INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia Associada à Universidade de São Paulo

Avaliação dos efeitos preventivos do laser de Nd:YAG e fluoreto sobre a cárie dental por meio da tomografia por coerência óptica

MARCIA CRISTINA DIAS DE MORAES

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Doutor em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear - Materiais

Orientador:

Prof. Dr. Anderson Zanardi de Freitas

Coorientadora:

Profa. Dra. Denise Maria Zezell

São Paulo
2018

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia Associada à Universidade de São Paulo

**Avaliação dos efeitos preventivos do laser de Nd:YAG e fluoreto sobre a
cárie dental por meio da tomografia por coerência óptica**

MARCIA CRISTINA DIAS DE MORAES

**Tese apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
Doutor em Ciências na Área
de Tecnologia Nuclear - Materiais**

Orientador:

Prof. Dr. Anderson Zanardi de Freitas

Coorientadora:

Profa. Dra. Denise Maria Zezell

**São Paulo
2018**

Auxílio: FAPESP/CEPID (05/51689-2); CNPq/INCT (465763/2014-6); CNPq/PQ (309902/2017-7); CAPES/PROCAD (8881.068505/2014-01); FAPESP (2013/09311-9).
Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Moraes, Marcia Cristina Dias de

Avaliação dos Efeitos Preventivos do laser de Nd:YAG e Fluoreto sobre a Cárie Dental por meio da Tomografia por Coerência Óptica.

Tese (Doutorado em Tecnologia Nuclear – Materiais)- Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares(IPEN) da Universidade de São Paulo, 2018.

Orientador: Prof. Dr. Anderson Zanardi de Freitas

Coorientadora: Profa. Dra. Denise Maria Zezell

1-OCT, 2- Laser de Nd:YAG, 3- Microdureza Knoop, 4- FTIR, 5-Cárie Dental, 6- Esmalte dental

FOLHA DE APROVAÇÃO

Autor: Marcia Cristina Dias de Moraes

Título: Avaliação dos Efeitos Preventivos do Laser de Nd:YAG e Fluoreto sobre a Cárie Dental por meio da Tomografia por Coerência Óptica

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em
Tecnologia Nuclear: Área de Concentração: Materiais, da
Universidade de São Paulo para obtenção do Grau de Doutor em
Ciências

Data: 07 /08 / 2018

Banca Examinadora

Prof. Dr Marcelo Giannini.

Instituição Faculdade de Odontologia de Piracicaba / UNICAMP Julgamento _____

Profa. Dra Cristina Kurachi

Instituição Instituto de Física de São Carlos / USP Julgamento _____

Prof. Dr Marcus Paulo Rael

Instituição: Centro de Lasers e Aplicações / IPEN Julgamento _____

Prof. Dr Anderson Zanardi de Freitas

Instituição: Centro de Lasers e Aplicações / IPEN Julgamento _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho:

Mais uma vez, ao meu marido, meu amigo, **Paulo Ney**, que me apoiou e incentivou em mais esta etapa profissional, pelas palavras de incentivo, aguentando as crises de ansiedade, as noites acordada até tarde, as viagens para congressos, que atendeu meus pacientes quando eu estava longe, e por ainda sentir saudades de mim!

Às minhas filhas, **Thaísa** e **Priscilla**, agora juntamente com o meu genro **Gabriel**, pela estrutura familiar, que me permite a concentração que o projeto exigiu, e que me estimulam a buscar sempre mais...

Ao meu pai **José Rodrigues Dias Filho (Prof. Dias, Zé Dias, Neném)**, (*in memoriam*), pelo exemplo de família e dedicação, pelos valores transmitidos e praticados. Pelo amor que sempre nos dedicou...

À minha mãe **Terezinha L. Dias**. Brava, protetora, matriarca da nossa família, pela base que nos orientará pelo resto de nossas vidas. Que sejamos merecedores de tudo o que fizeram por nós.

À minha irmã **Carla**, fortaleza que segurou a barra durante os momentos mais difíceis por que todos passamos ... ao meu cunhado **João**, por todo o apoio à nossa (e sua) família.

Ao meu irmão **Paulo** e à minha cunhada **Christiane**, pela amizade e amor de sempre.

À minha prima, **Sonia Dias**, por me aturar mais uma vez no cafofo, pela companhia e pela alegria de sempre.

Aos meus queridos amigos /irmãos **Rosângela Gelly** e **Dalton Chiarelli**. Por serem vocês. Por toda a ajuda, por elevar a minha moral, pela cumplicidade.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Aos meus Orientadores

Profa. Dra. Denise Maria Zezell e Prof. Dr. Anderson Zanardi de Freitas

Prof. Dr. Anderson Zanardi de Freitas e Profa. Dra. Denise Maria Zezell

Pela alternância nas orientações; pela paciência; pelo carinho; pela amizade; pelo apoio em todos os momentos; pela convivência durante os últimos quatro anos; pela compreensão; pela transferência de conhecimentos; pela confiança em mim depositada; e principalmente pelo estímulo durante o desenvolvimento deste trabalho.

Obrigada por tudo! De coração!

AGRADECIMENTOS

À Universidade de São Paulo (USP), na pessoa do magnífico reitor **Prof. Dr. Vahan Agopyan** e ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN- CNEN/ SP) na pessoa do ilustríssimo superintendente **Prof. Dr. Wilson Aparecido Parejo Calvo**, meus sinceros agradecimentos.

À **Prof. Dra Denise Maria Zzell**, agora não na qualidade de orientadora, mas na qualidade de amiga, pelas conversas, pela companhia nos passeios, pelo brinde após a Qualificação do trabalho, pelas caronas, risadas e conversas e enfim, pelo exemplo em tudo.

À **Prof. Dra Patrícia Aparecida da Ana** (UFABC) pela ajuda com as minhas dúvidas infundáveis que surgiram ao longo do doutorado, pelo exemplo de simpatia, alegria, competência e profissionalismo!

À **Daísa**

Daísa

Daísa de Lima Pereira, pela amizade, pela companhia, por todas as nossas ponderações e debates no laboratório, pela hospedagem, pela ajuda com cronogramas e sempre que eu entrava em “modo alfa”, pela ajuda com a parte de estatística, e pelos projetos que se Deus quiser, um dia faremos, por tudo!

Ao amigo **Pedro A. A. Castro**, pela ajuda com a aquisição dos espectros de ATR – FTIR.

Ao meu amigo **Cássio A. Lima**, além da ajuda com cálculos, fundamentos e apresentações, por todas as risadas, cafés e montanhas-russas, momentos de descontração tão necessários!

À **Cláudia Bianchi Zamataro**, colega de profissão, pela sua presença alegre, pela sua competência no laboratório, amiga nova e já considerada antiga, pela ajuda no entendimento do nosso contexto no campo da pesquisa!

Aos amigos do Laboratório de Biofotônica do Centro de Lasers e Aplicações, **Gabriela Cunha**, **Derly Dias**, **Lúcia Regina Cavalcanti**, **Marcello Magri**, **Mariella Gottardi**, **Nathalia Alves**, **Suzy Ogushi**, pelo nosso convívio sempre agradável!

Ao amigo **Lucas Ramos de Pettro** pela simpatia e pela força com o microdurômetro e as dúvidas nas disciplinas obrigatórias.

Aos amigos *Aryel Heitor* e *Luciana Vasques*, pela companhia, cumplicidade e estímulo durante os créditos obrigatórios!!! Saudades!

Aos professores do **Centro de Lasers e Aplicações (CLA)** nas pessoas dos *Professores Doutores Eduardo Landulfo, Gessé Eduardo Calvo Nogueira, Marcus Paulo Raele, Martha Simões Ribeiro, Niklaus Ursus Wetter, Nilson Dias Vieira Jr, Ricardo Elgul Samad, Sônia Lícia Baldochi*, pelo acolhimento nesta Instituição.

Ao técnico do **Laboratório de Biofotônica do CLA**, *Valdir de Oliveira* pela amizade, receptividade, e risadas, além de toda a ajuda para a realização deste trabalho.

À secretária do CLA, *Sra. Sueli Venancio*, pela delicadeza e prestatividade com que sempre recebe os alunos.

Ao *Marcos Antônio Scapin, Marco Hortellani e José Tort* pela solicitude sempre que necessário.

Aos técnicos da oficina *Marco Antônio Andrade e Paulo César da Silva* pela ajuda na solução de detalhes, sempre com um sorriso no rosto...

À *D. Marta de Jesus da Silva*, pela conversa e pelo café salvador de todos os dias!

Quando os meus filhos

disserem aos meus netos

O quanto eu os amava;

e quando os meus netos

disserem aos meus filhos

que guardam lembranças minhas

e de mim sentem saudade,

não terei morrido nunca:

serei eternidade!

Ronaldo Cunha Lima

RESUMO

MORAES, M.C.D. **Avaliação dos efeitos preventivos do laser de Nd:YAG e fluoreto sobre a cárie dental por meio da tomografia por coerência óptica.** 2018. 103 p. Tese (Doutorado em Tecnologia Nuclear) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN – CNEN/SP. São Paulo.

Este trabalho teve por objetivo correlacionar as alterações nos coeficientes de atenuação óptica obtidos por meio da técnica de OCT, com os valores obtidos em testes de microdureza seccional Knoop ao longo do tempo, em amostras de esmalte dental irradiadas com o laser de Nd:YAG e o Flúor Fosfato Acidulado (FFA) visando a prevenção de lesões de cárie em esmalte dental humano *in vitro*. Foram utilizadas 160 amostras de esmalte dental obtidas a partir de 40 molares humanos, divididas em 04 grupos: grupo Controle (onde nenhum tratamento foi realizado); grupo Fluoreto (FFA - flúor fosfato acidulado durante 4 minutos); grupo Fluoreto-Laser: aplicação de FFA seguido de irradiação com laser de Nd:YAG ($DE=84,9 \text{ J/cm}^2$, modo contato, com o uso de pasta de carvão como fotoabsorvedor); grupo Laser-fluoreto (irradiação com laser de Nd:YAG seguido da aplicação de FFA). Os grupos foram submetidos a ciclagem de pH durante 20 dias. Nos dias 5, 10, 15 e 20, 10 amostras de cada grupo foram removidas da ciclagem para a realização do teste de microdureza seccional Knoop. Duas amostras de cada grupo, a cada tempo, foram aleatoriamente selecionadas para a análise com ATR-FTIR (Espectroscopia por Transformada de Fourier associada a técnica de Reflexão Total Atenuada). A correlação entre os valores de microdureza seccional e o coeficiente de atenuação óptica medido por meio de OCT em esmalte dental irradiado comprovou que a associação entre a aplicação de fluoreto e a irradiação com laser de Nd:YAG é uma importante ferramenta para a prevenção da desmineralização do esmalte dental. A análise por meio de ATR-FTIR evidenciou alterações na composição química nas amostras dos grupos irradiados em relação ao grupo Controle e Fluoreto. Foi observada uma relação direta entre os valores de perda mineral e os valores dos coeficientes de atenuação óptica. O grupo FL apresentou os menores valores de coeficientes de atenuação óptica e de perda mineral ($p<0,05$) em relação ao grupo Controle.

Palavras-chave: 1- OCT, 2- Laser de Nd:YAG, 3 Coeficiente de atenuação óptica, 4- Microdureza Knoop, 5 - FTIR, 6- Cárie Dental, 7-Esmalte dental.

ABSTRACT

MORAES, M.C.D. **Evaluation of the preventive effects of the Nd: YAG laser and fluoride on dental caries through optical coherence tomography.** 2018. 103 p. Tese (Doutorado em Tecnologia Nuclear) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN – CNEN/SP. São Paulo.

The purpose of this work was to correlate the changes in the optical attenuation coefficients obtained through the OCT technique with the values obtained in Knoop sectional microhardness tests over time in dental human enamel samples irradiated with the Nd: YAG laser and Acid Phosphate Fluoride (APF), aiming the prevention of enamel caries lesions *in vitro*. 160 tooth enamel samples, obtained from 40 human molars, were divided into 4 groups: Control group (where no treatment was performed); Fluoride group (APF - fluoride phosphate acidulated for 4 minutes); Fluoride-Laser group: APF followed by irradiation with Nd: YAG laser ($DE = 84.9 \text{ J / cm}^2$, contact mode, with the use of carbon paste as photoabsorbent); Laser-fluoride group (irradiation with Nd: YAG laser followed by APF). The groups were subjected to pH cycling for 20 days. On days 5, 10, 15 and 20, 10 samples from each group were removed from the cycling for the Knoop sectional microhardness test. Two samples of each group, at each time, were randomly selected for the analysis with FTIR ATR (Fourier transform spectroscopy associated with attenuated total reflection technique). The correlation between the values of sectional microhardness tests and the measured optical attenuation coefficient by OCT in irradiated dental enamel showed that the association between fluoride application and Nd:YAG laser irradiation is an important tool for the prevention of tooth enamel demineralization. The analysis by ATR-FTIR showed changes in the chemical composition of the samples of the irradiated groups compared to Control and Fluoride group. A direct correlation between mineral loss values and the values of optical attenuation coefficient was observed. The FL group showed lower values of optical attenuation coefficients and mineral loss ($p < 0.05$) compared to Control group.

Keywords: 1- OCT, 2- Nd: YAG Laser, 3- Optical Attenuation Coefficient, 4 - Knoop Microhardness, 5 – FTIR, 6- Dental caries, 7- Dental Enamel

LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 1: Diagrama representando a interação dos fatores primários para o desenvolvimento da doença cárie e a influência dos fatores protetores e de risco.....	22
Figura 2: Dimensões do cristal de HAP e dos prismas de esmalte.....	28
Figura 3: Curva de Stephan.....	33
Figura 4: Eventos químicos da cárie após a dissolução da minerais provenientes dos tecidos dentais de acordo com a presença de diferentes íons no meio.	34
Figura 5: Coeficientes de absorção da HAP carbonatada e H ₂ O em função dos comprimentos de onda dos lasers. Os picos de absorção representam os componentes dos radicais moleculares (hidroxila, água livre, carbonato e fosfato).	42
Figura 6: Esmalte adjacente à região de incidência do feixe de laser de CO ₂ ; 20 W; 1 a 4 mm; 0,1 a 5s; DE = 15 a 12000J/cm ₂ ; DP= 150 a 2400 W/ cm ₂ ; C= trincas; I = carbonização; N= esmalte normal.	45
Figura 7: Localização do laser de Nd:YAG (1064 nm) no espectro de absorção dos principais componentes dos tecidos biológicos.....	48
Figura 8: Diagrama da metáfora do iceberg para a cárie dentária, identificando as fases da cárie registradas em diferentes limiares diagnósticos. O índice cpo (dentes decíduos) e CPO (dentes permanentes) é usado para quantificar a experiência de cárie, que é a soma de dentes cariados, perdidos e obturados. O pontilhado refere-se ao limite do diagnóstico utilizado. De /DE refere-se a cárie de esmalte ou dentina, enquanto e / E refere-se apenas a cárie em esmalte.....	51
Figura 9: Aspectos visuais associados ao ICDAS.....	53
Figura 10: Árvore de decisão de diagnóstico	54
Figura 11: Lesão de cárie após exposição à sacarose 8 x /dia: R – resina de embutimento; S – superfície de esmalte; L – extensão da lesão subsuperficial, E- esmalte íntegro. Na fotografia observa-se Lesões de Cárie visíveis clinicamente – Manchas Brancas.	55
Figura 12: Interação da luz com os tecidos dentais: a) Reflexão; b) Espalhamento; c) Transmissão; d) Absorção com produção de calor; e) Absorção com liberação de fluorescência; f) Retro Espalhamento.	56
Figura 13: Coeficientes de atenuação do esmalte dental e coeficientes de absorção da água. Adaptado de Jones et al (2003)	57
Figura 14: Superfícies oclusais de acordo com a técnica QS-Occlusal, obtidas por meio de QLF-D (luz branca e imagens de fluorescência) e microscopia de luz polarizada (PLM).....	59
Figura 15: Comparação da resolução e penetração da OCT com ultrassom e microscopia confocal	60

Figura 16: Representação esquemática da varredura da amostra por meio da técnica da OCT.	61
Figura 17: Diagrama representando as dimensões das estruturas que compõem o esmalte e a dentina.	62
Figura 18: Construção de imagens a partir de uma sequência de A-Scans realizados por meio da técnica de OCT.....	63
Figura 19 : Amostra avaliada por: a) Histologia; b) OCT 1300 nm; c) OCT 840 nm. Esmalte (E), dentina (D) e junção amelo-dentinária (seta). Nota-se a semelhança entre as imagens.....	63
Figura 20: a) imagem de MLP de uma fôssula oclusal hígida. Há ausência de áreas castanho-escuras e pretas (conforme indicado pelo asterisco *); b) imagem MLP de uma lesão cariiosa não cavitada em fôssula. Há áreas de marrom escuro e preto (como mostrado por setas tracejadas) no local; c) imagem de OCT B-scan correspondente da fissura hígida em (a). Há uma borda de superfície distinta limitada a um a dois pixels de espessura na faixa amarela / vermelha (-15dB a -5dB) e ausência de bandas subsuperficiais e difusas de intensidade elevada na faixa amarela / vermelha (-15dB para - 5dB) do mapa de cores (conforme indicado pelo asterisco *). A reflexão especular é mostrada pela seta sólida; d) B-scan de OCT correspondente à lesão de carie não cavitada em (b). Há presença de bandas difusas subsuperficiais de intensidade elevada (como mostrado por setas tracejadas) aparecendo na faixa amarela / vermelha (-15dB a -5dB) do mapa de cores.	65
Figura 21: Comparação entre os ângulos de espalhamento da luz em uma área saudável (azul) e desmineralizada (vermelho), relacionadas com a imagem de microscopia digital em alta resolução (círculos azul e preto à direita na imagem).	67
Figura 22: Sequência de preparo das amostras: a) separação coroa/raiz e secção da coroa em 4 porções; b) proteção da superfície com exceção da janela de 2 x 3 mm.....	72
Figura 23: Análise com OCT da superfície Baseline, onde se observa uma superfície uniforme, com perfeita visualização das margens do verniz ácido resistente, que delimitam a área que foi submetida à ciclagem de pH.	72
Figura 24: Amostra descartada em função da detecção de áreas de desmineralização na subsuperfície durante a análise inicial das amostras com OCT(baseline).	73
Figura 25: Amostra descartada após a detecção de uma trinca durante a obtenção das imagens de OCT da superfície baseline	73
Figura 26: Laser de Nd:YAG, 1064 nm, Power Laser™ ST6.....	74
Figura 27: Amostras (escolhidas aleatoriamente), onde se observa a camada de fotoabsorvedor antes da irradiação com o laser de Nd:YAG (a), e imediatamente após quase não são visualizados resíduos da mesma (b), antes da lavagem com água MiliQ.....	75
Figura 28: a) Inclusão das amostras para possibilitar a identificação, imersão nas soluções de ciclagem de pH e posterior secção para o teste de MD; b) amostras posicionadas suspensas nos tubos Falcon contendo as soluções DES ou RE (na foto, DES)	76

Figura 29: Posicionamento da amostra para análise por meioda técnica de OCT (OCT 930 nm – Thorlabs Inc. USA).....	78
Figura 30: Imagem em tons de cinza da seção transversal da amostra 24 LF5.....	78
Figura 31: Imagem da área exposta na amostra. As linhas horizontais mostram as 3 seções transversais analisadas, sendo uma no centro, e as outras 2 deslocadas 75 µm em direções opostas a partir do centro. A linha pontilhada vertical mostra o ponto onde as amostram foram seccionadas para a realização do teste de microdureza seccional Knoop.	79
Figura 32: Velocidade de decaimento exponencial da intensidade do sinal de OCT em função da desmineralização da amostra 68 do grupo FL no momento baseline (linha azul) e após 10 dias de ciclagem de pH (linha vermelha), destacando-se ainda a menor refletividade na superfície em função da desmineralização.	79
Figura 33: As linhas branca e vermelha delimitam a ROI com 2000 µm para cálculo do coeficiente de atenuação óptica, que representa a média de todas as colunas contidas na ROI. A segunda imagem mostra uma área com lesão subsuperficial de cárie em uma amostra do grupo Controle, no dia 5 do processo de ciclagem de pH.	80
Figura 34: Exemplo de planilha gerada pelo software com o registro dos parâmetros como profundidade de análise, fator de correlação R-Square, coeficiente de atenuação óptica calculado. O sinal negativo indica o decaimento exponencial da intensidade do sinal deOCT.	81
Figura 35: Interface do software usado para calcular o coeficiente de atenuação óptica. No topo da imagem, em azul, a seleção da ROI com o posicionamento das linhas branca e vermelha. Na janela abaixo a posição das linhas branca e vermelha marcam a profundidade analisada, e a curva amarela mostra o decaimento exponencial do sinal de OCT.....	82
Figura 36: Amostras seccionadas transversalmente à direção das análises com OCT, evidenciando o corte conservador obtido.	83
Figura 37: a) Pirâmide Knoop; b) sequência de linhas de endentação no esmalte dental, com distância de 250 micrometros entre elas.....	84
Figura 38: Amostra já seccionada, no momento da indentação para cálculo do valor de microdureza Knoop na área submetida à ciclagem de pH	84
Figura 39 Amostra do grupo F após o 5º dia de ciclagem de pH. É possível ver a organização dos prismas de esmalte (P) e uma camada alterada, atribuído à ação do fluoreto (A).....	84
Figura 40: Amostra do grupo FL - 15º dia, indentação a 20 µm da borda do dente. E=Esmalte, A= Ar.....	85
Figura 41: Exemplo de posicionamento das amostras no equipamento ATR-FTIR Thermo SScientific Nicolet	86

Figura 42: Amostra 63 do grupo Controle – Imagens B-Scan (alteração visível no contorno na superfície do esmalte) e de vídeo ao longo do tempo, e o aspecto da lesão induzida de cárie no esmalte após a remoção do verniz ácido resistente.	89
Figura 43: Amostra 35 F – Imagens B-Scan e de vídeo ao longo do tempo.....	90
Figura 44: Amostra 32 F, no dia 20 do processo de ciclagem de pH, evidenciando a presença de lesão subsuperficial de cárie, e os picos na tela da análise do coeficiente de atenuação óptica devido às diferenças entre os índices de refração ar / superfície do esmalte e lesão subsuperficial/esmalte dental.....	91
Figura 45: Amostra 81, Grupo Fluoreto-Laser – Imagens B-Scan e de vídeo ao longo do tempo...	92
Figura 46: Amostra 65 FL, no dia 20 do processo de ciclagem de pH, onde não se evidenciam novos picos relativos a mudanças adicionais no índice de refração na amostra, característicos na presença de lesão subsuperficial de cárie	93
Figura 47: Amostra 93 FL, retirada do processo de ciclagem de pH no dia 05	94
Figura 48: Amostra 88, Grupo Laser-Fluoreto – Imagens B-Scan e de vídeo ao longo do tempo..	94
Figura 49: a) Amostra 8 LF, dia 5 da ciclagem de pH após ser seccionada; b) Imagem B-scan correspondente.....	96
Figura 50: Amostra 62, Grupo Controle, dia 5. Observa-se a formação de lesão subsuperficial de cárie na janela em azul, e na janela da curva do coeficiente de atenuação óptica (seta amarela) aparece com um segundo pico relacionado à diferença no índice de refração devido à porosidade logo abaixo da superfície	99
Figura 51 - amostra do grupo Fluoreto no dia 20, apresentando os 2 picos no sinal de OCT, característicos de lesão subsuperficial de cárie.	101
Figura 52: Amostra 11 LF, no dia 5 da ciclagem de pH. Observa-se uma diferença no formato e padrão de orientação dos prismas de esmalte na área irradiada (I) e não irradiada da amostra (NI)	106
Figura 53: Ilustração da diferença das áreas sob a curva referente à projeção da amostra hígida, e da área calculada (perda mineral) correspondente ao Delta Z.	107
Figura 54: Gráficos representativos da perda mineral de cada grupo ao longo do tempo. Letras diferentes significam que houve diferença com significância estatística entre os grupos após o teste de Tukey ($p < 0,05$).	108
Figura 55: Gráficos comparativos da perda mineral entre os grupos em cada tempo. Nos primeiros 5 dias,.....	109
Figura 56: Amostra 12 C no dia 5 da ciclagem de pH. Ao microscópio acoplado ao microdurômetro (100 e 400X) foi observado o rompimento da camada superficial, provavelmente em função do polimento da amostra para a realização das medidas.	110

Figura 57: Imagens de OCT da amostra 12 do grupo C, no momento baseline (a) e no dia 5 da ciclagem de pH (b), onde se observa a presença da lesão subsuperficial.	110
Figura 58: Tentativa de indentação na borda da amostra 108 C no dia 05, indicando desmineralização excessiva neste local e a necessidade de se buscar outro local onde fosse possível selecionar de modo adequado a área da indentação realizada.	111
Figura 59: Avanço da desmineralização para regiões localizadas abaixo do verniz ácido resistente (traço amarelo pontilhado) em uma amostra do grupo C, no dia 15 da ciclagem de pH.	112
Figura 60: Amostra 65 FL, submetida a 20 dias de ciclagem de pH. Apesar da quantidade de porosidades, as áreas mais proeminentes ainda suportavam a carga exercida pelo dispositivo, apresentando valores compatíveis com o esmalte dental sadio, o que sugere uma ação efetiva da radiação com laser em alta intensidade na prevenção da desmineralização do esmalte em profundidade. As áreas em destaque estão ampliadas com seus respectivos valores de microdureza Knoop (a e b).....	112
Figura 61: Amostra 97F, no dia 20 da ciclagem de pH (microscópio acoplado ao microdurômetro (400 X). Os valores medidos entre as porosidades nas amostras de grupo apresentaram valores inferiores aos das amostras irradiadas com laser de Nd:YAG em alta intensidade.	113
Figura 62: Comparação da obtenção das médias dos coeficientes de atenuação óptica e de microdureza Knoop. Em (a) para o cálculo do coeficiente de atenuação óptica, acontece um ajuste automático da superfície da região analisada. O software utilizado “desloca” as irregularidades, de modo a considerar a mesma profundidade em todas as colunas contidas na ROI. Em (b), o operador seleciona as regiões na amostra onde serão efetuadas as indentações para o cálculo da microdureza.	114
Figura 63: Gráficos relacionando as médias dos coeficientes de atenuação óptica com as médias dos valores de microdureza Knoop, para as profundidades de 20 – 120 μm , nos diferentes dias da ciclagem de pH. O sinal negativo é devido ao decaimento exponencial da intensidade do sinal de OCT.	114
Figura 64: Amostra 49 C no dia 15 da ciclagem de pH, onde é possível visualizar uma grande perda de tecido e alteração do contorno da amostra. Em amostras onde a desmineralização foi muito intensa, as medições precisaram ser feitas o mais próximo possível das bordas da lesão criada, o que dificulta a comparação com valores obtidos a partir de amostras que não sofreram uma perda de tecido equivalente.	115
Figura 65: Diferentes tempos no processo de desmineralização. a) lesão no 10º dia de ciclagem de pH; b) lesão mais avançada com perda de esmalte, no 20º dia de ciclagem.....	115
Figura 66: Espectros obtidos por ATR-FTIR das amostras de esmalte. Observou-se uma alteração nas bandas de absorção do carbonato ($\sim 1400\text{ cm}^{-1}$), nas bandas do fosfato ($\sim 561\text{ cm}^{-1}$ e $\sim 602\text{ cm}^{-1}$) e na região de superposição entre os modos ν_1 - ν_3 do fosfato da HAP ($900 - 1180\text{ cm}^{-1}$).	116

LISTA DE GRÁFICOS

Página

Gráfico 1: Distribuição dos valores dos coeficientes de atenuação óptica para a profundidade de 20 a 120 μm das amostras de esmalte dental antes do início do processo de ciclagem de pH e da distribuição de modo aleatório entre os grupos A linha vermelha representa o valor médio de $-3,22\text{E}-02 \mu\text{m}^{-1}$ para todas as amostras.....	88
Gráfico 2: Variação da média dos coeficientes de atenuação óptica calculados por meio da técnica de OCT para o grupo Controle. As barras verticais representam o erro padrão das médias. Letras diferentes significam que há diferença estatística entre os tempos, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0.05$).....	89
Gráfico 3: Variação da média dos coeficientes de atenuação óptica calculados por meio da técnica de OCT para o grupo Fluoreto. As barras verticais representam o erro padrão das médias. Letras diferentes significam que há diferença estatística entre os tempos, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0.05$).....	91
Gráfico 4: Variação da média dos coeficientes de atenuação óptica calculados por meio da técnica de OCT para o grupo Fluoreto-Laser. As barras verticais representam o erro padrão das médias. Letras diferentes significam que há diferença estatística entre os tempos, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0.05$).....	93
Gráfico 5: Variação da média dos coeficientes de atenuação óptica calculados por meio da técnica de OCT para o grupo Laser - Fluoreto. As barras verticais representam o erro padrão das médias. Letras diferentes significam que há diferença estatística entre os tempos, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0.05$).....	95
Gráfico 6: Comparação entre as médias dos coeficientes de atenuação óptica de cada grupo antes da realização dos tratamentos propostos para prevenção da cárie de esmalte dental. Não houve diferença com significância estatística entre os grupos após o teste de Tukey ($p > 0,05$)	97
Gráfico 7: Comparação entre as médias dos coeficientes de atenuação óptica de cada grupo imediatamente após a realização dos tratamentos propostos para prevenção da cárie de esmalte dental. Letras diferentes significam que houve diferença com significância estatística entre os grupos após o teste de Tukey ($p < 0,05$).....	98
Gráfico 8: Comparação entre as médias dos coeficientes de atenuação óptica de cada grupo após 5 dias de ciclagem de pH. Letras diferentes significam que houve diferença com significância estatística entre os grupos após o teste de Tukey ($p < 0,05$).	98
Gráfico 9: Comparação entre as médias dos coeficientes de atenuação óptica de cada grupo após 10 dias de ciclagem de pH. Não houve diferença com significância estatística entre os grupos ($p > 0,05$).	99

Gráfico 10: Comparação entre as médias dos coeficientes de atenuação óptica de cada grupo após 15 dias de ciclagem de pH. Não houve diferença com significância estatística entre os grupos ($p > 0,05$).	100
Gráfico 11: Médias dos coeficientes de atenuação óptica ao final dos 20 dias de ciclagem de pH. O grupo FL apresentou os menores valores na média de coeficiente de atenuação óptica em relação aos outros grupos ($p < 0,05$).	100
Gráfico 12: Variação das médias do Coeficiente de Atenuação Óptica ao longo do tempo.....	101
Gráfico 13: Microdureza de Superfície – Distribuição dos valores de microdureza de Superfície Baseline.....	102
Gráfico 14: Comparação das médias de cada grupo, por profundidade, no dia 05 da ciclagem de pH. As barras representam o erro padrão.	103
Gráfico 15: Valores de microdureza seccional após 5 dias de ciclagem de pH.....	103
Gráfico 16: Valores de microdureza seccional após 10 dias de ciclagem de pH.....	104
Gráfico 17: Valores de microdureza seccional após 15 dias de ciclagem de pH.....	105
Gráfico 18: Valores de microdureza seccional após 20 dias de ciclagem de pH.....	105

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1: Efeitos do pH do meio X presença/ausência de fluoreto: Efeito físico-químico e consequências para a estrutura dental.....	38
Tabela 2: Alterações observadas por faixas de temperatura durante aquecimento	40
Tabela 3: Alterações provocadas na HAP e nos tecidos duros dentais pelo aquecimento em forno e irradiação laser na rede cristalina.	41
Tabela 4: Coeficientes de Absorção e Espalhamento do esmalte dental	43
Tabela 5: Índice ICDAS.....	53
Tabela 6 : Técnicas ópticas utilizadas em diagnóstico.....	58
Tabela 7: Descrição das estruturas que compõem o esmalte dental e suas dimensões.....	62
Tabela 8: Vantagens e desvantagens de algumas técnicas ópticas aplicadas em diagnóstico.....	66
Tabela 9: Delineamento Experimental.....	71
Tabela 10: Valores Knoop aferidos para a amostra 11LF, no dia 5 da ciclagem de pH	106
Tabela 11: Valores de microdureza Knoop relativos à amostra C12, no dia 5 da ciclagem de pH111	

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO	21
2 OBJETIVOS	26
3 REVISÃO DA LITERATURA	27
3.1. Esmalte dental humano: composição e estrutura	27
3.2. Cárie dental	30
3.2.1 Etiologia, mecanismo e prevalência	30
3.3. Prevenção da cárie	35
3.3.1. Fluoreto	35
3.3.2. Irradiação com Laser em alta intensidade	39
3.4. Laser de Nd:YAG	47
3.4.1 Associação do Laser de Nd:YAG e Fluoreto	50
3.5. Diagnóstico e controle da Cárie	51
3.5.1. Diagnóstico Clínico	52
3.5.2. Diagnóstico por meio de técnicas ópticas	55
4 TOMOGRAFIA POR COERÊNCIA ÓPTICA (OCT)	60
5 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)	69
6 MATERIAL E MÉTODOS.....	71
7 RESULTADOS.....	87
7.1. Coeficientes de atenuação óptica por meio da OCT.....	87
7.1.1 Grupo Controle (C).....	88
7.1.1 Grupo Fluoreto (F).....	90
7.1.1 Grupo Fluoreto-Laser (FL).....	92
7.1.1 Grupo Laser-Fluoreto (LF).....	94

7.2. Variação dos coeficientes de atenuação óptica entre os grupos.....	97
7.3. Valores de microdureza knoop	102
7.3.1. Valores de microdureza de superfície (Baseline).....	102
7.3.2. Valores de microdureza seccional.....	102
7.3.2. Valores de perda mineral.....	106
7.4. Comparação entre a microdureza seccional Knoop e os coeficientes de atenuação óptica	113
7.5. Espectro ATR-FTIR.....	115
8 DISCUSSÃO	117
9 CONCLUSÕES	123
10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	126
11 ANEXOS	136

1. INTRODUÇÃO

A doença cárie é considerada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como a doença crônica não transmissível com maior incidência entre as populações, consumindo um percentual de 5 a 10 % do orçamento da área de saúde em países industrializados, sendo considerada ainda um problema de saúde pública [1].

A progressão da cárie dental pode provocar desconforto e dor. A dor severa pode ser debilitante, interferindo na vida produtiva do indivíduo, e há risco de infecção e sepse ao atingir a polpa dental. Em 2003, de acordo com a OMS, 5 bilhões de pessoas eram afetadas pela doença cárie em todo o mundo, quando foram estipulados objetivos a serem atingidos até o ano de 2020, com a participação da OMS, da FDI (Federação Dentária Internacional) e da IADR (Associação Internacional de Pesquisa Odontológica). Assim, buscava-se influenciar a inclusão de estratégias nas políticas de saúde visando uma redução percentual de diferentes eventos decorrentes de problemas bucais, como faltas escolares e ausência do trabalho devido a dores orais ou de origem craniofaciais; número de pessoas afetadas por limitações funcionais pela perda de elementos dentários; número de pessoas socialmente afetadas por dor e problemas estéticos, incluindo além da perda de dentes, defeitos no esmalte como fluorose, recessão gengival e mau odor na cavidade oral; número de indivíduos com problemas mastigatórios, salivação, deglutição e comunicação; redução dos índices CPO-D (dentes cariados, perdidos e obturados) em adolescentes até 12 anos; redução do número de elementos extraídos e pessoas edêntulas em diferentes faixas etárias; e aumento da proporção de indivíduos livres de cárie em crianças até 6 anos; o número de dentes presentes em diferentes faixas etárias; e aumento de indivíduos com uma dentição funcional, com mais de 21 elementos dentários presentes, nas faixas entre 35-44 e 65-74 anos [2]. Entretanto, em 2017, a OMS fez um levantamento constatando que 50 % da população mundial ainda é afetada pela doença, considerada portanto uma endemia mundial, uma vez que seu declínio mundial foi seguido pelo fenômeno de polarização, onde a maior prevalência da doença e sua necessidade de tratamento ficam restritas a uma pequena parcela da população, atingindo níveis sócio econômicos mais baixos, que fazem alto consumo de carboidratos, principalmente em países em desenvolvimento [1].

A doença cárie é caracterizada pela degradação de tecido dental com perda de cristais de hidroxiapatita (HAP) devido à ação de ácidos provenientes da fermentação de carboidratos da dieta por bactérias. Possui etiologia complexa e multifatorial, e para o desenvolvimento da doença, é necessário a coexistência de quatro fatores: um substrato (carboidratos fermentáveis), um hospedeiro (tecidos dentais), um biofilme (colonizado por bactérias acidogênicas), por um determinado período [3], como representado no diagrama proposto por Fejerskov e Manji (1990) (Figura 1).

Ao longo do tempo, ciclos sucessivos de desmineralização e remineralização ocorrem na superfície dental, e quando há o equilíbrio entre os dois processos, a remineralização é o processo que ocorre naturalmente. Fatores como composição, fluxo e capacidade tampão da saliva, a disponibilidade de fluoreto na cavidade oral, hábitos de higiene e atenção profissional, além da frequência de ingestão de carboidratos fermentáveis podem desequilibrar esse equilíbrio fisiológico [3, 4,5,6].

Figura 1: Diagrama representando a interação dos fatores primários para o desenvolvimento da doença cárie e a influência dos fatores protetores e de risco.

Fonte: FEJERSKOV, MANJI.;1990

O flúor é considerado a medida mais eficaz no controle da doença cárie, utilizado sob a forma de íon fluoreto (F^{-1}), a nível coletivo (na água de abastecimento, adição a sal de cozinha e leite) ou individual (aplicações em consultório, vernizes e materiais restauradores, dentifrícios ou soluções para bochecho) [7,8]. Na presença de fluoreto em concentração suficiente na saliva, os íons fluoreto são adsorvidos na superfície dos cristais, antes ou

durante um processo de desmineralização, potencializando o processo de remineralização e inibindo a desmineralização. Por serem altamente eletronegativos, atraem íons de cálcio, e depois íons de fosfato, construindo uma nova camada mineral semelhante à fluorapatita (FA: $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$) na superfície dos cristais [5].

Mesmo com a oferta de fluoreto através das águas de abastecimento, dentifrícios, enxaguatórios e vernizes, a doença cárie não foi erradicada. Apesar de uma menor prevalência, tem demonstrado uma grande variabilidade regional [1]. Portanto, a busca de métodos para a potencialização dos processos de remineralização, especialmente em indivíduos de alto risco, é de extrema importância [9,10].

A irradiação com lasers de alta potência promove alterações estruturais e químicas nos tecidos duros dentais, aumentando a sua resistência à desmineralização, em particular quando associados com o uso de fluoretos. Stern e Sogannaes (1965) foram os primeiros a demonstrar o aumento da resistência à desmineralização do esmalte dental após irradiação com laser de rubi [11].

Os lasers mais comumente utilizados para provocar alterações térmicas nos tecidos dentais com intuito preventivo são o Er:YAG ($\lambda = 2940 \text{ nm}$), Er,Cr:YSGG ($\lambda = 2780 \text{ nm}$), CO_2 ($\lambda = 9600$ e 10.600 nm), Argônio ($\lambda = 488\text{-}514 \text{ nm}$), Ho:YLF ($\lambda = 2065 \text{ nm}$), Ho:YAG ($\lambda = 2100 \text{ nm}$) e Nd:YAG ($\lambda = 1064 \text{ nm}$) [12]. Vários autores demonstraram uma relação entre tratamentos com diferentes tipos de lasers e taxas reduzidas de desmineralização subsuperficial no esmalte dental [13, 14].

A interação do laser com os tecidos depende do comprimento de onda (λ) e outras características do equipamento (regime de operação, largura temporal, energia de cada pulso, taxa de repetição, diâmetro do feixe e meio de entrega); e também das características ópticas do tecido alvo, como índice de refração, coeficientes de espalhamento e de absorção, capacidade e condutividade térmicas [11,12]. Os lasers que emitem na região do infravermelho médio (Er:YAG, Er,Cr:YSGG) e distante (CO_2) do espectro eletromagnético são altamente absorvidos pela HAP e pela água, presentes nos tecidos duros dentais [15]. O laser de Nd:YAG pode promover uma fusão com subsequente ressolidificação dos tecidos dentários, diminuindo sua permeabilidade e aumentando a sua resistência à desmineralização [16,17,18,19].

O diagnóstico da cárie envolve a detecção da lesão, uma estimativa da sua profundidade (tecidos dentais envolvidos) e grau desmineralização destes tecidos. O exame

visual e tátil é baseado em critérios clínicos subjetivos, e muitas vezes a sondagem das superfícies dentais pelo profissional pode romper a camada de esmalte ainda íntegra. O diagnóstico precoce possibilita a escolha de procedimentos conservadores, visando a remineralização das lesões para evitar tratamentos mais invasivos [20]. Quanto mais precoce o diagnóstico, menos invasivas e mais eficientes serão as estratégias traçadas para o controle da doença e remineralização das lesões. É consenso que a prevenção da doença seja baseada no controle dos fatores de risco, de modo geral e individualizado, com medidas adequadas ao risco de cada paciente [21].

Durante a Segunda Conferência Mundial sobre Novos Agentes Anticáries e Remineralizantes (ICNARA – International Conference on Novel Anticaries and Remineralizing Agents), foi discutido o estado da arte em agentes anticárie e remineralizantes, e novas e subutilizadas tecnologias, incluindo manejo de biofilme, nanotecnologia e lasers, entre outros tópicos. Entre as principais conclusões, destacaram-se o fato de que, apesar dos métodos para acompanhamento de risco de cáries serem eficientes, ainda podem ser refinados e aperfeiçoados, assim como as terapias para remineralização em casos de indivíduos de alto risco de cárie [22]. Em 2018, durante o ICNARA 3, foi ressaltada a importância de se continuar a difundir a necessidade da redução de consumo de açúcares e carboidratos fermentáveis, juntamente com a necessidade de implementação de estratégias para prevenir a desmineralização e/ou promover a remineralização de lesões de cárie, explorando métodos inovadores para o controle da saúde bucal [23].

O uso da radiação eletromagnética (EM) com intuito de auxiliar no diagnóstico de lesões cariosas é usado em odontologia de forma corriqueira, mesmo sem a percepção disto por parte dos profissionais, quando se realiza uma radiografia (que não fornece informações sobre a atividade da lesão, além de não detectar as lesões em seu estágio inicial) ou na análise de uma mancha ou sombra nos tecidos dentais [24,25].

A aplicação da técnica de Tomografia por Coerência Óptica (OCT) foi relatada em tecidos biológicos por Huang *et al* em 1991, inicialmente para oftalmologia, e permite o imageamento de estruturas transparentes e semitransparentes espalhadoras. OCT é uma técnica interferométrica de alta resolução que produz imagens em tempo real, sem contato, *in vivo*, permitindo uma análise qualitativa e quantitativa da saúde dos tecidos biológicos, com a vantagem de não usar radiação ionizante [26].

As aplicações de OCT em odontologia vêm crescendo, sendo a desmineralização dentária, problemas periodontais e o câncer oral as aplicações clínicas mais estudadas. A

maioria dos sistemas de OCT utilizados em tecidos dentais usam fontes de luz que emitem entre 840-1310 nm, visto que nesta faixa espectral os comprimentos de onda são pouco absorvidos pelos tecidos orais, atingindo profundidades entre 0,6 a 2 mm [27].

A técnica de OCT permite a detecção e o acompanhamento longitudinal das alterações dos tecidos bucais. Por ser uma técnica não invasiva, permite a análise *in vivo* dos tecidos, com o potencial de avaliar a eficácia da irradiação laser para o controle da desmineralização dos tecidos duros dentais. Entretanto, ainda não se havia correlacionado as alterações entre os coeficientes de atenuação óptica devido à irradiação com o laser de Nd:YAG, medidos por meio da técnica de OCT, e os resultados dos testes de microdureza seccional Knoop.

2. OBJETIVOS

Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi correlacionar os valores dos coeficientes de atenuação óptica e da microdureza Knoop, para inferir a prevenção da desmineralização de esmalte, avaliando a efetividade da associação da irradiação com laser de Nd:YAG e fluoreto na prevenção da desmineralização em esmalte dental humano *in vitro*.

Objetivos Específicos

- Medir as variações nos valores de microdureza seccional Knoop de amostras irradiadas com laser de Nd:YAG e tratadas com Flúor Fosfato Acidulado (FFA), em relação aos valores do grupo controle;
- Medir as variações nos valores coeficientes de atenuação óptica medidos por meio da técnica de OCT de amostras irradiadas com laser de Nd:YAG e tratadas com FFA, em relação aos valores do grupo controle;

3 – REVISÃO DA LITERATURA

3.1 – Esmalte dental humano: composição e estrutura

Os tecidos duros dentais são diferentes em estrutura, mas semelhantes em composição. Juntamente com a água, as porções orgânica e inorgânica contidas no esmalte e dentina definem as características químicas e mecânicas dos tecidos duros, sendo os mesmos caracterizados por diferenças entre estes constituintes [28].

O esmalte é um tecido acelular, translúcido, e é o mais mineralizado do corpo humano. No esmalte, a porção inorgânica é responsável por 95 % do seu peso e 87 % de seu volume, sendo a HAP carbonatada o principal constituinte, enquanto na dentina corresponde a 70 % e 47 % respectivamente. A porção inorgânica do esmalte difere da dentina e do osso pela relação Ca/P, relacionada à solubilidade do tecido, que no esmalte é de 1/64, na dentina 1/62 e no osso 1/70. Quanto menor a taxa de relação entre eles, maior a solubilidade. É composta por cristais minerais incorporados em uma matriz proteica, semelhantes à HAP - $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ - com deficiência de cálcio (substituído por sódio, magnésio, zinco, cobre, enxofre e outros íons), contendo de 3 a 6% de carbonato (CO_3) por peso, no lugar do fosfato (PO_4) ou hidroxila (OH) na rede cristalina [28].

A fórmula da HAP biológica é semelhante a $(\text{Ca}, \text{Mg}, \text{Na}_x)_{10-x} [(\text{PO}_4)_{6-y} (\text{CO}_3, \text{HPO}_4)_z] (\text{OH}, \text{Cl})_{2-u} (\text{F})_u$, mais solúvel em ácidos, disposta em uma rede cristalina hexagonal, com cristais do esmalte maiores que os da dentina [29].

O fluoreto pode ser incorporado à estrutura da HAP biológica no lugar da hidroxila, conferindo menor solubilidade. Entretanto, apenas uma pequena quantidade de substituições, em torno de 10 %, acontece durante o período de formação dos elementos dentários. Nestes casos não há a formação de cristais puros de FAP, caracterizada pela repetição de milhares de cristais na forma química $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2]$, mas sim HAP fluoretada $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})(\text{CO}_3)(\text{F})]_n$ [3,30].

A concentração de carbonato presente na matriz inorgânica é responsável pelo tamanho dos cristais de HAP. No esmalte dental, o baixo conteúdo de 2,5 a 4 % de carbonatos incorporados na rede cristalina [33] é responsável pelo maior tamanho dos cristais quando comparado a outros tecidos mineralizados [31,32]. O carbonato pode ser

incorporado na estrutura da rede cristalina substituindo a hidroxila ou, como ocorre com maior frequência na HAP biológica, o fosfato. A incorporação de carbonato provoca uma redução no tamanho dos cristais, alteração de sua morfologia, aumento de tensão na estrutura cristalina, e uma maior solubilidade [3,28,30].

O esmalte dental apresenta uma camada aprismática, mais externa, com aproximadamente 30 μm de espessura, e uma camada prismática, que possui cristais de HAP com dimensões aproximadas de 50 nm de largura e 100 nm de comprimento, organizados de forma repetitiva formando os prismas ou bastões de esmalte. Cada prisma é formado por aproximadamente 1000 cristais de HAP, com o alinhamento do seu longo eixo (eixo C) paralelos ao longo eixo dos prismas, com aspecto transversal de buraco de fechadura e diâmetro de 4 a 5 μm . Na periferia dos prismas ocorre uma pequena desorientação no alinhamento dos cristais, aumentando o espaço intercristalino (tamanho médio entre 0,1 a 0,5 μm), como ilustrado na Figura 2 [31,33]. Os prismas de esmalte estendem-se da junção amelodentinária até a superfície do dente, quase sempre perpendicularmente, mas com variações entre 60 a 90° em sua trajetória [33].

Figura 2: Dimensões do cristal de HAP e dos prismas de esmalte

Fonte: BACHMANN, L., ZEZZEL D.M., 2005

O espaço intercristalino é preenchido por água e pela porção orgânica, que no esmalte corresponde a 1 % em peso e 2 % em volume, constituída principalmente por proteínas, sendo 58 % delas correspondente a amelogeninas, enamelinina, fosforoproteínas, lipídeos (40 %), traços de açúcares, citratos e íons de lactato. Na dentina constitui 20 % de

seu peso e 30 % do volume, sendo 90 % composta por colágeno (85 % do tipo I e 5% dos tipos III e IV) e 10% por proteínas do tipo não colágeno (na maioria fosfoproteínas fosforiladas, com pequenas quantidades de proteínas do tipo osteocalcina contendo ácido γ -carboxiglutâmico, glicoproteínas e proteínas séricas). A porção orgânica e o conteúdo de água representam um papel importante na dissolução e remineralização dos tecidos, por permitir a difusão de pequenas moléculas, como ácido láctico, e íons (hidrogênio e cálcio) que ocorrem nestes processos [28,33].

Os cristais de HAP do esmalte são intimamente ligados à enamelinas, enquanto a proteína amelogenina diminui com a maturação do esmalte. Durante o estágio de secreção, as proteínas da matriz do esmalte (amelogenina, ameloblastina e enamulina, e a enzima enamelinina - MMP-206,9) são sintetizadas e secretadas pelos ameloblastos. Duas outras proteínas foram detectadas mais recentemente, amelotina e apina, relacionadas à processos de adesão celular, sendo que a última parece exercer papel fundamental nas fases finais da formação dentária, por ter sido localizada na fase final de maturação do esmalte, importante para a sua dureza. O mecanismo de atuação destas proteínas ainda não foi totalmente elucidado [34].

A quantidade de água dos tecidos mineralizados encontra-se parcialmente associada aos componentes orgânicos, sendo de 3 % em peso e 11 % em volume no esmalte, e na dentina 10 % em peso e 21 % em volume. O esmalte dental apresenta um índice de refração de 1,64 [31], próximo ao índice de refração da água, que é igual a 1,33 [35].

Wasaka et al (2016) detectaram através de MEV e HRTEM (microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução) uma diferença na existência de espaços interprismáticos vazios, na quantidade de HAP policristalina e de HAP pobremente cristalizada nos espaços interprismáticos de pré-molares amarelados e de pré-molares mais brancos de indivíduos na casa dos 50 e 20 anos respectivamente. Nas amostras de esmalte amarelado dos indivíduos de 50 anos não foram encontrados espaços interprismáticos vazios, enquanto no esmalte branco de indivíduos mais jovens havia alguns espaços vazios. Concluíram que o esmalte amarelado dos indivíduos na casa dos 50 anos era resultado da ausência de espaços interprismáticos vazios, resultado da calcificação progressiva do esmalte durante toda a vida do indivíduo, alterando o espalhamento da luz incidente no esmalte e possibilitando a transmissão da cor da camada de dentina subjacente [36].

3.2 - Cárie dental

3.2.1 – Etiologia, Mecanismo e Prevalência

A doença cárie é a doença crônica não transmissível com maior prevalência mundial, e os indivíduos são susceptíveis durante toda vida [4]. Durante muito tempo só se considerava a ocorrência da doença cárie a partir do momento da detecção de uma mancha branca ou uma lesão cavitada, que na verdade são sinais da doença. A partir do século XX, todo o processo passou a ser considerado como doença [6]. Porém, principalmente entre leigos, corriqueiramente ainda refere-se à cárie somente quando uma cavidade no elemento dentário é detectada, quando na realidade é um sinal que caracteriza um estágio avançado da doença [21,37].

A doença cárie é resultado do desequilíbrio entre o mineral do dente e o fluido do biofilme, e possui etiologia complexa e multifatorial. Para o desenvolvimento da doença, é necessária a coexistência de um hospedeiro (elemento dentário), um substrato (carboidratos fermentáveis), presença de bactérias acidogênicas no biofilme dental, durante um certo tempo [6].

A presença de fatores protetores (disponibilidade de fluoreto, frequência de higiene dental, capacidade tampão da saliva) e fatores de risco, como diminuição de fluxo salivar, frequência de ingestão de carboidratos e hábitos de higiene desfavoráveis, influencia o balanço entre os processos de mineralização e desmineralização que ocorrem normalmente na cavidade oral [4,6]. Quando os fatores de risco se sobrepõem aos fatores protetores, a perda mineral não consegue ser evitada. Repetidos episódios ultrapassam a capacidade de remineralização por parte dos fluidos orais, e a doença progride [38].

A saliva exerce um papel importante na homeostase da cavidade oral, porque neutraliza os ácidos produzidos pelas bactérias, proporciona uma solução supersaturada de cálcio e fosfato e possui componentes antibacterianos [22].

Imediatamente após a erupção dentária ou escovação dentária, inicia-se sobre a superfície dentária a adsorção de proteínas (glicoproteínas – mucinas MG1 e MG2; fosfoproteínas - estaterina) da saliva, lipídeos, enzimas (amilase, cistatina, imunoglobulina A, lisozima, lactoferrina, lactoperoxidase, entre outras), fluido crevicular gengival, que formam a película adquirida, uma camada acelular, com espessura entre 1-10 µm, que promove uma lubrificação durante mastigação, proteção contra desmineralização e permite a difusão de íons, sendo um meio que favorece a maturação do esmalte após a erupção [39].

Na cavidade oral já foram identificadas mais de 700 espécies de bactérias colonizadoras, e em média um indivíduo adulto apresenta entre 100 e 200 destas espécies, dependendo do ambiente, idade, fatores genéticos e estilo de vida, que se organizam em uma estrutura tridimensional, envolta por uma matriz extracelular [40, 41].

Sobre a película adquirida ocorre o início do desenvolvimento do biofilme dental pela adesão de bactérias colonizadoras, inicialmente por *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus gordinii*, *Streptococcus mitis* biovar 1, *Actinomyces sp.*, bactérias Gram-negativas, por meio de ligações inespecíficas (ligações eletrostáticas e/ou do tipo Van der Waals) ou específicas, através de adesinas da superfície bacteriana e proteínas da película adquirida, como estaterina e proteínas ricas em prolina (PRP) - glicoproteínas [42].

Caso não haja desorganização mecânica do biofilme, os microrganismos do biofilme sofrem divisão celular e secretam enzimas produtoras de polissacarídeos extracelulares a partir de carboidratos da dieta, formando uma matriz de polissacarídeos extracelulares, permitindo o acúmulo de microcolônias, e ocorre a coadesão de novas espécies de microrganismos aos microrganismos já aderidos à película adquirida, como *Veillonella spp*, *Fusobacterium spp*, *Haemophilus spp*, aumentando a complexidade da estrutura. As camadas mais internas do biofilme apresentam menor disponibilidade de oxigênio, proporcionando uma maior facilidade para a multiplicação de *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* e *Lactobacillus*. Algumas espécies utilizam oxigênio para a formação de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), de modo que espécies anaeróbias estritas (*Prevotella*, *Porphyromonas*, *Actinobacillus* e *Treponema*) são favorecidas [42].

A estrutura do biofilme protege a comunidade de microrganismos contra a penetração de agentes antimicrobianos, e diversos mecanismos de sinergismo e antagonismo microbianos são observados [43].

A composição do biofilme é diferente em superfícies distintas da cavidade oral, devido a diferenças no ambiente do local e do estágio de maturação do biofilme, influenciado pela frequência de ingestão de carboidratos fermentáveis e em função da localização (áreas mais retentivas ou de difícil acesso na superfície dentária, que dificultem a ação de forças mecânicas sobre o biofilme) [44].

Grande parte das bactérias no biofilme são sacarolíticas fermentativas, produtoras de ácidos láctico, acético, fórmico e propiônico, que ocasionam a queda do pH, enquanto outras podem reduzir o potencial danoso convertendo o ácido láctico em ácidos

mais fracos ou gerando álcalis a partir da uréia e arginina da saliva, aumentando o pH, o que favorece o equilíbrio entre as populações no biofilme [45].

Quando o ambiente no biofilme encontra-se em equilíbrio, a doença cárie não se instala. Microrganismos relevantes para o desenvolvimento de lesões de cárie podem ser encontrados em superfícies dentais saudáveis, mas em quantidade ou atividade muito baixa para ter significado clínico. Desta forma, a instalação da doença é devida ao desequilíbrio entre a população de microrganismos que preferencialmente se desenvolvem em ambientes com pH neutro e as bactérias acidogênicas (que produzem ácidos) e acidúricas (que sobrevivem em ambientes ácidos), em consequência da ingestão frequente de carboidratos fermentáveis da dieta, especialmente sacarose [46,47].

De acordo com esta teoria, para o controle da doença cárie, é necessário interferir nos fatores protetores, como o fluxo e capacidade tampão da saliva, devido à presença de bicarbonato, fosfato e peptídeos; componentes imunológicos presentes na saliva (S-IgA- imunoglobulina antígeno específica contra *Streptococcus mutans*); transformação do lactato em ácidos mais fracos por algumas espécies (ex: *Veillonella spp*); geração de amônia através do catabolismo de arginina ou uréia por *Streptococcus spp* e *Actinomyces spp*); capacidade de redução de nitratos em nitritos, com provável efeito anticárie pela produção de amônia e óxido nítrico (ON) e degradação de lactato por espécies redutoras de nitrato, assim como interferir nos fatores patológicos (que favorecem os microrganismos acidogênicos e acidúricos, por meio do controle da ingestão de carboidratos fermentáveis), buscando um equilíbrio da ecologia do biofilme [48].

Após a produção de ácidos orgânicos pelas bactérias do biofilme, a difusão dos mesmos através do biofilme acontece em todas as direções, através das porosidades do esmalte ou dentina, e se dissociam em íons hidrogênio (H^+) o que provoca uma queda no pH no biofilme e na superfície dental [6].

A estabilidade química da porção mineral do dente é essencial para a integridade da estrutura dental, contra o desenvolvimento de lesões de cáries ou de erosão. Para o desenvolvimento de lesões de cárie, o pH crítico para o esmalte é inferior a 5,5, enquanto na dentina é inferior a 6,5 [3].

O pH crítico é o pH onde uma solução fica saturada em relação a um mineral em particular. Abaixo destes valores do pH, a saliva fica subsaturada em relação aos íons cálcio e fosfato (PO_4^{3-}) comparada à HAP do esmalte dental, e ocorre dissolução de cálcio e fosfato da superfície do cristal de HAP, no espaço intercristalino. A desmineralização ocorre então,

inicialmente à nível atômico. A solubilidade da HAP em um meio depende da concentração dos íons que a compõem (cálcio, fosfato e hidroxila), o que no caso dos fluidos bucais varia entre indivíduos, e portanto, o pH crítico para os tecidos dentais também irá variar. O pH crítico para a dissolução dos tecidos dentais é inversamente proporcional à concentração destes íons na saliva e no fluido da placa dental [49].

Durante o processo de desmineralização, as áreas deficientes em cálcio e ricas em carbonatos são as mais susceptíveis ao efeito de ácidos, sendo que o carbonato não é reintegrado durante o processo de remineralização [50].

Entre 5 a 10 minutos da ingestão de carboidratos fermentáveis, o pH atinge o valor crítico, permanece nesta faixa por um período entre 20 – 60 minutos. A presença no biofilme dos minerais dissolvidos eleva gradualmente os valores do pH a valores normais, favorecendo a reposição dos minerais dissolvidos que se encontram supersaturados na saliva e no biofilme em relação à HAP dos tecidos dentais, promovendo a remineralização. Este fenômeno foi descrito por Stephan (1940) e conhecido como curva de Stephan, representada na Figura 3 [51].

Figura 3: Curva de Stephan

Fonte: STEPHAN, R.M., 1940.

A Figura 4 representa a formação de novos compostos após a dissolução de minerais pela exposição dos tecidos dentais a um meio ácido devido à fermentação de carboidratos por bactérias acidogênicas. Podem ser formados, além da HAP, outros tipos de fosfato de cálcio pelos subprodutos Ca^{2+} , HPO_4^{2-} e PO_4^{3-} provenientes desta dissolução: fosfato de cálcio dihidrato – bruxita ($\text{CaHPO}_4 - 2 \text{H}_2\text{O}$), fosfato de tricálcio na fase β ($((\text{Ca},\text{Mg})_3(\text{PO}_4)_2 - \beta)$), fosfato de octacálcio penta hidratado ($\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 - 5 \text{H}_2\text{O}$), e na

presença de fluoreto, pode ser formado fluoreto de cálcio (CaF_2) ou Fluorapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$) [52].

Figura 4: Eventos químicos da cárie após a dissolução da minerais provenientes dos tecidos dentais de acordo com a presença de diferentes íons no meio.

Fonte: BACHMANN, L., ZECELL D.M., 2005.

A remineralização é o processo de reparação natural dos tecidos duros dentais, e frequentes ciclos de desmineralização e remineralização ocorrem ao longo do tempo, caracterizando um dinâmico processo físico-químico fisiológico. O desequilíbrio entre fatores protetores e patológicos altera o balanço entre os dois processos, o que determina a progressão da doença [6]. A frequência de ingestão de carboidratos aumenta o tempo necessário para a normalização do valor do pH, e perdas progressivas de mineral levam ao estágio visível da lesão, clinicamente caracterizado por manchas no esmalte [53].

O objetivo na prevenção de cáries é a preservação de estrutura dentária, desde o surgimento de novas lesões à promoção de métodos de remineralização, com ações na esfera da saúde pública (abordagem preventiva a nível de legislações, regulamentações e incentivo à promoção de saúde e ações sociais), afetando uma população inteira, como adição de fluoreto nas águas de abastecimento e sal de cozinha, ou identificando populações de risco (famílias de baixa renda, restrição de acesso a atendimento odontológico, pequena exposição a fluoreto, grupos com deficiência imunológica, disfunções salivares, dificuldades cognitivas, uso frequente de medicamentos), desenvolvendo estratégias direcionadas com a melhor relação custo-benefício possível. A abordagem isolada de indivíduos segue o mesmo padrão de populações maiores, a partir da classificação do nível de risco daquele indivíduo,

baseado atualmente em índices de classificação de risco de cárie, exames clínicos e auxiliares de diagnóstico [48].

3.3 Prevenção da cárie

3.3.1 Fluoreto

O Flúor é o elemento mais reativo da tabela periódica, e em sua forma iônica fluoreto (F^{-1}), forma compostos iônicos carregados positivamente com íons como cálcio (Ca) e sódio (Na). É encontrado em minerais, vegetais e em fontes de água natural, que podem chegar a conter até 10 mg de fluoreto por litro (10 ppm). A baixa incidência de cáries e alta incidência de fluorose em localidades com alta concentração de fluoreto nas águas naturais direcionou as pesquisas para o uso do fluoreto na prevenção da doença cárie [54].

O processo de remineralização dos tecidos duros dentais é favorecido na presença de fluoreto na cavidade oral, que pode ser disponibilizado por meios coletivos (fluoretação das águas de abastecimento, sal de cozinha e fluoretação do leite). A fluoretação do sal é sugerida pela OMS através da Resolução 60-17 em locais onde não adição de fluoreto na água de abastecimento, sendo permitida em toda a Comunidade Europeia. Duzentos milhões de habitantes em 8 países já são beneficiados, porém para que mais pessoas sejam beneficiadas, é preciso que tenham acesso ao produto, e estratégias como adicionar o sal ao pão e colocar o produto em promoção sejam adotadas, sendo importante frisar que o uso de dentifrícios e o uso do sal fluoretado não são alternativas, devem ser utilizados em conjunto [55].

A adição de flúor ao leite distribuído em escolas públicas foi avaliado em um estudo *in situ* por grupos de escolares que ingeriam 200 ml de leite com 1 mg de fluoreto uma vez ao dia, duas vezes (100 ml) e 200 ml de uma vez, mas inserindo o dispositivo com amostras após a ingestão, buscando avaliar um efeito sistêmico, e após 21 dias as amostras foram submetidas a teste de microdureza de superfície e por microradiografia transversa, para avaliar perda de minerais e alterações na mineralização respectivamente. Todos os grupos apresentaram melhores resultados de microdureza e microradiografias, porém a ingestão de 200 ml foi mais efetiva [56].

Após pesquisas para a determinação de um valor onde se obtém o nível máximo de proteção, com um nível de fluorose aceitável, iniciou-se a adição de fluoreto às águas de

abastecimento, inicialmente nos Estados Unidos da América (USA) em 1945, e no Brasil a partir de 1953 no município do Baixo Guandu [8].

É considerada a forma mais abrangente e democrática de disponibilização de fluoreto. O Valor Máximo Permitido (VMP) nas águas de abastecimento, de acordo com a OMS, é 1,5 mg/l (1,5 ppm), com a ressalva de que variações na ingestão de água em função do clima e atividades locais devem ser consideradas para o ajuste nos padrões nacionais [54]. Em 2014, um levantamento dos custos anuais de adição de fluoreto nas águas de abastecimento por indivíduo em localidades na Austrália, Nova Zelândia, Canadá e USA. Foi ratificada, em relação à estudos em anos anteriores, uma relação vantajosa entre estes custos e os benefícios alcançados em relação à redução de intervenções por cáries e suas complicações, sendo que quanto maior a população atingida, menores foram os custos individualmente [57, 58].

No Brasil, a adição de fluoreto é regida pela Lei Federal 6.050 – 24/05/1974, com os primeiros valores de VMP fixados em 1977 em 1,7mg/l, e pela portaria 635/75 passou a ser igual a 1,5 mg/l (1,5 ppm). Entretanto, de acordo com os cálculos nos quais se baseia a portaria 635/75, os valores recomendáveis para a maioria das capitais brasileiras seria entre 0,6 e 0,8 mg/l (0,6 e 0,8 ppm), valores já adequados em alguns estados através de resoluções e portarias para este fim [59]. Em 2015, o Serviço Público de Saúde dos Estados Unidos da América (USA) reforçou a importância da adição de fluoreto nas águas de abastecimento e ajustou a quantidade para 0,7 mg/l, considerando esta a melhor concentração visando uma melhor relação entre prevenção de cáries e risco de fluorose dental [60].

Atribui-se à adição de flúor nas águas de abastecimento um percentual de redução de cáries entre 60 a 70 % [8]. No século XX acreditava-se que esta redução era devida à incorporação do fluoreto ingerido na matriz da HAP, formando FA com menor solubilidade (efeito sistêmico do fluoreto). Entretanto, apenas 10 % da HAP é substituída pela FA pela ingestão de fluoreto durante a formação dos elementos dentários [3].

O fluoreto incorporado à rede cristalina durante o desenvolvimento do elemento dentário pode ser encontrado em concentrações entre 20 – 100 ppm abaixo da superfície do esmalte dental e pode atingir valores entre 1000-2000 ppm nos micrometros mais superficiais, mas mesmo essas quantidades não alteram a solubilidade nos tecidos duros dentais [29].

Após a ingestão de água fluoretada, alimentos cozidos na água contendo fluoreto, e ingestão de chás, o fluoreto é absorvido através da mucosa do estômago, circula

pelo sangue sendo liberado na cavidade oral através das glândulas salivares, tendo então um efeito local na cavidade oral. A diferença de concentração de fluoreto na saliva de indivíduos em locais com e sem adição de fluoreto nas águas de abastecimento é 0,02 mg/l contra 0,01 mg/l, e esta diferença no biofilme pode ser 10 vezes maior [7].

Atualmente, o uso de dentifrícios fluoretados é considerado o principal fator para a redução da prevalência da doença cárie [61], pela associação da desorganização mecânica da placa com a disponibilização de fluoreto na cavidade oral [7].

O fluoreto presente na solução ao redor do cristal de HAP carbonatada é fortemente adsorvido na superfície desse cristal, e durante uma queda do pH provocada por ácidos produzidos por bactérias acidogênicas penetra na subsuperfície do dente, onde adere à superfície do cristal protegendo durante a desmineralização, havendo substituição da HAP carbonatada da subsuperfície por apatita fluoretada (AF) adsorvida à superfície dental, com menor solubilidade [21,29].

Na presença de fluoreto aplicado localmente, seja através da escovação com dentifrícios fluoretados contendo ao menos 1000 ppm de fluoreto; aplicação tópica com fluoreto de sódio (NaF), especialmente o acidulado (FFA - há pequena dissolução do esmalte superficial pelo ácido fosfórico, liberando maior quantidade de cálcio) são formados glóbulos de fluoreto de cálcio (CaF_2), no esmalte e na placa bacteriana. Estes depósitos de fluoreto de cálcio são instáveis, protegidos contra a dissolução rápida por um revestimento de fosfato proteico de origem salivar, e durante a queda de pH o revestimento dos glóbulos é perdido, ocorrendo assim uma maior taxa de dissolução de CaF_2 , que atua como uma fonte eficiente de íons fluoreto livre. O fluoreto liberado passa a participar ativamente na remineralização das lesões cariosas iniciais, sendo depositado sobre a área desmineralizada sob a forma de FA [62,63]. A reação da precipitação do CaF_2 é descrita pela equação (1) a seguir:

Além da redução da solubilidade mineral e promoção de remineralização com formação de FA, outro modo de atuação seria através da inibição de enzimas bacterianas, afetando seu metabolismo e diminuição da formação de ácidos na placa dental [64,65]. Na presença de ácidos de origem bacteriana, quando ocorre uma queda no valor do pH, o fluoreto se combina com íons hidrogênios liberados pela dissolução dos ácidos e penetra na célula sob a forma de ácido fluorídrico (HF), se dissocia liberando íons fluoreto que interferem com a atividade enzimática (enolase).

O limiar crítico do pH é alterado na presença de fluoreto, como demonstrado na Tabela 1. Com o fornecimento de fluoreto de forma contínua, seja pela água fluoretada, dentifrícios ou outros meios, o valor crítico do pH para o esmalte passa a ser inferior a 4,5. Entre 4,5 a 5,5, a presença do fluoreto exerce um dos seus efeitos para controlar o desenvolvimento da cárie dental, aumentando de 2 a 4 vezes a capacidade de reposição de minerais pela saliva. Na ausência do flúor e queda do pH abaixo de 5,5, mas ainda acima de 4,5, há dissolução de minerais do esmalte. Embora na presença de flúor a dissolução de minerais tipo HAP ou AF não seja evitada, uma certa quantidade de cálcio e fosfato é simultaneamente reposta para o esmalte na forma de FA [3].

Tabela 1 - Efeitos do pH do meio versus a presença ou ausência de fluoreto: Efeito físico-químico e consequências para a estrutura dental.

pH	Flúor no Meio	Efeito Físico-químico				Consequências:	
		Dissolução minerais + solúveis *	Dissolução HA e AF	Formação de FAP	Dissolução de FAP	Esmalte	Dentina
7,0	Não	Não	Não	Não	Não	Re	Re
7,0	Sim	Não	Não	Sim	Não	Re+	Re+
< 6,5 > 5,5	Não	Sim	Não	Não	Não	Re	Des
< 6,5 > 5,5	Sim	Sim	Não	Sim	Não	Re+	Des -
< 5,5 > 4,5	Não	Sim	Sim	Não	Não	Des	Des+
< 5,5 > 4,5	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Des	Des
< 4,5	Indifer	Sim	Sim	Não	Sim	Cárie Aguda / Erosão	

* Apatita carbonatada e fosfato de cálcio amorfo; Re = Remineralização; Re+ = Remineralização ativada; Des = Desmineralização; Des- = desmineralização reduzida; Des+ = Desmineralização aumentada

Fonte: CURY, J.A., 2001.

Ainda há a possibilidade de utilização de produtos com alta concentração de fluoreto para aplicação profissional, como vernizes e produtos restauradores fluoretados, com os objetivos de aumentar a concentração de fluoreto no momento da aplicação e formar reservatórios de CaF_2 . Intervenções personalizadas podem ser necessárias, em casos de indivíduos com maior risco de desenvolver a doença cárie, e a associação de mais de uma forma de disponibilização de fluoreto na cavidade oral (por ex. dentifrícios fluoretados e bochechos diários com solução de NaF a 0,05% (225 ppm), dependendo da avaliação do profissional de saúde [7,66].

Para a manutenção dos seus efeitos de proteção contra a desmineralização e participação no processo de remineralização, o fluoreto deve ser constantemente disponibilizado na cavidade oral, entretanto para o controle da doença cárie os fatores

patológicos devem ser constantemente monitorados por meio do controle da ingestão de carboidratos fermentáveis e da presença de biofilme [3].

Hujoel et al (2018), em uma revisão de literatura compararam as conclusões a partir estudos randomizados sobre higiene pessoal oral e cáries dentais, concluindo que a higiene oral na ausência de fluoretos não mostrou benefício significativo na prevenção de cáries [67].

3.3.2. Irradiação com laser em alta intensidade

Apesar de todos os esforços e dos resultados alcançados visando a redução da doença cárie e seus efeitos sobre a saúde oral e geral dos indivíduos em todas as esferas, coletivas e individuais, a polarização da doença cárie indica a necessidade de novos métodos buscando a prevenção da perda de minerais dos tecidos duros dentais, especialmente em indivíduos pertencentes a grupos com maior risco de desenvolver a doença [68].

Desde a primeira utilização de um laser de rubi em odontologia, quando foi observado um aumento na resistência à desmineralização no esmalte dental irradiado, este mesmo efeito foi observado em estudos posteriores envolvendo diversos comprimentos de onda [11,12].

Quando a radiação eletromagnética (EM) atinge um tecido biológico, diferentes fenômenos podem acontecer em função de sua natureza heterogênea, como reflexão, transmissão, absorção e espalhamento. A interação vai ser dependente das características ópticas dos tecidos (coeficientes de absorção - μ_a e de espalhamento - μ_s ; capacidade e condutividade térmica; índice de refração) e dos parâmetros do laser (comprimento de onda - λ ; potência - Watt, [W]; energia por pulso - Joules [J]; largura do pulso - podendo variar de milissegundos [ms] a picosegundos [ps]; taxa de repetição - Hertz [Hz]; modo de entrega - contato ou não contato; tipo de emissão - contínuo, pulsado,; diâmetro do feixe [cm^2]; Densidade de Energia - DE [J/cm^2]; Densidade de Potência - DP [W/cm^2]), que devem ser entendidos para a obtenção dos resultados esperados com segurança [69].

A energia proveniente da irradiação laser em alta intensidade incidente em um tecido com alto coeficiente de absorção, maior do 1000 cm^{-1} (extensão até onde a radiação incidente será absorvida por unidade de comprimento - [cm^{-1}] ou [mm^{-1}]), para determinado comprimento de onda, ou seja, quando o tecido possui elementos em sua composição que são absorvedores daquele comprimento de onda (cromóforos), é absorvida nos primeiros

micrometros do tecido, e quando convertida em energia térmica, gera calor que pode ser superior a 1000 °C [11, 12, 69, 7072].

A possibilidade de danos térmicos aos tecidos dependerá da Densidade de Potência, que traduz a quantidade de energia depositada durante um certo tempo, em determinada área de tecido (DP em W/cm²). A interação fototérmica pode provocar carbonização, coagulação, vaporização, fusão, fotoablação, fotodisrupção e ablação induzida por plasma nos tecidos. A condução de calor para os tecidos vizinhos ao tecido alvo em que se deseja produzir o efeito deve ser considerada, para que não haja efeitos deletérios. Em lasers de emissão contínua, dependerá da potência média emitida pelo equipamento, e em lasers pulsados, da potência pico emitida, da duração e da frequência do pulso [69,70].

Stern et al (1996) propuseram a hipótese da fusão – ressolidificação do esmalte dental para explicar, através da diminuição da permeabilidade do esmalte à água, os efeitos preventivos alcançados através da irradiação laser [71].

No caso dos tecidos duros dentais, o calor pode alterar as características cristalográficas da matriz mineral, de modo similar ao aquecimento em forno, como o tamanho dos cristais e os parâmetros da rede cristalina, eliminando água e impurezas nos sítios dos fosfatos e da hidroxila, surgindo novos compostos cristalinos. A faixa de temperatura alcançada durante o aumento de temperatura determina o efeito sobre os tecidos dentais, e é dividida em três faixas, relacionadas com a formação de novas fases cristalinas: fosfato de tricálcio na fase β (FTC- β : Ca₃(PO₄)₂- β), fosfato de tricálcio na fase α (FTC- α : Ca₃(PO₄)₂- α) e fosfato tetracálcio (FTeC: Ca₃(PO₄)₂O), de acordo com a Tabela 2 [12,13,72,73]:

Tabela 2 - Alterações observadas por faixas de temperatura durante aquecimento [13].

I	100 – 650 °C	hidroxiapatita (HAP) estável com alteração no parâmetro de rede
II	650 –1100 °C	crescimento de cristais de HAP, expansão do parâmetro da rede e formação FTC- β
III	> 1100 °C	FTC- β converte-se em FTC- α , fusão da HAP (1280 °C) e presença de FTeC (acima de 1300 °C)

Fonte: FOWLER, B.O.; KURODA, S., 1986.

As novas fases formadas, isoladamente, são mais solúveis na presença de ácidos, porém a maior resistência à desmineralização pode ser atribuída à eliminação de água, carbonato e ao crescimento de cristais. Bachmann e Zezell (2005) relacionaram alterações nas fases cristalográficas dos tecidos duros dentais após a irradiação com diversos comprimento de onda , entre eles os lasers de Ho:YLF (λ =2065 nm) e Nd:YAG

($\lambda = 1064 \text{ nm}$), onde foram observados o crescimento dos cristais, derivados da eliminação de água e carbonatos, de acordo com a Tabela 3 [72].

Tabela 3: Alterações provocadas na HAP e nos tecidos duros dentais pelo aquecimento em forno e irradiação laser na rede cristalina.

Tratamentos	Resultados Observados
HIDROXIAPATITA	
Aquecimento (1000 °C)	Crescimento dos cristais de HAP
Aquecimento (1500 °C)	Formação de $(\text{Ca}_3\text{PO}_4)_2 - \alpha$ e $\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2^\circ$
Nd:YAG / $\text{CO}_2 - 10,6 \mu\text{m}$ (500-3230 J/cm ²)	Crescimento dos cristais; $(\text{Ca}_3\text{PO}_4)_2 - \alpha$
DENTINA	
Q-Switched Nd:YAG ($\Delta t = 15 \text{ ns}$; $F=40 \text{ J/cm}^2$)	Crescimento de cristais de HAP; Formação de $\beta - (\text{Ca}_3\text{PO}_4)_2$ e $\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2^\circ$
Nd:YAG (150mJ / pulso)	Formação de $(\text{Ca}_3\text{PO}_4)_2 - \beta$ e $(\text{Ca}_3\text{PO}_4)_2 - \alpha$
$\text{CO}_2 - 10,6 \mu\text{m}$ (50 W)	Crescimento dos Cristais de HAP
Nd:YAG (207 J / cm ²)	Crescimento dos cristais de HAP
ESMALTE	
Aquecimento (100 – 900 °C)	Contração do parâmetro de rede a entre 200- 400 °C, expansão entre 500 – 900 °C
Aquecimento (100 – 1000 °C)	Variação na largura do pico (300) parâmetro de rede e formação de $(\text{Ca}_3\text{PO}_4)_2 - \beta$
Nd:YAG	Formação de $(\text{Ca}_3\text{PO}_4)_2 - \alpha$
$\text{CO}_2 - 10,6 \mu\text{m}$ (15- 12000 J/cm ²)	Formação de $(\text{Ca}_3\text{PO}_4)_2 - \alpha$
$\text{CO}_2 - 10,6 \mu\text{m}$ (10 W)	Formação de $(\text{Ca}_3\text{PO}_4)_2 - \alpha$
Argônio (67 J/ cm ²)	Contração do eixo a
$\text{CO}_2 - 10,6 \mu\text{m}$ (4 W)	Formação de $(\text{Ca}_3\text{PO}_4)_2 - \beta$
$\text{CO}_2 - 10,6 \mu\text{m}$ (104 J/cm ²)	Aumento dos cristais de HAP; Formação de $(\text{Ca}_3\text{PO}_4)_2 - \alpha$
Rubi (694 nm) 1 W	Formação de $(\text{Ca}_3\text{PO}_4)_2 - \beta$
$\text{CO}_2 - 9,3 \mu\text{m}$ (10- 50 J/cm ²)	Formação de $\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_3^\circ$
Q-switched Nd:YAG(100 J/cm ²)	Formação de $(\text{Ca}_3\text{PO}_4)_2 - \beta$

Fonte: BACHMANN, L; ZECELL, D.M., 2005.

As diferenças na constituição do esmalte e da dentina fazem com que os mesmos sejam afetados de forma distinta quando aquecidos. A perda de água se inicia a temperaturas inferiores a 100 °C, e a 1330 °C é totalmente eliminada do esmalte. A matriz inorgânica é eliminada com temperaturas inferiores a 350 °C, produzindo cianato (a 700 °C) e dióxido de carbono (a 400 °C). Na matriz inorgânica, o carbonato (radical da matriz mineral) começa a ser eliminado a partir dos 100 °C, e é totalmente eliminado a 1100 °C. O fosfato só apresenta alterações em sua concentração a partir da fusão da HAP (1280 °C), com a formação das novas fases cristalográficas (fosfato de cálcio nas fases α e β e fosfato de tetracálcio). O radical hidroxila inicialmente aumenta sua intensidade na faixa de temperatura de 400 °C, porém acima dessa temperatura a sua concentração diminui. Devido ao maior componente orgânico, a dentina perde mais massa do que o esmalte nas mesmas faixas de aquecimento [72,73].

As alterações na composição química dos tecidos duros dentais são dependentes da alta absorção da radiação incidente, de modo que uma grande quantidade de calor seja

gerada, visto que a temperatura alcançada determina o grau de alterações morfológicas e químicas nos tecidos e deve ocorrer em uma profundidade controlada, para evitar danos a estruturas adjacentes (tecidos periodontais e polpa)[13].

De acordo com Lin et al (2010), o comportamento térmico do elemento dentário é principalmente um processo de condução de calor relacionado aos seus processos fisiológicos (fluido dentinário e circulação pulpar). As propriedades termofísicas dos dentes são diferentes entre suas camadas (esmalte e dentina), e a circulação pulpar aumenta ou diminui de acordo com a temperatura, ajudando a difundir o calor quando a temperatura ultrapassa os 42 °C. De acordo com os autores, os modelos matemáticos precisam levar em consideração uma grande variedade de fatores, que incluem a geometria de cada elemento dentário, calor específico, capacidade térmica, e a difusão térmica, que corresponde à uma taxa entre a capacidade térmica em relação à densidade do material. De acordo com os autores, diferenças significativas vêm sendo observadas entre as propriedades termofísicas dos tecidos dentais em diferentes estudos, dependendo da metodologia utilizada [74].

A HAP é o elemento mais abundante nos tecidos duros dentais. Desta forma, os lasers que são melhores absorvidos por estes tecidos são os lasers de Erbio (Er:YAG e Er,Cr:YSGG) e os lasers de CO₂, com comprimentos de onda entre 9300 e 10600 nm. Os lasers de CO₂ apresentam uma maior interação com o maior pico de absorção dos radicais fosfato da HAP, enquanto os lasers de Er:YAG e o de Er,Cr:YSGG são ressonantes com os radicais fosfato, mas apresentam maior interação com a água presente nos tecidos, como demonstrado na Figura 5, que relaciona os coeficientes de absorção da HAP e da água em função do comprimento de onda [75].

Figura 5: Coeficientes de absorção da HAP carbonatada e H₂O em função dos comprimentos de onda dos lasers. Os picos de absorção representam os componentes dos radicais moleculares (hidroxila, água livre, carbonato e fosfato).

Fonte: NAGY, A., 2017.

Em tecidos duros dentais, quando lasers como o CO₂, Er,Cr:YSGG e Er:YAG são utilizados, as propriedades ópticas de absorção e reflexão são importantes em relação à interação destes comprimentos de onda com os tecidos, enquanto o espalhamento é desprezível. No emprego do laser de Nd:YAG em tecidos não pigmentados, o espalhamento predomina sobre a absorção, e modelos matemáticos consideram os coeficientes de espalhamento e anisotropia dos tecidos, entretanto negligenciam a refletividade, responsável por perda de grande parte de energia na superfície irradiada [74].

A Tabela 4 [76] apresenta os coeficientes de absorção e espalhamento do esmalte dental em relação aos lasers mais estudados em odontologia.

Tabela 4: Coeficientes de Absorção e Espalhamento do esmalte dental [7676]

Lasers	Comprimento de Onda	Coefficiente de Absorção (cm ⁻¹)	Coefficiente de Espalhamento (cm ⁻¹)
Visível	450-700 nm	< 1	40-100
Nd:YAG	1064 nm	< 1	15
Ho:YAG	2100 nm	< 20	Não determinado
Er,Cr:YSGG	2780 nm	450	Aproximadamente 0
Er:YAG	2940 nm	770	Aproximadamente 0
CO ₂	9300 nm	5500	Aproximadamente 0
CO ₂	9600 nm	8000	Aproximadamente 0
CO ₂	10300 nm	1125	Aproximadamente 0
CO ₂	10600 nm	825	Aproximadamente 0

Fonte: FEATHERSTONE, J.D.B., 2000.

Os lasers de Er:YAG; Er,Cr:YSGG e os diferentes comprimentos de onda dos lasers de CO₂ são estudados com intuito preventivo desde as décadas de 70 e 80 por diferentes autores, e o consenso é de que devem ser utilizados com densidades de energia sub-ablativas para possibilitar a promoção de alterações estruturais, evitando a remoção indesejável de tecido saudável. Entretanto, não há na literatura um consenso quanto a esse limiar de ablação [77,78]. De acordo com Liu et al (2005), densidades de energia acima de 19 J/cm² promovem ablação do esmalte dental [79].

Rodrigues-Vilchis et al (2011) avaliaram através de microscopia de força atômica, microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia de difração de energia dispersiva de Rx, as alterações morfológicas e estruturais do esmalte dental irradiado com diferentes densidades de energia (100 mJ – 12,7 J/cm²; 100 mJ – 7,5 J/cm²; 150 mJ – 11 J/cm²) com um laser de ER:YAG. Houve formação de crateras com diâmetros e profundidades variáveis em todos os grupos. Foi possível detectar alterações significativas na composição química (concentrações de cálcio, fósforo e cloro) nas crateras, entretanto não foi possível estabelecer um padrão químico característico [80].

Ahari et al (2012) irradiaram o esmalte de pré-molares antes da colagem de bráquetes ortodônticos com um laser de Er:YAG nos seguintes parâmetros: largura do pulso de 180 μ s; 300 mJ de energia por pulso; 10 Hz; diâmetro do feixe do feixe de 1 mm; distância de irradiação igual a 1 mm; em movimento de varredura durante 10 s; e observaram que não houve aumento na resistência à desmineralização *in vitro* no grupo tratado com laser em relação ao grupo controle. Porém, o modelo de ciclagem de pH não incluiu a adição de fluoreto nas soluções DES/RE [81].

Apel et al (2004) utilizaram os lasers de Er,Cr:YSGG e Er:YAG com potências subablativas (8 J/cm² e 6 J/cm² respectivamente), em amostras de esmalte dental para testar os efeitos sobre a desmineralização *in situ*. Cada amostra foi irradiada em uma área, deixando uma área controle não irradiada para comparação. Voluntários usaram dispositivos intra-orais contendo as amostras durante 1 semana. Foi realizado teste de microdureza de superfície Knoop antes e após o período de utilização dos dispositivos. Os autores descreveram uma tendência no aumento da resistência à desmineralização, porém não houve diferença com significância estatística [82].

Gehan et al observaram uma redução na desmineralização do esmalte dental ao redor de bráquetes ortodônticos após a utilização do laser de Er:YAG (2940 nm, 80 mJ, 2 Hz, 200 μ s de largura de pulso, sem refrigeração, modo não contato, durante 10 s, com distância de 4 mm em relação à face vestibular de pré-molares) previamente à aplicação de verniz fluoretado, em comparação com um grupo sem irradiação, um grupo com o uso do verniz isoladamente, e um grupo com a irradiação laser isoladamente. Todos os grupos foram submetidos à ciclagem de pH. Os resultados mais favoráveis do grupo onde o laser foi utilizado antes da aplicação do verniz fluoretado foi comprovado através de testes de microdureza e de MLP. A redução da desmineralização em relação aos demais grupos foi da ordem de 70 % [83].

Diferentes comprimentos de onda do laser de CO₂, em baixas densidades de energia, podem ser usados com sucesso para fundir esmalte e dentina com intuito preventivo, já que em função do alto coeficiente de absorção dos tecidos duros em relação a estes comprimentos de onda, a energia é absorvida na superfície, com ótimo aproveitamento. Deste modo, menores densidades de energia são necessárias para a indução de alterações químicas com o intuito de prevenção da cárie dental [84,85].

Foram registrados percentuais significativos na redução de perda mineral em esmalte dental, *in vitro*, após irradiação com laser de CO₂ em diferentes comprimentos de onda, entre 68 % e 85 % [86].

Entretanto, a maioria dos equipamentos comercialmente disponíveis de laser de CO₂ para aplicações em odontologia, operavam em regime de emissão contínua e, como demonstrado por Fried et al (1996), os lasers de CO₂ operando no regime contínuo provocam acúmulo de calor que poderia levar a dano pulpar [87]. Em um dos primeiros estudos com o laser de CO₂, 10.600 nm, realizado por Lobene e Bhussry (1968), foram verificados trincas e carbonização no esmalte dental (Figura 6) [88].

Figura 6: Esmalte adjacente à região de incidência do feixe de laser de CO₂; 20 W; 1 a 4 mm; 0,1 a 5s; DE = 15 a 12000J/cm²; DP= 150 a 2400 W/ cm²; C= trincas; I = carbonização; N= esmalte normal.

Fonte: LOBENE, R.R.; BHUSSRY, R.A.J. 1968.

Em 2011, Rechman et al demonstraram pela primeira vez que a irradiação com laser de CO₂, emitindo no comprimento de onda 9600 nm, foi eficaz na inibição da desmineralização de esmalte dental humano *in vivo*. Realizaram a irradiação de áreas próximas a braquetes colados em pré-molares, com os seguintes parâmetros: largura de pulso 20 µs; 20 Hz; diâmetro do feixe 1100 µm; densidade de energia média de $4,1 \pm 0,3$ J/cm²; 20 pulsos por ponto. Uma área não irradiada próxima, no mesmo dente, serviu como controle. Os participantes eram orientados a escovar os dentes com um dentifrício contendo 1100 ppm de fluoreto, duas vezes ao dia, durante um minuto. Os elementos dentários foram extraídos por razões ortodônticas, depois de 4 e 12 semanas em 2 diferentes grupos, separados de acordo com a faixa etária. A redução da desmineralização foi de 46% e 87%, respectivamente, em relação à área controle [89].

Um novo equipamento de laser de CO₂ emitindo no comprimento de 9300 nm, pulsado, foi aprovado pelo FDA (Administração de Alimentos e Drogas dos USA) em 2013 para uso *in vivo*, sendo um equipamento promissor para uso nos tecidos orais. Contém a

molécula de gás $^{12}\text{C } ^{18}\text{O}_2$ e não a $^{12}\text{C } ^{16}\text{O}_2$, por isso denominado gás CO_2 isotópico, apesar do átomo ^{18}O ocorrer naturalmente e ser estável, porém mais raro. O equipamento depende de um computador para gerenciar o manejo do feixe, proporcionando uma variação no diâmetro, de modo a atingir uma grande área em uma velocidade maior do que seria possível à mão livre, garantindo margens mais precisas e menor aquecimento. O sistema permite o controle da velocidade de emissão dos pulsos como resposta à pressão no pedal, de forma semelhante ao que acontece com o uso da turbina nos consultórios odontológicos, emitindo entre 1 a 10.000 pulsos por segundo, e a duração de cada pulso pode ser ajustada entre 1-500 μs [90].

Vitale et al (2011) avaliaram a incorporação de fluoreto no esmalte dental de pré-molares (que seriam posteriormente extraídos por razões ortodônticas) associado à irradiação com laser de diodo em alta intensidade em comparação com a aplicação do fluoreto isoladamente (gel com 12500 ppm fluoreto – 2 minutos) e nenhum tratamento. O gel foi aplicado em dois grupos: antes e após a irradiação com laser de diodo (809 nm); 2 W de potência; 20 s de irradiação; diâmetro da fibra 400 μm ; modo não contato, com distância padronizada de 4 mm; movimento de varredura. Houve maior incorporação de fluoreto por parte dos grupos irradiados em relação ao grupo onde o laser não foi utilizado e o grupo controle ($p < 0,05$), entretanto não houve diferença entre os grupos irradiados [91].

Apesar do consenso de que as altas temperaturas alcançadas com a irradiação laser em alta intensidade sejam eficazes para promover o aumento da resistência à desmineralização em tecidos duros dentais, alguns estudos foram realizados com o uso do laser de argônio (488 nm) em baixa intensidade, associado ou não ao uso de fluoreto, obtendo resultados positivos no uso deste comprimento de onda para esta finalidade [92,93].

Miresmaeili et al (2014) utilizaram o laser de argônio (6.9 J/cm²; 0.270 W; 5 mm de diâmetro do feixe; DP 1080 mW/cm²; largura do pulso de 10 ms; durante 10s; em uma extensão de 2 mm a partir da borda de bráquetes ortodônticos colados em pré-molares), na prevenção da desmineralização do esmalte dental. Foram irradiadas superfícies hígidas e lesões incipientes de cárie induzidas *in vitro*. Foi feita irradiação na face vestibular dos dentes após o condicionamento ácido convencional e polimerização do cimento adesivo com o laser de argônio (grupo 2); durante 10 s antes da polimerização do cimento com luz halógena (grupo 3); durante 10 s antes da polimerização com laser de argônio durante 10 s (grupo 4); e durante 10 s após indução de lesões incipientes de cárie, e antes da cimentação com luz halógena (grupo 5). Um grupo controle (grupo 1) não foi irradiado e o cimento foi

polimerizado com lâmpada halógena. Os grupos irradiados com laser de argônio antes ou depois da cimentação apresentaram menores lesões com diferença com significância estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle. O grupo 5 apresentou as menores profundidades de lesão entre todos os grupos ($p=0,44$) após 10 dias de ciclagem de pH, com uma redução de 45% na média de profundidade das lesões em relação ao controle [94].

Os efeitos positivos alcançados com o uso de lasers em baixa intensidade são atribuídos supostamente a alterações na polarização de componentes do esmalte dental em função da irradiação, facilitando uma maior retenção do fluoreto, entretanto ainda não há comprovação na literatura.

3.4 – Laser de Nd:YAG

O laser de Nd:YAG (Granada de ítrio e alumínio dopada com o íon neodímio) foi o primeiro laser a ser comercializado para uso em tecidos moles em odontologia, e logo em seguida foram iniciadas pesquisas buscando aplicações seguras em tecidos duros dentais.

O sistema de entrega dos lasers de Nd:YAG (fibra óptica flexível) foi considerado por Adrian (1977) e Rezaei et al (2011) como tendo um maior potencial de uso clínico, o que constitui uma vantagem para o acesso intraoral em relação aos lasers de Er:YAG e CO₂, cuja entrega era feita inicialmente somente por meio de braços articulados [95,96].

O esmalte dentário apresenta fortes bandas de absorção a 2.900 nm, 7.900 nm e 9.600 nm. Por ser fracamente absorvido pelos componentes dos tecidos duros dentais (Figura 7), a profundidade de penetração do laser de Nd:YAG é menos previsível do que nos lasers de Er:YAG e CO₂, o que poderia gerar danos térmicos à polpa. Deste modo, o uso de fotoabsorvedores é indicado para manter o calor na superfície, potencializando seus efeitos e controlando a difusão de calor às estruturas adjacentes [95,97, 98].

Figura 7: Localização do laser de Nd:YAG (1064 nm) no espectro de absorção dos principais componentes dos tecidos biológicos.

Fonte: Adaptado de ANA, P.A, 2006.

O laser de Nd:YAG tem o potencial de promover alterações na estrutura e composição dos tecidos dentais, especialmente quando associado a um fotoabsorvedor na superfície dental. Bedini et al (2010), estudaram o efeito da irradiação com diferentes potências do laser de Nd:YAG (0,6 W, 1,2 W e 2,4 W) para avaliar alterações na microdureza e aspectos morfológicos do esmalte dental, e concluíram que para promover um aumento de retenção na superfície dental potências maiores deveriam ser usadas, enquanto que para aumentar a resistência à desmineralização com preservação da integridade do esmalte, menores potências são requeridas. Quando os parâmetros de 60 mJ; 10 Hz; 0,6 W foram utilizados, o esmalte tratado apresentou uma superfície mais lisa, sem a presença de microtrincas, mantendo as características de dureza de superfície [99].

A tinta nanquim foi utilizada sobre tecidos duros dentais previamente à irradiação com laser de Nd:YAG em diversos estudos, onde seu uso como fotoabsorvedor proporcionou melhores resultados na fusão [97] e na topografia do esmalte irradiado, quando comparado com a irradiação do laser isoladamente [100].

Scabar et al (2005), observaram através de MEV que os efeitos sobre a morfologia do esmalte dental humano após a irradiação com laser de Nd:YAG (80 mJ; 10 Hz; 0,8 W; 113,2 J/cm²; diâmetro da fibra 300 μm), foram mais uniformes na presença do carvão vegetal como fotoabsorvedor do que com o uso de verniz fluoretado. A presença das duas substâncias promoveu fusão e recristalização do esmalte dental, porém a pasta de

carvão foi considerada mais adequada, por ter promovido uma maior extensão de fusão na superfície, além de mais uniforme, observado através de microrradiografias [101].

Corrêa-Afonso et al (2015), por meio da análise de Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) compararam as bandas de absorção do esmalte dental e as alterações na superfície do esmalte irradiado com laser de Nd:YAG (0,3 mm de diâmetro do feixe; contato; 0,8 W; 10 Hz; DE 113 J/cm²; largura de pulso de 250 µs) com e sem fotoabsorvedor (carvão vegetal triturado, diluído em partes iguais de etanol 99% e água deionizada). De acordo com a análise dos resultados obtidos, onde não foram observadas alterações nas bandas de absorção da água e carbonato no grupo onde não foi utilizado o fotoabsorvedor, concluíram que sem o fotoabsorvedor, a temperatura na superfície do esmalte não foi suficiente para provocar alterações na composição química do esmalte com intuito de aumentar a sua resistência à desmineralização [102].

Valério et al (2015) irradiaram o esmalte de dentes decíduos com laser de Nd:YAG, usando os seguintes parâmetros: 10 Hz; 0,8 W; 80 mJ, variando as larguras de pulso utilizadas: 10.000 µs, 700 µs e 350 µs. Em todos os grupos o aumento de temperatura foi superior a 5,5°C, variação de temperatura considerada segura para a polpa [103], porém os autores não utilizaram uma substância fotoabsorvedora para restringir o calor gerado pela irradiação laser em alta intensidade à superfície [104].

Yu et al (1995) mediram a variação de temperatura na polpa em dentes humanos durante a irradiação com laser de Nd:YAG no esmalte dental. Termopares tipo T foram presos à parede pulpar. O diâmetro do feixe variou entre 4 mm e 8,2 mm. Para cada diâmetro, foram variados os seguintes parâmetros: 20 W e 5 W; largura de pulso entre 100 µs e 50 ms e taxa de repetição entre 1-5000 Hz; e irradiações feitas sob água ou não. Durante a irradiação sob água, usando o maior diâmetro do feixe (8,2 mm) e com a potência igual a 5 W foram registradas as menores variações de temperatura (entre 10° e 22° C aproximadamente, variando de acordo com a presença ou não de refrigeração, e movimento ou não da fibra) sendo que os autores também não utilizaram uma substância fotoabsorvedora. A variação de temperatura foi entre 31° C a 101° C durante a irradiação com 20 W de potência, de acordo com as mesmas variáveis [105].

3.4.1 – Associação do Laser de Nd:YAG e fluoreto

Vários estudos demonstraram que as alterações estruturais pelo aquecimento levam a uma maior incorporação de elementos químicos como o Flúor nos tecidos duros dentais [97,98,106].

Durante a aplicação tópica de FFA ocorre uma dissolução maior de cristais de HAP, aumentando a quantidade de CaF_2 na superfície do esmalte dentário. A irradiação laser permite uma maior retenção dos íons flúor, mas o mecanismo ainda não está estabelecido. A irradiação laser pode aumentar a difusão de íons flúor até as camadas mais internas da estrutura cristalina do esmalte, criando novas reservas de flúor e diminuindo a sua solubilidade. O pH crítico para a dissolução de esmalte passa do pH 5,5 para um pH de 4,8 quando o tecido é irradiado [107].

Utilizando amostras de dentes permanentes extraídos, Morioka et Tagomori (1981) aplicaram sobre a superfície do esmalte uma solução de FFA (2% NaF; 0,68 M H_3PO_4 ; pH 5,3) antes e após a irradiação com um laser de Nd:YAG (parâmetros: DE entre 0 e 150 J/cm^2 , 10 pulsos por segundo (pps) e tempo de irradiação de 0,5 s). Com fluências acima de 30 J/cm^2 observaram uma redução de dissolução do esmalte dental, e nas amostras onde a irradiação laser foi realizada após a aplicação de FFA, houve uma maior incorporação de flúor, com maior resistência à desmineralização [108].

Ana et al (2005) em uma revisão de literatura, selecionando trabalhos listados pela *Medline*, *Web of Science*, *Embase* e *Cochrane*, puderam constatar o efeito preventivo dos lasers de alta intensidade na prevenção de cárie em esmalte. Verificaram que a irradiação com quaisquer dos comprimentos de onda utilizados (Nd:YAG, CO_2 , Er:YAG, ER,Cr:YSGG e Argônio) aumentou a incorporação de fluoreto nos tecidos, sendo um tratamento mais promissor do que somente a irradiação com os lasers ou a aplicação de fluoreto isoladamente [12].

Em alguns estudos não foi observado o aumento de incorporação de fluoreto após a irradiação com lasers de alta potência, principalmente quando o laser utilizado foi o laser de Nd:YAG. Importante salientar que na maioria destes estudos não foi utilizada uma substância fotobasorvedora com a intenção de reter a energia do laser na superfície do esmalte, de forma que fosse possível alcançar a temperatura suficiente para promover alterações no tecido dental estudado [109].

Rezaei et al (2011), em uma revisão de literatura sobre estudos envolvendo diversos comprimentos de onda (Nd:YAG, CO_2 e Argônio), relatou que a irradiação laser

isoladamente poderia aumentar significativamente a resistência dos tecidos duros dentais à desmineralização, entretanto a sua associação com fluoreto promoveria melhores resultados contra o surgimento de lesões cariosas e contra a progressão de lesões incipientes [95].

Chen e Huang (2009) irradiaram pré-molares com os lasers de Nd:YAG e CO₂, isoladamente ou em conjunto com FFA, alternando a ordem de aplicação do fluoreto, para comparar entre eles e outros 2 grupos, um controle e outro onde somente foi feita a aplicação de FFA, a concentração de cálcio na solução após dois dias de ciclagem com de pH. Todos os grupos laser foram irradiados com a DE igual a 83,33 J/cm². A concentração de cálcio foi menor em todos os grupos laser em relação ao grupo controle ($p < 0,50$ e ao grupo FFA, entretanto não houve diferença com significância estatística entre os grupos irradiados [110].

3.5– Diagnóstico da cárie

De acordo com Carounanidy e Sathyanayarayanan (2009), diagnóstico compreende o reconhecimento de uma doença ou condição por meio de seus sinais ou sintomas, em um processo hipótese-dedutivo, onde dados são coletados de forma metódica para destacar uma doença em particular entre outras possíveis listadas (diagnóstico diferencial) [111].

A doença cárie é caracterizada por uma evolução de estágios, com severidade crescente em função do estado de desmineralização dos tecidos duros dentais, variando de alterações subclínicas, subsuperficiais, a nível molecular, a lesões com envolvimento dentinário, com uma superfície intacta ou cavitação óbvia, como exemplificado na Figura 8 [4].

O diagnóstico depende do conhecimento, capacidade de observação e disciplina do observador, de modo a que as análises sejam executadas com a mesma acurácia na detecção de sinais de diferentes severidades. Em relação à doença cárie, há grande variabilidade por parte dos pesquisadores e clínicos, com necessidade de padronização para a detecção de sinais da doença em diferentes locais do elemento dental e também na quantificação da severidade destes sinais intra e inter examinadores [111] .

Figura 8: Diagrama da metáfora do iceberg para a cárie dentária, identificando as fases da cárie registradas em diferentes limiares diagnósticos. O índice cpo (dentes decíduos) e CPO (dentes permanentes) é usado para quantificar a experiência de cárie, que é a soma de dentes cariados, perdidos e obturados. O pontilhado refere-se ao limite do diagnóstico utilizado. De /DE refere-se a cárie de esmalte ou dentina, enquanto e / E refere-se apenas a cárie em esmalte.

Fonte: SELWITZ, R.H; ISMAIL, A.I; PITTS, N.B., 2007.

3.5.1 Diagnóstico clínico

Como a desmineralização dos tecidos duros dentais é passível de ser prevenida e revertida em estágios iniciais, a acurácia de técnicas que permitam o diagnóstico preciso e precoce é de extrema importância. Como a doença cárie é um produto da interação de múltiplos fatores, endógenos e exógenos, a eliminação de todos de forma definitiva geralmente não é possível, ocorrendo um equilíbrio entre um estado patológico e fisiológico. A análise dos fatores que interfere nesse equilíbrio é denominada como avaliação do risco de cárie [111].

A inspeção visual é uma forma subjetiva, dependente da sensibilidade de um observador treinado, para a detecção e acompanhamento da atividade das lesões de cárie. A elaboração de índices para o diagnóstico e classificação do seu estágio clínico, baseados na quantidade de faces atingidas no elemento dental e na extensão das lesões, foram

relacionados por diferentes estudos na literatura. Entretanto, devido a inconsistências entre os índices, foi observada a necessidade de uniformização para se obter a padronização dos índices utilizados em pesquisas, estudos de cariologia, educação, buscando também a extrapolação para a prática clínica. O Sistema Internacional para Detecção e Acompanhamento de Cáries (International Caries Detection and Assessment System - ICDAS), cujos escores apresentam-se descritos na Tabela 5 e seus aspectos visuais exemplificados na Figura 9, apresenta uma boa correlação com a histologia [112,113].

Tabela 5: Índice ICDAS

0	Nenhuma ou mínima alteração na translucidez do esmalte após secagem prolongada
1	Primeira alteração visual no esmalte após secagem, ou restrita a fôssulas e fissuras
2	Alterações visuais distintas no esmalte
3	Esmalte opaco ou descolorido, com ruptura localizada (sem dentina envolvida)
4	Sombreamento escuro da dentina
5	Cavidade distinta com dentina visível
6	Cavidade Extensa, com dentina visível (mais da metade da superfície)

Fonte: PITTS, N.B., 2004.

Figura 9: Aspectos visuais associados ao ICDAS

Fonte: PITTS, N.B., EKSTRAND, K.R.; 2013.

O exame visual tradicionalmente é realizado em conjunto com o uso de sondas exploradoras, que atualmente é contraindicado, e deve ser evitado. A sondagem pode inadvertidamente por ação mecânica transformar lesões incipientes não cavitadas em cavitadas [114].

A aplicação dos escores do sistema ICDAS obedece a uma metodologia de avaliação durante o exame clínico, como descrito na Árvore de Diagnóstico ilustrada na Figura 10 [115].

Figura 10: Árvore de decisão de diagnóstico

Fonte: BUSSANELI, D.B., 2010.

Na última década, após trabalhos conjuntos com diversas instituições mundiais, foi implementado um sistema de classificação de risco e gerenciamento de riscos da doença cárie – Sistema Internacional de Classificação e Acompanhamento de Cárie (ICCMS – International Caries Classification and Management System), baseado nos escores do sistema ICDAS, com a intenção de auxiliar na tomada de decisões de tratamento com melhores resultados focados na prevenção [113].

Rechmann et al (2018) publicaram os resultados de um estudo sobre a calibração de cirurgiões dentistas na aplicação do sistema CAMBRA (Caries Management by Risk Assessment), baseados na análise de pacientes sob o prisma do sistema ICDAS, ou seja, calibrar as ações preventivas/intervencionistas nos elementos dentais, de acordo com a classificação das alterações na estrutura dentária, em função do risco de cáries de cada paciente. Entre os 7300 profissionais registrados na região da Baía de São Francisco, (CA, USA), 100 mostraram interesse, e 30 ingressaram no programa após a explicação da metodologia, e nenhum deles era familiarizado com o sistema ICDAS. Após o treinamento, que incluiu revisão dos critérios de exame e diagnóstico da doença cárie e do sistema ICDAS; demonstração de exames com um examinador padrão ouro; calibração dos examinadores por meio de comparação com exames feitos pelo examinador padrão ouro e registro dos dados por meio de um software, os profissionais acompanharam aproximadamente 900 pacientes ao longo de 2 anos. Ao final do estudo, concluiu-se que os profissionais foram capazes de ser calibrados para a coleta de dados baseados em critérios pré-determinados, entretanto a confiabilidade na avaliação de lesões não cavitadas foi pequena [116].

3.5.2 Diagnóstico por meio de técnicas ópticas

As alterações nas propriedades ópticas dos tecidos dentais são primariamente detectadas através do exame visual, quando o cirurgião dentista avalia a presença de manchas brancas ou sombras no elemento dentário. A análise clínica da mancha branca na superfície dentária sugere a profundidade e a atividade da lesão, direcionando a escolha do tratamento a ser empregado, embora seja um método que dependa da sensibilidade do examinador (Figura 11)[3].

Figura 11: Lesão de cárie após exposição à sacarose 8 x /dia: a) R – resina de embutimento; S – superfície de esmalte; L – extensão da lesão subsuperficial, E- esmalte íntegro. b) na fotografia observa-se Lesões de Cárie visíveis clinicamente – Manchas Brancas.

Fonte: CURY, J.A., 2001.

A interação da radiação eletromagnética com um meio poderá produzir uma variedade de fenômenos (Figura 12), dependendo das características do meio e da fonte de luz. No caso do elemento dentário, quando ocorre Reflexão, a radiação incidente não penetra no dente, retornando na direção da fonte (sem sofrer alteração em seu comprimento de onda). Na Transmissão, a radiação atravessa o dente sem sofrer nenhuma interação, e neste caso dizemos que o meio é transparente para aquele comprimento de onda. A radiação incidente pode sofrer Absorção com subsequente produção de calor, quando a energia luminosa é transferida para algum cromóforo e transformada em calor. No Espalhamento, a radiação penetra e muda de direção ao interagir com estruturas internas. Pode ocorrer o fenômeno de espalhamento com liberação de Fluorescência. Nesse caso, o fóton é absorvido, há a excitação de algum cromóforo presente, e liberação de energia luminosa após um curto período de tempo, e o fóton liberado possui menor energia (e maior comprimento de onda). Pode também ocorrer o Retroespalhamento da radiação incidente, onde um fóton da onda eletromagnética atinge uma estrutura espalhadora, retornando na mesma direção da radiação incidente. A interpretação desses fenômenos fornece, portanto, informações precisas sobre o meio estudado [122].

Figura 12: Interação da luz com os tecidos dentais: a) Reflexão; b) Transmissão; c) Absorção com produção de calor; d) Espalhamento; d.1) Fluorescência; d.2) Retro Espalhamento.

Fonte: Autor da Tese.

A estrutura do dente, pela distribuição e tamanho de seus componentes, comparáveis à porção visível e infravermelho próximo do espectro eletromagnético, torna o diagnóstico com técnicas ópticas especialmente adequado. Comprimentos de onda maiores sofrem menos espalhamento, e por este motivo têm uma penetração maior nos tecidos do que comprimentos de onda menores. Os comprimentos de onda situados entre 400-700 nm,

na porção visível do espectro, são fortemente espalhados e por este motivo não são adequados para iluminar através dos elementos dentários [117].

Para comprimentos de onda abaixo de 1000 nm, as propriedades de espalhamento são responsáveis pelo principal fenômeno que acontece na análise de tecidos dentais devido ao tamanho das partículas, comparáveis ao tamanho da luz incidente, analisados pela teoria do espalhamento do tipo Mie [118].

A magnitude do espalhamento diminui à medida que o comprimento de onda da fonte de luz aumenta, chegando a ser 30 vezes menor na faixa de 1310- 1500 nm do que na porção visível do espectro [119].

Por este motivo, de acordo com Jones et al (2003), o comprimento de onda de 1310 nm penetra até 3,2 mm no esmalte dental, enquanto que para comprimentos de onda maiores do que 1550 nm, o coeficiente de atenuação óptica não diminuiria mais devido ao aumento do coeficiente de absorção da água para esta faixa do espectro. A Figura 13 mostra os coeficientes de atenuação da água e do esmalte dental relacionados aos comprimentos de onda no intervalo visível e infravermelho próximo do espectro [120].

Figura 13: Coeficientes de atenuação do esmalte dental e coeficientes de absorção da água. Adaptado de Jones et al (2003)

Fonte: JONES, R.S.; HUYNH, G.D.; JONES, G.C.; FRIED, D., 2003.

A desmineralização acarreta a difusão de cálcio, fósforo e carbonatos para fora do tecido, com maior quantidade de água preenchendo as lacunas criadas, e acontece um maior espalhamento da radiação incidente. A porosidade nos tecidos dentais causada pela desmineralização é a base de diversas técnicas de diagnóstico, listadas na Tabela 6 [121, 122].

Tabela 6 : Técnicas ópticas utilizadas em diagnóstico

Tomografia por Coerência Óptica	OCT
Espectroscopia Polarizada Raman	RPS
Tomografia por Coerência Óptica Sensível à Polarização	PS-OCT
TransIluminação por Fibra Óptica	FOTI
Fluorescência Quantitativa Induzida por Luz	QLF
Fluorescência Induzida por Laser	LF
TransIluminação por Luz no Infravermelho Próximo	TI-NIR

Fonte: KARLSSON, L. 2010.

Algumas dessas técnicas, como a fluorescência induzida por laser (FL), já estão comercialmente disponíveis e bastante difundidas. A fluorescência apresenta grande sensibilidade, entretanto, pouca especificidade, pois pode apresentar falsos resultados em função de manchas e cálculos, devido ao fato do equipamento detectar porfirinas e outros produtos bacterianos, e não a desmineralização em si, motivo pelo qual não é eficiente em casos de erosão dentária, onde há dissolução dos tecidos dentais por ácidos sem o envolvimento de microrganismos.

As técnicas Quantitative Light-induced Fluorescence (QLF) e FOTI (Fiber Optic TransIlumination) ou DiFOTI (Digital Imaging Optical TransIlumination) utilizam fontes de iluminação com comprimento de onda na porção visível do espectro, com penetração limitada a 1 ou 2 mm. O sistema FOTI não permite um registro da imagem obtida, dificultando um acompanhamento longitudinal, além de continuar sendo dependente da interpretação do operador. O sistema DiFOTI usa uma câmera acoplada para o registro de imagens em tons de cinza, entretanto não há um software para quantificar os dados [123].

Na QLF, a alteração da fluorescência emitida pelos tecidos dentários pode ser armazenada e quantificada, entretanto a análise das regiões proximais não é possível. A técnica de Transiluminação com Luz no Infravermelho próximo (780-1550 nm) apresenta uma imagem familiar ao clínico, e possui maior penetração devido ao fraco espalhamento e pouca absorção dos tecidos dentais nesta faixa do espectro. O sistema é composto de uma fonte de luz no infravermelho próximo, uma câmera CCD e um software para computador, permitindo a captura da imagem em formato digital, sendo um método promissor no diagnóstico de cáries [124].

Jung et al (2018) buscaram desenvolver um sistema de classificação oclusal, denominado de Escore Quantitativo Oclusal (QS-Oclusal), através da estipulação de valores para padronizar a interpretação de imagens captadas através de técnica de QLF em superfícies oclusais, analisando as propriedades de fluorescência de lesões não cavitadas, para assim substituir a análise clínica por este sistema de avaliação. A metodologia usada foi através da comparação de imagens digitais obtidas com QLF (QLF-D) de superfícies oclusais de 791 dentes, de 94 indivíduos, com análises clínicas baseadas nos critérios de avaliação da ICDAS. A fluorescência vermelha (devido a porfirina produzida por bactérias) aumenta à medida que a lesão progride, porque mais bactérias penetram quando os poros vão aumentando e a atividade metabólica vai aumentando. Trinta dentes foram extraídos e foi possível comparar os resultados do exame visual, da QS-Oclusal e da microscopia com luz polarizada (Figura 14). O sistema foi considerado apropriado para substituir o exame clínico, ou torná-lo mais preciso [125].

Figura 14: Superfícies oclusais de acordo com a técnica QS-Oclusal, obtidas por meio de QLF-D (luz branca e imagens de fluorescência) e microscopia de luz polarizada (PLM)

Fonte: JUNG, E.H.; LEE, E.S.; JUNG, H.I.; KANG, S.M.; JONG, E.J.; KIN, B.I., 2018.

4 – TOMOGRAFIA POR COERÊNCIA ÓPTICA (OCT)

A técnica de OCT é baseada em princípios de interferometria de baixa coerência, com penetração da ordem de milímetros, permitindo a visualização de microestruturas a camadas profundas. É uma técnica não destrutiva, e com resolução axial e lateral da ordem de micrometros, possibilitando a análise das propriedades ópticas dos tecidos em tempo real, sem o uso de radiação ionizante. A resolução alcançada por meio da técnica de OCT é superior à da técnica do ultrassom, e inferior à da técnica de microscopia confocal, sendo que esta é uma técnica destrutiva (Figura 15) [126].

Figura 15: Comparação da resolução e penetração da OCT com ultrassom e microscopia confocal

Fonte: Adaptado de AMARAL, M.M. 2013.

O interferômetro de Michelson é a base mais utilizada em OCT. Um feixe luminoso, proveniente de uma fonte óptica de grande largura espectral emitindo no infravermelho próximo, incide sobre um divisor de feixes, sendo que 50% da radiação luminosa ilumina um espelho de referência, e os outros 50% são direcionados para a amostra que se deseja estudar. Os fótons da radiação incidente que sofrerem retroespalhamento retornam na direção da fonte, onde serão recombinados com a radiação refletida pelo espelho de referência, sofrendo interferências construtivas e destrutivas (dependendo da fase da onda, da amplitude e frequência da onda refletida). As interferências ocorrem quando os caminhos ópticos da amostra e do espelho de referência são iguais, ou diferentes do comprimento de coerência da fonte. Estas interferências geram um sinal elétrico, que corresponde a uma varredura axial na amostra, com amplitude proporcional à intensidade da

luz retroespalhada, interpretado por um software e convertido em imagens, conforme o esquema da Figura 16 [126].

Figura 16: Representação esquemática da varredura da amostra por meio da técnica da OCT. [127]

Fonte: CARA, A.C.; ZECELL, D.M.; ANA, P.A.; MALDONADO, E.P.; FREITAS, A.Z., 2014.

Quando a radiação incidente não possui uma frequência de vibração ressonante com as partículas de um tecido alvo (condição para ocorrer o fenômeno de absorção), as partículas do meio sofrem uma vibração forçada, os fótons sofrem uma alteração em sua direção de propagação e a onda muda de direção, ocorrendo o espalhamento dessa radiação. O tipo de espalhamento depende do comprimento de onda incidente em relação ao tamanho das partículas do meio sobre o qual incide. Se a radiação espalhada possuir o mesmo comprimento de onda da radiação incidente, não houve perda de energia, e o espalhamento é elástico. Quando as partículas são menores do que o comprimento de onda da radiação incidente, acontece um tipo especial de espalhamento, o Rayleigh, com probabilidade de acontecer o retroespalhamento igual à de ocorrer o espalhamento na direção de propagação da radiação incidente. Quando a radiação incidente é comparável às dimensões das partículas do meio, o espalhamento é do tipo Mie, com direcionamento preferencialmente na mesma direção da radiação incidente. Nos tecidos biológicos, o espalhamento não ocorre na maioria dos casos de uma ou outra forma, mas como uma combinação dos dois tipos [128].

O espalhamento decorre da descontinuidade do índice de refração no meio de propagação, e sua eficiência é dependente da razão entre os índices de refração de uma estrutura espalhadora e o do meio em que ela se encontra. O espalhamento também não depende exclusivamente do comprimento de onda ou do tamanho da estrutura espalhadora,

mas da razão entre eles. Para uma avaliação do espalhamento da radiação no interior de um tecido, deve-se considerar os índices de refração de estruturas presentes neste tecido, assim como o tamanho delas em relação ao comprimento de onda incidente (Tabela 7 e Figura 17) [52].

Tabela 7: Descrição das estruturas que compõem o esmalte dental e suas dimensões

ESTRUTURA ESMALTE	DESCRIÇÃO	TAMANHO
Prismas de Esmalte	Largura	4,9 – 5,3 μm
Regiões Interprismáticas	Distância entre prismas	0,1 - 0,5 μm
Cristais de HAP	Comprimento	1000 nm
	Diâmetro	40 nm
Rede Cristalina dos cristais de HAP	Eixo <i>a</i>	~ 0,94 nm
	Eixo <i>c</i>	~ 0,69 nm

Fonte: Adaptado de BACHMANN L.; ZECELL D.M.; 2005.

Figura 17: Diagrama representando as dimensões das estruturas que compõem o esmalte e a dentina.

Fonte: BACHMANN L.; ZECELL D.M.; 2005.

Comprimentos de onda menores sofrem mais espalhamento, o que limita a sua aplicação em diagnóstico óptico. A probabilidade de ocorrer espalhamento diminui com o aumento do comprimento de onda incidente, portanto comprimentos de onda maiores sofrem menos espalhamento, e por este motivo penetram mais nos tecidos [121].

O equipamento de OCT realiza múltiplos escaneamentos longitudinais (A-scan) em uma série de locais adjacentes (interferogramas), criando um mapa tomográfico

bidimensional da amostra analisada (B-scans), de forma análoga à técnica de ultrassom, utilizando ondas eletromagnéticas e não ondas sonoras, com maior resolução. A reconstrução digital 3D de um tecido é realizada pelo conjunto de B-scans realizados (Figura 18)[126].

Figura 18: Construção de imagens a partir de uma sequência de A-Scans realizados por meio da técnica de OCT.

Fonte: CARA, A.C.; ZECELL, D.M.; ANA, P.A.; MALDONADO, E.P.; FREITAS, A.Z., 2014

A técnica de OCT permite a visualização de cortes transversais do tecido examinado, em uma imagem semelhante à histologia, como ilustrado na Figura 19 [129].

Figura 19 : Amostra avaliada por: a) Histologia; b) OCT 1300 nm; c) OCT 840 nm. Esmalte (E), dentina (D) e junção amelodentinária (seta). Nota-se a semelhança entre as imagens.

Fonte: MAIA, A.M.A.; FONSECA, D.D.D.; KYOTOKU, B.B.C.; GOMES, A.S.L., 2010.

Os sistemas de OCT podem ser classificados em TD-OCT (Time Domain) e FD-OCT (Frequency Domain). No TD-OCT, o espelho de referência move-se linearmente, para

formar padrões de interferência com os diversos retroespalhamentos provenientes de diferentes posições na amostra. Desta forma, o caminho óptico do braço de referência altera-se para encontrar os caminhos ópticos que a radiação percorreu na amostra. No FD-OCT, o braço de referência não se move, e os padrões de interferência são obtidos a partir de um espectrômetro com uma grade de difração e um dispositivo CCD (Charge Coupled Device) internos [130].

O sinal retroespalhado é representado em escala logarítmica, traduzido normalmente sob a forma de tons de cinza, onde a cor branca representa um sinal de alta intensidade (alto espalhamento) e a preta, um sinal de baixa intensidade (baixo espalhamento). Entretanto, um esquema de cores falsas pode ser atribuído para uma melhor visualização de sutis diferenças na amostra estudada. As alterações das propriedades ópticas dos tecidos dentais provocadas pela desmineralização podem ser detectadas precocemente, antes que as técnicas convencionais possam detectar alterações estruturais [131,132,133,134].

Kashet et al (1989) verificaram que as alterações no esmalte dental, em função do aumento do processo de desmineralização, podem ser percebidas de forma precoce *in vitro* e *in situ* por meio da variação dos valores de penetração de íons iodeto (ΔI_p) devido às porosidades. A penetração dos íons iodeto acontecem antes de alterações no esmalte dental serem detectadas em microradiografias e microscopia de polarização óptica [135].

Em 1998, Colston et al publicaram o primeiro estudo de tecidos moles e duros da cavidade oral com OCT, com indicações de uso para patologias de tecidos moles periodontais, e lesões de cárie e fraturas dentárias [136]. Em seguida, mostraram as primeiras imagens de tecidos dentais obtidas por meio de um equipamento de OCT com comprimento de onda central igual a 1310 nm, *in vivo*, com imagens de profundidades de 3 mm e 1,5 mm em tecidos duros e moles respectivamente, visualizando estruturas como a esmalte, dentina, junção amelo dentinária, sulco gengival e epitélio gengival [137].

Através da técnica de OCT, Moraes et al (2017) acompanharam qualitativa e quantitativamente a perda de tecido dentinário *in vitro*, detectando alterações na penetração da luz na amostra em função da desmineralização, e foi verificado que as alterações nos coeficientes de atenuação óptica puderam ser detectadas antes que qualquer perda macroscópica de tecido pudesse ser percebida em lesões induzidas de erosão [138].

Simon et al (2017) analisaram 26 lesões oclusais com suspeita de lesão cáries, indicados após exame clínico convencional para sofrer intervenção restauradora, embora

sem comprovação radiográfica, com imagens obtidas por meio de iluminação (reflectância – 1500-1700 nm e transiluminação- 1300 nm) e OCT de polarização cruzada (CP-OCT), para avaliar a penetração da lesão na dentina, comprovando a grande sensibilidade destas técnicas para o diagnóstico precoce da desmineralização em superfícies oclusais [139].

Zain et al (2018), avaliaram a ocorrência de lesões cáries não cavitadas na região de sulcos e fissuras em pré molares extraídos, baseada em critérios de interpretação de imagens B-scans adquiridas com OCT, comparando com microscopia de luz polarizada (MLP), concluindo que esta resultou em alta especificidade e sensibilidade e não foi afetada pela localização. A medição da largura da OCT dos loci da parede foi de acordo com a MLP, entretanto diferenças com significância estatística na altura das paredes foram observadas. A alta sensibilidade indica que a avaliação visual de B-scans descarta com segurança a existência de lesões não cavitadas, e que as imagens de B-scan de OCT devem ser usadas para monitorar a NCFC, mas não a altura do loco da parede (Figura 20) [140].

Figura 20: a) imagem de MLP de uma fôssula oclusal hígida. Há ausência de áreas castanho escuras e pretas (conforme indicado pelo asterisco *); b) imagem MLP de uma lesão cáries não cavitada em fôssula. Há áreas de marrom escuro e preto (como mostrado por setas tracejadas) no local; c) imagem de OCT B-Scan correspondente da fissura hígida em (a). Há uma borda de superfície distinta limitada a um a dois pixels de espessura na faixa amarela / vermelha (-15dB a -5dB) e ausência de bandas subsuperficiais e difusas de intensidade elevada na faixa amarela / vermelha (-15dB para - 5dB) do mapa de cores (conforme indicado pelo asterisco *). A reflexão especular é mostrada pela seta sólida; d) B-Scan de OCT correspondente à lesão de carie não cavitada em (b). Há presença de bandas difusas subsuperficiais de intensidade elevada (como mostrado por setas tracejadas) aparecendo na faixa amarela / vermelha (-15dB a -5dB) do mapa de cores.

Fonte: ZAIN, E.; ZAKIAN, C.M.; CHEW, H.P., 2018.

Apesar da quantidade de aplicações clínicas e estudos em tecidos biológicos usando a técnica de OCT, e por ser uma técnica relativamente nova, é importante estabelecer a sua confiabilidade metrológica, através da informação de parâmetros relativos aos equipamentos, regulamentados por normas da International Electrical Commission (IEC), mas também através da validação do método através da equiparação com outras técnicas comparáveis e da necessidade da criação de um banco de dados contendo informações sobre as propriedades ópticas dos tecidos biológicos, como os coeficientes de espalhamento e absorção e índice de refração, e a necessidade de caracterização das alterações destas propriedades em resposta à excitação eletromagnética [141,142].

De acordo com Hsieh et al (2013), a técnica de OCT apresenta vantagens e desvantagens sobre muitas técnicas ópticas aplicadas atualmente, como resumido na Tabela 8 [118].

Tabela 8: Vantagens e desvantagens de algumas técnicas ópticas aplicadas em diagnóstico.

MÉTODOS	VANTAGENS	DESVANTAGENS
Radiografias	1. Baixo custo 2. Ampla faixa de medição	1. Radiação ionizante 2. Baixa resolução espacial 3. Imagem 2D
Tomografia 3D	1. Ampla faixa de medição 2. Reconstrução 3D	1. Não é em tempo real 2. Radiação Ionizante 3. Pequena resolução espacial
Câmera Digital Intra Oral	1. Baixo custo 2. Radiação não ionizante	1. Somente informação da superfície
Sondagem Periodontal	1. Baixo custo 2. Imagem em tempo real 3. Reconstrução 3D possível	1. Baixa sensibilidade 2. Sem imagem 3. Invasivo
OCT	1. Alta resolução espacial 2. Imagem em tempo real 3. Reconstrução 3D	1. Pequena penetração e amplitude do escaneamento
Espectroscopia Raman	1. Alta sensibilidade 2. Responde a alterações em concentrações minerais e químicas	1. Medidas in vitro 2. Sem imagem 3. Alto custo
Fluorescência Induzida por Laser	1. Detecção em tempo real 2. Responde à bactérias e variação de concentrações químicas	1. Sem imagem 2. Ausência de consistência diagnóstica

Fonte: HSIEH, Y.S.; HO, Y.C.; LEE, S.Y.; CHUANG, C.C.; TSAI, J.C.; LIN, K.F.; SUN, C.W., 2013.

Ko et al (2000) provaram que o poder de espalhamento da luz branca visível pelo esmalte desmineralizado pode fornecer uma estimativa sobre a quantidade de perda mineral. Imagens, adquiridas por meio de uma câmera CCD acoplada a um microscópio com fonte de luz resultante da combinação de comprimentos de onda no espectro visível, foram analisadas por meio de modelos matemáticos. A partir dos valores de refletância e transmitância foi possível determinar o poder de espalhamento das amostras em função da

profundidade, e sua correlação com o seu conteúdo mineral através de testes de microdureza [143].

Darling et al (2006) utilizaram microscopia digital em alta resolução para correlacionar as alterações em amostras de esmalte dental em função da desmineralização com as alterações nos coeficientes de espalhamento da luz na faixa de 1310 nm, assim como alterações no coeficiente de anisotropia do espalhamento em lesões naturais e induzidas de cárie em esmalte dental. O coeficiente de espalhamento aumentou significativamente em áreas desmineralizadas, e o espalhamento ocorreu preferencialmente no sentido de propagação da radiação. As porosidades surgidas agiram como centros espalhadores, com ângulos de espalhamento da luz aumentados em relação ao perfil de atenuação apresentado pelas amostras quando sadias (Figura 21). Foi verificado também que após a desmineralização, a porosidade e irregularidade da superfície das amostras não permitiu que as mesmas fossem consideradas de forma separada do corpo das lesões [144].

Figura 21: Comparação entre os ângulos de espalhamento da luz em uma área saudável (azul) e desmineralizada (vermelho), relacionadas com a imagem de microscopia digital em alta resolução (círculos azul e preto à direita na imagem).

Fonte: DARLING, C.; L.; HUYING, G.; D.; FRIED, D.; 2006.

Cara et al (2014) demonstraram *in vitro* uma relação linear entre os coeficientes de atenuação óptica avaliados com OCT e testes de microdureza Knoop avaliando o conteúdo mineral em amostras de esmalte dental humano *in vitro*. Em lesões induzidas de cárie, o coeficiente de atenuação óptica das amostras de esmalte dental humano ao longo do tempo diminuiu de maneira equivalente à diminuição dos valores de microdureza Knoop,

sinalizando que a técnica de OCT é adequada para uma análise quantitativa longitudinal de perda mineral e para a avaliação de lesões incipientes de cárie [127].

Maia et al (2016) compararam as técnicas de OCT e QLF para o acompanhamento de lesões incipientes de cárie em esmalte dental. Foram avaliadas a diminuição na intensidade da fluorescência do esmalte cariado em relação ao esmalte sadio, assim como a variação nas médias dos coeficientes de atenuação óptica, confirmados por microscopia de luz polarizada. As amostras apresentaram uma diminuição na emissão da fluorescência nas áreas desmineralizadas em relação à área de esmalte sadio, enquanto nessas mesmas áreas houve um aumento nos coeficientes de atenuação óptica. Entretanto, a análise dos coeficientes de atenuação óptica evidenciou de forma mais precisa as diferenças entre o tecido sadio e desmineralizado [145].

5. ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

A Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) fornece informações qualitativas e quantitativas sobre a composição química dos tecidos, permitindo a análise de alterações estruturais e químicas causadas por tratamentos, como irradiações a laser; patologias como neoplasias, osteoporose, envelhecimento e radiação ionizante; entre outros.

A absorção da radiação no infravermelho não possui energia suficiente para promover transições eletrônicas, mas sim para alterar o modo vibracional desde que haja alteração no momento de dipolo, quando a radiação incidente é ressonante com o modo de vibração das ligações químicas das moléculas do tecido investigado. A radiação IR é pouco absorvida pelos tecidos biológicos, o que permite uma penetração maior. A técnica de FTIR fornece grande quantidade de informações de uma amostra em um só espectro, devido a uma variedade de comprimentos de onda incidentes simultaneamente no tecido, no lugar de um comprimento de onda específico em cada momento. Quando acoplado a uma fibra óptica para coletar o sinal de retroespalhamento, associado à técnica ATR (Reflexão Total Atenuada ou Attenuated Total Reflection), o ATR-FTIR pode analisar o conteúdo orgânico e inorgânico da amostra, fornecendo informações sobre sua resistência mecânica e química [146].

Mudanças na composição química dos tecidos, detectadas através de espectroscopia vibracional, juntamente com as alterações na análise histológica sofridas em função de uma patologia ou tratamento, fornecem informações precisas sobre o diagnóstico[146,147].

A água e os compostos orgânicos têm grande importância na dissolução e remineralização tecidual, permitindo a difusão de íons durante esses processos [135]. O percentual de CO_3 na matriz orgânica é responsável pelo tamanho do cristal de HAP, e no esmalte dentário, há entre 2,5 a 4% de CO_3 na rede cristalina, responsáveis pelo tamanho maior destes cristais de HAP em comparação com outros tecidos mineralizados [31].

As principais bandas de absorção alteradas durante o aquecimento dos tecidos duros dentais são as da água adsorvida ou água livre; colágeno; amida I; amida II; amida III;

amida B; radicais OH⁻ e C-H estruturais; fosfato (PO⁻³₄) e carbonato (CO⁻²₃). Algumas regiões foram listadas na Tabela 9 :

Tabela 9: Posição das bandas de absorção da água, matriz mineral e orgânica do esmalte dental humano (fatia).

Composto Químico	Modo vibracional	Região do Espectro (cm ⁻¹)
OH	δ Estiramento	750 - 650
PO⁻³₄	ν 3	1300 - 900
PO⁻³₄	ν 1	1300 - 900
PO⁻³₄	ν 4	740 – 490
CO⁻²₃	ν 3	1600 – 1300
CO⁻²₃	ν 3	874
Amida III + Colágeno		1400 - 1200
Amidas I e II	Sobrepostas ao carbonato	1600 – 1400
Água		3700 – 2200
Água		1650

Fonte: BACHMANN, L. e ZECELL, D.; M. 2005.

A técnica de FTIR é capaz de fornecer informações da composição química do esmalte (índice de refração de 1,63) até 6 μ m, permitindo a análise dos efeitos da irradiação com laser em alta intensidade na superfície do esmalte [147].

6. MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 40 dentes humanos (terceiros molares hígidos), cedidos pelo Banco de Dentes Humanos da Universidade Camilo Castelo Branco (UNICASTELO) e projeto submetido ao Comitê de Ética de Pesquisa em Seres Humanos (CEP-FOUSP) em 12/2013), para avaliar através da técnica de OCT os efeitos da associação da irradiação com o laser de Nd:YAG e fluoreto, conforme o delineamento experimental descrito na Tabela 10. Os elementos dentários foram examinados, e os que apresentavam manchas e/ou defeitos no esmalte dental foram excluídos.

Tabela 10: Delineamento Experimental

DESENHO DO ESTUDO	TECIDO	1 Nível	Esmalte dental humano
	CONDIÇÕES de IRRADIAÇÃO	1 Nível	60 mJ de energia por pulso Densidade de Energia (DE): 84,9 J/cm ² 10 Hz de frequência Diâmetro da fibra 300 µm
	FFA / LASER Nd:YAG	3 Níveis	Controle (Sem FFA ou Laser) FFA 4 minutos FFA + Laser Laser + FFA
	FOTOABSORVEDOR	1 Nível	Presente durante irradiação laser
	TEMPO DE CICLAGEM	4 Níveis	5 dias 10 dias 15 dias 20 dias
UNIDADES EXPERIMENTAIS	Faces de 3 ^{os} molares humanos, com área experimental exposta de 2 x 3mm = 6 mm ²		
RESPOSTAS VARIÁVEIS	Coeficiente de Atenuação Óptica Microdureza Seccional de Knoop		

Fonte: Autor da Tese

As coroas dentárias foram separadas das raízes com disco diamantado (American Burrs, SC, Brasil), fixadas em placas de acrílico com cera pegajosa (Kota, SP, Brasil) e seccionadas através de cortadeira elétrica (Isomet, Buehler, IL, USA) de forma a obter 4 faces de cada dente (160 amostras), aleatoriamente divididas em 04 grupos (n = 40). As faces foram protegidas com verniz ácido resistente (Revlon, NY, USA), com exceção de uma janela de esmalte dental protegida por uma máscara de etiqueta adesiva (Pimaco-Bic,

RJ, Brasil) com área padronizada de 6 mm², conseguida com o uso de um vazador de aço medindo 2 x 3 mm, onde os tratamentos foram realizados (Figura 22).

Figura 22: Sequência de preparo das amostras: a) separação coroa/raiz e secção da coroa em 4 porções; b) proteção da superfície com exceção da janela de 2 x 3 mm

Fonte: Autor da tese

Foi realizado o teste de microdureza de superfície de superfície (microdurômetro HMV-2T, Shimadzu®, Japão), para a padronização do substrato.

Todas as amostras foram analisadas através da técnica de OCT antes da realização dos tratamentos propostos neste estudo. As Figura 23, Figura 24 e Figura 25 demonstram respectivamente a diferença na visualização entre uma amostra com ausência e presença de áreas de desmineralização na subsuperfície do esmalte e com trincas (descartadas e substituídas).

Figura 23: Análise com OCT da superfície Baseline, onde se observa uma superfície uniforme, com perfeita visualização das margens do verniz ácido resistente, que delimitam a área que foi submetida à ciclagem de pH. A seta amarela indica a mudança brusca do índice de refração devido à mudança de meio sofrida pela radiação luminosa, do ar para o interior da amostra, traduzida pelo pico na intensidade do sinal de OCT à direita.

Fonte: Autor da tese

Figura 24: Amostra descartada em função da detecção de áreas de desmineralização (seta amarela) na subsuperfície durante a análise inicial das amostras com OCT (baseline).

Fonte: Autor da Tese

Figura 25: Amostra descartada após a detecção de uma trinca durante a obtenção das imagens de OCT da superfície baseline

Fonte: Autor da Tese

As amostras aprovadas foram aleatoriamente divididas em quatro grupos:

- Controle (C): onde nenhum tratamento foi realizado
- Fluoreto (F): Aplicação de FFA (Flúor fosfato acidulado - 1,23% de fluoreto, pH 3,6 – 3,9, FluGel - Nova DFL – BR)
- Laser-Fluoreto (LF): Irradiação com laser de Nd:YAG previamente à aplicação de FFA
- Fluoreto-Laser (FL): Aplicação de FFA, seguida de irradiação com laser de Nd:YAG.

O FFA foi aplicado sobre as amostras com auxílio de uma haste de algodão durante 4 minutos, e depois lavadas com água MiliQ por 30 segundos, e secas gentilmente com jato de ar.

O equipamento laser utilizado neste estudo foi o laser de Nd:YAG (Figura 26) Power LaserTM ST6 (Lares Research®, Chico, CA, USA), de propriedade do LELO (Laboratório Especial de Lasers em Odontologia), FO-USP, adquirido por importação da FAPESP (processo 07/55487-0). O equipamento é portátil, acompanhado de acessórios (fibra óptica, cânulas e caneta para a fibra, óculos de proteção, manual, placa de advertência e chave de interlock). Possui as seguintes especificações:

- Comprimento de onda: 1064 nm
- Potência variável entre 0,5 a 6 W
- Taxa de repetição: 10 Hz
- Taxa de Pulso variável: 10, 15, 20, 30 e 50 pps
- Duração de Pulso variável: 120 a 300 μ s
- Luz guia: 635 nm, 5 mW
- Fibra óptica de quartzo: 320 μ m de diâmetro
- Peso: 22,7 kg / 50 Lbs

Figura 26: Laser de Nd:YAG, 1064 nm, Power LaserTM ST6

Fonte: Autor da tese

A potência do equipamento foi aferida, e a fibra clivada entre as irradiações. As irradiações foram realizadas em modo contato, pulsado, focalizado, perpendicular, na região pré-estabelecida, fazendo-se movimentos de varredura nos sentidos horizontal e vertical. Foram realizadas quatro irradiações de 10 segundos (duas em cada sentido), totalizando uma irradiação total de 40 segundos, abrangendo toda a área exposta da amostra, respeitando-se

um intervalo de 10 segundos entre as irradiações para permitir a relaxação térmica do tecido, seguindo a metodologia de Boari et al (2009) [19].

- Potência utilizada: 0,6 W
- Energia por pulso: 60 mJ
- Taxa de Repetição: 10 Hz
- Largura de Pulso: 120 μ s
- Fibra óptica com 320 μ m diâmetro
- DE = 84,9 J/cm²

Previamente às irradiações com o laser de Nd:YAG, foi aplicada uma película de fotoabsorvedor (partículas de carvão vegetal, trituradas em grau e pistilo de cerâmica, com tamanho do grão padronizado em 10 μ m, diluídas em álcool 50% para a obtenção de uma pasta homogênea), com auxílio de um aplicador descartável (KG Brush- KG Sorensen, SP, Brasil), com aproximadamente 100 μ m de espessura, seguindo a metodologia de Boari et al [19].

Praticamente toda a camada de fotoabsorvedor da superfície das amostras foi removida durante a irradiação (Figura 27 a e b). Após as irradiações as amostras foram lavadas com água MiliQ durante 30 s, secas gentilmente com jato de ar comprimido.

Figura 27: Amostras (escolhidas aleatoriamente), onde se observa a camada de fotoabsorvedor antes da irradiação com o laser de Nd:YAG (a), e imediatamente após quase não são visualizados resíduos da mesma (b), antes da lavagem com água MiliQ

Fonte: Autor da tese

As amostras foram então incluídas em discos de resina acrílica autopolimerizável (Jet, Clássico, SP, Brasil), obtidos a partir de um molde confeccionado para este fim, feito com silicone para moldagem odontológico. Toda a extensão do acrílico foi protegida com verniz ácido resistente incolor (Revlon, NY, USA), para não interferir nas soluções da ciclagem de pH. Uma marcação foi feita nos discos para indicar a região central da amostra analisada por meio de OCT. Os discos foram identificados com o número de cada amostra (Figura 28 a).

Antes do início do processo de ciclagem, as amostras permaneceram armazenadas em ambientes úmidos dentro de tubos Falcon identificados.

Os discos foram presos (com a mesma resina acrílica autopolimerizável usada em sua confecção) a hastes confeccionadas com fio ortodôntico de diâmetro 0,8 mm (Morelli, SP, Brasil). Estas hastes foram passadas em furos realizados com pontas diamantadas para uso odontológico (número 1090, KG Sorensen, SP, Brasil), em tampas de tubo Falcon com capacidade de 50 ml, para que as amostras ficassem suspensas, imersas na solução contida nos tubos (Figura 29 b), e as extremidades superiores torcidas de forma a permitir o encaixe de uma haste horizontal. Deste modo, cinco amostras puderam ser removidas dos tubos contendo uma determinada solução de uma só vez, para serem lavadas, secas e inseridas em tubos contendo o outro tipo de solução, de maneira a facilitar o processo de ciclagem.

Cada tubo, de ambas as soluções (desmineralizante-DES; remineralizante – RE) e, em todas as etapas da ciclagem, foi devidamente identificado, para que não houvesse troca de minerais entre as amostras. Da mesma forma, a sequência de troca das soluções era mantida, para possibilitar o mesmo tempo de permanência nas soluções para todas as amostras. Foram utilizados 960 tubos Falcon para o acondicionamento de amostras e realização da ciclagem de pH.

Figura 28: a) Inclusão das amostras para possibilitar a identificação, imersão nas soluções de ciclagem de pH e posterior secção para o teste de MD; b) amostras posicionadas suspensas nos tubos Falcon contendo as soluções DES ou RE (na foto, DES)

Fonte: Autor da Tese

Os grupos foram submetidos a ciclagem de pH seguindo o protocolo de Featherstone et al (1986) [134], modificado por Argenta et al (2003) [148] para simular o processo de desmineralização e remineralização que acontece na cavidade oral [134,148,149], durante 20 dias, com a intenção de obter lesões cáries com maior profundidade, e assim uma melhor evidência das diferenças entre os tratamentos. A alteração do tempo de ciclagem preconizada por Argenta et al, em relação ao modelo

proposto por Featherstone (6 h de imersão na solução RE e 17 h na solução DES, alterado para 3 h e 20 h respectivamente), e a adição de fluoreto nas soluções teve por objetivo simular a quantidade de fluoreto na saliva em pessoas que ingerem água fluoretada, e possibilitar a formação de uma camada superficial mineralizada, equivalente à formação de lesões incipientes no esmalte dental [148]. Por este motivo, seria possível a realização do teste de microdureza a uma distância pequena da superfície, relacionando-se o resultado com as análises dos coeficientes de atenuação óptica.

As amostras foram mantidas em estufas a 37° C durante todo o experimento, simulando o ambiente oral, e as soluções foram trocadas a cada cinco dias para evitar a saturação das mesmas.

Os reagentes foram pesados e diluídos em água MiliQ, e para cada litro foi adicionado 0,64 g de timol para evitar o desenvolvimento de fungos. As soluções foram preparadas em quantidades menores, e reunidas em um recipiente maior antes do início da ciclagem, para garantir uma uniformidade durante todo o processo.

Para a indução do processo de desmineralização, as amostras ficaram imersas durante 3 h, em solução DES, composta por 2,0 mM de cálcio; 2,0 mM de fosfato; 0,03 ppm de flúor em solução tampão de 0,075 M de acetato, com pH 4,3, e depois lavadas com água MiliQ durante 15 s e secas. De acordo com a metodologia adotada, a quantidade de solução foi de 6,37 ml/mm², correspondendo a 38,22 ml em cada tubo. Foram usados no total 24,5 litros de solução desmineralizante.

As amostras ficaram armazenadas, suspensas, em tubos contendo a solução RE, composta por 1,5 mM cálcio; 0,9 mM de fosfato; 150 mM de cloreto de potássio; 0,05 ppm F; em 20 mM em solução tampão cacodilato; pH 7,4, durante 20 h. A quantidade de solução foi igual a 3,19 ml/mm², correspondendo a 19,08 ml em cada tubo, totalizando 12,22 litros utilizados.

Foi realizada uma avaliação do coeficiente de atenuação óptica de cada amostra por meio da técnica de OCT no momento inicial (momento 0) do experimento, ou seja, antes da realização de qualquer tratamento (OCT Baseline), e imediatamente após os tratamentos (OCT Post). Novas leituras por meio de OCT de cada amostra foram realizadas nos dias 5 (OCT 5), 10 (OCT 10), 15 (OCT 15) e 20 (OCT 20) do ciclo de desmineralização / remineralização.

O equipamento de OCT utilizado foi o Modelo OCP930SR, Thorlabs Inc., do laboratório multiusuário do Centro de Lasers e Aplicações do IPEN-CNEN/SP (Figura 29), com as seguintes características:

- fonte de luz - SLED (super-luminescent light-emitting diode)
- $\lambda = 930 \text{ nm}$
- 2 mW potência;
- Resolução em profundidade no ar: $6,0 \mu\text{m}$
- Número de imagens por segundo: 3 fps (2000 x 512 pixels).

Figura 29: Posicionamento da amostra para análise por meio da técnica de OCT (OCT 930 nm – Thorlabs Inc. USA)

Fonte: Autor da Tese

A varredura é executada de forma perpendicular à área desprotegida na amostra, gerando uma imagem em tons de cinza da secção transversal do seu centro geométrico (Figura 30).

Figura 30: Imagem em tons de cinza da secção transversal da amostra 24 LF5

Fonte: Autor da tese

Foram adquiridas imagens de 3 regiões da amostra: no centro geométrico da janela exposta aos tratamentos e efeitos da ciclagem de pH, e deslocando-se 75 μm em cada direção, conforme visto na Figura 31. Após o cálculo dos coeficientes de atenuação óptica nas regiões escolhidas, as amostras foram seccionadas para a realização do teste de microdureza seccional de Knoop nos diferentes tempos de ciclagem.

Figura 31: Imagem da área exposta na amostra. As linhas horizontais mostram as 3 seções transversais analisadas, sendo uma no centro, e as outras 2 deslocadas 75 μm em direções opostas a partir do centro. A linha pontilhada vertical mostra o ponto onde as amostras foram seccionadas para a realização do teste de microdureza seccional Knoop.

Fonte: Autor da tese

A Figura 31 demonstra o registro dos tomogramas de uma amostra do grupo FL (amostra 68) em diferentes momentos, onde se percebe a diferença nas intensidades do sinal de OCT em função da desmineralização. Após a aquisição das imagens, o software salva os arquivos correspondentes a cada imagem permitindo a sua análise em um momento posterior.

Figura 32: Velocidade de decaimento exponencial da intensidade do sinal de OCT em função da desmineralização da amostra 68 do grupo FL: a) no momento baseline (linha azul) e b) após 10 dias de ciclagem de pH (linha vermelha), destacando-se ainda a menor refletividade na superfície em função da desmineralização.

Fonte: Autor da tese

As imagens de secções transversais ao longo do experimento foram utilizadas para acompanhar as alterações no sinal coletado devido à desmineralização, analisadas através de um software desenvolvido em ambiente LabView 8 no CLA-IPEN, que permite selecionar uma Região de Interesse (Region Of Interest - ROI), delimitada na Figura 33, para obter o coeficiente de atenuação óptica total. Este coeficiente é obtido através da média dos valores de todas as colunas contidas na ROI, neste estudo definida em 2000 μm .

Figura 33: As linhas branca e vermelha delimitam a ROI com 2000 μm para cálculo do coeficiente de atenuação óptica, que representa a média de todas as colunas contidas na ROI (a). A segunda imagem mostra uma área com lesão subsuperficial de cárie em uma amostra do grupo Controle, no dia 5 do processo de ciclagem de pH (b).

Fonte: Autor da tese

À medida que a desmineralização progride, a quantidade de porosidades aumenta, e a radiação incidente consegue penetrar mais na amostra. O software desenvolvido em ambiente LabView calcula o decaimento exponencial da intensidade do sinal de OCT de acordo com a equação (2):

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

Onde I é a intensidade detectada; I_0 a intensidade da fonte de luz; α é o coeficiente de atenuação óptica total; z é a profundidade analisada e C é a constante empregada devido ao sinal de ruído de fundo.

Na planilha gerada, os valores calculados do coeficiente de atenuação (α) aparecem na coluna “b”, além das substituições na equação (2), descritos pela equação (3):

$$f(z) = A \cdot e^{-2b \cdot z} + C \quad (3)$$

sendo A = Intensidade da fonte de luz; b = taxa de decaimento; C = constante de ajuste do ruído de fundo. O sinal negativo indica o decaimento exponencial da intensidade do sinal.

O software compensa as irregularidades na superfície das amostras, inclusive a sua curvatura, por meio de um “alinhamento” dos dados na região delimitada. A resposta do sistema em função da profundidade determinada (linha base) e a escala em decibéis (dB) – $10.\log(I/I_0)$ também são levados em consideração no cálculo dos coeficientes de atenuação óptica. Os valores são salvos automaticamente, para depois serem exportados para planilhas conforme demonstrado na Figura 34.

Figura 34: Exemplo de planilha gerada pelo software com o registro dos parâmetros como profundidade de análise, fator de correlação R-Square, coeficiente de atenuação óptica calculado. O sinal negativo indica o decaimento exponencial da intensidade do sinal deOCT.

$$f(z) = A \cdot e^{-2b \cdot z} + C$$

Nome do arquivo	R-square	x	z	a (I ₀)	b (α)	c (C)	X imagem inicial	X imagem final	Média b (α)
amostra27F20_0001	9,92E-01	2,81E+01	1,19E+02	1,68E+03	-5,07E-02	2,85E+00	6,36E+02	2,64E+03	
amostra27F20_0002	9,93E-01	2,66E+01	1,19E+02	1,52E+03	-4,19E-02	5,49E+00	5,82E+02	2,52E+03	
amostra27F20_0003	9,92E-01	2,10E+01	1,18E+02	9,08E+02	-4,68E-02	1,43E+00	5,82E+02	2,52E+03	-4,65E-02
amostra29F20_0001	9,91E-01	1,97E+01	1,18E+02	1,05E+03	-5,88E-02	2,78E+00	5,82E+02	2,52E+03	
amostra29F20_0002	9,83E-01	2,40E+01	1,19E+02	2,91E+03	-5,97E-02	-3,74E+00	5,82E+02	2,52E+03	
amostra29F20_0003	9,97E-01	2,06E+01	1,19E+02	6,97E+02	-4,95E-02	1,53E+00	5,82E+02	2,52E+03	-5,60E-02
amostra32F20_0001	9,93E-01	3,36E+01	1,19E+02	2,36E+03	-4,91E-02	3,79E+00	5,82E+02	2,52E+03	
amostra32F20_0002	9,83E-01	2,00E+01	1,18E+02	1,25E+03	-5,35E-02	-9,13E-01	6,12E+02	2,52E+03	
amostra32F20_0003	9,82E-01	3,15E+01	1,20E+02	1,50E+03	-4,04E-02	-2,85E-01	7,99E+02	2,82E+03	-4,77E-02
amostra34F20_0001	9,82E-01	2,94E+01	1,22E+02	1,11E+03	-2,93E-02	-1,28E+01	7,99E+02	2,82E+03	
amostra34F20_0002	9,92E-01	2,98E+01	1,19E+02	1,46E+03	-4,83E-02	4,55E+00	7,99E+02	2,82E+03	
amostra34F20_0003	9,95E-01	1,96E+01	1,18E+02	9,29E+02	-5,59E-02	3,86E+00	8,58E+02	2,82E+03	-4,45E-02
amostra35F20_0001	9,95E-01	1,97E+01	1,18E+02	1,92E+03	-5,94E-02	1,17E+01	8,58E+02	2,82E+03	
amostra35F20_0002	9,96E-01	2,06E+01	1,19E+02	1,67E+03	-6,94E-02	7,55E+00	8,58E+02	2,82E+03	
amostra35F20_0003	9,89E-01	2,02E+01	1,19E+02	1,38E+03	-4,63E-02	-4,04E+00	5,92E+02	2,63E+03	-5,84E-02
amostra36F20_0001	9,95E-01	2,66E+01	1,19E+02	2,13E+03	-5,69E-02	4,03E+00	4,34E+02	2,91E+03	
amostra36F20_0002	9,95E-01	3,22E+01	1,19E+02	2,40E+03	-5,66E-02	1,33E+01	6,02E+02	2,71E+03	
amostra36F20_0003	9,96E-01	2,09E+01	1,19E+02	4,72E+02	-4,96E-02	1,97E-02	6,02E+02	2,71E+03	-5,43E-02
amostra40F20_0001	9,89E-01	2,62E+01	1,19E+02	2,69E+03	-6,02E-02	2,85E+01	6,41E+02	2,71E+03	
amostra40F20_0002	9,93E-01	2,40E+01	1,19E+02	1,48E+03	-4,47E-02	6,38E+00	6,95E+02	2,75E+03	
amostra40F20_0003	9,96E-01	2,36E+01	1,18E+02	1,29E+03	-5,31E-02	6,92E+00	9,72E+02	2,86E+03	-5,27E-02
amostra97F20_0001	9,91E-01	2,85E+01	1,17E+02	3,37E+03	-6,65E-02	2,19E+01	8,24E+02	2,80E+03	
amostra97F20_0002	9,95E-01	2,27E+01	1,19E+02	2,97E+03	-6,42E-02	1,35E+01	6,95E+02	2,70E+03	
amostra97F20_0003	9,94E-01	2,45E+01	1,19E+02	3,29E+03	-6,59E-02	1,24E+01	6,95E+02	2,70E+03	-6,55E-02
amostra98F20_0001	9,96E-01	2,26E+01	1,19E+02	1,34E+03	-7,17E-02	3,43E+00	6,95E+02	2,70E+03	
amostra98F20_0002	9,95E-01	3,26E+01	1,19E+02	2,62E+03	-5,24E-02	2,08E+01	6,07E+02	2,62E+03	
amostra98F20_0003	9,96E-01	2,10E+01	1,18E+02	3,01E+03	-1,08E-01	4,94E+00	6,07E+02	2,62E+03	-7,74E-02
amostra99F20_0001	9,97E-01	2,06E+01	1,19E+02	1,11E+03	-5,21E-02	1,72E+00	5,43E+02	2,65E+03	
amostra99F20_0002	9,85E-01	2,06E+01	1,19E+02	9,85E+02	-3,76E-02	-4,48E+00	7,10E+02	2,82E+03	
amostra99F20_0003	9,95E-01	2,06E+01	1,19E+02	6,68E+02	-7,06E-02	3,99E+00	8,04E+02	2,72E+03	-5,34E-02

Fonte: Autor da tese

O perfil de decaimento analisado (curva amarela na parte inferior da Figura 35) resulta da média de todas as colunas da imagem de OCT na ROI, entre as linhas branca e vermelha.

Figura 35: Interface do software usado para calcular o coeficiente de atenuação óptica. No topo da imagem, em azul, a seleção da ROI com o posicionamento das linhas branca e vermelha. Na janela abaixo a posição das linhas branca e vermelha marcam a profundidade analisada, e a curva amarela mostra o decaimento exponencial do sinal de OCT.

Fonte: Autor da tese

Após cada etapa da ciclagem de pH, no momento da troca dos tubos (a cada 5 dias) contendo as soluções pipetadas anteriormente, 10 amostras de cada grupo foram retiradas do processo de ciclagem, para que os coeficientes de atenuação óptica fossem comparados com os resultados da microdureza dessas amostras. Assim, a quantidade de amostras em cada etapa de análise de OCT foi: OCT Baseline e OCT Post, $n=40$ amostras em todos os grupos; OCT 5, OCT 10, OCT 15 e OCT 20, $n=10$ amostras em cada grupo, em cada tempo.

A determinação da perda de microdureza das amostras tratadas e submetidas ao desafio cariogênico artificial foi realizada segundo a técnica proposta por Featherstone *et al* (1983) [150], por meio do teste de microdureza seccional, tendo em vista a alta correlação (0,93) existente entre a porcentagem de mineral medida por microrradiografia e dureza do esmalte com lesão de cárie. A média dos valores obtidos das medições de cada ponto a cada distância da superfície é expressa como o número de microdureza Knoop (kg/mm^2).

O indentador Knoop é um diamante em forma piramidal que produz uma indentação em forma de pirâmide, com uma relação entre diagonais de 7:1. A profundidade da indentação é de aproximadamente 1/30 do seu comprimento. Para a determinação da dureza Knoop, somente a diagonal maior da indentação é medida e usada na equação abaixo (4) para o cálculo da KHN (Knoop Hardness Number).

$$\text{KHN} = \frac{C \cdot c}{D^2}$$

KHN = valor de dureza Knoop
 C (constante) = 14,230
 c = 25 gramas
 D = comprimento da maior diagonal da endentação

(4)

Após cada etapa da ciclagem de pH, as 10 amostras separadas de cada grupo foram seccionadas transversalmente à direção das análises realizadas por meio de OCT (Figura 36), com uso de disco diamantado sob refrigeração, com auxílio de contra-ângulo para peça de mão de baixa rotação (Gnatus, Brasil), e receberam polimento com lixas de granulação 400, 600 e 1200 (Carbimed Paper Discs, Buehler, IL,USA), seguidas pelo polimento com discos de feltro (Polishing Cloth METADI, Buehler, IL, USA) e solução diamantada 1 µm para polimento (METADI Diamond suspension, Buehler, IL,USA).

Figura 36: Amostras seccionadas transversalmente à direção das análises com OCT, evidenciando o corte conservador obtido.

Fonte: Autor da Tese.

A microdureza Knoop é considerada mais adequada para ser utilizada em pequenas áreas alongadas, materiais frágeis muito duros e seções muito finas, e é mais sensível às condições da superfície do que o teste Vickers [151].

Para a análise da microdureza seccional foi utilizado o microdurômetro (HNV 2T - Shimatzu, Japão), com ponta Knoop de 25g aplicada durante 5 s, seguindo a metodologia de Cara et al (2014)[127] e Zamataro (2013) [152], representada na .Figura 37

Figura 37: a) Pirâmide Knoop; b) sequência de linhas de endentação no esmalte dental, com distância de 250 micrometros entre elas

Fonte: a) https://www.cimm.com.br/portal/material_didatico/6560-teste-da-microdureza#.WwNvt-4vzIU
b) Autor da tese

Figura 38 mostra o posicionamento de uma amostra durante a realização do teste de microdureza Knoop.

Figura 38: Amostra já seccionada, no momento da indentação para cálculo do valor de microdureza Knoop na área submetida à ciclagem de pH

Fonte: Autor da Tese.

A Figura 39 mostra uma amostra do grupo F após 5 dias de ciclagem de pH, com a evidência dos prismas de esmalte e integridade de margens.

Figura 39 Amostra do grupo F após o 5º dia de ciclagem de pH. É possível ver a organização dos prismas de esmalte (P) e uma camada alterada, atribuído à ação do fluoreto (A)

Fonte: Autor da Tese.

Foram analisadas as superfícies das seções laterais à lesão de cárie, onde foram feitas três linhas, cada uma com dez endentações, com distâncias de 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140 e 160 μm da superfície, com distância de 250 μm entre elas, sendo uma delas na região central da área de esmalte exposta, de modo a se obter uma média da área submetida à ciclagem de pH [153]. A média dos valores obtidos das medições de cada ponto, a cada distância da superfície, é expressa como o número de microdureza Knoop (Kg/mm^2). Os resultados foram registrados em tabelas, de modo que para cada amostra foi calculada uma média dos três valores obtidos.

A Figura 40 mostra a primeira indentação, feita a 20 μm da superfície de uma amostra.

Figura 40: Amostra do grupo FL - 15º dia, indentação a 20 μm da borda do dente. E=Esmalte, A= Ar

Fonte: Autor da Tese.

Duas amostras de cada grupo, em cada etapa, foram selecionadas aleatoriamente para a análise composicional com a técnica ATR-FTIR (Thermo Nicolet Smart Orbit, Thermo Scientific®, USA) acoplado a um acessório de reflexão atenuada, com um cristal de diamante (Smart Orbit, Thermo Scientific®, USA), como exemplificado na Figura 41. Os espectros ATR-FTIR foram obtidos com resolução de $4,0\text{ cm}^{-1}$. Os espectros foram obtidos a partir de uma área de $1,5\text{ mm}^2$, correspondente ao tamanho do cristal, com índice de refração igual a 2,41, e tiveram correção de linha de base e foram normalizados vetorialmente.

Figura 41: Exemplo de posicionamento das amostras no equipamento ATR-FTIR Thermo Scientific Nicolet

Fonte: <https://www.uml.edu/Research/CAM/epa-programs/Green-Packaging/Facilities.aspx>. Acessado em 08/07/2018

Este estudo considerou as seguintes bandas de absorção para a análise composicional por meio de FTIR: superposição dos modos vibracionais ν_1 e ν_3 de fosfato ($1300-900\text{ cm}^{-1}$), amida I ($1680 - 1600\text{ cm}^{-1}$), amida II ($1580 - 1480\text{ cm}^{-1}$), amida III ($1300 - 1200\text{ cm}^{-1}$), ν_2 dos modos vibratórios de carbonato (próximo a 870 cm^{-1}) e superposição dos modos de alongamento e de flexão de carbonato ν_3 e ν_4 respectivamente (entre $1600 - 1300\text{ cm}^{-1}$), além da banda da hidroxila localizada na região de $750 - 650\text{ cm}^{-1}$.

7. RESULTADOS

As análises das médias obtidas por meio da técnica de OCT e microdureza Knoop foram feitas isoladamente, e posteriormente comparadas entre si.

A faixa de profundidade compreendida entre 20-120 μm foi considerada para a análise, com base em estudos anteriores, onde a partir desta profundidade os valores obtidos não apresentaram variação com significância estatística [127].

Para a análise estatística dos coeficientes de atenuação óptica calculados, foi utilizado o software GraphPad Prism (versão 6.0), com nível de significância estipulado em $p < 0,05$. As amostras foram avaliadas quanto à independência, homogeneidade e normalidade (Shapiro-Wilk, $p < 0,05$). Os valores das médias dos coeficientes de atenuação óptica obtidos foram analisados pela análise de variância One-Way ANOVA, para relacionar os diferentes tratamentos realizados aos tempos de ciclagem de pH. Os grupos cujos dados apresentaram uma distribuição não normal foram submetidos ao teste Kruskal Wallis. O método de comparações múltiplas de Tukey foi utilizado para comparar as médias dos grupos entre si, em cada tempo do experimento, com intervalo de confiança de 95 %, e letras diferentes demonstram diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

7.1 Variação dos coeficientes de atenuação óptica para cada grupo

A variação das médias dos coeficientes de atenuação óptica foi avaliada entre os grupos em cada etapa da ciclagem de pH, para análise das diferenças em função dos tratamentos executados, e em relação a cada grupo isoladamente ao longo do tempo, para a análise das diferenças em tempos distintos.

O Gráfico 1 representa a distribuição dos valores dos coeficientes de atenuação óptica das amostras para a profundidade de 20 a 120 μm , antes do início do processo de ciclagem de pH e da distribuição aleatória entre grupos. A linha vermelha representa o valor da média aritmética dos valores calculados para as 160 amostras, igual a $-3,22\text{E}-02 \mu\text{m}^{-1}$.

Gráfico 1: Distribuição dos valores dos coeficientes de atenuação óptica para a profundidade de 20 a 120 μm das amostras de esmalte dental antes do início do processo de ciclagem de pH e da distribuição de modo aleatório entre os grupos. A linha vermelha representa o valor médio de $-3,22\text{E-}02 \mu\text{m}^{-1}$ para todas as amostras. O sinal negativo é devido ao decaimento exponencial da intensidade do sinal de OCT.

Fonte: Autor da tese

As médias dos coeficientes de atenuação óptica indicaram que houve uma variação dos valores dos grupos em função do tempo ($p < 0,05$), mas que esta variação não foi a mesma para todos os grupos.

É possível observar que em todos os grupos houve um aumento nas médias dos coeficientes de atenuação óptica, quando cada grupo é comparado consigo mesmo longitudinalmente, especialmente entre as médias das superfícies baseline e após os 20 dias, com exceção do grupo FL, que apresentou valores com semelhança estatística às médias iniciais.

7.1.1 Grupo Controle

Na Figura 42 observa-se o acompanhamento de uma amostra do grupo Controle durante todo o processo de ciclagem de pH: cinco imagens B-Scan, cinco imagens de vídeo da região analisada, e a aparência da área desmineralizada em comparação ao esmalte íntegro após a remoção do verniz ácido resistente.

Figura 42: Amostra 63 do grupo Controle – a) Imagens B-Scan (alteração visível no contorno na superfície do esmalte); b) de vídeo ao longo do tempo, e o aspecto da lesão induzida de cárie no esmalte após a remoção do verniz ácido resistente (c).

Fonte: Autor da tese

O Gráfico 2 mostra as médias dos coeficientes de atenuação óptica do Grupo Controle ao longo dos 20 dias de ciclagem de pH. Após 5 dias houve uma diferença com significância estatística em relação aos coeficientes do momento baseline, mantendo-se sem diferença em relação ao restante do período de ciclagem.

Gráfico 2: Variação da média dos coeficientes de atenuação óptica calculados por meio da técnica de OCT para o grupo Controle. As barras verticais representam o erro padrão das médias. Letras diferentes significam que há diferença estatística entre os tempos, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0.05$). O sinal negativo é devido ao decaimento exponencial da intensidade do sinal de OCT.

Fonte: Autor da tese

7.1.2 GRUPO FLUORETO

Na Figura 43 é possível acompanhar a evolução da amostra 35 do grupo Fluoreto durante todo o processo de ciclagem de pH: seis imagens B-Scan e as seis imagens correspondentes de vídeo da região analisada.

Figura 43: Amostra 35 F – Imagens B-Scan (a) e de vídeo ao longo do tempo (b)

Fonte: Autor da tese

O Gráfico 3 mostra as médias dos coeficientes de atenuação óptica do Grupo Fluoreto ao longo dos 20 dias de ciclagem de pH. Não houve diferença entre os coeficientes medidos no momento baseline e após a aplicação do fluoreto. Entretanto, houve diferença significativa nos valores medidos após os primeiros 5 dias, mas não houve uma diferença com significância estatística na variação do coeficiente de atenuação óptica em relação ao restante do processo de ciclagem.

Gráfico 3: Variação da média dos coeficientes de atenuação óptica calculados por meio da técnica de OCT para o grupo Fluoreto. As barras verticais representam o erro padrão das médias. Letras diferentes significam que há diferença estatística entre os tempos, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0.05$). O sinal negativo é devido ao decaimento exponencial da intensidade do sinal de OCT.

Fonte: Autor da tese

A Figura 44 evidencia a presença de lesão subsuperficial de cárie na amostra 32 F, no dia 20 do processo de ciclagem, com a presença de um segundo pico na curva de decaimento exponencial do coeficiente de atenuação óptica, provocado pelas diferenças entre os índices de refração ar/esmalte e lesão subsuperficial/esmalte.

Figura 44: Amostra 32 F, no dia 20 do processo de ciclagem de pH, evidenciando a presença de lesão subsuperficial de cárie, e os picos na tela da análise do coeficiente de atenuação óptica devido às diferenças entre os índices de refração ar / superfície do esmalte e lesão subsuperficial/esmalte dental (seta amarela).

Fonte: Autor da tese

7.1.3 GRUPO FLUORETO-LASER

A Figura 45 mostra a evolução da amostra 81 do grupo Fluoreto-Laser durante todo o processo de ciclagem de pH: seis imagens B-Scan e as seis imagens correspondentes de vídeo da região analisada.

Figura 45: Amostra 81, Grupo Fluoreto-Laser – Imagens B-Scan (a) e de vídeo (b) ao longo do tempo

Fonte: Autor da tese

O Gráfico 4 demonstra a variação da média dos coeficientes de atenuação óptica calculados por meio da técnica de OCT para o grupo Fluoreto-Laser. Não houve diferença entre os coeficientes de atenuação óptica das amostras no momento imediatamente após o tratamento para a prevenção da desmineralização executado, aplicação de FFA previamente à irradiação com laser de Nd:YAG.

Entretanto, neste grupo houve diferença entre os coeficientes de atenuação óptica entre os momentos PosT (coeficientes medidos por meio da técnica de OCT após o tratamento, antes do início do processo de ciclagem de pH) e após 5 dias de ciclagem.

Houve um aumento do coeficiente de atenuação óptica com diferença significativa entre após 5 dias de ciclagem de pH. Entre os dias 5, 10 e 15, não houve variação significativa. No dia 20 houve o sinal de OCT foi menos atenuado em relação aos dias anteriores, apresentando semelhança estatística com os valores dos dias iniciais.

Gráfico 4: Variação da média dos coeficientes de atenuação óptica calculados por meio da técnica de OCT para o grupo Fluoreto-Laser. As barras verticais representam o erro padrão das médias. Letras diferentes significam que há diferença estatística entre os tempos, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0.05$). O sinal negativo é devido ao decaimento exponencial da intensidade do sinal de OCT.

Fonte: Autor da tese

A Figura 46 demonstra a ausência de áreas desmineralizadas na subsuperfície da amostra 65 FL ao término do processo de ciclagem de pH, e a curva amarela demonstra o decaimento exponencial do sinal de OCT em função da profundidade.

Figura 46: Amostra 65 FL, no dia 20 do processo de ciclagem de pH, onde não se evidenciam novos picos relativos a mudanças adicionais no índice de refração na amostra, característicos na presença de lesão subsuperficial de cárie

Fonte: Autor da tese

A Figura 47 mostra a indentação na amostra 93 FL no dia 05 do processo de ciclagem de pH, próximo à borda da superfície da amostra.

Figura 47: Amostra 93 FL, retirada do processo de ciclagem de pH no dia 05

Fonte: Autor da tese

7.1.4 GRUPO LASER-FLUORETO

A Figura 48 mostra a evolução da amostra 88 do grupo Laser- Fluoreto durante todo o processo de ciclagem de pH: seis imagens B-Scan e as imagens de vídeo correspondentes ao momento de cada análise.

Figura 48: Amostra 88, Grupo Laser-Fluoreto – Imagens B-Scan(a) e de vídeo (b) ao longo do tempo

Fonte: Autor da tese

O Gráfico 5 mostra a variação das médias do coeficiente de atenuação óptica do grupo Laser-Fluoreto ao longo do processo de ciclagem de pH. Da mesma forma que os outros grupos, não foi verificada uma diferença entre as médias entre os coeficientes medidos no momento baseline a após a realização dos tratamentos. Houve diferença significativa após os 5 dias iniciais de ciclagem de pH, mas neste grupo também foi observada um aumento nas médias dos coeficientes de atenuação óptica entre os dias 5 e 10 com diferença significativa.

Entre os dias 10 e 15 não houve diferença, entretanto entre os dias 15 e 20 foi observada uma nova diminuição com diferença significativa nas médias dos coeficientes de atenuação óptica.

Gráfico 5: Variação da média dos coeficientes de atenuação óptica calculados por meio da técnica de OCT para o grupo Laser - Fluoreto. As barras verticais representam o erro padrão das médias. Letras diferentes significam que há diferença estatística entre os tempos, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0.05$). O sinal negativo é devido ao decaimento exponencial da intensidade do sinal de OCT.

Fonte: Autor da tese

A Figura 49 mostra a amostra 8 do grupo LF após 5 dias de ciclagem de pH seccionada para a realização do teste de microdureza seccional Knoop, e a imagem B-Scan adquirida previamente por meio da técnica de OCT. As indentações foram feitas na superfície transversal, correspondente à imagem B-Scan.

Figura 49: a) Amostra 8 LF, dia 5 da ciclagem de pH após ser seccionada; b) Imagem B-Scan correspondente.

Fonte: Autor da tese

Nos grupos onde foram efetuados os tratamentos (F, FL e LF), assim como no grupo Controle, não houve diferença com significância estatística ($p < 0,05$) entre as médias dos coeficientes de atenuação óptica entre a análise imediatamente após a realização dos tratamentos e as suas respectivas médias nas superfícies baseline.

Entre a análise Pós Tratamento e os 5 primeiros dias de ciclagem de pH, houve um aumento no valor das médias dos coeficientes de atenuação óptica com significância estatística ($p < 0,05$) em todos os grupos, indicando que todas as amostras sofreram desmineralização neste período.

Entre o dia 5 e o dia 10, somente no grupo onde a irradiação com o laser de Nd:YAG foi antes da aplicação de fluoreto, houve uma variação maior no valor das médias com significância estatística entre estes tempos ($p < 0,05$), o que significa que neste grupo a taxa de desmineralização foi maior do que no restante.

Entre os dias 10 e 15, não houve diferença significativa nas médias dos coeficientes de atenuação óptica em nenhum dos grupos.

No dia 20, houve uma queda no valor das médias dos coeficientes de atenuação óptica em todos os grupos, entretanto sem diferença com significância estatística ($p > 0,05$) em relação ao tempo anterior (15º dia), com exceção do grupo LF.

Nos grupos F, FL e LF, os valores das médias dos coeficientes de atenuação óptica no dia 20 apresentaram semelhança com as médias verificadas no 5º dia de ciclagem de pH. Entretanto, no grupo FL houve semelhança estatística ($p < 0,05$) com os valores calculados nas amostras imediatamente após a irradiação com laser (PosTrat).

7.2 Variação dos coeficientes de atenuação óptica entre os grupos

As amostras foram analisadas antes do início da ciclagem, e antes de serem separadas nos diferentes grupos, com suas superfícies ainda hígidas (Superfície Baseline).

Na comparação entre os valores das médias dos coeficientes de atenuação óptica entre todos os grupos antes da realização dos tratamentos propostos, não houve diferença estatística significativa ($p > 0,05$), comprovando a homogeneidade entre os grupos, como demonstrado no Gráfico 6.

Gráfico 6: Comparação entre as médias dos coeficientes de atenuação óptica de cada grupo antes da realização dos tratamentos propostos para prevenção da cárie de esmalte dental. Não houve diferença com significância estatística entre os grupos após o teste de Tukey, traduzido pela ausência de letras ($p > 0,05$). O sinal negativo é devido ao decaimento exponencial da intensidade do sinal de OCT.

Fonte: Autor da tese

De acordo com o Gráfico 7, que compara as médias dos coeficientes de atenuação óptica dos grupos imediatamente após a execução dos tratamentos, porém antes do início do processo de ciclagem de pH, houve diferença com significância estatística ($p < 0,05$) entre os grupos LF e FL em relação ao grupo F. Entre o grupo Controle e os demais grupos não houve diferença neste momento. A média dos valores obtidos para o grupo F foram menores em relação aos demais grupos,

Gráfico 7: Comparação entre as médias dos coeficientes de atenuação óptica de cada grupo imediatamente após a realização dos tratamentos propostos para prevenção da cárie de esmalte dental. Letras diferentes significam que houve diferença com significância estatística entre os grupos após o teste de Tukey ($p < 0,05$). O sinal negativo é devido ao decaimento exponencial da intensidade do sinal de OCT.

Fonte: Autor da tese

Após o 5º dia de ciclagem de pH, o grupo Controle apresentou um aumento na média dos coeficientes de atenuação óptica, com diferença estatística em relação às médias dos demais grupos, conforme o Gráfico 8.

Gráfico 8: Comparação entre as médias dos coeficientes de atenuação óptica de cada grupo após 5 dias de ciclagem de pH. Letras diferentes significam que houve diferença com significância estatística entre os grupos após o teste de Tukey ($p < 0,05$). O sinal negativo é devido ao decaimento exponencial da intensidade do sinal de OCT.

Fonte: Autor da tese

Foi verificado neste momento a presença de desmineralizações na subsuperfície de várias amostras deste grupo, como exemplificado pela amostra 62 (Figura 50), que apresenta um segundo pico do sinal de OCT, relacionado à diferença nos índices de refração entre as porosidades e o tecido menos desmineralizado logo abaixo.

Figura 50: Amostra 62, Grupo Controle, dia 5. Observa-se a formação de lesão subsuperficial de cárie na janela em azul, e na janela da curva do coeficiente de atenuação óptica (seta amarela) aparece com um segundo pico relacionado à diferença no índice de refração devido à porosidade logo abaixo da superfície

Fonte: Autor da tese

Após 10 dias e 15 dias de ciclagem de pH, não houve diferença com significância estatística entre a média dos coeficientes de atenuação óptica em todos os grupos, conforme o Gráfico 9 e o Gráfico 10.

Gráfico 9: Comparação entre as médias dos coeficientes de atenuação óptica de cada grupo após 10 dias de ciclagem de pH. Não houve diferença com significância estatística entre os grupos ($p > 0,05$). O sinal negativo é devido ao decaimento exponencial da intensidade do sinal de OCT.

Fonte: Autor da tese

Gráfico 10: Comparação entre as médias dos coeficientes de atenuação óptica de cada grupo após 15 dias de ciclagem de pH. Não houve diferença com significância estatística entre os grupos ($p > 0,05$). O sinal negativo é devido ao decaimento exponencial da intensidade do sinal de OCT.

Fonte: Autor da tese

No final dos 20 dias de ciclagem de pH, somente o grupo FL apresentou diferença com significância estatística ($p < 0,05$) entre os grupos, como visto no Gráfico 11.

Gráfico 11: Médias dos coeficientes de atenuação óptica ao final dos 20 dias de ciclagem de pH. O grupo FL apresentou os menores valores na média de coeficiente de atenuação óptica em relação aos outros grupos ($p < 0,05$). O sinal negativo é devido ao decaimento exponencial da intensidade do sinal de OCT.

Fonte: Autor da tese

A Figura 51 mostra a formação de lesão subsuperficial de cárie na amostra 32 do Grupo F após 20 dias de ciclagem de pH, com a percepção de um segundo pico relativo à alteração no índice de refração devido à desmineralização na subsuperfície.

Figura 51 - amostra do grupo Fluoreto no dia 20, apresentando os 2 picos no sinal de OCT, característicos de lesão subsuperficial de cárie.

Fonte: Autor da tese

No Gráfico 12 nota-se o comportamento dos grupos ao longo do tempo. O grupo FL, onde a aplicação do fluoreto foi realizada antes da irradiação com o laser de Nd:YAG, apresentou uma menor variação da média ao final do experimento em relação aos valores no momento Baseline e imediatamente após o tratamento recebido quando comparado aos demais grupos.

Gráfico 12: Variação das médias dos Coeficientes de Atenuação Óptica dos grupos ao longo do tempo

Fonte: Autor da tese

7.3 Valores de microdureza Knoop

7.3.1 Valores de microdureza Knoop de superfície - Baseline

O teste de microdureza seccional de Knoop foi executado somente nas amostras que foram retiradas após cada etapa de ciclagem, nos dias 5, 10, 15 e 20, devido ao seu caráter destrutivo, o que impediu a continuação do processo de ciclagem de pH durante todo o experimento.

Entretanto, para garantir a homogeneidade das amostras, todas as 160 amostras foram submetidas ao teste de microdureza de superfície Knoop (em uma área protegida por verniz ácido resistente, de modo a não interferir no efeito da ciclagem) previamente à identificação das amostras e divisão por grupos (Gráfico 13).

Gráfico 13 - Microdureza de Superfície – Distribuição dos valores de microdureza de Superfície Baseline

Fonte: Autor da tese

7.3.2 Valores de microdureza seccional Knoop

A cada cinco dias, no momento da troca de soluções, 10 amostras de cada grupo foram aleatoriamente removidas do processo de ciclagem de pH, e reservadas individualmente em tubos Falcon em ambiente umidificado, para avaliar a condição mineral naquele momento, por meio do teste de microdureza seccional Knoop.

As amostras foram avaliadas em três regiões, separadas por 250 μm entre elas, e foram feitas indentações a cada 20 μm a partir da superfície, até a profundidade de 160 μm . Os valores de cada amostra, para cada profundidade, foram salvos em planilhas, e foi obtida uma média entre os três valores em cada profundidade, para comparação em cada tempo, conforme exemplificado no Gráfico 14.

Gráfico 14: Comparação das médias de cada grupo, por profundidade, no dia 05 da ciclagem de pH. As barras representam o erro padrão.

Fonte: Autor da Tese

Analisando a distribuição das médias dos valores de microdureza Knoop a cada etapa de ciclagem, é possível avaliar a influência dos tratamentos sobre a condição mineral das amostras.

No dia 05 da ciclagem de pH, os grupos irradiados com o laser de Nd:YAG apresentaram os maiores valores de microdureza Knoop em uma menor profundidade na amostra, conforme o Gráfico 15. O grupo C apresentou os menores valores, indicativo de maior perda mineral.

Gráfico 15: Valores de microdureza seccional após 5 dias de ciclagem de pH. As barras representam o erro padrão.

Fonte: Autor da tese

Após 10 dias de ciclagem de pH, os valores nas regiões mais próximas da superfície (20 μm) dos grupos F, FL e LF apresentaram valores similares entre si, superiores ao grupo C (Gráfico 16).

Gráfico 16: Valores de microdureza seccional após 10 dias de ciclagem de pH. As barras representam o erro padrão.

Fonte: Autor da tese

Após 15 dias de ciclagem de pH, os valores nas regiões mais próximas da superfície (20 μm) dos grupos FL e LF apresentaram valores similares entre si, superiores ao grupo F, que também apresentou as médias maiores que do grupo C (Gráfico 17).

Gráfico 17: Valores de microdureza seccional após 15 dias de ciclagem de pH. As barras representam o erro padrão.

Fonte: Autor da tese

Após os 20 dias de ciclagem de pH, os valores nas regiões mais próximas da superfície (20 μm) dos grupos F, FL e LF apresentaram valores similares entre si, superiores ao grupo C (Gráfico 18).

Gráfico 18 - Valores de microdureza seccional após 20 dias de ciclagem de pH. As barras representam o erro padrão.

Fonte: Autor da tese

Durante a realização dos testes de microdureza, foi possível visualizar em algumas amostras submetidas à ação do laser de Nd:YAG, nas áreas irradiadas, os prismas de esmalte com aspecto diferente dos prismas da área protegida pelo verniz ácido resistente (Figura 52). Os valores correspondentes ao teste de microdureza da amostra 11 LF estão listados na Tabela 11 .

Figura 52: Amostra 11 LF, no dia 5 da ciclagem de pH. Observa-se uma diferença no formato e padrão de orientação dos prismas de esmalte na área irradiada (I) e não irradiada da amostra (NI)

Fonte: Autor da tese

Tabela 11: Valores Knoop aferidos para a amostra 11LF, no dia 5 da ciclagem de pH

Região da amostra	Distância da Superfície (μm)							
	20	40	60	80	100	120	140	160
250 μm	319	301	359	301	359	343	371	383
Centro	292	343	297	314	310	333	297	338
250 μm	343	323	377	395	365	383	402	333

Fonte: Autor da tese

7.3.3 Perda Mineral

Os dados obtidos foram utilizados para calcular-se o valor de conteúdo mineral das amostras (% vol.), por meio da equação (5) a seguir [154]:

$$\text{Conteúdo Mineral} = 4,3 \sqrt{KHN} + 11,3 \quad (5)$$

Onde KHN (Knoop Hardness Number) corresponde à média dos valores Knoop para cada profundidade analisada. O gráfico resultante representa uma curva relacionada à lesão de cárie da amostra, e a área sob a curva corresponde à perda mineral sofrida em função

da desmineralização. Para a caracterização da perda mineral, os valores da área sob a curva foram subtraídos de um valor representativo para a condição de tecido mineralizado, ou seja, uma projeção do conteúdo mineral da amostra hígida. A perda mineral ou Delta Z (ΔZ), em azul na Figura 53, corresponde então à diferença entre os valores calculados e a projeção da linha correspondente à amostra não desmineralizada.

Figura 53: Ilustração da diferença das áreas sob a curva referente à projeção da amostra hígida, e da área calculada (perda mineral) correspondente ao Delta Z.

Fonte: Autor da tese

Desta forma, foi obtido um percentual de perda mineral para cada grupo ao longo da ciclagem de pH. Na Figura 54 pode-se observar que somente o grupo FL (FFA seguido de irradiação com laser de Nd:YAG) apresentou diferença entre os valores perdidos em cada etapa da ciclagem de pH com significância estatística ($p < 0,05$).

Figura 54: Gráficos representativos da perda mineral de cada grupo ao longo do tempo. Letras diferentes significam que houve diferença com significância estatística entre os grupos após o teste de Tukey ($p < 0,05$). As barras representam o erro padrão.

Fonte: Autor da tese

Na comparação da perda mineral entre os grupos, é possível verificar na Figura 55 que houve variação entre os grupos devido aos tratamentos realizados após 5 dias de ciclagem de pH ($p < 0,05$).

Figura 55: Gráficos comparativos da perda mineral entre os grupos em cada tempo. Letras diferentes representam diferenças estatísticas entre os grupos. As barras representam o erro padrão.

Fonte: Autor da tese

O grupo Controle apresentou as maiores variações na perda mineral em reação aos outros grupos no dia 05 da ciclagem de pH, o que era esperado devido à ausência de tratamentos para a prevenção da desmineralização.

A Figura 56 mostra um detalhe da amostra 12 do grupo C, no dia 5 do processo de ciclagem, onde é possível visualizar uma extensa área de desmineralização na subsuperfície, com uma trinca na camada superficial. A Figura 57 mostra as imagens adquiridas por meio de OCT desta amostra no início do experimento, com a superfície íntegra e com ausência de lesões de desmineralização.

Figura 56: Amostra 12 C no dia 5 da ciclagem de pH. Ao microscópio acoplado ao microdurômetro foi observado o rompimento da camada superficial, provavelmente em função do polimento da amostra para a realização das medidas.

Fonte: Autor da tese

Figura 57: Imagens de OCT da amostra 12 do grupo C, no momento baseline (a) e no dia 5 da ciclagem de pH (b), onde se observa a presença da lesão subsuperficial, com integridade da camada superficial.

Fonte: Autor da tese.

Os valores calculados para a amostra 12 C (Tabela 12) no dia 5 da ciclagem, apresentaram valores compatíveis com o restante das amostras do mesmo grupo, o que reforça a hipótese de que a trinca detectada tenha ocorrido em função do preparo da amostra e a mesma apresentava-se sem resistência mecânica em função da lesão subsuperficial.

Tabela 12: Valores de microdureza Knoop relativos à amostra C12, no dia 5 da ciclagem de pH

12 C5	20 μm	40 μm	60 μm	80 μm	100 μm	120 μm	140 μm	160 μm
1 linha	228	292	255	269	266	310	292	365
2 linha	277	289	297	311	323	349	395	452
3 linha	301	311	323	342	354	338	349	354
MÉDIA	268,67	297,33	291,67	307,33	314,33	332,33	345,33	390,33

Fonte: Autor da Tese

Devido ao alto grau de desmineralização na superfície de algumas amostras, especialmente nas amostras do grupo Controle, algumas indentações não produziram marcas delimitadas, dificultando a obtenção de medidas corretas (Figura 58), e a necessidade da realização de medidas em locais adjacentes aos de porosidades excessivas.

Figura 58: Tentativa de indentação na borda da amostra 108 C no dia 05. O valor obtido indica a desmineralização excessiva neste local e a necessidade de se buscar outro local, onde fosse possível selecionar de modo adequado a área da indentação realizada.

Fonte: Autor da tese

Em algumas amostras do grupo Controle (C) foi observada uma região desmineralizada sob as áreas protegidas pelo verniz ácido resistente, relacionada a um alto grau de desmineralização nestas amostras (Figura 59).

Figura 59: Avanço da desmineralização para regiões localizadas abaixo do verniz ácido resistente (traço amarelo pontilhado) em uma amostra do grupo C, no dia 15 da ciclagem de pH.

Fonte: Autor da tese.

Nas amostras submetidas aos tratamentos, observou-se, nos diferentes tempos da ciclagem, valores mais elevados de microdureza Knoop, mesmo entre as áreas que apresentavam porosidades, o que indica uma ação efetiva dos tratamentos executados sobre a prevenção da desmineralização das amostras de esmalte dental. No caso da maioria das amostras dos grupos irradiados, foram obtidos valores elevados em pequenas áreas de esmalte compreendidas entre porosidades, como exemplificado na Figura 60, da amostra 65 do grupo FL, no dia 20 da ciclagem de pH.

Figura 60: Amostra 65 FL, submetida a 20 dias de ciclagem de pH. Apesar da quantidade de porosidades, as áreas mais proeminentes ainda suportavam a carga exercida pelo dispositivo, apresentando valores compatíveis com o esmalte dental sadio, o que sugere uma ação efetiva da radiação com laser em alta intensidade na prevenção da desmineralização do esmalte em profundidade. As áreas em destaque estão ampliadas com seus respectivos valores de microdureza Knoop (a e b)

Fonte: Autor da tese.

Algumas amostras do grupo F também apresentaram áreas com resistência mecânica durante a realização das endentações, entretanto a média dos valores nessas áreas eram inferiores aos dos grupos irradiados (Figura 61).

Figura 61: Amostra 97F, no dia 20 da ciclagem de pH (microscópio acoplado ao microdurômetro). Os valores medidos entre as porosidades nas amostras deste grupo apresentaram valores inferiores aos das amostras irradiadas com laser de Nd:YAG em alta intensidade.

Fonte: Autor da tese

Os maiores valores de microdureza Knoop obtidos nos grupos irradiados reforça a hipótese de que a ação térmica altera as propriedades físicas dos tecidos duros dentais, tornando-os mais resistentes à desmineralização.

7.4 Comparação entre microdureza seccional Knoop e coeficientes de atenuação óptica

O cálculo do coeficiente de atenuação óptica realizado pelo software considerou toda a sequência de A-Scans contida na área selecionada, sendo que é realizado um ajuste da superfície, tornando-a mais linear, de modo que a área analisada possuiu a mesma profundidade em toda a extensão selecionada.

A média dos valores de microdureza Knoop considerou a média de três fileiras (em cada profundidade medida) nas áreas selecionadas para a realização das indentações, como ilustrado na Figura 62.

Figura 62: Comparação da obtenção das médias dos coeficientes de atenuação óptica e de microdureza Knoop. Em (a) para o cálculo do coeficiente de atenuação óptica, acontece um ajuste automático da superfície da região analisada. O software utilizado “desloca” as irregularidades, de modo a considerar a mesma profundidade em todas as colunas contidas na ROI. Em (b), o operador seleciona as regiões na amostra onde serão efetuadas as indentações para o cálculo da microdureza.

Fonte: Autor da Tese.

Os gráficos a seguir comparam as médias entre os valores brutos de microdureza Knoop e as médias dos coeficientes de atenuação óptica entre os grupos em cada tempo (Figura 63).

Figura 63: Gráficos relacionando as médias dos coeficientes de atenuação óptica com as médias dos valores de microdureza Knoop, para as profundidades de 20 – 120 μm , nos diferentes dias da ciclagem de pH. O sinal negativo é devido ao decaimento exponencial da intensidade do sinal de OCT. As barras representam o erro padrão das médias.

Fonte: Autor da Tese

A Figura 64 ilustra a dificuldade de se realizar as medidas de microdureza nas mesmas regiões, em profundidades uniformes, quando as amostras encontravam-se muito desmineralizadas e com perda de tecido dental, devido à perda tecido dental.

Figura 64: Amostra 49 C no dia 15 da ciclagem de pH, onde é possível visualizar uma grande perda de tecido e alteração do contorno da amostra. Em amostras onde a desmineralização foi muito intensa, as medições precisaram ser feitas o mais próximo possível das bordas da lesão criada, o que dificulta a comparação com valores obtidos a partir de amostras que não sofreram uma perda de tecido equivalente.

Fonte: Autor da tese.

Na Figura 65 evidencia-se a diferença de contorno entre uma amostra no dia 5 (Figura 65a) e outra no dia 20 (Figura 65b), onde percebe-se a perda de contorno na superfície da estrutura dental, sugestivo de perda excessiva de tecido.

Figura 65: Diferentes tempos no processo de desmineralização. a) lesão no 10º dia de ciclagem de pH; b) lesão mais avançada com perda de esmalte, no 20º dia de ciclagem

Fonte: Autor da tese

7.5 Espectro ATR-FTIR

Foram realizadas medidas no intervalo $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$ com o sistema de espectroscopia Thermo Nicolet 6700 (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), com o acessório Smart Orbit ATR acoplado. Os espectros foram obtidos com resolução igual a 4.0 cm^{-1} , sendo coletados cinco espectros de cada amostra, em uma área de $1,5 \text{ mm}^2$, correspondente ao tamanho do cristal de diamante (índice de refração igual a 2,41).

Esta análise qualitativa visou verificar se houve alteração nas principais bandas de absorção relacionadas a composição química do esmalte dental nas condições deste estudo.

Foram observadas alterações nas bandas do fosfato ($\sim 561\text{ cm}^{-1}$ e $\sim 602\text{ cm}^{-1}$), na região de superposição entre os modos ν_1 - ν_3 do fosfato do esmalte dental (900 - 1180 cm^{-1}), como destacado na Figura 66, e também alterações na intensidade nas bandas de absorção relacionadas ao material orgânico entre os grupos irradiados e o grupo Fluoreto e o Controle, na região de $\sim 1300\text{ cm}^{-1}$.

Figura 66: Espectros obtidos por ATR-FTIR das amostras de esmalte. Observou-se uma alteração nas bandas de absorção do carbonato ($\sim 1300\text{ cm}^{-1}$), nas bandas do fosfato ($\sim 561\text{ cm}^{-1}$ e $\sim 602\text{ cm}^{-1}$) e na região de superposição entre os modos ν_1 - ν_3 do fosfato do esmalte ($900 - 1180\text{ cm}^{-1}$).

Fonte: Autor da Tese

8. DISCUSSÃO

A ação mais difundida em odontologia para a prevenção da doença cárie é através do uso de fluoreto. O uso de lasers em alta intensidade há muito vem sendo estudado visando o aumento da resistência à desmineralização dos tecidos dentais através da alteração de características estruturais e químicas destes tecidos, associado ou não ao uso de fluoretos.

Neste estudo, não foi incluído um grupo onde a irradiação com o laser de Nd:YAG foi realizada isoladamente, já que melhores resultados na redução da desmineralização dos tecidos duros dentais foram observados em outros estudos quando o laser de Nd:YAG foi utilizado em conjunto com fluoreto [138, 155, 156].

O laser de Nd:YAG ($\lambda = 1064 \text{ nm}$) não é fortemente absorvido pelos tecidos duros dentais como os lasers de Er,Cr:YSGG ($\lambda = 2078 \text{ nm}$), Er:YAG ($\lambda = 2940 \text{ nm}$) e CO_2 ($\lambda = 9600 \text{ nm}$ e 10600 nm) devido aos altos coeficientes de absorção principalmente da HAP e da água. O uso de substâncias absorvedoras na região de emissão do laser de neodímio na superfície do esmalte absorverá a radiação depositada, convertendo-a em calor, limitado à superfície do tecido dental em questão, potencializando os efeitos térmicos nessa região [19].

O efeito térmico da irradiação com laser em alta intensidade pode alterar as características cristalográficas da matriz mineral, aumentando a sua resistência à desmineralização, especialmente quando associada a fluoretos, com resultados favoráveis alcançados em estudos com diferentes comprimentos de onda, analisados por meio de estudos de microscopia e testes de microdureza seccional [12,127].

A microdureza é uma propriedade física, que permite avaliar o efeito de agentes químicos e/ou físicos sobre a superfície dos tecidos duros dentais [150] razão pela qual foi utilizada como referência para a comparação da variação dos valores dos coeficientes de atenuação ópticos em função dos tratamentos realizados. O coeficiente de atenuação óptica total, determinado por meio da análise do decaimento exponencial do sinal de OCT coletado, foi positivamente correlacionado ao conteúdo mineral em amostras de esmalte dental por meio de seus valores de microdureza seccional [127]. Entretanto, uma relação entre o efeito da radiação com laser em alta intensidade sobre a microdureza do esmalte dental e o coeficiente de atenuação óptica total não foi ainda determinada.

Em muitas amostras dos grupos irradiados foi possível visualizar, durante o teste de microdureza, diferenças no padrão e orientação dos prismas de esmalte nas áreas

irradiadas e não irradiadas. Al-Jedani et al (2016) perceberam alterações na forma, tamanho e organização de prismas de esmalte irradiados com laser de Nd:YAG com largura de pulso de 5 nanosegundos, sendo que quanto maior as densidades de energias utilizadas, maiores foram as alterações morfológicas observadas [157].

No momento imediatamente após os tratamentos, os grupos C, FL e LF apresentaram coeficientes de atenuação óptica maiores do que o grupo F. Esta diferença provavelmente é devida à desidratação temporária das amostras nos grupos irradiados, pela maior perda de água adsorvida pela irradiação naquele momento. Boari et al (2009) [19], usando os mesmos parâmetros de irradiação usados neste estudo, registraram um aumento de temperatura de 650 °C no esmalte. A eliminação da água se inicia em temperaturas inferiores a 100° C dependendo de seu estado de ligação (água livre), mas somente a partir de 1300 °C acontece a sua total eliminação (água estrutural ou aprisionada em algum sítio da HAP). Em um estudo utilizando FTIR para acompanhar alterações nas bandas de absorção do esmalte dental irradiado com laser de Nd:YAG, com e sem o uso de um fotoabsorvedores na superfície, Corrêa-Afonso et al (2015) verificaram uma redução significativa ($p < 0,05$) na quantidade de água no grupo onde o fotoabsorvedor foi utilizado, que voltou a aumentar somente após 7 dias [102].

Fried et al (2010) observaram áreas opacas no esmalte após irradiação com laser de CO₂, atribuído a um maior espalhamento da radiação na imagem adquirida por meio da técnica de NIR devido à desidratação temporária das amostras, que retornaram ao aspecto normal após reidratação das mesmas [158]. A eliminação da água fracamente ligada nas amostras irradiadas e sua substituição por ar (que possui um índice de refração menor e aumenta a eficiência do espalhamento na amostra), aumenta temporariamente o coeficiente de atenuação óptica dessas amostras, que volta a diminuir após a reidratação das mesmas

No Gráfico 12 pode ser observado que em todos os grupos o coeficiente de atenuação óptica aumentou a partir do início da ciclagem de pH (imediatamente após o dia em que foram realizados os tratamentos – Post) até o 5º dia.

Conforme a desmineralização progride, aumentam a quantidade e o tamanho das porosidades, devido à dissolução preferencial das fases cristalográficas da HAP ricas em impurezas, principalmente carbonato e magnésio, facilitando a difusão de ácidos. Com a diminuição progressiva do conteúdo mineral, e ao mesmo tempo, com o aumento da quantidade de interfaces poros/esmalte, a luz consegue penetrar mais na amostra devido ao menor índice de refração da água contida nas porosidades. A probabilidade dos fótons que

conseguem penetrar no tecido encontrarem um centro espalhador para então sofrer retroespalhamento na direção do detector diminui, provocando uma maior velocidade na taxa de decaimento do sinal de OCT [159,160].

No 5º dia, o grupo Controle apresentou os maiores valores dos coeficientes de atenuação óptica ($p < 0,05$) em relação aos demais grupos (Gráfico 8), com diferença estatística entre eles. Essa diferença pode ser verificada também no Gráfico 15, que representa os valores médios de microdureza Knoop na região mais próxima à superfície.

A aplicação de FFA é responsável por alterações nos cristais de HAP. Inicialmente promove uma desmineralização superficial, com dissolução de minerais na superfície do esmalte. Os íons fluoreto presentes são adsorvidos na superfície do cristal de HAP, atraindo íons cálcio e fosfato, construindo uma camada remineralizada de AF, menos solúvel do que a HAP carbonatada. Fan et al (2009), concluíram que a concentração de fluoreto afeta a morfologia dos cristais formados na superfície do esmalte *in vitro*. Verificaram o crescimento de cristais de HF (hidroxiapatita fluoretada), com formato e tamanho semelhantes aos do esmalte nativo com um 1mg/l de fluoreto. O fluoreto aplicado a baixas concentrações, de forma controlada, pode ser incorporado diretamente a cristais de hidroxiapatita em superfícies desmineralizadas, sem haver a formação de partículas esféricas de CaF_2 [161].

O grupo Fluoreto apresentou um aumento na velocidade de progressão da desmineralização em relação ao intervalo entre o momento após o tratamento e no 5º dia, evidenciado pelo maior valor da média dos coeficientes de atenuação óptica das amostras a partir deste momento (Gráfico 3). Foi observado também um aumento na taxa de perda mineral (Figura 54), embora sem diferença estatística significativa entre os tempos, provavelmente devido à pouca estabilidade dos depósitos de cristais de CaF_2 formados, removidos durante a exposição à ciclagem de pH [161].

Não há na literatura consenso quanto a haver ou não diferença entre os efeitos no esmalte da ordem da aplicação entre o fluoreto e a irradiação com laser de neodímio. Alguns autores sugerem que o laser seja um potencializador da difusão do fluoreto quando utilizado após a sua aplicação, por facilitar a sua incorporação nos cristais, formando FA ou AF, conforme sugerido por Tepper et al (2004) e Mahmoudzadeh et al (2017), em estudos com o laser de CO_2 emitindo em 10.600 nm, o que vai de encontro aos resultados obtidos nesse trabalho [162,163].

Quando o fluoreto é aplicado após a irradiação com o laser, o resultado positivo na prevenção da desmineralização dos tecidos dentais é atribuído à maior retenção de fluoreto pelas irregularidades provocadas pela irradiação, aumentando a formação de CaF_2 [164].

No 5º dia, o grupo Fluoreto-Laser apresentou uma diferença significativa em relação ao valor de perda mineral quando comparado ao Grupo Controle (Figura 55), assim como havia sido percebido em relação aos coeficientes de atenuação óptica.

Não foram observadas diferenças entre os grupos em relação aos valores dos coeficientes de atenuação óptica e valores de perda mineral entre todos os grupos nos 10º e 15º dias.

Nos 10º e 15º dias, não foram observadas diferenças nos coeficientes de atenuação óptica e no percentual de taxa de perda mineral entre os grupos.

No 20º dia, o grupo Fluoreto-Laser apresentou uma diferença com significância estatística nos valores do coeficiente de atenuação óptica em relação aos demais grupos (Gráfico 11). Os valores de perda mineral deste grupo apresentaram diferença em relação ao grupo Controle, entretanto apresentou semelhança com os grupos Fluoreto e Laser-Fluoreto (Figura 55).

Os grupos Controle, Fluoreto e Laser-Fluoreto apresentaram semelhança estatística em relação à perda mineral no 20º dia (Figura 55). Os valores dos coeficientes de atenuação óptica foram diferentes estatisticamente entre o Grupo Controle e os demais grupos (Gráfico 11).

No 20º dia, houve uma alteração, com uma diminuição das médias dos coeficientes de atenuação em todos os grupos, apesar de ocorrer uma maior penetração da luz nas amostras. Com a continuidade da ciclagem de pH, a quantidade e o tamanho das porosidades aumentaram em todos os grupos, devido ao aumento da perda mineral sofrida pelas amostras. A explicação mais provável é que, devido à perda excessiva de tecido dental, já estaremos fora da região de validade do modelo teórico utilizado pelo software, que considera regiões que ficaram resguardadas da desmineralização desde o início da ciclagem de pH, portanto com maior conteúdo mineral, o que exerce influência sobre o cálculo da média do coeficiente de atenuação, e menores médias de microdureza Knoop.

Os gráficos apresentados na Figura 63 relacionam a média dos valores brutos de microdureza seccional na profundidade de 20 a 120 μm , com a média dos coeficientes de atenuação óptica obtidos nesta mesma extensão na amostra. Nos 10 primeiros dias de ciclagem de pH, foi observada uma relação inversa entre eles. Menores valores de

microdureza são relacionados a menor conteúdo mineral (maior desmineralização) e a maiores valores dos coeficientes de atenuação óptica.

A partir do 15º dia, embora a relação com a taxa de perda mineral tenha se mantido, esta relação direta com os valores brutos de microdureza só foi observada com o grupo Laser-Fluoreto.

O principal composto da matriz inorgânica dos tecidos duros dentais é a HAP carbonatada, e o carbonato e o fosfato podem ser analisados por FTIR. A eliminação do carbonato é relacionada a uma maior resistência à desmineralização, e nas amostras dos grupos submetidos aos tratamentos propostos neste estudo foram detectadas alterações nas bandas de absorção do carbonato em relação ao grupo Controle. Durante o aquecimento, a taxa de carbonato sofre alterações a partir de 100 °C, embora somente seja eliminado acima de 1100 °C. Com a irradiação com laser em alta intensidade, o aumento da temperatura se dá nessa faixa, e ocorre uma alteração da intensidade das bandas de absorção em relação às bandas de fosfato [52,146]. Estas variações são de acordo com as conclusões de Corrêa-Afonso et al (2015), onde somente no grupo onde o uso do laser de Nd:YAG foi associado ao carvão como fotoabsorvedor, a temperatura alcançada foi capaz de induzir alterações na composição química do esmalte dental.

A água nos tecidos duros dentais apresenta duas bandas de absorção nos espectros IR, uma entre 3700 cm^{-1} e 2200 cm^{-1} (relacionada aos modos vibracionais de água e pontes de hidrogênio), e outra a 1640-1670 cm^{-1} . Bandas estreitas, de menor intensidade, relacionadas à hidroxila e à matriz orgânica também são notadas. É esperado que o aquecimento promovido pela irradiação com laser Nd:YAG promova alterações nessas bandas [52]. Boari et al (2009) [19], com os mesmos parâmetros utilizados neste estudo, registraram um aumento de temperatura de 650 °C na superfície do esmalte. A água começa a ser eliminada com temperaturas abaixo de 100 °C (água livre), mas somente com temperaturas acima de 1330 °C é totalmente eliminada (água adsorvida ou confinada na HAP).

Os principais elementos da matriz orgânica dos tecidos duros dentais analisados por meio do FTIR são as amidas I, II e III. A matriz orgânica é degradada com temperaturas acima de 60 °C e abaixo de 350 °C, levando a uma diminuição na relação entre as bandas das amidas e as bandas de fosfato. Isso é mais notado na dentina por causa de seu conteúdo orgânico mais elevado. No esmalte, a intensidade das bandas no infravermelho relacionadas à água e ao colágeno é menor do que aquelas relacionadas ao carbonato e o fosfato devido à sua pequena quantidade [52]. A diminuição das bandas de absorção na região de 1300 cm^{-1} ,

relacionada ao conteúdo orgânico, como observado na Figura 66, é atribuída ao aquecimento promovido pelo aumento de temperatura nos grupos irradiados.

Neste estudo foram observadas diferenças nas bandas do fosfato entre os grupos submetidos a tratamentos para a prevenção da desmineralização, que apresentaram picos maiores na região de 1030 cm^{-1} e 1020 cm^{-1} e o grupo Controle. As bandas de absorção do fosfato estão relacionadas com a cristalinidade e maturidade dos tecidos mineralizados. As sub-bandas do fosfato (estiramento assimétrico do fosfato - modo ν_3), nas regiões de 1030 cm^{-1} e 1020 cm^{-1} estão associadas à proporção de domínios da apatita e não apatita na estrutura destes tecidos.

O fato de não surgirem novas bandas após a irradiação com laser de Nd:YAG, com os parâmetros utilizados neste estudo, e também de nenhuma das bandas existentes ter desaparecido, sugerem que a irradiação com o laser não promoveu a degradação do esmalte, e que esses parâmetros induzem mudanças em sua morfologia e composição química, com a finalidade de aumentar a sua resistência à desmineralização, sem promover efeitos deletérios como a carbonização.

9. CONCLUSÕES

A variação dos valores dos coeficientes de atenuação óptica do esmalte irradiado com laser de Nd:YAG em alta intensidade, calculados por meio da técnica de OCT, apresentou uma correlação inversa com a variação dos valores de microdureza do esmalte dental irradiado.

Nenhum dos tratamentos realizados neste estudo foi capaz de impedir a progressão da perda mineral nas amostras, entretanto os grupos FL e LF apresentaram os melhores resultados, tanto nos valores dos coeficientes de atenuação óptica como nos valores de microdureza Knoop.

A análise qualitativa realizada por meio da técnica de ATR-FTIR detectou alterações nas bandas de absorção do fosfato e carbonato entre as amostras dos grupos submetidos aos tratamentos para a prevenção da desmineralização do esmalte dental em relação ao grupo Controle, atribuídas aos efeitos térmicos provocados pela radiação com laser de Nd:YAG em alta intensidade e pela ação do FFA, compatível com os resultados da microdureza Knoop e dos coeficientes de atenuação óptica.

10. REFERÊNCIAS

- 1 Sugar and Dental Caries. **WHO Technical Information Note**. WHO/NMH/NHD/17.12. 2017. Disponível em <http://www.who.int/oral_health/publications/sugars-dental-carries-keyfacts/en/>. Acessado em 31/03/2018.
- 2 HOBDEL, M.; PETERSEN, P.E.; CLARKSON, J.; JOHNSON, N. Global goals for oral health 2020. **Int Dent Journal**, FDI/World Dental Press 0020-6539/03/05285-04; v.53, p.285–288, 2003.
- 3 CURY, J.A. Uso do flúor e controle da cárie como doença. In: Baratieri LN et al. **Odontologia Restauradora: fundamentos e possibilidades**. São Paulo: Ed. Santos; cap. 2, p.31-68; 2001.
- 4 SELWITZ, R.H; ISMAIL, A.I; PITTS, N.B. Dental Caries. **Lancet**, v.369, n.9555, p.51-9, 2007.
- 5 MANDELL, I.D. The role of saliva in maintaining oral homeostasis. **J Am Dent Assoc**, v.119, p.298-304, 1989.
- 6 FEATHERSTONE, J.D.B. Dental Caries: a dynamic disease process. **Aust Dent J**, v.53, p.286-291, 2008.
- 7 TENUTA, L.M.A.; CURY, J.A. Fluoride: its role in dentistry. **Braz Oral Res**, v.24, p.9-17. 2010. Spec Issue 1.
- 8 BRASIL. Fundação Nacional de Saúde. **Manual de fluoretação da água para consumo humano** / Fundação Nacional de Saúde. – Brasília : Funasa, 2012. 72 p Disponível em: <http://www.funasa.gov.br/site/wp-content/files_mf/mnl_fluoretacao.pdf>. Acesso em 13 fev. 2018.
- 9 SB Brasil 2010: **Pesquisa Nacional de Saúde Bucal: resultados principais** / Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasília : Ministério da Saúde, 2012, 116 p. : il. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/pesquisa_nacional_saude_bucal.pdf. Acesso em 12 fev. 2018.
- 10 PERES, S.H.C.S.; CARVALHO, F.S; CARVALHO, C.P; BASTOS, J.R.M.; LAURIS, J.R.P. Polarização da cárie dentária em adolescentes, na região sudoeste do Estado de São Paulo, Brasil. **Ciência e Saúde Coletiva**, v.13, n.2, p.2155-2162, 2008.
- 11 STERN, R.H.; SOGNINAES, R.F. Laser effect on dental hard tissue. **J S Calif Dent Assoc**, v.33, p.17-19, 1965.
- 12 ANA, P.A.; BACHMANN, L.; ZECELL, D.M. Lasers Effects on Enamel for Caries Prevention. **Laser Physics**, v.16, n.5, p.865-875, 2006.
- 13 FOWLER, B.O.; KURODA, S. Changes in Heated and in Laser-Irradiated Human Tooth Enamel and Their Probable Effects on Solubility. **Calcif Tissue Int**, v.38, p.197-208, 1986.

- 14 NELSON, D.G.A.; SHARIATI, M.; GLENDIA, R.; et al. Effect of pulsed low-energy infrared laser irradiation on artificial caries-like lesion formation. *Caries Res*, v.20, p.289-299, 1986.
- 15 MORIOKA, T.; SUZUKI, K.; TAGAMORI, S. Effect of acid resistance of dental enamel with the irradiation of various types of laser beam (1st report). *J Jap Soc Laser Med*, v.3, p.605-612. 1982.
- 16 YAMAMOTO, H.; OOYA, K. Potential of yttrium-aluminium-garnet laser in caries prevention. *J Oral Pathol*, v.3, p.7-15, 1974.
- 17 YAMAMOTO, H.; SATO, K. Prevention of dental caries by Nd:YAG laser irradiation. *J Dent Res*, v.59, p.2171-2177, 1980.
- 18 BEDINI, R.; MANZON, L.; FRATTO, G.; PECCI, R. Microhardness and morphological changes induced by Nd:YAG laser on dental enamel: an in vitro study. *Ann Ist Sanità*. V.46, n.2, p.168-172, 2010.
- 19 BOARI, H.G.D.; ANA, P.A.; EDUARDO, C.P.; POWELL, L.G.; ZECELL, D.M. Absorption and Thermal Study of Dental Enamel when Irradiated with Nd:YAG Laser with the Aim of Caries Prevention. *Las Phys*, v.19, n.7, p.1463–1469, 2009.
- 20 BERG, J.H. The Marketplace for new caries management products: dental caries detection and caries management by risk assessment. *BMC Oral Health*, v.6(Suppl 1):S6, 2006.
- 21 CURY, J.A.; TENUTA, L.M.A. Enamel remineralization: controlling the caries disease or treating early caries lesions? *Braz Oral Res*, v.23, p.23-30, 2009 (Spec Iss 1).
- 22 FEATHERSTONE, J.D.B.; DOMÉJEAN, S. The Role of Remineralizing and Anticaries Agents in Caries Management. *Adv Dent Res*, v.24, n.2, p.28-31, 2012.
- 23 FEATHERSTONE, J.D.B.; FONTANA, M.; WOLFF, M. Novel Anticaries and remineralization Agents: Future Research Needs. *J Dent Res*, v.97, n.2, p.125–127, 2018.
- 24 WHITE, S.C.; PHAROAH, M.J. Dental caries. In: *Oral Radiology: principles and interpretation*. 5th ed. Toronto: Mosby, p.297-313, 2004.
- 25 KIDD, E.A.M.; FEJERSKOV, O. What Constitutes Dental Caries? Histopathology of Carious Enamel and Dentin Related to the Action of Cariogenic Biofilms. *J Dent Res*, v.83(Spec Iss C):C35-C38, 2004.
- 26 HUANG, D.; SWANSON, E.A.; LIN, C.P.; SCHUMAN, J.S.; STINSON, W.G., CHANG, W.; et al. Optical Coherence Tomography. *Science*, v.254, p.1178-1181, 1991.
- 27 EVERETT, M.J.; COLSTON, B.W.; SATHYAM, U.S.; DA SILVA, L.B.; FRIED, D.; FEATHERSTONE, J.D.B. Non invasive diagnosis of early caries with polarization-sensitive optical coherence tomography (PS-OCT). *Proc. SPIE 3593, Lasers in Dentistry*. 1999.
- 28 LEGEROS, R.Z. Calcium Phosphates in Enamel, dentin and Bone. In: *Oral Biology and Medicine. Monographs in Oral Science*. Ed:HM Mayers. 1991.
- 29 FEATHERSTONE, J.D.B. Prevention and reversal of dental caries: role of low level fluoride. *Community Dent Oral Epidemiol*, v.27, p.31-40, 1999.
- 30 MALTZ, M.; TENUTA, L.M.A.; GROISMAN, S.; CURY, J.A. *Cariologia: Conceitos Básicos, Diagnóstico e Tratamento Restaurador*. São Paulo. Ed. Abeno. 2016. Cap 2: 17-27

- 31 LI, Z.; AL-JAWAD, M.; SIDDIQUI, S.; PASTERIS, J.D. A mineralogical study in contrasts: highly mineralized whale rostrum and human enamel. *Nature Sci. Rep.*, 5:16511, 2015. doi: 10.1038/srep16511
- 32 ROBINSON, C.; SHORE R.C.; BROOKES, S.J.; STRATFFORD, S.; WOOD, S.R.; KIRKHAM, J. The Chemistry of Enamel Caries. *Crit Rev Oral Biol Med*, v.11, n.4, p.481-495, 2000.
- 33 FEHRENBACH, M.J.; BATH-BALOGH, M. Esmalte. In: *Anatomia, Histologia e Embriologia dos Dentes e das Estruturas Orofaciais*. Ed. Manole, v.3, n.12, p.179-191. 2008.
- 34 NISHIO, C. Formação do esmalte dentário, novas descobertas, novos horizontes. *R Dental Press Ortodon Ortop Facial*, v.13, n.4, p.17-1834, 2008.
- 35 MARQUES, G.C.; UETA, N. Índice de Refração. In: *Ótica*. Cap. 6. 2007. Disponível em <<http://efisica.if.usp.br/optica/basico/>>. Acesso em 03 mai.2018.
- 36 WASAKA, M.; NAGANISHI, K.; MANAGO, K.; ISOBE, T.; ESHITA, Y.; OKAMOTO, M.; ISSHIKI, T. Fine Structure of Tooth Enamel in the Yellowing Human Teeth: SEM and HRTEM Studies. *Microsc Res Tech*, v.79, p.14-22. 2016.
- 37 THYLSTRUP, A.; FEJERSKOV, O. *Textbook of clinical cariology*. 2nd ed. Copenhagen: Munksgaard. 1994.
- 38 FEATHERSTONE, J.D.B. Remineralization, the Natural Caries Repair Process – The Need for New Approaches. *Adv Dent Res*, v.21, p. 4-7,2009. DOI: 10.1177/0895937409335590
- 39 VAN NIEUW, A.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.
- 40 DEWHRIST, F.E.; CHEN, T.; IZARD, J.; PASTER, B.J.; TANNER, A.C.; YU, W.H.; LAKSHMANAN, A.; WADE, W.G. The human oral microbiome. *J Bacteriol*, v.192, n.19, p.5002-5017, 2010.
- 41 KILIAN, M.; CHAPPLE, L.C.; HANNIG, M.; MARSH, P.D.; MEURIC, V.; PEDRESEN, A.M.L.; TONETTI, M.S.; WADE, W.G.; ZAURA, E. The oral microbiome – an update for oral healthcare professionals. *Br Dent J*, v.221, n.10, p.657-666, 2016.
- 42 NYVAD, B.; FEJERSKOV, O. In: Thylstrup A, Fejerskov O. *Tratado de Cariologia*. Ed Cultura Médica. RJ. 1ª Ed. 1988
- 43 ROSIER, B.T.; MARSH, P.D.; MIRA, A. Resilience of the oral microbiota in health – mechanisms that prevent dysbiosis. *J Dent Research*, v. 97, n.4, p.371-380, 2018.
- 44 TAGAHASHI, N. Microbial ecosystem in the oral cavity: metabolic diversity in an ecological niche and its relationship with oral diseases. *Int Congr Ser*. V.1284, p.103-112, 2005.
- 45 LIU, Y-L.; NASCIMENTO, M.; BURNE, R.A. Progress toward understanding the contribution of alkali generation in dental biofilms to inhibition of dental caries. *Int J Oral Sci*, v.4, n.3, p.135-140, 2012. doi:10.1038/ijos.2012.54.
- 46 ROBINSON, C.; SHORE, C.; BROOKES, S.J.; STRAFFORD, S.; WOOD, S.R.; KIRKHAM, J. The chemistry of enamel caries. *Crit Ver Oral Biol Med*, v.11, n.4, p.481-495, 2000.

47 MARSH, P.D. Are dental diseases examples of ecological catastrophes? *Microbiology*, v.149, p.279-294, 2003.

48 PITTS, N.B.; ZERO, D.T.; MARSH, P.D.; EKSTRAND, K; WEINTRAUB, J.A.; RAMOS-GOMEZ, F; TAGAMI, J.; TWETMAN, S.; TSAKOS, G.; AMID, A. Dental Caries. *Nature Reviews Disease Primers*, v.3, p1-16, 2017.

49 DAWES, C. What is the Critical pH and Why Does a Tooth Dissolve in Acid ? *J Can Dent Assoc*, v.69, n.11, p.722-724, 2003.

50 TENUTA, L.M.A., CEREZETTI, R.V.; DEL BEL CURY, A.A.; TABCHOURY, C.P.; CURY, J.A. Fluoride Release from CaF₂ and Enamel Demineralization. *J Dent Res*, v.87, n.11, p.1032-1036, 2008.

51 STEPHAN, R.M.; Intra-Oral Hydrogen-Ion Concentrations Associated With Dental Caries Activity. *J Dent Res*, v.23, n.4, p.257-266, 1944. Disponível em <<https://doi.org/10.1177/00220345440230040401>>. Acesso em 06 mai. 2018.

52 BACHMANN, L.; ZECELL, D.M. *Estrutura e composição do esmalte e dentina – Tratamento Térmico e Irradiação Laser*. São Paulo. Ed Livraria da Física, cap 3, p. 50-84, 2005.

53 JOHN, M.K.; BABU, A.; GOPINATHAN, A.S. Incipient caries: an early intervention approach. *Int J Community Med Public Health*, v.2, n.1, p.10-14, 2015.

54 Guidelines for drinking-water quality: fourth edition incorporating the first addendum. Geneva: WHO; Cap.12, p.370-373. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. 2017. <ISBN 978-92-4-154995-0>. Acesso em 31 mar. 2018.

55 MARTHALER, T.M. Salt fluoridation and oral health. *Act Med Acad*, v.42, n.2, p.140-155. 2013.

56 MALINOWSKI, M.; TOUMBA, K.J.; STRAFFORD, S.M.; DUGGAL, M.S. The effect on dental enamel of the frequency of consumption of fluoridated milk with a cariogenic challeng in situ. *J of Dent*, v.70, p.87-91, 2018.

57 RAN, T.; CHATTOPADHYAY, S.K.; Community Preventive Services Task Force. Economic Evaluation of Community Water Fluoridation. A Community Guide Systematic Review. *Am J Prev Med*, v.50, n.6, p.790–796, 2016. Disponível em <https://doi.org/10.1016/j.amepre.2015.10.014>. Acesso em 13 fev. 2018.

58 CAMPAIN, A.C.; MARIÑO, R.J.; WRIGHT, F.A.; HARRISON, D.; BAILEY, D.L.; MORGAN, M.V. The impact of changing dental needs on cost savings from fluoridation. *Aust Dent J*, v.55, n.1, p.37-44, 2010. Disponível em <doi: 10.1111/j.1834-7819.2010.01173.x>. Acesso em 13 fev. 2018.

59 FRAZÃO, P.; PERES, M.A.; CURY, J.A. Drinking water quality and fluoride concentration. *Rev Saúde Pub*, v.45, n.5, p.964-973. 2011.

60 Public Health Service Recommendation for Fluoride Concentration in Drinking Water for Prevention of Dental Caries. Department of Healthy and Human Services, National Institutes of Health, Center For Scientific Review; Notice of Closed Meetings. 2015; 80(84):24936-24947. Disponível em <<https://www.federalregister.gov/documents/2015/05/01/2015-10201/public-health-service-recommendation-for-fluoride-concentration-in-drinking-water-for-prevention-of>>. Acesso em 09/05/2018.

- 61 BRATHALL, D.; HANSEL, P.G.; SUNDBERGH, H. Reasons for the caries decline: what do the experts believe? *Eur J Oral Sci*, v.104, p.416-422, 1996.
- 62 TEN CATE, J. Review on Fluoride with Special Emphasis on Calcium Fluoride Mechanisms in Caries Prevention. *Eur J Of Oral Sci*, v.105, n. 5, Pt 2, p.461-5. Nov 1997. DOI10.1111/j.1600-0722.1997.tb00231.x.
- 63 ROSIN-GRGET, K.; PEROS, K.; ŠUTEJ, I.; BASIC, K. The cariostatic mechanisms of fluoride. *Acta Medica Academica*, v.42, n.2, p.179-188, 2013. DOI: 10.5644/ama2006-124.85.
- 64 AOBA, T. The Effect of Fluoride On Apatite Structure and Growth. *Crit. Rev. Oral Biol. Med*, v.8, n.2, p.136-153, 1997.
- 65 BUZALAF, M.A.R; PESSAN, J.P.; HONORIO, H.M.; TEN CATE, J.M. Mechanisms of Action of Fluoride for Caries Control. *Monogr Oral Sci*, v.22, p. 97-114, 2011.
- 66 TENUTA, L.M.A.; CURY, J.A. Fluoreto na prática de promoção de saúde, individual e coletiva. *Cadernos da ABOPREV IV*. 2005.
- 67 HUJOEL, P.P.; HUJOEL, M.L.A.; KOTSAKIS, G.A. Personal oral hygiene and dental caries: A systematic review of randomised controlled trials, *Gerodontology*. 2018. Doi:10.1111/ger.12331.
- 68 MALAVASI, C. caries Progression: How Can We Control this Disease ? *J Interdiscipl Med Dent Sci*, v.6, n.1, p.227, 2018. Doi: 10.4172/2376-032X.1000227.
- 69 ZECELL, D.M.; ROSSI, W.; BACHMANN, L. Fundamentos da Física do Laser e Interação da Radiação Laser com Tecido Biológico. In: Eduardo CP et al. *Fundamentos de Odontologia: Lasers em Odontologia*. Rio de Janeiro. Ed Guanabara Koogan. 2010.
- 70 TEIXEIRA, M.R. Aspectos de Protecção Laser. In: *Radioproteção. Sociedade Portuguesa de Protecção Contra Radiações*, v.1, n.2, p.54-58, 1996.
- 71 STERN, R.H.; SOGNAES, R.F.; GOODMAN, F. Laser effect on *in vitro* enamel permeability and solubility. *J S Am Dent Assoc*, v.73, n.4, p. 838-843, 1966.
- 72 BACHMANN, L.; ZECELL, D.M. *Estrutura e composição do esmalte e dentina – Tratamento Térmico e Irradiação Laser*. São Paulo. Ed Livraria da Física, cap 2, p. 6-10, 2005.
- 73 BACHMANN, L.; GOMES, A.S.L.; ZECELL, D.M. Bound Energy of water in hard dental tissues. *Spectroscopy Letters*, v.37, n.6, p.565-579, 2004.
- 74 LIN, M.; XU, F.; LU, T.J.; BAI, B.F. A review of heat transfer in human tooth – Experimental characterization and mathematical modeling. *Dent Mat*, v.26, p.501-503, 2010.
- 75 NAGY, A. All Tissues Dental Laser Er:YAG laser - Review Article. *Biomed J Sci & Tech Res*, v.1, n.1, p. 1-9. 2017. DOI: 10.26717/BJSTR.2017.01.000104.
- 76 FEATHERSTONE, J.D.B. Caries detection and prevention with laser energy. *Dent Clin*, v.44, p.955-969, 2000.
- 77 CECHINNI, R.C.M.; ZECELL, D.M.; OLIVEIRA, E.; FREITAS, P.M.; EDUARDO, C.P. Effect of Er:YAG Laser on Enamel Acid Resistance: Morphological and Atomic Spectrometry Analysis. *Las Surg Med*, v.37, p.366-372, 2005.

78 LIN, S.; LIU, Q.; PENG, Q.; LIN, M.; ZHAN, Z.; ZHANG, X. The ablation threshold of Er:YAG and Er,Cr:YSGG laser in dental dentin. *Sci Res Essays*, v.5, n.16, p.2128-2135, 2010.

79 LIU, J.F.; LIU, Y.; STEPHEN, H.C.Y. Optimal Er:YAG laser energy for preventing enamel demineralization. *J Dent*, v.31, n.1, p.62-66, 2005.

80 RODRIGUES-VILCHIS, L.E.; CONTRERAS-BULNES, R.; OLEA-MEJIA, O.F.; SANCHEZ-FLORES, I.; CENTENO-PEDRAZA, C. Morphological and Structural Changes on Human Dental Enamel After Er:YAG Laser Irradiation: AFM, SEM and EDS Evaluation. *Photom Las Surg*, v.29, n.7, p. 493-500, 2011.

81 AHARI, F.; POOSTI, M.; MOTAHARI, P. Enamel resistance to demineralization following Er:YAG laser etching for bonding orthodontic brackets. *Dent Res J*, v.9, n.4, p.472-477, 2012.

82 AEL, C.; BIRKER, L.; MEISTER, J.; WEISS, C.; GUTKNECHT, N. The Caries-Preventive Potential of Subablative Er:YAG and Er:YSGG Laser Radiation in an Intraoral Model: A Pilot Study. *Photom Las Surg*, n.22, p.4, p.312-317, 2004.

83 GEHAN, GA.; AZIZB, A.F.A. Comparing topical fluoride application, laser irradiation and their combined effect on remineralisation of enamel. *Future Dental Journal*, Available online 4 May 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.fdj.2018.04.006>>. Acesso em 22 mai. 2018.

84 FEATHERSTONE, J.D.B.; NELSON, D.G.A. Laser effects on dental hard tissues. *Adv Dent Res*, v.1, n.1, p. 21-26, 1987.

85 STERN, R.H.; VAHL, J.; SOGNAES, R.F. Laser effect: Ultrastructural observation of pulsed carbon dioxide lasers. *J Dent Res*, v.51, p. 455-460, 1972.

86 FEATHERSTONE, J.D.B.; BARRET-VESPONE, N.A.; FRIED, D.; KANTOROWITZ, Z.; SEKA, W. CO₂ laser inhibition of artificial caries-like lesion progression in dental enamel. *J Dent Res*, v.77, n.6, p.1397-1403, 1998.

87 FRIED, D.; SEKA, W.; GLENA, R.E.; FEATHERSTONE, J.D.B. Thermal response of hard dental tissues to 9- through 11-µm CO₂-laser irradiation. *Opt Eng*, v.35, n.7, p.1976-1984, 1996.

88 LOBENE, R.R.; BHUSSRY, R.A.J. Fine S. Interaction of Carbon Dioxide Laser Radiation with Enamel and Dentin. *J Dent Res*. v.47, n.2, p.311:317, 1968. Doi:10.1.1.1003.3184

89 RECHMANN, P.; FRIED, D.; LE, C.Q.; NELSON, G.; RAPOZO-HILO, M.; RECHMANN, B.M.T.; FEATHERSTONE, J.D.B. Caries inhibition in vital teeth using 9.6-µm CO₂-laser irradiation. *J Biomed Opt*, v.16, n.7, p.071405. doi: 10.1117/1.3564908

90 FANTARELLA, D.; KOTLOW, L. The 9.3 µm CO₂ Dental Laser: Technical Development and Early Clinical Experiences. *J laser Dent*, v.22, n.1. p.10-27, 2014.

91 VITALE, M.C.; ZAFFE, D.; BOTICELL, AR.; CAPRIOGLIO, C. Diode laser irradiation and fluoride uptake in human teeth. *Off J Eur Academ Ped Dent*, v.12, n.2, p.90-92, 2011.

92 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.

93 TAVARES, J.G.; EDUARDO, C.P.; BURNETT, L.H.Jr.; BOFF, T.R.; FREITAS, P.M. Argon and Nd:YAG lasers for caries prevention in enamel. *Photomed Laser Surg*, v.30, n.8, p.433-7, 2012. doi: 10.1089/pho.2011.3104. Epub 2012 Jun 29

94 MIRESMAEILI, A.; KHOSROSHAHI M.E.; MOTAHARI, P.; REZAI-SOUFI, L.; MAHJUB, H.; DADASHI, M.; FARHADIAN, N. Effect of Argon Laser on Enamel Demineralization around Orthodontic Brackets: An In Vitro Study. *J Dent (Tehran)*, v.11, n.4, p.411-417, 2014.

95 ADRIAN, J.C. Pulp Effects of neodymium laser, a preliminary report. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. V. 44, p. 301-305, 1977.

96 REZAEI, Y.; BAGHERI, H.; ESMAEILZADH, M. Effects of laser irradiation on caries prevention. *J Lasers Med Sci*, v.2, n.4, p.159-164, 2011.

97 COX, C.J.M.; PEARSON, G.J.; PALMER, G. Preliminary *in vitro* investigation of the effects of pulsed Nd:YAG laser radiation on enamel and dentine. *Biomaterials*, v.15, n.14, p.1145-1151, 1994.

98 HOSSAIN, M.; NAKAMURA, Y.; LIMURA, Y.; YAMADA, Y.; KAWANAKA, T.; MATSUMOTO, K. Effect of pulsed Nd:YAG laser irradiation on acid demineralization of enamel and dentin. *J Clin Las Med & Surg*, v.19, n.2, p.105-108, 2001.

99 BEDINI, R.; MANZON, L.; FRATTO, G.; PECCI, R. Microhardness and morphological changes induced by Nd:YAG laser on dental enamel: an *in vitro* study. *Ann Ist Sanità*, v.46, n.2, p.168-172, 2010.

100 JALIL, L.A.; LABELLA, R.; PEARSON, C.J. Surface Topography of Enamel and Dentine from Primary Teeth Following Infra-Red Nd:YAG Laser Irradiation: An *In Vitro* Study. *Las Med Sci*, v.12,p.61-67, 1997.

101 SCABAR, L.F.; ARMONIA, P.L.; SARACENI, C.H.C.; TORTAMANO, N. Estudo Morfológico através de microscopia eletrônica de varredura do esmalte dental humano irradiado com laser de Nd:YAG utilizando o verniz fluoretado e o carvão vegetal como fotoabsorvedores. *Inst Ciênc Saúde*, v.23, n.2, p.127-32, Abr-jun, 2005.

102 CORRÊA-AFONSO, A.M.; BACHMANN, L.; ALMEIDA, C.G.; PALMA-DIBB, R.G.; BORSATTO, M.C. Loss of Structural water and carbonate of Nd:YAG laser-irradiated human enamel. *Lasers Med Sci*. V.30, p.1183-1187,2015.

103 ZACH, L.; COHEN, G. Pulp response to externally applied heat. *Oral Surg, Oral Med, Oral Pathol*, v.19, n.4, p.515-530, 1965.

104 VALÉRIO, R.A.; CUNHA, V.S.; GALO, R.; LIMA, F.A.; BACHAMANN, L.; CORONA, S.A.M.; BORSATTO, M.C. Influence of the Nd:YAG Laser Pulse Duration on the Temperature of Primary Enamel. *The Sci World J*. 2015. Article ID 396692. Disponível em <<http://dx.doi.org/10.1155/2015/396692>>. Acesso em 14 set. 2017.

- 105 YU, D.; POWELL, G.L.; HIGUCHI, W.I.; FOX, J.L. Pulpal Temperature Measurement for Nd:YAG Laser-Irradiated Human Tooth. *J Clin Las Medic Surg*, v.13, n.2, p.69-71, 1995.
- 106 HSUL, C.Y.S.; JORDAN, T.H.; DEDERICH, D.N.; Wefel, J.S. Laser-Matrix-Fluoride Effects on Enamel Demineralization. *J Dent Res*, v.80, n.9, p.1797-1801, 2001.
- 107 FOX, J.L.; YU, D.; OTSUKA, M.; HIGUCHI, W.I.; WONG, J.; POWELL, G.L. Combined effects of laser irradiation and chemical inhibitors on the dissolution of dental enamel. *Caries Res*, v.26, p.333-339, 1992.
- 108 MORIOKA, T.; TAGOMORI, S. Combined effect of Nd:YAG laser irradiation and fluoride application on the acid-resistance of dental enamel. *Proceedings of the 3rd International Nd:YAG Laser Symposium*. p.487-490. 1981.
- 109 AZEVEDO, D.T.; FARAONI-ROMANO, J.J.; DERCELI, J.R.; PALMA-DIBB, R.G. Effect of Nd:YAG Laser Combined with Fluoride on the Prevention of Primary Tooth Enamel Demineralization. *Braz Dent J*, v.23, n.2, p.104-109, 2012.
- 110 CHEN, C.C.; HUANG, S.T. The effects of lasers and fluoride on the acid resistance of decalcified human enamel. *Photomed Laser Surg*, v.27, n.3, p.447-52, 2009.
- 111 CAROUNANIDY, U.; SATHYANARAYANAN, R. Dental Caries: A complete changeover (Part II) – Changeover in the diagnosis and prognosis. *J Conserv Dent*, v.12, n.3, p.87-100, 2009.
- 112 PITTS, N.B. ‘ICDAS’ – an international system for caries detection and assessment being developed to facilitate caries epidemiology, research and appropriate clinical management. *Community Dent Health*, v.21, p.193–198, 2004.
- 113 PITT, N.B.; EKSTRAND, K.R. International Caries Detection and Assessment System (ICDAS) and its International Caries Classification and Management System (ICCMS) – methods for staging of the caries process and enabling dentists to manage caries. *Community Dent Oral Epidemiol*, v.41, p.e41-e52, 2013.
- 114 KUHNISCH, J.; DIETZ, W.; STOSSER, L.; HICKEL, R.; HEINRICH-WELTZEIN R. Effects of dental probing on occlusal surfaces – a scanning electron microscopy evaluation. *Caries Res*, v.21, n.4, p.368-374. 2007. Doi:10.1159/000261041.
- 115 BUSSANELI, D.;G. Diagnóstico Visual de Lesões de Cárie. Disponível em: <https://edutec.unesp.br/publicador/index.php/conteudo/visualizarInteiro?pid=201>. Acessado em 17/03/2016.
- 116 RECHMANN, P.; JUE, B.; SANTO, W.; RECHMANN. M.T.; FEATHERSTONE, J.D.B. Calibration of dentists for Caries Management by Risk Assessment Research in a Practice Based Research Network – CAMBRA PBRN. *BMC Oral Health*, v.18, n.2, p.1-9, 2018.
- 117 SPITZER, D.; TEN BOSCH, J. The absorption and scattering of light in bovine and human dental enamel. *Calcif Tiss Res*. v.17, p.129-137, 1975.
- 118 HSIEH, Y.S.; HO, Y.C.; LEE, S.Y.; CHUANG, C.C.; TSAI, J.C.; LIN, K.F.; SUN, C.W. Dental Optical Coherence Tomography. *Sensors*, v.13, p.8928-8949. 2013. Doi:10.3390/s130708928

-
- 119 JONES, R.S.; FRIED, D. The nature of light scattering in dental enamel and dentin at visible and near-IR wavelengths. *Appl Optics*. v.34, p.1278-1285, 1985.
- 120 JONES, R.S.; HUYNH, G.D.; JONES, G.C.; FRIED, D. Near-infrared transillumination at 1310-nm for the imaging of early dental decay. *Opt Exp*, v.11, p.18, 2003.
- 121 HALL, A.; GIRKIN, M. A Review of Potencial New Diagnostic Modalities for Caries Lesions. *J Dent Res*, v.83, Spec Iss C, p.C89-C94. 2004.
- 122 KARLSSON, L. Caries detection methods based on changes in optical properties between healthy and carious tissue. *Int J Dent*. 2010:270729. doi: 10.1155/2010/270729. Epub 2010 Mar 28.
- 123 PRETTY, I.A. Caries Detection and diagnosis: Novel technologies. *J of Dent*, v.34, p.727-739, 2006.
- 124 LUSSI, A.; IMWINKELRIED, S.; PITTS, N.B.; LONGBOTTOM, C.; REICH, E. Performance and Reproducibility of a Laser Fluorescence System for Detection of Oclusal Caries *in vitro*. *Caries Res*, v.33, p.261-266, 1999.
- 125 JUNG, E.H.; LEE, E.S.; JUNG, H.I.; KANG, S.M.; JONG, E.J.; KIN, B.I. Development of a fluorescence-image scoring system for assessing non cavitated occlusal caries. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, v.21, p.36-42, 2018.
- 126 HUANG, D.; SWANSON, E.A.; LIN, C.P.; SCHUMAN, J.S.; STINSON, W.G.; CHANG, W.; et al. Optical Coherence Tomography. *Science*, v.254, p.1178-1181, 1991.
- 127 CARA, A.C.; ZEZELE, D.M.; ANA, P.A.; MALDONADO, E.P.; FREITAS, A.Z. Evaluation of Two Quantitative Analysis Methods of Optical Coherence Tomography for Detection of Enamel Demineralization and Comparison With Microhardness. *Laser Surg Med*, v.46, n.9, p.666-671. 2014
- 128 ZEZELE, D.M.; DE ROSSI, W.; BACHMANN, L. Fundamentos da Física do Laser e Interação da Radiação Laser com tecido Biológico. In: Eduardo, *Fundamentos de Odontologia - Lasers em odontologia*. Ed. Guanabara Koogan. RJ. 2010. Cap1, p.13-17.
- 129 MAIA, A.M.A.; FONSECA, D.D.D.; KYOTOKU, B.B.C.; GOMES, A.S.L. Characterization of enamel in primary teeth by optical coherence tomography for assessment of dental caries. *Int J Paed Dent*, v.20, n.2, p.158-164, 2010.
- 130 RAO, Y.; SARWADW, N.P.; MAKKAR, R. Modeling and Simulation of Optical Coherence Tomography on Virtual OCT. *Proc Comput Sci*, p.644-650, 2015.
- 131 FREITAS, A.Z.; ZEZELE, D.M.; VIEIRA JR, N.D.R.; RIBEIRO, A.C.; GOMES, A.S.L. Imaging carious human dental tissue with optical coherence tomography. *J Appl Phys*, v.99, n.2, p.024906-024906-6, 2006.
- 132 COLSON, B.W.; SATHYAM, U.S.; DA SILVA, L.B.; EVERETT, M.J. Dental OCT. *Opt Exp*, v.3, n.6, p.230-238, sep1998.
- 133 ZEZELE, D.M.; ANA, P.A.; RIBEIRO, A.C.; BACHMANN, L.; FREITAS, A.Z.; VIEIRA JR, N.D. Lasers in caries diagnosis and prevention. *Int J Appl Elet Mech*, v.21, p.1-7, 2005.

134 FEATHERSTONE, J.D.B.; O'REILLY, M.M.; SHARIATI, M.; et al. Enhancement of remineralization *in vitro* and *in vivo*. In: **Factors relating to demineralization and remineralization of the teeth**. S.A. Leach (eds.) Oxford: IRL Press, 1986; p. 23-34.

135 KASHKET, S.; AHERN, J.M. Correlation between Physical Changes in Tooth Enamel and Changes in Iodide Penetrability following *in vitro* or Intraoral Demineralization. **Caries Res**, v.23, p.232-237, 1989.

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

137 COLSTON, B.W.JR; SATHYAM, U.S.; DA SILVA, L.B.; EVERETT, M.J. Dental OCT. **Opt Exp**. V.3, n.6, p.230-238, 1998

138 MORAES, M.C.D.; FREITAS, A.Z.; ARANHA, A.C.C. Progression of erosive lesions after Nd:YAG laser and fluoride using optical coherence tomography. **Lasers Med Sci**. 2017; 32: 1. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10103-016-2075-8>.

139 SIMON, J.C.; KANG, H.; STANINEE, M.; JANG, A.T.; CHAN, K.H.; DARLING, C.L.; LEE, R.C.; FRIED, D. Near-IR and CP-OCT Imaging of Suspected Occlusal Caries Lesions. **Lasers Surg Med**, v.49, p. 215-224, 2017.

140 ZAIN, E.; ZAKIAN, C.M.; CHEW, H.P. Influency of the loci of non-cavited fissure caries on its detection with optical coherence tomography. **J of Dent**, v.71, p.31-37, 2018.

141 GOLONI, C.M.; TEMPORÃO, G.P.; MONTEIRO, E.C. Metrological reliability of optical coherence tomography in biomedical applications. **J Phys: Conf. Ser.** 2013. 459:012064. Doi:10.1088/1742-6596/459/1/012064.

142 BROWNSTEIN, M.; HOFFMAN, R.A.; LEVENSON, R.; MILNER, T.E.; DOWELL, M.L.; WILLIAMS, P.A.; WHITE, G.S.; GAIGALAS, A.K.; HWANG, JC. Biophotonic Tools in Cell and Tissue Diagnostics. **J Res Nat Inst Stand Tech**, v.112, n.3, p.139-152, 2007.

143 KO, C.C.; TANTBIROJN, D.; WANG, T.; DOUGLAS, W.H. Optical Scattering Power for Characterization of Mineral Loss. **J Dent Res**, v.79, n.8, p.1584-1589, 2000.

144 DARLING, C.; L.; HUYNH, G.; D.; FRIED, D. Light scattering properties of naturally and artificially demineralized dental enamel at 1310 nm. **J Biomed Opt**, v.11, n.3, 034023, mai/jun 2006.

145 MAIA, A.; M.; A.; FREITAS, A.; Z.; CAMPELLO, S.; L.; GOMES, A.; S.; L., KARLSSON; L. Evaluation of dental enamel caries assessment using Quantitative Light Fluorescence and Optical Coherence Tomography. **J Biophot**, v.9, n.6, p.596-602, 2016.

146 Zezzel, D.M.; Benetti, C.; Veloso, M.; Castro, P.;A.;A.; Ana, P.; A. FTIR Spectroscopy Revealing the Effects of Laser and Ionising Radiation on Biological Hard Tissues. **J. Braz. Chem. Soc.** 2015; 00(00):1-12

147 DIEM, M.; GRIFFITHS, P.R.; CHALMERS, J.M. **Vibrational Spectroscopy for Medical Diagnosis**, 1st ed.; Wiley:New York. USA, 2008.

148 ARGENTA, R.M.O.; TABCHOURY, C.P.M.; CURY, J.A. A modified pH-cycling model to evaluate fluoride effect on enamel demineralization. *Pesq Odontol Bras*, V.17, n.3, p.241 – 246, 2003.

149 ANA, P.A.; TABCHOURY, C.P.M.; CURY, J.A.; ZEZEEL, D.M. Effect of Er,Cr:YSGG Laser and Professional Fluoride Application on Enamel Demineralization and on Fluoride Retention. *Caries Res*, v. 46, n.5, p.441–451, 2012. Disponível em <https://doi.org/10.1159/000333603>.

150 FEATHERSTONE, J.D.B.; 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.

151 Teste da Microdureza. CIMM -Centro de Informação Metal Mecânica. Disponível https://www.cimm.com.br/portal/material_didatico/6560-teste-da-microdureza#.WwNvt-4vzIU. Acesso em 03 mai. 2018.

152 ZAMATARO, C.B. *Estudo in situ da resistência à desmineralização do esmalte dental submetido à irradiação com laser de Er,Cr:YSGG associada ao uso de produtos fluoretados*. 2013. P. Tese (Doutorado em Tecnologia Nuclear) Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.

153 ANA, P.A.; TABCHOURY, C.P.M.; CURY, J.A.; ZEZEEL, D.M. Effect of Er,Cr:YSGG Laser and Professional Fluoride Application on Enamel Demineralization and on Fluoride Retention. *Caries Res*, v.46, n.5, p.441-451, 2012.

154 FEATHERSTONE, J.D.B.; TEN CATE, J.M.; SHARIAT, M.; AREDS, J. Comparison of artificial caries-like lesions by quantitative microradiography and microhardness profiles. *Caries Res.*, v.17, p.385-391, 1983.

155 SEINO, P.Y.; FREITAS, P.M.; MARQUES, M.M.; ALMEIDA, F.C.S.; BOTA, S.B.; MOREIRA, M.S.N.A. Influence of CO₂ (10.6 µm) and Nd:YAG laser irradiation on the prevention of enamel caries around orthodontic brackets. *Lasers Med Sci*, v.30, p.611–616, 2015.

156 HUANG, G-F.; LAN, W-H.; GUO, M-K.; CHIANG, C-P. Synergistic Effect of Nd:YAG Laser Combined with Fluoride Varnish on Inhibition of Caries Formation in Dental Pits and Fissures *In Vitro*. *J Formos Med Assoc*, v.100, n.3, p.181-185, 2001.

157 AL-JEDANI, S.; AL-HADEETHI, Y.; ANSARI, M.S.; RAZVI M.A.N. Dental Hard Tissue Ablation with Laser Irradiation. *Austin Dent Sci*, v.1, n.1, p.1-10, 2016.

158 FRIED, D.; STANINEC, M.; DARLING, C.L. Near-Infrared Imaging of Dental Decay at 1310 nm. *J Las Dent*, v.18, n.1, p.8-16, 2010.

159 HARIRI, I.; SADR, A.; NAKASHIMA, Y.; TAGAMI, J.; SUMI, Y. Estimation of the Enamel and Dentin Mineral Content from the Refractive Index. *Caries Res*, v.47, p.18-26, 2012.

160 POPESCU, T.D.; 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*. Doi: 10.1117/1.2992129, 2008.

161 FAN, Y.; SUN, Z.; MORADIAN-OLDAK, J. Effect of fluoride on the Morphology of calcium phosphate crystals grown on acid-etched human enamel. *Caries Res*, v. 43, n.2, p.132-136, 2009.

162 TEPPER, S.A.; ZEHNDER, M.; PAJAROLA, G.F.; SCHIMIDLIN, P.R. Increased fluoride uptake and acid resistance by CO₂ laser-irradiation on human enamel in vitro. *J Dent*, v.32, p.635-641, 2004.

163 MAHMOUDZADEH, M.; REZAEI-SOUFI, L.; FARHADIAN, N.; JAMALIAN, S.F.; AKBARZADEH, M.; MOMENI, M.; BASAMTABAR, M. Effect of CO₂ Laser and Fluoride Varnish Application on Microhardness of Enamel Surface Around Orthodontic Brackets. *J Lasers Med Sci*, v.9, n.1, p.43-49, 2017.

164 DELBEM, A.C.B.; CURY, J.A.; NAKASSIMA, C.K.; GOUVEIA, V.G.; THEODORO, L.H. Effect of Er:YAG laser on CaF₂ formation and its anti-cariogenic action on human enamel: an in vitro study. *J. Clin. Laser Med. Surg*, v.21, p.197-200, 2003.

11. ANEXOS

11.1 COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS

Por se tratar de trabalho envolvendo dentes humanos, e uma vez que o IPEN não dispõe de um Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, este trabalho foi submetido para avaliação via Plataforma Brasil/SISNEP ao Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Faculdade de Odontologia da USP, tendo sido aprovado em 13/02/2014, sob parecer nº 529.666.

11.2

O poder do estudo obtido a partir dos coeficientes de atenuação óptica provenientes do sinal de OCT (20 a 120 μm) deste experimento foi calculado por meio da análise One-Way ANOVA, e está representado no gráfico a seguir:

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Diretoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Ensino
Av. Prof. Lineu Prestes, 2242 – Cidade Universitária CEP: 05508-000
Fone/Fax(0XX11) 3133-8908
SÃO PAULO – São Paulo – Brasil
<http://www.ipen.br>

O IPEN é uma Autarquia vinculada à Secretaria de Desenvolvimento, associada à Universidade de São Paulo e gerida técnica e administrativamente pela Comissão Nacional de Energia Nuclear, órgão do Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações.