



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

**Caracterização óptica de tecidos duros dentais irradiados com lasers de
Nd:YAG**

DAÍSA DE LIMA PEREIRA

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

**Orientadora:
Profa. Dra. Denise Maria Zezell**

**São Paulo
2019**

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

**Caracterização óptica de tecidos duros dentais irradiados com lasers de
Nd:YAG**

Versão Corrigida

DAÍSA DE LIMA PEREIRA

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

**Orientadora:
Profa. Dra. Denise Maria Zezell**

**São Paulo
2019**

Fonte de Financiamento: FAPESP (CEPOF 05/51689-2), CNPq (INCT: 465763/2014-6, PQ: 309902/2017-7, PhD: 140619/2015-1) e CAPES (PROCAD: 8888.068505/2014-1)

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Como citar:

PEREIRA, D. L. *Caracterização óptica de tecidos duros dentais irradiados com lasers de Nd: YAG*. 2019. 122 f. Tese (Doutorado em Tecnologia Nuclear), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN, São Paulo. Disponível em: <<http://repositorio.ipen.br/>> (data de consulta no formato: dd/mm/aaaa)

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de geração automática da Biblioteca IPEN, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Pereira, Daisa Lima

Caracterização óptica de tecidos duros dentais irradiados com lasers de Nd:YAG / Daisa Lima Pereira; orientador Denise Maria Zezell. -- São Paulo, 2019.

122 f.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Nuclear (Materiais) -- Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2019.

1. tecido duro dental. 2. laser Nd:YAG. 3. tomografia por coerência óptica. 4. espectroscopia Raman confocal. 5. termografia infravermelho. I. Zezell, Denise Maria, orient. II. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Autora: Daísa de Lima Pereira

Título: Caracterização óptica de tecidos duros dentais irradiados com lasers de Nd:YAG

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Tecnologia Nuclear da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Data:23/07/2019

Banca Examinadora

Prof. Dr.: Arandi Ginane Bezerra Junior

Instituição: Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Julgamento:_____Assinatura:_____

Profa. Dra.: Daniela de Fátima Teixeira da Silva

Instituição: Universidade Nove de Julho

Julgamento:_____Assinatura:_____

Profa. Dra.: Patricia Aparecida da Ana

Instituição: Universidade Federal do ABC

Julgamento:_____Assinatura:_____

DEDICATÓRIA

A Deus, por permitir que eu chegasse até aqui.

Aos meus pais Moisa e Dalva, que são meus exemplos de vida e minha inspiração para ser tão boa quanto eles. Além disso, sempre me deram o amor, a formação e incentivo necessários para que eu pudesse seguir este caminho e alcançar mais essa conquista.

A minha avó Alice que hoje está distante fisicamente mas me acompanha nos meus pensamentos e no meu coração. Enquanto foi possível sempre cuidou de mim e me incentivou a trilhar novos caminhos. Tenho certeza que estaria orgulhosa de mim ao saber desse novo degrau alcançado.

Ao meu marido Julio, fundamental na trajetória de construção desse trabalho. Já esteve presente em mais da metade da minha vida e sempre ao meu lado com muito amor, amizade e companheirismo. Agradeço por toda a compreensão e dedicação a mim e a nossa família e por continuar sendo meu fiel escudeiro. E também por deixar tudo mais engraçado e mais leve.

E por último, porém não menos importantes. Dedico aos meus filhinhos: Enrico (humano) e Frotinha (cachorrinho). Enrico que nasceu logo no início desse doutorado é a grande razão para eu seguir em frente e para que eu queira ser uma pessoa melhor a cada dia, espero que quando for maior entenda que as minhas ausências tiveram um motivo bastante plausível e que se sinta orgulhoso da mamãe que tem. E o Frotinha, é a minha fonte inesgotável de amor e carinho que me acompanha nas horas e horas sentada na frente do computador.

AGRADECIMENTOS

A Profa. Dra. Denise Maria Zezell por ter aceitado me orientar, por ter me ensinado muitas coisas e por ter sido tão compreensiva na fase mais importante da minha vida.

A Profa. Dra. Patricia Aparecida da Ana (UFABC) que hoje posso chamar de amiga, sem ela jamais estaria onde estou hoje e sou muito grata pelas oportunidades dadas a mim por ela. Foi minha orientadora no mestrado e continuou me guiando cientificamente ajudando no doutorado com sugestões valiosíssimas. Agradeço ainda por sempre deixar a UFABC de portas abertas para usar os equipamentos ou qualquer coisa que eu precisasse.

A Profa. Dra. Carolina Benetti (UFABC) pela contribuição no exame de qualificação, pelas dicas e ajudas no laboratório ou enquanto escrevíamos capítulos de livro.

Ao Prof. Dr. Marcello Magri Amaral (Univ. Brasil) pela ajuda no delineamento experimental, na montagem de experimentos e até na compreensão de alguns resultados obtidos. E também pelas contribuições em meu seminário de área.

Ao Prof. Dr. Marcus Paulo Raele (IPEN) pelo auxílio em algumas medidas experimentais.

Ao Prof. Dr. Marcos Antonio Scapin (IPEN), pela ajuda na execução e compreensão de alguns experimentos.

Ao Prof. Dr. John Girkin (Durham University – UK) pelo grande auxílio no desenvolvimento de parte da metodologia deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Christiano José Santiago de Matos (Mackgraphe) por disponibilizar as instalações do Mackgraphe para a realização deste trabalho.

Ao Dr. Henrique Bücken Ribeiro (Mackgraphe) pela paciência de ter me ensinado a utilizar o equipamento Raman confocal.

Ao Prof. Dr. Anderson Stevens Leônidas Gomes (UFPE) por disponibilizar o seu laboratório e equipamentos para que eu pudesse usar durante o período que estive em Recife-PE.

Ao Prof. Dr. Renato de Araujo (UFPE) por disponibilizar o seu laboratório e equipamentos para que eu pudesse usar durante o período que estive em Recife-PE e também me auxiliar na análise dos dados e resultados.

A M.e Daniela Siqueira Lopes por todo o auxílio e disponibilidade durante a temporada que estive em Recife-PE.

A Profa. Dra. Ana Cecilia Correa Aranha (LELO- FOU SP) pelas inúmeras vezes que disponibilizou consultório e o laser para que eu pudesse utilizar para irradiar minhas amostras e também pela valiosa contribuição em meu seminário de área.

A Gabriela Vieira Gomes (Gabi- FOU SP/IPEN, a IC mais premiada do Brasil), que me ajudou em várias etapas desse trabalho. Ainda me possibilitou a incrível experiência de ensinar e supervisionar seu trabalho e com isso trouxe resultados fantásticos com o seu trabalho de iniciação científica que foi reconhecido com alguns prêmios. Sou muito grata por ter tido a oportunidade de compartilhar meu conhecimento e ver que ela voará longe.

Ao M.e Pedro Arthur Augusto de Castro (IPEN) que me ajudou demais na reta final com a análise dos dados e vibrava a cada figura linda que obtíamos como resultado.

Ao Dr. Cassio Lima (IPEN) por ter me auxiliado desde o início no IPEN com todas as burocracias e por ter dado várias dicas para otimizar e melhorar a qualidade da análise de dados.

A Dra. Claudia Bianchi Zamataro (Cacau- IPEN) pela amizade e por ter me auxiliado em uma das etapas mais difíceis desse trabalho que foi o preparo das amostras. Disponibilizou seu tempo em finais de semana e seu espaço e equipamentos para que eu conseguisse terminar o preparo das amostras no período de tempo necessário. Sempre serei grata!!

A Dra. Marcia Cristina Dias de Moraes (Marrrcia – IPEN) pela amizade, apoio e por sempre me dar uma consultoria da parte clínica da odontologia. Um dos presentes que o doutorado me trouxe!

Ao M.e Matheus del Valle que prontamente me auxiliou em algumas medidas e rotinas do Matlab.

À todos os colegas do Laboratório de Biofotônica.

Ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) e Centro de Lasers e Aplicações (CLA) pela infraestrutura fornecida.

À todos os funcionários do CLA e da Secretaria de Pós-Graduação o Programa de Tecnologia Nuclear.

Às agências de fomento que financiaram essa pesquisa CNPq (PhD: 140619/2015-1, INCT: 465763/2014-6, PQ: 309902/2017-7), Fapesp (CEPID: 05/51689-2, 17/50332-0), CAPES (PROCAD 88881.068505/2014-01, 88887.187534/2018-00).

*Nem tudo que reluz é ouro.
Nem sempre o melhor está ao alcance dos
olhos. É preciso estar atento e aprender a
perceber melhor as pessoas e o mundo à
volta porque os diamantes não ficam na
superfície e são o que de mais valioso há.*

Augusto Branco

RESUMO

DE LIMA PEREIRA, D. **Caracterização óptica de tecidos duros dentais irradiados com lasers de Nd:YAG**. 2019. 122 p. Tese (Doutorado em Tecnologia Nuclear), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN/SP, São Paulo.

Os métodos de diagnóstico óptico são muito utilizados na odontologia e se baseiam nas propriedades ópticas dos tecidos duros dentais esmalte e dentina. Estes, podem detectar doenças da cavidade oral precocemente possibilitando uma intervenção mais rápida e eficaz. O *laser* Nd:YAG ($\lambda=1064\text{nm}$) é bastante difundido na clínica para a prevenção e tratamento de cárie e erosão dentária. Após a irradiação dos tecidos duros com Nd:YAG, suas propriedades ópticas são modificadas, há alta penetração de fótons deste comprimento de onda e baixa absorção, assim é necessário o uso de fotoabsorvedores para que os fótons sejam absorvidos na superfície e se evite a necrose da polpa dental. Atualmente a pasta de carvão, usada como fotoabsorvedor, causa escurecimento no tecido irradiado implicando na baixa adesão ao tratamento por questões estéticas. O objetivo deste estudo *in vitro* foi caracterizar os tecidos duros dentais quanto à irradiação com *laser* de Nd:YAG com pulsos na ordem de microssegundos e nanossegundos, descrever as alterações promovidas pela irradiação e se essas interferem nos métodos de diagnóstico e também como o uso de um fotoabsorvedor alternativo, como a tinta de lula, influencia nas propriedades ópticas dos tecidos. Esses *lasers* também são propostos como alternativa de prevenção de lesões de erosão dentária. Foram determinados os protocolos de irradiação eficiente e seguros para o *laser* de Nd:YAG ($0,6\text{W}; 84,9\text{J}/\text{cm}^2; 120\mu\text{s}$) e também para o Q-Switched Nd:YAG ($4\text{W}; 1,05\text{J}/\text{cm}^2; 5\text{ns}$) baseados na medida da temperatura intrapulpar com termopares de resposta rápida e superficial com termografia no infravermelho durante a irradiação de dentes humanos; concentração de flúor nos fotoabsorvedores; mudança de cor de acordo com o fotoabsorvedor e também na análise da morfologia superficial por microscopia eletrônica de varredura após a irradiação de dentes bovinos. Após a determinação dos protocolos, foram calculados o índice de refração, coeficiente de atenuação óptica para determinar se o protocolo foi eficiente na prevenção de lesões de erosão e também foram utilizados neste cálculo os índices refração calculados anteriormente. Ambos

protocolos apresentaram aumento menor do que 5,5°C da temperatura intrapulpar, indicando que estão na faixa de manutenção da vitalidade pulpar. A temperatura superficial durante a irradiação foi maior do que 200°C. A concentração de flúor na pasta de carvão é $0,03 \pm 0,01 \mu\text{gF/mL}$ e na tinta de lula é $3,92 \pm 0,32 \mu\text{gF/mL}$. A tinta de lula promoveu menor escurecimento. As eletromicrografias mostraram que os *lasers* promoveram fusão nas superfícies dos tecidos exceto a dentina irradiada com o Nd:YAG Q-Switched. Não houve diferença estatística significativa entre os índices de refração calculados, porém, o cálculo do coeficiente de atenuação óptica mostrou diferenças significativas e os protocolos que se utilizaram da tinta de lula se mostraram mais eficientes na prevenção das lesões de erosão. A composição química em profundidade foi determinada utilizando-se a espectroscopia Raman confocal. *Lasers* de Nd:YAG são eficientes para a prevenção de lesões de erosão dentária independente da largura de pulso, a tinta de Lula se mostrou eficaz e viável esteticamente. Os protocolos são seguros para aplicação clínica e alteram os tecidos duros dentais química e opticamente influenciando no diagnóstico por técnicas ópticas, por exemplo OCT.

Palavras-chave: esmalte; dentina; laser Nd:YAG; caracterização óptica; tomografia por coerência óptica; espectroscopia Raman confocal; termografia no infravermelho

ABSTRACT

DE LIMA PEREIRA, D. ***Optical characterization of irradiated dental hard tissues with Nd:YAG lasers.*** 2019. 122 p. Thesis (Ph.D. in Nuclear Technology), Nuclear and Energy Research Institute, IPEN-CNEN/SP, São Paulo.

Optical diagnostic methods are widely used in dentistry and are based on the optical properties of hard dental tissues, like enamel and dentin. These methods can detect early oral cavity diseases, which allow a faster and more effective intervention. The Nd:YAG laser ($\lambda = 1064\text{nm}$) is very useful in the clinical dentistry for the prevention and treatment of caries and dental erosion. Optical properties of hard tissues irradiated with Nd:YAG laser are modified, this wavelength allow most of photons can penetrate more and there is low absorption, so it is necessary to use photoabsorbers and most of photons are absorbed in the surface and there is no necrosis in dental pulp. Currently the coal paste is used as a photoabsorber but the irradiated tissue turns darker what implies in the low adherence to the treatment due to aesthetic reasons. There are several types of Nd:YAG laser, even with different pulse widths. This *in vitro* study aimed to characterize the dental hard tissues irradiated with Nd:YAG laser with pulses in the order of microseconds and nanoseconds, in order to describe the changes promoted by the irradiation and show if there is an interfeeration in the diagnostic methods and also as the use of a photoabsorbent alternative as squid ink influences the optical properties of the tissues. These lasers are also proposed as an alternative to prevent dental erosion lesions. An efficient and safe irradiation protocols were determined for the Nd:YAG laser (0.6W; $84.9\text{J}/\text{cm}^2$; $120\mu\text{s}$) and also for the Q-Switched Nd:YAG (4W; $1,05\text{J}/\text{cm}^2$; 5ns) based on the measurement of intrapulpal temperature with thermocouples and superficial temperature with infrared thermography during human teeth irradiation; concentration of fluoride in the photoabsorbers; color change according to the photoabsorbers and also in the analysis of surface morphology by scanning electron microscopy after bovine teeth irradiation. After the determination of the irradiation protocols, the refractive index was calculated and optical attenuation coefficient was determined to stablish the effience of the irradiation protocol in the prevention of erosion lesions and also the previously calculated refractive indexes were used in this calculation. Both protocols showed an increase of less than 5.5°C in intrapulpal temperature, indicating that is

a safe protocol to the maintenance of pulp vitality. The surface temperature during irradiation was higher than 200°C. The fluoride concentration in the coal paste is $0.03 \pm 0.01 \mu\text{gF/mL}$ and in the sepia ink is $3.92 \pm 0.32 \mu\text{gF/mL}$. The sepia ink promoted less color change. Electron micrographs showed that the lasers promoted fusion on the surfaces of the tissues except the group of dentin irradiated with Q-Switched Nd:YAG. There was no statistically significant difference between the calculated refractive indices, however, when these index were used in the calculation of the optical attenuation coefficient significant differences were noted and the protocols that were used for the squid ink were shown to be more efficient in the prevention of dental erosion lesions. The in-depth chemical composition was determined using confocal Raman spectroscopy. Nd:YAG lasers are efficient for the prevention of injuries of tooth erosion independent of pulse width, squid ink has shown to be effective and aesthetically viable. The protocols are safe for clinical application and alter chemically and optically the hard dental tissues and influences optical diagnoses techniques like OCT.

Keyword: dentin; enamel; Nd:YAG laser; optical characterization; optical coherence tomography; confocal Raman spectroscopy; infrared thermography

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL.....	16
2 OBJETIVOS	21
2.1 Objetivos gerais.....	21
2.1.1 Objetivos específicos.....	21
3 Delineamento experimental geral.....	22
4 AVALIAÇÃO DE NOVO FOTOABSORVEDOR PARA LASERS DE Nd:YAG.....	25
4.1 Introdução	25
4.2 Material e Métodos	27
4.2.1 Avaliação de temperatura superficial e pulpar durante a irradiação	27
4.2.2 Avaliação da concentração de flúor nos fotoabsorvedores.....	30
4.2.3 Análise da variação de cor pós irradiação com fotoabsorvedores	32
4.2.3.1 Preparo das amostras	34
4.2.3.2 Avaliação da variação de cor pós irradiação	35
4.2.4 Análise morfológica pós irradiação	36
4.2.5 Características de absorção dos fotoabsorvedores	37
4.2.6 Análise Estatística	37
4.3 Resultados e Discussão	38
4.3.1 Avaliação de temperatura superficial e pulpar	38
4.3.2 Fotoabsorvedores: Análise de flúor fracamente ligado	42
4.3.3 Avaliação da variação de cor pós irradiação.....	43
4.3.4 Análise morfológica pós irradiação	47
4.3.5 Características de absorção dos fotoabsorvedores	52
4.4 Conclusão.....	54
5 DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE REFRAÇÃO.....	55
5.1 Introdução	55
5.2 Materiais e Métodos	55
5.2.1 Preparo das amostras.....	55
5.2.2 Tratamento das amostras.....	58
5.2.2.1 Aplicação de Flúor Fosfato Acidulado (FFA) nas amostras	58
5.2.2.2 Irradiação das amostras	58
5.2.3 Avaliação por OCT.....	59
5.2.3 Análise Estatística	60
5.3 Resultados e Discussão	61
5.4 Conclusão.....	64
6 DETERMINAÇÃO DO COEFICIENTE DE ATENUAÇÃO ÓPTICA.....	65
6.1 Introdução	65

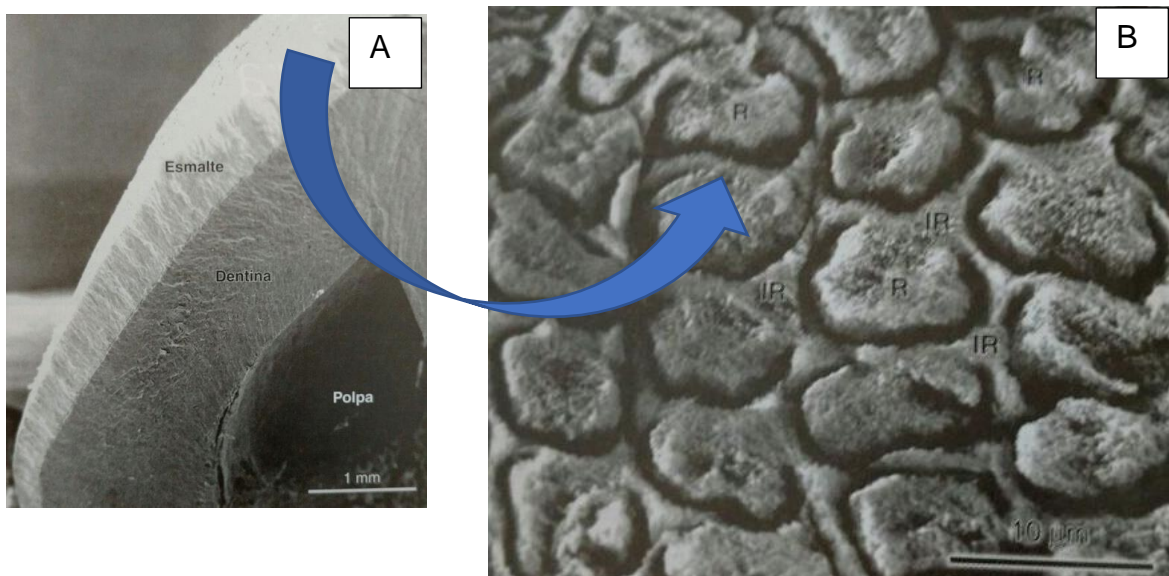
6.2 Materiais e Métodos	67
6.2.1 Preparo das amostras	67
6.2.2 Avaliação por OCT	70
6.2.3 Análise Estatística	72
6.3 Resultados e Discussão	72
6.4 Conclusão.....	90
<u>7 ANÁLISE DA VARIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA.....</u>	<u>91</u>
7.1 Introdução	91
7.2 Materiais e Métodos	93
7.2.2 Tratamento das amostras	96
7.2.2.1 Aplicação de Flúor Fosfato Acidulado (FFA) nas amostras	96
7.2.3 Análise Estatística	97
7.3 Resultados e Discussão	97
7.4 Conclusão.....	103
<u>8 DISCUSSÃO GERAL.....</u>	<u>104</u>
<u>9 CONCLUSÃO GERAL.....</u>	<u>106</u>
<u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</u>	<u>107</u>
<u>APÊNDICE</u>	<u>111</u>

1 INTRODUÇÃO GERAL

Tecidos biológicos são de natureza anisotrópica, ou seja, suas propriedades ópticas podem depender da orientação do tecido em relação a fonte de luz ¹. A propagação da luz nos materiais está relacionada com as suas propriedades ópticas, sendo assim, conhecer os parâmetros ópticos de tecidos biológicos é essencial para diagnósticos e tratamentos ópticos ². Por serem meios complexos, a propagação da luz nos tecidos biológicos é influenciada principalmente pelo índice de refração do tecido, coeficiente de absorção e suas propriedades de espalhamento ³.

As propriedades ópticas dos tecidos são determinadas por suas características químicas e microestruturais de suas matrizes formadoras ⁴. O esmalte dental é composto por 96% de material inorgânico (hidroxiapatita) e 4% de material orgânico e água. Sendo composto basicamente por cristais de hidroxiapatita (Figura 1), a orientação deles é responsável pelo processo de espalhamento da luz incidente. Além disso, caracteriza-se por ser um tecido bastante duro e frágil, translúcido e pode ter no máximo 2,5 mm de espessura⁵.

Figura 1-(A) Eletromicrografia da estrutura dental. (B) Detalhe para a estrutura prismática dental.

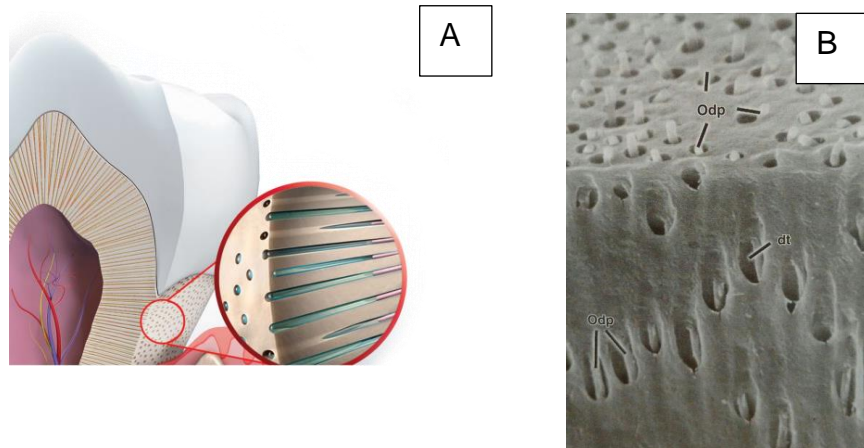


Fonte: Ten Cate, A.R. Histologia Oral, 2008

Já a dentina Figura 2 é composta por 70% de hidroxiapatita, 20% de material orgânico e 10% de água, sua estrutura possui túbulos que são o meio mais

espalhador de luz deste tecido, já que sua quantidade e orientação podem influenciar muito no espalhamento da luz incidente¹. Além dessas características, pode-se citar a elasticidade do tecido e a cor opaca e amarelada.

Figura 2- (A) Ilustração da estrutura dentinária com destaque para os túbulos dentinários. (B) Eletromicrografia dentina.



Fontes: <http://www.colgateprofissional.com.br/pacientes/nbspFolheto-Hipersensibilidade/artigo> e Ten Cate, A.R. Histologia Oral, 2008.

O diagnóstico e tratamento ópticos são realizados com base nas propriedades ópticas do tecido, as quais podem ser alteradas de acordo com o tratamento prévio ao qual o tecido foi submetido ou ao tipo de interação deste tecido com a fonte de luz utilizada. A interação dos tecidos duros dentais com *lasers* depende principalmente do comprimento de onda utilizado e de seus coeficientes de absorção e espalhamento. *Lasers* com comprimento de onda na região do infravermelho são mais absorvidos por tecidos biológicos e portanto podem promover aumento de temperatura do tecido^{6,7}.

Lasers em alta intensidade promovem efeito térmico localizado quando a sua irradiação é absorvida pelo tecido duro dental. Esse efeito provoca modificações químico-estruturais como formação de novas fases cristalográficas nos tecidos duros dentais, que dependem da temperatura superficial atingida e podem tornar o tecido muito mais resistente à ação de ácidos o que evita sua desmineralização⁴. A matriz orgânica do esmalte e da dentina é eliminada com temperaturas inferiores a 350°C; sendo que a desnaturação de proteínas já é observada a partir de 45°C. Os constituintes da matriz mineral são mais estáveis termicamente. A eliminação de carbonato começa a ser observada após aquecimento a 100°C, sendo quase totalmente eliminado após aquecimento a 1100°C, temperatura na qual ocorre a

formação de novas estruturas cristalográficas, tais como fosfato de tricálcico na fase α e β e fosfato tetracálcico ⁴.

Sabendo-se que *lasers* em alta intensidade emissores na região do infravermelho promovem alterações químico-estruturais no tecido duro, é importante conhecer qual é o índice de refração dos tecidos depois de irradiados para que se possa prever como os fótons se propagam nestes tecidos e quais serão os efeitos térmicos e ópticos ocasionados pela sua absorção ^{3,4,8-10}. A seguir é mostrada uma tabela com os principais *lasers* de alta intensidade utilizados na clínica odontológica e os parâmetros ópticos do esmalte (Tabela 1).

Tabela 1- Propriedades ópticas de alguns *lasers* de alta intensidade. Adaptado de ¹¹.

<i>Lasers</i>	Comprimento de onda	Coefficiente de absorção	Coefficiente de espalhamento
	λ (nm)	μ_a (cm ⁻¹)	μ_s (cm ⁻¹)
Visíveis	450-700	<1	40-100
Nd:YAG	1064	<1	15
Ho:YAG	2100	<20	Não determinado
Er,Cr:YSGG	2790	450	~0
Er:YAG	2940	770	~0
CO₂	9300	5500	~0
CO₂	9600	8000	~0
CO₂	10300	1125	~0

Fonte: Featherstone JDB. Caries detection and prevention with laser energy. Dent Clin North Am. 2000;44:955-69

O índice de refração (n) é um parâmetro importante da propagação da luz em tecidos biológicos, inclusive os dentes ¹². O espalhamento da luz é causado pela descontinuidade do índice de refração do meio em que a luz se propaga, ou seja, é resultado final da variação do n ^{4,7}. Ainda, é sabido que o índice de refração pode variar de acordo com a desmineralização do tecido ou decorrente de alterações químicas e/ou estruturais ⁷.

A alteração da cor natural do tecido dental pode ter diversas origens, tais como: traumas, retenção de pigmentos provenientes de bebidas escuras, uso de clorexidina, presença de cáries, íons ferro, hemoglobina e também pelo aquecimento do tecido. Particularmente o aquecimento pode alterar a coloração dos tecidos de diferentes formas, para esmalte e dentina a coloração pode variar

entre preto, marrom, azul, cinza, branco e rosa dependendo da temperatura do tecido ⁴.

Entre os métodos ópticos não destrutivos para caracterização de tecidos duros estão a tomografia por coerência óptica (OCT), a espectroscopia Raman confocal e microscopia eletrônica de varredura (MEV).

A técnica de OCT consiste no imageamento óptico não destrutivo de materiais espalhadores e fornece imagens de alta resolução de tecidos biológicos. Esta técnica não requer contato com a amostra em análise, é não invasiva e não utiliza radiação ionizante, o que possibilita a sua aplicação *in vivo* sem qualquer efeito colateral ao paciente. Há muitos estudos na área de saúde incluindo a Odontologia, que demonstram a alta capacidade da técnica de OCT para o diagnóstico de cárie. Entretanto há poucos estudos visando o diagnóstico de erosão dentária ¹³⁻¹⁵. As lesões de cárie e erosão dentária surgem por conta do pH ácido no ambiente oral. No entanto, ao contrário da erosão dentária, a cárie necessita da presença de biofilme e microorganismos para ocorrer. Esta técnica foi utilizada neste trabalho para determinar o índice de refração e o coeficiente de atenuação óptica de esmalte e dentina bovinos irradiados com laser de Nd:YAG.

Já a espectroscopia Raman é uma técnica que pode ser utilizada para caracterizar quimicamente uma amostra. Trata-se de uma técnica óptica que usa uma fonte monocromática de luz a qual, ao atingir um objeto, é espalhada por ele, gerando luz de mesma energia (espalhamento elástico) ou de energia diferente da energia incidente (espalhamento inelástico). Então a diferença entre as frequências de luz incidida e espalhada corresponde a energia com que os átomos presentes no material estão vibrando, o que permite identificar as espécies químicas presentes, ter a informação de como interagem entre si, como os seus átomos estão ligados e também sobre a geometria molecular¹⁶. Com esta técnica foi possível analisar as diferenças químico-estruturais entre tecidos duros dentais bovinos irradiados e não irradiados com laser de Nd:YAG.

O MEV permite que a morfologia do tecido seja avaliada, neste caso, foi utilizada para avaliar os efeitos causados pela irradiação com *laser* nos tecidos duros dentais.

Dessa forma, o objetivo deste trabalho consistiu em determinar parâmetros seguros de irradiação através da análise da variação de temperatura superficial e pulpar e além disso caracterizar os tecidos duros dentais ópticamente,

quimicamente e morfológicamente através das técnicas de OCT e Espectroscopia Raman e MEV.

Este trabalho foi desenvolvido para que se pudesse conhecer as propriedades ópticas de tecidos duros dentais irradiados, o que é de suma importância pois assim será possível tornar os métodos ópticos de prevenção ou tratamento e de diagnóstico cada vez mais precisos e eficazes.

Além disso, é inédito o estudo sobre índice de refração (parâmetro importante para um diagnóstico eficiente) de tecidos duros dentais irradiados com *lasers* de Nd:YAG.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Caracterizar os tecidos duros dentais esmalte e dentina irradiados com *lasers* de Nd:YAG de acordo com suas propriedades óptica, composicional e morfológica.

2.1.1 Objetivos específicos

- a. Determinar a variação de temperatura superficial e pulpar do tecido duro dental humano durante a irradiação com os *lasers* de Nd:YAG.
- b. Avaliar a variação de cor do tecido duro dental após a irradiação com os *lasers* de com dois fotoabsorvedores diferentes.
- c. Caracterizar morfológicamente os tecidos duros dentais bovinos irradiados com os *lasers* de Nd:YAG e dois fotoabsorvedores diferentes
- d. Determinar o índice de refração de tecidos duros dentais bovinos irradiados com os dois *lasers* e dois fotoabsorvedores diferentes.
- e. Calcular coeficiente de atenuação óptica de tecidos duros dentais bovinos após tratamentos e posteriormente ao protocolo de desmineralização.
- f. Avaliar a variação da composição química dos tecidos duros dentais bovinos irradiados.

3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL GERAL

Este estudo *in vitro* randomizado foi dividido em 5 etapas que serão descritas nos próximos capítulos. Na Tabela 2 observa-se o delineamento experimental do estudo completo.

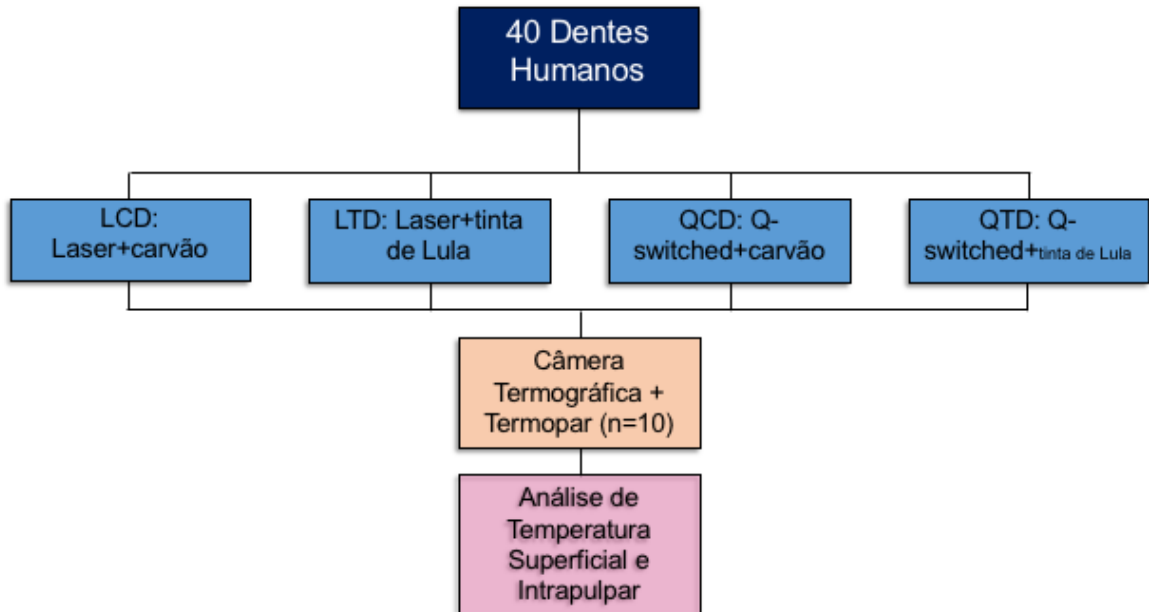
Tabela 2 – Delineamento experimental do estudo.

Fatores em estudo	
Fotoabsorvedor	<ul style="list-style-type: none"> • Tinta de lula • Carvão
Largura temporal de pulso do <i>laser</i> Nd:YAG	<ul style="list-style-type: none"> • μs • ns
Tecido	<ul style="list-style-type: none"> • Esmalte bovino • Dentina bovina <hr/> <ul style="list-style-type: none"> • Esmalte humano • Dentina humana
Unidades experimentais	<ul style="list-style-type: none"> • Blocos/fatias de esmalte e dentina radicular bovinos • Dentes humanos
Variáveis resposta	Variação de temperatura superficial: °C Variação de temperatura pulpar: °C Variação de cor Morfologia superficial Transmitância Índice de refração Coeficiente de atenuação óptica: μm^{-1} Variação composicional

Fonte: Autora da tese.

Na Figura 3 é mostrado um fluxograma do delineamento experimental da etapa de análise de temperatura, parte do estudo realizada com dentes humanos.

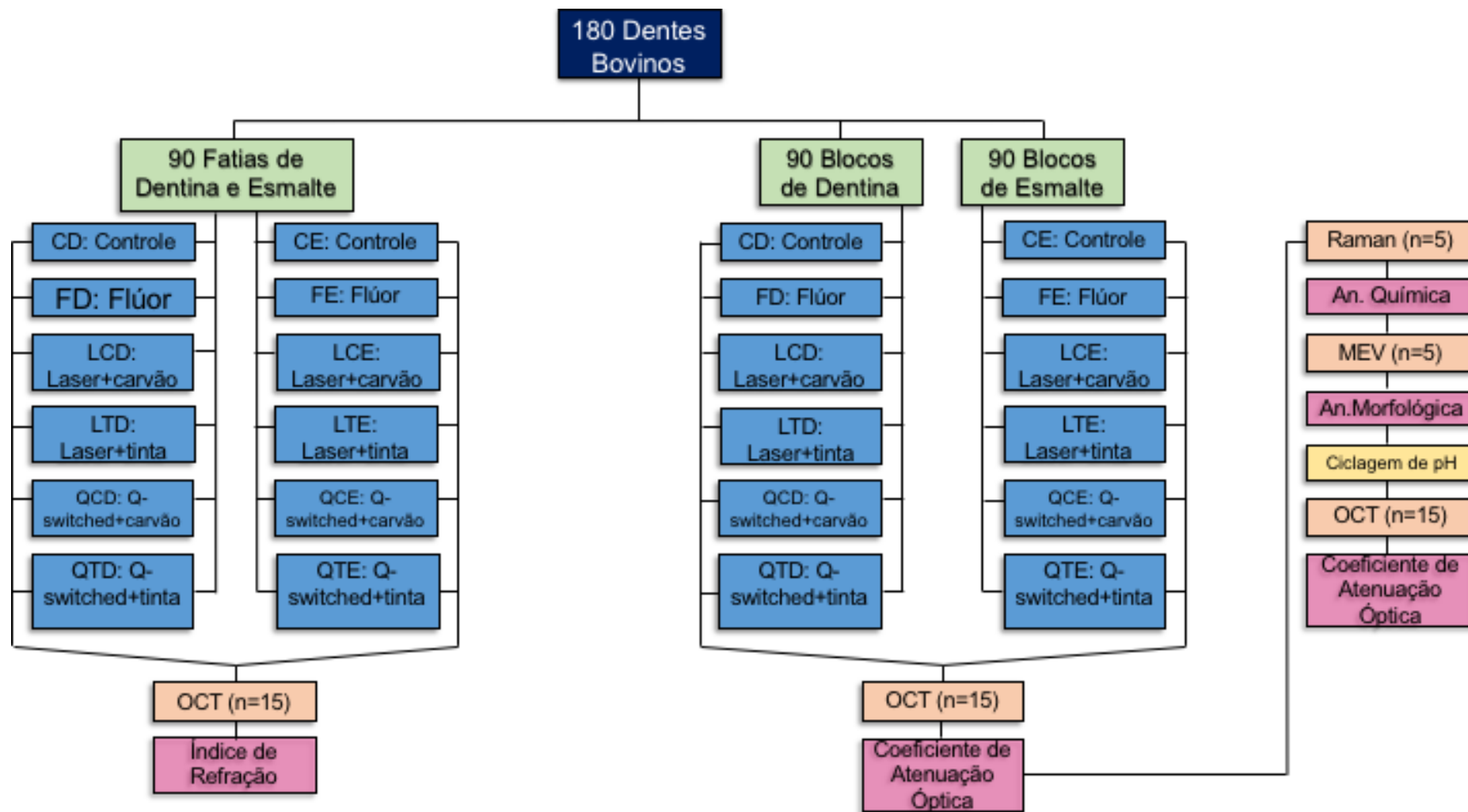
Figura 3- Fluxograma delineamento experimental das etapas que utilizaram tecidos duros dentais humanos.



Fonte: Autora da tese.

Já na Figura 4 pode-se observar o fluxograma das demais etapas do estudo, realizadas com a utilização de dentes bovinos.

Figura 4- Fluxograma delineamento experimental das etapas que utilizaram tecidos duros dentais bovinos.



Fonte: Autora da tese.

4 AVALIAÇÃO DE NOVO FOTOABSORVEDOR PARA LASERS DE Nd:YAG

4.1 Introdução

Neste capítulo serão descritos os métodos de determinação dos parâmetros seguros e eficientes para a irradiação com os *lasers* de Nd:YAG utilizados nesse trabalho.

Os efeitos térmicos decorrentes da irradiação com *lasers* de alta potência em tecidos biológicos são de extrema importância e devem ser considerados para a segurança no seu uso. O aumento na temperatura de um tecido promove algumas mudanças em sua estrutura, como desnaturação de proteínas, evaporação de água, coagulação, entre outros efeitos¹⁷. Como citado no capítulo anterior, nos tecidos duros dentais, o aumento de temperatura pode alterar as características cristalográficas da matriz mineral, como alteração da rede cristalina, do tamanho dos cristais de hidroxiapatita e também pode haver a formação de novos compostos⁴. Por isso, para estabelecer protocolos seguros e eficazes deve-se considerar a variação de temperatura esperada durante a irradiação com laser.

O calor gerado dentro do tecido decorrente da irradiação com laser está diretamente relacionado às propriedades ópticas do tecido, como os coeficientes de absorção e espalhamento¹⁸. Além disso, a transferência de calor depende de algumas propriedades dos tecidos biológicos, tais como difusividade térmica e condutividade térmica¹⁰. Além disso, devem ser considerados parâmetros como comprimento de onda, densidade de energia, potência de emissão, potência pico, potência média, taxa de repetição e duração do pulso na determinação da geração de calor devido à irradiação em qualquer tecido biológico.

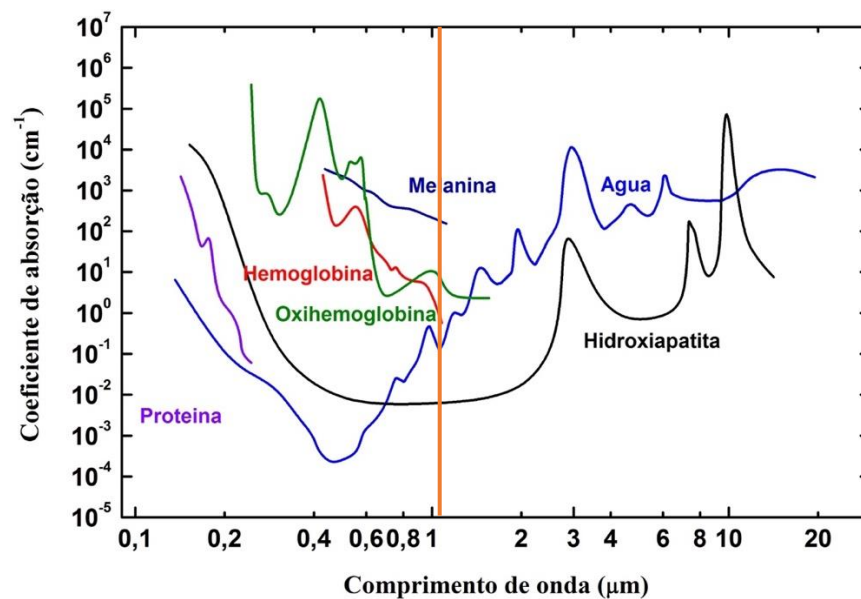
Para garantir a segurança do protocolo de irradiação com laser de Nd:YAG utilizado neste trabalho e assegurar a possibilidade de que seja aplicado futuramente *in vivo*, foram realizados estudos de variação de temperatura superficial e pulpar durante a irradiação.

Outro fator importante é a interação do comprimento de onda do laser utilizado com os cromóforos dos tecidos biológicos, tendo em vista essa questão é

possível observar que nas regiões do espectro eletromagnético ($\lambda < 400$ nm- ultravioleta e $\lambda > 1500$ nm- infravermelho) a absorção influencia mais do que o espalhamento e a penetração da luz se limita a poucos micrometros do tecido; na região do visível ($\lambda = 400-600$ nm), a absorção e o espalhamento ocorrem ao mesmo tempo e a luz penetra em uma profundidade que pode variar entre 0,5 e 2,5 mm; por fim na região do vermelho para o infravermelho próximo ($\lambda = 600-1500$ nm), o espalhamento prevalece sobre a absorção e a luz pode penetrar em uma profundidade entre 8 e 10 mm¹⁹.

O laser de Nd:YAG, utilizado neste trabalho, tem comprimento de onda de 1064 nm e está na região do infravermelho, como pode ser observado na Figura 5. O principal cromóforo do tecido duro dental é a hidroxiapatita e observa-se que na região do laser de Nd:YAG o valor do coeficiente de absorção deste é baixo, isso significa que durante a irradiação de esmalte ou dentina com este laser haverá alta penetração no tecido e possível aumento da temperatura pulpar além do limite de manutenção da vitalidade pulpar que é um aumento de temperatura maior do que 5,5°C. Além disso, os efeitos desejados de alteração química e morfológica podem não acontecer ou podem se dar de forma não uniforme.

Figura 5- Coeficientes de absorção dos principais cromóforos de tecidos biológicos com destaque em laranja para o laser de Nd:YAG ($\lambda = 1064$ nm).



Fonte: Adaptado de Zezell *et al*, 2007¹⁹.

Para solucionar este problema deve-se restringir a penetração do fóton e, com isso, manter o calor apenas na superfície do esmalte (poucos micrometros). Assim se faz necessário o uso de fotoabsorvedores que interajam adequadamente com o comprimento de onda do laser em questão. A literatura preconiza que se utilize uma pasta de carvão como fotoabsorvedor ²⁰, no entanto, dentistas que atuam na parte clínica relatam que há escurecimento do elemento dental após a irradiação e o resultado final não é esteticamente viável e conseqüentemente há baixa adesão ao tratamento por parte dos pacientes. Na busca de novos fotoabsorvedores para esta aplicação, foi encontrada a tinta de lula. Essa substância é bastante utilizada na culinária e foi estudada neste trabalho em comparação à pasta de carvão no âmbito da avaliação de temperatura intrapulpal e superficial durante a irradiação, no seu conteúdo de flúor e na variação de cor do tecido pós irradiação.

Para finalizar, foi feita a avaliação morfológica utilizando a técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura dos tecidos após a irradiação com ambos fotoabsorvedores.

4.2 Material e Métodos

4.2.1 Avaliação de temperatura superficial e pulpar durante a irradiação

Após aprovação do presente projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do ABC (CAAE 49456715.0.0000.5594, número do parecer 1.334.133), foram obtidos 40 dentes incisivos inferiores humanos através de doação de pacientes que passaram por exodontias por motivos alheios a este trabalho.

Esses dentes foram lavados com água corrente e detergente aniônico, e foi feita raspagem ultrassônica e profilaxia com pedra-pomes e água para a remoção de seus indutos orgânicos. Até o momento dos experimentos, as amostras foram mantidas em ambiente úmido (em gaze estéril umedecida com água deionizada com timol a 0,1% e sob refrigeração a 4°C). A remoção de restos pulpares e limpeza completa de seus condutos radiculares e da câmara pulpar foi realizada por meio de limas endodônticas tipo K #80 e água destilada.

Em cada dente foi feito um acesso na região cervical até a câmara pulpar pela face lingual com brocas esféricas diamantadas #1012 em alta rotação para posterior inserção dos termopares.

Para esta etapa os dentes incisivos humanos foram divididos aleatoriamente em 4 grupos (n=10), conforme descrito a seguir:

- Grupo **LC**: Irradiado com fotoabsorvedor carvão e laser de Nd:YAG Power™ ST6 (Lares Research®, Estados Unidos) com potência de 0,6 W, taxa de repetição de 10 Hz, diâmetro do *spot* de 300 μm , energia de pulso de 60 mJ, densidade de energia de 84,9 J/cm^2 , duração de pulso de 120 μs . Cada amostra foi irradiada duas vezes, primeiramente na direção horizontal e depois na direção vertical com o intuito de fazer uma varredura na região de irradiação. Parâmetros utilizados de acordo com a literatura ²⁰.
- Grupo **LT**: Irradiado com fotoabsorvedor tinta de lula e mesmo laser e parâmetros utilizados no grupo LC.
- Grupo **QC**: Irradiado com fotoabsorvedor carvão e laser de Nd:YAG Q-Switched com potência de 4 W, taxa de repetição de 20 Hz, diâmetro de *spot* de 5 mm, energia de pulso de 200 mJ, densidade de energia de 1,05 J/cm^2 , duração de pulso de 5 ns. Parâmetros determinados através de estudo piloto.
- Grupo **QT**: Irradiado com fotoabsorvedor tinta de lula e mesmo laser e parâmetros utilizados no grupo QC.

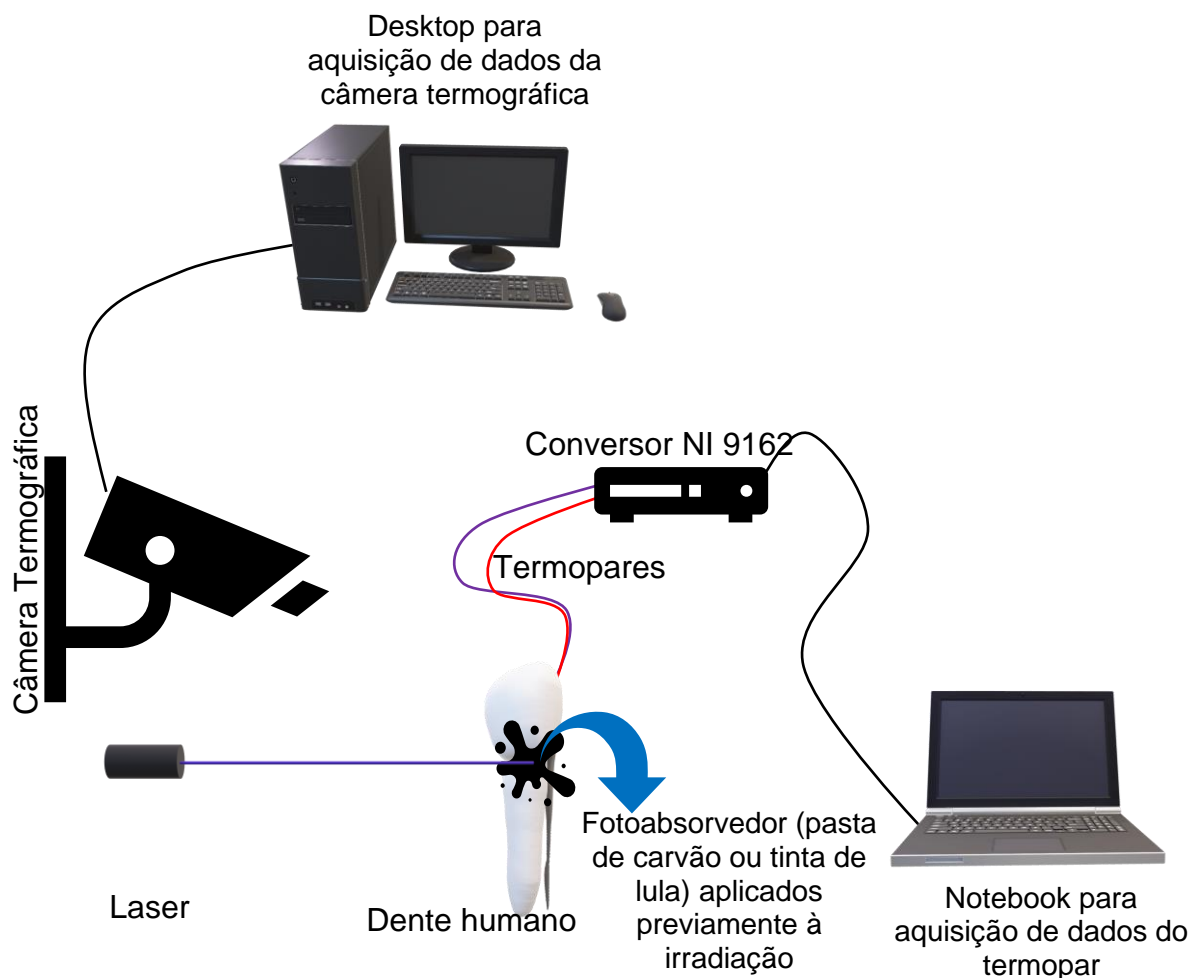
Para a aquisição da temperatura superficial foi utilizada uma câmera termográfica (ThermaCam FLIR SC3000, USA) posicionada em frente à amostra a uma distância focal de 10 cm e conectada a um computador com *software* ThermaCam (FLIR Systems, USA). No momento das medidas a temperatura ambiente e umidade relativa do ar foram mantidos estáveis e o valor considerado para a emissividade do dente foi 0,91 ²¹.

Nas medidas de temperatura pulpar foram inseridos termopares de resposta rápida na câmara pulpar pelos orifícios feitos na face lingual dos dentes. Os termopares são do tipo K (chromel-alumel – NiCr-NiAl, Omega Eng. Inc., USA) com

espessura de $127 \mu\text{m}$ e resolução de $0,2^\circ\text{C}$. Anteriormente a inserção dos termopares a câmara pulpar foi preenchida com pasta térmica (Implastec, Votorantim, Brasil) de condutividade térmica equivalente a $0,4 \text{ cal s}^{-1} \text{ m}^{-1} \text{ K}^{-1}$. Para aquisição dos dados foi utilizado um conversor de sinais NI 9162 (National Instrument, USA) conectado a um notebook com o *software* NI-DAQmx.

Foram feitas duas irradiações (Irradiação 1 e Irradiação 2) na região de interface entre coroa e raiz do dente humano com aplicação prévia de fotoabsorvedor. Nos grupos LC e LT, a irradiação foi feita no modo contato e manualmente em forma de varredura. Nos grupos QC e QT a amostra foi posicionada de forma que o feixe de laser atingisse a região de interesse. O esquema de montagem do experimento pode ser observado na Figura 6.

Figura 6- Esquema de montagem do experimento de análise de temperatura utilizando câmera termográfica e termopar.



Fonte: Autora da tese.

4.2.2 Avaliação da concentração de flúor nos fotoabsorvedores

Nesta etapa foram avaliadas as concentrações de flúor dos fotoabsorvedores para analisar a influencia do flúor presente nessas substâncias no processo de desmineralização descrito no capítulo 6. Foram utilizadas amostras de pasta de carvão e amostras de tinta de lula de composição descrita a seguir:

- Pasta de carvão: composta por carvão triturado (partículas com diâmetro de $\pm 10 \mu m$) diluído em partes iguais de água deionizada e etanol 99%. Essa mistura resulta em uma pasta de consistência fluida.
- Pasta de tinta de lula: composta por tinta de lula comercial de uso culinário diluída em partes iguais de água deionizada e etanol 99%. Essa mistura resulta em uma pasta de consistência fluida.

Foram medidas as concentrações de flúor dos fotoabsorvedores carvão e tinta de lula utilizando-se eletrodo íon seletivo de flúor (Thermo Orion, Estados Unidos). Este eletrodo fornece a informação de diferença de potencial (ddp) entre a solução contida no eletrodo e a solução que está sendo medida, a ddp é dada no equipamento em mV (milivolts). Essa ddp tem relação logarítmica com a concentração do flúor em análise.

A relação linear entre $\log[F]$ e ΔmV foi determinada através da construção de uma curva de calibração com a leitura de soluções de concentrações conhecidas de flúor de 0,125 ppm; 0,25 ppm; 0,5 ppm; 1,0 ppm; 2,0 ppm; 4,0 ppm; 8,0 ppm e 16 ppm^{6,22}. Assim, pode-se expressar a função linear pela equação 1, descrita abaixo:

$$\log[F] = a + b(mV) \quad (1)$$

Onde, $[F]$ é a concentração de flúor; a é o coeficiente linear da reta (curva de calibração) e b é o coeficiente angular.

Assim, o cálculo da concentração de flúor em ambos fotoabsorvedores foi feito utilizando-se a equação 1.

4.2.3 Análise da variação de cor pós irradiação com fotoabsorvedores

Para esta etapa do estudo foram utilizados 40 blocos de esmalte e 40 blocos de dentina bovinos. Esses blocos foram aleatoriamente distribuídos em 8 grupos experimentais (n=10), 4 grupos de dentina e 4 grupos de esmalte conforme descrito abaixo:

- Grupo **LCD**: Amostras de dentina bovina irradiadas com fotoabsorvedor carvão e laser de Nd:YAG Power™ ST6 (Lares Research®, Estados Unidos) com potência de 0,6 W, taxa de repetição de 10 Hz, *diâmetro do spot* de 300 µm, energia de pulso de 60 mJ, densidade de energia de 84,9 J/cm², duração de pulso de 120 µs.
- Grupo **LTD**: Amostras de dentina bovina irradiadas com fotoabsorvedor tinta de lula e mesmo laser utilizado no grupo LCD.
- Grupo **QCD**: Amostras de dentina bovina irradiadas com fotoabsorvedor carvão e laser de Nd:YAG Q-Switched com potência de 4 W, taxa de repetição de 20 Hz, diâmetro do spot de 5 mm, energia de pulso de 200 mJ, densidade de energia de 1,05 J/cm², duração de pulso de 5 ns.
- Grupo **QTD**: Amostras de dentina bovina irradiadas com fotoabsorvedor tinta de lula e mesmo laser utilizado no grupo QCD.
- Grupo **LCE**: Amostras de esmalte bovino irradiadas com fotoabsorvedor carvão e laser de Nd:YAG Power™ ST6 (Lares Research®, Estados Unidos) com potência de 0,6 W, taxa de repetição de 10 Hz, *diâmetro do spot* de 300 µm, energia de pulso de 60 mJ, densidade de energia de 84,9 J/cm², duração de pulso de 120 µs.

- Grupo **LTE**: Amostras de esmalte bovino irradiadas com fotoabsorvedor tinta de lula e mesmo laser utilizado no grupo LCE.
- Grupo **QCE**: Amostras de esmalte bovino irradiadas com fotoabsorvedor carvão e laser de Nd:YAG Q-Switched com potência de 4 W, taxa de repetição de 20 Hz, diâmetro do spot de 5 mm, energia de pulso de 200 mJ, densidade de energia de 1,05 J/cm², duração de pulso de 5 ns.
- Grupo **QTE**: Amostras de esmalte bovino irradiadas com fotoabsorvedor tinta de lula e mesmo laser utilizado no grupo QCE.

Antes de iniciar a irradiação dos grupos LCD, LCE, QCD e QCE, grupos que fazem uso do carvão como fotoabsorvedor, as amostras foram recobertas por uma pasta composta por carvão vegetal finamente triturado diluído em etanol e água deionizada na proporção de 1:1. A aplicação da pasta de carvão foi feita em toda a superfície da amostra formando uma camada homogênea com auxílio de um microbrush (KG Sorensen, Brasil). Também antes de iniciar a irradiação dos grupos LTD, LTE, QTD e QTE, grupos que fazem uso da tinta de lula como fotoabsorvedor, as amostras foram recobertas por uma pasta composta por tinta de lula de uso culinário comercial diluída em etanol e água deionizada na proporção de 1:1. A aplicação da tinta de lula foi feita em toda a superfície da amostra formando uma camada homogênea com auxílio de um *microbrush* (KG Sorensen, Brasil).

As amostras dos grupos LCD, LTD, LCE e LTE foram irradiadas com o *laser* de Nd:YAG Power™ ST6 (Lares Research®, Estados Unidos) por contato e com a sobreposição dos pulsos em 50% utilizando o motor de passo com o objetivo de padronizar a irradiação. Ajustado conforme descrito acima ^{13,20}.

A potência real foi aferida utilizando-se um medidor de potência (Newport, Estados Unidos) a cada três amostras irradiadas.

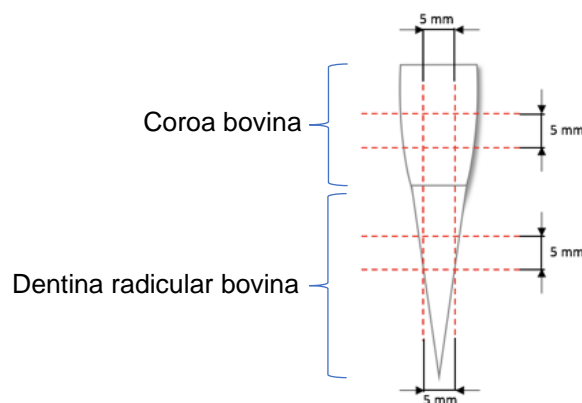
Enquanto as amostras dos grupos QCD, QTD, QCE e QTE foram irradiadas com o *laser Q-switched* Nd:YAG Brilliant Brill IR/10 (Quantel Laser, França), ajustado conforme protocolo obtido em experimento piloto prévio e descrito acima. Neste caso não foi utilizado o motor de passo pois o diâmetro do *spot* do laser foi suficiente para irradiar toda a superfície das amostras.

4.2.3.1 Preparo das amostras

Para esta etapa do estudo foram utilizados 40 dentes incisivos inferiores bovinos, obtidos em frigorífico após aprovação do presente projeto pela Comissão de Ética de uso Animal do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN/CNEN-SP nº 149/2014). Os dentes bovinos foram utilizados devido à sua maior disponibilidade em relação aos dentes humanos e também por não haver diferenças bioquímicas estatisticamente significativas em relação aos dentes humanos^{23,24}.

De cada coroa e raiz dental bovina foi obtido um bloco de 5 mm x 5 mm x 2 mm por meio de seccionamento com disco de corte diamantado sob refrigeração na cortadeira metalográfica (Accutom-5, Struers, Dinamarca). Para o seccionamento, o dente bovino foi colado a uma placa acrílica com cera pegajosa odontológica para prótese fixa (Kota®, Brasil). Os blocos obtidos foram polidos na politriz (Ecomet 250, Buehler, Alemanha) com lixas de granulação 300, 600, 1200 e 2000 (Buehler, Alemanha) até ficarem planos e com faces paralelas e também atingirem as medidas citadas acima para padronização do experimento, de acordo com o esquema da Figura 7.

Figura 7- Esquema de secção das amostras. Secção e polimento de blocos de 5 mm x 5 mm x 2mm das regiões da coroa e dentina radicular bovina.



Fonte: Autora da tese.

4.2.3.2 Avaliação da variação de cor pós irradiação

Nesta etapa, cada grupo foi avaliado antes e após a irradiação para comparar a pigmentação da amostra após a irradiação com os fotoabsorvedores carvão e tinta de lula. Foi utilizada uma câmera CCD para a aquisição das imagens antes e depois da irradiação. Para a análise das imagens foi utilizada uma metodologia baseada no espaço CIELAB, onde as cores podem ser definidas por Luminosidade (L), seu valor mínimo é 0 que representa o preto e seu valor máximo é 100 que representa uma superfície totalmente clara; coordenada **a**, onde **a** negativo é verde e **a** positivo é vermelho (coordenada **a** compreende o conteúdo de vermelho a verde) e coordenada **b**, onde **b** negativo é azul e **b** positivo é amarelo (coordenada **b** compreende o conteúdo de amarelo a azul). O significado geométrico das coordenadas $L^*a^*b^*$ pode ser observado na Figura 8.

Figura 8- Significado geométrico das coordenadas $L^*a^*b^*$.



Fonte: Adaptado de Hunterlab, 2012²⁵.

No espaço CIELAB é possível quantificar as diferenças em termos psicométricos de ΔL^* , Δa^* e Δb^* . As coordenadas ΔL^* , Δa^* e Δb^* representam as diferenças entre a amostra analisada e o padrão estabelecido. No caso deste trabalho a amostra analisada é a amostra irradiada e o padrão estabelecido é a mesma amostra antes da irradiação. Assim, a diferença de cor é dada pela equação ΔE^* descrita abaixo²⁶:

$$\Delta E^* = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2}$$

Onde, ΔE^* = diferença de cor entre amostra analisada e amostra padrão; ΔL^* = diferença de luminosidade entre amostra analisada e amostra padrão; Δa^* = diferença de conteúdo de vermelho a verde entre amostra analisada e amostra padrão e Δb^* = diferença de conteúdo de amarelo a azul entre amostra analisada e amostra padrão.

A aquisição das imagens foi feita utilizando-se uma câmera CCD científica MVBlueFox 121 C (Matrix Vision, Alemanha) com resolução de 1024 x 768, exposição de 8 ms, ganho de 29,7 dB e correções automáticas desabilitadas para preservar imagem original.

Assim, as imagens obtidas foram analisadas utilizando-se uma rotina elaborada no *software* Matlab que se utiliza de todas as componentes da equação ΔE^* . Como os fotoabsorvedores são escuros, foram encontradas diferenças significantes apenas na coordenada L que se refere a luminosidade.

Assim, para analisar os dados a componente L medida após a irradiação foi normalizada em relação a componente L medida antes da irradiação. E então as componentes L de cada grupo foram comparadas entre si de acordo como a análise estatística descrita em tópico abaixo.

4.2.4 Análise morfológica pós irradiação

Nesta etapa, foram avaliadas 3 amostras de cada grupo da etapa anterior. Para isso foi utilizado o Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) TM 3000 (Hitachi, Japão), o qual não demanda tratamento específico nas amostras para sua utilização.

4.2.5 Características de absorção dos fotoabsorvedores

Nesta etapa, foi feita a aquisição do espectro de transmitância dos fotoabsorvedores. A absorbância e a transmitância se relacionam de modo que, quando há 100% de absorção da luz pelo fotoabsorvedor a transmitância é 0 e quando a absorção é menor do que 100% a fração de luz que atravessa a solução é medida pela transmitância. Para isso, foram depositadas em lâminas de vidro a pasta de carvão e a tinta de lula e as medidas foram realizadas em um espectrofotômetro UV-Vis/NIR V-730 (Jasco do Brasil, Brasil).

4.2.6 Análise Estatística

Neste capítulo, as variáveis resposta analisadas foram: variação de temperatura superficial, variação de temperatura pulpar, variação de cor, morfologia superficial e transmitância (as duas últimas são análises qualitativas que não requerem análise estatística). As análises foram realizadas utilizando-se o *software* de estatística GraphPad Prism 6.0 para MAC OS X (GraphPad Software, Estados Unidos).

Para cada variável resposta foi realizada uma análise estatística diferente. Assim, para a seleção do teste estatístico mais apropriado para a análise em questão, primeiramente foram testadas as três pressuposições principais para validar uma possível análise de variância: independência, normalidade e homogeneidade de variâncias dos dados experimentais. A independência foi garantida pela forma que o experimento foi executado. A normalidade foi detectada utilizando-se o teste de Shapiro- Wilk com nível de significância de 5%. A homogeneidade foi avaliada pelo teste de D'Agostino & Pearson também com 5% para o nível de significância.

Na variável resposta variação de temperatura superficial foi detectada a distribuição não normal dos dados e então, utilizou-se o teste de Mann-Whitney para verificar a diferença entre os grupos com fotoabsorvedor carvão e fotoabsorvedor tinta de lula com nível de significância de 5%.

Na variável resposta variação de temperatura pulpar a distribuição dos dados foi não normal, o que levou a realização do teste estatístico não paramétrico Kruskal-Wallis *post hoc* Teste de Dunn com nível de significância de 5%.

Por fim, na análise da variável resposta variação de cor foi verificada a distribuição não normal dos dados de todos os grupos e utilizou-se o teste de Mann-Whitney para verificar a diferença entre os grupos com fotoabsorvedor carvão e fotoabsorvedor tinta de lula com nível de significância de 5%.

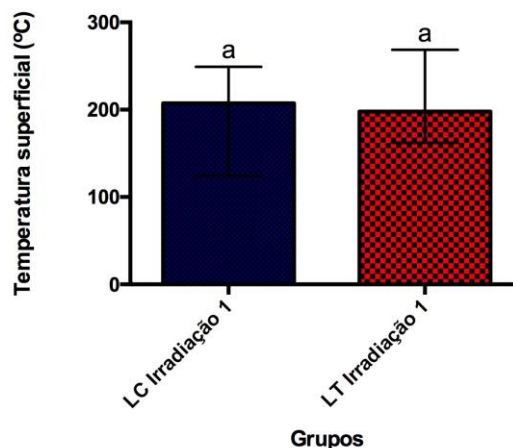
4.3 Resultados e Discussão

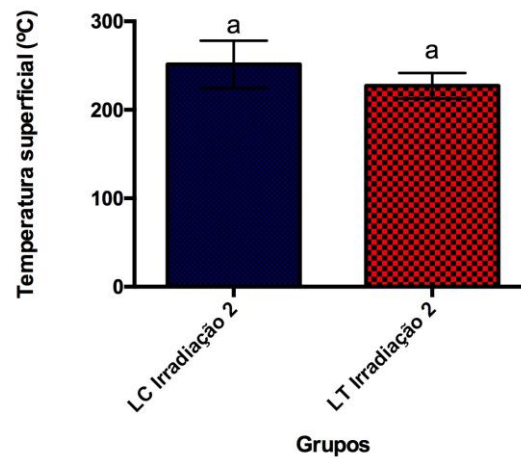
4.3.1 Avaliação de temperatura superficial e pulpar

A temperatura superficial das amostras dos grupos LC e LT foi medida e observou-se que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos, indicando que o efeito dos dois fotoabsorvedores utilizados é semelhante (Figura 9). A superfície de todas as amostras atingiu temperaturas maiores do que 200°C, nessa temperatura pode-se observar desnaturação de proteínas e eliminação de carbonato. Essas modificações químicas promovem maior resistência do tecido duro dental aos ácidos⁴.

Figura 9 – Temperatura superficial após irradiação com laser de Nd:YAG com os fotoabsorvedores carvão e tinta de lula. A- Primeira irradiação e B- Segunda irradiação. O gráfico é representado pela mediana e suas barras de erro são o interquartil. Letras iguais indicam que não houve diferença estatisticamente significativa.

A Temperatura Superficial pós irradiação com laser de Nd:YAG

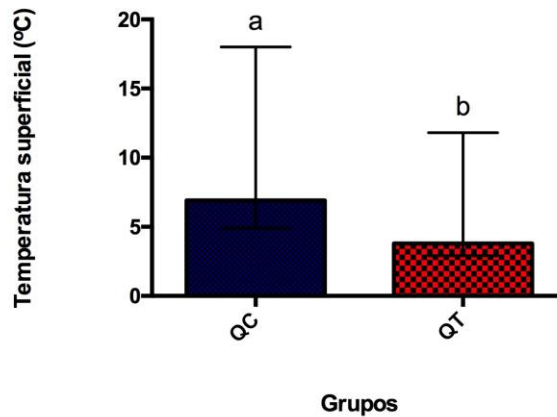


B Temperatura Superficial pós irradiação com laser de Nd:YAG

Já na Figura 10 pode-se observar a temperatura atingida pela superfície do tecido durante a irradiação com laser Q-switched. Foram observadas temperaturas abaixo de 10°C para os grupos QC e QT, no entanto, era esperado um aumento de temperatura muito maior do que o observado.

Figura 10- Temperatura superficial após irradiação com laser Q-switched com os fotoabsorvedores carvão e tinta de lula.

Temperatura Superficial pós irradiação com laser Q-switched



Os resultados de temperatura superficial para os grupos QC e QT foram inconclusivos possivelmente porque a frequência de captação da câmera não foi suficiente para detectar o aquecimento causado por um laser com pulsos de nanossegundos.

O aquecimento da superfície irradiada pelo laser de Nd:YAG atingiu a temperatura de aproximadamente 251,3°C em LC e 227,1°C em LT. E com o laser Q-switched em QC foi detectado uma temperatura média de 9,66°C e em QT de 5,34°C. Essas temperaturas, apesar de muito inferiores à temperatura de fusão do tecido no caso do laser de Nd:YAG sugere-se que foram suficientes para reduzir o teor de carbonato e água tornando o tecido duro dental menos solúvel em ambiente de pH ácido ^{4,8}.

A câmera termográfica utilizada neste trabalho adota um sistema de espelho elíptico com um detector de HgCdZnTe e possui resolução temporal de 1 μ s. Considerando que a largura de pulso do laser de Nd:YAG é de 120 μ s e do Q-switched é de 5 ns, os picos de temperatura promovidos pela irradiação vão surgir após dezenas de microssegundos o que impede a detecção do pico da temperatura por esse sistema⁶.

A seguir, os resultados para a variável resposta temperatura pulpar com fator de variação tratamento. Na Figura 11 é possível observar a comparação das temperaturas pulpares entre os grupos LC, LT, QC e QT.

Tabela 3, é possível observar a estatística descritiva do grupo de dados. Na Figura 11 é possível observar a comparação das temperaturas pulpares entre os grupos LC, LT, QC e QT.

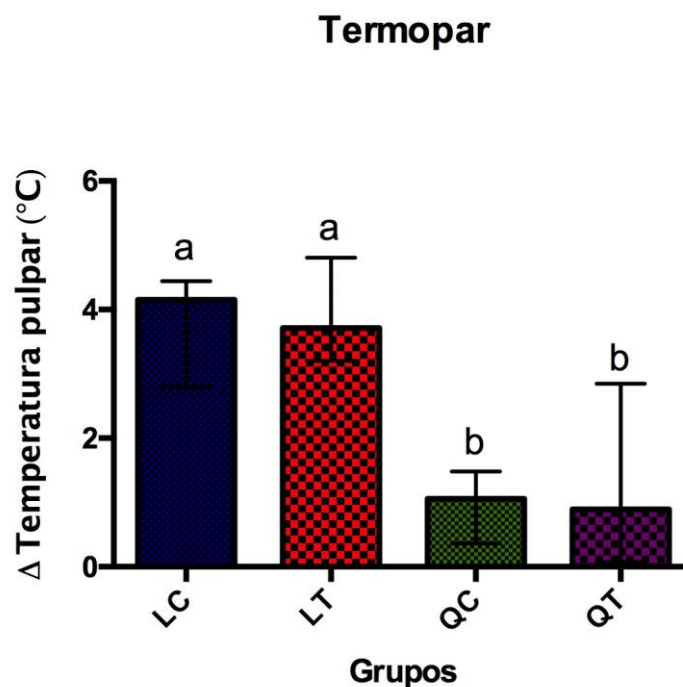
Tabela 3- Estatística descritiva para a variável resposta temperatura pulpar nos diferentes tratamentos e condições de irradiação. Dados originais.

Grupo	Δ Temperatura pulpar ($^{\circ}\text{C}$)
LC	$3,72 \pm 1,03$
LT	$4,07 \pm 1,21$
QC	$2,01 \pm 2,90$
QT	$1,16 \pm 0,92$

Fonte: Autora da tese.

Na Figura 11 observa-se a comparação da elevação das temperaturas pulpares entre todos os grupos.

Figura 11- Elevação das temperaturas pulpares obtidas de acordo com os tratamentos e condições de irradiação. Letras distintas indicam medianas estatisticamente diferentes de acordo com o teste de Kruskal-Wallis.



Fonte: Autora da tese.

Na Figura 11 pode-se observar que não há diferença estatisticamente significativa entre os grupos LC e LT que foram irradiados com o mesmo *laser* (Nd:YAG com pulso de microssegundos) e sob as mesmas condições de irradiação, diferem apenas no fotoabsorvedor utilizado. Na Figura 11 é possível

observar a comparação das temperaturas pulpares entre os grupos LC, LT, QC e QT.

Tabela 3 observa-se que o valor atingido de aumento de temperatura na polpa dental é menor que 5,6°C (LC- 3,72°C e LT- 4,07°C), o que indica que os parâmetros de irradiação utilizados neste trabalho são seguros para que não ocorra necrose pulpar^{27,28}. A partir desse resultado pode-se dizer também que ambos fotoabsorvedores não interferem na elevação da temperatura pulpar durante a irradiação.

Ainda na Figura 11 observa-se que também não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos QC e QT, os quais foram irradiados com o laser de Nd:YAG com pulso de nanossegundos sob as mesmas condições de irradiação com fotoabsorvedores diferentes. O aumento da temperatura da polpa dental desses grupos também pode ser considerado seguro^{27,28} e foi menor do que dos grupos LC e LT (QC- 2,01°C e QT- 1,16°C), havendo diferença estatisticamente significativa entre eles. Mais uma vez pode-se afirmar que os fotoabsorvedores não influenciaram no resultado da elevação da temperatura pulpar durante a irradiação.

4.3.2 Fotoabsorvedores: Análise de flúor fracamente ligado

A concentração de flúor nos fotoabsorvedores deste estudo foi avaliada e corroborando a literatura⁶ foi encontrada a concentração de $0,03 \pm 0,01 \mu\text{g F}^-/\text{mL}$ para o carvão e $3,92 \pm 0,32 \mu\text{g F}^-/\text{mL}$ para a tinta de lula. Observa-se que a concentração de flúor na tinta de lula é aproximadamente 130 vezes maior do que no carvão. Esse resultado indica que o uso da tinta de lula como fotoabsorvedor na irradiação com laser de Nd:YAG pode tornar o tecido duro dental ainda mais resistente a ação de ácidos por conta da ação do flúor. A associação entre flúor e laser é bastante positiva e potencializa o efeito ácido-resistente do tecido dental pós irradiação pois aumenta a disponibilidade de flúor, que por sua vez, é capaz de inibir ou paralisar uma lesão^{13,29-32}.

4.3.3 Avaliação da variação de cor pós irradiação

A seguir, os resultados para a variável resposta variação de cor com fator de variação tratamento. Os dados da componente luminosidade obtidos das amostras após as irradiações foram normalizados em relação às suas amostras controle (sem tratamento) para que os grupos pudessem ser comparados. Na Tabela 4, é possível observar a estatística descritiva do grupo de dados.

Tabela 4- Estatística descritiva para a variável resposta variação de cor nos diferentes tratamentos e condições de irradiação. Dados originais.

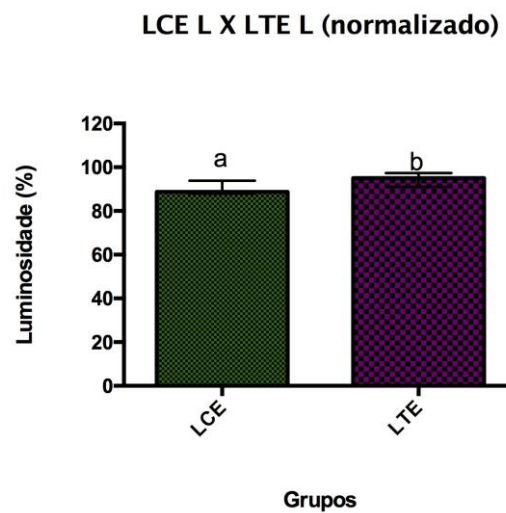
Grupo	Mediana	Mínimo	Máximo
LCD	88,79	87,92	93,84
LTD	95,01	91,02	97,34
QCD	87,81	86,46	93,39
QTD	91,68	90,78	92,59
LCE	90,49	84,98	98,53
LTE	92,60	85,60	99,90
QCE	90,24	87,32	95,70
QTE	96,25	93,36	100

Fonte: Autora da tese.

Foi feito o teste de normalidade dos dados Shapiro Wilk que detectou uma distribuição não normal. Então foi feito o teste estatístico não paramétrico Mann-Whitney para comparar os grupos com as mesmas condições de irradiação porém com fotoabsorvedores diferentes.

Na Figura 12 pode-se observar a comparação da componente luminosidade após a irradiação entre os grupos LCE e LTE. O grupo LTE apresentou maior porcentagem de luminosidade estatisticamente significativa ($p < 0,0001$) em relação ao grupo LCE. Assim, pode-se dizer que o uso do fotoabsorvedor tinta de lula causa menos escurecimento do esmalte dental bovino do que o carvão sob as condições de irradiação descritas previamente neste trabalho.

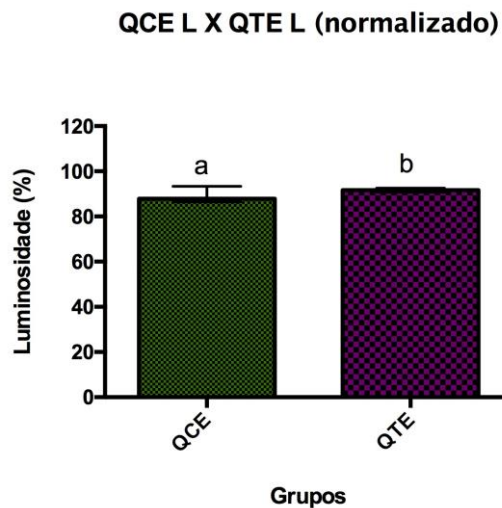
Figura 12- Luminosidade, em porcentagem, obtida para os grupos de esmalte bovino irradiados com o laser de Nd:YAG com os fotoabsorvedores carvão e tinta de lula. As barras indicam intervalo de dados. Letras distintas evidenciam medianas estatisticamente diferentes de acordo com o teste de Mann-Whitney.



Fonte: Autora da tese.

Na Figura 13 pode-se observar a comparação da componente luminosidade após a irradiação entre os grupos QCE e QTE. O grupo QTE apresentou maior porcentagem de luminosidade estatisticamente significativa ($p=0,0047$) em relação ao grupo QCE. Assim, pode-se dizer que o uso do fotoabsorvedor tinta de lula causa menos manchamento do esmalte dental bovino do que o carvão sob as condições de irradiação descritas previamente neste trabalho.

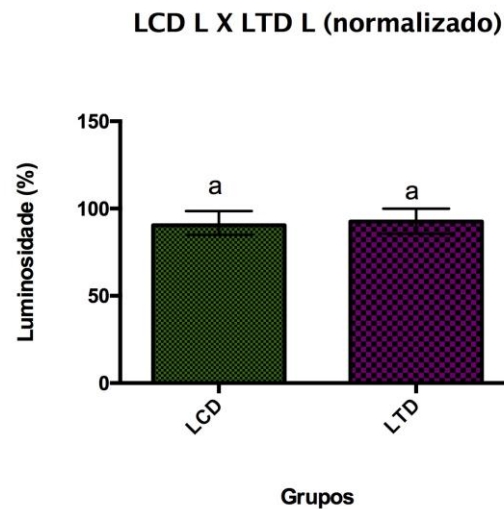
Figura 13- Luminosidade, em porcentagem, obtida para os grupos de esmalte bovino irradiados com o laser Q-Switched Nd:YAG com os fotoabsorvedores carvão e tinta de lula. As barras indicam intervalo de dados. Letras distintas evidenciam medianas estatisticamente diferentes de acordo com o teste de Mann-Whitney.



Fonte: Autora da tese.

Na Figura 14 pode-se observar a comparação da componente luminosidade após a irradiação entre os grupos LCD e LTD, a qual não apresentou diferença estatisticamente significativa ($p=0,1046$). Assim, pode-se dizer que o uso de ambos fotoabsorvedores tinta de lula e carvão causam manchamento similar na dentina bovina sob as condições de irradiação descritas previamente neste trabalho. Isso pode ter ocorrido devido à porosidade da dentina bovina, por ser um tecido composto por microtubulos as soluções de fotoabsorvedor podem ficar aderidas ao tecido.

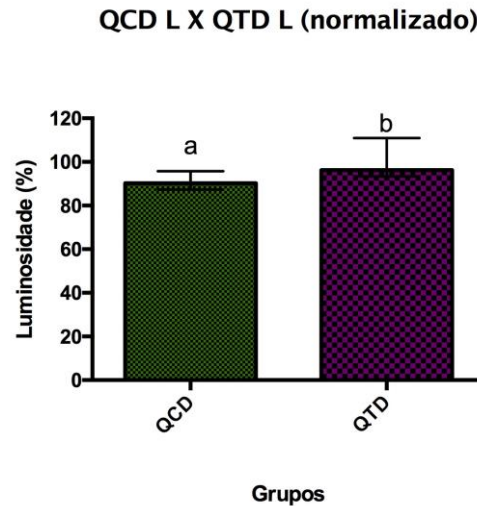
Figura 14- Luminosidade, em porcentagem, obtida para os grupos de dentina bovino irradiados com o laser de Nd:YAG com os fotoabsorvedores carvão e tinta de lula. As barras indicam intervalo de dados. Letras distintas evidenciam medianas estatisticamente diferentes de acordo com o teste de Mann-Whitney.



Fonte: Autora da tese.

Na Figura 15 pode-se observar a comparação da componente luminosidade após a irradiação entre os grupos QCD e QTD. O grupo QTE apresentou maior porcentagem de luminosidade estatisticamente significativa ($p < 0,0001$) em relação ao grupo QCE. Assim, pode-se dizer que o uso do fotoabsorvedor tinta de lula causa menos manchamento da dentina bovina do que o carvão sob as condições de irradiação descritas previamente neste trabalho.

Figura 15- Luminosidade, em porcentagem, obtida para os grupos de dentina bovino irradiados com o laser Q-Switched Nd:YAG com os fotoabsorvedores carvão e tinta de lula. As barras indicam intervalo interquartil. Letras distintas evidenciam medianas estatisticamente diferentes de acordo com o teste de Mann-Whitney.



Fonte: Autora da tese.

De acordo com os resultados obtidos acima pode-se dizer que o fotoabsorvedor tinta de lula causa menos escurecimento na superfície dental do que o fotoabsorvedor carvão. Esse fenômeno talvez ocorra porque o carvão é um pó de partículas pequenas que não se dissolvem na sua totalidade quando misturadas à solução de água e álcool e durante a irradiação talvez essas partículas fiquem presas ao tecido derretido por ocorrência do aumento de temperatura.

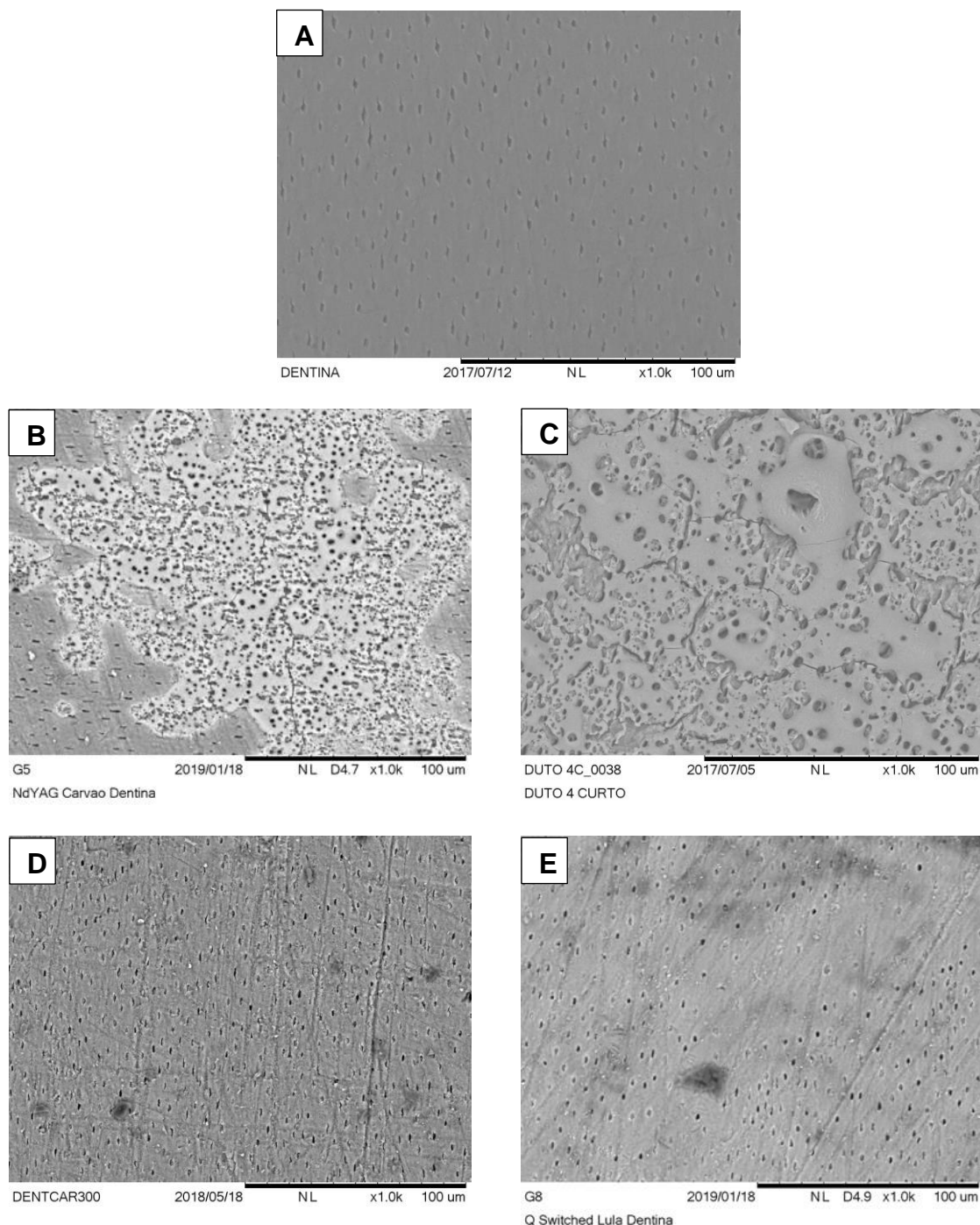
Portanto, pode-se concluir que a tinta de lula causa menos escurecimento nos tecidos duros dentais do que o carvão e de acordo com essa avaliação poderia ser utilizada em substituição ao carvão como fotoabsorvedor para irradiação com laser de Nd:YAG.

4.3.4 Análise morfológica pós irradiação

Nesta etapa do trabalho foi possível analisar a morfologia da amostra representativa dos grupos experimentais de dentina com irradiação *laser* e também da amostra hígida através das micrografias eletrônicas mostradas a seguir. Na Figura 16 é possível observar em (A) a micrografia de uma dentina hígida onde é possível observar os túbulos dentinários abertos e em (B) a micrografia que

representa o grupo LCD, onde é possível observar que houve *melting* (derretimento devido ao aquecimento promovido pelo *laser* e imediata ressolidificação). Em (C) na micrografia que representa o grupo LTD se observa que o *melting* é mais uniforme na superfície dentinária comparando-se a LCD. Já em (D) e (E), são mostradas as micrografias das amostras representativas dos grupos irradiados com o *laser Q-switched* (QCD e QTD), nessas imagens é possível observar que a irradiação não alterou a morfologia do tecido (A).

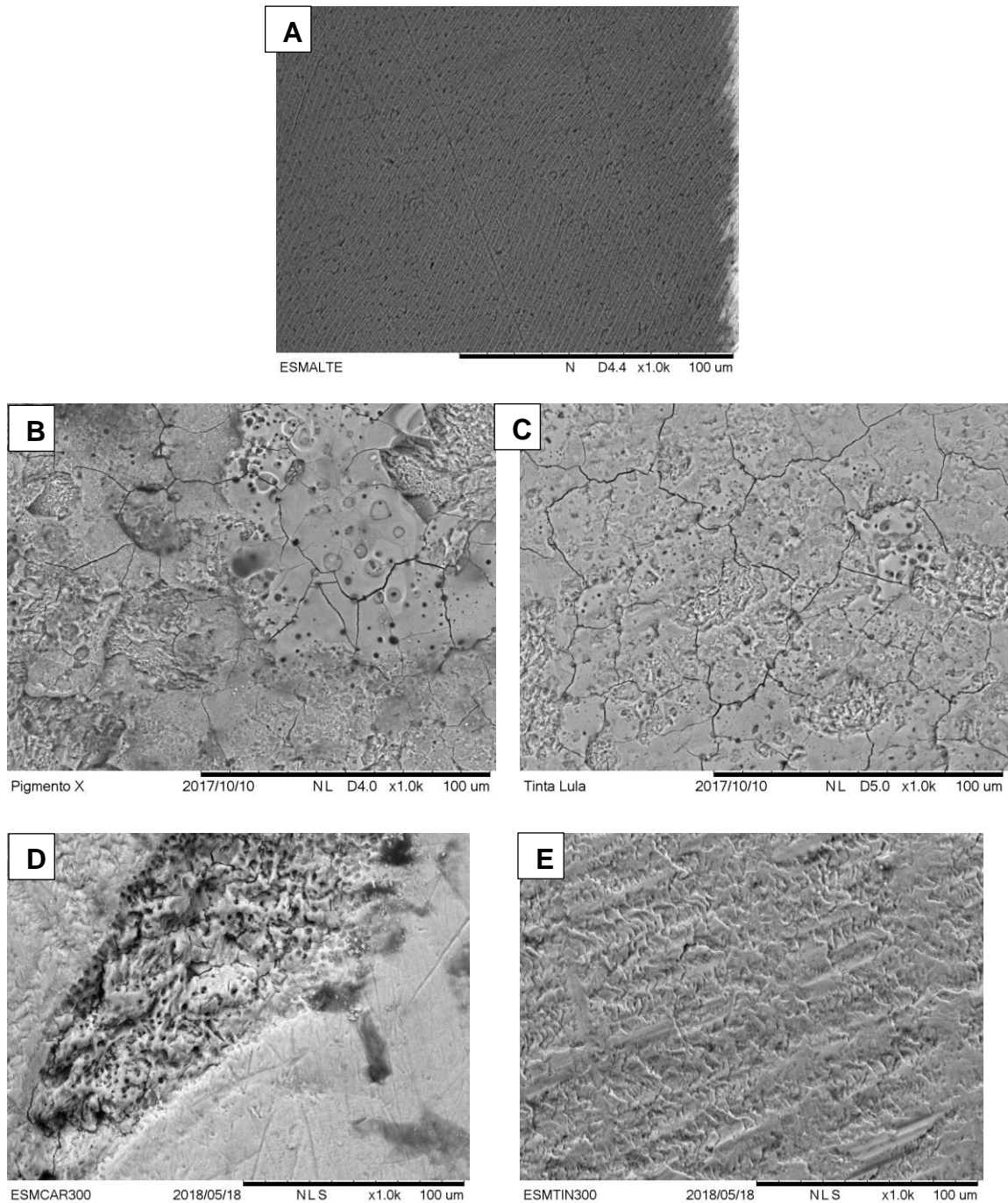
Figura 16- Micrografias eletrônicas obtidas por microscopia eletrônica de varredura de dentina bovina após os diferentes tratamentos aplicados. (A) Dentina Controle (B) Grupo LCD; (C) Grupo LTD (D) Grupo QCD e (E) Grupo QTD. Aumento original = 1000 X.



Na Figura 17 são mostradas as micrografias eletrônicas das amostras de esmalte representativas dos grupos irradiados assim como da amostra hígida. Em (A) observa-se o esmalte hígido com seus prismas evidenciados. Em (B) no grupo LCE observa-se uma mudança na morfologia, aparentemente ablação,

comparando-se com (A) decorrente do aquecimento promovido pela irradiação. Em (C) no grupo LTE foi utilizada a tinta de lula como fotoabsorvedor e é possível visualizar uma região muito parecida com (B) mas também alguns pontos de *melting*. Já em (D), no grupo QCE observou-se o comportamento morfológico de ablação e também *melting*, indicando que houve aquecimento naquela região promovido pelo laser Q-switched. Por fim, em (E) foi possível observar que o grupo QTE também apresentou comportamento morfológico que indica que houve ablação.

Figura 17- Micrografias eletrônicas obtidas por microscopia eletrônica de varredura de esmalte bovino após os diferentes tratamentos aplicados. (A) Esmalte Controle (B) Grupo LCE; (C) Grupo LTE (D) Grupo QCE e (E) Grupo QTE Aumento original = 1000X.



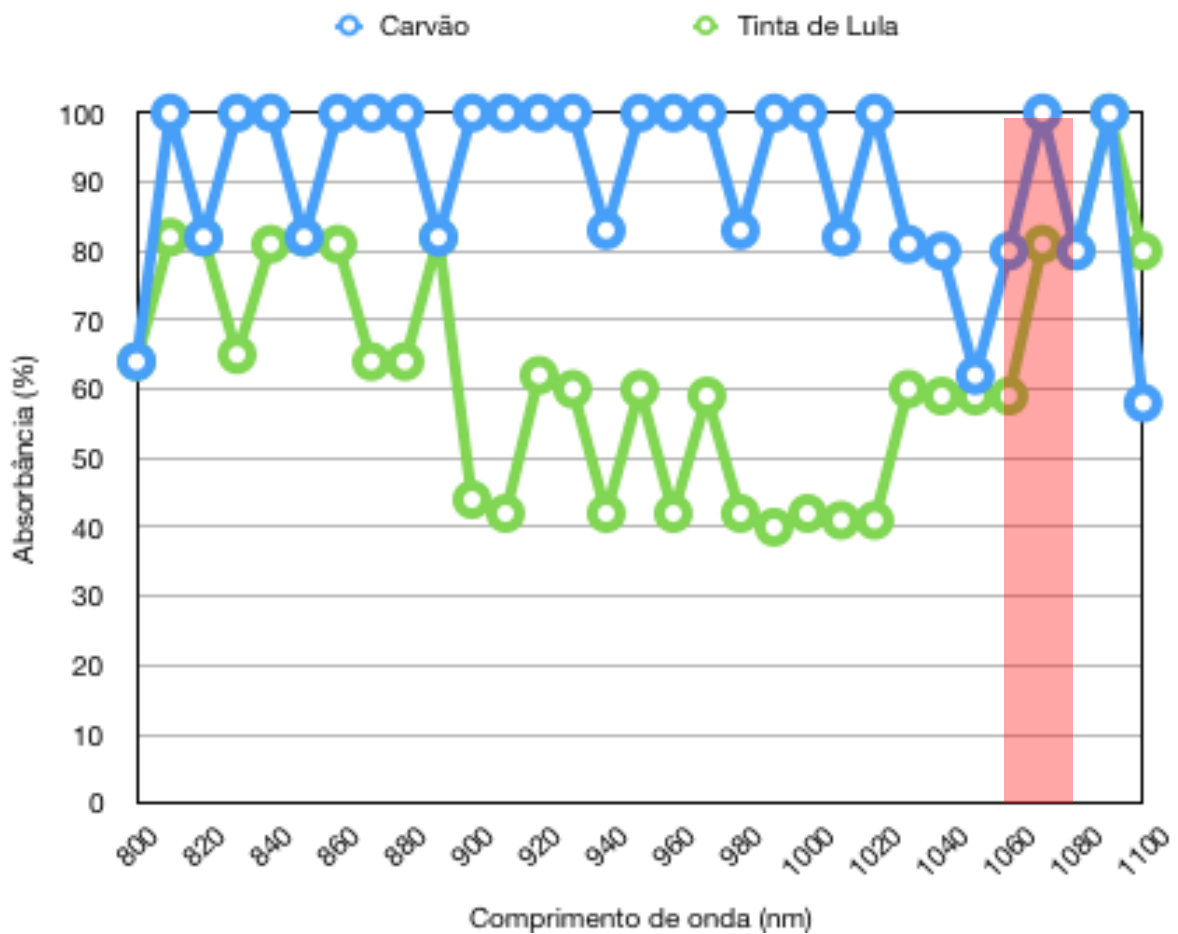
A partir desta etapa pode-se dizer que os tecidos duros dentais apresentaram alterações morfológicas decorrentes do aumento de temperatura em sua superfície após a irradiação. Os grupos LCD e LTD apresentaram aspecto característico de fusão e ressolidificação da dentina. Já os grupos QCD e QTD

apresentaram características de estreitamento do diâmetro dos túbulos dentinários. Enquanto os grupos LCE e QTE apresentaram morfologia de ablação e nos grupos LTE e QCE ocorreram os dois fenômenos: tanto ablação como fusão.

4.3.5 Características de absorção dos fotoabsorvedores

Na Figura 18 pode-se observar o espectro de transmitância da pasta de carvão em azul e da tinta de lula em vermelho. A transmitância dos dois fotoabsorvedores é muito próxima de zero inclusive na região do comprimento de onda do laser de Nd:YAG. Isso significa que os dois fotoabsorvedores absorvem quase que a totalidade da luz no comprimento de onda do laser utilizado neste trabalho (Nd:YAG - $\lambda=1064$ nm).

Figura 18- Espectro de transmitância em porcentagem dos fotoabsorvedores tinta de lula e carvão com linha preta destacando a região do laser de Nd:YAG ($\lambda=1064$ nm).



Fonte: Autora da tese.

Dessa forma, podemos afirmar que a tinta de lula pode ser utilizada como fotoabsorvedor durante a irradiação com laser de Nd:YAG.

4.4 Conclusão

A partir dos resultados obtidos nesta etapa do trabalho e descritos nesse capítulo, pode-se afirmar que foram utilizados parâmetros seguros de irradiação para futuras aplicações clínicas dos protocolos abordados. A temperatura superficial atingida após a irradiação com o laser de Nd:YAG de micropulsos é suficiente para promover mudanças químicas e morfológicas no tecido duro dental para a indução ácido-resistente nos tecidos. A elevação da temperatura pulpar decorrente do aumento de temperatura causado pela irradiação não é suficiente para que a polpa dental seja danificada ou até necrosada.

A avaliação da concentração de flúor indicou maior concentração de flúor na tinta de lula, fator que pode ser positivo quando se trata de prevenção a desmineralização, pois o flúor, de acordo com a literatura, tem papel muito importante neste processo e age em sinergia com a irradiação laser.

O estudo de variação de cor mostrou que a tinta de lula causa menor manchamento na superfície dental do que o carvão, o que sugere que a tinta de lula pode ser um fotoabsorvedor promissor para ser usado na clínica odontológica.

Já a avaliação da morfologia demonstrou que o aumento de temperatura superficial decorrente da irradiação provocou alterações morfológicas na superfície do tecido dental bastante significativas e de grande importância para a prevenção de desmineralização do tecido duro dental.

Durante o estudo da transmitância dos fotoabsorvedores, observou-se que tanto a tinta de lula como o carvão absorvem quase 100% da luz na região de 1064 nm. Sendo assim, os dois fotoabsorvedores podem ser utilizados durante a irradiação com o laser de Nd:YAG para garantir a eficiência da absorção da radiação e seus efeitos no tecido duro dental.

É importante salientar que a partir destes resultados foi possível prosseguir com análises por meio de técnicas ópticas acerca do tecido duro dental irradiado com lasers de Nd:YAG, com o objetivo de caracterizá-lo da melhor maneira possível e melhorar cada vez mais a confiabilidade dos resultados fornecidos por métodos ópticos de diagnóstico já existentes ou até visar a criação de novas técnicas ópticas de diagnóstico ou tratamento.

5 DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE REFRAÇÃO

5.1 Introdução

O índice de refração (n) é um parâmetro importante da propagação da luz em tecidos biológicos, inclusive os dentes¹². Historicamente o índice de refração foi utilizado para determinar o grau de pureza de esmalte e dentina em pó, convencionalmente era medido de acordo com a coloração da dispersão durante a imersão do tecido dental em fluidos³³.

O espalhamento da luz é causado pela descontinuidade do índice de refração do meio em que a luz se propaga, ou seja, é resultado final da variação do n ^{4,7}. Ainda, é sabido que o índice de refração pode variar de acordo com a desmineralização do tecido ou decorrente de alterações químicas e/ou estruturais ou até pode variar dentro do mesmo tecido dependendo de sua heterogeneidade⁷. O espalhamento é resultado de todas as mudanças no índice de refração.

O conhecimento deste parâmetro óptico é de grande importância para garantir a segurança e eficácia dos resultados provenientes de métodos ópticos de diagnóstico.

5.2 Materiais e Métodos

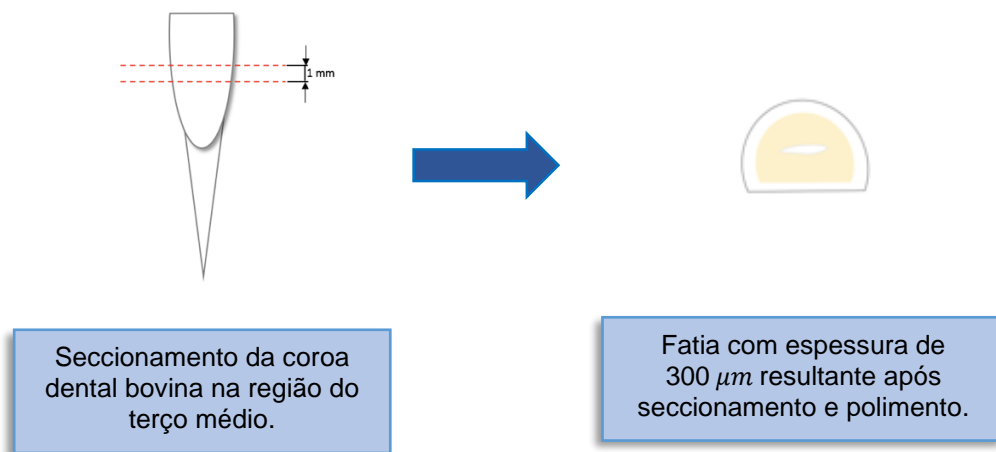
5.2.1 Preparo das amostras

Para esta etapa do estudo foram utilizados 90 dentes incisivos inferiores bovinos, obtidos em frigorífico após aprovação do presente projeto pela Comissão de Ética de uso Animal do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN/CNEN-SP nº 149/2014). Os dentes bovinos foram utilizados devido à sua maior disponibilidade em relação aos dentes humanos e também por não haver diferenças bioquímicas estatisticamente significativas em relação aos dentes humanos^{23,24}.

Do terço médio de cada coroa dental bovina foi obtida uma fatia de 1 mm de espessura por meio de seccionamento com disco de corte diamantado sob refrigeração na cortadeira metalográfica (Accutom-5, Struers, Dinamarca). Para o

seccionamento, o dente bovino foi colado a uma placa acrílica com cera pegajosa odontológica para prótese fixa (Kota®, Brasil). As fatias obtidas foram polidas na politriz (Ecomet 250, Buehler, Alemanha) com lixas de granulação 300, 600, 1200 e 2000 (Buehler, Alemanha) até atingir $300\ \mu\text{m}$ de espessura, de acordo com o esquema da Figura 19.

Figura 19 – Esquema de secção das amostras para o estudo de índice de refração.



Fonte: Autora da tese.

Essas fatias foram aleatoriamente distribuídas em 12 grupos experimentais (n=15):

- Grupo **CD**: Amostras de dentina bovina sem tratamento (controle negativo)
- Grupo **FD**: Amostras de dentina bovina com aplicação de FFA (FFA fosfato acidulado- FFA) (controle positivo)
- Grupo **LCD**: Amostras de dentina bovina irradiadas com fotoabsorvedor carvão e laser de Nd:YAG Power™ ST6 (Lares Research®, Estados Unidos) com potência de 0,6 W, taxa de repetição de 10 Hz, diâmetro do spot de $300\ \mu\text{m}$, energia de pulso de 60 mJ, densidade de energia de $84,9\ \text{J}/\text{cm}^2$, duração de pulso de $120\ \mu\text{s}$.

- Grupo **LTD**: Amostras de dentina bovina irradiadas com fotoabsorvedor tinta de lula e mesmo laser utilizado no grupo LCD.
- Grupo **QCD**: Amostras de dentina bovina irradiadas com fotoabsorvedor carvão e laser de Nd:YAG Q-Switched com potência de 4 W, taxa de repetição de 20 Hz, diâmetro do spot de 5 mm, energia de pulso de 200 mJ, densidade de energia de 1,05 J/cm², duração de pulso de 5 ns.
- Grupo **QTD**: Amostras de dentina bovina irradiadas com fotoabsorvedor tinta de lula e mesmo laser utilizado no grupo QCD.
- Grupo **CE**: Amostras de esmalte bovino sem tratamento (controle negativo)
- Grupo **FE**: Amostras de esmalte bovino com aplicação de FFA (FFA fosfato acidulado- FFA) (controle positivo)
- Grupo **LCE**: Amostras de esmalte bovino irradiadas com fotoabsorvedor carvão e laser de Nd:YAG Power™ ST6 (Lares Research®, Estados Unidos) com potência de 0,6 W, taxa de repetição de 10 Hz, diâmetro do spot de 300 µm, energia de pulso de 60 mJ, densidade de energia de 84,9 J/cm², duração de pulso de 120 µs.
- Grupo **LTE**: Amostras de esmalte bovino irradiadas com fotoabsorvedor tinta de lula e mesmo laser utilizado no grupo LCE.
- Grupo **QCE**: Amostras de esmalte bovino irradiadas com fotoabsorvedor carvão e laser de Nd:YAG Q-Switched com potência de 4 W, taxa de repetição de 20 Hz, diâmetro do spot de 5 mm, energia de pulso de 200 mJ, densidade de energia de 1,05 J/cm², duração de pulso de 5 ns.

- Grupo **QTE**: Amostras de esmalte bovino irradiadas com fotoabsorvedor tinta de lula e mesmo laser utilizado no grupo QCE.

5.2.2 Tratamento das amostras

5.2.2.1 Aplicação de Flúor Fosfato Acidulado (FFA) nas amostras

O flúor é amplamente utilizado com o objetivo de tornar o tecido dental mais resistente aos ácidos e prevenir e estabilizar lesões causadas por desmineralização do tecido dental. Assim, os grupos com aplicação de flúor são os grupos controle positivo deste estudo. As amostras dos grupos com aplicação de flúor (FD e FE), receberam aplicação de FFA com 1,23% F⁻ e pH 3,3-3,9 (Nova DFL, Brasil) durante 4 minutos³⁴. A aplicação foi feita com um *microbrush* (KG Sorensen, Brasil) e transcorrido esse tempo, as amostras foram lavadas com água deionizada por 1 minuto e secas suavemente com jato de ar comprimido.

3.2.2.2 Irradiação das amostras

Antes de iniciar a irradiação dos grupos LCD, LCE, QCD e QCE, grupos que fazem uso do carvão como fotoabsorvedor, as amostras foram recobertas por uma pasta composta por carvão vegetal finamente triturado diluído em etanol e água deionizada na proporção de 1:1. A aplicação da pasta de carvão foi feita em toda a superfície da amostra formando uma camada homogênea com auxílio de um *microbrush* (KG Sorensen, Brasil). Também antes de iniciar a irradiação dos grupos LTD, LTE, QTD e QTE, grupos que fazem uso da tinta de lula como fotoabsorvedor, as amostras foram recobertas por uma pasta composta por tinta de lula de uso culinário comercial diluída em etanol e água deionizada na proporção de 1:1. A aplicação da tinta de lula foi feita em toda a superfície da amostra formando uma camada homogênea com auxílio de um *microbrush* (KG Sorensen, Brasil).

As amostras dos grupos LCD, LTD, LCE e LTE foram irradiadas com o *laser* de Nd:YAG Power™ ST6 (Lares Research®, Estados Unidos) por contato e com a sobreposição dos pulsos em 50% utilizando o motor de passo com o objetivo de padronizar a irradiação. Ajustado conforme discriminado em tópico acima^{13,20}.

A potência real foi aferida utilizando-se um medidor de potência (Newport, Estados Unidos) a cada três amostras irradiadas.

Enquanto as amostras dos grupos QCD, QTD, QCE e QTE foram irradiadas com o *laser Q-switched Nd:YAG Brilliant Brill IR/10* (Quantel Laser, França), ajustado conforme protocolo obtido em experimento piloto prévio e descrito em tópico acima.

5.2.3 Avaliação por OCT

Após os tratamentos todas as amostras foram avaliadas por Tomografia por Coerência Óptica (OCT) Callisto (Thorlabs Inc., Estados Unidos). Foram feitas aquisições de imagem em 3 pontos distintos de cada amostra já que são bastante heterogêneas.

Com a técnica de OCT, é possível medir o caminho físico e o caminho óptico das amostras, assim, a partir da relação entre eles é feito o cálculo do índice de refração (n) de cada tecido.

O índice de refração é dado pela seguinte equação:

$$n = \frac{c}{v} \quad (3)$$

Onde, c = velocidade da luz no vácuo e v = velocidade da propagação da luz no meio. Sabe-se que $v \ll c$, então n será sempre maior do que 1.

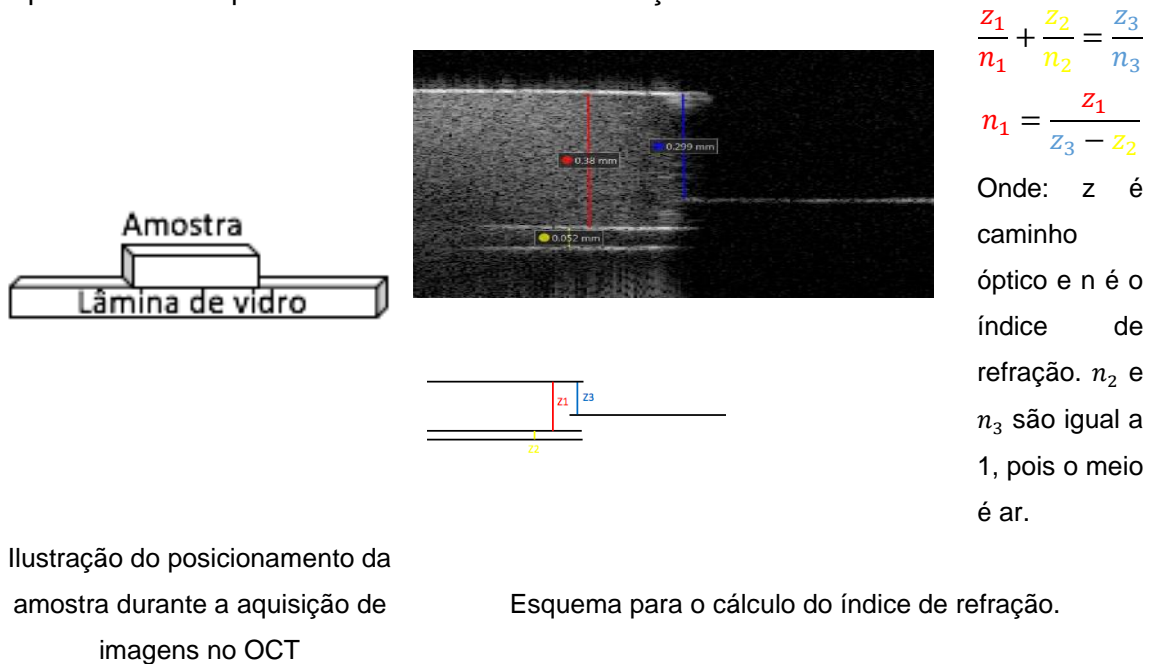
O caminho físico é a distância que a luz percorre na amostra, ou seja, corresponde a sua espessura. No entanto, a velocidade da luz em um meio material é menor do que no vácuo, assim o caminho óptico é a distância equivalente que a luz percorreria no vácuo durante o tempo de vôo na amostra ou seja, considerando o índice de refração (n)³⁵:

$$D_{\text{óptico}} = D_{\text{físico}} \cdot n \quad (4)$$

$$n = \frac{D_{\text{óptico}}}{D_{\text{físico}}} \quad (5)$$

Na Figura 20 é possível observar o posicionamento da amostra durante a aquisição de imagens no OCT e também o esquema utilizado para o cálculo do índice de refração neste trabalho.

Figura 20- Posicionamento da amostra durante a aquisição das imagens no OCT e esquema utilizado para o cálculo do índice de refração.



Fonte: Autora da tese.

A partir dessas imagens e com o auxílio do software *ImageJ*, foram calculados os índices de refração dos tecidos duros. Foram feitas aquisições de imagem em 3 pontos distintos de cada amostra já que são bastante heterogêneas. Assim, o índice de refração calculado abrange toda a área da amostra.

5.2.3 Análise Estatística

Neste capítulo as variáveis resposta analisadas foram apenas índice de refração do esmalte e dentina. As análises foram realizadas utilizando-se o *software* de estatística GraphPad Prism 6.0 para MAC OS X (GraphPad Software, Estados Unidos).

Para cada variável resposta foi realizada uma análise estatística diferente. Assim, para a seleção do teste estatístico mais apropriado para a análise em questão, primeiramente foram testadas as três pressuposições principais para validar uma possível análise de variância: independência, normalidade e homogeneidade de variâncias dos dados experimentais. A independência foi

garantida pela forma que o experimento foi executado. A normalidade foi detectada utilizando-se o teste de Shapiro- Wilk com nível de significância de 5%. A homogeneidade foi avaliada pelo teste de D'Agostino & Pearson também com 5% para o nível de significância.

5.3 Resultados e Discussão

A seguir são mostrados os resultados para a variável resposta índice de refração com fator de variação tratamento. O índice de refração foi calculado para todos os grupos e suas respectivas estatísticas descritivas de dentina bovina (Tabela 5) e esmalte bovino (Tabela 6), o valor encontrado para os grupos controle corrobora com a literatura descrita na Tabela 7. É possível observar que há um aumento no valor do índice de refração de acordo com a mineralização do tecido.

Tabela 5- Estatística descritiva para a variável resposta índice de refração do tecido dentina bovina. Dados originais.

Índice de Refração Dentina	
Grupo	Índice de Refração±Desvio Padrão
CD	1,44±0,31
FD	1,70±0,30
LCD	1,45±0,35
LTD	1,58±0,32
QCD	1,61±0,28
QTD	1,58±0,31

Foi feito o teste de normalidade dos dados Shapiro Wilk que detectou uma distribuição normal dos dados. Então foi feito o teste estatístico ANOVA para comparar os grupos, porém não houve diferenças estatisticamente significativas ($p=0,1939$).

Tabela 6- Estatística descritiva para a variável resposta índice de refração do tecido esmalte bovino. Dados originais.

Índice de Refração Esmalte	
Grupo	Índice de Refração
CE	1,54±0,23
FE	1,51±0,26
LCE	1,62±0,36
LTE	1,67±0,19
QCE	1,71±0,08
QTE	1,68±0,24

Foi feito o teste de normalidade dos dados Shapiro Wilk que detectou uma distribuição não normal dos dados. Então foi feito o teste estatístico não paramétrico Kruskal-Wallis para comparar os grupos, porém não houve diferenças estatisticamente significantes ($p=0,058$).

Tabela 7- Índice de refração dos tecidos duros dentais dentina e esmalte relatados na literatura.

Referência	Dentina	Esmalte
Wang, 1999 ³⁵	1,50±0,02	1,62±0,02
Kienle, 2006 ³⁶	1,5	-
Zijp, 2010 ³⁷	1,45	1,64
Hariri, 2012 ¹	1,55±0,08	1,63±0,02
Hariri, 2013 ⁷	1,43-1,57	1,52-1,63

Foi obtido para o grupo controle dentina o índice de refração no valor de $1,44 \pm 0,31$ corroborando o valor encontrado na literatura^{7,37}. No grupo FD houve um aumento no valor de índice de refração provavelmente por conta da formação de glóbulos de fluoreto de cálcio²² (CaF_2) na superfície da dentina. Nos grupos irradiados LTD, QCD e QTD também houve um aumento no valor de índice de refração por conta das mudanças químicas promovidas pelo laser de Nd:YAG e sugere-se que o laser Q-switched Nd:YAG as promovem também.

Para o grupo controle esmalte foi obtido o valor de índice de refração de $1,54 \pm 0,23$ corroborando com Hariri, 2013⁷. Diferentemente da dentina, no grupo com aplicação de flúor FE houve uma diminuição do índice de refração e esse comportamento pode se dever ao fato de que foi utilizado flúor fosfato acidulado e o pH baixo e ácido do flúor aplicado pode ter promovido uma desmineralização que apesar de pequena é suficiente para alterar o índice de refração. Em contrapartida, os grupos irradiados tiveram seu índice de refração aumentado o que pode indicar aumento da mineralização do tecido.

Nesta etapa, foi possível obter os valores de índice de refração para os tecidos duros irradiados com laser de Nd:YAG e dois diferentes fotoabsorvedores. Este parâmetro tem grande importância para a utilização de métodos ópticos de diagnóstico como o OCT por exemplo para que não ocorram falsos positivos ou negativos na análise de lesões no consultório odontológico.

5.4 Conclusão

Neste capítulo foi obtido um parâmetro óptico de importância clínica para métodos diagnósticos que se utilizam de técnicas ópticas. O uso do valor de índice de refração verdadeiro do tecido pode melhorar a qualidade das imagens fornecidas e também evitar falsos resultados. Os resultados obtidos nesta etapa serão utilizados na etapa a seguir para o cálculo do coeficiente de atenuação óptica.

6 DETERMINAÇÃO DO COEFICIENTE DE ATENUAÇÃO ÓPTICA

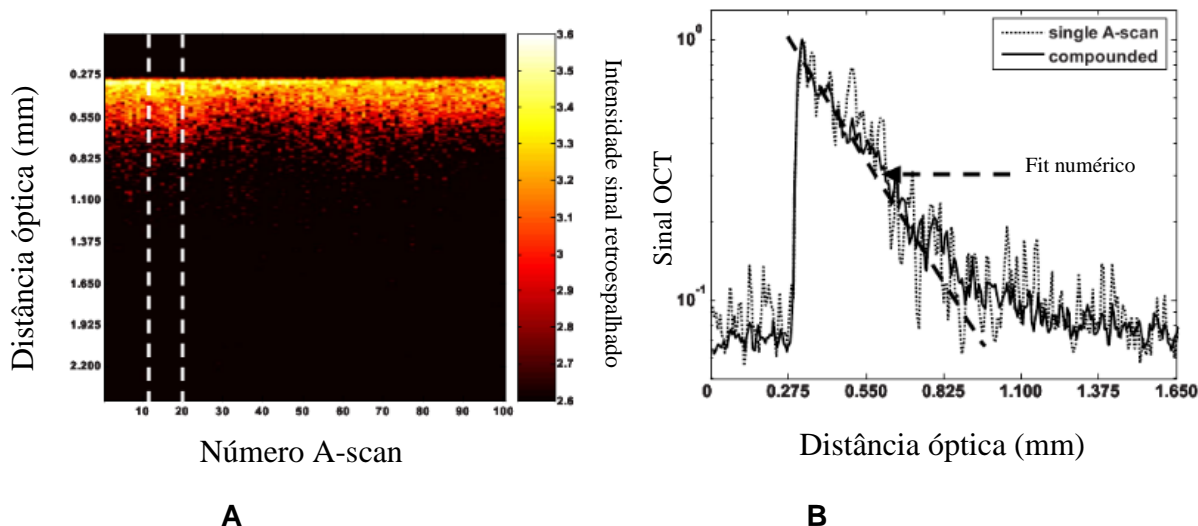
6.1 Introdução

A busca por técnicas de diagnóstico médico e odontológico não invasivas tem crescido nos últimos anos. Os métodos invasivos podem ser incômodos ou até causar impacto negativo ao paciente, por isso as técnicas invasivas, na medida do possível, têm sido substituídas por técnicas não invasivas que fornecem resultados semelhantes. Os métodos ópticos tem desempenhado um papel muito importante neste aspecto e a técnica que pode ser utilizada entre outras coisas como análise morfológica e pode ser também para o cálculo do coeficiente de atenuação óptica é a tomografia por coerência óptica¹.

A tomografia por coerência óptica é uma técnica de imagem não invasiva que fornece imagens em cortes transversais de estruturas internas biológicas por meio da diferenciação entre fótons espalhados e transmitidos ou refletidos utilizando fonte de luz de banda larga na região do infravermelho próximo e com escala de resolução na ordem de micrômetros^{1,38}.

Como pode ser observado na Figura 21, um A-scan pode ser descrito como uma coluna de dados e o B-Scan é uma figura 2D formada por um conjunto de A-scan. Em B, pode-se observar que o sinal de OCT é uma curva que pode ser ajustada por uma equação de decaimento exponencial.

Figura 21 – (A) Exemplo de imagem OCT em 2D (B-scan) a partir de esmalte hígido. As duas linhas tracejadas estão delimitando a região que compreende do 13° ao 20° A-scan. (B) A varredura A que corresponde a 13ª varredura de (A). São mostrados o perfil A-scan único (linha pontilhada) e o perfil mais suave obtido após a adição (composição) dos oito A-scans adjacentes (13° ao 20° A-scan – linha contínua). O ajuste exponencial do perfil composto segue a linha tracejada.



Fonte: Adaptado de Popescu, 2008.

A estimativa do coeficiente de atenuação óptica se baseia no ajuste exponencial da curva do sinal do OCT utilizando a lei de Lambert-Beer, a qual descreve um feixe de luz quando se propaga através de um meio atenuante^{13,39}.

$$I(z) = I_0 e^{-2\mu z}$$

Onde: $I(z)$ é o sinal de intensidade de energia em função da distância de propagação na amostra z ; I_0 é a potência da luz incidente; $e^{-2\mu z}$ é a atenuação total, composta pela soma dos coeficientes de absorção e espalhamento. O fator 2 presente na exponencial se refere a bidirecionalidade da propagação da luz através do tecido, característico da configuração do OCT.

De acordo com a lei de Lambert-Beer a atenuação da luz dentro dos tecidos é exponencial, a inclinação dessa curva é proporcional a atenuação total de fótons balísticos. Como a absorção nos tecidos é substancialmente menor que o espalhamento na faixa espectral do infravermelho próximo, a atenuação exponencial depende principalmente do espalhamento. Portanto, analisando o perfil exponencial da atenuação da luz detectada pelo sistema OCT, pode-se obter informações sobre o tecido.

Assim, a análise localizada do sinal do OCT pode aumentar o potencial clínico do OCT, permitindo diferenciar quantitativamente entre diferentes tipos de tecidos ou diferenciação entre tecidos hígidos, tratados ou com lesões¹.

A literatura é controversa a respeito do aumento ou diminuição do coeficiente de atenuação óptica após a desmineralização do tecido duro dental. A primeira linha de raciocínio é que o aumento do valor do coeficiente de atenuação óptica após uma ciclagem de desmineralização pode ocorrer por conta do aumento de espaços no tecido desmineralizado, aumento de interfaces e conseqüentemente aumento do espalhamento da luz. Assim, a luz penetra menos no tecido e retorna mais ao detector e tendo assim o aumento do coeficiente de atenuação óptica ^{38,40}. Entretanto, outros trabalhos citam que após a desmineralização o coeficiente de atenuação óptica diminui por causa dos espaços criados pós-desmineralização, a luz penetra mais no tecido e o espalhamento é diminuído e assim, obtém-se menor coeficiente de atenuação óptica ^{13,41-43}.

Atualmente na prática de laboratório se usa índice de refração igual a 1 para qualquer medida de OCT, no entanto, no capítulo anterior foi mostrado que o índice de refração para os diferentes tecidos e tratamentos é específico. Assim, nesse capítulo serão comparados os coeficientes de atenuação óptica calculados com índice de refração igual a 1 e também com o índice de refração calculado neste trabalho.

6.2 Materiais e Métodos

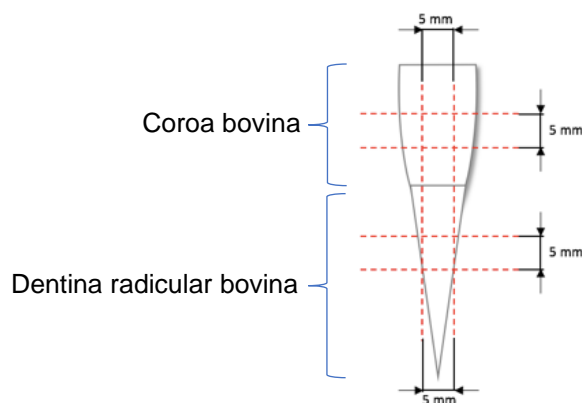
6.2.1 Preparo das amostras

Para esta etapa do estudo foram utilizados 90 dentes incisivos inferiores bovinos, obtidos em frigorífico após aprovação do presente projeto pela Comissão de Ética de uso Animal do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN/CNEN-SP nº 149/2014). Os dentes bovinos foram utilizados devido à sua maior disponibilidade em relação aos dentes humanos e também por não haver diferenças bioquímicas estatisticamente significativas em relação aos dentes humanos ^{23,24}.

De cada coroa e raiz dental bovina foi obtido um bloco de 5 mm x 5 mm x 2 mm por meio de seccionamento com disco de corte diamantado sob refrigeração

na cortadeira metalográfica (Accutom-5, Struers, Dinamarca). Para o seccionamento, o dente bovino foi colado a uma placa acrílica com cera pegajosa odontológica para prótese fixa (Kota®, Brasil). Os blocos obtidos foram polidos na politriz (Ecomet 250, Buehler, Alemanha) com lixas de granulação 300, 600, 1200 e 2000 (Buehler, Alemanha) até ficarem planos e com faces paralelas e também atingirem as medidas citadas acima para padronização do experimento, de acordo com o esquema da Figura 22.

Figura 22- Esquema de secção das amostras. Secção e polimento de blocos de 5 mm x 5 mm x 2mm das regiões da coroa e dentina radicular bovina.



Fonte: Autora da tese.

Esses blocos foram aleatoriamente distribuídos em 12 grupos experimentais (n=15), 6 grupos de dentina e 6 grupos de esmalte como pode ser observado abaixo:

- Grupo **CD**: Amostras de dentina bovina sem tratamento (controle negativo)
- Grupo **FD**: Amostras de dentina bovina com aplicação de FFA (FFA fosfato acidulado- FFA) (controle positivo)
- Grupo **LCD**: Amostras de dentina bovina irradiadas com fotoabsorvedor carvão e laser de Nd:YAG Power™ ST6 (Lares Research®, Estados Unidos) com potência de 0,6 W, taxa de repetição de 10 Hz, diâmetro do spot de 300 µm, energia de pulso de

60 mJ, densidade de energia de 84,9 J/cm², duração de pulso de 120 μ s.

- Grupo **LTD**: Amostras de dentina bovina irradiadas com fotoabsorvedor tinta de lula e mesmo laser utilizado no grupo LCD.
- Grupo **QCD**: Amostras de dentina bovina irradiadas com fotoabsorvedor carvão e laser de Nd:YAG Q-Switched com potência de 4 W, taxa de repetição de 20 Hz, diâmetro do spot de 5 mm, energia de pulso de 200 mJ, densidade de energia de 1,05 J/cm², duração de pulso de 5 ns.
- Grupo **QTD**: Amostras de dentina bovina irradiadas com fotoabsorvedor tinta de lula e mesmo laser utilizado no grupo QCD.
- Grupo **CE**: Amostras de esmalte bovino sem tratamento (controle negativo)
- Grupo **FE**: Amostras de esmalte bovino com aplicação de FFA (FFA fosfato acidulado- FFA) (controle positivo)
- Grupo **LCE**: Amostras de esmalte bovino irradiadas com fotoabsorvedor carvão e laser de Nd:YAG Power™ ST6 (Lares Research®, Estados Unidos) com potência de 0,6 W, taxa de repetição de 10 Hz, diâmetro do spot de 300 μ m, energia de pulso de 60 mJ, densidade de energia de 84,9 J/cm², duração de pulso de 120 μ s.
- Grupo **LTE**: Amostras de esmalte bovino irradiadas com fotoabsorvedor tinta de lula e mesmo laser utilizado no grupo LCE.
- Grupo **QCE**: Amostras de esmalte bovino irradiadas com fotoabsorvedor carvão e laser de Nd:YAG Q-Switched com potência de 4 W, taxa de repetição de 20 Hz, diâmetro do spot de 5 mm,

energia de pulso de 200 mJ, densidade de energia de 1,05 J/cm², duração de pulso de 5 ns.

- Grupo **QTE**: Amostras de esmalte bovino irradiadas com fotoabsorvedor tinta de lula e mesmo laser utilizado no grupo QCE.

Antes de iniciar a irradiação dos grupos LCD, LCE, QCD e QCE, grupos que fazem uso do carvão como fotoabsorvedor, as amostras foram recobertas por uma pasta composta por carvão vegetal finamente triturado diluído em etanol e água deionizada na proporção de 1:1. A aplicação da pasta de carvão foi feita em toda a superfície da amostra formando uma camada homogênea com auxílio de um microbrush (KG Sorensen, Brasil). Também antes de iniciar a irradiação dos grupos LTD, LTE, QTD e QTE, grupos que fazem uso da tinta de lula como fotoabsorvedor, as amostras foram recobertas por uma pasta composta por tinta de lula de uso culinário comercial diluída em etanol e água deionizada na proporção de 1:1. A aplicação da tinta de lula foi feita em toda a superfície da amostra formando uma camada homogênea com auxílio de um microbrush (KG Sorensen, Brasil).

As amostras dos grupos LCD, LTD, LCE e LTE foram irradiadas com o *laser* de Nd:YAG Power™ ST6 (Lares Research®, Estados Unidos) por contato e com a sobreposição dos pulsos em 50% utilizando o motor de passo com o objetivo de padronizar a irradiação. Ajustado conforme discriminado acima ^{13,20}:

A potência real foi aferida utilizando-se um medidor de potência (Newport, Estados Unidos) a cada três amostras irradiadas.

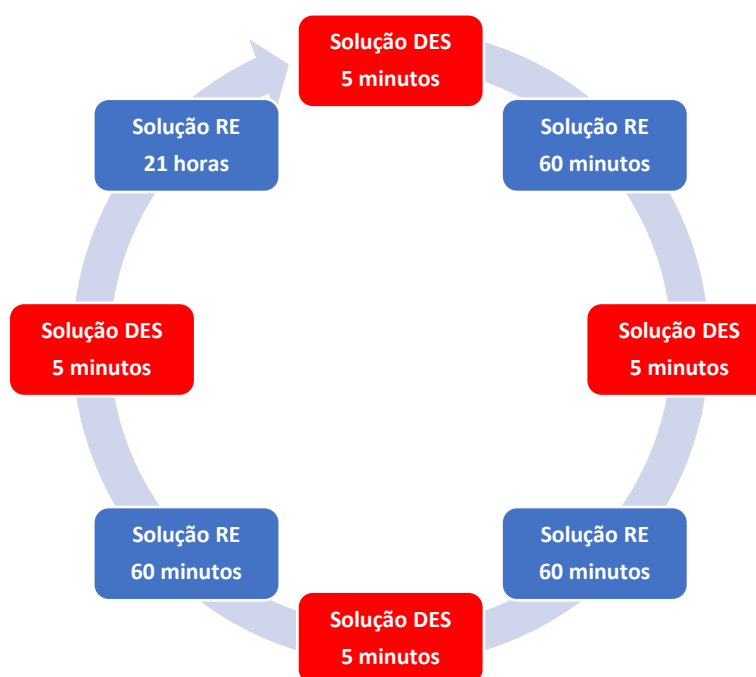
Enquanto as amostras dos grupos QCD, QTD, QCE e QTE foram irradiadas com o *laser Q-switched* Nd:YAG Brilliant Brill IR/10 (Quantel Laser, França), ajustado conforme protocolo obtido em experimento piloto prévio e descrito acima.

6.2.2 Avaliação por OCT

Assim, as amostras foram medidas em três regiões equidistantes por OCT imediatamente após os tratamentos e após ciclagem de desmineralização e remineralização ^{13,14} utilizando o valor de índice de refração igual a 1. Nesta etapa, foi utilizado o OCT Callisto (Thorlabs Inc., Estados Unidos) da Central Multiusuário da Universidade Federal do ABC – Campus São Bernardo do Campo.

Após as medidas iniciais que foram feitas após os tratamentos, as amostras foram submetidas a um protocolo de ciclagem de pH (desmineralização e remineralização) por 5 dias ⁴⁴. A solução remineralizadora é saliva artificial composta por 0,213 g/L de $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,738 g/L de KH_2PO_4 , 1,114 g/L de KCl , 0,381 g/L de NaCl e 12 g/L de tampão TRIS e o pH da solução foi ajustado para 7,0 com HCl 1M. Já a solução desmineralizadora foi ácido cítrico 0,3% (pH=2,53). As amostras foram submetidas quatro vezes ao dia à solução desmineralizadora por 5 minutos e à solução remineralizadora por 60 minutos. A solução desmineralizadora foi trocada a cada exposição das amostras enquanto a solução remineralizadora foi trocada todos os dias no início da ciclagem. Entre as trocas de solução, as amostras foram lavadas com água deionizada (Figura 23).

Figura 23- Esquema do protocolo de ciclagem de pH.



Fonte: Autora da tese.

Por fim, foram calculados os coeficientes de atenuação óptica por meio de rotina no software Matlab de todos os grupos antes e depois da ciclagem, utilizando-se primeiramente o índice de refração $n=1,0$ e posteriormente os coeficientes foram recalculados utilizando-se os valores de índice de refração calculados no capítulo anterior deste trabalho.

6.2.3 Análise Estatística

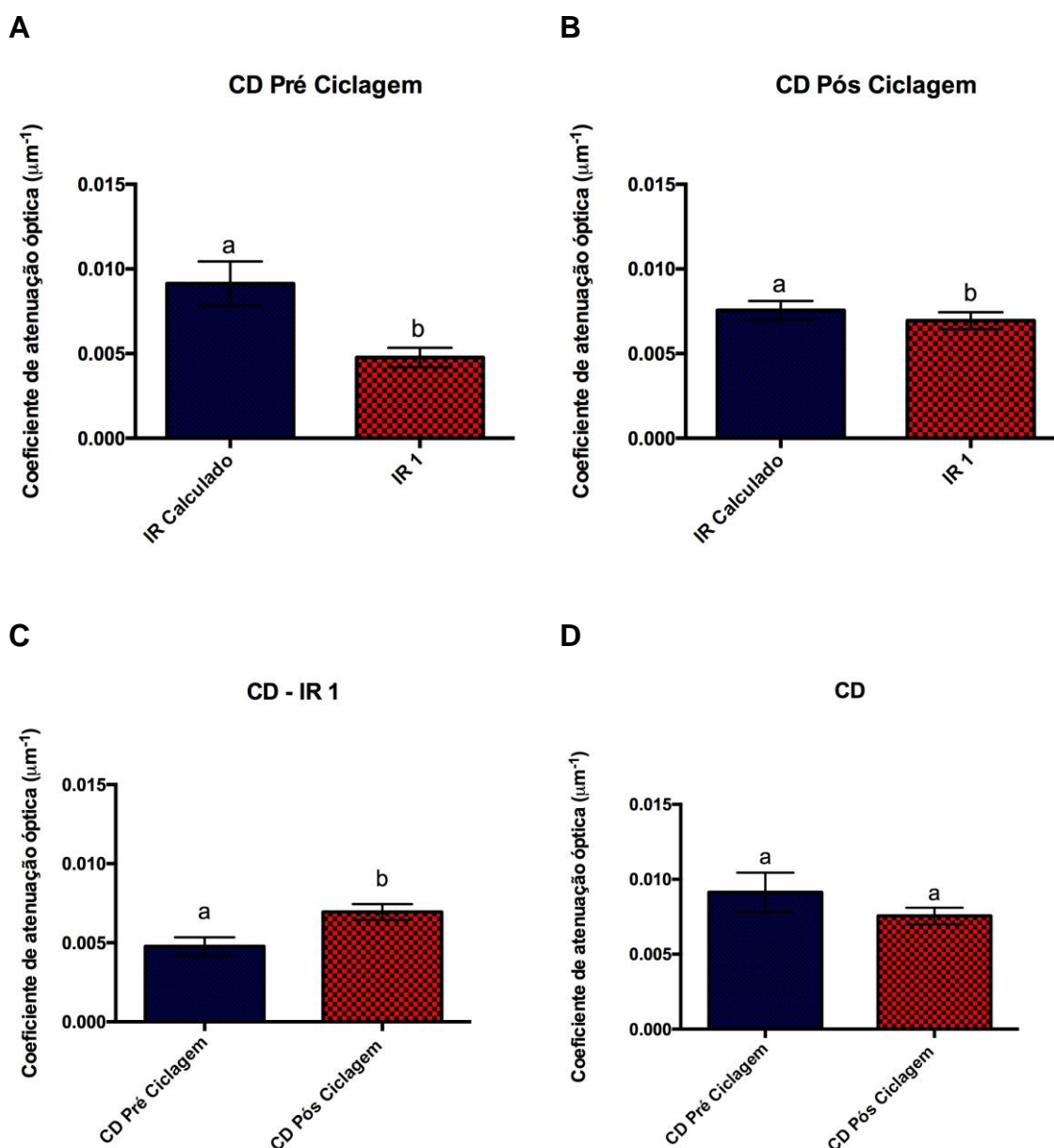
Neste capítulo as variáveis resposta analisadas foram coeficiente de atenuação óptica do esmalte e dentina hígidos e tratados e também variando o índice de refração usado igual a 1 para todos os grupos e calculado especificamente para cada grupo. As análises foram realizadas utilizando-se o *software* de estatística GraphPad Prism 6.0 para MAC OS X (GraphPad Software, Estados Unidos).

Para cada variável resposta foi realizada uma análise estatística diferente. Assim, para a seleção do teste estatístico mais apropriado para a análise em questão, primeiramente foram testadas as três pressuposições principais para validar uma possível análise de variância: independência, normalidade e homogeneidade de variâncias dos dados experimentais. A independência foi garantida pela forma que o experimento foi executado. A normalidade foi detectada utilizando-se o teste de Shapiro-Wilk com nível de significância de 5%. A homogeneidade foi avaliada pelo teste de D'Agostino & Pearson também com 5% para o nível de significância.

6.3 Resultados e Discussão

Na Figura 24 em (A) e (B) observa-se que houve diferenças estatisticamente significantes entre os coeficientes de atenuação calculados com os índices de refração 1 e calculado. Já, em (C) e (D) observa-se que o resultado para o coeficiente de atenuação óptica do grupo controle dentina modificou quando foi utilizado o valor correto do índice de refração. Em (C) com o índice de refração igual a 1 poderia afirmar que houve desmineralização do tecido pós ciclagem já que o coeficiente de atenuação aumentou, no entanto, ao utilizar o índice de refração corrigido em (D) observou-se que não houve diferença estatisticamente significativa entre pré e pós ciclagem. Assim, pode-se citar a importância de se utilizar o valor calculado para o índice de refração.

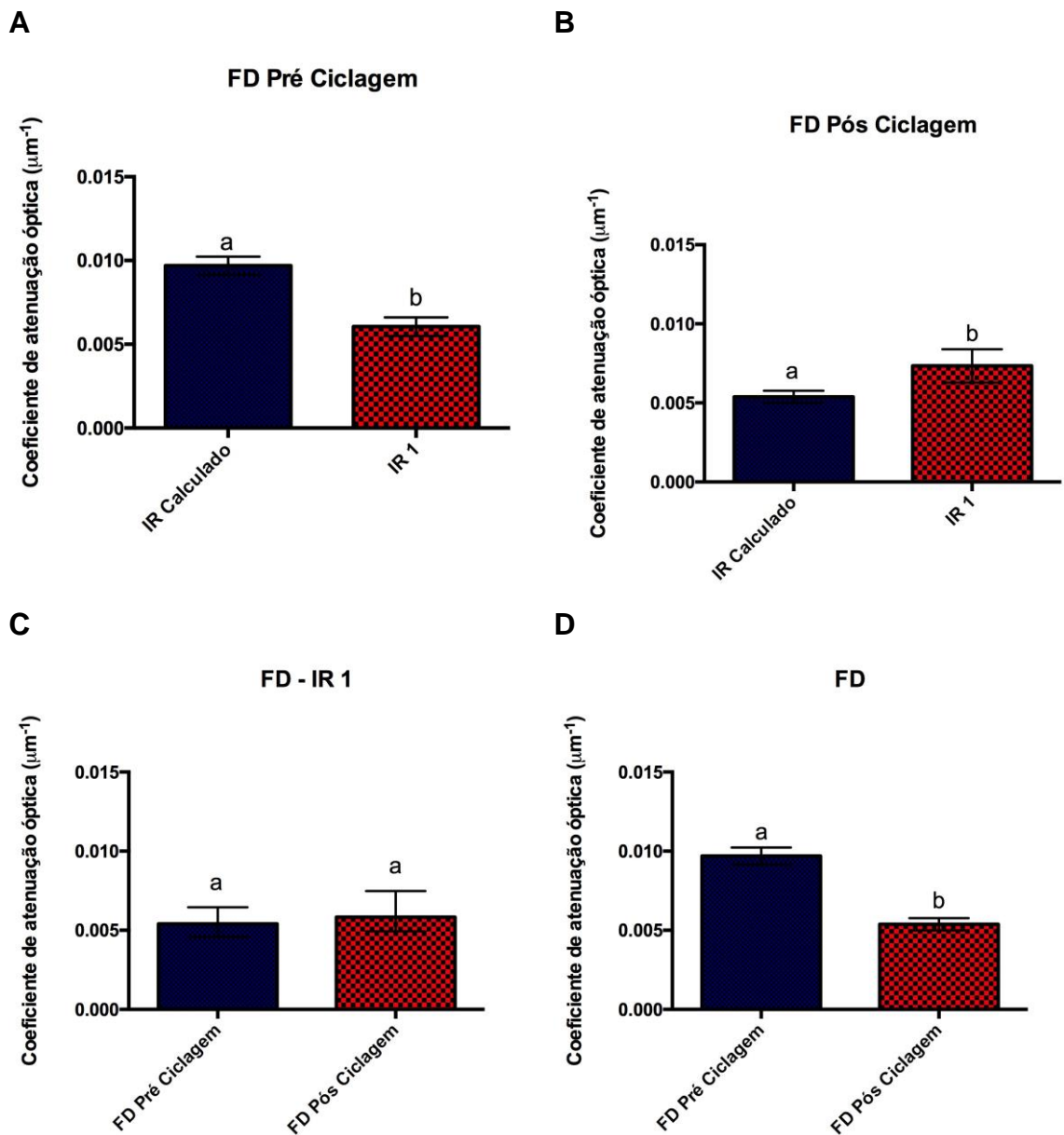
Figura 24- Coeficiente de atenuação óptica do grupo controle dentina (CD). (A) Comparação do coeficiente de atenuação óptica pré ciclagem calculado com índice de refração calculado e 1. (B) Comparação do coeficiente de atenuação óptica pós ciclagem calculado com índice de refração calculado e 1. (C) Comparação do coeficiente de atenuação óptica pré ciclagem e pós ciclagem calculado com índice de refração igual a 1. (D) Comparação do coeficiente de atenuação óptica pré ciclagem e pós ciclagem calculado com índice de refração igual calculado. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa.



Na Figura 25 em (A) e (B) observa-se que houve diferenças estatisticamente significantes entre os coeficientes de atenuação calculados com os índices de refração 1 e calculado. Já, em (C) e (D) observa-se que o resultado para o coeficiente de atenuação óptica do grupo flúor dentina modificou quando foi utilizado o valor correto do índice de refração. Em (C) com o índice de refração igual

a 1 não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos, no entanto, ao utilizar o índice de refração corrigido em (D) observou-se que houve uma diminuição no coeficiente de atenuação pós ciclagem com diferença estatisticamente significativa entre pré e pós ciclagem.

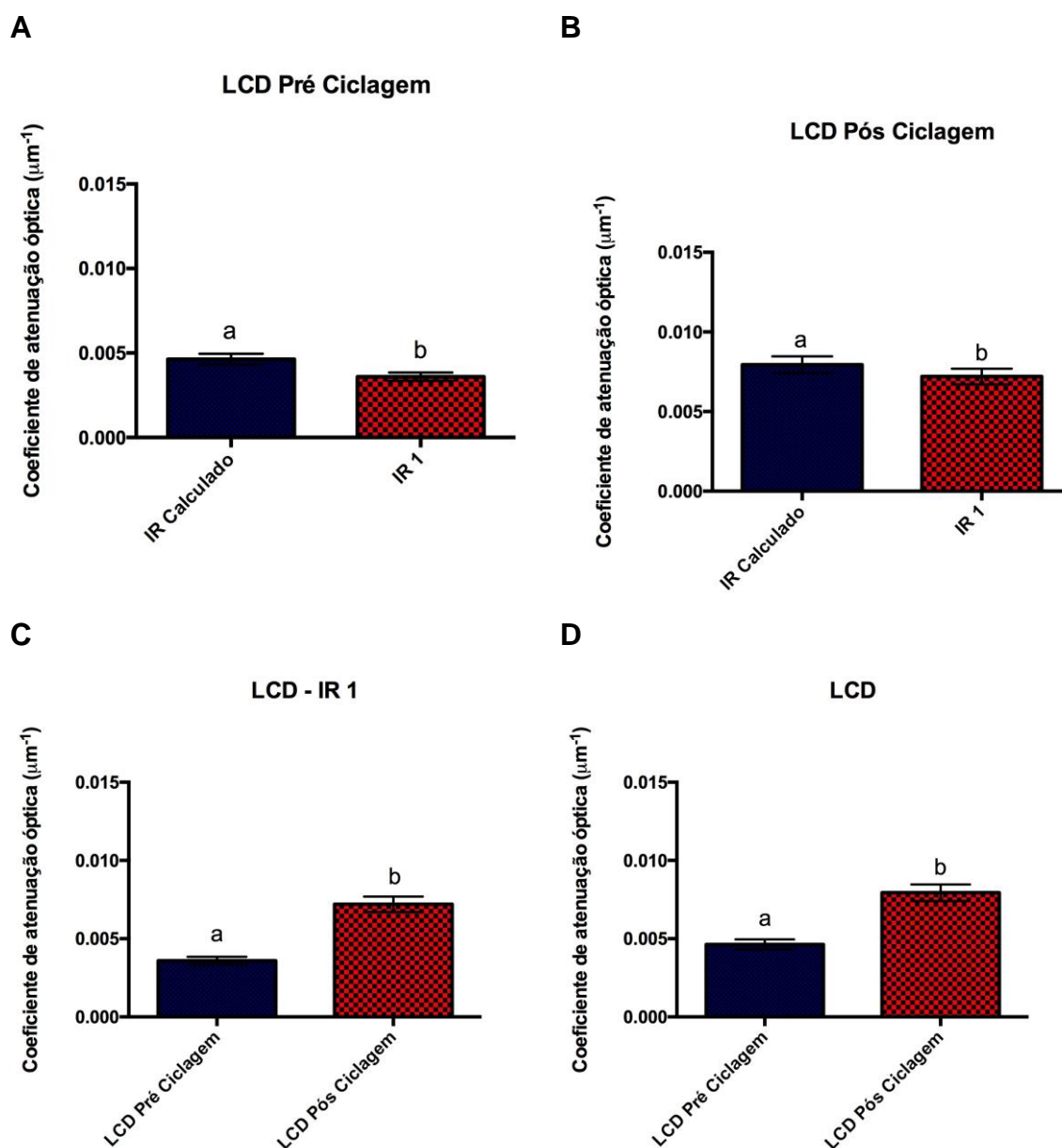
Figura 25- Coeficiente de atenuação óptica do grupo flúor dentina (FD). (A) Comparação do coeficiente de atenuação óptica pré ciclagem calculado com índice de refração calculado e 1. (B) Comparação do coeficiente de atenuação óptica pós ciclagem calculado com índice de refração calculado e 1. (C) Comparação do coeficiente de atenuação óptica pré ciclagem e pós ciclagem calculado com índice de refração igual a 1. (D) Comparação do coeficiente de atenuação óptica pré ciclagem e pós ciclagem calculado com índice de refração igual calculado. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa.



Na

Figura 26 em (A) e (B) observa-se que houve diferenças estatisticamente significantes entre os coeficientes de atenuação calculados com os índices de refração 1 e calculado e o comportamento foi mantido com ambos valores de índice de refração. Em (C) e (D) observa-se que o resultado para o coeficiente de atenuação óptica do grupo laser Nd:YAG usando como fotoabsorvedor o carvão na dentina modificou quando foi utilizado o valor correto do índice de refração. Ambos apresentaram diferenças estatisticamente significantes pré e pós ciclagem e mantiveram o mesmo comportamento com os dois valores de índice de refração.

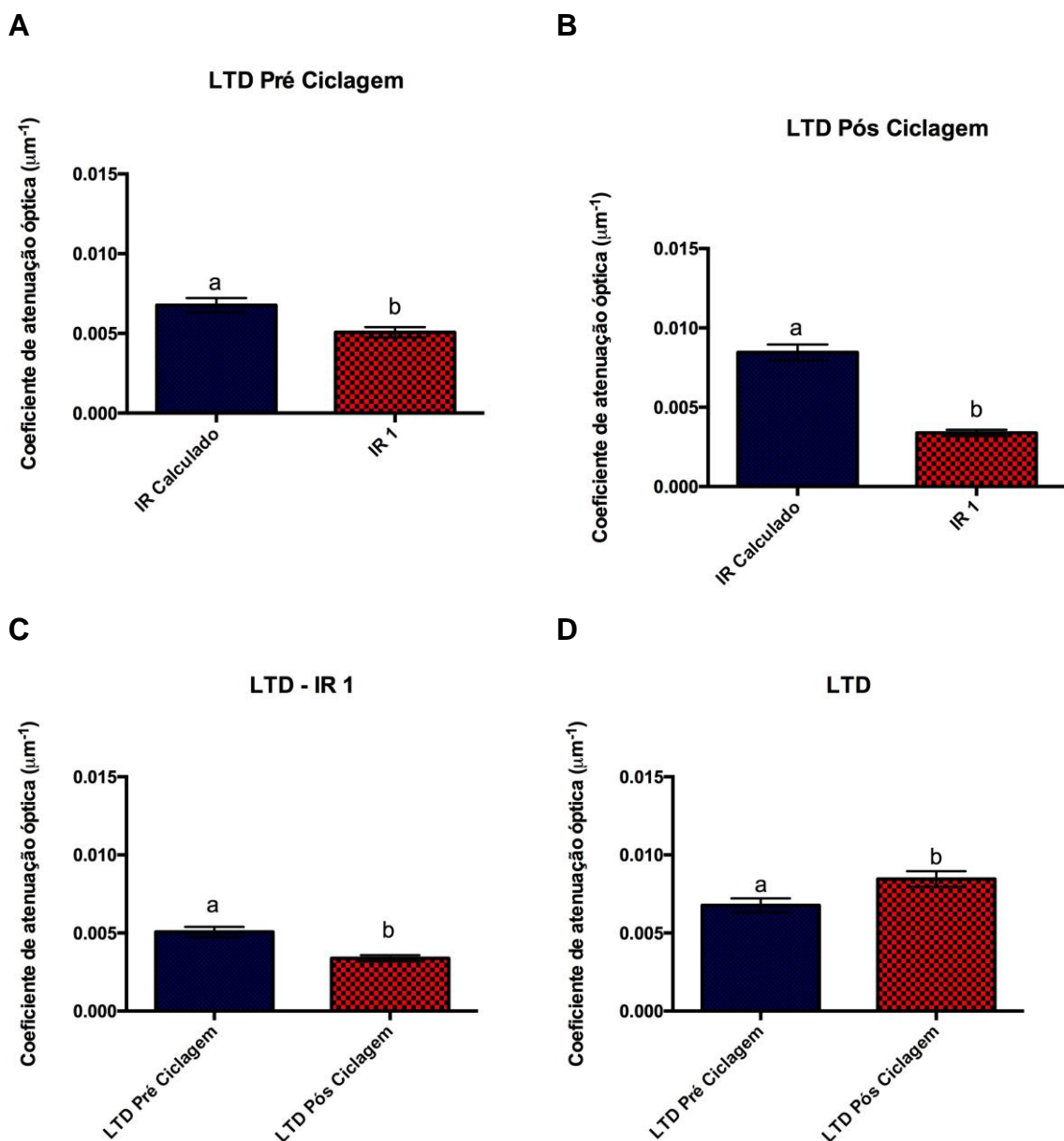
Figura 26- Coeficiente de atenuação óptica do grupo laser Nd:YAG com carvão como fotoabsorvedor dentina (LCD). (A) Comparação do coeficiente de atenuação óptica pré ciclagem calculado com índice de refração calculado e 1. (B) Comparação do coeficiente de atenuação óptica pós ciclagem calculado com índice de refração calculado e 1. (C) Comparação do coeficiente de atenuação óptica pré ciclagem e pós ciclagem calculado com índice de refração igual a 1. (D) Comparação do coeficiente de atenuação óptica pré ciclagem e pós ciclagem calculado com índice de refração igual calculado. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa.



Na Figura 27 em (A) e (B) observa-se que houve diferenças estatisticamente significantes entre os coeficientes de atenuação calculados com os índices de refração 1 e calculado. Já, em (C) e (D) observa-se que o resultado para o coeficiente de atenuação óptica do grupo laser Nd:YAG com fotoabsorvedor tinta de lula na dentina modificou quando foi utilizado o valor correto do índice de

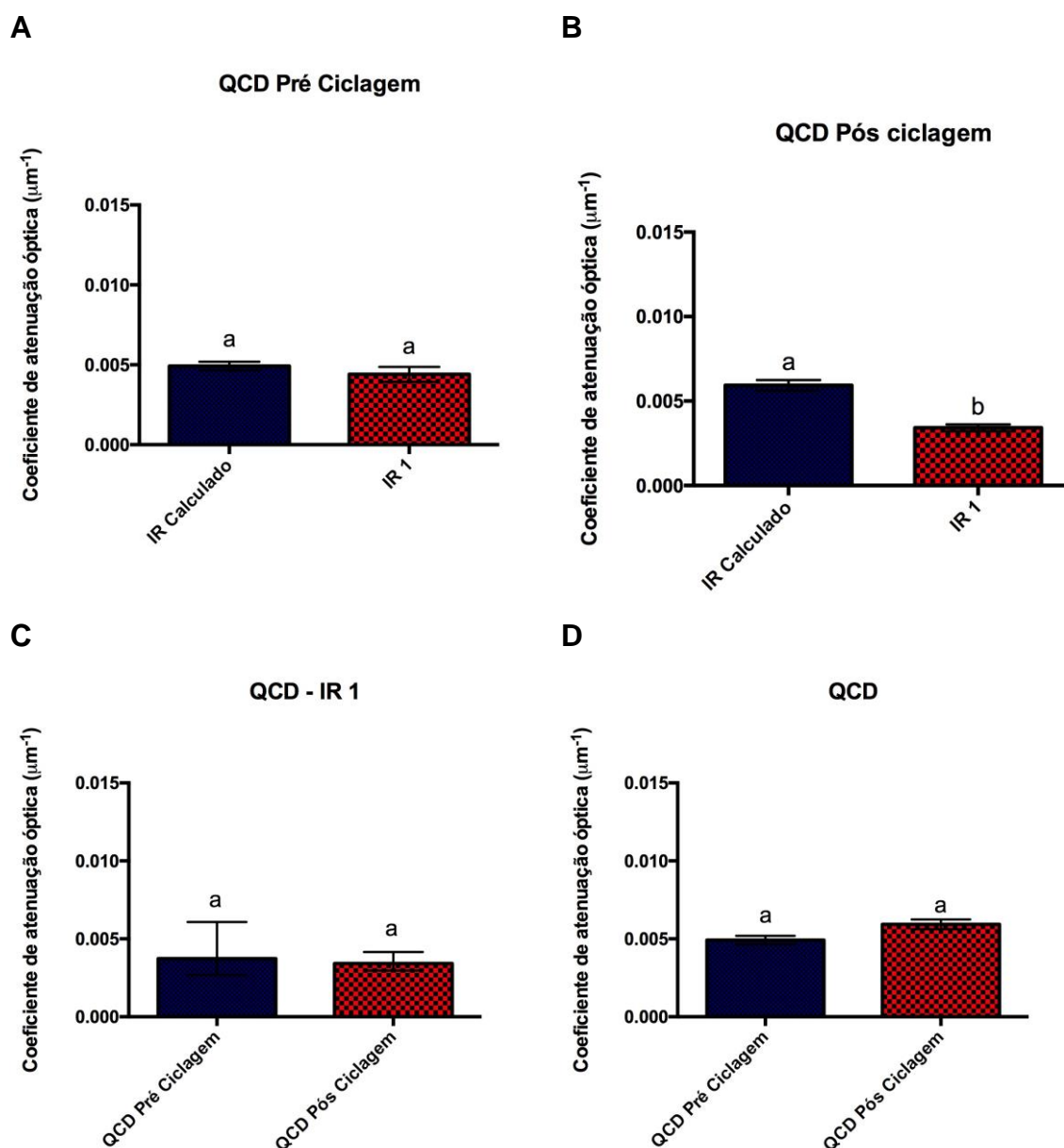
refração. Em (C) com o índice de refração igual a 1 o coeficiente de atenuação apresentou diminuição no pós ciclagem, no entanto, ao utilizar o índice de refração corrigido em (D) observou-se que houve um aumento no coeficiente de atenuação pós ciclagem com diferença estatisticamente significativa entre pré e pós ciclagem.

Figura 27- Coeficiente de atenuação óptica do grupo laser Nd:YAG com tinta de lula como fotoabsorvedor dentina (LTD). (A) Comparação do coeficiente de atenuação óptica pré ciclagem calculado com índice de refração calculado e 1. (B) Comparação do coeficiente de atenuação óptica pós ciclagem calculado com índice de refração calculado e 1. (C) Comparação do coeficiente de atenuação óptica pré ciclagem e pós ciclagem calculado com índice de refração igual a 1. (D) Comparação do coeficiente de atenuação óptica pré ciclagem e pós ciclagem calculado com índice de refração igual calculado. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa.



Na Figura 28 em (A) não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos com coeficiente de atenuação óptica calculados com índice de refração igual a 1 e calculado, em (B) observa-se que houve diferenças estatisticamente significantes entre os coeficientes de atenuação calculados com os índices de refração 1 e calculado. Já, em (C) e (D) observa-se que o resultado para o coeficiente de atenuação óptica do grupo laser Q-switched Nd:YAG com fotoabsorvedor carvão na dentina modificou quando foi utilizado o valor correto do índice de refração. Em (C) e (D) não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos, o que mostrou que o comportamento não mudou e também que não houve desmineralização nesses grupos.

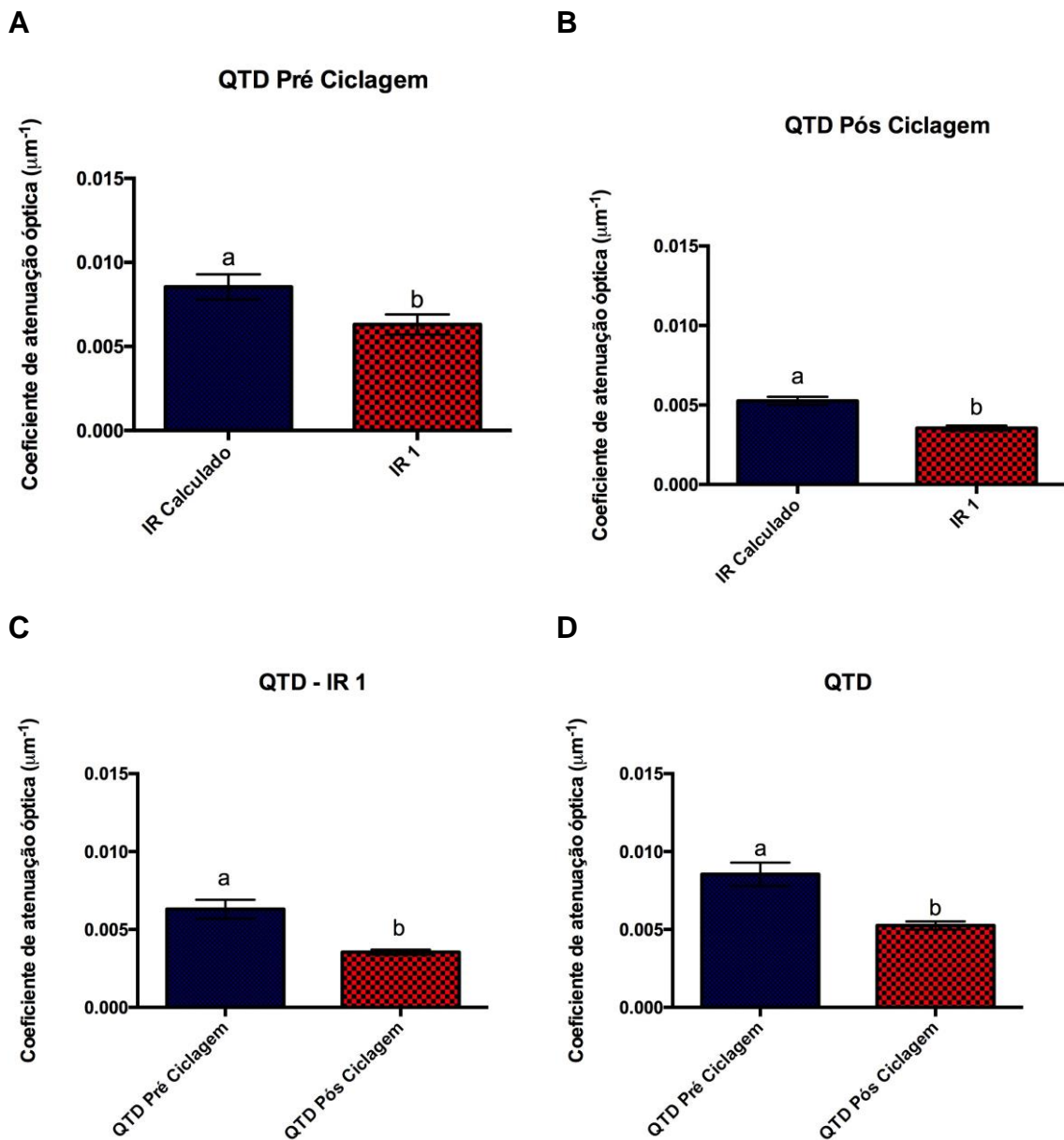
Figura 28- Coeficiente de atenuação óptica do grupo laser Q-switched com carvão como fotoabsorvedor dentina (QCD). (A) Comparação do coeficiente de atenuação óptica pré ciclagem calculado com índice de refração calculado e 1. (B) Comparação do coeficiente de atenuação óptica pós ciclagem calculado com índice de refração calculado e 1. (C) Comparação do coeficiente de atenuação óptica pré ciclagem e pós ciclagem calculado com índice de refração igual a 1. (D) Comparação do coeficiente de atenuação óptica pré ciclagem e pós ciclagem calculado com índice de refração igual calculado. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa.



Na Figura 29 em (A) e (B) observa-se que houve diferenças estatisticamente significantes entre os coeficientes de atenuação calculados com os índices de refração 1 e calculado. Já, em (C) e (D) observa-se que o resultado para o coeficiente de atenuação óptica do grupo laser Q-switched com fotoabsorvedor tinta de lula na dentina modificou quando foi utilizado o valor correto do índice de

refração, no entanto, o comportamento do coeficiente de atenuação pré e pós ciclagem não foi alterado.

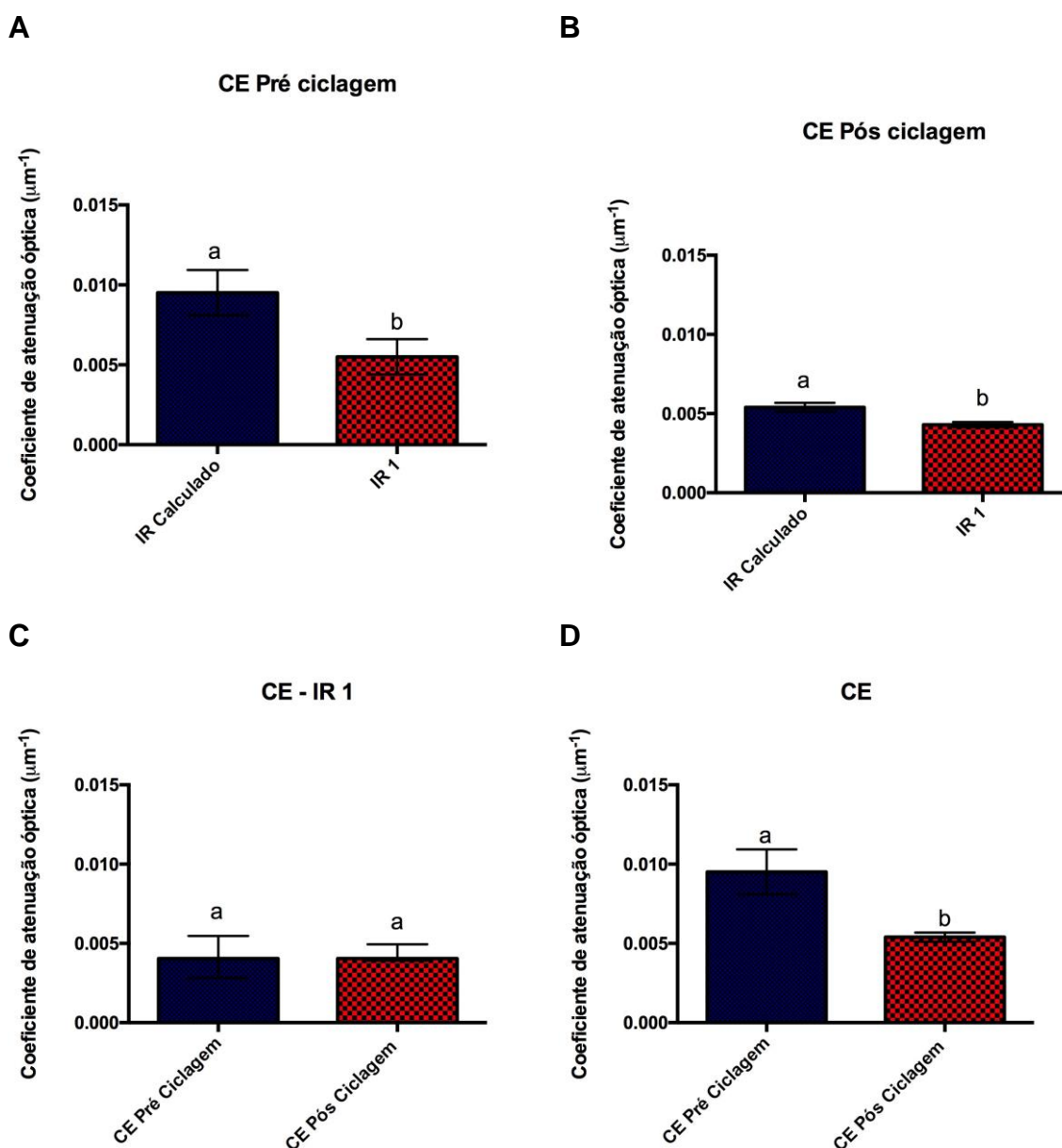
Figura 29- Coeficiente de atenuação óptica do grupo laser Q-switched com tinta de lula como fotoabsorvedor dentina (QTD). (A) Comparação do coeficiente de atenuação óptica pré ciclagem calculado com índice de refração calculado e 1. (B) Comparação do coeficiente de atenuação óptica pós ciclagem calculado com índice de refração calculado e 1. (C) Comparação do coeficiente de atenuação óptica pré ciclagem e pós ciclagem calculado com índice de refração igual a 1. (D) Comparação do coeficiente de atenuação óptica pré ciclagem e pós ciclagem calculado com índice de refração igual calculado. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa.



Na Figura 30 em (A) e (B) observa-se que houve diferenças estatisticamente significantes entre os coeficientes de atenuação calculados com os índices de

refração 1 e calculado. Já, em (C) e (D) observa-se que o resultado para o coeficiente de atenuação óptica do grupo controle esmalte modificou quando foi utilizado o valor correto do índice de refração. Em (C) não foi observada mudança estatisticamente significativa comparando-se os grupos de coeficiente de atenuação calculados com índice de refração igual a 1 e calculado. Em (D) observou-se que houve diferença estatisticamente significativa entre pré e pós ciclagem e uma diminuição no pós ciclagem, indicando que houve desmineralização. Assim, pode-se citar a importância de se utilizar o valor calculado para o índice de refração.

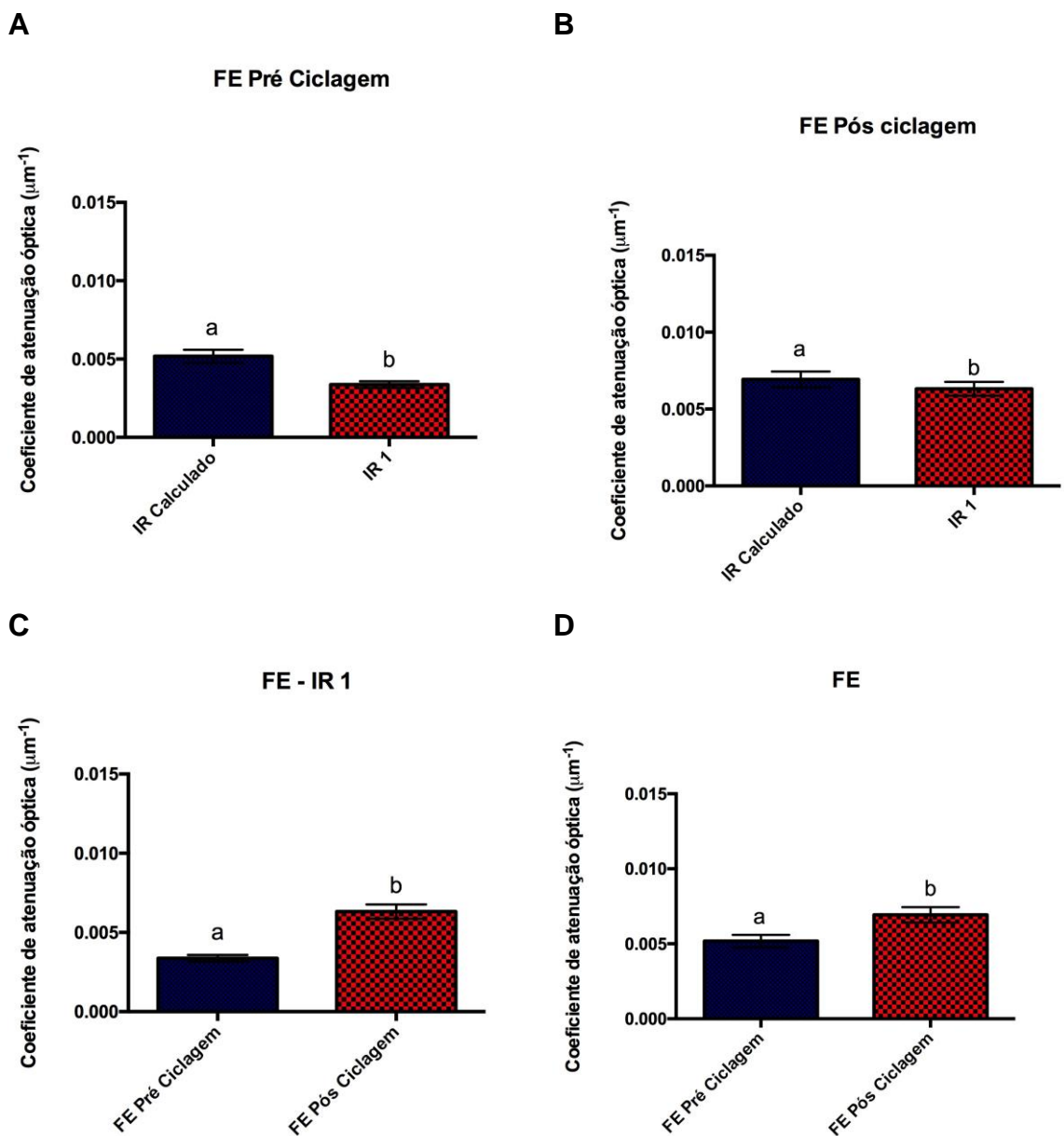
Figura 30- Coeficiente de atenuação óptica do grupo controle esmalte (CE). (A) Comparação do coeficiente de atenuação óptica pré ciclagem calculado com índice de refração calculado e 1. (B) Comparação do coeficiente de atenuação óptica pós ciclagem calculado com índice de refração calculado e 1. (C) Comparação do coeficiente de atenuação óptica pré ciclagem e pós ciclagem calculado com índice de refração igual a 1. (D) Comparação do coeficiente de atenuação óptica pré ciclagem e pós ciclagem calculado com índice de refração igual calculado. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa.



Na Figura 31 em (A) e (B) observa-se que houve diferenças estatisticamente significantes entre os coeficientes de atenuação calculados com os índices de refração 1 e calculado. Já, em (C) e (D) observa-se que o resultado para o coeficiente de atenuação óptica do grupo flúor esmalte modificou quando foi utilizado o valor correto do índice de refração. Em (D) observou-se que houve

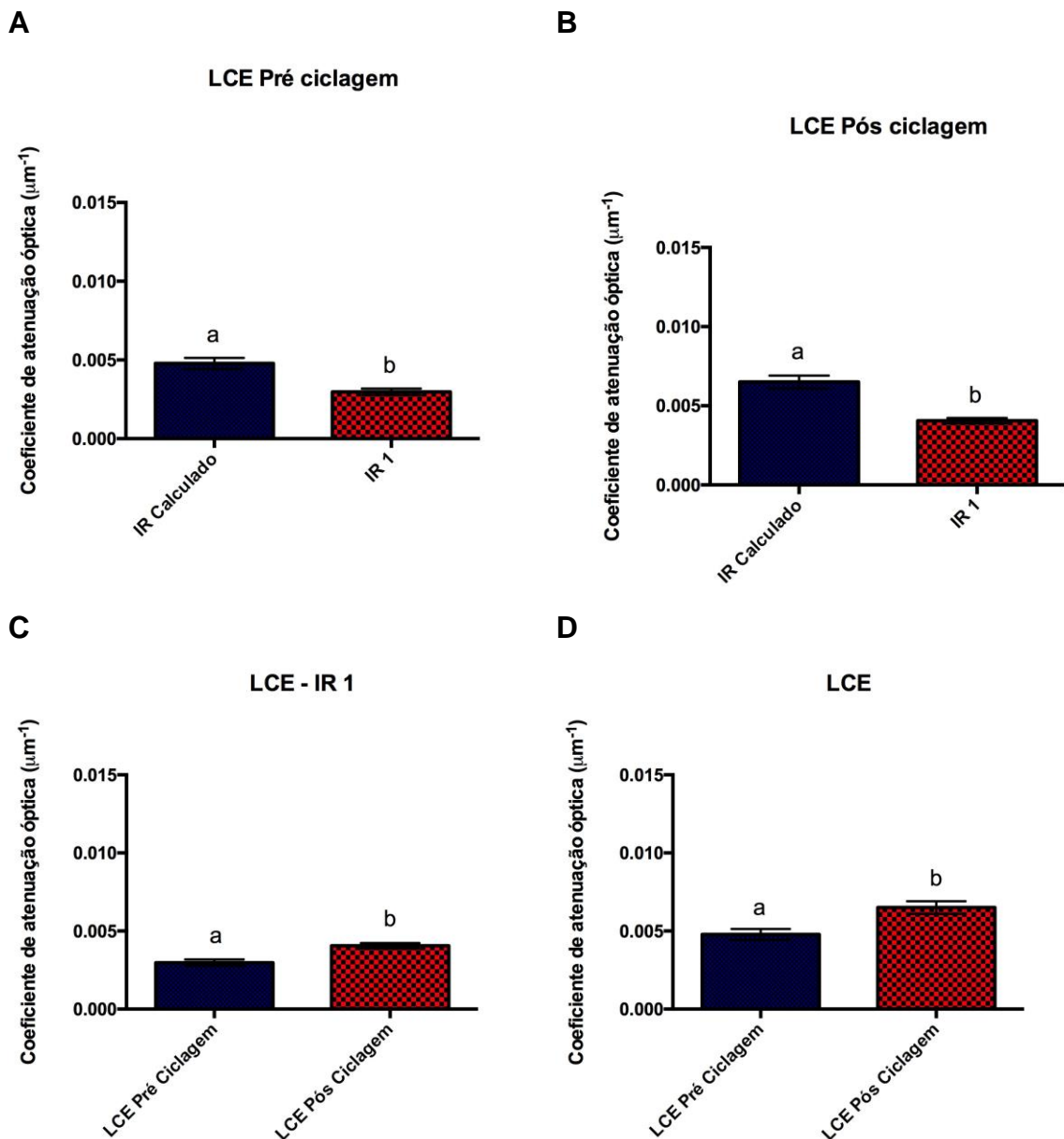
diferença estatisticamente significativa entre pré e pós ciclagem e um aumento no pós ciclagem, indicando que não houve desmineralização. Assim, pode-se citar a importância de se utilizar o valor calculado para o índice de refração.

Figura 31- Coeficiente de atenuação óptica do grupo flúor esmalte (FE). (A) Comparação do coeficiente de atenuação óptica pré ciclagem calculado com índice de refração calculado e 1. (B) Comparação do coeficiente de atenuação óptica pós ciclagem calculado com índice de refração calculado e 1. (C) Comparação do coeficiente de atenuação óptica pré ciclagem e pós ciclagem calculado com índice de refração igual a 1. (D) Comparação do coeficiente de atenuação óptica pré ciclagem e pós ciclagem calculado com índice de refração igual calculado. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa.



Na Figura 32 em (A) e (B) observa-se que houve diferenças estatisticamente significantes entre os coeficientes de atenuação calculados com os índices de refração 1 e calculado. Já, em (C) e (D) observa-se que o resultado para o coeficiente de atenuação óptica do grupo laser Nd:YAG com fotoabsorvedor carvão no esmalte modificou quando foi utilizado o valor correto do índice de refração, no entanto, o comportamento não foi alterado.

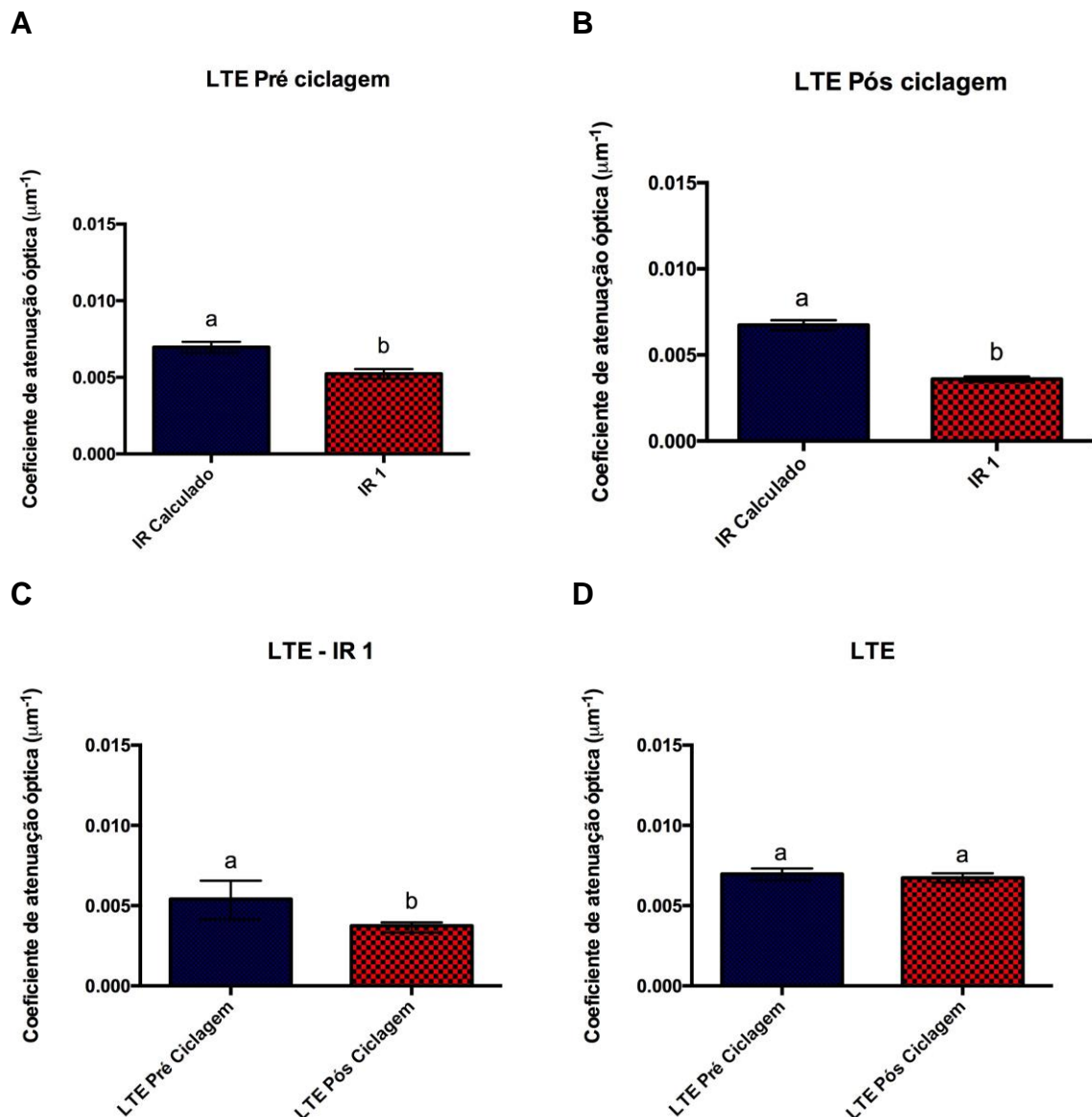
Figura 32- Coeficiente de atenuação óptica do grupo laser Nd:YAG com carvão como fotoabsorvedor esmalte (LCE). (A) Comparação do coeficiente de atenuação óptica pré ciclagem calculado com índice de refração calculado e 1. (B) Comparação do coeficiente de atenuação óptica pós ciclagem calculado com índice de refração calculado e 1. (C) Comparação do coeficiente de atenuação óptica pré ciclagem e pós ciclagem calculado com índice de refração igual a 1. (D) Comparação do coeficiente de atenuação óptica pré ciclagem e pós ciclagem calculado com índice de refração igual calculado. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa.



Na Figura 33 em (A) e (B) observa-se que houve diferenças estatisticamente significantes entre os coeficientes de atenuação calculados com os índices de refração 1 e calculado. Já, em (C) e (D) observa-se que o resultado para o coeficiente de atenuação óptica do grupo laser Nd:YAG com fotoabsorvedor tinta de lula no esmalte modificou quando foi utilizado o valor correto do índice de

refração, e neste caso não houve diferença estatisticamente significativa entre pré e pós ciclagem quando foi utilizado o índice de refração calculado.

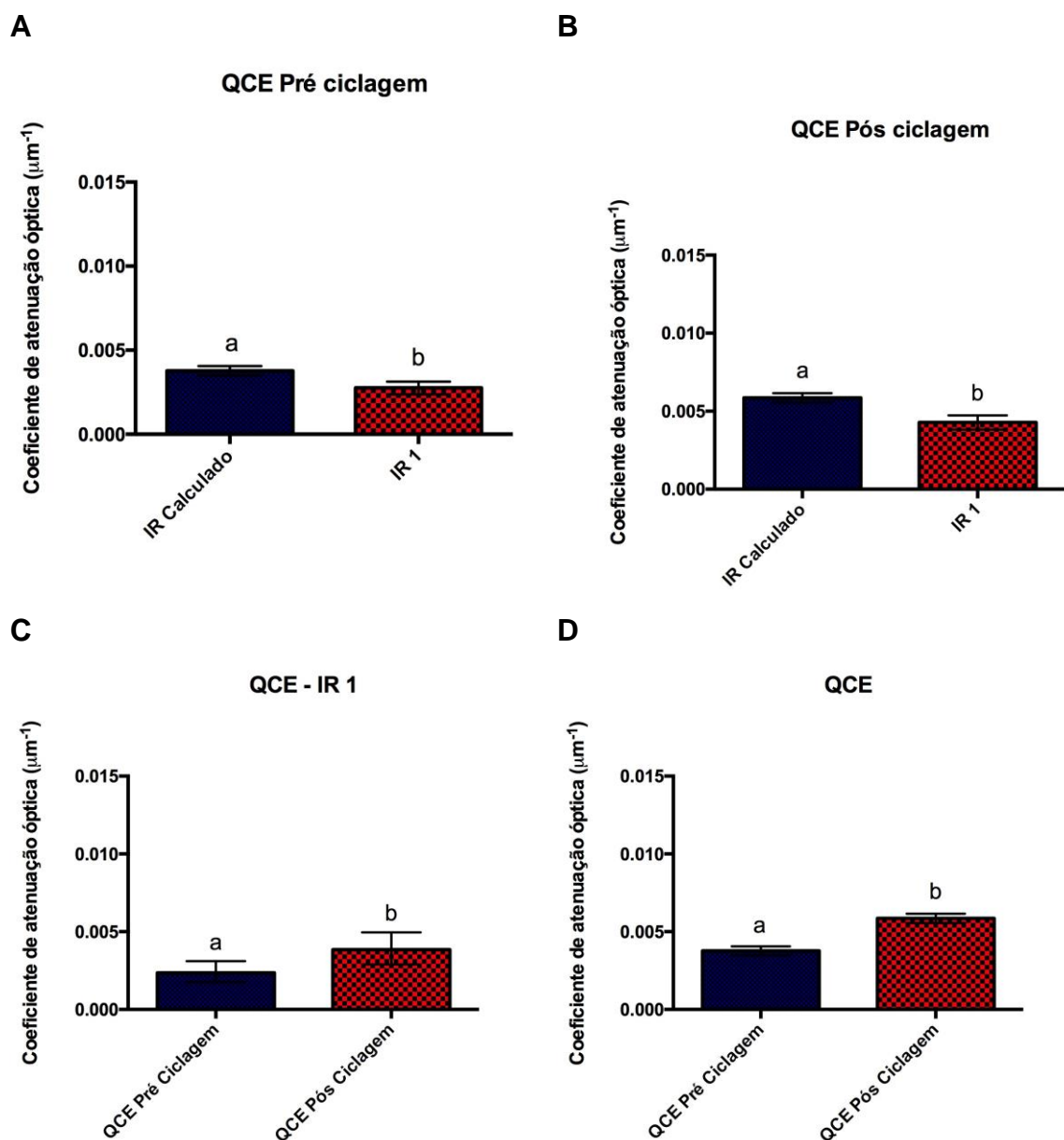
Figura 33- Coeficiente de atenuação óptica do grupo laser Nd:YAG com tinta de lula como fotoabsorvedor esmalte (LTE). (A) Comparação do coeficiente de atenuação óptica pré ciclagem calculado com índice de refração calculado e 1. (B) Comparação do coeficiente de atenuação óptica pós ciclagem calculado com índice de refração calculado e 1. (C) Comparação do coeficiente de atenuação óptica pré ciclagem e pós ciclagem calculado com índice de refração igual a 1. (D) Comparação do coeficiente de atenuação óptica pré ciclagem e pós ciclagem calculado com índice de refração igual calculado. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa.



Na Figura 34 em (A) e (B) observa-se que houve diferenças estatisticamente significantes entre os coeficientes de atenuação calculados com os índices de refração 1 e calculado. Já, em (C) e (D) observa-se que o resultado para o

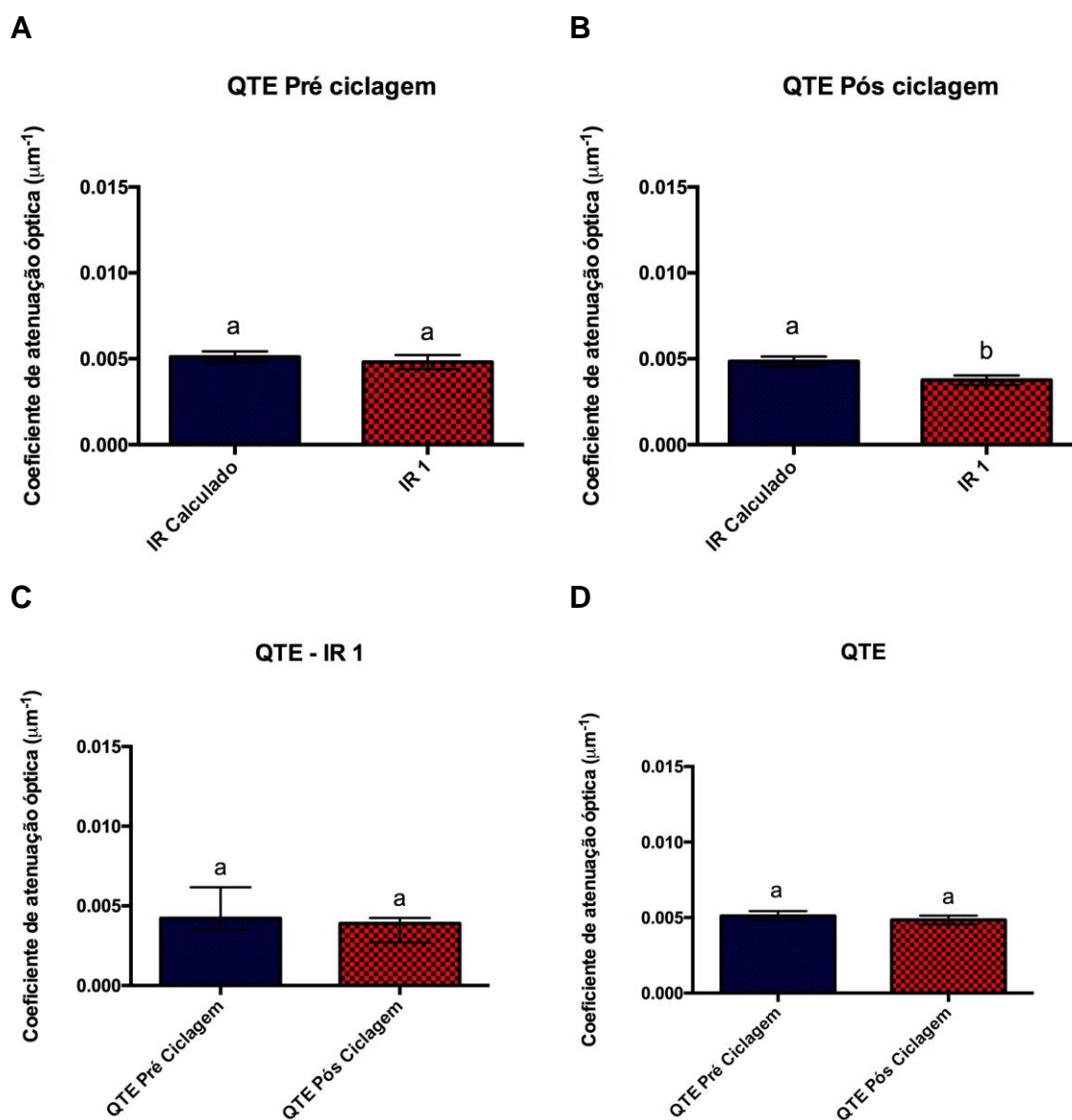
coeficiente de atenuação óptica do grupo laser Q-switched com fotoabsorvedor carvão no esmalte modificou quando foi utilizado o valor correto do índice de refração, no entanto, o comportamento não foi alterado.

Figura 34- Coeficiente de atenuação óptica do grupo laser Q-switched com carvão como fotoabsorvedor esmalte (QCE). (A) Comparação do coeficiente de atenuação óptica pré ciclagem calculado com índice de refração calculado e 1. (B) Comparação do coeficiente de atenuação óptica pós ciclagem calculado com índice de refração calculado e 1. (C) Comparação do coeficiente de atenuação óptica pré ciclagem e pós ciclagem calculado com índice de refração igual a 1. (D) Comparação do coeficiente de atenuação óptica pré ciclagem e pós ciclagem calculado com índice de refração igual calculado. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significante.



Na Figura 35 em (A) observa-se que não houve diferença estatisticamente significativa entre os coeficientes de atenuação calculados com os índices de refração 1 e calculado. Em (B) foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos de coeficiente de atenuação calculados com os dois índices de refração. Já, em (C) e (D) observa-se que o resultado para o coeficiente de atenuação óptica do grupo laser Q-switched com fotoabsorvedor tinta de lula no esmalte modificou quando foi utilizado o valor correto do índice de refração, no entanto, o comportamento não foi alterado.

Figura 35- Coeficiente de atenuação óptica do grupo laser Q-switched com tinta de lula como fotoabsorvedor esmalte (QTE). (A) Comparação do coeficiente de atenuação óptica pré ciclagem calculado com índice de refração calculado e 1. (B) Comparação do coeficiente de atenuação óptica pós ciclagem calculado com índice de refração calculado e 1. (C) Comparação do coeficiente de atenuação óptica pré ciclagem e pós ciclagem calculado com índice de refração igual a 1. (D) Comparação do coeficiente de atenuação óptica pré ciclagem e pós ciclagem calculado com índice de refração igual calculado. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa.



De acordo com a literatura, o aumento do valor do coeficiente de atenuação óptica após uma ciclagem de desmineralização pode ocorrer por conta do aumento de espaços no tecido desmineralizado e conseqüentemente menor penetração da luz e aumento do espalhamento e por fim, aumento do coeficiente de atenuação óptica ^{38,40}. Entretanto, outros trabalhos citam que após a desmineralização o coeficiente de atenuação óptica diminui por causa dos espaços criados pós-

desmineralização, a luz penetra mais no tecido e o espalhamento é diminuído e assim, obtém-se menor coeficiente de atenuação óptica ^{13,41-43}.

6.4 Conclusão

Foi possível calcular o coeficiente de atenuação óptica de todas as amostras avaliadas. Através da comparação dos índices de refração observou-se durante a aquisição da imagem é importante que seja utilizado o índice de refração apropriado para o tipo de tecido e tratamento ao qual a amostra tenha sido submetida.

Observou-se também que com exceção do grupo LTD, o fotoabsorvedor tinta de lula foi mais eficiente durante a irradiação com os dois tipos de laser porque os tecidos não foram desmineralizados durante a ciclagem de pH.

Assim, pode-se ressaltar a importância de se utilizar o índice de refração correto para o tipo de tecido em análise.

7 ANÁLISE DA VARIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA

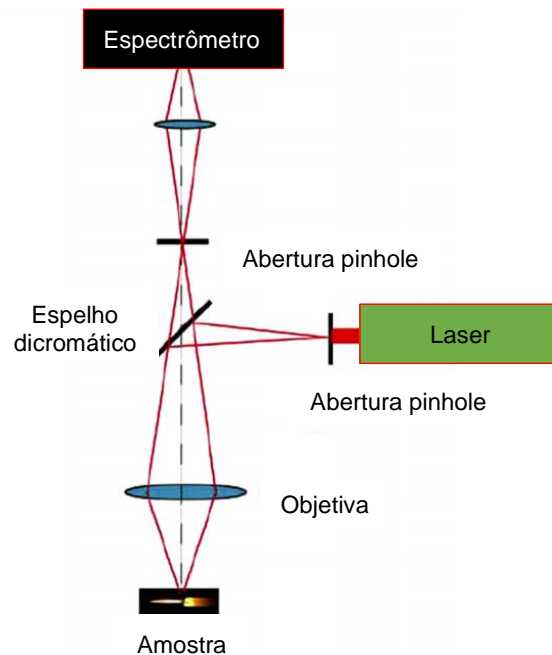
7.1 Introdução

Recentemente a microscopia confocal tem sido utilizada como uma técnica analítica mais eficiente do que a microscopia óptica. No microscópio confocal a imagem é detectada através de um pequeno *pinhole* que é colocado na frente do detector. Se a amostra é focalizada por uma fonte coerente como o laser, a imagem será detectada através do *pinhole*. Ou seja, o *pinhole* é confocal com o spot de iluminação e está localizado no plano da imagem do microscópio. Assim, a aquisição da imagem é feita ponto a ponto da amostra ou linha por linha. Ao contrário da microscopia convencional, a amostra não é iluminada de forma homogênea dentro de um campo de visão já que a iluminação é feita por um feixe laser que tem comportamento gaussiano. A luz espalhada ou emitida pelo spot é coletada e colimada na mesma lente objetiva e então é focalizada pelo *pinhole* e direcionada ao detector. Dessa forma, o *pinhole* atua como um seletor de profundidade já que apenas a luz originada do ponto focal terá seu foco dentro do *pinhole* e poderá atingir o detector. A luz de outras profundidades da amostra, acima ou abaixo do plano focal não é colimada pela lente objetiva e conseqüentemente será desfocada no *pinhole*. Assim, tudo que está fora do foco se torna um ponto escuro na imagem.

Este método foi criado em 1955 e patenteado em 1961 por M. Minsky do Massachusetts Institute of Technology (MIT) com o objetivo de evitar a necessidade de se fazer um corte muito fino do tecido cerebral. O uso da técnica foi difundido mais tarde quando já haviam lasers e computadores acessíveis e com alto poder de processamento para a aquisição das imagens.

Atualmente a técnica é muito utilizada em Ciências da vida pois se utiliza apenas da luz e pode ser facilmente combinada com outras técnicas que também façam uso da luz como por exemplo a espectroscopia. A estrutura da espectroscopia Raman associada a microscopia confocal é mostrada na Figura 36. Ao mesmo tempo que se faz a aquisição da imagem da amostra é possível analisar as substâncias que a compõe quimicamente por causa do seu espectro característico Raman.

Figura 36- Estrutura esquemática da espectroscopia Raman associada a microscopia confocal.



Assim, a principal vantagem da microscopia confocal em relação a convencional é a alta resolução em profundidade, o que foi muito importante para esta parte do trabalho que buscou investigar as modificações promovidas pelos tratamentos tanto na superfície quanto na profundidade do material.

A espectroscopia Raman é uma técnica que pode ser utilizada para caracterizar quimicamente uma amostra. Trata-se de uma técnica óptica que usa uma fonte monocromática de luz a qual, ao atingir um objeto, é espalhada por ele, gerando luz de mesma energia (espalhamento elástico) ou de energia diferente da energia incidente (espalhamento inelástico). Então a diferença entre as frequências de luz incidida e espalhada corresponde a energia com que os átomos presentes no material estão vibrando, o que permite identificar as espécies químicas presentes, ter a informação de como interagem entre si, como os seus átomos estão ligados e também sobre a geometria molecular¹⁶. Com esta técnica foi possível analisar as diferenças químico-estruturais entre tecidos duros dentais bovinos irradiados e não irradiados com laser de Nd:YAG.

A junção da espectroscopia Raman e a microscopia confocal fornece muitas informações importantes do objeto analisado, inclusive tecidos biológicos, em profundidade. Esta informação não é fornecida por microscópios convencionais ou

eletrônicos. Deve-se considerar alguns fatores importantes do acoplamento óptico entre o microscópio e o espectrômetro, como o ajuste da luz do microscópio ao espectrômetro, os espelhos utilizados de forma a evitar perda de sinal, entre outros fatores.

Neste capítulo, a espectroscopia Raman confocal foi utilizada para avaliar as modificações químicas promovidas pelos tratamentos superficialmente e em profundidade também.

7.2 Materiais e Métodos

Para esta etapa do estudo foram utilizados 30 blocos de esmalte e 30 blocos de dentina bovinos.

Esses blocos foram aleatoriamente distribuídos em 12 grupos experimentais (n=5):

- Grupo **CD**: Amostras de dentina bovina sem tratamento (controle negativo)
- Grupo **FD**: Amostras de dentina bovina com aplicação de FFA (FFA fosfato acidulado- FFA) (controle positivo)
- Grupo **LCD**: Amostras de dentina bovina irradiadas com fotoabsorvedor carvão e laser de Nd:YAG Power™ ST6 (Lares Research®, Estados Unidos) com potência de 0,6 W, taxa de repetição de 10 Hz, diâmetro do spot de 300 µm, energia de pulso de 60 mJ, densidade de energia de 84,9 J/cm², duração de pulso de 120 µs.
- Grupo **LTD**: Amostras de dentina bovina irradiadas com fotoabsorvedor tinta de lula e mesmo laser utilizado no grupo LCD.
- Grupo **QCD**: Amostras de dentina bovina irradiadas com fotoabsorvedor carvão e laser de Nd:YAG Q-Switched com potência de 4 W, taxa de repetição de 20 Hz, diâmetro do spot de 5 mm,

energia de pulso de 200 mJ, densidade de energia de 1,05 J/cm², duração de pulso de 5 ns.

- Grupo **QTD**: Amostras de dentina bovina irradiadas com fotoabsorvedor tinta de lula e mesmo laser utilizado no grupo QCD.
- Grupo **CE**: Amostras de esmalte bovino sem tratamento (controle negativo)
- Grupo **FE**: Amostras de esmalte bovino com aplicação de FFA (FFA fosfato acidulado- FFA) (controle positivo)
- Grupo **LCE**: Amostras de esmalte bovino irradiadas com fotoabsorvedor carvão e laser de Nd:YAG Power™ ST6 (Lares Research®, Estados Unidos) com potência de 0,6 W, taxa de repetição de 10 Hz, diâmetro do spot de 300 µm, energia de pulso de 60 mJ, densidade de energia de 84,9 J/cm², duração de pulso de 120 µs.
- Grupo **LTE**: Amostras de esmalte bovino irradiadas com fotoabsorvedor tinta de lula e mesmo laser utilizado no grupo LCE.
- Grupo **QCE**: Amostras de esmalte bovino irradiadas com fotoabsorvedor carvão e laser de Nd:YAG Q-Switched com potência de 4 W, taxa de repetição de 20 Hz, diâmetro do spot de 5 mm, energia de pulso de 200 mJ, densidade de energia de 1,05 J/cm², duração de pulso de 5 ns.
- Grupo **QTE**: Amostras de esmalte bovino irradiadas com fotoabsorvedor tinta de lula e mesmo laser utilizado no grupo QCE.

Antes de iniciar a irradiação dos grupos LCD, LCE, QCD e QCE, grupos que fazem uso do carvão como fotoabsorvedor, as amostras foram recobertas por uma pasta composta por carvão vegetal finamente triturado diluído em etanol e água

deionizada na proporção de 1:1. A aplicação da pasta de carvão foi feita em toda a superfície da amostra formando uma camada homogênea com auxílio de um microbrush (KG Sorensen, Brasil). Também antes de iniciar a irradiação dos grupos LTD, LTE, QTD e QTE, grupos que fazem uso da tinta de lula como fotoabsorvedor, as amostras foram recobertas por uma pasta composta por tinta de lula de uso culinário comercial diluída em etanol e água deionizada na proporção de 1:1. A aplicação da tinta de lula foi feita em toda a superfície da amostra formando uma camada homogênea com auxílio de um microbrush (KG Sorensen, Brasil).

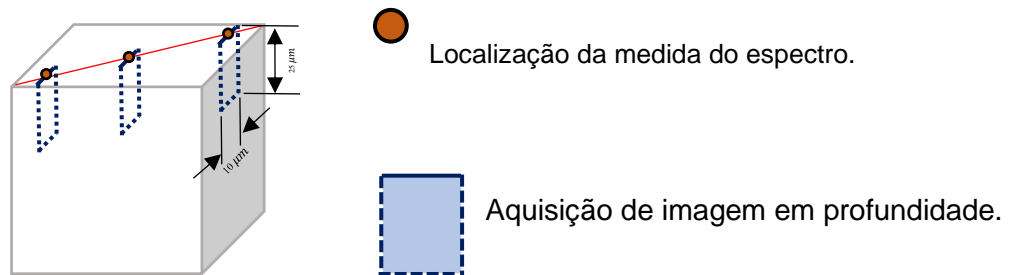
As amostras dos grupos LCD, LTD, LCE e LTE foram irradiadas com o *laser* de Nd:YAG Power™ ST6 (Lares Research®, Estados Unidos) por contato e com a sobreposição dos pulsos em 50% utilizando o motor de passo com o objetivo de padronizar a irradiação. Ajustado conforme discriminado acima ^{13,20}.

A potência real foi aferida utilizando-se um medidor de potência (Newport, Estados Unidos) a cada três amostras irradiadas.

Enquanto as amostras dos grupos QCD, QTD, QCE e QTE foram irradiadas com o *laser Q-switched* Nd:YAG Brilliant Brill IR/10 (Quantel Laser, França), ajustado conforme protocolo obtido em experimento piloto prévio e descrito acima.

Após os tratamentos, foram realizadas medidas de espectroscopia Raman no espectrômetro equipado com microscópio confocal Raman modelo Witec Alpha 300R (Witec, Alemanha) de propriedade do MackGraphe na Univerddidade Presbiteriana Mackenzie. Foram feitas medidas utilizando o *laser* verde ($\lambda = 532 \text{ nm}$) e com a grade de difração de 600 g/mm ^{45,46}. Foi feita a aquisição dos espectros e também das imagens em três pontos da amostra, conforme ilustração (Figura 37) a seguir.

Figura 37- Metodologia utilizada para a aquisição de espectros e imagens no espectrômetro Raman.



Fonte: Autora da tese.

A aquisição dos espectros foi feita com tempo de integração de 0,8 s e 50 acumulações. As imagens foram adquiridas no tamanho de 10 μm de largura X 25 μm de profundidade com 150 linhas por imagem e 150 pontos por linha.

O processamento dos espectros foi feito utilizando-se um algoritmo no Matlab que primeiramente busca minimizar os efeitos de fluorescência com correções quimiométricas ^{47,48}, posteriormente foi feita suavização de Savitzky-Golay de ordem polinomial 2 e janela de 13 pontos. E então foram obtidas as figuras de intensidade para a região do fosfato do espectro.

7.2.2 Tratamento das amostras

7.2.2.1 Aplicação de Flúor Fosfato Acidulado (FFA) nas amostras

O flúor é amplamente utilizado com o objetivo de tornar o tecido dental mais resistente aos ácidos e prevenir e estabilizar lesões causadas por desmineralização do tecido dental. Assim, os grupos com aplicação de flúor são os grupos controle positivo deste estudo. As amostras dos grupos com aplicação de flúor (FD e FE), receberam aplicação de FFA com 1,23% F^- e pH 3,3-3,9 (Nova DFL, Brasil) durante 4 minutos ³⁴. A aplicação foi feita com um *microbrush* (KG Sorensen, Brasil) e transcorrido esse tempo, as amostras foram lavadas com água deionizada por 1 minuto e secas suavemente com jato de ar comprimido.

7.2.3 Análise Estatística

Neste capítulo as variáveis resposta analisadas foram variação química através da quantificação do fosfato na dentina e esmalte de acordo com as profundidades do tecido e também da hidroxiprolina na dentina. As análises foram realizadas utilizando-se o *software* de estatística GraphPad Prism 6.0 para MAC OS X (GraphPad Software, Estados Unidos).

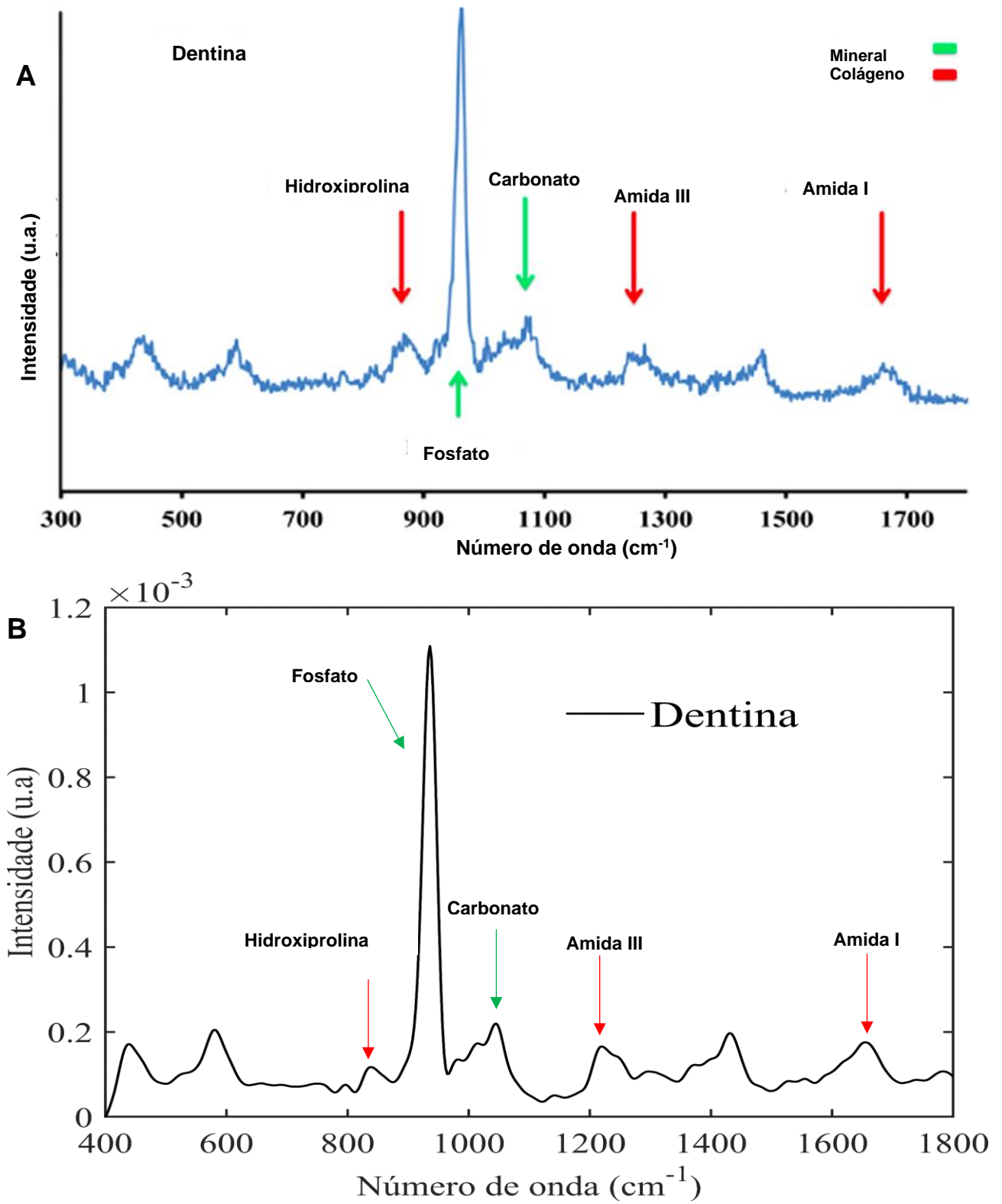
Para a seleção do teste estatístico mais apropriado para a análise em questão, primeiramente foram testadas as três pressuposições principais para validar uma possível análise de variância: independência, normalidade e homogeneidade de variâncias dos dados experimentais. A independência foi garantida pela forma que o experimento foi executado. A normalidade foi detectada utilizando-se o teste de Shapiro- Wilk com nível de significância de 5%. A homogeneidade foi avaliada pelo teste de D'Agostino & Pearson também com 5% para o nível de significância.

Em todas as variáveis resposta foram detectadas distribuições não normais dos dados e então, utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis *post hoc* Teste de Dunn para verificar a diferença composicional entre as profundidades de cada grupo com nível de significância de 5%.

7.3 Resultados e Discussão

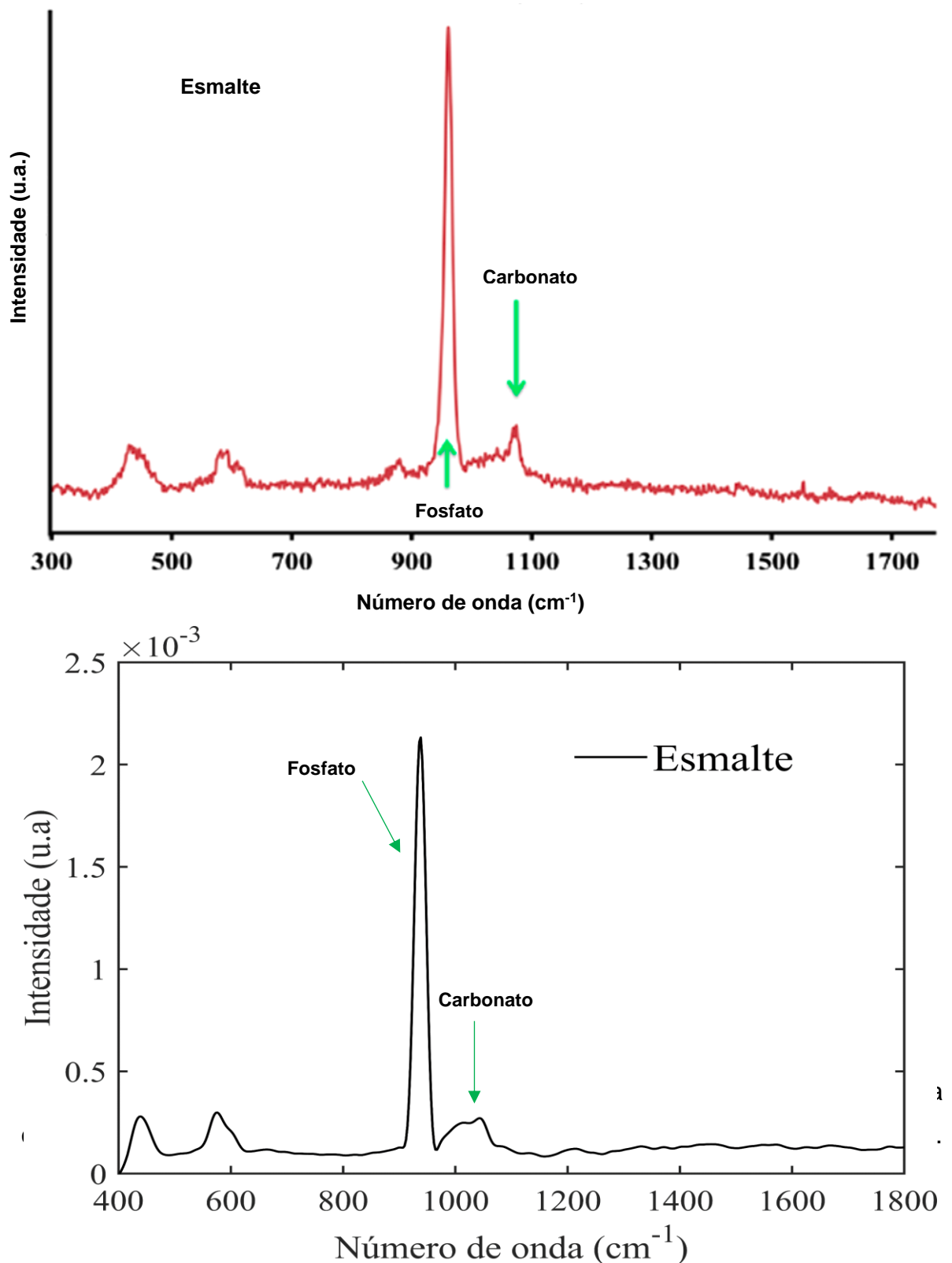
Na Figura 38 observa-se o espectro Raman de dentina adquirido com o mapeamento dos picos característicos Raman em comparação com a literatura⁴⁵. Ambos espectros Raman apresentam as mesmas bandas, o que valida a metodologia utilizada neste trabalho.

Figura 38- Mapeamento do tecido dentina utilizando Espectroscopia Raman Confocal. (A) Espectro Raman de dentina e mapeamento obtido da literatura. Adaptado de Slimani, 2017⁴⁵. (B) Espectro Raman de dentina e mapeamento obtidos neste trabalho.



Na Figura 39 observa-se o espectro Raman do esmalte adquirido com o mapeamento dos picos característicos Raman em comparação com a literatura⁴⁵. Ambos espectros Raman apresentam as mesmas bandas, o que valida a metodologia utilizada neste trabalho.

Figura 39- Mapeamento do tecido esmalte utilizando Espectroscopia Raman Confocal. (A) Espectro Raman de esmalte e mapeamento obtido da literatura. Adaptado de Slimani, 2017⁴⁵. (B) Espectro Raman de esmalte e mapeamento obtidos neste trabalho.



Foram observados alguns picos Raman deslocados em relação a literatura, no entanto, este pode se dar por conta da correção da linha de base realizada no pré processamento dos dados.

Tabela 8- Tabela de atribuição dos picos Raman detectados em esmalte e dentina. Comparação entre a literatura e os resultados deste trabalho.

Número de onda (cm ⁻¹) e bandas do espectro Raman de esmalte e dentina hígidos	Esmalte (cm ⁻¹)		Dentina (cm ⁻¹)	
	Slimani, 2017	Este Trabalho	Slimani, 2017	Este Trabalho
ν_2 Fosfato (PO ₄ ³⁻)	433	436,8	432	439
ν_4 Fosfato (PO ₄ ³⁻)	(579-608)	(576-578)	(580-610)	(545,7-582,2)
ν_1 Fosfato (PO ₄ ³⁻)	959	938,5	959	936,1
Hidroxiprolina				837,2
ν_1 Carbonato tipo B (CO ₃ ²⁻)	1071	1009	1069	988,1
ν_1 Carbonato tipo A (CO ₃ ²⁻)	1103	1036	1102	1012
(NH) Amida III			1243	1220
(NH) Amida III tripla hélice de colágeno não polar			1275	1300
Deformação CH			1450	1430
Amida I (C=O)			1665	1657
Pentosidina			1550	1527
AGEs			1550-1690	1527-1566

Fonte: Adaptado de Slimani *et al*, 2017.

Os espectros representativos de cada grupo de acordo com a profundidade se encontram no apêndice desse trabalho.

Na Tabela 9 estão descritos os valores de área sob a curva do espectro da dentina na região do fosfato (936,1).

Tabela 9- Comparações realizadas entre as quantidades de fosfato calculadas através da área sob a curva do espectro Raman dos grupos de dentina. pelo teste de Kruskal-Wallis *post hoc* Teste de Dunn dos grupos de estudo em diferentes profundidades. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ao nível de 5%.

	CD	FD	LCD	LTD	QCD	QTD
0-5 μm	14,39±6,6 ^a	20,55±10,82 ^a	46,63±16,99 ^a	10,65±5,19 ^a	15,66±7,80 ^a	43,35±15,35 ^a
5-10 μm	13,68±6,41 ^b	69,54±36,72 ^b	45,07±15,97 ^{a,b}	11,31±5,42 ^b	13,77±6,81 ^b	42,07±14,20 ^a
10-15 μm	13,08±6,17 ^c	31,40±16,19 ^c	46,28±16,26 ^{a,b}	12,63±6,26 ^c	14,08±7,04 ^b	40,31±13,79 ^{b,c}
15-20 μm	11,91±5,94 ^d	18,82±9,50 ^d	44,10±15,43 ^b	17,01±8,54 ^d	13,52±6,90 ^{b,c}	40,42±13,50 ^{b,c}

20-25 μm	12,14 \pm 6,06 ^d	14,83 \pm 7,13 ^e	44,85 \pm 15,93 ^b	32,19 \pm 17,74 ^e	13,04 \pm 6,43 ^c	39,54 \pm 13,20 ^c
---------------------	-------------------------------	-------------------------------	--------------------------------	--------------------------------	-------------------------------	--------------------------------

É possível observar que no grupo CD houve diferença estatisticamente significativa até 15 μm de profundidade e depois até 25 μm não houve diferença entre os grupos. No grupo flúor FD houve diferença estatisticamente significativa entre todos os grupos. Já no grupo irradiados LCD o efeito do calor do laser e as modificações estruturais promovidas por ele se dá até a profundidade de 15 μm já que a partir desta profundidade o valor da área começa a diminuir. Em LTD há diferença estatística significativa entre todos os grupos e o valor da área não diminui, o que sugere que o efeito do laser se prolongou para mais de 25 μm de profundidade. Em QCD apenas a camada mais superficial (0-5 μm de profundidade) se diferencia significativamente das outras e tem valor de área maior, em QTD a camada de 0 à 10 μm tem valor de área maior e se diferencia significativamente das outras. Assim, pode-se sugerir que o laser Q-switched Nd:YAG tem efeito mais superficial na dentina.

Na Tabela 10 estão descritos os valores de área sob a curva do espectro da dentina na região da hidroxiprolina (837,2). A hidroxiprolina⁴⁹ é componente do colágeno, está presente na dentina e tem seu pico Raman bem definido. Observou-se que nos grupos sem irradiação laser e no grupo LTD houve diferença estatisticamente significativa entre todas as profundidades do tecido com relação a quantidade de hidroxiprolina.

Tabela 10- Comparações realizadas entre as quantidades de hidroxiprolina calculadas através da área sob a curva do espectro Raman dos grupos de dentina. pelo teste de Kruskal-Wallis *post hoc* Teste de Dunn dos grupos de estudo em diferentes profundidades. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ao nível de 5%.

	CD	FD	LCD	LTD	QCD	QTD
0-5 μm	7,51 \pm 4,49 ^a	10,93 \pm 6,93 ^a	25,47 \pm 10,03 ^{a,b}	4,68 \pm 2,90 ^a	6,52 \pm 4,04 ^a	22,52 \pm 9,13 ^a
5-10 μm	7,01 \pm 4,00 ^b	46,83 \pm 29,75 ^b	24,79 \pm 10,11 ^{a,d}	5,06 \pm 3,19 ^b	5,98 \pm 3,73 ^b	21,36 \pm 8,69 ^b
10-15 μm	6,44 \pm 3,73 ^c	17,18 \pm 10,97 ^c	25,76 \pm 10,08 ^b	5,45 \pm 3,43 ^c	5,71 \pm 3,51 ^b	20,42 \pm 8,13 ^c
15-20 μm	5,67 \pm 3,29 ^d	9,77 \pm 6,12 ^d	24,70 \pm 10 ^{c,d}	7,27 \pm 4,61 ^d	5,74 \pm 3,51 ^b	20,30 \pm 8,58 ^c
20-25 μm	6,05 \pm 3,63 ^e	7,73 \pm 4,77 ^e	24,85 \pm 10,17 ^{a,c}	14,21 \pm 9,41 ^e	5,75 \pm 3,51 ^b	20,58 \pm 8,20 ^{b,c}

Na Tabela 11 estão descritos os valores de área sob a curva do espectro da dentina na região do fosfato (938,5).

É possível observar que no grupo CE houve diferença estatisticamente significativa até 15 μm de profundidade. No grupo flúor FE houve diferença estatisticamente significativa até 10 μm de profundidade. Em LCE, QCE e QTE notou-se diferença significativa até 10 μm de profundidade também. No entanto, LTE, assim como em LTD, apresentou diferença estatisticamente significativa entre todos os grupos. Porém, ao contrário de LTD, a quantidade de fosfato é reduzida a medida q se avança na profundidade.

Tabela 11- Comparações realizadas entre as quantidades de fosfato calculadas através da área sob a curva do espectro Raman dos grupos de esmalte. pelo teste de Kruskal-Wallis *post hoc* Teste de Dunn dos grupos de estudo em diferentes profundidades. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ao nível de 5%.

	CE	FE	LCE	LTE	QCE	QTE
0-5 μm	16,61±8,30 ^a	20,64±10,08 ^a	27,50±14,32 ^a	21,63±11,41 ^a	23,57±11,39 ^a	50,09±18,10 ^a
5-10 μm	17,69±8,81 ^b	22,59±11,17 ^b	18,13±8,91 ^b	20,22±10,53 ^b	24,96±11,68 ^b	47,37±17,21 ^b
10-15 μm	17,18±8,45 ^{a,b}	21,62±11,08 ^{a,c}	16,31±8,0 ^c	14,07±6,99 ^c	24,22±11,74 ^{a,b}	46,44±16,44 ^{b,c}
15-20 μm	17,51±8,99 ^b	21,90±10,81 ^{b,c}	15,51±7,55 ^c	13,31±6,74 ^d	23,49±11,35 ^a	45,40±16,34 ^c
20-25 μm	17,91±9,10 ^b	22,02±10,91 ^{b,c}	15,06±7,46 ^c	12,55±6,37 ^e	23,48±11,56 ^a	46,29±16,92 ^{b,c}

7.4 Conclusão

A análise química das amostras tratadas neste trabalho mostrou que há diferença composicional de acordo com a profundidade inclusive em tecidos hígidos. Nos tecidos irradiados, foi possível detectar qual é o alcance do efeito promovido pela irradiação laser com ambos os lasers e fotoabsorvedores.

Por fim, pode-se dizer que a técnica de espectroscopia confocal Raman foi eficiente na detecção de mudanças químicas e estruturais em tecidos duros dentais.

8 DISCUSSÃO GERAL

Os métodos de diagnóstico que se utilizam de técnicas ópticas permitem que doenças dentais como cárie e erosão dentária sejam detectadas precocemente e assim pode-se tratar ou paralisar a lesão antes que o tecido seja danificado.

No entanto, é importante que haja confiabilidade nos resultados fornecidos por essas técnicas. Dessa forma, o objetivo deste trabalho consistiu em determinar parâmetros seguros de irradiação através da análise da variação de temperatura superficial e pulpar e além disso caracterizar os tecidos duros dentais ópticamente, através das técnicas de OCT e Espectroscopia Raman e MEV.

A partir dos resultados obtidos pode-se afirmar que foram utilizados parâmetros seguros de irradiação para futuras aplicações clínicas dos protocolos abordados. A elevação da temperatura pulpar decorrente do aumento de temperatura causado pela irradiação não é suficiente para que a polpa dental seja danificada ou até necrosada.

A avaliação de temperatura superficial mostrou que a temperatura atingida pelos lasers irradiados com laser de Nd:YAG com largura de pulso da ordem de microssegundos foi suficiente para a promoção de alterações químicas, estruturais e morfológicas nos tecidos esmalte e dentina.

A avaliação da concentração de flúor indicou maior concentração de flúor na tinta de lula, fator que pode ser positivo quando se trata de prevenção a desmineralização pois o flúor, de acordo com a literatura, tem papel muito importante neste processo.

O estudo de variação de cor mostrou que a tinta de lula causa menor escurecimento na superfície dental do que o carvão, o que sugere que a tinta de lula pode ser um fotoabsorvedor promissor para ser usado na clínica odontológica.

Já a avaliação da morfologia demonstrou que o aumento de temperatura superficial decorrente da irradiação provocou alterações morfológicas na superfície do tecido dental bastante significativas e de grande importância para a prevenção de desmineralização do tecido duro dental.

Foi observado também que os fotoabsorvedores utilizados no trabalho absorvem quase 100% da irradiação laser Nd:YAG na região de comprimento de

onda de 1064 nm. Isso significa que quando os fotoabsorvedores são utilizados, a irradiação é eficiente e promove todos os efeitos esperados nos tecidos duros.

Posteriormente, o parâmetro óptico índice de refração dos tecidos irradiados foi determinado para todos os grupos e observou-se que o valor aumenta de acordo com a mineralização do tecido.

No cálculo do coeficiente de atenuação óptica destacou-se a importância de se utilizar o valor correto e adequado para o tecido em análise pois um índice de refração usado de maneira equivocada pode alterar significativamente o resultado como foi observado neste trabalho.

A análise química mostrou que há diferença composicional nos tecidos duros de acordo com sua profundidade e também através dela foi possível detectar até qual profundidade a irradiação laser promove mudanças químico-estruturais nos tecidos duros.

É importante salientar que a partir destes resultados foi possível prosseguir com análises por meio de técnicas ópticas acerca do tecido duro dental irradiado com lasers de Nd:YAG, com o objetivo de caracterizá-lo de forma a abranger todas as técnicas e melhorar cada vez mais a confiabilidade dos resultados fornecidos por métodos ópticos de diagnóstico já existentes ou até visar a criação de novas técnicas ópticas de diagnóstico ou tratamento.

9 CONCLUSÃO GERAL

De acordo com a metodologia empregada e os resultados obtidos no presente estudo, é possível concluir que:

- a. A variação da temperatura pulpar foi determinada e considerada segura para utilização *in vivo* para os lasers de Nd:YAG com larguras de pulso da ordem de nanossegundos e microssegundos e também com ambos fotoabsorvedores: carvão já utilizado e a tinta de lula proposta neste trabalho.
- b. Foi possível avaliar o escurecimento do tecido duro dental após a irradiação com dois fotoabsorvedores diferentes e observou-se que quando a tinta de lula é usada como fotoabsorvedor há um escurecimento menor da superfície tratada do que quando o carvão é utilizado.
- c. Foi possível determinar o índice de refração de tecidos duros dentais bovinos irradiados de acordo com a metodologia proposta neste trabalho e utilizar esses valores para o cálculo do coeficiente de atenuação óptica.
- d. O coeficiente de atenuação óptica de tecidos duros dentais bovinos foi calculado imediatamente após os tratamentos e posteriormente ao protocolo de desmineralização, primeiramente utilizando-se $n=1$ e depois utilizando o n calculado neste trabalho. Foram notadas diferenças significativas ao se corrigir o valor de n . E também foi observado que o protocolo de irradiação utilizado neste trabalho foi eficiente na prevenção de lesões de erosão dental.
- e. Os tecidos duros dentais irradiados foram caracterizados químico-estruturalmente em profundidade por meio da técnica de espectroscopia Raman confocal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Hariri I, Sadr A, Shimadaa Y, Tagamia J, Sumi Y. Effects of structural orientation of enamel and dentine on light attenuation and local refractive index: An optical coherence tomography study. *J Dent*. 2012;40:387–96.
2. Deng Z, Wang J, Ye Q, Sun T, Zhou W, Mei J, et al. Determination of continuous complex refractive index dispersion of biotissue based on internal reflection. *J Biomed Opt*. 2016;21(1):015003-1-015003–7.
3. Vo-Dinh T. *Biomedical Photonics Handbook*. 2003.
4. Bachmann L, Zezell DM. Estrutura e composição de esmalte e dentina. *Livraria da Física*; 2005. 299 p.
5. Ten Cate AR. *Histologia Oral*. 2008.
6. Ana PA. ESTUDO IN VITRO DA RESISTÊNCIA À DESMINERALIZAÇÃO E DA RETENÇÃO DE FLÚOR EM ESMALTE DENTAL IRRADIADO COM LASER DE Er,Cr: YSGG. IPEN. [São Paulo]: USP; 2007.
7. Hariri I, Sadr A, Nakashima S, Shimada Y, Tagami J, Sumi Y. Estimation of the Enamel and Dentin Mineral Content from the Refractive Index. *Caries Res*. 2013;47:18–26.
8. Rechmann P, Zezell DM, Ana PA, Benetti C, Goulart VP, Bachmann L, et al. Compositional and crystallographic changes on enamel when irradiated by Nd:YAG or Er,Cr:YSGG lasers and its resistance to demineralization when associated with fluoride</title>. *Proc - SPIE*. 2010;7549:75490G-1-75490G – 12.
9. BACHMANN L, Rosa K, ZECELL DM, CRAIEVICH AF, Kellermann G. Crystalline structure of human enamel irradiated with Er,Cr:YSGG laser . *Laser Phys Lett*. 2009;6:159–62.
10. Zezell DM, al et, *InTech. Developments_in_Heat_Transfer*. 2011.
11. Featherstone JDB. Caries detection and prevention with laser energy. *Dent Clin North Am*. 2000;44:955–69.
12. Yao ZMXS, Yao H, Liu YLT, Wang YLG, Lan S. Measurement of the refractive index of human teeth by optical coherence tomography. *J Biomed Opt*. 2013;14(3).
13. Pereira DL, Freitas AZ, Bachmann L, Benetti C, Zezell DM, Ana PA. Variation on molecular structure, crystallinity, and optical properties of dentin due to Nd:YAG laser and fluoride aimed at tooth erosion prevention. *Int J Mol Sci*. 2018;19(2):1–14.
14. Habib M, Lee KM, Liew YM, Zakian C, Ung NM, Chew HP. Assessing surface characteristics of eroded dentine with optical coherence

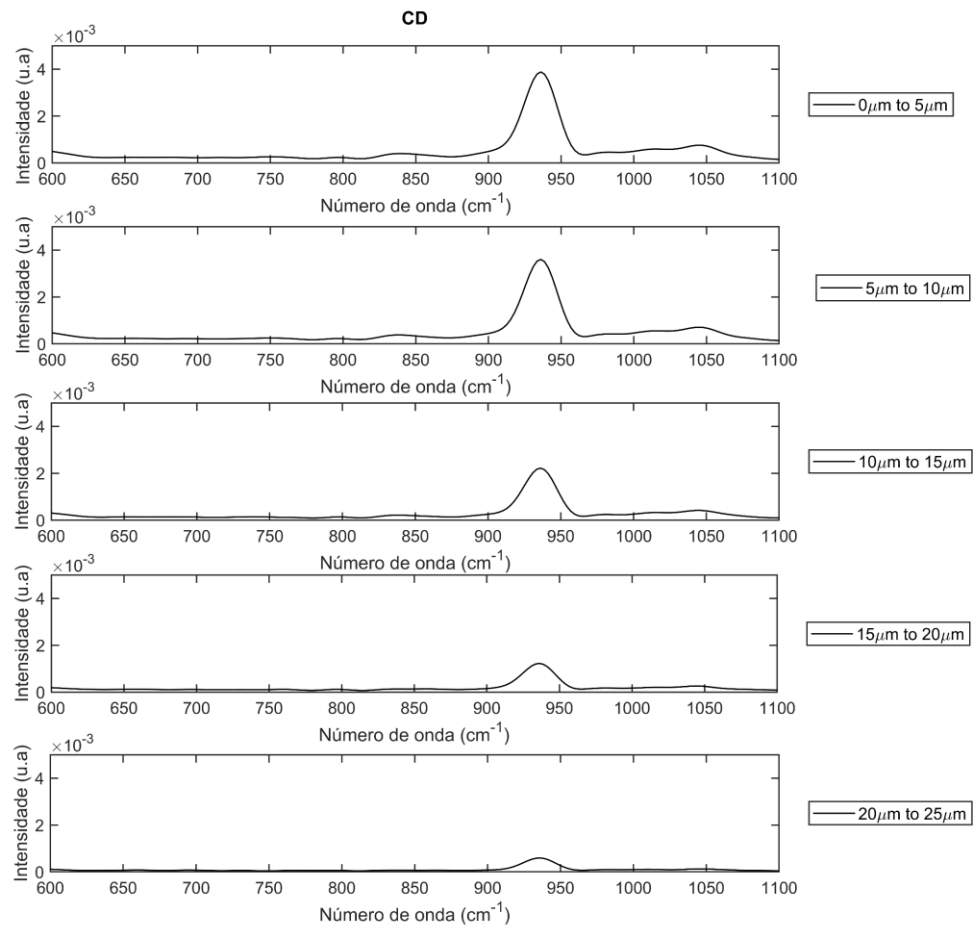
- tomography: a preliminary in vitro validation study. *Appl Opt.* 2018;57(29):8673.
15. Mylonas P, Austin RS, Moazzez R, Joiner A, Bartlett DW. In vitro evaluation of the early erosive lesion in polished and natural human enamel. *Dent Mater [Internet]*. 2018;34(9):1391–400. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.dental.2018.06.018>
 16. Faria DL a. De, Santos LGC, Gonçalves NS. Demonstração Sobre a Dispersão Inelástica de Luz. *Quim Nova.* 1997;20(3):319–23.
 17. Vitale MC, Caprioglio C. *Lasers in Dentistry - Practical text book.* 1st ed. Edizioni Martina; 2010. 307 p.
 18. Zezell DM, Ana PA. High power lasers and their interaction with biological tissues. In: Freitas PM, Simoes A, editors. *Lasers in Dentistry.* 1st ed. 2015. p. 11–8.
 19. Zezell DM, Ribeiro M. *Interação da Luz com tecidos biológicos – aplicações.* 1st ed. São Paulo: Mestrado Profissionalizante Lasers em Odontologia IPEN-FOUSP; 2007.
 20. Boari HGD, Ana PA, Eduardo CP, Powell GL, Zezell DM. Absorption and thermal study of dental enamel when irradiated with Nd:YAG laser with the aim of caries prevention. *Laser Phys.* 2009;19(7):1463–9.
 21. Systems F. *Therma CAM SC 3000 Operator's manual.* Boston; 1999.
 22. Zamataro CB. *Estudo in situ da resistência à desmineralização do esmalte dental submetido à irradiação com laser Er,Cr:YSGG associada ao uso de produtos fluoretados.* USP; 2013.
 23. Wegehaupt F, Gries D, Wiegand A, Attin T. Is bovine dentine an appropriate substitute for human dentine in erosion/abrasion tests? *J Oral Rehabil.* 2008;35(5):390–4.
 24. Ghaeth H, Yassen, Jeffrey A, Platt, Anderson T. Hara. Bovine teeth as substitute for human teeth. *J Oral Sci.* 2011;53(3):273–82.
 25. Hunter Associates laboratory inc. *Hunter Lab vs. CIE Lab.* 2012;4. Available from: <https://www.hunterlab.com/duplicate-of-an-1005-hunterlab-vs-cie-lab.pdf?r=false>
 26. HunterLab. *CIE L*a*b* Color Scale Background.* Insight Color [Internet]. 1996;8(7):1–4. Available from: <http://cobra.rdsor.ro/cursuri/cielab.pdf>
 27. Zach L, Cohen G. Pulp response to externally applied heat. *Oral Surg.* 1965;19:515–30.
 28. White JM, Fagan MC, Goodis HE. Intrapulpal temperature during pulsed Nd:YAG laser treatment on dentin, in vitro. *J Periodontol.* 1994;65:255–9.

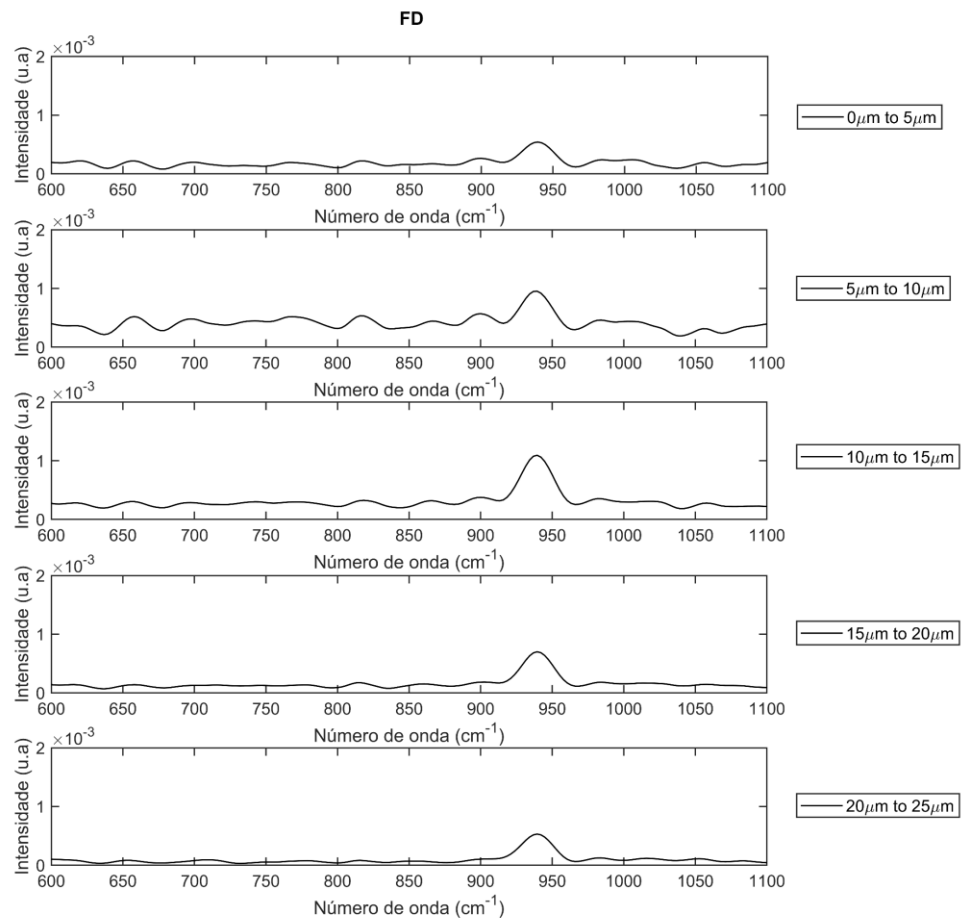
29. Morioka T, Tagomori S, Tsutsuni H. Effects of laser irradiation on fluoride uptake in enamel - by EPM surface scanning. *J Jap Soc Laser Dent.* 1986;abstract.
30. Morioka T, Tagomori S. Applicability of Nd:YAG laser on prevention of dental caries. *Lasers Dent.* 1988;907(Proc. Spie):94–7.
31. Chiga S, Toro CVT, Lepri TP, Turssi CP, Colucci V, Corona SAM. Combined effect of fluoride varnish to Er:YAG or Nd:YAG laser on permeability of eroded root dentine. *Arch Oral Biol [Internet].* 2016;64:24–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.archoralbio.2015.12.006>
32. Huang GF, Lan WH, Guo MK, Chiang CP. 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.* 2001;100:181–5.
33. Knüttel A, Bonev S, Knaak W. New method for evaluation of in vivo scattering and refractive index properties obtained with optical coherence tomography. *J Biomed Opt.* 2004;9(2):265.
34. Cury JA. USO DO FLÚOR E CONTROLE DA CÁRIE COMO DOENÇA. In: *Odontologia restauradora-Fundamentos e possibilidades.* São Paulo; 2001. p. 33–68.
35. Wang X, Milner TE, Boer JF, Zhang Y, Pashley DH, Nelson JS. Characterization of dentin and enamel by use of optical coherence tomography. *Appl Opt.* 1999;38(10):2092–6.
36. Kienle A, Hibst R. Light guiding in biological tissue due to scattering. *Phys Rev Lett.* 2006;97(1):2–5.
37. Zijp JR. Chapter 3 - Optical Properties of Dentin. *Handb Optofluidics.* 2010;A-1-A-5.
38. Popescu DP, Sowa MG, Hewko MD, Choo-Smith L. Assessment of early demineralization in teeth using the signal attenuation in optical coherence tomography images. 2008;13(5).
39. Amaral MM, Zezell DM, Monte AFG, de Cara ACB, Araújo JCR, Antunes A, et al. General model for depth-resolved estimation of the optical attenuation coefficients in optical coherence tomography. *J Biophotonics.* 2019;e201800402.
40. Maia AMA, de Freitas AZ, Campello SD, Gomes ASL, Karlsson L. Evaluation of dental enamel caries assessment using Quantitative Light Induced Fluorescence and Optical Coherence Tomography. *J Biophotonics.* 2016;9:596–602.
41. Cara ACB, Zezell DM, Ana PA, Maldonado EP, Freitas AZ. Evaluation of two quantitative analysis methods of optical coherence tomography for detection of enamel demineralization and comparison with microhardness. *Lasers Surg Med.* 2014;46:666–71.

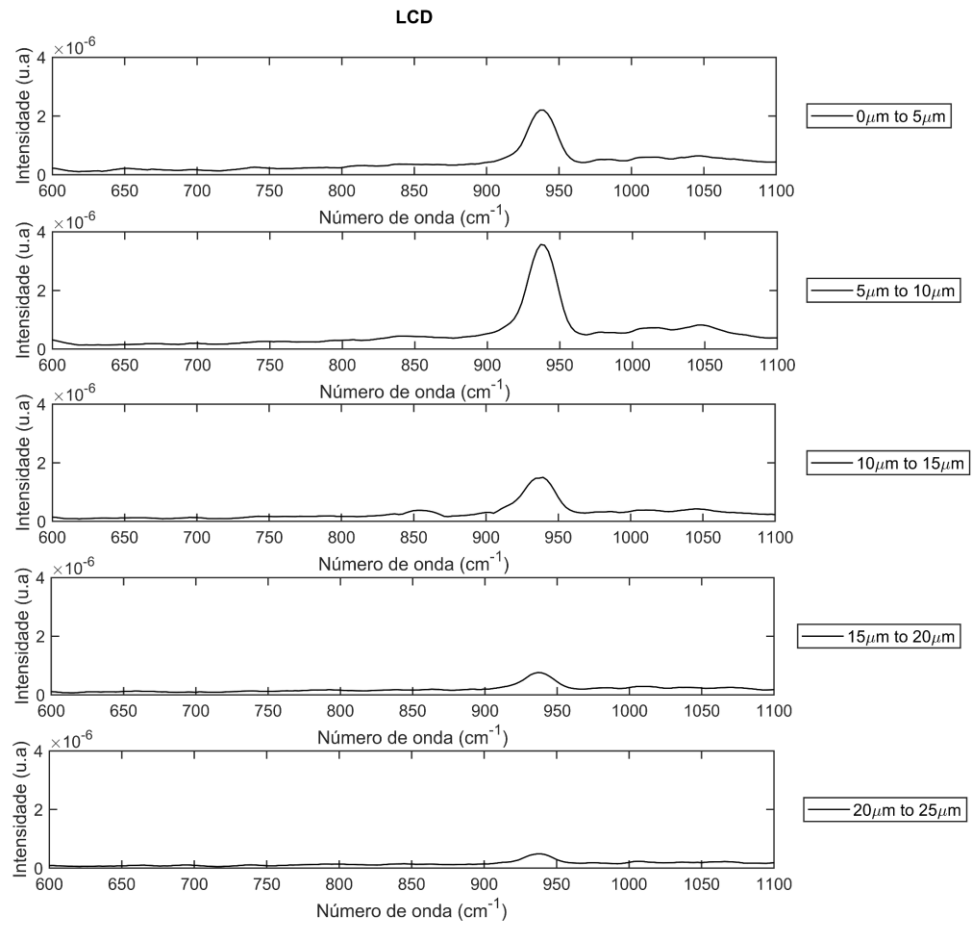
42. Mujat C, Van Der Veen MH, Ruben JL, Ten Bosch JJ, Dogariu A. al path-length spectroscopy of incipient caries lesions in relation to quantitative light induced fluorescence and lesions characteristics. *Appl Opt.* 2003;42:2079–86.
43. Dias-moraes MC, Lima CA, Freitas AZ, Aranha ACC, Zezell DM. Using Optical Attenuation Coefficient to Monitor the Efficacy of Fluoride and Nd:YAG Laser to Control Dentine Erosion. 2019;
44. Bezerra SJC, Trevisan LR, Viana IEL, Lopes RM, Pereira DL, Aranha ACC, et al. Er,Cr:YSGG laser associated with acidulated phosphate fluoride gel (1.23% F) for prevention and control of dentin erosion progression. *Lasers Med Sci.* 2018;
45. Slimani A, Nouioua F, Desoutter A, Levallois B, Cuisinier FJG, Tassery H, et al. Confocal Raman mapping of collagen cross-link and crystallinity of human dentin–enamel junction. *J Biomed Opt.* 2017;22(08):1.
46. Desoutter A, Slimani A, Al-Obaidi R, Barthélemy S, Cuisinier F, Tassery H, et al. Cross striation in human permanent and deciduous enamel measured with confocal Raman microscopy. *J Raman Spectrosc.* 2019;(December 2018):1–9.
47. Zhao J, Lui H, Mclean DI, Zeng H. Automated autofluorescence background subtraction algorithm for biomedical raman spectroscopy. *Appl Spectrosc.* 2007;61(11):1225–32.
48. Guevara E, Torres-Galván JC, Ramírez-Elías MG, Luevano-Contreras C, González FJ. Use of Raman spectroscopy to screen diabetes mellitus with machine learning tools. *Biomed Opt Express.* 2018;9(10):4998.
49. Woessner JF. The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this imino acid. *Arch Biochem Biophys.* 1961;93(2):440–7.

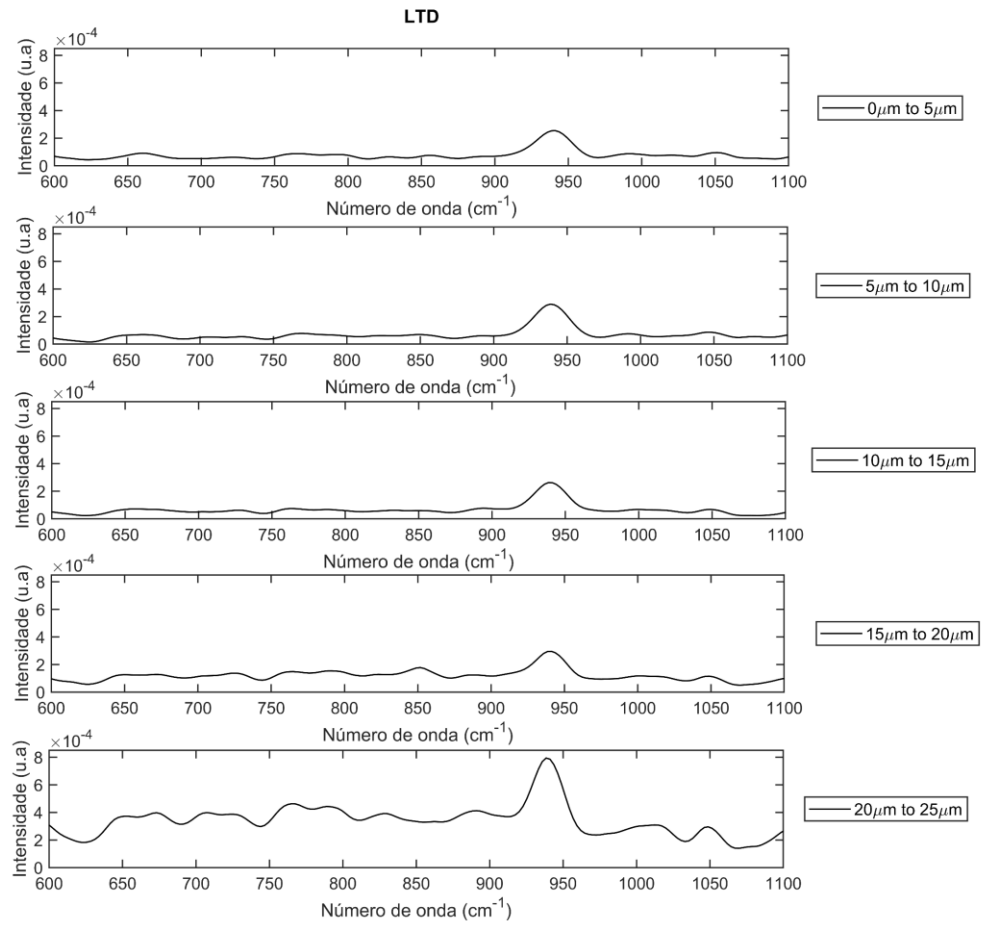
APÊNDICE

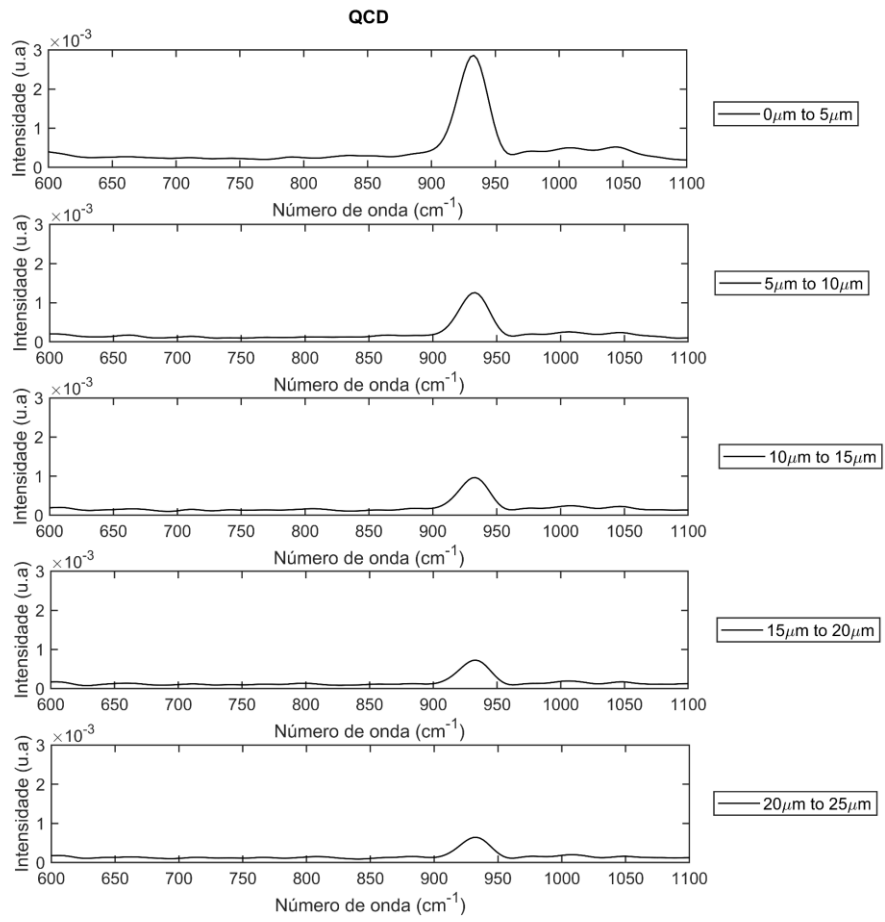
- Espectros Raman representativos de cada grupo de estudo da dentina e profundidade do tecido.

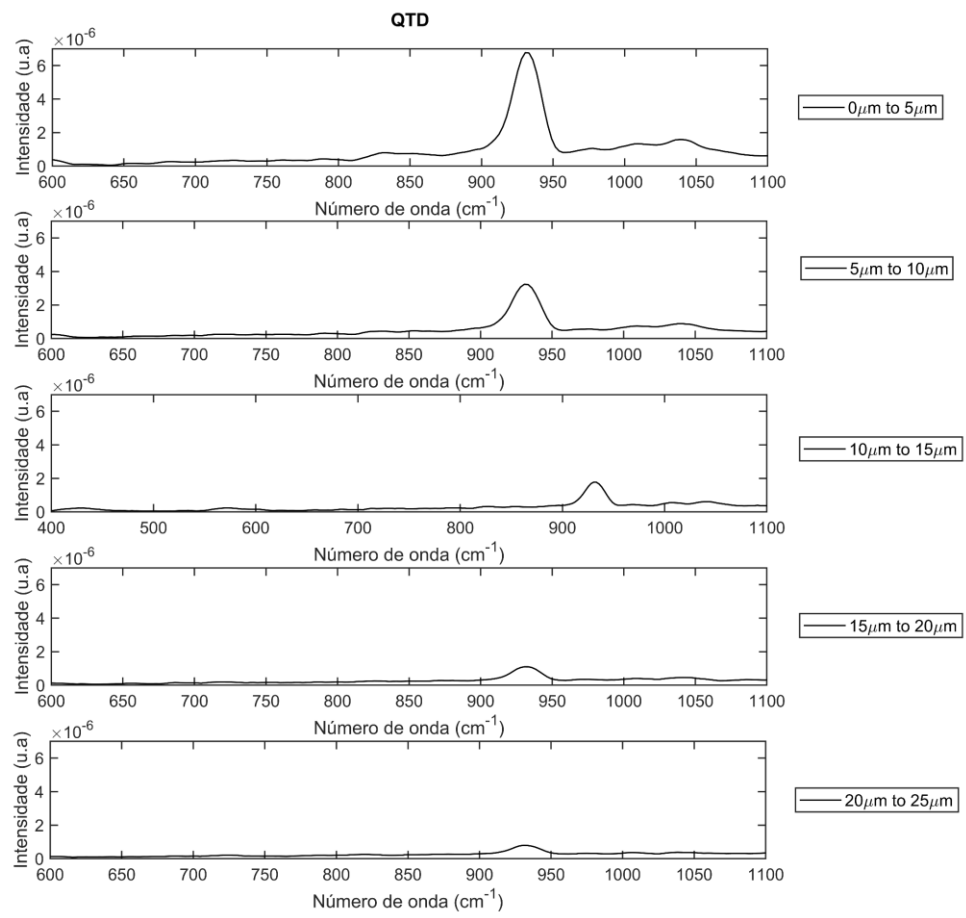












- Espectros Raman representativos de cada grupo de estudo do esmalte e profundidade do tecido.

