e O. FEJERSKOV (Ed.). **Cariologia Clínica**. São Paulo: Santos, 1995. p.231-257.
- 11 ZERO, D.T. Sugars - the arch criminal? **Caries Res.**, v. 38, n. 3, p. 277-285, 2004.
- 12 CURY, J.A. Uso do flúor e controle da cárie como doença. In: M. S. BARATIERI LN, ANDRADA MAC, VIEIRA LCC, RITTER AV, CARDOSO AC (Ed.). **Odontologia Restauradora: fundamentos e possibilidades**. São Paulo: Santos, 2001. p.33-68.

- 13 VAN NIEUW AMERONGEN, A.; BOLSCHER, J.G.; VEERMAN, E.C. Salivary proteins: protective and diagnostic value in cariology? *Caries Res.*, v. 38, n. 3, p. 247-253, 2004.
- 14 ARENDS, J.; CHRISTOFFERSEN, J. The nature of early caries lesions in enamel. *J. Dent. Res.*, v. 65, n. 1, p. 2-11, 1986.
- 15 FEATHERSTONE, J.D. The continuum of dental caries-evidence for a dynamic disease process. *J. Dent. Res.*, v. 83 n. Spec No C, p. C39-C42, 2004.
- 16 FEATHERSTONE, J.D. The science and practice of caries prevention. *J. Am. Dent. Assoc.*, v. 131, n. 7, p. 887-899, 2000.
- 17 MARGOLIS, H.C.; BENIASH, E.; FOWLER, C.E. Role of macromolecular assembly of enamel matrix proteins in enamel formation. *J. Dent. Res.*, v. 85, n. 9, p. 775-793, 2006.
- 18 GLIMCHER, M.J.; LEVINE, P.T. Studies of the proteins, peptides and free amino acids of mature bovine enamel. *Biochem. J.*, v. 98, n. 3, p. 742-753, 1966.
- 19 ROBINSON, C.; SHORE, R.C.; BROOKES, S.J.; STRAFFORD, S.; WOOD, S.R.; KIRKHAM, J. The chemistry of enamel caries. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, v. 11, n. 4, p. 481-495, 2000.
- 20 FLEMING, S.; TAWASHI, R. Dissolution Retardation of Dental Enamel with Special Reference to Protein Matrix. *Can. J. Pharm. Sci.*, v. 12, n. 3, p. 55-59, 1977.
- 21 HSU, C.Y.; JORDAN, T.H.; DEDERICH, D.N.; WEFEL, J.S. Effects of low-energy CO₂ laser irradiation and the organic matrix on inhibition of enamel demineralization. *J. Dent. Res.*, v. 79, n. 9, p. 1725-1730, 2000.
- 22 SATO, K. Relation between Acid Dissolution and Histological Alteration of Heated Tooth Enamel. *Caries Res.*, v. 17, n. 6, p. 490-495, 1983.
- 23 GARNETT, J.; DIEPPE, P. The effects of serum and human albumin on calcium hydroxyapatite crystal growth. *Biochem. J.*, v. 266, n. 3, p. 863-868, 1990.
- 24 ROBINSON, C.; SHORE, R.C.; BONASS, W.A.; BROOKES, S.J.; BOTEVA, E.; KIRKHAM, J. Identification of human serum albumin in human caries lesions of enamel: the role of putative inhibitors of remineralisation. *Caries Res.*, v. 32, n. 3, p. 193-199, 1998.

- 25 ROBINSON, C.; HALLSWORTH, A.S.; SHORE, R.C.; KIRKHAM, J. Effect of surface zone deproteinisation on the access of mineral ions into subsurface carious lesions of human enamel. **Caries Res.**, v. 24, n. 4, p. 226-230, 1990.
- 26 ANA, P.A.; BACHMANN, L.; ZECELL, D.M. Lasers effects on enamel for caries prevention. **Laser Phys.**, v. 16, n. 5, p. 865–875, 2006.
- 27 ESTEVES-OLIVEIRA, M.; ZECELL, D.M.; MEISTER, J.; FRANZEN, R.; STANZEL, S.; LAMPERT, F.; EDUARDO, C.P.; APEL, C. CO(2) Laser (10.6 μm) Parameters for Caries Prevention in Dental Enamel. **Caries Res.**, v. 43, n. 4, p. 261-268, 2009.
- 28 WESTERMAN, G.H.; FLAITSZ, C.M.; POWELL, G.L.; HICKS, M.J. Enamel caries initiation and progression after argon laser irradiation: *in vitro* argon laser systems comparison. **J. Clin. Laser Med. Surg.**, v. 20, n. 5, p. 257-262, 2002.
- 29 WESTERMAN, G.H.; HICKS, M.J.; FLAITSZ, C.; POWELL, G.L. In vitro enamel caries formation: argon laser, light-emitting diode and APF treatment effect. **Am. J. Dent.**, v. 17, n. 6, p. 383-387, 2004.
- 30 HICKS, J.; WINN, D., 2ND; FLAITSZ, C.; POWELL, L. *In vivo* caries formation in enamel following argon laser irradiation and combined fluoride and argon laser treatment: a clinical pilot study. **Quintessence Int.**, v. 35, n. 1, p. 15-20, 2004.
- 31 GOODMAN, B.D.; KAUFMAN, H.W. Effects of an argon laser on the crystalline properties and rate of dissolution in acid of tooth enamel in the presence of sodium fluoride. **J. Dent. Res.**, v. 56, n. 10, p. 1201-1207, 1977.
- 32 NAMMOUR, S.; ROCCA, J.P.; PIREAUX, J.J.; POWELL, G.L.; MORCIAUX, Y.; DEMORTIER, G. Increase of enamel fluoride retention by low fluence argon laser beam: a 6-month follow-up study *in vivo*. **Lasers Surg. Med.**, v. 36, n. 3, p. 220-224, 2005.
- 33 HICKS, M.J.; WESTERMAN, G.H.; FLAITSZ, C.M.; BLANKENAU, R.J.; POWELL, G.L.; BERG, J.H. Effects of argon laser irradiation and acidulated phosphate fluoride on root caries. **Am. J. Dent.**, v. 8, n. 1, p. 10-14, 1995.
- 34 KRAMER, N.; LOHBAUER, U.; GARCIA-GODOY, F.; FRANKENBERGER, R. Light curing of resin-based composites in the LED era. **Am. J. Dent.**, v. 21, n. 3, p. 135-142, 2008.
- 35 BUCHALLA, W.; ATTIN, T. External bleaching therapy with activation by heat, light or laser--a systematic review. **Dent. Mater.**, v. 23, n. 5, p. 586-596, 2007.

- 36 CHANG, C.J.; WILDER-SMITH, P. Topical application of photofrin for photodynamic diagnosis of oral neoplasms. **Plast. Reconstr. Surg.**, v. 115, n. 7, p. 1877-1886, 2005.
- 37 ZECELL, D.M.; RIBEIRO, A.C.; BACHMANN, L.; GOMES, A.S.L.; ROUSSEAU, C.; GIRKIN, J. Characterization of natural carious lesions by fluorescence spectroscopy at 405-nm excitation wavelength. **J. Biomed. opt.**, v. 12, n. 6, p. 1-5, 2007.
- 38 BOUILLAGUET, S.; CAILLOT, G.; FORCHELET, J.; CATTANI-LORENTE, M.; WATAHA, J.C.; KREJCI, N. Thermal risks from LED- and high-intensity QTH-curing units during polymerization of dental resins. **J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.**, v. 72B, n. 2, p. 260-267, 2005.
- 39 WESTERMAN, G.H.; HICKS, M.J.; FLAITSZ, C.M.; POWELL, G.L.; BLANKENAU, R.J. Surface morphology of sound enamel after argon laser irradiation: an *in vitro* scanning electron microscopic study. **J. Clin. Pediatr. Dent.**, v. 21, n. 1, p. 55-59, 1996.
- 40 ROBINSON, C.; HALLSWORTH, A.S.; SHORE, R.C.; KIRKHAM, J. Effect of surface zone deproteinization on the access of mineral ions into subsurface carious lesions of human enamel. **Caries Res.**, v. 24, n. 4, p. 226-230, 1990.
- 41 PAINE, M.L.; SNEAD, M.L. Protein interactions during assembly of the enamel organic extracellular matrix. **J. Bone Miner. Res.**, v. 12, n. 2, p. 221-227, 1997.
- 42 GLIMCHER, M.J.; BRICKLEY-PARSONS, D.; LEVINE, P.T. Studies of enamel proteins during maturation. **Calcif. Tissue Res.**, v. 24, n. 3, p. 259-270, 1977.
- 43 FINCHAM, A.G.; MORADIAN-OLDAK, J.; SIMMER, J.P. The structural biology of the developing dental enamel matrix. **J. Struct. Biol.**, v. 126, n. 3, p. 270-299, 1999.
- 44 ODUTUGA, A.A.; PROUT, R.E. Lipid analysis of human enamel and dentine. **Arch. Oral Biol.**, v. 19, n. 8, p. 729-731, 1974.
- 45 KIRKEBY, S.; MOE, D.; BOG-HANSEN, T.C.; SALLING, E. Electrophoretic demonstration of glycoproteins, lipoproteins, and phosphoproteins in human and bovine enamel. **Caries Res.**, v. 24, n. 3, p. 169-173, 1990.
- 46 GLIMCHER, M.J.; FRIBERG, U.A.; LEVINE, P.T. The isolation and amino acid composition of the enamel proteins of erupted bovine teeth. **Biochem. J.**, v. 93, n. 1, p. 202-210, 1964.

- 47 YOUNG, R.A. Implications of atomic substitutions and other structural details in apatites. *J. Dent. Res.*, v. 53, n. 2, p. 193-203, 1974.
- 48 NEWBRUN, E. *Cariology*. Baltimore, Maryland: Williams and Wilkins, 1978.
- 49 YOUNG, R.A. Biological apatite vs hydroxyapatite at the atomic level. *Clin. Orthop. Relat. Res.*, v., n. 113, p. 249-262, 1975.
- 50 LEGEROS, R.Z.; SAKAE, T.; BAUTISTA, C.; RETINO, M.; LEGEROS, J.P. Magnesium and carbonate in enamel and synthetic apatites. *Adv. Dent. Res.*, v. 10, n. 2, p. 225-231, 1996.
- 51 AOBA, T. The effect of fluoride on apatite structure and growth. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, v. 8, n. 2, p. 136-153, 1997.
- 52 LEGEROS, R.Z. Calcium phosphates in demineralization/remineralization processes. *J. Clin. Dent.*, v. 10, n. 2, p. 65-73, 1999.
- 53 WHITTAKER, D.K. Structural variations in the surface zone of human tooth enamel observed by scanning electron microscopy. *Arch. Oral Biol.*, v. 27, n. 5, p. 383-392, 1982.
- 54 NEWMAN, H.N.; POOLE, D.F. Observations with scanning and transmission electron microscopy on the structure of human surface enamel. *Arch. Oral Biol.*, v. 19, n. 12, p. 1135-1143, 1974.
- 55 FAVA, M.; WATANABE, I.; FAVA-DE-MORAES, F. Fine structure and histometry of the enamel prismless layer of unerupted third molar teeth. *Rev. Chil. Anat.*, v. 11, n. 1, p. 19-24, 1993.
- 56 MARGOLIS, H.C.; MORENO, E.C. Composition of pooled plaque fluid from caries-free and caries-positive individuals following sucrose exposure. *J. Dent. Res.*, v. 71, n. 11, p. 1776-1784, 1992.
- 57 FEATHERSTONE, J.D.; RODGERS, B.E. Effect of acetic, lactic and other organic acids on the formation of artificial carious lesions. *Caries Res.*, v. 15, n. 5, p. 377-385, 1981.
- 58 HALLSWORTH, A.S.; ROBINSON, C.; WEATHERBELL, J.A. Mineral and magnesium distribution within the approximal carious lesion of dental enamel. *Caries Res.*, v. 6, n. 2, p. 156-168, 1972.

- 59 HALLSWORTH, A.S.; WEATHERELL, J.A.; ROBINSON, C. Loss of carbonate during the first stages of enamel caries. ***Caries Res.***, v. 7, n. 4, p. 345-348, 1973.
- 60 YANAGISAWA, T.; MIAKE, Y. High-resolution electron microscopy of enamel-crystal demineralization and remineralization in carious lesions. ***J Electron. Microsc.***, v. 52, n. 6, p. 605-613, 2003.
- 61 EHRLICH, H.; KOUTSOUKOS, P.G.; DEMADIS, K.D.; POKROVSKY, O.S. Principles of demineralization: modern strategies for the isolation of organic frameworks. Part II. Decalcification. ***Micron***, v. 40, n. 2, p. 169-193, 2009.
- 62 ZHANG, Y.P.; KENT, R.L., JR.; MARGOLIS, H.C. Enamel demineralization under driving forces found in dental plaque fluid. ***Eur. J. Oral Sci.***, v. 108, n. 3, p. 207-213, 2000.
- 63 TANAKA, M.; MARGOLIS, H.C. Release of mineral ions in dental plaque following acid production. ***Arch. Oral Biol.***, v. 44, n. 3, p. 253-258, 1999.
- 64 LENANDER-LUMIKARI, M.; LOIMARANTA, V. Saliva and dental caries. ***Adv. Dent. Res.***, v. 14, n. 1, p. 40-47, 2000.
- 65 BARDOW, A.; MOE, D.; NYVAD, B.; NAUNTOFTE, B. The buffer capacity and buffer systems of human whole saliva measured without loss of CO₂. ***Arch. Oral Biol.***, v. 45, n. 1, p. 1-12, 2000.
- 66 KIDD, E.A.; FEJERSKOV, O. What constitutes dental caries? Histopathology of carious enamel and dentin related to the action of cariogenic biofilms. ***J. Dent. Res.***, v. 83 n. Spec No C, p. C35-38, 2004.
- 67 KONIG, K.G. Clinical manifestations and treatment of caries from 1953 to global changes in the 20th century. ***Caries Res.***, v. 38, n. 3, p. 168-172, 2004.
- 68 TEN CATE, J.M.; FEATHERSTONE, J.D. Mechanistic aspects of the interactions between fluoride and dental enamel. ***Crit. Rev. Oral Biol. Med.***, v. 2, n. 3, p. 283-296, 1991.
- 69 TEN CATE, J.M. Remineralization of caries lesions extending into dentin. ***J. Dent. Res.***, v. 80, n. 5, p. 1407-1411, 2001.
- 70 THYLSTRUP, A.; FEJERSKOV, O. Clinical and pathological features of dental caries. In: A. THYLSTRUP e O. FEJERSKOV (Ed.). ***Textbook of Clinical Cariology***. Copenhagen: Munksgaard, 1994. p.111-157.

- 71 NYVAD, B.; FEJERSKOV, O. Assessing the stage of caries lesion activity on the basis of clinical and microbiological examination. **Community Dent. Oral Epidemiol.**, v. 25, n. 1, p. 69-75, 1997.
- 72 KOULOURIDES, T.; KELLER, S.E.; MANSON-HING, L.; LILLEY, V. Enhancement of fluoride effectiveness by experimental cariogenic priming of human enamel. **Caries Res.**, v. 14, n. 1, p. 32-39, 1980.
- 73 LARSEN, M.J. An investigation of the theoretical background for the stability of the calcium-phosphate salts and their mutual conversion in aqueous solutions. **Arch. Oral Biol.**, v. 31, n. 11, p. 757-761, 1986.
- 74 FEATHERSTONE, J.D. Prevention and reversal of dental caries: role of low level fluoride. **Community Dent. Oral Epidemiol.**, v. 27, n. 1, p. 31-40, 1999.
- 75 FLAITSZ, C.M.; HICKS, M.J.; WESTERMAN, G.H.; BERG, J.H.; BLANKENAU, R.J.; POWELL, G.L. Argon laser irradiation and acidulated phosphate fluoride treatment in caries-like lesion formation in enamel: an in vitro study. **Pediatr Dent.**, v. 17, n. 1, p. 31-35, 1995.
- 76 HAIDER, S.M.; WHITE, G.E.; RICH, A. Combined effects of argon laser irradiation and fluoride treatments in prevention of caries-like lesion formation in enamel: an in vitro study. **J. Clin. Pediatr. Dent.**, v. 23, n. 3, p. 247-257, 1999.
- 77 HICKS, M.J.; FLAITSZ, C.M.; WESTERMAN, G.H.; BLANKENAU, R.J.; POWELL, G.L.; BERG, J.H. Enamel caries initiation and progression following low fluence (energy) argon laser and fluoride treatment. **J. Clin. Pediatr. Dent.**, v. 20, n. 1, p. 9-13, 1995.
- 78 ANDERSON, A.M.; KAO, E.; GLADWIN, M.; BENLI, O.; NGAN, P. The effects of argon laser irradiation on enamel decalcification: An in vivo study. **Am. J. Orthod. Dentofacial Orthop.**, v. 122, n. 3, p. 251-259, 2002.
- 79 BLANKENAU, R.J.; POWELL, G.; ELLIS, R.W.; WESTERMAN, G.H. In vivo caries-like lesion prevention with argon laser: pilot study. **J. Clin. Laser Med. Surg.**, v. 17, n. 6, p. 241-243, 1999.
- 80 FEATHERSTONE, J.D. Caries detection and prevention with laser energy. **Dent. Clin. North Am.**, v. 44, n. 4, p. 955-969, ix, 2000.
- 81 HUANG, D.; SWANSON, E.A.; LIN, C.P.; SCHUMAN, J.S.; STINSON, W.G.; CHANG, W.; HEE, M.R.; FLOTTE, T.; GREGORY, K.; PULIAFITO, C.A.; FUJIMOTO, J.G. Optical Coherence Tomography. **Science**, v. 254, n. 5035, p. 1178-1181, 1991.

- 82 FREITAS, A.Z.; ZECELL, D.M.; VIEIRA, N.D.; RIBEIRO, A.C.; GOMES, A.S.L. Imaging carious human dental tissue with optical coherence tomography. *J. Appl. Phys.*, v. 99, n. 2, p. 024906, 2006.
- 83 COLSTON, B.W.; EVERETT, M.J.; DA SILVA, L.B.; OTIS, L.L.; STROEVE, P.; NATHEL, H. Imaging of hard- and soft-tissue structure in the oral cavity by optical coherence tomography. *Appl. Opt.*, v. 37, n. 16, p. 3582-3585, 1998.
- 84 BRANDENBURG, R.; HALLER, B.; HAUGER, C. Real-time in vivo imaging of dental tissue by means of optical coherence tomography (OCT). *Opt. Commun.*, v. 227, n. 4-6, p. 203-211, 2003.
- 85 HEE, M.R.; IZATT, J.A.; SWANSON, E.A.; HUANG, D.; SCHUMAN, J.S.; LIN, C.P.; PULIAFITO, C.A.; FUJIMOTO, J.G. Optical coherence tomography of the human retina. *Arch. Ophthalmol.*, v. 113, n. 3, p. 325-332, 1995.
- 86 POPESCU, D.P.; SOWA, M.G.; HEWKO, M.D.; CHOO-SMITH, L.P. Assessment of early demineralization in teeth using the signal attenuation in optical coherence tomography images. *J. Biomed. Opt.*, v. 13, n. 5, p. 054053, 2008.
- 87 KO, A.C.; CHOO-SMITH, L.P.; HEWKO, M.; LEONARDI, L.; SOWA, M.G.; DONG, C.C.; WILLIAMS, P.; CLEGHORN, B. Ex vivo detection and characterization of early dental caries by optical coherence tomography and Raman spectroscopy. *J. Biomed. Opt.*, v. 10, n. 3, p. 031118, 2005.
- 88 JONES, R.S.; FRIED, D. Remineralization of enamel caries can decrease optical reflectivity. *J. Dent. Res.*, v. 85, n. 9, p. 804-808, 2006.
- 89 VAARKAMP, J.; TEN BOSCH, J.J.; VERDONSCHOT, E.H. Light propagation through teeth containing simulated caries lesions. *Phys. Med. Biol.*, v. 40, n. 8, p. 1375-1387, 1995.
- 90 DARLING, C.L.; HUYNH, G.D.; FRIED, D. Light scattering properties of natural and artificially demineralized dental enamel at 1310 nm. *J. Biomed. Opt.*, v. 11, n. 3, p. 34023, 2006.
- 91 FRIED, D.; XIE, J.; SHAFI, S.; FEATHERSTONE, J.D.; BREUNIG, T.M.; LE, C. Imaging caries lesions and lesion progression with polarization sensitive optical coherence tomography. *J. Biomed. Opt.*, v. 7, n. 4, p. 618-627, 2002.
- 92 FILOCHE, S.K.; SOMA, K.; SISSONS, C.H. Antimicrobial effects of essential oils in combination with chlorhexidine digluconate. *Oral Microbiol. Immunol.*, v. 20, n. 4, p. 221-225, 2005.

- 93 QUEIROZ, C.S.; HARA, A.T.; PAES LEME, A.F.; CURY, J.A. pH-cycling models to evaluate the effect of low fluoride dentifrice on enamel de- and remineralization. **Braz. Dent. J.**, v. 19, n. 1, p. 21-27, 2008.
- 94 MORENO, E.C.; ZAHRADNIK, R.T. Chemistry of enamel subsurface demineralization *in vitro*. **J. Dent. Res.**, v. 53, n. 2, p. 226-235, 1974.
- 95 TEN CATE, J.M.; DUIJSTERS, P.P. Alternating demineralization and remineralization of artificial enamel lesions. **Caries Res.**, v. 16, n. 3, p. 201-210, 1982.
- 96 FEATHERSTONE, J.D.; TEN CATE, J.M.; SHARIATI, M.; ARENDS, J. Comparison of artificial caries-like lesions by quantitative microradiography and microhardness profiles. **Caries Res.**, v. 17, n. 5, p. 385-391, 1983.
- 97 CURY, J.A.; HASHIZUME, L.N.; DEL BEL CURY, A.A.; TABCHOURY, C.P. Effect of dentifrice containing fluoride and/or baking soda on enamel demineralization/remineralization: an in situ study. **Caries Res.**, v. 35, n. 2, p. 106-110, 2001.
- 98 KIELBASSA, A.M.; WRBAS, K.T.; SCHULTE-MONTING, J.; HELLWIG, E. Correlation of transversal microradiography and microhardness on in situ-induced demineralization in irradiated and nonirradiated human dental enamel. **Arch. Oral Biol.**, v. 44, n. 3, p. 243-251, 1999.
- 99 TEN BOSCH, J.J.; ANGMAR-MANSSON, B. A review of quantitative methods for studies of mineral content of intra-oral caries lesions. **J. Dent. Res.**, v. 70, n. 1, p. 2-14, 1991.
- 100 WHITE, D.J.; FEATHERSTONE, J.D. A longitudinal microhardness analysis of fluoride dentifrice effects on lesion progression in vitro. **Caries Res.**, v. 21, n. 6, p. 502-512, 1987.
- 101 VIEIRA, A.E.; DELBEM, A.C.; SASSAKI, K.T.; RODRIGUES, E.; CURY, J.A.; CUNHA, R.F. Fluoride dose response in pH-cycling models using bovine enamel. **Caries Res.**, v. 39, n. 6, p. 514-520, 2005.
- 102 SHAPIRO, S.S.; WILK, M.B. An Analysis of Variance Test for Normality (Complete Samples). **Biometrika**, v. 52, n., p. 591-&, 1965.
- 103 JIMENEZ-PLANAS, A.; MARTIN, J.; ABALOS, C.; LLAMAS, R. Developments in polymerization lamps. **Quintessence Int.**, v. 39, n. 2, p. e74-84, 2008.

- 104 ARIKAWA, H.; KANIE, T.; FUJII, K.; TAKAHASHI, H.; BAN, S. Effect of inhomogeneity of light from light curing units on the surface hardness of composite resin. **Dent. Mater. J.**, v. 27, n. 1, p. 21-28, 2008.
- 105 RUEGGERBERG, F.A.; COLE, M.A.; LOONEY, S.W.; VICKERS, A.; SWIFT, E.J. Comparison of manufacturer-recommended exposure durations with those determined using biaxial flexure strength and scraped composite thickness among a variety of light-curing units. **J. Esthet. Restor. Dent.**, v. 21, n. 1, p. 43-61, 2009.
- 106 COUTINHO, D.S.; SILVEIRA, L., JR.; NICOLAU, R.A.; ZANIN, F.; BRUGNERA, A., JR. Comparison of temperature increase in in vitro human tooth pulp by different light sources in the dental whitening process. **Lasers Med. Sci.**, v. 24, n. 2, p. 179-185, 2009.
- 107 MELLBERG, J.R. Hard-tissue substrates for evaluation of cariogenic and anti-cariogenic activity in situ. **J. Dent. Res.**, v. 71 Spec No, n., p. 913-919, 1992.
- 108 PAES LEME, A.F.; TABCHOURY, C.P.; ZERO, D.T.; CURY, J.A. Effect of fluoridated dentifrice and acidulated phosphate fluoride application on early artificial carious lesions. **Am. J. Dent.**, v. 16, n. 2, p. 91-95, 2003.
- 109 ZERO, D.T. In situ caries models. **Adv. Dent. Res.**, v. 9, n. 3, p. 214-230; discussion 231-214, 1995.
- 110 SYDNEY-ZAX, M.; MAYER, I.; DEUTSCH, D. Carbonate content in developing human and bovine enamel. **J. Dent. Res.**, v. 70, n. 5, p. 913-916, 1991.
- 111 FEATHERSTONE, J.D.; PEARSON, S.; LEGEROS, R.Z. An infrared method for quantification of carbonate in carbonated apatites. **Caries Res.**, v. 18, n. 1, p. 63-66, 1984.
- 112 FEATHERSTONE, J.D.; MELLBERG, J.R. Relative rates of progress of artificial carious lesions in bovine, ovine and human enamel. **Caries Res.**, v. 15, n. 1, p. 109-114, 1981.
- 113 AMAECHI, B.T.; HIGHAM, S.M.; EDGAR, W.M. Factors influencing the development of dental erosion in vitro: enamel type, temperature and exposure time. **J. Oral Rehabil.**, v. 26, n. 8, p. 624-630, 1999.
- 114 EDMUNDS, D.H.; WHITTAKER, D.K.; GREEN, R.M. Suitability of human, bovine, equine, and ovine tooth enamel for studies of artificial bacterial carious lesions. **Caries Res.**, v. 22, n. 6, p. 327-336, 1988.

- 115 TEN CATE, J.M.; MUNDORFF-SHRESTHA, S.A. Working Group Report 1: Laboratory models for caries (in vitro and animal models). **Adv. Dent. Res.**, v. 9, n. 3, p. 332-334, 1995.
- 116 SCHEMEHORN, B.; ROBERTS, J.A.; WOOD, G.D. An in vitro remin/demin model showing a fluoride dose response. **J. Dent. Res.**, v. 73, n. special issue, p. 241-241, 1994.
- 117 CUMMINS. Working Group Report 3: Role of models in assessing new agents for caries prevention. **Adv. Dent. Res.**, v. 9, n. 3, p. 338-339, 1995.
- 118 KIELBASSA, A.M.; WRBAS, K.T.; SCHULTE-MONTING, J.; HELLWIG, E. Correlation of transversal microradiography and microhardness on in situ-induced demineralization in irradiated and nonirradiated human dental enamel. **Arch. Oral Biol.**, v. 44, n. 3, p. 243-251, 1999.
- 119 VIEIRA, A.E. **Metodologia para determinar a relação dose-resposta de produtos fluoretados utilizando esmalte bovino e modelo de ciclagem de pH**. 2003. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Araçatuba.
- 120 LAMMERS, P.C.; BORGGREVEN, J.M.; DRIESSENS, F.C. Acid-susceptibility of lesions in bovine enamel after remineralization at different pH values and in the presence of different fluoride concentrations. **J. Dent. Res.**, v. 70, n. 12, p. 1486-1490, 1991.
- 121 TEN CATE, J.M.; BUIJS, M.J.; MILLER, C.C.; EXTERKATE, R.A. Elevated fluoride products enhance remineralization of advanced enamel lesions. **J. Dent. Res.**, v. 87, n. 10, p. 943-947, 2008.
- 122 FELDCHTEIN, F.; GELIKONOV, V.; IKSANOV, R.; GELIKONOV, G.; KURANOV, R.; SERGEEV, A.; GLADKOVA, N.; OURUTINA, M.; REITZE, D.; WARREN, J. In vivo OCT imaging of hard and soft tissue of the oral cavity. **Opt. Express.**, v. 3, n. 6, p. 239-250, 1998.
- 123 JONES, R.S.; DARLING, C.L.; FEATHERSTONE, J.D.; FRIED, D. Imaging artificial caries on the occlusal surfaces with polarization-sensitive optical coherence tomography. **Caries Res.**, v. 40, n. 2, p. 81-89, 2006.
- 124 QUEIROZ, C.S. **Modelos de estudos in vitro para avaliar o efeito do fluoreto na desmineralização e remineralização do esmalte e dentina**. 2004. Tese (Doutorado) - Unicamp, Campinas.

- 125 MIAKE, Y.; SAEKI, Y.; TAKAHASHI, M.; YANAGISAWA, T. Remineralization effects of xylitol on demineralized enamel. **J. Electron Microsc.**, v. 52, n. 5, p. 471-476, 2003.
- 126 JONES, R.S.; DARLING, C.L.; FEATHERSTONE, J.D.; FRIED, D. Remineralization of in vitro dental caries assessed with polarization-sensitive optical coherence tomography. **J. Biomed. Opt.**, v. 11, n. 1, p. 014016, 2006.
- 127 SPITZER, D.; BOSCH, J.T. The absorption and scattering of light in bovine and human dental enamel. **Calcif. Tissue Res.**, v. 17, n. 2, p. 129-137, 1975.
- 128 BACHMANN, L.; DIEBOLDER, R.; HIBST, R.; ZECELL, D.M. Infrared absorption bands of enamel and dentin tissues from human and bovine teeth. **Appl. Spectrosc. Rev.**, v. 38, n. 1, p. 1-14, 2003.
- 129 BACHMANN, L.; ZECELL, D.M. **Estrutura e Composição do Esmalte e da Dentina**. São Paulo: Editora Livraria da Física, 2005.
- 130 NIEMZ, M.H. Interaction mechanism. In: M. H. NIEMZ (Ed.). **Laser-tissue interactions: Fundamental and applications**. New York: Springer-Verlag Berlin Heidelberg 1996. p.45-150.
- 131 ANA, P.A. **Estudo in vitro da resistência à desmineralização e da retenção de flúor em esmalte dental irradiado com laser de Er,Cr:YSGG**. 2007. (Doutorado) - Universidade de São Paulo, São Paulo.
- 132 DOUGLAS A. SKOOG; F. JAMES HOLLER; NIEMAN, T.A. An Introduction to Infrared Spectrometry. In: DOUGLAS A. SKOOG, F. JAMES HOLLER, *et al* (Ed.). **Principles of instrumental analysis** Orlando: Harcourt Brace College Publishers, 1998. p.380-403.
- 133 OU-YANG, H.; PASCHALIS, E.P.; MAYO, W.E.; BOSKEY, A.L.; MENDELSON, R. Infrared microscopic imaging of bone: spatial distribution of CO₃(²⁻). **J. Bone Miner. Res.**, v. 16, n. 5, p. 893-900, 2001.
- 134 LEBON, M.; REICHE, I.; FROHLICH, F.; BAHAIN, J.J.; FALGUERES, C. Characterization of archaeological burnt bones: contribution of a new analytical protocol based on derivative FTIR spectroscopy and curve fitting of the $\nu(1)\nu(3)$ PO₄ domain. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 392, n. 7-8, p. 1479-1488, 2008.