



AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**CARACTERIZAÇÃO DO PROCESSO DE
DESMINERALIZAÇÃO EM ESMALTE HUMANO ATRAVÉS DA
TOMOGRAFIA POR COERÊNCIA ÓPTICA**

VANESSA FREITAG NEERMANN

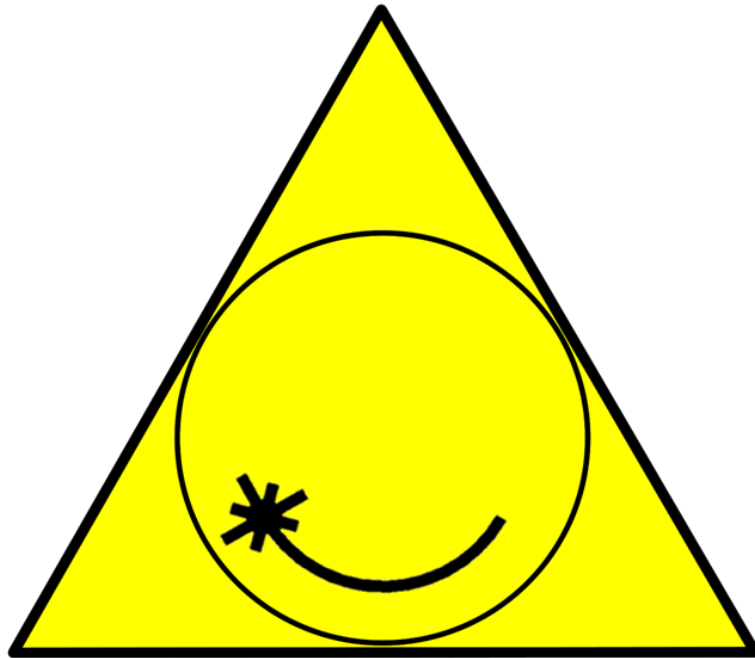
Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Mestre Profissional na área de LASER em Odontologia.

Orientador:
Prof. Dr. Anderson Zanardi de Freitas

Co-orientadora:
Profa. Dra. Adriana da Costa Ribeiro

**SÃO PAULO
2009**





Mestrado Profissionalizante Lasers em
Odontologia

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**CARACTERIZAÇÃO DO PROCESSO DE
DESMINERALIZAÇÃO EM ESMALTE HUMANO ATRAVÉS DA
TOMOGRÁFIA POR COERÊNCIA ÓPTICA.**

VANESSA FREITAG NEERMANN

Dissertação apresentada como parte
dos requisitos para obtenção do Grau
de Mestre Profissional na área de
LASER em Odontologia.

Orientador:
Prof. Dr. Anderson Zanardi de Freitas

Co-orientadora:
Profa. Dra. Adriana da Costa Ribeiro

**SÃO PAULO
2009**

AGRADECIMENTOS

Agradeço,

Ao meu orientador, Prof. Dr. Anderson Zanardi de Freitas, pela oportunidade de realizar este trabalho. Muito obrigada pelo aprendizado proporcionado, pelos conselhos, pela paciência e disponibilidade em realizar este trabalho, obrigada por saber orientar e conduzir tão bem a realização desta pesquisa.

À minha co-orientadora, Dra. Adriana da Costa Ribeiro, por ter desempenhado muito mais do que a sua função de co-orientação. Agradeço a orientação e ajuda em toda a pesquisa. Muito obrigada pela paciência e pelos ensinamentos proporcionados.

À Profa. Dra. Márcia Pinto Alves Mayer pela grande oportunidade de utilizar o seu laboratório, por disponibilizar a sua infra-estrutura para a realização deste trabalho e pelos seus sábios conselhos.

A todos os Professores do Mestrado Profissionalizante de Laser em Odontologia, obrigada pelos inúmeros conhecimentos transmitidos e pelo apoio em todos os momentos.

A todos amigos que fiz durante esta magnífica experiência, obrigada pela amizade, ajuda nos momentos difíceis, pelo companheirismo e pela troca de conhecimentos.

À Andréa Malavazi, muito obrigada pela amizade, incentivo e ajuda em todos os momentos, em especial nos momentos difíceis, tornando-os menos amargos.

Ao João Paulo, funcionário de ICB II, pela grande ajuda, companheirismo e colaboração neste trabalho.

Aos meus pais, Dieter e Lívia, minha irmã, Gabriela, pelo GRANDE incentivo e apoio durante toda a minha vida. Muito obrigada pela oportunidade de me tornar uma pessoa e profissional melhor. Agradeço em especial a alegria que vocês proporcionam a minha vida, dando constante exemplo de sabedoria, força, garra, persistência, superação e caráter!

À Elizabeth S.R. Somessari pela ajuda e atenção prestadas com a esterilização das amostras.

Ao Prof. Dr. Ricardo A. de S. Zanon pela grande ajuda e disponibilidade em transmitir seus conhecimentos.

A todos os funcionários que de alguma forma fizeram parte desta trajetória, obrigada pelo apoio.

A todos que dê alguma forma acompanharam esta minha trajetória, me incentivando durante todo o processo.

Muito Obrigada!

CARACTERIZAÇÃO DO PROCESSO DE DESMINERALIZAÇÃO EM ESMALTE HUMANO ATRAVÉS DA TOMOGRAFIA POR COERÊNCIA ÓPTICA

Vanessa Freitag Neermann

RESUMO

Este estudo teve como objetivo monitorar longitudinalmente o processo de desmineralização do esmalte humano, induzido *in vitro* por biofilme de *Streptococcus mutans*, utilizando o sistema de tomografia por coerência óptica (OCT). Foram utilizados 15 terceiros molares inclusos, que resultaram em 30 amostras. As superfícies vestibulares e linguais (n=30) foram isoladas com verniz ácido resistente exceto uma área central de 2x2 mm, onde foi induzida a desmineralização por biofilme de *S. mutans*. As amostras foram individualmente expostas ao *S. mutans*, este microrganismo foi previamente cultivado em ágar BHI e crescido em caldo Todd Hewitt. O sistema OCT utilizou um led superluminescente (930 nm), com resolução, no ar, lateral e longitudinal de 6,0 μm . O processo de desmineralização foi monitorado pelo sistema durante 15 dias: 3 leituras no primeiro dia (a cada 4 horas) e 2 leituras nos dias subseqüentes (a cada 12 horas). A aferição do pH do meio de cultura foi realizada no momento de renovação deste, ao final de cada 24 horas. Concluído o período experimental, as amostras foram avaliadas por microscopia de luz polarizada. As imagens adquiridas pelo sistema OCT (n=930) foram analisadas pelo software SRDermaViewer, sendo o coeficiente de espalhamento avaliado numa área de 1mm e 250 μm de profundidade em função do tempo. A média do pH ao início do experimento foi de 5,11(\pm 0,04) alcançando 6,73(\pm 0,03) ao final. O grau de desmineralização do esmalte humano induzido neste estudo não foi possível de ser monitorado pelo sistema OCT, visto que a variação do pH em muito prejudicou o

processo de desmineralização.

CHARACTERIZATION OF HUMAN ENAMEL DEMINERALIZATION BY OPTICAL COHERENCE TOMOGRAPHY

Vanessa Freitag Neermann

ABSTRACT

The aim of this study was to verify the demineralization process of human enamel induced by *Streptococcus mutans* biofilm, using the optical coherence tomography (OCT) system. Fifteen crown molars samples were sectioned, becoming 30 samples. The smooth surface of the samples were recovered by an acid resistant varnish except in the central area (2x2 mm), where occurred the demineralization process. The samples were exposed to *S. mutans*, this microorganism was previously cultivated in agar BHI and grew in Todd Hewitt. The OCT system had a super luminescent led (930 nm), with lateral and longitudinal resolution of 6.0 μm . The demineralization process was monitored by OCT system for 15 days, 3 measures in the first day (every 4 hours) and 2 measures in the rest of the experience (every 12 hours). The pH measurement occurred every 24 hour. When the experimental period has ended, the samples were analyzed by polarized light microscopy. The images resulted by the OCT system were analyzed by the SRDermaViewer software, where the scattering coefficient was analyzed in an area of 1mm and 250 μm of depth in function of time. The scattering coefficient was measured in function of time. In the beginning of the experiment, the pH average was 5.11 (± 0.04) reaching 6.73(± 0.03) at the end. The demineralization process of human enamel wasn't possible to be monitor by the OCT, probably the variation of the pH has harmed the demineralization process.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
2. OBJETIVOS.....	12
3. REVISÃO DE LITERATURA	13
3.1 Esmalte dentário.....	13
3.2 Cárie dentária.....	14
3.3 Tomografia por coerência óptica.....	18
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
4.1 As amostras.....	23
4.2 O processo de desmineralização.....	24
4.3 Monitoramento pela técnica de OCT	25
4.4 Microscopia por luz polarizada.....	26
4.5 Análise das imagens.	27
5. RESULTADOS.....	30
6. DISCUSSÃO	39
7. CONCLUSÕES.....	41
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	grau Celsius
CO ₂	dióxido de carbono
fs	femtossegundos
kGy	kilogrey
mg	miligrama
ml	mililitro
mm	milímetro
nJ	nanoJoule
nm	nanômetro
OCT	tomografia por coerência óptica (do inglês Optical Coherence Tomography)
ppm	partes por milhão
λ	comprimento de onda
μm	micrometro
μW	microwatt

1. INTRODUÇÃO

Há alguns anos os tratamentos das lesões de cárie dentária seguiam a premissa de remoção de tecido cariado e de porção do tecido dental sadio, como forma preventiva à extensão da doença. Os conhecimentos científicos adquiridos sobre a etiopatogenia das doenças mediadas por placa foram reconhecidos ao longo dos anos e em muito contribuíram para ações profissionais mais conservadoras¹.

Antigamente apenas "tratava-se" as lesões de cárie, hoje em dia busca-se o diagnóstico precoce desta doença cárie e tenta-se controlar os fatores etiológicos da doença, prevenindo-se que o indivíduo venha a apresentar o desenvolvimento ou recorrência da patologia¹.

No entanto os atuais métodos de detecção da cárie não são muitos sensíveis a pequenas alterações estruturais, que caracterizam o estágio incipiente da doença, principalmente quando esta acomete a região interproximal do dente². Assim sendo, surgem constantemente novos métodos auxiliares para detecção da lesão de cárie, no intuito de tornarem-se mais específicos e sensíveis à detecção dessa patologia, ou seja, capazes de identificar pequenas alterações estruturais nos tecidos duros do elemento dentário, antes mesmo de tornarem-se visíveis e detectar a localização exata dessas alterações. Estes novos métodos auxiliarão no tratamento desta patologia, onde nem sempre o melhor tratamento será a dentística operatória.

Dentre estes novos métodos, destaca-se a tomografia por coerência óptica (OCT - Optical Coherence Tomography), que tem sido desenvolvida pelos últimos 10 anos como um método não-invasivo aplicado no diagnóstico de diferentes doenças, como na área de oftalmologia e dermatologia³. Esta técnica auxilia na detecção e monitoramento de sinais de doenças, por exemplo, a identificação e quantificação da espessura da camada de fibras nervosas, que muitas vezes precede as alterações de campo visual e da escavação do nervo óptico, permitindo diagnóstico mais rápido e tratamento precoce, com menor risco de

progressão do glaucoma.⁴

Na Odontologia, as técnicas de monitoramento óptico são métodos promissores que muito tem contribuído nas áreas de periodontia e cariologia. A característica não-invasiva do método permite o monitoramento óptico da perda mineral dentária, de forma mais específica e sensível, antes mesmo da detecção da cárie pelos métodos tradicionais. Além disso, resguarda a estrutura do esmalte dentário essencial a remineralização de lesões cariosas incipientes, quando o desafio cariogênico é re-equilibrado por medidas como orientação de higiene oral e fluoroterapia⁵, sendo também utilizado no monitoramento da remineralização por ações preventivas no tratamento da cárie⁵.

O início da lesão de cárie ocorre porque há um desequilíbrio do desafio cariogênico, ocorrendo maior perda mineral na camada externa de esmalte, que é birrefringente devido à organização dos cristais de hidroxiapatita. As medidas iniciais do esmalte dental sadio, através da técnica de tomografia por coerência óptica, enfatizam a caracterização da birrefringência do tecido^{3,6}. O aumento nas mudanças de polarização e retroespalhamento causadas pela desmineralização do esmalte dental têm sido documentados por vários autores que estudam a aplicação da técnica de OCT em dentes, embora os princípios teóricos dos efeitos de despolarização e espalhamento da luz polarizada incidente não estejam bem definidos^{3,7}.

A literatura sobre a técnica de tomografia por coerência óptica na odontologia ainda é restrita. Não há trabalhos publicados que demonstrem a aplicação da técnica no monitoramento longitudinal do processo de desmineralização do esmalte humano. Portanto, este estudo visa monitorar o desenvolvimento de lesões cariosas pela técnica de tomografia por coerência óptica, buscando determinar o período do início de desmineralização do esmalte dental. Este conhecimento poderá auxiliar os profissionais na detecção e controle clínico da doença cárie.

2. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi utilizar a técnica de tomografia por coerência óptica no monitoramento do desenvolvimento do processo de desmineralização do esmalte de dentes humanos, quando submetido ao processo de desmineralização induzido *in vitro* pelo biofilme de *Streptococcus mutans*.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. O esmalte dentário

O esmalte é um tecido de origem ectodérmica que recobre a coroa anatômica do dente, sua espessura varia entre o máximo de 2,5 mm nas superfícies de trabalho até uma borda muito delgada na linha cervical⁸.

O tecido clinicamente sadio demonstra dureza e translucidez com aspecto vítreo, refletindo a cor branco-amarelada da dentina. Possui uma matriz orgânica e uma matriz inorgânica. A sua matriz orgânica é reduzida em relação à matriz da dentina, porém sua matriz inorgânica constitui a sua maior formação.⁶ Estruturalmente o conteúdo mineral caracteriza-se por em cristais densamente agrupados dispostos em prismas, que se estendem da junção amelocementária à superfície externa do dente, com aproximadamente 5 µm de diâmetro. Os cristais estão separados pelos espaços intercrystalinos (microporos) preenchidos por água e material orgânico, conferindo ao tecido vias de difusão^{9,10,11}.

Alterações na porosidade do esmalte conduzem a mudanças nas propriedades ópticas do tecido de forma que gradualmente o tecido torna-se menos translúcido, o que clinicamente pode ser observado como alterações esbranquiçadas (opacas), característica notável nas lesões de cárie incipientes. A translucidez do esmalte relaciona-se ao fenômeno óptico, que depende do tamanho dos espaços intercrystalinos. Logo, o conteúdo de preenchimento desses microporos desempenha fundamental participação no grau de translucidez observado. A discreta diferença entre o índice de refração da hidroxiapatita (1,62) e da água (1,33) não afeta esta propriedade do tecido. Contudo a dissolução dos cristais resulta no aumento dos espaços intercrystalinos, que ao serem preenchidos pelo ar por ocasião da secagem da superfície, confere menor translucidez ao esmalte, dada a diferença entre o índice de refração da hidroxiapatita e do ar (1,62x1,0)¹¹.

3.2. Cárie dentária

A cárie é considerada uma doença infecciosa, localizada, resultante da ação de bactérias aderidas à superfície dental, ou pode ser considerada também uma doença multi-fatorial^{7,11,12,13}. Como qualquer doença infecciosa, o processo e a severidade dependem do desafio microbiológico, dos mecanismos de defesa do hospedeiro e das condições do meio⁷.

A cárie e a doença periodontal, provavelmente, são as duas doenças mais prevalentes relacionadas com a placa bacteriana⁹. Dependendo da composição da microbiota da placa, esta apresenta potencial para ser cariogênica ou periodontopatogênica¹.

Quando a placa bacteriana consegue crescer sem qualquer distúrbio mecânico, após a ingestão de alimentos ricos em carboidratos o pH da placa decresce à medida que os microorganismos convertem os açúcares em ácidos. A desmineralização ocorrerá enquanto o pH permanecer baixo e o fluído da placa estiver subsaturado em relação ao dente¹⁴. Por outro lado as características protetoras da saliva favorecem a dissolução dos ácidos da placa, a neutralização desses por um tampão de bicarbonato e a difusão de íons cálcio e fosfato para o esmalte¹⁵. A placa bacteriana atua como uma membrana de difusão, influenciando a passagem de íons para dentro e para fora da superfície de esmalte, diminuindo a ação tampão da saliva contra os ataques ácidos⁹.

O valor do pH crítico, no qual a saliva é extremamente saturada no que se refere à apatita, depende das condições de cálcio e fosfato na saliva e no fluído da placa. Esse valor varia em torno de 5,3-5,5 sendo o valor do pH crítico do fluído da placa levemente mais baixo do que o da saliva devido a maior presença de cálcio e fosfato na placa e no seu fluído. Já a saliva torna-se saturada com relação a hidroxiapatita com o pH na faixa de 5,5-4,5, mas permanece supersaturada com relação à fluorapatita. A lesão resultante é uma lesão cariiosa na qual a hidroxiapatita dissolvida se origina da região subsuperficial do esmalte e a fluorapatita é formada nas camadas superficiais do esmalte. Como consequência, mais mineralizada ficará a superfície do esmalte e menos ficará o corpo da lesão

subsuperficial. Com níveis de pH maiores que 6,0 todos os fluídos orais ficam supersaturados com relação tanto a hidroxiapatita quanto a fluorapatita, ocorrendo a formação da apatita¹⁶.

O mecanismo de desmineralização e remineralização pode ser considerado como um processo dinâmico. Quando o pH da superfície do esmalte é reduzido, a placa torna-se subsaturada com relação à estrutura dentária, resultando na dissolução do esmalte. Ao contrário, quando o pH é elevado, a placa torna-se supersaturada resultando na precipitação de íons na região desmineralizadas¹⁷.

A microflora da placa dental é extremamente complexa, pois consiste de uma grande variação de gênero e espécie de bactérias. Muitas dessas bactérias são capazes de produzir ácido através do carboidrato. As bactérias mais comumente encontradas são *Streptococcus*, *Actinomyces* e *Lactobacillus*⁹, porém a espécie que desempenha papel primordial nesta patologia é o *Streptococcus mutans*¹.

O *Streptococcus mutans* é um organismo altamente sacarolítico, capaz de produzir ácido de uma grande variedade de carboidratos. Outra habilidade sua é a produção de polissacarídeos extracelulares, que são polímeros de glucose e enzimas extracelulares responsáveis pela formação de glucosiltransferases. Os glucanos extracelulares são responsáveis pela retenção do *S. mutans* na superfície do dente e contribuem para a matriz acelular da placa⁹. Outra corrente de pesquisadores acredita que esses microrganismos crescem em condições ácidas, ou seja, eles podem ser considerados microrganismos indicadores, pois eles dominam o ambiente que permanece com pH baixo¹.

Portanto a queda do pH provoca a dissolução de minerais como o fosfato de cálcio, carbonato e fluoreto, até que a saturação seja alcançada. O flúor, quando presente no meio bucal ou no espaço inter-cristalino, terá um efeito inibitório da dissolução. Ao passo que os cristais do esmalte que são dissolvidos num pH 5,0 e são remineralizados através da formação de fluorapatita, só sofrerão dissolução novamente quando o pH estiver em torno de 3,0¹⁸.

Notadamente o flúor, obtido através do uso de dentífrício fluoretado, é

eficaz na redução da progressão da cárie, ele pode diminuir a profundidade da lesão e aumentar o conteúdo mineral da lesão^{7,19,20,18}. Utilizando várias modalidades de flúor (solução de flúor, selante fluoretado e ionômero de vidro), observou-se através do OCT que todos proporcionam algum grau de proteção a estrutura dental. Todos os grupos tratados com flúor apresentaram um grau menor de desmineralização quando comparados ao grupo controle, este efeito foi observado devido à menor refletividade das amostras submetidas ao flúor em relação ao grupo controle. Porém a desmineralização foi observada em todos os grupos, ou seja, o flúor não protege completamente o dente da desmineralização, ele reduz a severidade das lesões²¹.

A ação remineralizadora do flúor ocasiona o aumento de volume mineral de lesões cariosas, diminuindo significativamente a refletividade óptica de lesões artificiais de cárie²². Assim a refletividade das lesões de mancha branca aumenta quando o período de desmineralização aumenta²³. No entanto, a refletividade não diminui significativamente no corpo da lesão após a remineralização. É importante considerar que o corpo da lesão não remineralizou da mesma forma que a superfície. O mecanismo que pode ter ocorrido é que houve uma redução do tamanho dos poros, porém o seu número continuou alto. O corpo da lesão também pode não ter reparado da forma original o arranjo de cristais, devido à perda mineral substancial. Enquanto que a superfície do esmalte foi restaurada e reparada de forma similar ao esmalte sadio²⁴.

Os microrganismos presentes em lesões cariosas, também estão presentes em lesões de esmalte não-cavidades ativas e inativas, conforme foi constatado em uma pesquisa, na sua maioria sendo cocos e bacilos, podendo se apresentar sozinhos ou em colônias. Nas lesões ativas, mesmo não-cavidades, foram encontradas bactérias dentro dos túbulos dentinários e na dentina peritubular. Observou-se também através da microscopia eletrônica de varredura, a presença de canais que podem ter possibilitado a entrada das bactérias no interior da estrutura dentária. Apesar da microscopia revelar a presença de bactérias tanto em lesões ativas como inativas, não determina que estas bactérias estão vivas e viáveis ao crescimento²⁵.

Considerando que a cárie gera a perda de mineral na estrutura dental, pesquisadores avaliaram superfícies radiculares e de esmalte através de microradiografias. Detectaram que a perda mineral e profundidade das lesões de cárie em ambas superfícies foi proporcional ao tempo de desmineralização. No caso da superfície radicular ocorreu uma rápida desmineralização na primeira semana seguida de uma diminuição na intensidade com o tempo. Isto ocorreu provavelmente pela composição do cimento, que recobre superficialmente a raiz dental, apresentando alto conteúdo de água e menos componente mineral, sendo facilmente desmineralizado. Então após uma semana a lesão já se encontra em dentina, em que a progressão da desmineralização é muito mais rápida que no esmalte, mas menor que no cimento. A dentina apresenta mais conteúdo orgânico e menos conteúdo mineral que o esmalte, então a mesma quantidade de ácido pode desmineralizar um volume maior na dentina do que no esmalte. Em contrapartida a matriz orgânica da dentina pode formar uma barreira entre a placa e a lesão superficial da dentina, sendo que esta barreira pode ser responsável pela redução da progressão da lesão na dentina após a primeira semana²⁶.

A experiência clínica comprova que a dentística operatória não é o início e nem o fim do tratamento da cárie. Então deve-se realizar um tratamento não operatório extensivo ao tratamento convencional, como ações remineralizadoras, com o intuito de evitar a recorrência da cárie⁷. No entanto, para a efetividade das medidas remineralizadoras é necessário haver um método quantitativo para monitorar as mudanças ocorridas com o tempo, em relação à incorporação de mineral pelas lesões²⁷. O OCT é um método não-invasivo que pode acompanhar medidas de remineralização do esmalte²⁴.

A microscopia por luz polarizada é uma técnica consagrada para a análise qualitativa dos processos de desmineralização. Esta técnica foi utilizada para avaliar a capacidade de materiais restauradores que contém flúor para deter a formação de cárie, onde se observou que dependendo da concentração de flúor nesses materiais, é possível que eles minimizem o processo de desmineralização ao seu redor²⁸.

As amostras submetidas a esta técnica, podem ser imersas em água ou

outra substância, como a quinolina. O resultado da microscopia é praticamente o mesmo para os dois substratos, porém a quinolina permite uma melhor visualização das lesões, onde elas apresentam-se mais distintas, provavelmente devido ao seu índice de refração²⁹.

A importância de um método para avaliar quantitativamente a perda mineral de um dente, não terá utilidade se não houver um completo conhecimento das propriedades ópticas do esmalte dental, como refletividade, espalhamento e interação luz-tecido¹⁸.

3.3 Tomografia por coerência óptica

As modalidades de diagnóstico por imagem como ultra-som, tomografia computadorizada e ressonância magnética são exemplos de tecnologias que tiveram um impacto significativo na pesquisa médica e na prática clínica. A técnica de tomografia por coerência óptica (OCT) é uma técnica de imageamento óptico, que pode atingir uma resolução espacial até 10 vezes maior que o ultra-som⁴. Ela é baseada em princípios de interferometria de baixa coerência, é em muitos aspectos semelhante à técnica de ultra-som, mas utiliza luz ao invés de ondas acústicas³⁰.

A técnica de OCT para detecção de cárie é um método não-invasivo para detectar o início de lesões cariosas⁵. Apresenta vantagens como, por exemplo, a utilização da luz no infra-vermelho próximo ao invés de radiação ionizante (raios-X), que é capaz de causar mutagênese. Através desta técnica pode-se obter uma resolução da imagem da estrutura estudada em torno de 10 μm com uma profundidade de penetração típica³ de 1,5 mm.

A profundidade de penetração da tomografia por coerência óptica pode alcançar a junção esmalte-dentina, que se encontra aproximadamente 1,6 mm abaixo da superfície do esmalte e depende fundamentalmente do comprimento de onda utilizado no laser do sistema^{3,29}. Não se sabe ainda qual é o melhor comprimento de onda a ser utilizado no sistema de OCT, permitindo assim uma boa penetração nos tecidos com uma boa qualidade de imagem³¹. O processo

limitante da profundidade de penetração óptica do OCT é principalmente o processo de espalhamento da luz em relação a sua absorção¹⁹.

Para determinar qual o melhor comprimento de onda a ser utilizado no sistema de OCT, foi realizado um estudo com dois protótipos. Um dos protótipos apresentava um comprimento de onda de 850 nm e potência de 700 μ W, enquanto que o outro protótipo foi construído com um comprimento de onda de 1310 nm e potência de 140 μ W. Os dois protótipos foram utilizados para avaliar estruturas anatômicas dentárias. As imagens geradas pelos protótipos foram comparadas a fotomicrografias, com o objetivo de avaliar o grau de resolução gerado por cada equipamento. O protótipo com comprimento de onda de 1310 nm foi o que apresentou melhor qualidade de imagem, isto se deve ao fato da maior profundidade de penetração do comprimento de onda no tecido²⁹. Deve-se ter cuidado ao utilizar um sistema de OCT no visível ou infra-vermelho próximo, quando este apresenta 1mm de diâmetro de feixe na superfície do esmalte, pois pode gerar uma deposição de energia próximo da junção esmalte-dentina, o que pode ocasionar conseqüências negativas como gerar uma sub-superfície de calor³².

A profundidade de penetração do OCT também pode variar de acordo com a topografia do dente. É difícil implementar esta técnica em superfícies oclusais devido à variação da penetração óptica e refletividade superficial. As propriedades ópticas podem variar entre os diferentes tipos de lesões cariosas³³. Na cárie oclusal é muito importante realizar o diagnóstico precocemente por causa de sua prevalência e natureza oculta, até elas serem detectadas por radiografias pode ser muito tarde para um tratamento preventivo, pois a cárie pode já ter atingido a dentina⁷.

O sistema de OCT pode ser comparado conceitualmente com a imagem por ultra-som, visto que as duas técnicas são baseadas na medida de "ecos" provenientes de estruturas presentes nos tecidos medindo o sinal refletido ou retroespalhado³³. A técnica de OCT, ao contrário do ultra-som, não necessita de contato direto com o tecido a ser analisado. Devido à alta resolução de imagem é possível realizar diagnóstico em tecidos, pois através desta técnica consegue-se

obter informações morfológicas da área analisada. O OCT apresenta potencial para ser um método de biópsia óptica, pois consegue em tempo real obter imagens do tecido analisado sem necessidade de excisão⁴. O objetivo desta técnica é produzir imagens *in vivo*, capaz de captar imagens qualitativas e quantitativas dos tecidos vivos³⁴.

A técnica de OCT permite construir imagens para auxiliar a detecção de lesões de cárie, a identificação de fraturas dentárias e doenças periodontais^{34, 20}. A doença periodontal envolve mudanças morfológicas que são potencialmente detectadas pelo sistema de OCT. Esta patologia causa primeiramente alterações morfológicas na gengiva e sua progressão causa a perda de nível ósseo. Esta técnica é um método que permite determinar o nível de inserção periodontal, podendo diagnosticar a doença periodontal mesmo antes de haver perda de inserção detectável pela sondagem, que é a técnica usualmente utilizada para detectar a presença dessa patologia³⁵.

OCT é uma interessante técnica alternativa para obtenção de informações das estruturas dentais e permite detectar precocemente a presença de cárie, esta técnica tem o potencial para verificar a localização e profundidade das lesões^{3,1}, bem como apresenta a capacidade de detectar cáries ocultas e secundárias, que ocorrem na interface dente-restauração⁷. É importante ressaltar que este sistema é um grande auxiliar na detecção das lesões de cárie, porém para este diagnóstico ser correto e eficaz é necessário que as lesões estejam hidratadas, pois em dentes desidratados notou-se um maior espalhamento da luz e menor penetração em profundidade².

Com o OCT também se pode identificar áreas desmineralizadas como imagens brancas, isso ocorre devido ao espalhamento da luz refletida. Quando a superfície é remineralizada há uma redução no espalhamento da luz devido ao preenchimento dos microporos⁷. O espalhamento depende da interação do comprimento de onda do laser utilizado no sistema de OCT com o tecido analisado³⁶. Em lesões de desmineralização de esmalte, o coeficiente de espalhamento é relativamente maior que em esmalte sadio^{25,18}.

As mudanças ópticas em tecido cariado poderão ser rapidamente

detectadas pelo sistema de OCT, antes mesmo de que apareçam mudanças estruturais detectadas pelos métodos tradicionais. O método visual, por exemplo, não é completamente eficaz para detecção de cáries incipientes na região interproximal. Enquanto que as radiografias detectam melhor esta patologia nessas regiões, porém elas são bidimensionais e somente detectam alterações estruturais quando há uma quantidade significativa de alteração dos tecidos, aproximadamente após 500 μ m de desmineralização³⁰.

Na junção esmalte-cimento observou-se que a desmineralização ocorre em maior velocidade no cimento, pois o sinal de espalhamento detectado foi menor, ou seja, houve uma maior penetração do sinal na lesão em relação às estruturas sadias¹. No entanto, a imagem apresentada pelos equipamentos utilizados para detecção de cáries e defeitos de esmalte, devem apresentar adequado contraste e brilho da imagem, no objetivo de auxiliar no correto diagnóstico³⁷.

Através dessa técnica foram observados molares humanos, com e sem cárie, recém-extraídos de indivíduos adultos, que não apresentavam histórico de tratamento com flúor, procurando detectar lesões de cárie no esmalte desses dentes. Observou-se que o esmalte que apresentava maior refletividade, era o dente com cárie. Portanto, a imagem de uma amostra severamente deteriorada pela lesão de cárie demonstra baixa mudança de polarização, que pode ser atribuída à grande perda mineral e resultar na redução da birrefringência e do espalhamento. Quando a cor da superfície da lesão era de marrom à preta, indicava grande absorção, que pode causar decréscimo na profundidade de penetração da luz. Estes fatores são importantes para a interpretação das imagens geradas pela técnica de OCT³.

Esta técnica também mostrou-se eficaz no acompanhamento da inibição de lesões cariosas, tornando-se uma medida importante para avaliar as diferentes modalidades remineralizadoras¹⁷.

Um estudo realizado com incisivos bovinos, monitorou opticamente o

desenvolvimento de cárie quando as amostras foram armazenadas em uma solução subsaturada de cálcio e fosfato. Os três primeiros grupos permaneceram nesta solução por 24, 48 e 120 horas, respectivamente. Outros quatro grupos foram armazenados na mesma solução, porém foi adicionado a esta solução flúor a uma concentração de 0,1 ppm. Esses grupos restantes permaneceram nesta solução por 24, 48, 120 e 240 horas respectivamente. Após os períodos de imersão na solução, as amostras foram submetidas ao monitoramento óptico por espalhamento, onde foram feitas medidas em 10 pontos randomicamente escolhidos em cada amostra antes e após a sua imersão na solução. Os autores observaram que o monitoramento óptico da cárie, além de ser um método conservador para determinação indireta de perda mineral, permite informação mais rápida a respeito do efeito de ações preventivas no tratamento da cárie⁵.

O diagnóstico de cárie requer mais informação do que simplesmente a detecção da desmineralização, que tem sido demonstrado com sucesso através da intensidade e decréscimo da polarização das imagens comuns nas aplicações da técnica do OCT³.

O dentista precisa determinar a severidade da lesão de cárie para determinar o tratamento mais adequado^{7,33}. Estudos anteriores têm demonstrado que o OCT sensível à polarização (PS-OCT) pode produzir imagem e quantificar a progressão de lesões artificiais de cáries em superfície de esmalte humano através da medida da alta refletividade do retroespalhamento e despolarização das lesões de cárie^{7,33}. As imagens geradas pela técnica de OCT sensível à polarização apresentam maior contraste em relação à técnica tradicional de OCT⁶.

O sistema de OCT, num futuro próximo, será uma técnica importantíssima para detectar a cárie de maneira não-invasiva, podendo ser utilizado para complementar os métodos tradicionais de diagnóstico, como as radiografias, evitando assim as radiações ionizantes³¹.

MATERIAL E MÉTODOS

4.1 As amostras

Neste estudo foram utilizadas 30 amostras (15 terceiros molares inclusos extraídos por razões ortodônticas). Foi descartada a porção radicular dos terceiros molares e aproveitada somente a sua porção coronal, a qual foi seccionada no sulco central no sentido méso-distal. As superfícies vestibulares e linguais foram limpas através de profilaxia com pedra-pomes e água destilada. Após a lavagem com água destilada as amostras foram secas e recobertas por uma camada de verniz ácido resistente, exceto numa janela de 2mm x 2mm.

As amostras foram acondicionadas em um cilindro de acrílico, com a superfície a ser pesquisada voltada para cima. O conjunto cilindro de acrílico e amostra foi fixado individualmente em uma placa acrílica com 12 poços (Figura 1). Posteriormente a placa foi submetida à esterilização por raios- γ (Gammacell, 25 kGy, realizada no Centro de Tecnologia das Radiações – IPEN/CNEN, SP).

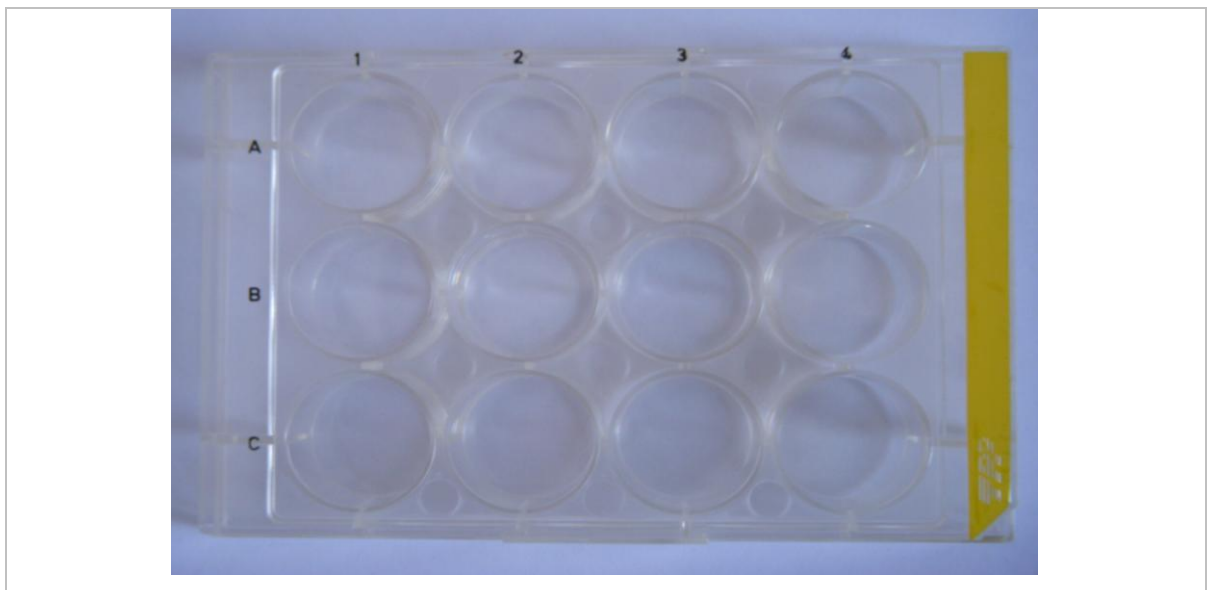


Figura 1: Placa acrílica com 12 poços.

4.2 O processo de desmineralização

O processo de desmineralização foi induzido por biofilme de *Streptococcus mutans* (GS5). O microrganismo foi previamente cultivado em ágar BHI (*Brain-heart infusion broth*) em condições de microaerofilia (10% CO₂) por 48 horas, para individualização das colônias. Cinco colônias foram transferidas para 2 tubos contendo 5 mL caldo Todd Hewitt (*Bacto Todd Hewitt Broth*, DIFCO, Maryland-USA) acrescido de 1 µL de anfotericina B (Cristália, Itapira-Brasil), os quais foram incubados em estufa contendo 10% de CO₂ a 37°C por 16 horas. A suspensão bacteriana foi ajustada em espectrofotômetro à densidade óptica (DO₅₅₀) de 1,0. Para determinar o número de UFC da suspensão bacteriana foram realizadas diluições seriadas (1:10) a partir da suspensão com DO₅₅₀=1. Alíquotas de 100 µL de cada uma das diluições realizadas (10⁻¹ a 10⁻¹⁰) foram semeadas em triplicata na superfície de ágar BHI. As placas foram incubadas em estufa de CO₂ a 10% por 48 horas. Após este período, foi realizada a contagem das UFC por placa e determinada a média de UFC para cada um dos fatores de diluição. Foram calculados os valores de UFC/ml para cada um dos fatores de diluição (UFC/mL = média x fator de diluição x alíquota). Neste estudo, foi padronizado inóculo inicial de 10⁹ UFC/mL em cada poço.

Os poços foram preenchidos com 3,5 mL de caldo Todd Hewitt e 35 µL da suspensão bacteriana. As placas foram mantidas estaticamente em estufa de CO₂ a 37°C durante todo o período experimental. O meio de cultura de cada um dos poços foi trocado diariamente evitando-se qualquer contato com a janela de desmineralização. Antes de ser desprezado, realizou-se a aferição do pH do meio de cultura. Para monitoramento da pureza da cultura, foi realizado diariamente coloração de Gram de 5 µL do meio a ser desprezado. Este procedimento foi realizado em poços alternados (ex: no dia 02 foi realizado nas fileiras 01 e 03 das placas, no dia 03, nas fileiras 02 e 04 e assim por diante). A coloração de Gram é um método comumente usado para visualizar bactérias através de uma lâmina em um microscópio.

4.3 Monitoramento pela técnica de OCT

O monitoramento do processo de desmineralização foi realizado pela técnica de tomografia por coerência óptica. As placas foram retiradas da estufa de CO₂ e transferidas para uma capela de fluxo laminar, evitando-se a contaminação das amostras. Todas as medidas foram realizadas no interior da capela e, tão logo finalizadas, as placas eram reposicionadas na estufa.

Utilizou-se um sistema de OCT (OCP930SR, Thorlabs) que utiliza um led superluminescente operando em 930 nm, com resolução, no ar, lateral e longitudinal de 6,0 µm, capaz de apresentar até 8 imagens por segundo (Figura 2). O sistema dispõe uma ponta de prova em fibra óptica capaz de alcançar as amostras facilmente dentro do fluxo laminar, sem a necessidade de contato entre a ponta de prova e as amostras.



Figura 2: Sistema de OCT que foi utilizado no experimento OCP930SR (Thorlabs Inc.).

Todas as amostras foram medidas inicialmente antes da exposição ao meio de cultura. O processo de desmineralização foi acompanhado durante 15 dias,

sendo que no primeiro dia a leitura com o laser foi realizada de 4 em 4 horas durante 8 horas e nos dias subseqüentes a leitura foi a cada 12 horas, coincidindo com o período de troca de cultura, conforme tabela abaixo.

Tabela 1: Tabela com os horários de medida programados

Medidas dia 01	10:00h, 14:00h, 18:00h
Medidas dia 02-15	08:00h e às 20:00h
Troca de cultura	08:00h e às 20:00h

As imagens foram adquiridas na região central da janela de exposição, gerando imagens da região exposta ao meio de cultura, foram geradas no primeiro dia $03 \times 30 = 90$ imagens e nos dias subseqüentes 60 imagens em cada dia, ao final do experimento temos um total de 930 imagens para avaliar.

4.4 Microscopia por luz polarizada (MLP)

Com o objetivo de observar se houve desmineralização das amostras, realizou-se o preparo de algumas amostras aleatórias para que estas fossem submetidas à microscopia de luz polarizada. As amostras foram seccionadas no sentido longitudinal no centro da região desmineralizada, sendo obtida uma fatia de aproximadamente $500\mu\text{m}$ de cada amostra. Esta foi desgastada manualmente com o auxílio de lixas d'água e água até atingirem uma espessura de $100\mu\text{m}$. As amostras foram colocadas em 5% de hipoclorito por uma hora, para a remoção de debris. Seqüencialmente foram imersas em água destilada por 24 horas e submetidas ao ultra-som por 60 segundos³⁸.

Os cortes produzidos foram submetidos à análise pela microscopia de luz polarizada, sendo previamente embebidos em quinolina (índice de refração 1,62) Utilizando uma lente de x20 foram selecionadas as regiões que correspondessem aproximadamente àquelas analisadas pelo OCT. As imagens foram capturadas por uma câmera digital acoplada ao microscópio e processadas pelo programa Image

J.

4.5 Análise das imagens

As imagens geradas pelo sistema de OCT foram analisadas pelo software SRDermaViewer, em uma janela de 1mm^2 e $250\mu\text{m}$ de profundidade. Essas imagens geraram um coeficiente de espalhamento que foi acompanhado em função do tempo (Figura 3).

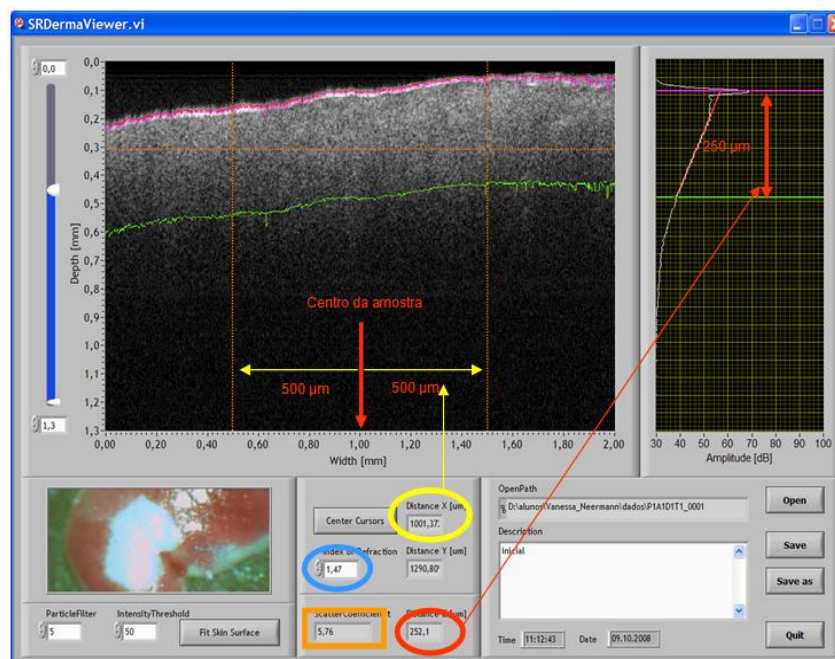


Figura 3: Tela do programa SRDermaViewer utilizado para cálculo do coeficiente de espalhamento

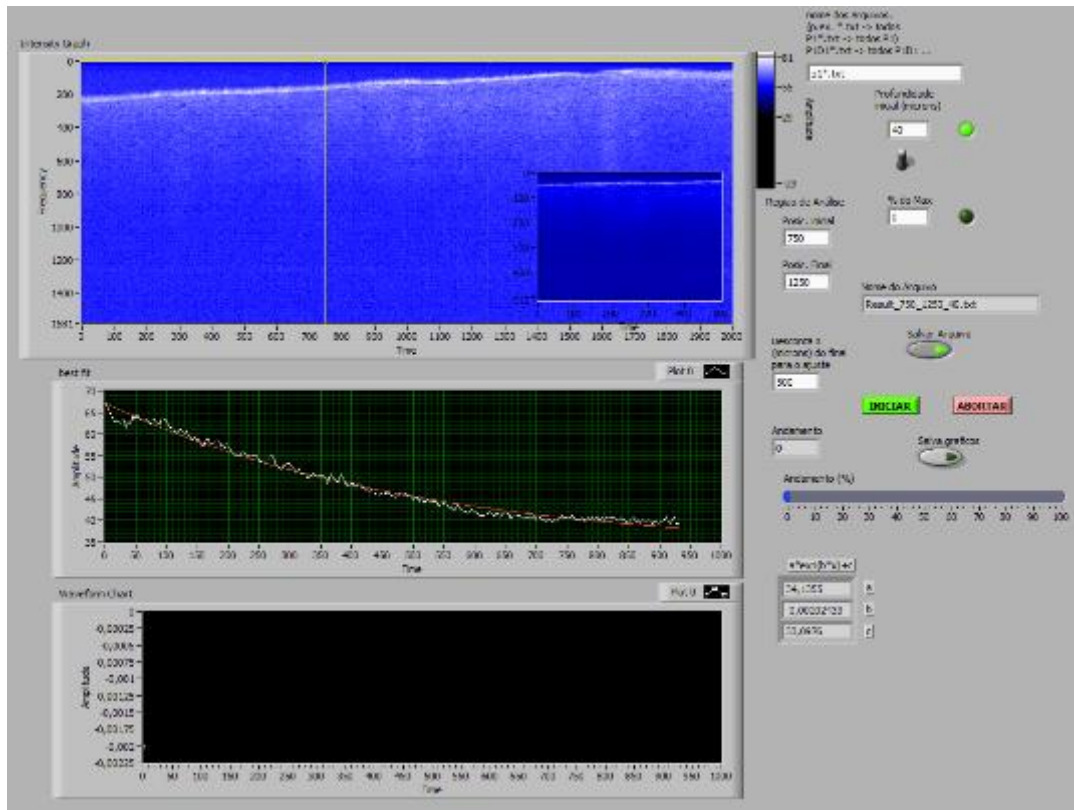


Figura 4: Software desenvolvido especialmente para a análise das imagens de OCT, onde se pode escolher vários parâmetros de análise, veja texto.

Foi desenvolvido um software pelo Dr. Anderson Zanardi de Freitas, especificamente para realizar outras análises das imagens geradas pelo sistema de OCT. Este software permite analisar de forma automática um conjunto de imagens geradas pelo OCT, sendo possível escolher vários parâmetros de análise: profundidade desprezada abaixo da superfície, porção do sinal abaixo da superfície desprezada em função de uma porcentagem de atenuação do sinal, profundidade máxima analisada e região de interesse das imagens. Esse software leva em consideração todos os sinais individuais de OCT que compõem a imagem e faz uma média aritmética nesta região, a partir deste sinal médio é realizado um ajuste linear do logaritmo natural deste sinal fornecendo os coeficientes ajustados. Então, através deste software, as imagens foram analisadas em uma janela de 500 μm a partir do centro da amostra, como apresentado na Figura 4, foram analisados 250 μm para cada lado e desprezados 40 μm , 70 μm , 100 μm e 130 μm superficiais. O software realiza nesta região uma média de todos os sinais de

OCT, desde -250 microns a 250 microns em torno da região central da imagem. Após esta média, o software realiza um ajuste de função do tipo decaimento exponencial $f(x) = A \cdot e^{B \cdot x} + C$, onde B é o coeficiente de extinção, que foi analisado. A função apresentou um ajuste exemplar neste experimento.

5 RESULTADOS

Cada medida de OCT gerou uma imagem da região exposta ao meio de cultura, sendo que no primeiro dia foram geradas $03 \times 30 = 90$ imagens e nos dias subseqüentes 60 imagens em cada dia, ao final do experimento obteve-se um total de 930 imagens para avaliar.

A tabela 2 apresenta as médias e desvio-padrão do pH aferidos nos meios de cultura. Verificou-se que nos primeiros dias o pH dos meios de cultura encontrava-se ácido (pH em torno de 5,0), porém ao longo do experimento o seu valor foi elevando-se, chegando a alcançar valores próximos a 7,0 como observado nos dias 5 e 6.

Tabela 2: Média de pH das amostras ao longo do experimento

Tempo	Média pH	Desvio Padrão
D2	5,11	0,04
D3	5,38	0,17
D4	5,74	0,11
D5	6,26	0,33
D6	6,71	0,35
D7	5,11	0,02
D8	5,22	0,12
D9	5,73	0,39
D10	6,18	0,38
D11	6,58	0,33
D12	6,76	0,21
D13	6,62	0,28
D14	6,61	0,19
D15	6,73	0,30

Pode-se visualizar a evolução do pH durante o experimento através da Figura 5.

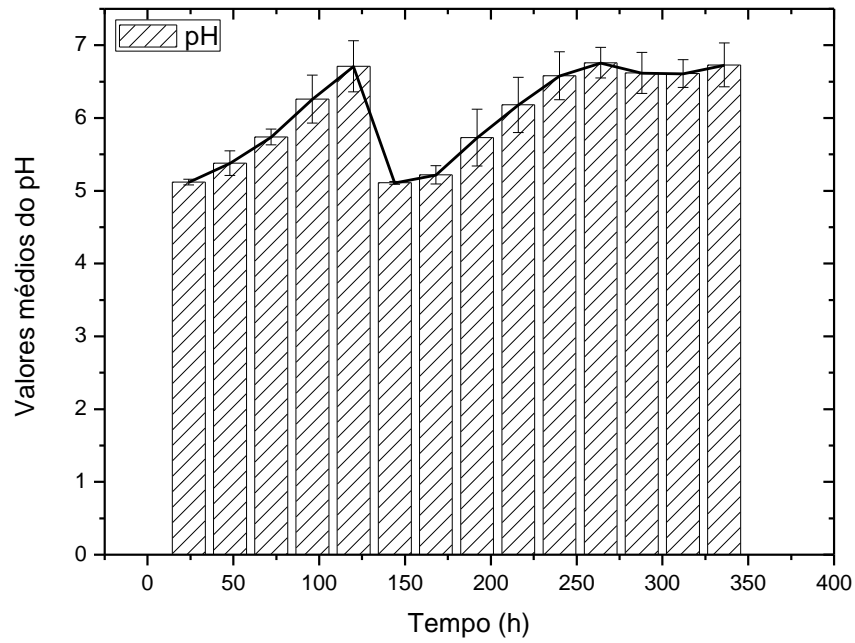


Figura 5: Evolução do pH ao longo do experimento

A partir do dia 5 foram visualizados contaminantes na cultura, pois através da coloração de Gram visualizamos colônias de estafilococos, fato que coincidiu com a elevação do pH acima do nível crítico de desmineralização 5,5. Esta contaminação nos forçou a preparar um novo inóculo e praticamente reiniciar o experimento no dia 6 (120 horas), evidenciada pela descontinuidade da Figura 5. Após 24 horas, o pH foi reduzido a 5,0 mantendo-se próximo a este valor até o dia 8 (168 horas). A partir do dia 9 observou-se contínua elevação do pH, inviabilizando satisfatório processo de desmineralização.

O coeficiente de espalhamento foi medido diariamente durante todo experimento, sendo que no primeiro dia foram realizadas 3 medidas e nos dias subsequentes duas medidas diárias com intervalo de 12 horas entre elas. A média do coeficiente de espalhamento em função do tempo de exposição à cultura de

bactérias, calculado sem desprezar o sinal proveniente da superfície das amostras pode ser visualizada na Figura 6, juntamente com a evolução do pH do meio de cultura.

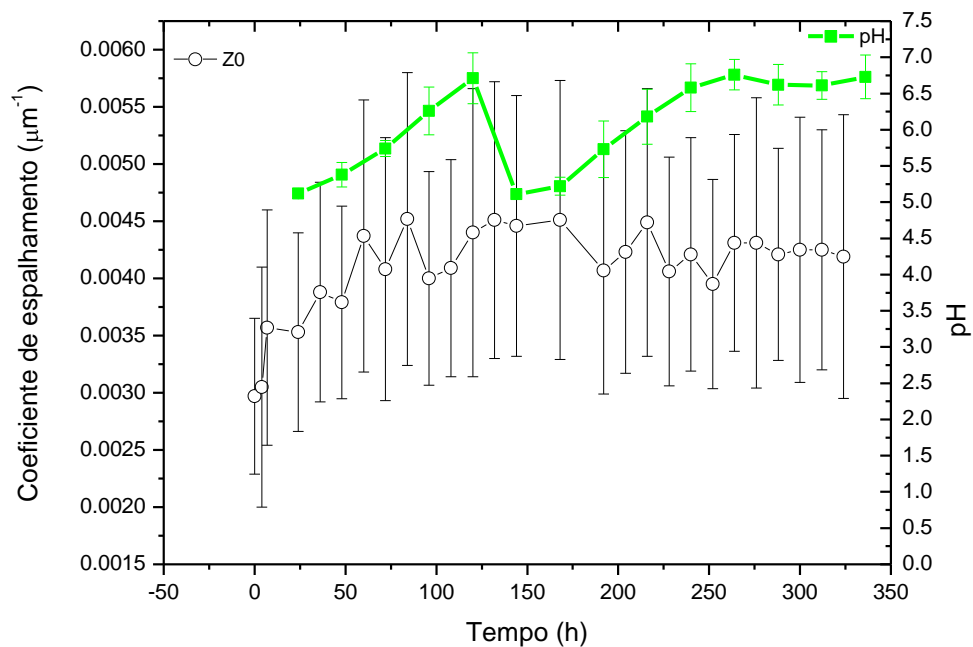


Figura 6: Coeficiente de espalhamento médio para todas as amostras em função do tempo de exposição à cultura de bactérias, calculado sem desprezar o sinal proveniente da superfície das amostras, e média do pH do meio de cultura aferido ao longo do experimento.

A figura acima representa a média do coeficiente de espalhamento de todas as amostras em função do tempo, sem que o sinal na superfície das amostras fosse desprezado (Z0). É importante salientar que as amostras foram transferidas do poço para uma plataforma de leitura, onde eram posicionadas sempre na mesma posição. Portanto a imagem captada pelo OCT para uma mesma amostra, era realizada sempre na mesma posição.

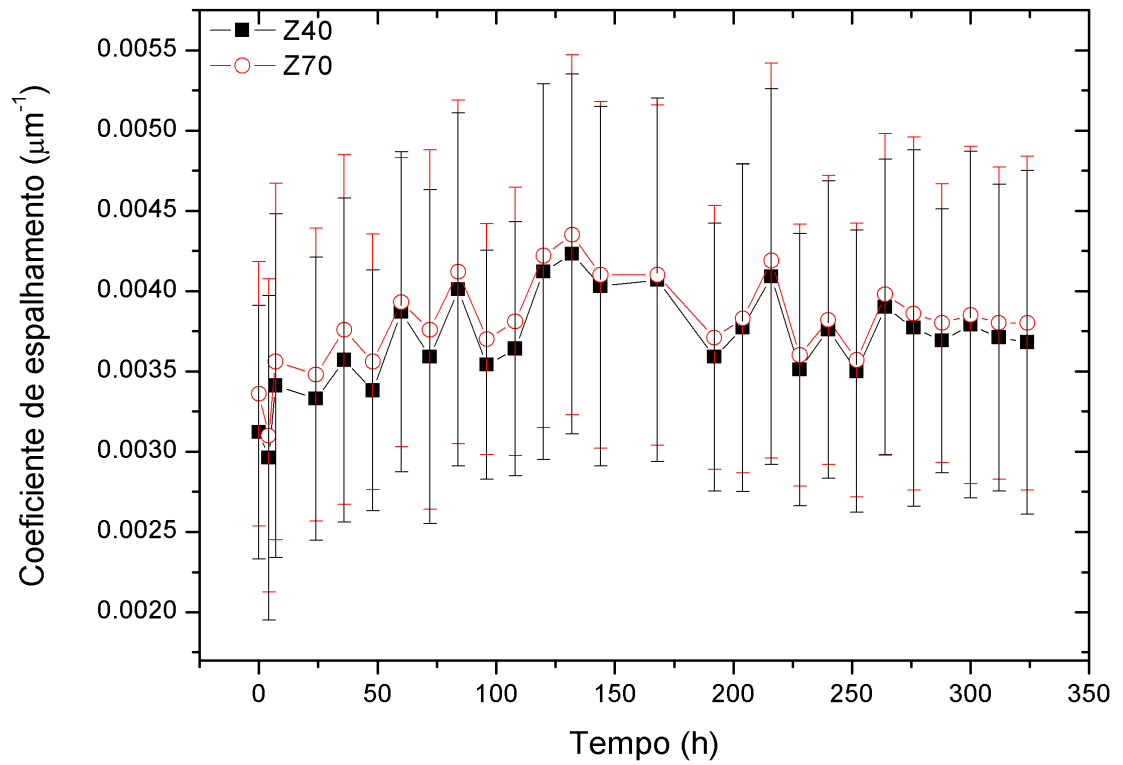


Figura 7: Coeficiente de espalhamento médio para todas as amostras em função do tempo de exposição à cultura de bactérias, calculado nas condições analisadas de descarte de sinal proveniente da superfície das amostras de 40 e 70 μm abaixo da superfície.

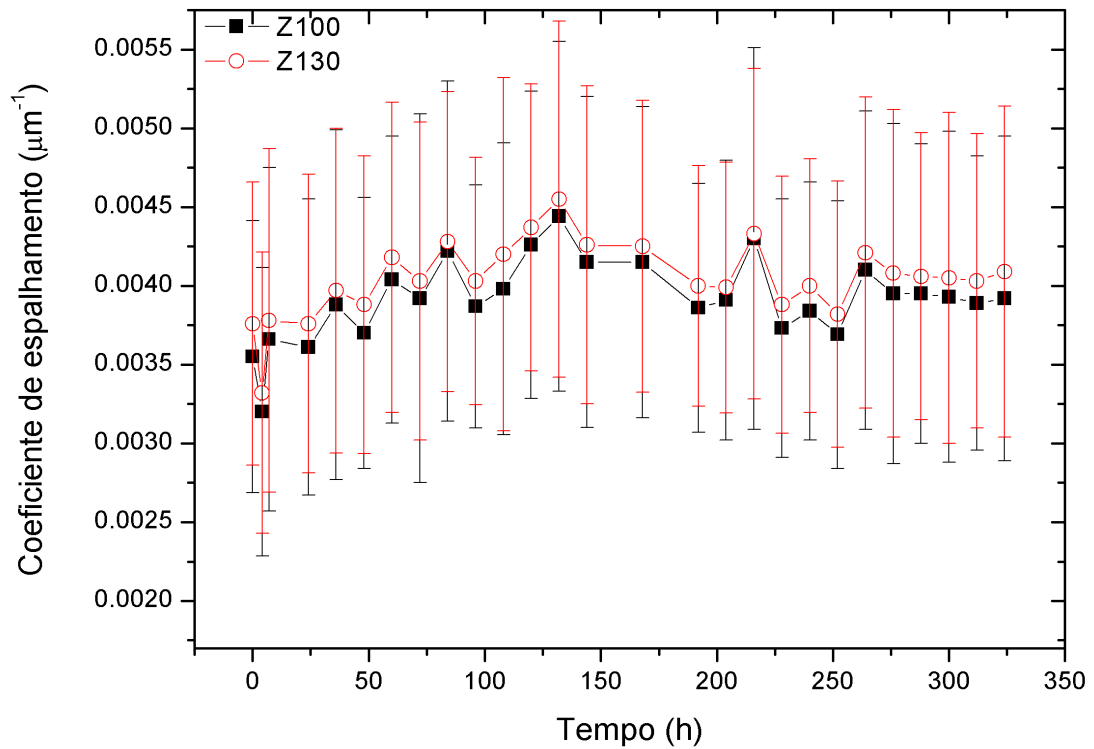


Figura 7: Coeficiente de espalhamento médio para todas as amostras em função do tempo de exposição à cultura de bactérias, calculado nas condições analisadas de descarte de sinal proveniente da superfície das amostras de 100 e 130 μm abaixo da superfície.

As análises das imagens realizadas pelo software desenvolvido para este experimento, geraram coeficientes de extinção em função do tempo. Foram realizadas análises desprezando 0 μm , 40 μm , 70 μm , 100 μm e 130 μm de sinal de OCT abaixo da superfície das amostras, para cada análise com x superficial desprezado, foram realizadas análises e estão consolidadas nas Figuras 7 e 8. Foram realizados diferentes análises, pois acreditava-se que o sinal do OCT proveniente da superfície, ou seja, em contato com o ar, poderia interferir no resultado do coeficiente analisado. Nota-se através das Figuras 7 e 8, que o comportamento geral de todas as análises realizadas foi o mesmo. Nestas Figuras é possível visualizar uma elevação inicial do coeficiente de espalhamento, que pode ter ocorrido em função de as amostras inicialmente apresentarem-se desidratadas e após o seu contato com o meio de cultura, houve uma re-hidratação.

No dia 6 (150 horas), onde o experimento foi praticamente reiniciado devido à contaminação das amostras, observa-se uma nova queda no pH do meio de cultura e há também uma diminuição do coeficiente de espalhamento até o dia 11 (275 horas). Esta diminuição do coeficiente de espalhamento é o resultado esperado neste experimento, porém ela não se manteve até o final, pois houve uma nova contaminação das amostras, que ocasionou uma nova elevação do pH. O período em que houve a diminuição do coeficiente de espalhamento, foi o período em que houve pequena desmineralização do esmalte dental.

Imagens adquiridas pelo equipamento de OCT de uma mesma amostra em diferentes momentos do experimento são representadas na Figura 8, início do experimento, e na Figura 9, ao último dia do experimento. Nas figuras a seguir é possível observar que não houve mudança estrutural visível no esmalte, as imagens inicial e final são praticamente iguais.

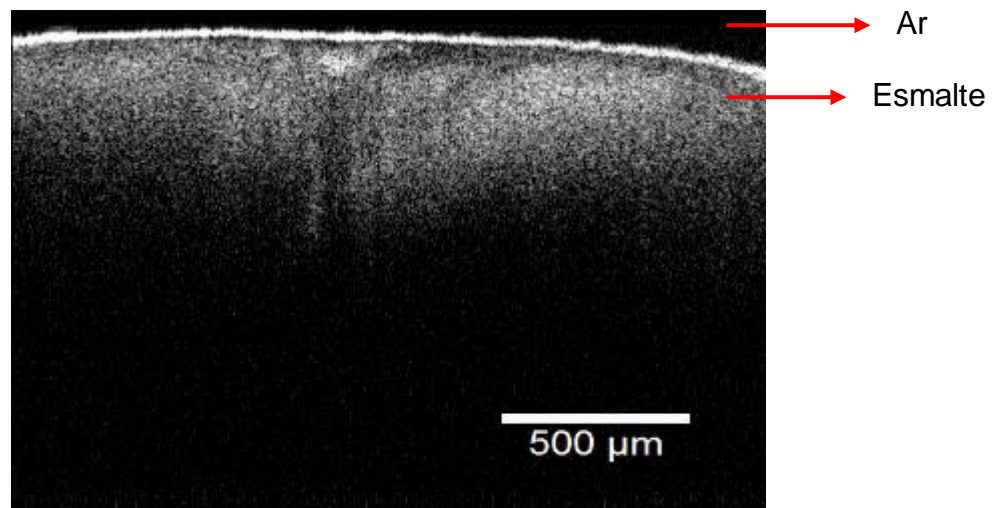


Figura 8: Amostra visualizada através do OCT - inicial

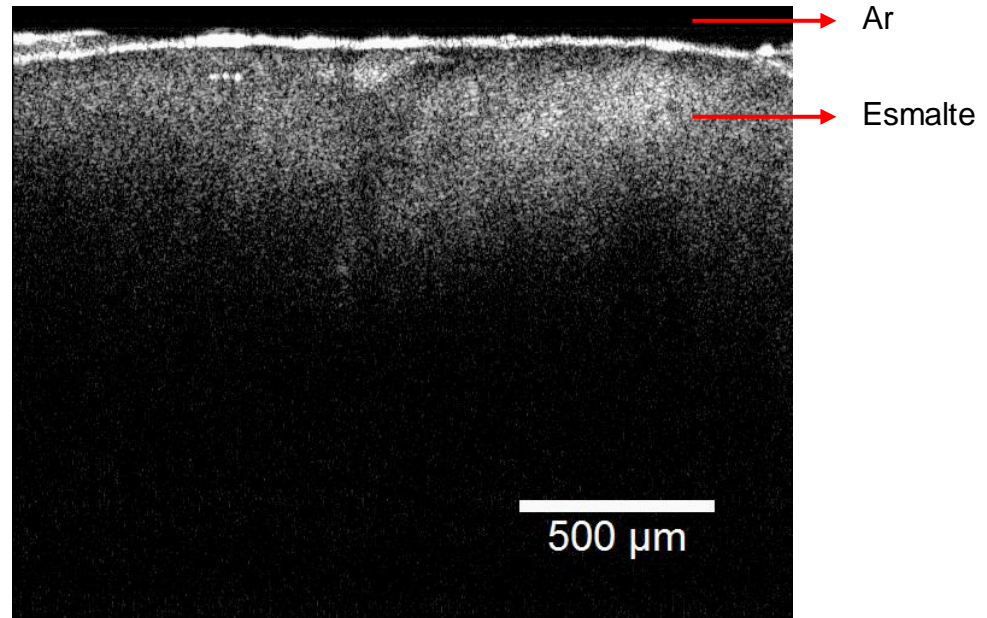


Figura 9: Amostra visualizada através do OCT – final (15 dias)

Visualmente não foi possível identificar alterações na estrutura do esmalte, por esse motivo faz-se necessária uma análise mais quantitativa, como o cálculo do coeficiente de espalhamento aqui utilizado.

A imagem da figura 10 é de uma amostra submetida à microscopia e a figura 11 é de uma amostra submetida à microscopia por luz polarizada ao final do período experimental, a fim de comprovação de que houve desmineralização. A seguir pode-se observar pequena desmineralização de duas amostras. A faixa escurecida representa o processo de desmineralização ocorrido na superfície do esmalte.

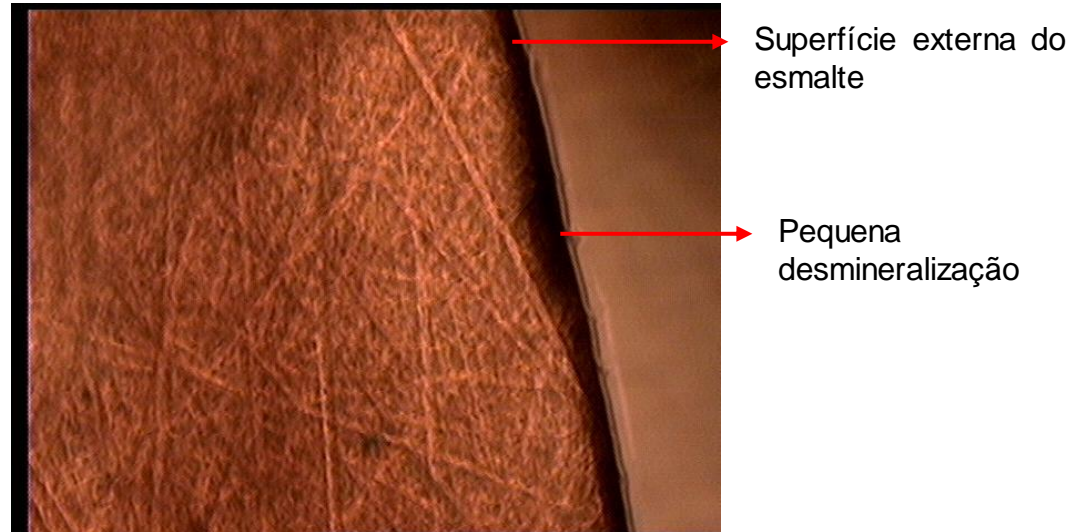


Figura 10 : Amostra visualizada através da microscopia.

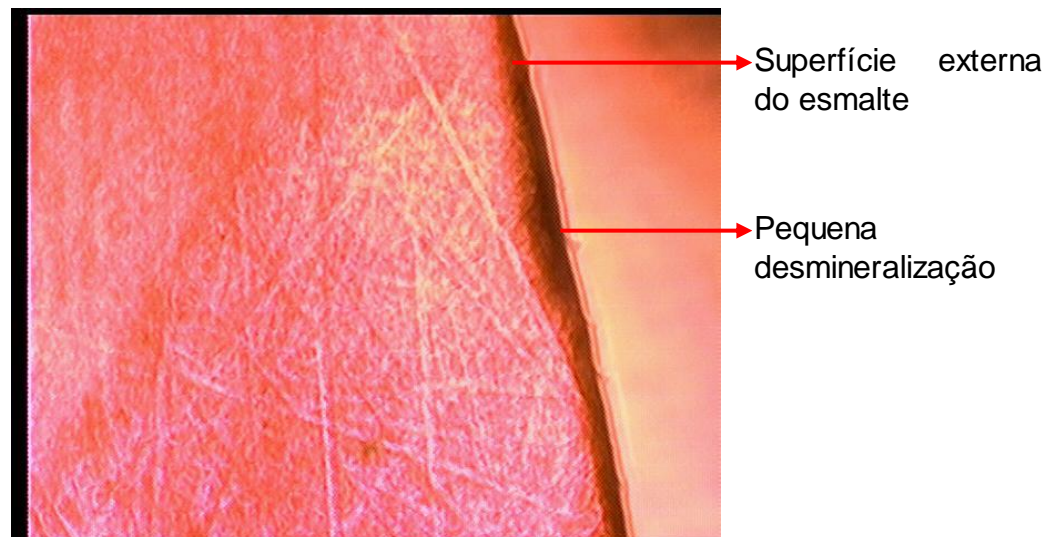


Figura 11: Imagem de amostra submetida à microscopia por luz polarizada.

Na Figura 12 pode-se observar uma amostra submetida à microscopia de luz polarizada, onde o traço branco indica a faixa onde houve pequena desmineralização do esmalte.

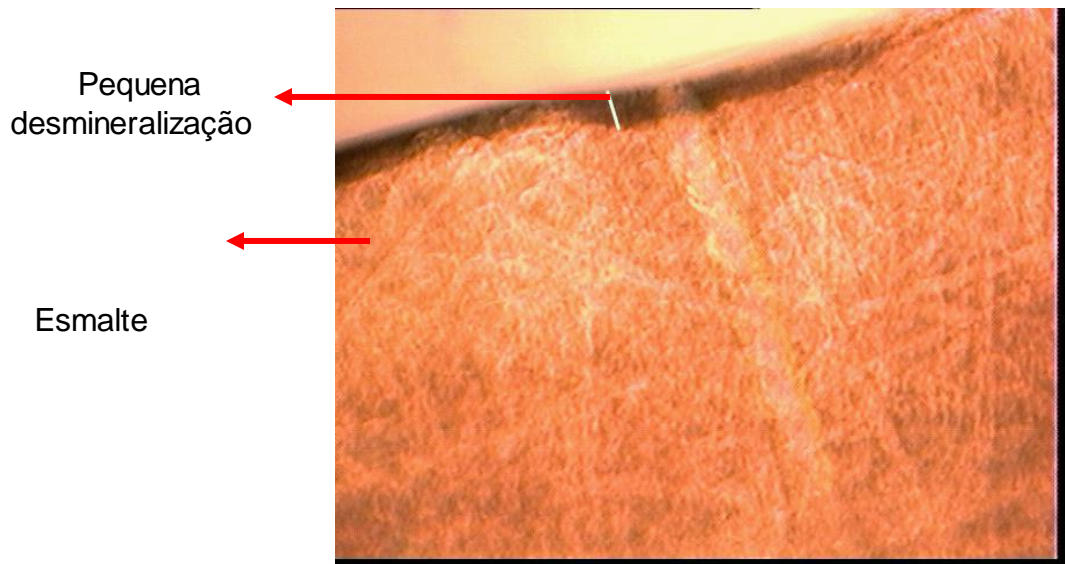


Figura 12: Imagem de amostra submetida à microscopia de luz polarizada.

6 DISCUSSÃO

Os resultados aqui apresentados não corresponderam ao esperado inicialmente, baseado nos resultados encontrados na literatura já citada^{3, 5, 6,7,21,27,31}. A análise da Figura 5 permitiu inferir que a variação do pH pode ter influenciado de forma definitiva o processo de desmineralização. O fato da amostra ser retirada de seu meio de cultura para realizar as medidas, também pode ter perturbado a eficiência do biofilme na desmineralização do esmalte. A remoção da amostra do poço para a plataforma de leitura ocasionou a contaminação por estafilococos, contribuindo para o aumento do pH de 5,0 (dia 6) à 6,75 (dia 15). A contaminação encontrada no dia 5 foi muito prejudicial para o experimento como um todo, pois este foi praticamente reiniciado, envolvendo novo preparo das culturas e das amostras. Na Figura 6 podemos observar uma diminuição do coeficiente de espalhamento a partir de 150h (dia 6) até 275h (dia 11), que é o resultado esperado, entretanto o pH voltou a subir e o coeficiente de espalhamento manteve-se constante a partir desse momento. A Figura 7 apresenta o comportamento para o coeficiente de espalhamento em função do tempo para as diferentes formas de análise. Podemos observar que o valor absoluto do coeficiente de espalhamento é alterado pela metodologia de cálculo, mas seu comportamento geral permanece o mesmo. A forma de cálculo do coeficiente de espalhamento, ou seja, a região escolhida para o cálculo, pode ser melhorada. Novas metodologias de análise podem ser implementadas, por exemplo, calculando a área sob a curva do sinal de OCT, ou o processamento de imagens, subtraindo das imagens posteriores a imagens inicial, para esse método ser eficaz, todas as tomadas de dados devem ser realizadas exatamente na mesma posição, e para isso deve-se modificar o desenho experimental. Entretanto como o objetivo é poder aplicar essa metodologia na rotina da clínica odontológica, deve-se manter o procedimento o mais simples possível.

Como a profundidade de penetração do OCT pode ser alterada devido à topografia do dente³³, preconizou-se utilizar neste trabalho, somente as superfícies

vestibulares e linguais das amostras, tentando assim obter o máximo de penetração do sinal de OCT.

As amostras escolhidas foram justamente selecionadas por não possuírem qualquer contato com flúor, pois vários estudos demonstram a capacidade remineralizadora do flúor e a necessidade de um pH mais ácido para que ocorra a dissolução mineral da estrutura dentária^{7,18,19,20}, o que poderia dificultar o processo de desmineralização deste experimento.

Os resultados iniciais achados neste experimento não foram semelhantes aos resultados da tese (Freitas, A.Z., 2007)³⁶, provavelmente por este trabalho ter sido realizado em dentina radicular, que apresenta estrutura mais suscetível a desmineralização em relação ao esmalte. Portanto não se pode esperar que os resultados sejam semelhantes, mesmo com o experimento sendo realizado no mesmo intervalo de tempo, pois esmalte e dentina são substratos diferentes.

Vários autores que utilizaram a técnica de OCT para visualizar o processo de desmineralização dental, corroboram com o fato de esta técnica ser efetiva para captar pequenas alterações estruturais^{2,3,5,7,21,30,35}. No entanto, neste experimento, provavelmente pela elevação do pH ocorrida, não se observou à alteração estrutural esperada.

A microscopia por luz polarizada é uma técnica consagrada para a visualização de estágios iniciais de desmineralização²⁸, por este motivo esta técnica foi utilizada nesta pesquisa, para comprovar os nossos resultados. Apesar do processo de desmineralização ter sido observado pela microscopia de luz polarizada, as modificações estruturais do esmalte não foram suficientes para serem detectadas pelo sistema de OCT, conforme pode ser observado nas figuras, Figura 8, Figura 9 e Figura 10. Esse resultado comprova a hipótese do processo de desmineralização ter sido prejudicado por algum fator externo, movimentação das amostras por exemplo.

7 CONCLUSÕES

Mediante as condições experimentais deste estudo, não foi possível monitorar a desmineralização do esmalte humano pelo sistema de OCT, visto que a variação do pH em muito prejudicou o processo de desmineralização.

ANEXO**DECLARAÇÃO DE DOAÇÃO DE DENTES****Identificação do Doador**

Nome:.....

Data de Nascimento:..... Local de Nascimento: UF:.....

RG n°:..... CPF n°.....

Endereço (Rua ou Avenida n° e complemento):

Cidade:..... UF:..... CEP:.....

Telefones para contato:.....

E-mail:.....

DECLARAÇÃO

Declaro ter sido esclarecido sobre quais os motivos que levaram a necessidade de remoção do(s) dente(s)..... – por razões ortodônticas - e concordo que os mesmos sejam utilizados na pesquisa de título “Caracterização do Processo de Desmineralização em Esmalte Humano através da Tomografia por Coerência Óptica” - que objetiva utilizar a técnica de tomografia por coerência óptica, para monitorar o desenvolvimento do processo de desmineralização do esmalte de dentes humanos.

Fui ainda esclarecido pelo pesquisador que minha identidade não será divulgada por qualquer meio e que o material recolhido será utilizado unicamente para a presente pesquisa.

São Paulo,.....de.....de 2008.

Assinatura

-
- ¹ BARATIERI, L.N., et al. Odontologia restauradora – fundamentos e possibilidades. São Paulo: Ed. Santos; 2002, 739p., cap.17, p.673-722.
- ² NGAOTHEPPITAK, P.; DARLING, C.L.; FRIED, D. Measurment of the severity of natural smooth surface (interproximal) caries lesions with polarization sensitive optical coherence tomography. *Lasers Surg. Med.*, v.37, p.78-88, 2005.
- ³ BAUMGARTNER, A.; DICHTL, S.; HITZENBERGER, C.K.; SATTMANN, H.; ROBL, B.; MORITZ, A.; FERCHER, A.F.; SPERR, W. Polarization-sensitive optical coherence tomography of dental structures. *Caries Res*, v.34, n.1, p.59-69, 2000.
- ⁴ FUJIMOTO, J.G.; BREZINSKI, M.E.; TEARNEY, G.J.; BOPPART, S.A.; BOUMA, B.; HEE, M.R.; SOUTHERN, J.F.; SWANSON, E.A. Optical biopsy and imaging using optical coherence tomography. *Nature Medicine*, v.1, n.9, p.970-972, sep. 1995.
- ⁵ BOSCH, J.J. ten; VAN DER MEI, H.C.; BORSBOOM, P.C.F. Optical monitor of in vitro caries. *Caries Res*, v.18, p.540-547, 1984.
- ⁶ WANG, X.J.; MILNER, T.E.; DE BOER, J.F.; ZHANG, Y.; PASHLEY, D.H.; NELSON, J.S. Characterization of dentin and enamel by use of optical coherence tomography. *Applied Optics*, v.38, n.10, p.2092-2096, 1999.
- ⁷ FRIED, D.; XIE, J.; SHAFI, S.; FEATHERSTONE, J.D.B.; BREUNIG, T.M.; LE, C. Imaging caries lesions and lesion progression with polarization sensitive optical coherence tomography. *J Biomed Opt*, v.7, n.4, p.618-627, oct 2002.
- ⁸ EISENMANN, D.R. Estrutura do esmalte. In: Tem Cate, A.R. *Histologia bucal*. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1988. cap.12, p. 175-192
- ⁹ FELDCHEIN, F.I.; GELIKONOV, G.V.; GELIKONOV, V.M.; IKSANOV, R.R.; KURANOV, R.V.; SERGEEV, A.M. *In vivo* OCT imaging of hard and soft tissue of the oral cavity. *Optics Express*, v.3, n.6, p.239-250, 1998.
- ¹⁰ NIEMZ, M.H. *Laser-tissue interactions – fundamentals and applications*. Germany: Ed. Springer-Verlag, 1996, 296p.
- ¹¹ THYLSTRUP, A. When is caries caries, and what should we do about it? *Quintessence Int.*, v.29, n.9, p.594-597, 1998.
- ¹² HARDIE, J.M. The microbiology of dental caries. *Dental Update*, v.1-5, p.199-208, may 1982.
- ¹³ THYLSTRUP, A. *Textbook of clinical cariology*. 2 ed. Copenhagen, Munksgaard, 1996.
- ¹⁴ JENSEN, ME Responses of interproximal plaque pH to sancks foods and effect of chewing sorbital containing gum . *JADA*, v. 113, p. 262-266, Aug, 1986.
- ¹⁵ LOESCHE, WJ. Cárie dental: uma infecção tratável Rio de Janeiro: Cultura Médica, 1993. cap.10, p.128-150: Produção de ácidos na placa.
- ¹⁶ LARSEN, M. J. BRUUN, C. A química da carie dentaria e flúor – mecanismo de ação. In Thylstrup, A.; Fejerskov, O. *Cariologia clinica*. Rio de Janeiro: Cultura Medica, 1995. cap.11, p.231-258.
- ¹⁷ WISTON, AE; BHASKAR, S.N. Caries prevention in the 21st century. *JADA* v. 129, p.1579-1587, Nov,

1998.

¹⁸FEATHERSTONE, J.D.B.; GLENA, R.; SHARIATI, M.; SHIELDS, C.D. Dependence of *in vitro* demineralization of apatite and remineralization of dental enamel on fluoride concentration. *J Dent Res.*, v.69, p.620-625, 1990.

¹⁹ WHITE, D.J.; FEATHERSTONE, J.D.B. A longitudinal microhardness analysis of fluoride dentifrice effects on lesion progression *in vitro*. *Caries Res.*, v.21, p.502-512, 1987.

²⁰TEN CATE, J.M.; BUIJS, M.J.; MILLER, C.C.; EXTERKATE, R.A.M. Elevated fluoride products enhance remineralization of advanced enamel lesions. *J Dent Res.*, v.87, n.10, p.943-947, 2008.

²¹CHONG, S.L.; DARLING, C.L.; FRIED, D. Nondestructive measurement of the inhibition of demineralization on smooth surfaces using polarization-sensitive optical coherence tomography. *Lasers Surg. Med.*, v.39, p.422-427, 2007.

²²JONES, R.S.; FRIED, D. Remineralization of enamel caries can decrease optical reflectivity. *J Dent Res*, v. 85, n. 9, p.804-808, 2006.

²³KO, C.C.; TANTBIROJN, WANG, T.; DOUGLAS, W.H. Optical scattering power for characterization of mineral loss. *J Dent Res.*, v.79, n.8, p.1584-1589, 2000.

²⁴JONES, R.S.; FRIED, D. Remineralization of enamel caries can decrease optical reflectivity. *J Dent Res*, v. 85, n. 9, p.804-808, 2006.

²⁵PAROLO, C.C.F.; MALTZ, M. Microbial contamination of noncavitated caries lesions: a scanning electron microscopic study. *Caries Res*, v.40, n.6, p.536-541, 2006.

²⁶OGAARD, B.; ROLLA, G.; ARENDS, J. *In vivo* progress of enamel and root surface lesions under plaque as a function of time. *Caries Res*, v.22, n.5, p.302-305, 1988.

²⁷AMAECHI, B.T.; HIGHAM, S.M.; PODOLEANU, A.GH.; ROGERS, J.A.; JACKSON, D.A. Use of optical coherence tomography for assessment of dental caries: quantitative procedure. *J Oral Rehab.*, v.28, p. 1092-1093, 2001.

²⁸GILMOUR, A.S.M.; EDMUNDS, D.H. The polarized light microscopic appearance of caries-like lesions adjacent to restored cavities in the crowns and roots of extracted human teeth. *J Oral Rehab.*, v.25, p.929-939, 1998.

²⁹McINTYRE, J.M.; FEATHERSTONE, J.D.B.; FU, J. Studies of dental root surface caries.1: comparison of natural and artificial root caries lesions. *Aus Dent J.*, v.45, n.1, p.24-30, 2000.

³⁰OTIS, L.L.; COLSTON Jr, B.W.; EVERETT, M.J.; NATHHEL, H. Dental optical coherence tomography: a comparison of two *in vitro* systems. *Dentomaxillofacial Radiology*, v.29, n.2, p.85-89, 2000.

³¹FREITAS, A.Z.; ZEZELE, D.M.; VIEIRA Jr., N.D.; RIBEIRO, A.C.; GOMES, S.L. Imaging carious human dental tissue with optical coherence tomography. *J Appl Phys*, v.99, p.024906-1 – 024906-6, 2006.

³²FRIED, D.; GLENA, R.E.; FEATHERSTONE, J.D.B.; SEKA, W. Nature of light scattering in dental enamel and dentin at visible and near-infrared wavelengths. *Appl Opt.*, v.34, n.7, p.1278-1285, mar.1995.

³³JONES, R.S.; DARLING, C.L.; FEATHERSTONE, J.D.B.; FRIED, D. Imaging artificial caries on the occlusal surfaces with polarization-sensitive optical coherence tomography. *Caries Res*, v.40, n.2, p.81-89, 2006.

³⁴COLSTON Jr., B.W.; SATHYAM, U.S.; Da SILVA, L.B.; EVERETT, M.J. Dental OCT. *Optic Express*, v.3,

n.6, p. 230-238, 1998.

³⁵ COLSTON Jr., B.W.; MATTHEW, J.E.; DA SILVA, L.B.; OTIS, L.L.; STROEVE, P.; NATHEL, H. Imaging of hard- and soft-tissue structure in the oral cavity by optical coherence tomography. *Applied Optics*, v.37, n.16, p.3582-3585, jun 1998.

³⁶ SCHMITT, J.M.; KNÜTTEL, A.; YADLOWSKY, M.; ECKHAUS, M.A. Optical-coherence tomography of a dense tissue: statistics of attenuation and backscattering. *Phys Med Biol.*, v.39, p. 1705-1720, 1994.

³⁷ FREITAS, A.Z. Caracterização de tecidos biológicos através de tomografia por coerência óptica. São Paulo, 2007. Tese (Doutorado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear). Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares.

³⁷ KITAGAWA, H.; WAKOH, M.; KUROYANAGI, K. Image contrast range for detection of enamel defects using a digital dental imaging system. *Oral Radiol.*, v.15, n.2, p.95-104, 1999.

³⁸ THYSTRUP, A.; BOYAR, R.M.; HOLMEN, L.; BOWDEN, G.H. A light and scanning electron microscopic study of enamel decalcification in children living in a water-fluoridated area. *J Dent Res*, v.69, n.10, p.1626-1633, oct. 1990.