

UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO

MESTRADO EM BIOFOTÔNICA APLICADA ÀS CIÊNCIAS DA SAÚDE

NELSON HIDEYOSHI KOSHOJI

**DETECÇÃO DE EROSÃO DENTAL UTILIZANDO ANÁLISE DE
ESPALHAMENTO DE LUZ COERENTE - *SPECKLE***

SÃO PAULO

2014

NELSON HIDEYOSHI KOSHOJI

**DETECÇÃO DE EROSÃO DENTAL UTILIZANDO ANÁLISE DE
ESPALHAMENTO DE LUZ COERENTE - *SPECKLE***

Defesa da Dissertação de Mestrado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em Biofotônica
Aplicada às Ciências da Saúde da Universidade
Nove de Julho, como requisito para obtenção do
título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Alessandro M. de Ana

SÃO PAULO

2014

FICHA CATALOGRÁFICA

Koshoji, Nelson Hideyoshi.

Detecção de erosão dental utilizando análise de espalhamento de luz coerente – Speckle. / Nelson Hideyoshi Koshoji. 2014.

20 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2014.

Orientador (a): Prof. Dr. Alessandro Melo de Ana.

1. Erosão Dental. 2. Laser. 3. Speckle. 4. Diagnóstico.

I. Ana, Alessandro Melo de. II. Título

CDU 615.831

São Paulo, 01 de dezembro de 2014.

TERMO DE APROVAÇÃO

Aluno(a): NELSON HIDEYOSHI KOSHOJI

Título da Dissertação: "DETECÇÃO DE EROSÃO DENTAL UTILIZANDO ANÁLISE DE ESPALHAMENTO DE LUZ COERENTE - SPECKLE"

Presidente: PROF. DR. ALESSANDRO MELO DE ANA



Membro: PROFA. DRA. PATRÍCIA APARECIDA DA ANA



Membro: PROF. DR. MARCELO TAVARES OLIVEIRA



AGRADECIMENTOS

Agradeço à **Universidade Nove de Julho** e ao **Departamento de Biofotônica Aplicada às Ciências da Saúde** pela oportunidade concedida para a realização do mestrado.

Não seria capaz de compor esta dissertação sem a ajuda de várias pessoas que colaboraram para a realização deste trabalho. Por isso, quero expressar minha gratidão:

Ao meu orientador **Prof. Dr. Alessandro Melo de Ana**, que durante os últimos dois anos, teve a paciência de orientar uma pessoa desprovida de qualquer metodologia científica; esteve presente em todo o processo experimental e participou constantemente na elaboração da escrita dos artigos e desta dissertação. Tenho o imenso prazer em dizer que aprendi a desenvolver o conhecimento de forma científica graças a sua orientação.

À minha colega e amiga **Carolina C. Bortoletto**, sem a sua intervenção, este trabalho não poderia ser realizado, pois foi responsável por construir as amostras de forma eficiente e a paciência de ajudar a coletar informações que contribuíram para o alcance dos objetivos.

À **Profa. Dra. Sandra K. Bussadori**, que teve um papel importante na elaboração dos artigos científicos oriundo deste projeto.

Ao **Prof. Dr. Renato A. Prates**, que soube corrigir alguns atos falhos do meu aprendizado científico.

Ao **Prof. Dr. Marcelo T. de Oliveira**, que me ajudou de forma valiosa em suas opiniões para a finalização deste projeto.

Aos meus queridos pais, **Tsukasa Koshoji** e **Miria Koshoji**, pela minha vida, pela dedicação, amor e carinho.

DEDICATÓRIA

A minha esposa Eliane e às minhas filhas Amanda e Noemi.

RESUMO

A erosão dental é uma lesão cervical não cariiosa que está relacionada a perda progressiva do dente através do seu contato com substâncias químicas que dissolvem os cristais de hidroxiapatita do esmalte. Atualmente, é uma condição altamente prevalente entre indivíduos de todas as idades. A perda da estrutura deste tecido provoca alterações na rugosidade de sua superfície. O objetivo deste trabalho é desenvolver uma metodologia que identifique e quantifique essa lesão de forma não invasiva, não destrutiva, com baixo custo e executado em tempo real através da análise dos padrões de espalhamento da luz coerente, denominado speckle. Foram utilizadas 32 amostras de incisivos bovinos e dividida em 4 grupos com diferentes tempos de ataque ácido. Metade de cada amostra foi protegida e, em seguida, imersas em coca-cola ($\text{pH} \cong 2,5$) durante 10, 20, 30 e 40 min, duas vezes ao dia e 7 dias consecutivos. Cada amostra possui duas áreas: metade saudável e metade erodida. Após o desafio, as amostras foram submetidas à análise speckle para encontrar as diferenças relativas entre as duas regiões de cada grupo. Foi encontrado 10 min com 18%, 20 min com 24%, 30 min com 38% e 40 min com 44% de diferença relativa. Após esta análise, foram realizados, também, o teste de dureza Knoop afim de comparar os métodos. Houve uma tendência linear entre os métodos com coeficiente $r = 0.80$. A imagem speckle é proporcional ao tempo de ataque, possui uma forte correlação e uma boa concordância com o teste de dureza Knoop.

Palavras-chaves: Erosão dental, Diagnóstico, Laser, *Speckle*, Dureza Knoop.

ABSTRACT

Dental erosion is a non-carious cervical lesion that is related to progressive tooth loss through its contact with chemicals that dissolve the enamel hydroxyapatite crystals. Currently, it is a highly prevalent condition among individuals of all ages. The loss of the structure of this tissue causes changes in the roughness of the surface. The objective of this work is to develop a methodology to identify and quantify this injury, in a non-invasively and non-destructive way, with low cost and executed in real time by analyzing the coherent light scattering patterns, called speckle. It was used 32 samples of bovine incisors and they were divided into 4 groups with different times of acid etching. Half of each sample was protected and then immersed in Coke (pH \cong 2.5) for 10, 20, 30 and 40 min, twice daily and for 7 consecutive days. Each sample has two areas: half healthy and half eroded. After the challenge, the samples were submitted to speckle analysis to find the relative differences between the two regions in each group. It was found 10 min with 18% 20 min with 24% 30 min with 38% and 40 min with 44% of relative difference. After this analysis, we performed also a Knoop hardness test in order to compare methods. There was a linear trend between the methods with coefficient $r = 0.80$. The speckle image is proportional to the attack time, has a strong correlation and a good agreement with the Knoop hardness test.

Key words: Dental Erosion, Diagnostics, Laser, Speckle, Hardness Knoop.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Estrutura do dente: (A) esmalte, (B) dentina, (C) polpa e (D) cimento.
 Fonte: <http://pt.wikipedia.org/wiki/Dente> 2
- Figura 2: Desgaste por erosão dental é possível visualizar o esmalte intacto ao longo da margem da gengiva e uma coloração branca ao longo da superfície do dente.
 Fonte: (GANSS, 2006) 3
- Figura 3: Espectro Eletromagnético. O laser atua nas faixas com comprimento de onda entre 380 nm a 780 nm. 7
- Figura 4: A incidência de luz coerente sobre uma superfície pode provocar quatro fenômenos físicos: absorção, reflexão, espalhamento e transmissão. 7
- Figura 5: A reflexão de luz coerente em superfícies lisas ocorre é denominada de a) reflexão especular, enquanto que, a reflexão em superfícies rugosas é denominada de b) reflexão difusa. Fonte: (SILVA, 2007) 8
- Figura 6: Speckle: interferência luminosa gerando granulados ópticos claros e escuros. 9
- Figura 7: Na incidência de luz, ao refletir ou espalhar, quando um feixe encontra outro, com mesma intensidade e direção, as ondas dos feixes estão em fase, ao somar, ocorre a interferência construtiva (efeito claro), por outro lado, quando um feixe encontra outro, com mesma intensidade e direção oposta, as ondas dos feixes estão completamente defasados, ao somar, eles se anulam gerando a interferência destrutiva (efeito escuro) 9
- Figura 8: Cada tubo de PVC contém duas amostras, e cada amostra possui duas regiões: metade sadia (protegido antes de ser submetido ao ataque ácido) e a outra metade lesionada (submetido ao ataque erosivo). 12
- Figura 9: Nas amostras, a região lesionada está disposta à esquerda (submetido ao ataque ácido), e a região saudável está disposta à direita (protegido durante o ataque ácido). 13
- Figura 10: Esquema de Captura de Imagem: a) Laser HeNe 633 nm, b) Lente para aumentar a incidência da região lesionada, c) Amostra, d) Captura de Imagem com uma câmera CCD, e) Transformação da intensidade luminosa da imagem em pixel. 14

- Figura 11: Representação de uma imagem digital: a) Plano cartesiano x e y (esquerda: lesão; direita: sadio), b) Plano espacial e c) Matriz numérica. 16
- Figura 12: a) Na amostra representada pela de luz branca, o contraste é quase imperceptível entre a região sadia e lesionada e b) na amostra representada pela luz coerente, houve um aprimoramento no contraste, a região sadia apresenta uma intensidade luminosa maior em relação à região lesionada. 16
- Figura 13: a) Amostra oriunda de iluminação de luz branca, b) amostra oriunda de iluminação de luz coerente e c) imagem gerada através de falsas cores a partir da luz coerente. 17
- Figura 14: Cálculo da intensidade média ($\langle I \rangle$) e do seu respectivo desvio padrão (σ). 18
- Figura 15: Diagrama Esquemático da construção de um mapa tipo LASCA. Uma matriz de ordem 700 se transforma em uma matriz de ordem 175 ao aplicar uma matriz quadrada de ordem 4. 19
- Figura 16: Recorte da amostra em uma matriz da região sadia e da região lesionada, para o cálculo do mapa LASCA de cada uma delas. 19
- Figura 17: Imagem do mapa LASCA na ordem de 4x4 obtida de cada região. 20
- Figura 18: Aparelho para medir a dureza Knoop. Fonte: USP, São Paulo. 21
- Figura 19: O comprimento da diagonal maior L da endentação do Knoop. 21
- Figura 20: a) Nas amostras à direita, identificada como região sadia, pode ser observado que a diagonal formada pelo diamante é menor (região mais dura), enquanto que, b) à esquerda, identificada como região lesionada, poder ser observado que a diagonal formada pelo diamante é maior (região menos dura) 22

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Índice que indica a severidade da lesão segundo Lussi (1996)	4
--	---

LISTA DE ABREVIATURAS

Couple Charge Device	CCD
grama	g
Laser <i>Speckle</i> Contrast Analysis	LASCA
Lesões Cervicais Não Cariosas	LCNC
Laser-Induced Fluorescence	LF
nanometro	nm
micrometro	µm
miliwatts	mW
minuto	min
Optical Coherence Tomography	OCT
Quantitative Light-induced Fluorescence	QLF
quilograma-força	kgf
Polyvinyl Chloride	PVC
Red, Green, Blue	RGB
segundos	s
Transillumination with Near-Infrared Light	TI-NIR

SUMÁRIO

FICHA CATALOGRÁFICA	iii
TERMO DE APROVAÇÃO	Erro! Indicador não definido.
AGRADECIMENTOS	v
DEDICATÓRIA	vi
RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS	xii
SUMÁRIO	xiii
1. CONTEXTUALIZAÇÃO	1
1.1. Erosão Dental	2
1.2. Tecnologias para diagnóstico de lesão dentária baseados em luz	4
1.3. Speckle	6
1.4. Objetivo	10
1.4.1. Objetivo Geral	10
1.4.2. Objetivo Específico	10
1.5. Hipótese	11
1.6. Justificativa e Motivação	11
2. MATERIAIS E MÉTODOS	12
2.1. Amostras de Dentes	12
2.2. Desafio Erosivo	13
2.3. Avaliação por imagem speckle	14
2.4. Análise speckle	16

2.5. Avaliação por teste de dureza Knoop.	21
3. RESULTADOS E DISCUSSÕES	23
3.1. Trabalho apresentado no XXIV Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica	23
3.2. Trabalho submetido para a revista PloS One: Laser Speckle imaging: A Novel Method for Detecting Dental Erosion.....	30
3.3. Trabalho a ser submetido: How to quantify enamel hardness shifts with laser speckle imaging: a real time analysis of na erosion model.....	50
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	65
5. REFERÊNCIAS	66
APÊNDICE A: Certificado de Apresentação do Trabalho no CBEB	69
APÊNDICE B: Carta de Aceite do Trabalho no SPIE	70
ANEXO A: Código-fontes dos softwares desenvolvidos	73

1. CONTEXTUALIZAÇÃO

A cárie dentária, é considerada como um grande problema na saúde pública, teve uma expressiva redução em sua prevalência, devido aos avanços científicos relacionados à sua prevenção; a fluoretação das águas e aumento do atendimento público relacionado à saúde oral. Em contrapartida, com as mudanças no estilo e qualidade de vida da população em geral, o desgaste dental ganhou atenção entre a comunidade científica, por aumentar sua prevalência entre indivíduos das mais diversas idades (BARBOSA *et al.*, 2009).

Enquanto a cárie dentária é uma lesão classificada como uma manifestação clínica de uma infecção bacteriana multifatorial, a erosão dental é uma lesão que provoca a perda progressiva desse tecido através de manifestações de origem não bacteriana, causado por processos químicos e mecânicos, conhecido como lesão cervical não cariada (LCNC) (GRIPPO *et al.*, 2004; HOEPPNER *et al.*, 2007).

O desgaste dental pode ser considerado como um processo natural causado pelo atrito da mastigação e escovação e pelo consumo de alimentos considerados ácidos, mas que passa a ser patológico à medida que a perda da estrutura dental compromete a sua estética e a funcionalidade do dente, surgindo sensibilidade dentária, desde um leve desconforto até a impossibilidade de ingestão de alguns alimentos (BARBOSA *et al.*, 2009).

As lesões cervicais não cariosas são classificadas em: abrasão, abfração e erosão.

- A **abrasão** é um processo de perda da estrutura dentária que está associado a um processo mecânico anormal, como por exemplo, o uso incorreto e excessivo da escovação e a mastigação de objetos externos como hábito nocivo à saúde bucal.
- A **abfração** é a perda da estrutura dentária associado a um processo mastigatório desbalanceado.
- A **erosão** é decorrente do contato do dente com substâncias químicas ácidas, sua origem pode estar relacionada a hábitos alimentares, doenças sistêmicas ou funcionais (trabalho).

A erosão dental vem sendo objeto de estudos e pesquisas da literatura já buscam prevenção com relação a essa lesão (AMAESHI *et al.*, 2005; CASTELAN *et al.*, 2010;

HOEPPNER *et al.*, 2007; LUSI *et al.*, 2008; ZERO *et al.*, 2006). Como a perda do tecido dental é irreversível, o seu diagnóstico precoce minimiza os danos e assume importante papel nas decisões do cirurgião-dentista. Novas ferramentas de diagnóstico de lesões cariosas e não cariosas estão sendo desenvolvidas e a área odontológica tem se beneficiado de maneira ampla, principalmente em novas tecnologias envolvendo a luz coerente. Algumas abordagens serão apresentadas no item 1.2 deste capítulo.

1.1. Erosão Dental

O dente é um órgão vivo, alimentado através do sangue e composto por quatro tecidos: esmalte, dentina, polpa e cimento. O esmalte é a camada mais externa da superfície do dente sendo o tecido mais duro e mineralizado de todo o corpo humano, composto de cristais de hidroxiapatita: 96% de matéria inorgânica e 4% de matéria orgânica e água. A dentina, que contém pequenos túbulos que vão diretamente à polpa do dente, tem uma composição de aproximadamente 70% de matéria orgânica, 20% de matéria inorgânica e 10% de água (ZERO *et al.*, 2006). A polpa é um tecido mole situado no centro do dente, onde se encontram os nervos e os vasos sanguíneos e, finalmente, o cimento é o tecido que circunda a raiz e promove a ligação, por meio dos ligamentos periodontais, ao osso alveolar (figura 1).

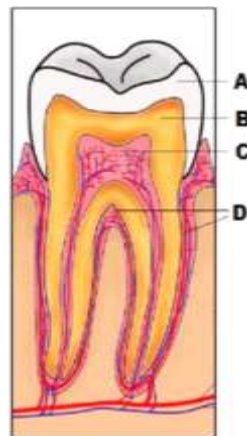


Figura 1: Estrutura do dente: (A) esmalte, (B) dentina, (C) polpa e (D) cimento. Fonte: <http://pt.wikipedia.org/wiki/Dente>

Dentre diversas patologias que podem acometer o esmalte do dente, a erosão dental ganhou destaque e importância nos últimos anos não só na população mais idosa, como

também em crianças (AL-DLAIGAN *et al.*, 2001). Destaca como seus principais sintomas a dor; uma aparência opaca; a formação de trincas e a formação de pequenos poros em sua estrutura (figura 2).



Figura 2: Desgaste por erosão dental é possível visualizar o esmalte intacto ao longo da margem da gengiva e uma coloração branca ao longo da superfície do dente. Fonte: (GANSS, 2006)

A erosão dental é definida como sendo a perda progressiva e irreversível da estrutura dentária provocada por processos químicos que ocorrem devido ao contato do dente com substâncias que apresentam pH baixo. A desmineralização começa nas camadas superficiais do esmalte, podendo evoluir para a dentina. Essa desmineralização é usualmente causada por substância ácida com pH inferior a 4,5 para o esmalte e a 5,5 para a dentina, dissolvendo os cristais de hidroxiapatita (BARRON *et al.*, 2003; GRIPPO *et al.*, 2004).

As substâncias químicas que provocam erosão dental podem ser provenientes de fontes extrínsecos e intrínsecos. Os fatores extrínsecos estão relacionados com dietas, ambientes, medicamentos e estilo de vida. O aumento de incidência de erosão dental também está relacionado ao ritmo da vida moderna, que tem influencia na substituição de alimentos frescos por bebidas e alimentos industrializados contendo conservantes e acidulantes podendo ser citados dentre eles: o refrigerante, a água gaseificada, o vinagre, o molho de saladas, o vinho, o iogurte, o queijo com conservantes e etc. Em relação ao estilo e qualidade de vida, muitos indivíduos adotaram uma dieta rica no consumo de frutas, sucos cítricos, chás com baixo pH e bebidas energéticas. Casos de indivíduos com erosão dental também podem ser associados ao ambiente onde trabalhadores estão em frequente contato com algum tipo de ácido como, por exemplo, fábricas de baterias e galvanização. Além disso, diversos medicamentos dentre as quais estão a aspirina; drogas antiasmáticas e consumo excessivo da vitamina C, apresentam um grande potencial erosivo (LUSSI *et al.* 2004; SOBRAL *et al.*, 2010; ZERO *et al.*, 2005).

Os fatores de origens intrínsecos estão relacionados com a ação dos ácidos gástricos e doenças sistêmicas relacionados à disfunção gástrica (a acidez do suco gástrico possui pH baixíssimo, em torno de 1 a 1,5) como, por exemplo, refluxo gastroesofageal; regurgitação; vômitos decorrentes por alcoolismo; anorexia nervosa e síndrome da bulimia. (BARRON *et al.*, 2003).

Eccles (1979) propôs um índice para medir a erosão dental de acordo com a sua severidade, e foi dividida em três classes:

- Classe I: são as lesões superficiais envolvendo somente o esmalte;
- Classe II: são as lesões localizadas envolvendo menos de 1/3 da dentina;
- Classe III: são as lesões generalizadas envolvendo mais de 1/3 da dentina;

Por outro lado, Lussi (1996) desenvolveu outra nomenclatura para indicar o índice da severidade da lesão, freqüentemente utilizado em estudos de grupos de pesquisa (tabela 1).

Tabela 1: Índice que indica a severidade da lesão segundo Lussi (1996).

SCORE	SUPEFICIE	CRITÉRIO
0	Vestibular	Nenhum sinal de erosão
1	Vestibular	Somente em Esmalte
2	Vestibular	Menos da metade da dentina
3	Vestibular	Mais da metade da dentina
0	Oclusal/Lingual	Nenhum sinal de erosão
1	Oclusal/Lingual	Somente em esmalte
2	Oclusal/Lingual	Erosão severa. Esmalte e dentina

1.2. Tecnologias para diagnóstico de lesão dentária baseados em luz

Neste item, serão discutidas, de forma resumida, algumas técnicas de diagnóstico com o propósito de apresentar o processo de interação da luz coerente com o tecido dentário.

O princípio no qual toda e qualquer detecção óptica se baseia é: alterações ultraestruturais modificam o comportamento da interação da luz com esse tecido. Nos tecidos com erosão, ocorre perda de mineral alterando a rugosidade, porosidade e dureza dos mesmos

e, conseqüentemente, as propriedades ópticas desse tecido. Portanto, a compreensão adequada das propriedades ópticas que ocorrem na superfície do tecido dental pode levar ao desenvolvimento de novas técnicas objetivando o modo de realizar o diagnóstico precoce de LCNC.

Atualmente, há poucas pesquisas relacionadas ao desenvolvimento de tecnologias baseadas em mudanças nas propriedades ópticas do tecido dental saudável e doente para diagnóstico LCNC porém, diferentemente de algumas técnicas não invasivas para detecção de lesões de cáries que já são bem desenvolvidas, este campo de pesquisa vem ganhando notoriedade e se consolidando nos últimos anos (KARLSSON, 2010).

Karlson (2010) realizou uma revisão de literatura enumerando os principais métodos de diagnóstico óptico na cavidade oral. Dentre os estudos feitos para cáries, pode-se citar: a fluorescência induzida por laser; a fluorescência quantitativa induzida de luz e a transiluminação por infravermelho próximo. Dentre os estudos voltados para erosão dental, foi encontrada a tomografia por coerência óptica.

Na técnica fluorescência induzida por laser (Laser-induced Fluorescence ou LF) um laser com comprimento de onda entre 488 nm e 650 nm é incidido sobre a lesão, que tem sua fluorescência medida e convertida em uma escala numérica de a 0 a 99. Quanto maior é o número obtido, mais profunda é a lesão. Ademais está disponível comercialmente um aparelho chamado DIAGNOdent, que usa a diferença de fluorescência para a detecção de cárie (RODRIGUES, 2005; SOARES *et al.*, 2012).

A técnica de fluorescência quantitativa induzida por luz (Quantitative Light-Induced Fluorescence ou QLF) utiliza uma radiação com comprimento de onda entre 290 nm a 450 nm. Ao incidir luz sobre a superfície dentária, a autofluorescência diminui com a desmineralização pois, há um aumento no espalhamento da radiação incidente e da fluorescência emitida. A imagem é capturada e reconstruída, mostrando em um dispositivo digital e a diferença entre a média da alteração da fluorescência na área lesionada e sã é utilizada na detecção da lesão. É uma técnica comercialmente disponível, mas restrita à superfície do esmalte do dente (KARLSSON, 2010; PRETTY, 2006).

A técnica transiluminação por infravermelho próximo (Transillumination with Near-Infrared light ou TI-NIR) utiliza uma fonte de luz com comprimento de onda entre

780 nm e 1550 nm. Em um dente sadio, a luz penetra com maior profundidade nos tecidos por se espalhar menos, porém na região desmineralizada, o coeficiente de espalhamento aumenta, fazendo que a imagem dessa região apareça como uma área escura (CHUNG *et al.*, 2011).

A técnica de tomografia por coerência óptica (Optical Coherence Tomography ou OCT) é baseada no espalhamento elástico de fótons pelo tecido e utiliza uma fonte de luz com comprimento de onda entre 840 nm e 1310 nm (HALL *et al.*, 2004). Esta técnica é uma poderosa ferramenta para diagnosticar e inferir quantitativa e qualitativamente as alterações das propriedades ópticas do tecido provocados pelo efeito de ácidos. No tecido com lesão, o coeficiente de espalhamento da luz medido pelo OCT é maior em relação ao tecido sadio, o que resulta em uma profundidade de penetração menor no tecido lesionado (FREITAS, 2007; MORAES, 2012; WILDER-SMITH *et al.*, 2009). Na odontologia, esta técnica foi verificada in vivo, mostrando ser uma prática clínica adequada, no entanto, ainda existe a necessidade do desenvolvimento de um equipamento mais adequado para acessar os dentes posteriores. (MOTA *et al.*, 2010)

1.3. Speckle

Neste item serão apresentadas, de maneira resumida, as principais características da fonte de luz laser e como o fenômeno óptico, denominado *speckle*, é formado.

A amplificação de luz por emissão estimulada de radiação (Light Amplified by Stimulated Emission Radiation - LASER) é uma fonte de luz dita coerente. Pode-se dizer que é um dispositivo que usa a emissão estimulada para produzir um feixe intenso de fótons coerentes.

A luz do laser é monocromática, isto é, emite uma onda eletromagnética de um único comprimento de onda enquanto que, uma fonte de luz extensa (por exemplo: incandescente), é formada por vários comprimentos de ondas. Dentre suas características, a luz do laser é colimada, ou seja, os feixes de luz são emitidos em uma única direção e são paralelos entre si. Em oposição com a luz extensa que não apresenta direcionalidade.

Outra característica importante de uma fonte de luz laser é a sua fase, isto é, possui uma frente de onda bem definida, ou seja, os picos e vales de cada uma das ondas que compõe o feixe laser estão na mesma posição temporal e espacial.

O espectro eletromagnético (figura 3) mostra a estreita faixa do espectro visível que compreende o comprimento de onda entre 380 nm a 780 nm (TIPLER *et al.*, 2012).

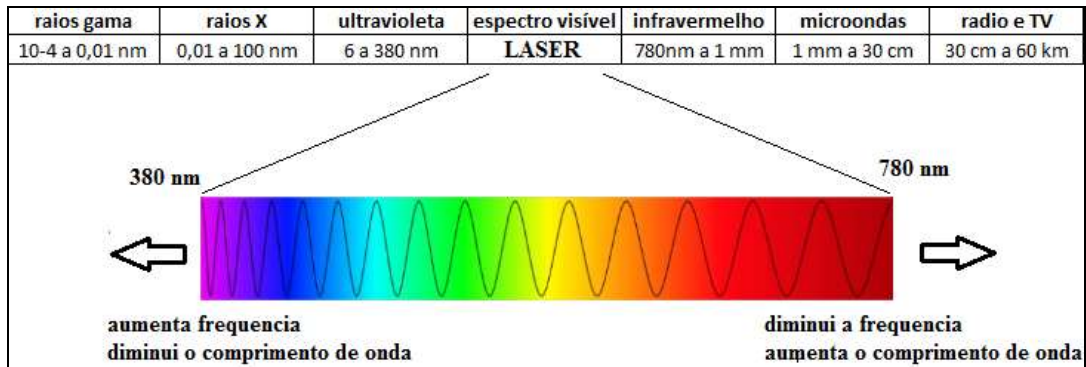


Figura 3: Espectro Eletromagnético. O laser atua nas faixas com comprimento de onda entre 380 nm a 780 nm.

Na incidência de luz sobre um tecido biológico, podem ocorrer quatro fenômenos físicos: absorção, reflexão, espalhamento e transmissão (figura 4). A intensidade com que cada um destes fenômenos ópticos ocorre depende da microestrutura de cada tecido, tais como a rugosidade, o componentes bioquímicos, assim como o comprimento de onda da luz a ser utilizada.



Figura 4: A incidência de luz coerente sobre uma superfície pode provocar quatro fenômenos físicos: absorção, reflexão, espalhamento e transmissão.

A absorção da luz é um processo onde a energia da radiação do feixe incidente é absorvida, total ou parcialmente, pelos átomos ou moléculas do meio de propagação, transformando-a em outras formas de energia, como por exemplo, em energia térmica. Na transmissão, a luz incidente atravessa a superfície sem desviar depois de se refratar. No processo de espalhamento, a energia que incide em uma direção é espalhada ou desviada para outras direções, havendo a produção de radiação difusa. Na reflexão da luz, os átomos da superfície incidente são absorvidos e torna a irradiá-la com a mesma frequência em direção ao meio de origem e, de acordo com a superfície, pode ser classificada em especular quando refletida em superfície lisa, ou difusa, quando refletida em superfície rugosa (figura 5) (SILVA, 2007).

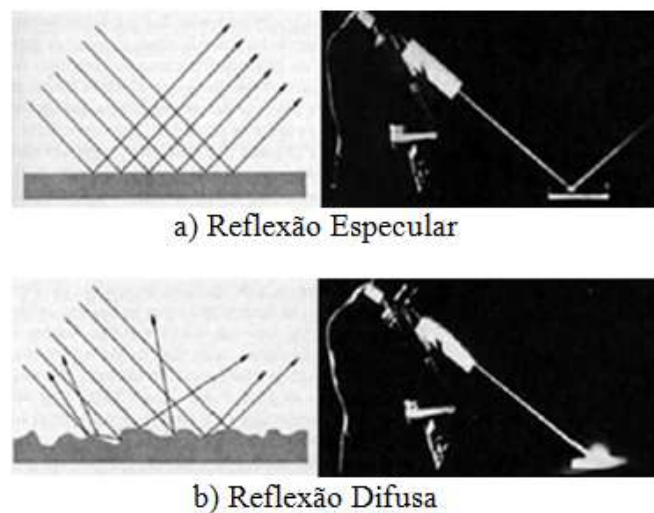


Figura 5: A reflexão de luz coerente em superfícies lisas ocorre é denominada de a) reflexão especular, enquanto que, a reflexão em superfícies rugosas é denominada de b) reflexão difusa. Fonte: (SILVA, 2007)

Dessa forma, quando um feixe de luz coerente incide sobre uma superfície que apresenta certa rugosidade, é possível observar, sobre esta superfície, a formação de granulados ópticos causados pela interferência entre os vários feixes espalhados. Este fenômeno físico ocorre porque uma superfície rugosa apresenta centros espalhadores distribuídos aleatoriamente, e quando uma luz coerente incide sobre essa superfície, esses feixes são espalhados com fases iniciais variando, também, de forma aleatória, gerando padrões de interferências com granulados claros e escuros (figura 6), resultado da intensidade da luz retroespalhada de acordo com a rugosidade da superfície (SILVA, 2007).

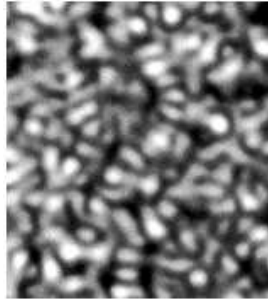


Figura 6: *Speckle*: interferência luminosa gerando granulados ópticos claros e escuros.

A interferência ocorre de acordo com a diferença de fases dos feixes de luz retroespalhadas. Observe o esquema de dois feixes de luz como mostra a figura 7, ao analisar dois feixes de luz, é dito que as ondas podem estar em fase, ligeiramente defasadas ou completamente defasadas. Pelo princípio da superposição, quando as ondas estão em fases ocorre o padrão de interferência construtiva, gerando os grânulos claros e quando as ondas estão completamente defasadas, ocorre o padrão de interferência destrutiva, gerando os grânulos escuros (TIPLER *et al.*, 2012). Este granulado óptico é a principal característica da técnica conhecida como *speckle*, palavra esta que não possui uma tradução adequada para o português. Apesar de possuir um caráter aleatório, pode-se extrair informações desse granulado no contexto da Teoria Estatística (GOODMAN, 1984; BERGKVIST, 1997).

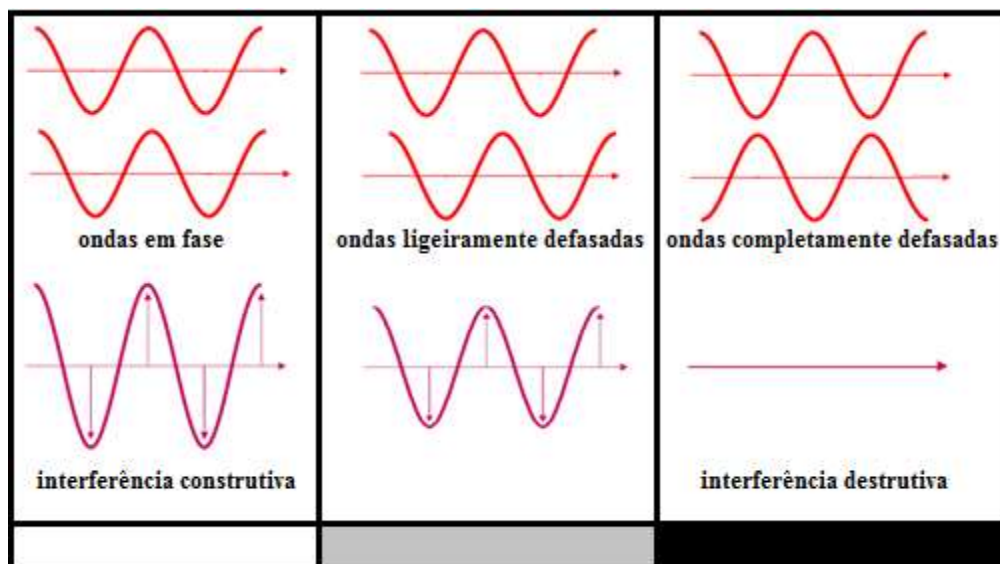


Figura 7: Na incidência de luz, ao refletir ou espalhar, quando um feixe encontra outro, com mesma intensidade e direção, as ondas dos feixes estão em fase, ao somar, ocorre a interferência construtiva (efeito claro), por outro lado, quando um feixe encontra outro, com mesma intensidade e direção oposta, as ondas dos feixes estão completamente defasadas, ao somar, eles se anulam gerando a interferência destrutiva (efeito escuro)

O *speckle* pode ser classificado como dinâmico e estático. O *speckle* dinâmico é utilizado amplamente para análise de tecidos biológicos moles. A superfície de um tecido biológico, quando vascularizado, apresenta mudanças ao longo do tempo. Por esse motivo, a investigação do granulado óptico obtido neste tecido se apresenta no domínio temporal. Neste domínio esta técnica tem sido utilizada para analisar vascularização de feridas, viabilidade de sementes, saúde geral de plantas ou qualquer situação onde seja necessário analisar micromovimentações locais (SILVA, 2007). Devido às suas várias aplicações, técnicas que utilizam *speckle* dinâmico no domínio temporal estão em um estágio muito mais avançado de desenvolvimento do que o *speckle* estático, este no domínio espacial. Como o esmalte dental é um tecido duro que não apresenta uma rede vascularizada, o *speckle* se apresenta de forma estática, pode-se dessa forma, classificar o padrão de espalhamento óptico no domínio espacial (NANCI, 2008).

1.4. Objetivo

1.4.1. Objetivo Geral

O objetivo desta pesquisa é desenvolver uma metodologia que identifique e quantifique a perda mineral do esmalte dental provocado pela erosão dental através da análise do padrão de espalhamento óptico de luz coerente irradiadas sobre essa superfície.

1.4.2. Objetivo Específico

a) Determinar uma associação entre o padrão de espalhamento de luz coerente na superfície dental o acometimento por uma lesão de erosão;

b) Determinar uma associação entre o padrão de espalhamento de luz coerente a progressão da lesão de erosão;

c) Determinar uma correlação entre o padrão de espalhamento de luz coerente na superfície dental e sua microdureza Knoop.

1.5. Hipótese

A incidência de luz coerente sobre uma determinada superfície rugosa gera um fenômeno óptico conhecido como *speckle*, caracterizado por diversos pontos claros e escuros e que podem ser analisados nos termos da Teoria Estatística.

Como a perda mineral do dente altera a sua estrutura intrínseca provocando diferentes rugosidades em sua superfície, tem-se a hipótese de que: ao iluminar superfície dental com uma fonte de luz coerente, o espalhamento da luz oriundo da superfície sadia e da acometida por lesão apresentará diferentes padrões, permitindo, portanto, qualificar a lesão e quantificar sua progressão.

1.6. Justificativa e Motivação

Atualmente, a lesão de erosão dental é diagnosticada pelos cirurgiões-dentistas de forma visual, apresentando dificuldades da sua identificação em seu estágio precoce. Uma grande maioria dos pacientes, ao chegar nos consultórios odontológicos, apresentam a lesão de erosão dental em um estágio já bastante desenvolvido e que, muitas vezes, necessite de procedimentos invasivos.

Verificou-se que a desmineralização da estrutura dentária altera a rugosidade de sua superfície, então, o estudo do *speckle* sobre uma lesão se caracteriza como uma potencial ferramenta para o diagnóstico odontológico, possibilitando, dessa forma, identificar a lesão de erosão dental em seu estágio inicial. Se o método proposto for quantificável, é possível desenvolver um protocolo de verificação das lesões em seus diversos estágios de maneira objetiva, não invasiva, não destrutiva, de baixo custo e em tempo real.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Para a prevenção e controle da erosão dental, as amostras usualmente são analisadas *in vitro* e *in situ* com o uso de microscopia eletrônica de varredura, teste de microdureza, fluorescência, entre outros. Este estudo, também utilizando amostras *in vitro*, propõe verificar os estágios iniciais de erosão dental analisando o fenômeno físico gerado pela incidência de luz coerente sobre sua superfície.

2.1. Amostras de Dentes

Para o desenvolvimento deste estudo, foram utilizadas 32 amostras, de incisivos bovinos. Através de inspeção visual e avaliação em lupa estereoscópica aumentado em 50 vezes, as amostras apresentavam sua superfície sem manchas ou trincas. Os dentes foram limpos com instrumentos periodontais e a realização de profilaxia com pedra-pomes e água. Após a limpeza, foram armazenados em um recipiente contendo gases umedecidas com timol e em temperatura ambiente, até a realização do experimento (BREVIK *et al.*, 2013; SCHLUETER *et al.*, 2011; SHELLIS *et al.*, 2011).

Para cada amostra, foi obtido um fragmento da superfície vestibular, com aproximadamente 6x6 mm² e incluídos em tubo de PVC com resina acrílica, deixando exposto o esmalte dental de maneira plana e paralela (figura 8). Cada amostra foi polida durante 60 segundos, utilizando-se lixas d'água com diferentes granulometrias de 400, 600, 1000 e 1200.



Figura 8: Cada tubo de PVC contém duas amostras, e cada amostra possui duas regiões: metade sadia (protegido antes de ser submetido ao ataque ácido) e a outra metade lesionada (submetido ao ataque erosivo).

Note que em cada porta-amostra há dois fragmentos, separados em duas regiões diferentes: a região com erosão foi submetida a processos de corrosão químicos, enquanto que a região sadia foi preservada. Antes de submeter as amostras numa solução química, a região sadia, denominada grupo controle, foi protegida por meio de duas camadas de esmalte de unha.

2.2. Desafio Erosivo

Para a realização do desafio erosivo, as amostras foram divididas em 4 grupos. Em seguida, foram imersas em 30 ml de coca-cola fresco com pH aproximadamente 2,5, em temperatura ambiente à 25 °C sem agitação (SANTOS *et al.*, 2011; SOBRAL *et al.*, 2000; YOUNG *et al.*, 2011). A imersão se repetiu durante 7 dias consecutivos e duas vezes ao dia, seguindo a condição experimental:

- As amostras (n=8) do grupo 1 permaneceram imersas durante 10 minutos;
- As amostras (n=8) do grupo 2 permaneceram imersas durante 20 minutos;
- As amostras (n=8) do grupo 3 permaneceram imersas durante 30 minutos;
- As amostras (n=8) do grupo 4 permaneceram imersas durante 40 minutos.

Após cada desafio, as amostras foram lavadas durante 20 segundos em água deionizada e secas em temperatura ambiente, para então serem armazenadas em um recipiente com gases umedecidas com timol até a realização do desafio seguinte. A figura 9 exhibe a disposição da região lesionada, localizado à esquerda e a região sadia, à direita.



Figura 9: Nas amostras, a região lesionada está disposta à esquerda (submetido ao ataque ácido), e a região saudável está disposta à direita (protegido durante o ataque ácido).

Ao término do desafio, as superfícies das amostras foram submetidas à avaliação por imagem *speckle*.

2.3. Avaliação por imagem *speckle*

A principal técnica de obtenção dos granulados ópticos baseia-se em iluminar a superfície de interesse com uma fonte de luz coerente e capturar essa imagem através de uma câmera CCD. Em sistema de computação, uma imagem digital pode ser transformada em uma matriz numérica, de acordo com a intensidade encontrada em cada pixel, onde os dados coletados podem ser tratados e processados de forma quantitativa.

Cada amostra foi iluminada com um laser He-Ne com comprimento de onda de 633 nm (vermelho) com potência de 40 mW. O laser ficou disposto a uma distância de aproximadamente 76 cm da amostra e no caminho óptico foi posicionada uma lente para expandir seu feixe de modo a iluminar uma área suficiente para obter uma quantidade de valores formados pela intensidade de luminosa do granulado óptico de cada região. A imagem iluminada foi capturada por uma câmera CCD colorida com captação das imagens em RGB (Cânon 500D) com uma distância de aproximadamente 30 cm em relação a amostra e com um ângulo menor que 10° em relação ao laser. A câmera foi configurada com velocidade do obturador 1/100, abertura da lente em F29 e sensibilidade fotográfica ISO100 (figura 10).

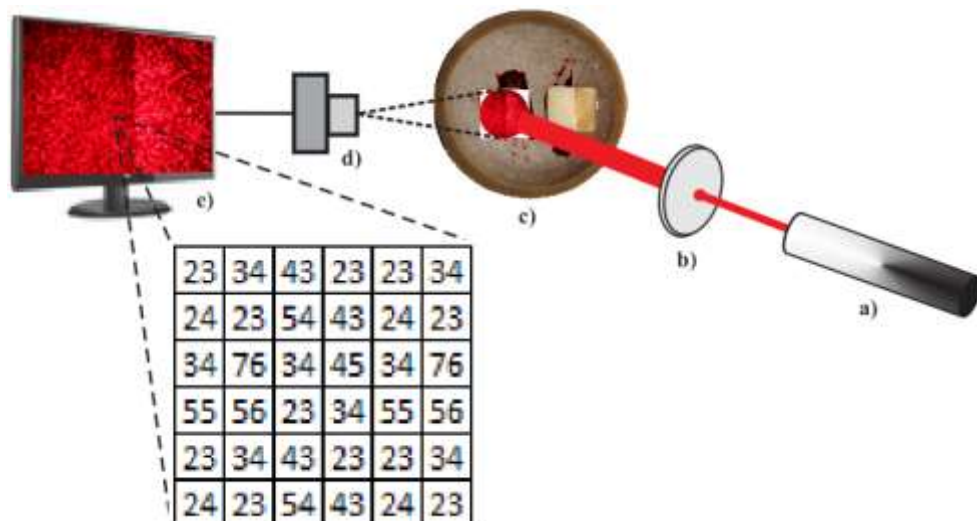


Figura 10: Esquema de Captura de Imagem: a) Laser HeNe 633 nm, b) Lente para aumentar a incidência da região lesionada, c) Amostra, d) Captura de Imagem com uma câmera CCD, e) Transformação da intensidade luminosa da imagem em pixel.

As imagens digitais foram transferidas para um computador e tratadas numericamente por meio de um software desenvolvido pelo grupo.

Uma imagem digital pode ser definida como uma matriz bidimensional, expressa pela função $f(x,y)$, onde x e y são coordenadas espaciais que fornecem a intensidade ou nível de cinza de cada ponto da imagem que é o menor elemento de uma imagem digital, denominado pixel (GONZALEZ *et al.*, 2008; PEDRINI *et al.*, 2008). Por convenção, a origem da imagem está localizada no canto superior esquerdo da imagem.

Segundo Woods e Gonzales (2008), a matriz numérica é utilizada para processamentos e desenvolvimento de algoritmos. Na forma de equação, a representação de uma matriz numérica $M \times N$ é dado pela função (1):

$$f(x, y) = \begin{bmatrix} f(0,0) & f(0,1) & \cdots & f(0, N-1) \\ f(1,0) & f(1,1) & \cdots & f(1, N-1) \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots \\ f(M-1,0) & f(M-1,1) & \cdots & f(M-1, N-1) \end{bmatrix} \quad (1)$$

Cada imagem capturada pelo sistema de aquisição de imagens é armazenada no padrão RGB. As imagens representadas no modelo RGB consistem de três componentes de imagens, uma para cada cor primária: [(R,G,B)]. As cores de um *pixel* podem ser representadas como um inteiro de 8 bits variando entre 0 e 255, sendo o valor 0 correspondente à cor preta e 255, à cor branca.

Para fins de análise, foi extraído do modelo RGB o primeiro valor inteiro da cor primária, ou seja, vermelho. Dessa forma, foi feita a associação da imagem *speckle* com a intensidade de brilho da imagem digital e transformada em uma matriz numérica.

Há três formas básicas de representar uma imagem (figura 11):

- (A) Plano - 2D: é uma representação gráfica que fornece os valores da localização espacial do eixo x e y .
- (B) Espacial - 3D: é uma representação gráfica que fornece os valores da localização espacial e o terceiro eixo, representando a intensidade do pixel.

- (C) Matriz: é uma representação numérica de tamanho MxN.

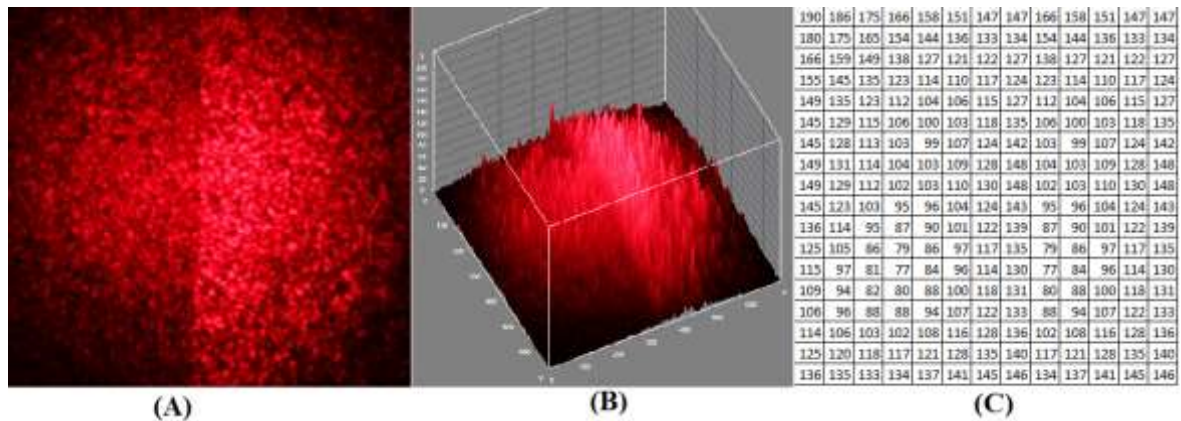


Figura 11: Representação de uma imagem digital: a) Plano cartesiano x e y (esquerda: lesão; direita: sadio), b) Plano espacial e c) Matriz numérica.

2.4. Análise *speckle*

Devido à utilização de uma solução desmineralizadora com corante (Coca-Cola), em todas as amostras, a região lesionada reteve este corante, porém sem detrimento aos resultados apresentados neste trabalho. Na figura 12a pode ser observado um contraste quase imperceptível entre as regiões e na figura 12b, representado pelo fenômeno *speckle*, pode ser observado um aprimoramento neste contraste, em que a região sadia apresenta uma intensidade luminosa maior.

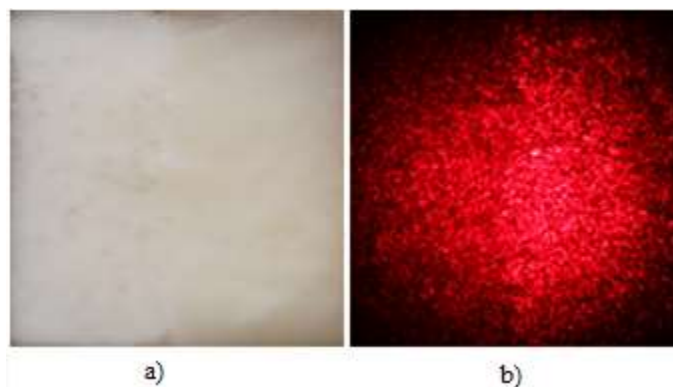


Figura 12: a) Na amostra representada pela de luz branca, o contraste é quase imperceptível entre a região sadia e lesionada e b) na amostra representada pela luz coerente, houve um aprimoramento no contraste, a região sadia apresenta uma intensidade luminosa maior em relação à região lesionada.

Devido ao seu caráter estocástico, o *speckle* pode ser descrito estatisticamente e para simplificar a análise, Goodman (1984) desenvolve um modelo na estatística de primeira ordem, que descreve os granulados ópticos por meio da média, variância e desvio padrão das intensidades de brilho da imagem capturada (GOODMAN, 1984). Segundo a sua teoria, a amplitude dos campos espalhadores é distribuída de forma aleatória e a intensidade segue uma distribuição exponencial negativa, conforme a equação (2):

$$P(I) = e^{-\frac{I}{\langle I \rangle}} \quad (2)$$

Onde I é a intensidade e $\langle I \rangle$ a intensidade média.

As imagens obtidas foram dimensionadas para uma matriz de 700x700 pixels contendo a região sadia na metade direita da imagem e a região lesionada na metade esquerda, como pode ser observado na figura 13. A primeira imagem foi realizada sob iluminação oriunda de uma fonte de luz branca (figura 13a) em seguida a amostra foi iluminada com uma fonte de luz coerente (figura 13b). Cada imagem foi processada por um algoritmo desenvolvido neste projeto de modo a quantificar o granulado óptico das regiões sadia e doentes, gerando uma imagem com falsas cores (figura 13c).

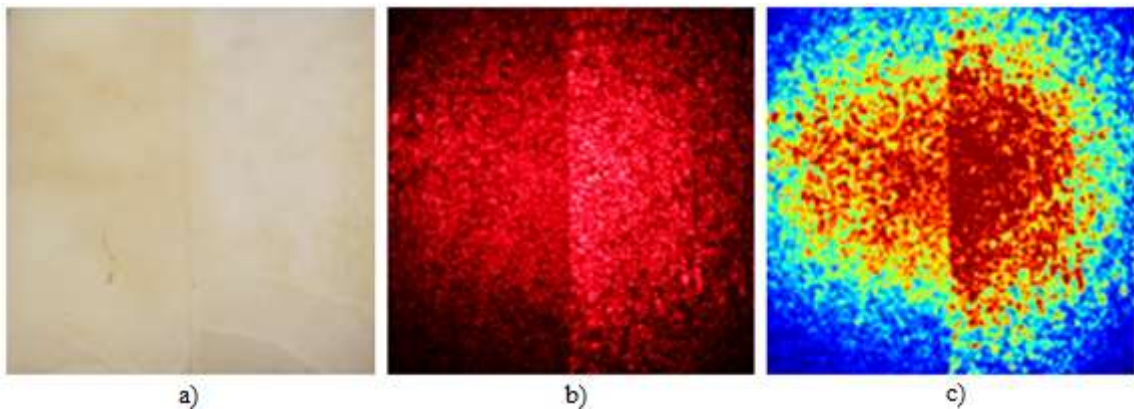


Figura 13: a) Amostra oriunda de iluminação de luz branca, b) amostra oriunda de iluminação de luz coerente e c) imagem gerada através de falsas cores a partir da luz coerente.

Para quantificar e qualificar cada amostra obteve-se o cálculo da intensidade luminosa média de cada região pela equação (3) e seu respectivo desvio padrão pela equação (4), conforme pode ser observado na figura 14.

$$\langle I \rangle = \frac{\sum_{i=1}^n I}{n} \quad (3)$$

O desvio padrão da intensidade do espalhamento óptico é obtido pela equação (4):

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (I_i - \langle I \rangle)^2}{n-1}} \quad (4)$$

Onde n é o tamanho amostral, ou seja, $n = M \times N$ de uma matriz. Segundo Deana (2013), utilizando uma matriz de ordem 4 ($n = 4 \times 4$ pixels) é possível obter um bom compromisso entre precisão estatística e a definição espacial de imagens de *speckle* de dentes.

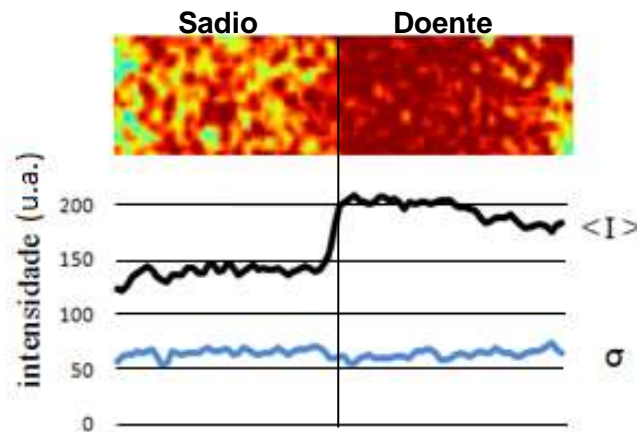


Figura 14: Cálculo da intensidade média ($\langle I \rangle$) e do seu respectivo desvio padrão (σ).

Na figura 14 observa-se que a intensidade média apresentada na região sadia é maior do que os valores da intensidade média apresentada na região lesionada e o desvio padrão da região sadia é menor do que na região lesionada. Para amplificar a diferença, outra grandeza muito utilizada na análise de contraste de *speckle* dinâmico, denominada Contraste (C), e no qual é dada pela equação (5):

$$C = \frac{\sigma}{\langle I \rangle} \quad (5)$$

Este método é conhecido como análise do contraste do *speckle* (LASCA). O método LASCA consiste em dividir os pixels do registro fotográfico em células quadradas e calcular o contraste em seu interior gerando uma segunda imagem formada apenas pelo contraste. Por exemplo, uma imagem de 700x700 pixels, ao calcular seu contraste por uma matriz de ordem 4 em seu interior, teremos uma nova imagem de contraste na ordem de 175x175 pixels (Figura 15) (BRIERS *et al*, 1996; RABAL *et al*, 2008;).

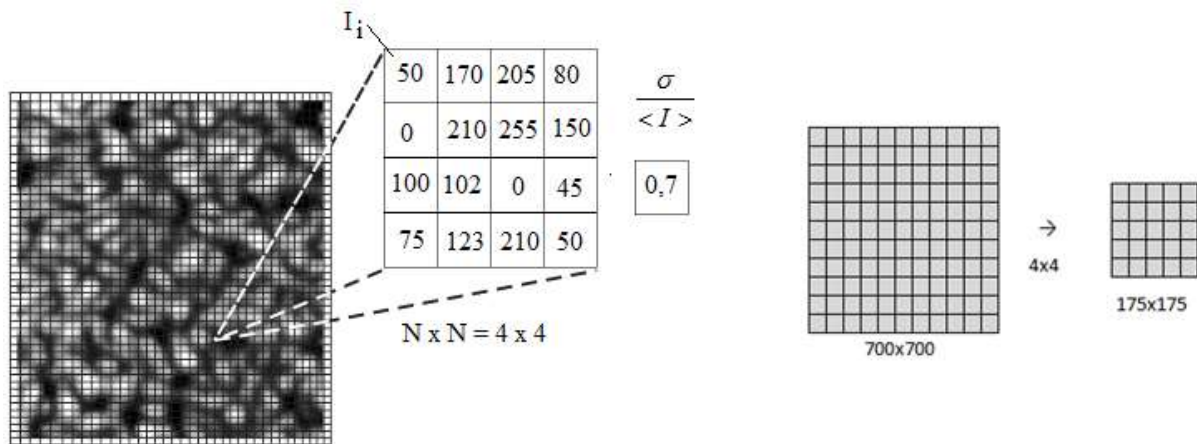


Figura 15: Diagrama Esquemático da construção de um mapa tipo LASCA. Uma matriz de ordem 700 se transforma em uma matriz de ordem 175 ao aplicar uma matriz quadrada de ordem 4.

Para obter uma média mais homogênea de cada região da imagem *speckle* original 700x700 pixels, foi extraída uma imagem na ordem de 300x200 pixels da região doente e outra da região sadia, conforme mostra a figura 16.

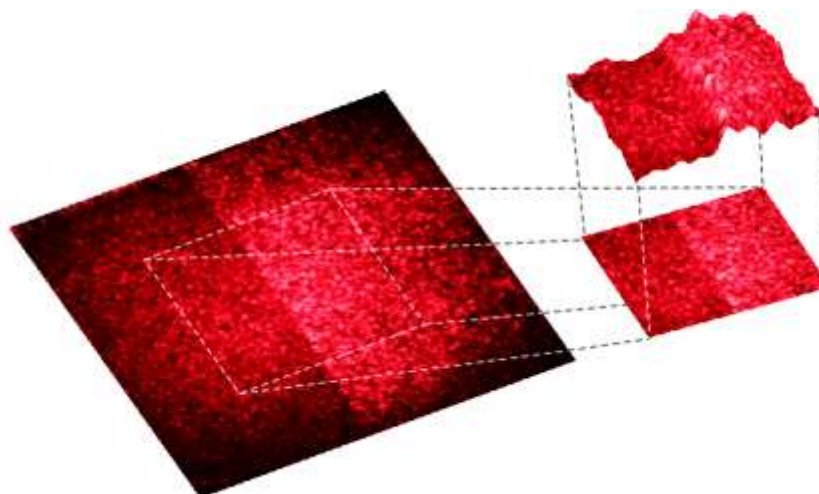


Figura 16: Recorte da amostra em uma matriz da região sadia e da região lesionada, para o cálculo do mapa LASCA de cada uma delas.

Para obter uma maior a diferença entre as regiões, foi calculado o Contraste de cada região usando a equação (5), gerando dessa forma, o mapa LASCA, conforme mostra a figura 17.

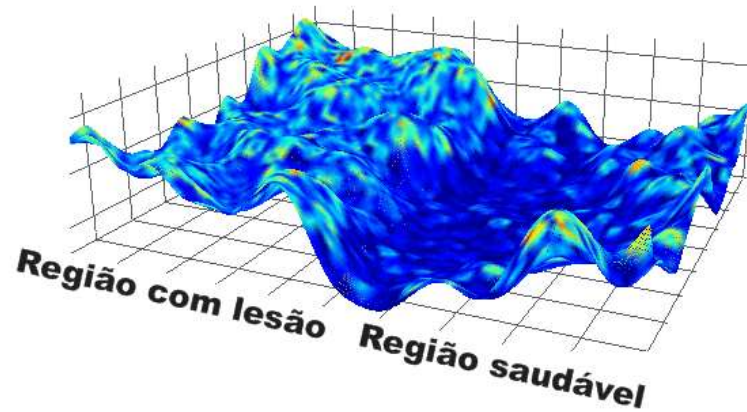


Figura 17: Imagem do mapa LASCA na ordem de 4x4 obtida de cada região.

Tem-se, então, que o valor de contraste na região lesionada é maior do que o valor de contraste na região sadia: [Região com Lesão] > [Região Saudável].

2.5. Avaliação por teste de dureza Knoop.

Foram realizados os testes de Dureza Knoop em todas as amostras. Esse teste é realizado com um instrumento que provoca pequenas endentações estáticas sobre a superfície, aplicando força com cargas menores que 1 kgf (figura 18).



Figura 18: Aparelho para medir a dureza Knoop. Fonte: USP, São Paulo

O indentador Knoop é formado por um diamante que produz endentações em forma de pirâmide, com uma relação entre diagonais de 7:1 (figura 19).

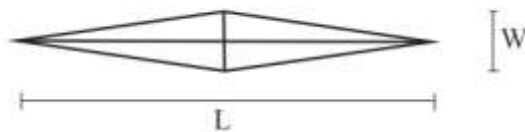


Figura 19: O comprimento da diagonal maior L da endentação do Knoop.

Para determinar o número de dureza Knoop (KHN) é utilizada a diagonal maior da endentação na equação (6):

$$KHN = \frac{F}{A} = \frac{F}{CL^2} \quad (6)$$

Onde:

- F, é a carga aplicada em kgf;

- A, é a projeção da área não recuperada da endentação em mm²;

- L, é o comprimento medido da diagonal maior da endentação em mm;

- $C = 0,07028$, é a constante do endentador, relacionando a área projetada da endentação ao quadrado do comprimento da diagonal maior.

O teste de dureza Knoop das amostras foram realizados no laboratório experimental da USP São Paulo. No centro de cada região da amostra, lesionada e sadia, foram feitas 10 medidas com uma distância de 150 μm entre elas. Utilizou uma carga de 50 g durante 10 s. Para fazer a comparação com o mapa LASCA, obteve-se a média das medidas de cada região para obter a diferença relativa entre as regiões (figura 20).

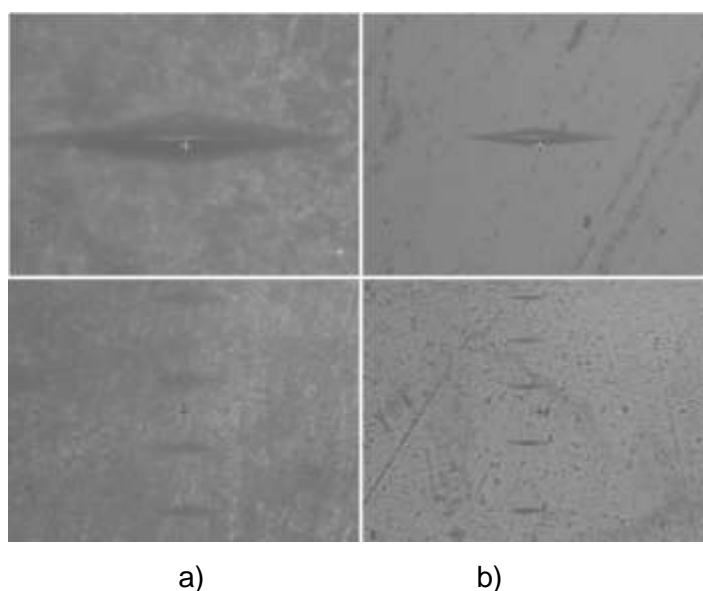


Figura 20: a) Nas amostras à direita, identificada como região sadia, pode ser observado que a diagonal formada pelo diamante é menor (região mais dura), enquanto que, b) à esquerda, identificada como região lesionada, poder ser observado que a diagonal formada pelo diamante é maior (região menos dura)

A área formada pelo diamante na região saudável é menor do que a área formada na região erodida, de acordo com a equação (6). A região saudável terá um valor Knoop maior do que da região lesionada: [Região Saudável] > [Região com Lesão].

Os resultados de cada amostra, obtidos por dureza Knoop, podem ser observados no próximo capítulo desta pesquisa.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1. Trabalho apresentado no XXIV Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica



XXIV Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica

XXIV Brazilian Congress on Biomedical Engineering

A Engenharia Biomédica como Propulsor de Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Saúde

13 a 17 de outubro de 2014 — Center Convention, Uberlândia, MG, Brasil



DETECÇÃO DE EROSÃO DENTAL UTILIZANDO ANÁLISE DO ESPALHAMENTO DE LUZ COERENTE – *SPECKLE*

Koshiji, N.H., Bussadori, S.K., Bortoletto, C.C., Mendes A.S., Martins J.S., Prates, R. A., Oliveira M.T. e Deana, A.M.

UNINOVE, São Paulo, Brasil

e-mail: amdeana@uninove.br

Resumo: A erosão dental é uma lesão cervical não cariiosa que provoca o desgaste progressivo da estrutura dentária através de processos químicos que não envolvem ação bacteriana. Sua origem está relacionada a hábitos alimentares ou doenças sistêmicas, que envolve o contato do dente com substâncias que apresentam pH muito baixo. Este trabalho tem por objetivo demonstrar uma nova metodologia que quantifique essa lesão através de padrões de espalhamento de luz coerente sobre a superfície dentária utilizando a Teoria Estatística.

Através dessa metodologia, pode-se observar que a medida que o tempo de ataque de uma substância sobre um tecido dental aumenta a diferença relativa do mapa de contraste (LASCA) da região sadia com a região lesionada também evolui. Os grupos submetidos a 10 min, 20 min, 30 min e 40 min de ataque apresentaram, respectivamente, os seguintes aumentos percentuais de contraste: 19,5 (68%), 33,9 (65%), 41,6 (51%) e 39,6 (45%). A pequena queda no contraste relativo do grupo de 30 min para 40 min não é significativa ($p=0,6934$).

Palavras-chave: Erosão dental, laser, *speckle*.

Abstract: *Dental erosion is a non-carious cervical lesion that causes the progressive wear of the tooth structure by chemical processes not involving bacterial action. Its origin is related to eating habits or systemic diseases involving the tooth contact with substances that have very low pH. This work aims to demonstrate a novel methodology that quantifies the injury through scattering patterns of coherent light on the tooth surface using the Statistical Theory.*

This technique shows a correlation between the acid each duration and the laser speckle contrast map (LASCA). The experimental groups presented a relative contrast between the eroded and sound tissue of 19,5(68)%, 33,9 (65)%, 41,6(51)% e 39,6(45)% for 10 min, 20 min, 30 min and 40 min of acid eaching, respectively. The small decay from 30 min to 40 min is not statistically significant ($p = 0,6934$).

Keywords: Dental erosion, laser, speckle.

Introdução

O desgaste dental pode ser considerado como um processo natural causado pelo atrito da mastigação e escovação e pelo consumo de alimentos ácidos. Este processo passa a ser considerado patológico quando o grau de destruição do dente compromete a estética e a funcionalidade dos dentes e surge sensibilidade dentária, desde um leve desconforto até a impossibilidade de ingestão de determinadas substâncias [1].

Dentre diversas patologias que podem acometer o tecido, a erosão dental ganhou destaque e importância nos últimos anos, não só na população mais idosa, como também em crianças e adultos, devido ao ritmo da vida moderna, que tem influencia na substituição de alimentos frescos por alimento industrializados contendo acidulantes e conservantes. Há uma estreita relação do aumento da erosão dental com a ingestão de alimentos e bebidas consideradas ácidas [2,3,4] e, além do mais, é possível observar também, uma relação da erosão com algumas doenças sistêmicas, como por exemplo, refluxo, bulimia, vômitos decorrentes por alcoolismo [2,5-7], pois o suco gástrico é uma substancia ácida que possui pH baixo.

A desmineralização da estrutura dentária é usualmente causada por substância ácida com pH inferior ao crítico para o esmalte (4,5) e dentina (5,5) que pode dissolver os cristais de hidroxiapatita [7,8]. Dentre os principais sintomas, tem como destaque a dor, a descoloração, a transparência, a formação de rachaduras e a formação de pequenas indentações, o que faz com que a estrutura microscópica do tecido dental sofra alterações em sua superfície.

Alguns estudos na literatura [2-9] buscam prevenção das lesões de erosão. Como a perda do tecido dental é irreversível, o diagnóstico precoce minimiza os danos e assume importante papel nas decisões do cirurgião-dentista.

Speckle - Segundo Goodman (1984), *speckle* é um fenômeno que pode ser descrito estatisticamente. Os métodos para a análise e interpretação das imagens baseiam-se em informações obtidas por meio de estatísticas de primeira e segunda ordem das intensidades de brilho da imagem capturada. Para simplificar a análise, Goodman desenvolve um modelo na estatística de primeira ordem, que descreve os granulados óticos, por meio da média, variância e desvio padrão das intensidades [10].

A equação (1) representa a equação da intensidade média $\langle I \rangle$:

$$\langle I \rangle = \frac{\sum_{i=1}^n I}{n} \quad (1)$$

Onde I é a intensidade e $\langle I \rangle$ a intensidade média.

O desvio padrão da intensidade do espalhamento óptico é obtido pela equação (2):

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (I_i - \langle I \rangle)^2}{n-1}} \quad (2)$$

Onde n é o tamanho amostral, ou seja, $n = M \times N$ pixel de uma imagem.

Para ampliar a diferença entre as regiões sadias e lesionadas, foi utilizada uma técnica bastante comum em *speckle* dinâmico, o método LASCA [11,12]. Este método consiste em calcular o contraste da imagem, dado pela seguinte equação (3):

$$C = \frac{\sigma}{\langle I \rangle} \quad (3)$$

Neste trabalho foi utilizada a análise estatística de imagens que contém informações de padrões de espalhamento óptico sobre uma superfície do tecido dental, iluminada por luz coerente, denominado *speckle*. O *speckle* é formado por um conjunto de granulados ópticos claros e escuros oriundos da reflexão difusa e retroespalhamento de luz coerente sobre uma determinada superfície [12,13]. O estudo do padrão dos granulados ópticos em tecidos biológicos apresenta um potencial para o diagnóstico médico, pois o padrão *speckle* apresenta mudança em seu comportamento dependendo da rugosidade da superfície iluminada. Sendo dessa forma, possível, encontrar uma associação entre padrão de espalhamento óptico e a desmineralização, acometido pela erosão dental.

Materiais e métodos

Amostras - Foram obtidos 32 fragmentos da superfície vestibular de incisivos bovinos e inseridos em pequenas porta-amostras. Em cada porta-amostras foram incluídos dois fragmentos de aproximadamente 6x6 mm em tudo de PVC com resina acrílica, deixando exposto o esmalte dental de maneira plana e paralela. Cada amostra foi polida durante 60 segundos, utilizando-se lixas d'água com diferentes granulometrias (400, 600, 1000 e 1200) e, em seguida, disco de feltro associado à pasta diamantada para polimento. Cada fragmento foi dividido em duas partes, sendo uma parte protegida por duas camadas de esmalte de unha, classificada como região sadia (grupo controle) e, a outra, exposta e submetida a processos de corrosão químico, classificada como região lesionada.

Para realizar o desafio erosivo, as amostras foram divididas em 4 grupos e imersas em 30 ml de refrigerante à base de cola (pH com aproximadamente 2,5), e em temperatura ambiente (aproximadamente 25° C). A imersão ocorreu duas vezes ao dia, durante 7 dias consecutivos, seguindo a condição experimental:

- Grupo 1 (n=8) = 10 minutos;
- Grupo 2 (n=8) = 20 minutos;
- Grupo 3 (n=8) = 30 minutos;
- Grupo 4 (n=8) = 40 minutos.

Após cada desafio, as amostras foram lavadas durante 20 segundos em água deionizada e secas em temperatura ambiente, para então serem armazenadas em umidade, até a realização do desafio seguinte [14-17].

Ao término do desafio, as superfícies das amostras foram submetidas à avaliação por imagem *speckle* [18]. Cada amostra foi iluminada com um laser He-Ne com comprimento de onda de 633 nm (vermelho). O laser ficou disposto a uma distância de aproximadamente 76 cm da amostra e no caminho óptico foi posicionada uma lente para expandir seu feixe de modo que sua área pudesse abranger uma maior área da amostra.

A imagem irradiada foi capturada por uma câmera CCD colorida com captação das imagens em RGB.

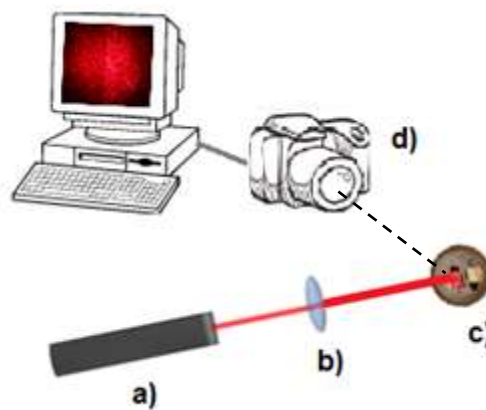


Figura 1: Diagrama esquemático do arranjo experimental: (a) Laser HeNe com comprimento de onda 633nm; (b) lente com foco $f = 40$ cm; (c) amostras; (d) câmera Canon T1.

Conforme mostra o esquema da figura 2, as imagens obtidas foram redimensionadas por em uma matriz de 700x700 pixels contendo a região lesionada, situada na metade esquerda da imagem, e a região sadia, na metade direita. De cada fragmento (figura 2a) obteve-se uma imagem oriunda de uma fonte de luz branca (figura 2b) e uma imagem iluminada com uma fonte de luz coerente (figura 2c).

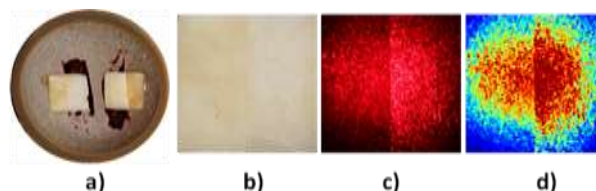


Figura 2: Procedimento para obtenção e análise das imagens *speckle*: (a) amostra; (b) imagem sob luz branca; (c) imagem sob luz coerente; (d) imagem com falsas cores.

A imagem composta de luz coerente foi processada por um algoritmo desenvolvido neste projeto de modo a quantificar o granulado óptico das regiões sadia e doente. Esta imagem composta de 700x700 pixels foi dividida em pequenas regiões de tamanho 4x4 pixels, de modo a obter a calcular sua intensidade média, gerando uma nova imagem de 175x175 pixels de falsas cores (figura 2d).

Resultados e Discussão

Em todas as 32 amostras, obteve-se a intensidade média do conjunto de pixel e seu desvio padrão, e de forma geral, percebeu-se que o valor da intensidade média da região lesionada é menor que na região sadia (figura 3). No cálculo do desvio padrão, nota-se também que o valor do desvio padrão da região lesionada é ligeiramente maior do que na região sadia.

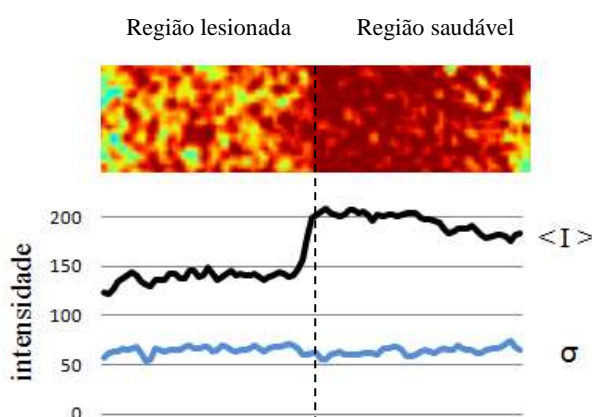


Figura 3: Média das intensidades e seu desvio padrão da região lesionada e região saudável.

Utilizando cálculo do contraste pelo método LASCA, verificou-se que o contraste da região sadia é menor que o contraste na região lesionada portanto, no mapa de LASCA da figura 4, pode-se observar as diferentes tonalidades apresentada entre as regiões.

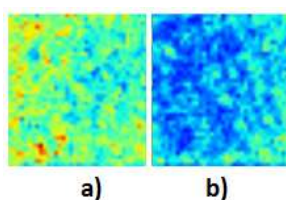


Figura 4: Mapa de LASCA típico: (a) região lesionada; (b) região saudável

O contraste relativo entre a região sadia e a lesionada foi determinado de acordo com (4):

$$1 - \frac{\langle R. Sadia \rangle}{\langle R. Lesão \rangle} \quad (4)$$

A Tabela 1 mostra a média do contraste relativo de cada grupo:

Tabela 1: Contraste relativo em cada grupo.

Ataque (min)	Contraste relativo RS/RL (EP)
10	0,195 (68) ^{a, b}
20	0,339 (65)
30	0,416 (51) ^a
40	0,396 (45) ^b

a: $p = 0,0184$

b: $p = 0,0263$

Da tabela 1, pode-se observar que a medida que o tempo de ataque evolui, ocorre um aumento na diferença relativa da região sadia com a lesionada.

O contraste relativo do grupo submetido a 10 min de ataque foi de 19,5(68%). Ao nível de significância $\alpha=0,05$, há diferença estatisticamente significativa entre este grupo e a região sadia ($p=0,0123$), demonstrando que a análise do mapa de LASCA do tecido dental é sensível suficiente para detectar mudanças sutis da microestrutura dental provocadas pelo processo erosivo.

Aumentando-se o tempo de ataque ácido, há uma evolução no contraste relativo para 33,9(65%), 41,6(51%) e 39,6(45%), respectivamente, para 20 min, 30 min e 40 min de ataque, demonstrando uma correlação entre o processo erosivo e o mapa de LASCA. A pequena queda no contraste relativo observado de 30 para 40 min não é significativa ($p=0,6934$).

Conclusão

Este estudo procurou demonstrar, pela primeira vez, que é possível quantificar a progressão da erosão do tecido dental, de forma não destrutiva e não invasiva, utilizando a análise de padrão *speckle*.

Com a aplicação da estatística de primeira ordem nas imagens oriundas do retroespalhamento da luz coerente aplicado sobre a superfície do esmalte dental, foi possível detectar a erosão com base em suas propriedades ópticas. Verificando, dessa forma, uma correlação existente entre o padrão de espalhamento óptico e a desmineralização ocorrida nessa superfície.

Referências

- [1] Zero DT, Lussi A. Behavioral Factors. In: Lussi A, Dental Erosion: From diagnosis to therapy. Monogr Oral Sci. Basel, Karger. 2006; 20(7):100-105.
- [2] Castelan A, Guedes APA, Santos PH. Erosão dental e suas implicações sobre a saúde bucal. RFO. 2010 jan-abr, 15 (1):83-86.
- [3] Sobral MAP, Luz MAAC, Gama-Teixeira A, Garonne-Neto N. Influência da dieta líquida ácida no desenvolvimento de erosão dental. Pesq. Odont. Bras. 2000 out-dez; 14(4):406-410.
- [4] Zero DT, Lussi A. Erosion-chemical and biological factors of importance to the dental practitioner. Int Dent J. 2005. 55(4):285-290.
- [5] Barbosa LPB, Prado JR RR, Mendes RF. Lesões cervicais não cariosas: etiologia e opções de tratamento restaurador. Rev Dent Online. 2009 jan-mar; 8(18):5-10.
- [6] Hoepfner MG, Massarollo S, Bremm LL. Considerações clínicas das lesões cervicais não cariosas. Publ UEPG Ci. Biol. Saúde. Ponta Grossa. 2007 set-dez;13(3/4):81-86
- [7] Barron RP, Carmichael RP, Marcon MA, Sandor GK. Dental erosion in gastroesophageal reflux disease. J Can Dent Assoc. 2003;69:84-9.
- [8] Grippo JO, Simring M, Schreiner S. Attrition, abrasion, corrosion and abfraction revisited: a new perspective on tooth surface lesions. J Am Dent Assoc. 2004;135:1109-18; quiz 63-5.
- [9] Moraes MCD. Análise in vitro da progressão de lesões de erosão em dentina após irradiação com laser de Nd:YAG e flúor através de Tomografia por Coerência Óptica (OCT). Dissertação. Mestrado Profissionalizante Laser em Odontologia, USP-IPEN 2012.
- [10] Goodman JW. Statistical Properties of Laser *Speckle* Patterns. In: Dainty, J.C. (ed). *Laser speckle and related phenomena*. Berlin: Springer-Verlag, 1984. P. 9-75.
- [11] Briers JD, Webster S. Laser *speckle* contrast analysis (LASCA): a non-scanning, full-field technique for monitoring capillary blood flow. J. Biom. Opt. v.1, n.2, Apr. 1996. P.174-179.
- [12] Silva RE. Estudo das propriedades do biospeckle e suas aplicações. Dissertação. Instituto de Física da Universidade de São Paulo. 2007.
- [13] Rabal HJ, Braga JR RA, Trivi M, Rabelo GF. Dynamic laser *Speckle* and applications. New York: CRC, 2008. v. 1, 282p.
- [14] Schluter N, Hara A, Shellis RP, Ganss C. Methods for the measurement and characterization of erosion in enamel and dentine. Caries Res. 2011; 45(Suppl 1):13-23
- [15] Shellis RP, Gans C, Ren Y, Zero DT, Lussi A. Methodology and models in erosion research: discussion and conclusions. Caries Res 2011; 45(1) 69-77
- [16] Brevik SC, Lussi A, Rakhmatullina. A new optical detection method to assess the erosion inhibition by in vitro salivary pellicle layer. Journal of Dentistry 2013; 41: 428-435;
- [17] Cheng ZJ, Wang XM, Cui FZ, Ge F, Yan JX. The enamel softening and loss during early erosion studied by AFM, SEM and nanoindentation. Biomed Mater. 2009; 4: 1-7
- [18] Deana AM, Jesus SHC, Koshiji NH, Busadori SK, Oliveira MT. Detection of early carious lesions using contrast enhancement with coherent light scattering (*speckle* imaging). Laser Physics, 23, p.075607, 2013

3.2. Trabalho submetido para a revista PloS One: Laser Speckle imaging: A Novel Method for Detecting Dental Erosion

Manuscript Number:	PONE-D-14-49672
Article Type:	Research Article
Full Title:	Laser speckle imaging: A Novel Method for Detecting Dental Erosion
Short Title:	Laser speckle imaging: Detecting Dental Erosion
Corresponding Author:	Alessandro Melo De Ana, Ph.D Universidade Nove de Julho São Paulo, São Paulo BRAZIL
Keywords:	Dental erosion; non-carious cervical lesions; laser; speckle; detection; diagnostic
Abstract:	The aim of the present study was to investigate the use of laser speckle imaging analysis in the spatial domain to quantify shifts in the microstructure of the tooth surface in an erosion model. Erosion is a highly prevalent condition known as a non- carious lesion that causes progressive tooth wear due to chemical processes that do not involve the action of bacteria. Speckle images proved sensitive to even minimal mineral loss from the enamel. To the best of our knowledge, this is the first study to demonstrate the correlation between speckle patterns and lesion progression.
Order of Authors:	Nelson H Koshoji Sandra K Bussadori Carolina C Bortoletto Renato A Prates Marcelo T Oliveira Alessandro Melo Deana, Ph.D
Suggested Reviewers:	
Opposed Reviewers:	
Additional Information:	

Question	Response
<p>Financial Disclosure</p> <p>Please describe all sources of funding that have supported your work. A complete funding statement should do the following:</p> <p>Include grant numbers and the URLs of any funder's website. Use the full name, not acronyms, of funding institutions, and use initials to identify authors who received the funding.</p> <p>Describe the role of any sponsors or funders in the study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. If they had no role in any of the above, include this sentence at the end of your statement: "The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript."</p> <p>If the study was unfunded, provide a statement that clearly indicates this, for example: "The author(s) received no specific funding for this work."</p> <p>* typeset</p>	<p>The author(s) received no specific funding for this work</p>
<p>Competing Interests</p> <p>You are responsible for recognizing and disclosing on behalf of all authors any competing interest that could be perceived to bias their work, acknowledging all financial support and any other relevant financial or non- financial competing interests.</p> <p>Do any authors of this manuscript have competing interests (as described in the PLOS Policy on Declaration and Evaluation of Competing Interests)?</p> <p>If yes, please provide details about any and all competing interests in the box below. Your response should begin with this statement: I have read the journal's policy and the authors of this manuscript have the following competing interests:</p> <p>If no authors have any competing interests to declare, please enter this statement in the box: "The authors have declared that no competing interests exist."</p> <p>* typeset</p>	<p>the authors have declared that no competing interests exist</p>

Question	Response
<p>Ethics Statement</p> <p>You must provide an ethics statement if your study involved human participants, specimens or tissue samples, or vertebrate animals, embryos or tissues. All information entered here should also be included in the Methods section of your manuscript. Please write "N/A" if your study does not require an ethics statement.</p>	<p>The Brazilian law number 11.797 (that regulates animal procedures) published on October 8th, 2008, paragraph 3rd, article 3 defines animal experiments as: "procedures made on live animals", therefore since all samples were obtained post mortem from disposable parts of animals grown for commercial slaughter purposes, this work don't require approval from the animal ethics committee</p>
<p>Human Subject Research (involved human participants and/or tissue)</p> <p>All research involving human participants must have been approved by the authors' Institutional Review Board (IRB) or an equivalent committee, and all clinical investigation must have been conducted according to the principles expressed in the Declaration of Helsinki. Informed consent, written or oral, should also have been obtained from the participants. If no consent was given, the reason must be explained (e.g. the data were analyzed anonymously) and reported. The form of consent (written/oral), or reason for lack of consent, should be indicated in the Methods section of your manuscript.</p> <p>Please enter the name of the IRB or Ethics Committee that approved this study in the space below. Include the approval number and/or a statement indicating approval of this research.</p> <p>Animal Research (involved vertebrate animals, embryos or tissues)</p> <p>All animal work must have been conducted according to relevant national and international guidelines. If your study involved non-human primates, you must provide details regarding animal welfare and steps taken to ameliorate suffering; this is in accordance with the recommendations of the Weatherall report, "The use of non-human primates in research." The relevant guidelines followed and the committee that approved the study should be identified in the ethics statement.</p> <p>If anesthesia, euthanasia or any kind of animal sacrifice is part of the study, please include briefly in your statement which substances and/or methods were applied.</p> <p>Please enter the name of your Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) or other relevant ethics board, and indicate whether they approved this research or granted a formal waiver of ethical approval. Also include an approval number if one was obtained.</p> <p>Field Permit</p> <p>Please indicate the name of the institution or the relevant body that granted permission.</p>	

Question	Response
<p>Data Availability</p> <p>PLOS journals require authors to make all data underlying the findings described in their manuscript fully available, without restriction and from the time of publication, with only rare exceptions to address legal and ethical concerns (see the PLOS Data Policy and FAQ for further details). When submitting a manuscript, authors must provide a Data Availability Statement that describes where the data underlying their manuscript can be found.</p> <p>Your answers to the following constitute your statement about data availability and will be included with the article in the event of publication. Please note that simply stating 'data available on request from the author' is not acceptable. If, however, your data are only available upon request from the author(s), you must answer "No" to the first question below, and explain your exceptional situation in the text box provided.</p> <p>Do the authors confirm that all data underlying the findings described in their manuscript are fully available without restriction?</p>	<p>Yes - all data are fully available without restriction</p>
<p>Please describe where your data may be found, writing in full sentences. Your answers should be entered into the box below and will be published in the form you provide them, if your manuscript is accepted. If you are copying our sample text below, please ensure you replace any instances of XXX with the appropriate details.</p> <p>If your data are all contained within the paper and/or Supporting Information files, please state this in your answer below. For example, "All relevant data are within the paper and its Supporting Information files."</p> <p>If your data are held or will be held in a public repository, include URLs, accession numbers or DOIs. For example, "All XXX files are available from the XXX database (accession number(s) XXX, XXX)." If this information will only be available after acceptance, please indicate this by ticking the box below.</p> <p>If neither of these applies but you are able to provide details of access elsewhere, with or without limitations, please do so in the box below. For example:</p> <p>"Data are available from the XXX Institutional Data Access / Ethics Committee for researchers who meet the criteria for access to confidential data."</p> <p>"Data are from the XXX study whose authors may be contacted at XXX."</p> <p>* typeset</p>	<p>Data are from the Laser speckle imaging: A Novel Method for Detecting Dental <u>Erosion study whose authors may be contacted at amdeana@gmail.com</u></p>
<p>Additional data availability information:</p>	<p>Tick here if the URLs/accession numbers/DOIs will be available only after acceptance of the manuscript for publication so that we can ensure their inclusion before publication.</p>



UNINOVE

Universidade Nove de Julho

Phone : +55 (011) 3385-9222

Rua Vergueiro, 235/249 – Liberdade – São Paulo – SP – Brasil

CEP 01504-001

amdeana@gmail.com or amdeana@uninove.br

November 02, 2014.

Editor-in-Chief

PloS One

Dear Editor,

We are pleased to send our manuscript " Laser speckle imaging: A Novel Method for Detecting Dental Erosion" to be appreciated as a potential paper for PloS One. Our study aimed to investigate the correlation between laser speckle images and the progression of tooth erosion. Our preliminary results will be presented on SPIE West Photonics on February 2015. This study presents for the first time a low cost method capable of detecting and quantifying mineral loss in bovine tooth. Our results prove that speckle images are sensitive to even minimal mineral loss from the enamel since it is able to detect acid etching as short as 10 min of contact.

Thank you very much

Sincerely,

The authors

Laser speckle imaging: A Novel Method for Detecting Dental Erosion

Nelson H. Koshiji^{1, 4}, Sandra K. Bussadori^{1, 2}, Carolina C. Bortoletto^{1, 2}, Renato A. Prates^{1, 2}, Marcelo T. Oliveira^{1, 2} and Alessandro M. Deana^{1, 3*}.

¹ Biophotonics Department, Nove de Julho University (UNINOVE), São Paulo, Brazil

² Dentistry School, Nove de Julho University (UNINOVE), São Paulo, Brazil

³ Information Technology Department, Nove de Julho University (UNINOVE), São Paulo, Brazil

⁴ Engineering Department, Nove de Julho University (UNINOVE), São Paulo, Brazil

*Corresponding author: Alessandro Melo Deana

Programa de Pós-graduação em Biofotônica Aplicada às Ciências da Saúde –
Universidade Nove de Julho.

Rua Vergueiro, 235/249 – Liberdade - São Paulo, SP - Brasil

Zipcode: 01504-001

Telephone: +55 (11) 3385-9222

E-mail: amdeana@uninove.br or amdeana@gmail.com

ABSTRACT

Erosion is a highly prevalent condition known as a non-carious lesion that causes progressive tooth wear due to chemical processes that do not involve the action of bacteria. Speckle images proved sensitive to even minimal mineral loss from the enamel. The aim of the present study was to investigate the use of laser speckle imaging analysis in the spatial domain to quantify shifts in the microstructure of the tooth surface in an erosion model. 32 fragments of the vestibular surface of bovine incisors were divided in four groups (10 min, 20 min, 30 min and 40 min of acid etching) immersed in a cola-based beverage (pH approximately 2.5) twice a day during 7 days to create an artificial erosion. By analyzing the laser speckle contrast map (LASCA) in the eroded region compared to the sound it was observed that the LASCA map shifts, proportionally to the acid each duration, by: 18%; 23%; 39% and 44% for the 10 min; 20 min; 30 min and 40 min groups, respectively. To the best of our knowledge, this is the first study to demonstrate the correlation between speckle patterns and erosion progression.

Keywords: Dental erosion; non-carious cervical lesions; laser; speckle; detection; diagnostic;

Introduction

Laser speckle imaging is a diagnostic technique in which the features of scattered coherent light are explored. At first considered noise, the image of the scatter pattern actually contains information on the microstructure and micro-movements of the surface of a given tissue. By employing statistical analysis of the temporal and spatial fluctuations in the light scattered by microstructure dynamics and heterogeneities, it is possible to extract information on the dynamics of the abdominal wall in rats, pulp vitality in teeth and cerebral blood flow.

The ability of laser speckle imaging to allow the evaluation of dynamic features in tissues using a non-invasive, non-destructive cost-effective, real-time method has stimulated the academic community to focus efforts on the study of this method in the time domain (dynamic speckle analysis). However, the analysis of speckle patterns in the spatial domain also contains information on the microstructure and heterogeneities of the surface, which can be explored by applying the proper statistical analysis. Deana *et al.* [1] describes a method to enhance the contrast between sound and decayed tooth tissue through the study of laser speckle pattern shifts in the spatial domain.

Tooth erosion is defined as change in the ultrastructure of the enamel, which is currently assessed only using clinical diagnostics. Erosion is highly prevalent, affecting more than 50% of the population under five years of age and up to 77% of elderly individuals (> 60 years of age) [2, 3]. Tooth wear is a natural process caused by friction during chewing and brushing as well as exposure to acidic foods and beverages. This process becomes pathological when the degree of destruction compromises the function and esthetics of the teeth, with the emergence of sensitivity, which can range from mild discomfort to the impossibility of ingesting certain substances [4 - 6].

Tooth erosion in all age groups has gained importance in recent years due to the pace of modern life, which often leads to the replacement of fresh foods by industrialized foods containing acidic ingredients and conservatives. Indeed, there is a close association between the increase in tooth erosion and the ingestion of acidic foods and beverages [7]. Moreover, tooth erosion is associated with certain adverse health conditions, such as acid reflux, bulimia and vomiting due to excessive alcohol intake, as gastric fluid is highly acidic [8,9].

Demineralization of the teeth is generally caused by an acidic substance with a lower pH than the critical threshold for the enamel (4.5) and dentin (5.5), which can dissolve hydroxyapatite crystals [9, 10]. The main signs and symptoms of demineralization are pain,

discoloration, transparency, cracking and the formation of pits, with microscopic changes to the tooth surface.

A large number of studies have investigated the prevention of erosion lesions [2 - 12], but the loss of dental tissue is irreversible. Thus, early diagnosis is crucial to minimizing the amount of damage and plays an important role in the decision-making process of dentists.

The aim of the present study was to detect and quantify small changes in the microstructure of teeth using laser speckle imaging analysis to assess dental tissue demineralization.

Materials and Methods

Ethics

The Brazilian law number 11.797 (that regulates animal procedures) published on October 8th, 2008, paragraph 3rd, article 3 defines animal experiments as: "procedures made on live animals", therefore since all samples were obtained *post mortem* from disposable parts of animals grown for commercial slaughter purposes at Frigobet, this work don't require approval from the animal ethics committee.

Sample preparation

Using the method proposed by Shellis et al. [13], Schluter et al. [14], Young et al. [15] and Cheng et al.[16], 32 fragments of the vestibular surface of bovine incisors were obtained. Two fragments measuring approximately 6x6 mm² were embedded in each sample holder (PVC tube) with acrylic resin with the enamel exposed, horizontal and parallel. Each sample was polished for 60 seconds using wet sandpaper with different degrees of coarseness (400, 600, 1000 and 1200, Buehler, UK). A felt disk with a diamond paste (3M, USA) was then used for polishing. Each fragment was divided into two parts, one of which was protected

with nail polish (classified as sound tissue) and the other was left exposed and submitted to chemical corrosion (classified as eroded tissue).

For the erosion challenge, the samples were divided into four groups and immersed in 30 ml of a cola-based beverage (pH approximately 2.5) at room temperature (approximately 25 °C). Immersion was performed twice a day over seven consecutive days using the following experimental protocol:

- Group 1 (n = 8) – 10 minutes;
- Group 2 (n = 8) – 20 minutes;
- Group 3 (n = 8) – 30 minutes;
- Group 4 (n = 8) – 40 minutes.

After each challenge, the samples were rinsed with de-ionized water for 20 seconds, dried at room temperature and stored in a humid environment until the subsequent etching acid. Two outliers were excluded from group 2 [13 - 16].

Laser speckle imaging

Figure 1 shows the schematic diagram of the laser speckle imaging system. The surfaces of each sample were imaged under a coherent light illumination at normal incidence. A HeNe laser (Uniphase, USA) emitting at 633 nm with 40 mW of continuous wave power was used. The beam was expanded by a $f = 100$ mm lens (K&F concept, China) achieving a circular spot size with 6 mm in diameter. The samples were then imaged using a CMOS sensor with 23.7 mm X 15.3 mm (4752 x 3168 pixels; pixel pitch = 4.99 μm) (Canon EOS Rebel T1i camera fitted with a macro 100 mm Canon lens, Japan) and stored. The photometric parameters were: exposure time = 1/200 s; f/ 29; ISO 100 and the camera was placed at an angle $\theta < 10^\circ$ with the laser (Figure 1). No data binning was performed by the camera.

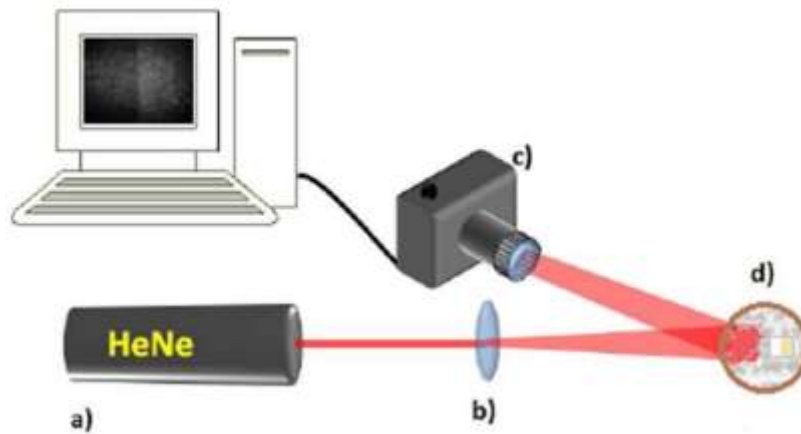


Figure 1: Schematic diagram of laser speckle imaging system: (a) HeNe laser emitting at 633 nm; (b) Beam expander lens; (c) CMOS camera; (d) samples

The samples were placed inside a plastic tube (Figure 2a). Each sample was imaged under white (Figure 2b) and laser (figure 2c) illumination. Figure 2d presents the speckle imaging mean ($n = 4 \times 4$) in which a false color algorithm was applied to increase the visual contrast. Each raw image was manually trimmed to obtain a 700 x 700 pixel image (Figure 2e) containing the region of interest with a sample of the sound tissue (right) and a sample of eroded tissue (left).

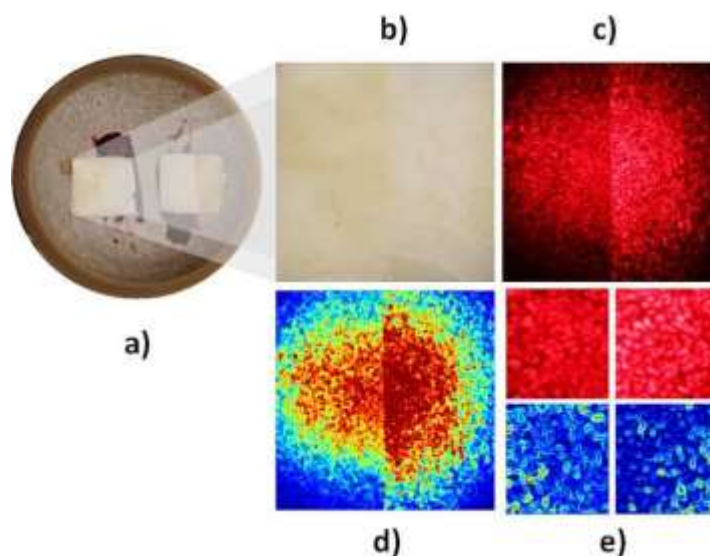


Figure 2: Procedure for acquisition and analysis of speckle images: (a) sample; (b) image under white light, (c) image under coherent light, (d) pre-processed images, (e) LASCA maps.

The methods currently used to extract information from speckle images are mainly based on the analysis of pixel intensity (brightness) of the image [1,17,18]. The images were analyzed by a custom software written (by the authors) in Python Language Reference (version 2.7,) based on the theoretical analysis of speckle images presented in ref. [19]. According to [19], the scattered amplitude fields are randomly distributed and the intensity values follow a negative exponential distribution (1) [19]:

$$P(I) = e^{\left(-\frac{I}{\langle I \rangle}\right)} \quad (1)$$

in which $\langle I \rangle$ is the mean intensity given by (2):

$$\langle I \rangle = \frac{\sum_{i=1}^n I}{n} \quad (2)$$

and the standard deviation of the pixel intensity is (3):

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (I_i - \langle I \rangle)^2}{n-1}} \quad (3)$$

in which n is the sample size.

High spatial resolution is desirable when analyzing oral tissues. Therefore, analysis of variance should be performed on small samples, but without compromising the statistical accuracy. Extrapolating data obtained from Deana et al. [1], a sample size of $n = 4 \times 4$ was used in the present study, resulting in a 175×175 pixel image (Figure 2d).

Laser speckle contrast analysis (LASCA) is another statistical method that is usually combined with the extraction of movement information from a spatial image and it is calculated as shown (4):

$$C_{i,j} = \frac{\sigma_{i,j}}{\langle I_{i,j} \rangle} \quad (4)$$

in which the contrast C is a number ranging between 0 and 1. Low contrast values denote fast moving particles, whereas high values denote slow moving particles [20].

Although usually associated with movement, contrast analysis also reveals interesting features in the spatial domain, as will be demonstrated in this paper, whereby the contrast map of the images is also studied.

To avoid heterogeneity in laser beam intensity, the contrast map was calculated only for the central portion of the image, where the illumination intensity is homogeneous (Figure 2e).

Statistical analysis:

The data were found to present normal distributions (Shapiro-Wilk; $p > 0.05$), therefore analysis of variance was used in order to compare multiple groups followed by Tukey as post-hoc. The correlation between the acid etching duration and the LASCA ratio was assessed by the Pearson's test. The inferential analysis was performed by BioEstat 5.3 (Brazil) and the significance level is set at $\alpha = 0,05$.

Results and Discussion

The laser speckle images demonstrate that it is possible to acquire information on the microstructure of the enamel and detect minimal changes, such as early non-carious lesions. Figure 3a shows a representative sample from each group under white illumination. Although there are visible stains in the left portion of each sample due the dye from the cola beverage, structural changes are difficult to assess with the naked eye.

In Figure 3b, each sample was imaged under laser illumination. The images were then averaged ($n = 4 \times 4$) and a false color algorithm was applied to facilitate the visualization.

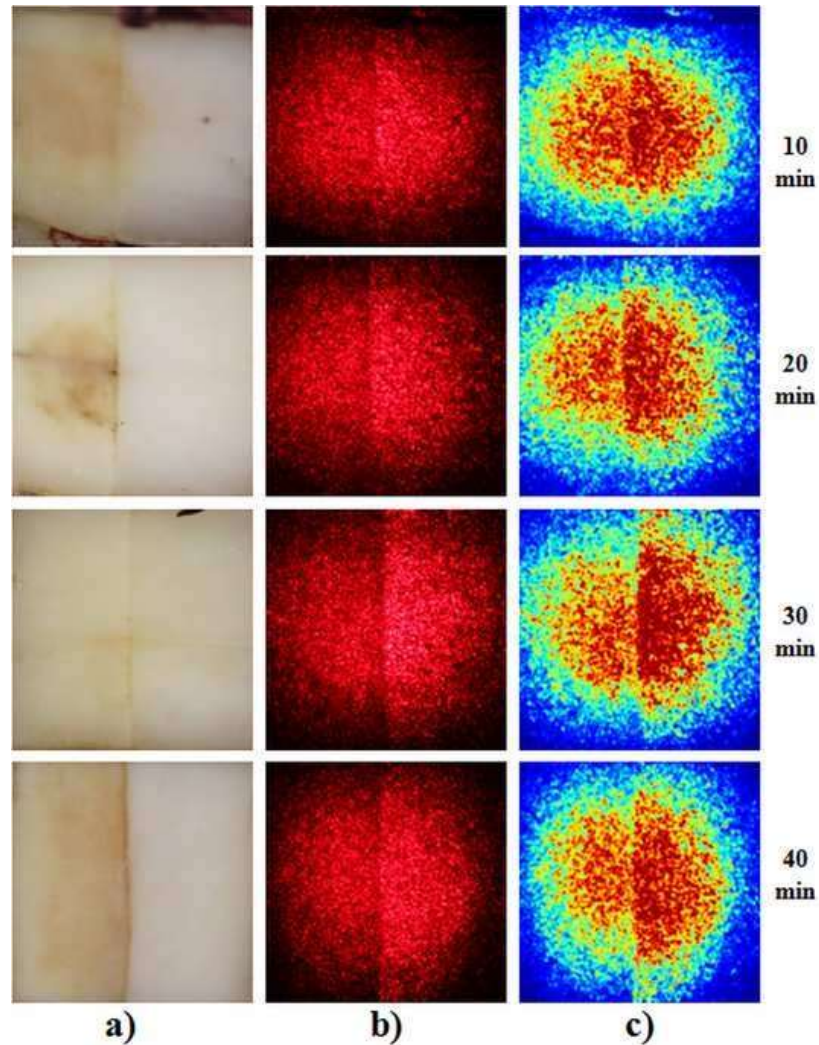


Figure 3: sample; (a) white light image; (b) coherent light image; (c) false color image with averaged intensity

All samples exhibited lower average intensity of the backscattered light on the eroded tissue, which is seen on the left side of Figure 3a and b, in comparison to sound tissue (right side). Figure 3c presents the speckle imaging mean ($n = 4 \times 4$) in which a false color algorithm was applied to enhance the visual contrast. Moreover, the standard deviation of each sample was larger in the eroded tissue in comparison to the sound tissue (Figure 4). Both effects are related to the heterogeneity induced in the microstructure of the enamel by the demineralization process, which increases the interprismatic spaces, exposing the top of the prism, which has greater porosity [21]. This increases the number of scattering centers,

thereby increasing the light scattering, but mineral loss also reduces the backscattering coefficient. This opaque surface therefore results in a larger standard deviation and less average intensity in laser speckle images (Figure 4).

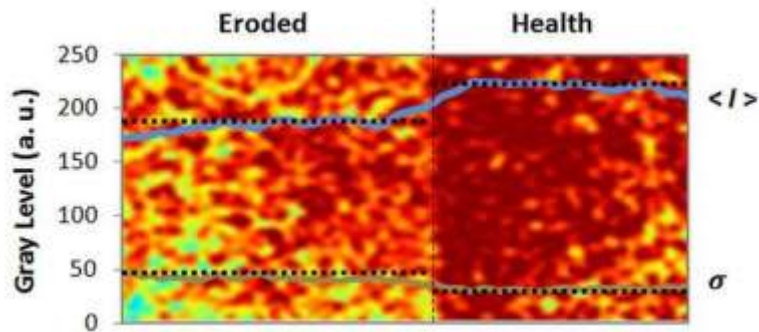


Figure 4: Average intensity and standard deviation of a typical laser speckle image of tooth enamel

To differentiate the sound and eroded tissues, contrast analysis was performed of the speckle patterns in the images. Since this analysis is, in its essence, the ratio of the standard deviation and average intensity, the LASCA map of the lesion is generally higher than in sound tissue. This phenomenon is demonstrated in the LASCA maps in Figure 5, which show the greater prevalence of dark blue on the right side, indicating sound tissue, and lower prevalence on the left side, indicating eroded tissue.

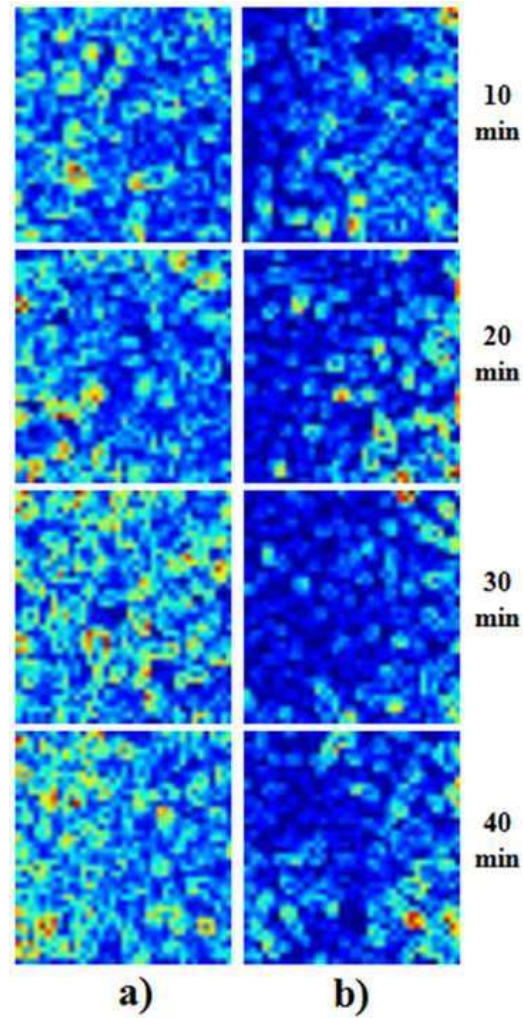


Figure 5: Typical LASCA maps of; (a) eroded tissue; (b) sound tissue

The contrast ratio of the LASCA map of the sound and eroded tissue in each sample is also analyzed according to (5) [22]:

$$1 - \frac{\langle C_{sound} \rangle}{\langle C_{lesion} \rangle} \quad (5)$$

Plotting the average contrast ratio for each group against its acid etching duration, a correlation is found between the speckle signal and demineralization process (Figure 6).

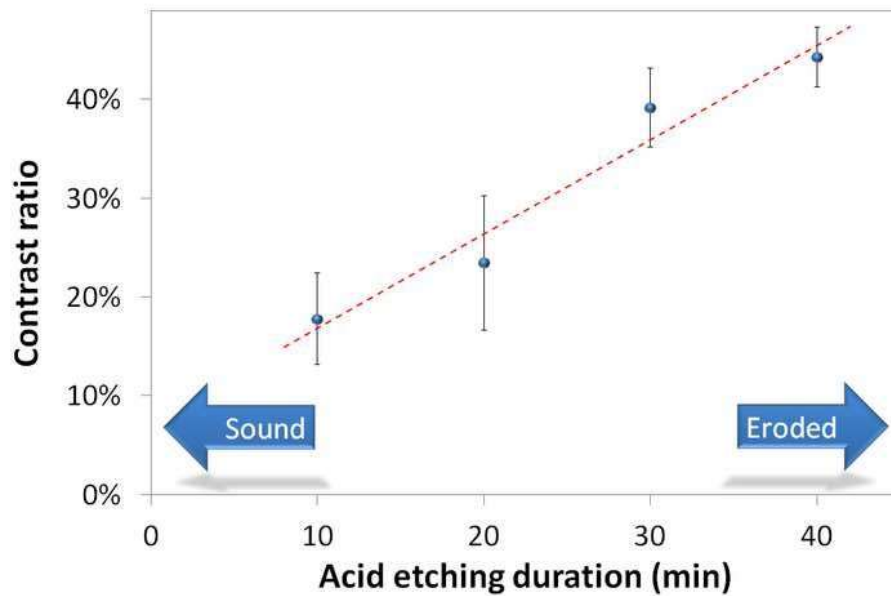


Figure 6: Contrast ratio x acid etching duration (equal letters means statistical difference). The arrow means the group statistically differs from the reference contrast ratio 0%

This contrast ratio demonstrates the lower LASCA signal from the eroded tissue lesion in comparison to the sound region. Figure 6 demonstrates that the contrast ratio (CR) of the speckle images is sensitive to even small changes in the microstructure of the surface. . Although the difference between 10 and 20 minutes; and between 30 and 40 minutes data points are not statistically significant, the overall trend would tend toward a linear correlation with the etching acid duration. (Pearson's coefficient $r = 0.9737$, $p = 0.0263$)

Ten minutes of acid etching in a cola-based beverage resulted in a contrast ratio of 18%, meaning that the LASCA signal originating from the lesion was 18% lower than that from the sound region which, at the significance level $\alpha = 0.05$, is statistically different from the 0% reference value ($p < 0.0001$). For the groups 20, 30 and 40 min of etching acid, the contrast ratio also statistically differs from the reference value ($p < 0.0001$). These data indicates the contrast ratio is strongly correlated to the etching acid, correctly detecting the demineralization due to the erosion process even for process as initial as 10 min of acid etch.

At 30 min of acid etching, the contrast ratio increased to 39%, which statistically differs from 10 min ($p = 0.0195$) and from 20 min ($p = 0.0149$). The 40 min group, does not statistically differs from the 30 min group but, it is different in comparison with the 10 min group and 20 min group ($p = 0.0095$ and $p = 0.0077$, respectively). This demonstrates the proposed method is capable of more than just detect – it also quantifies – the erosion progress thus this process provides an objective way of analyzing the disease progression.

Conclusions

Erosion is highly prevalent in people of all ages. However, an objective diagnostic procedure is still needed, thus the study of the laser speckle imaging for tooth enamel may provide the first low cost objective diagnostic method for this disease.

The analysis of laser speckle imaging in the spatial domain is a powerful diagnostic technique that provides information on the surface microstructure. To the best of our knowledge, this is the first study to demonstrate it is possible to analyze information on the microstructure of tooth enamel after an acid etching procedure using patterns and LASCA maps. In an erosion model, these patterns are associated with mineral loss from the enamel.

This method has proven sensitive to 10 minutes of acid etching on tooth enamel, which is a lesion so incipient that is not likely to be detected in clinical practice even by a trained dentist, besides it is also sensitive to the erosion progression.

In conclusion, even though it has never been tested in a clinical trial, the highlights of the method such as: non-contact non-destructive cost-effective in theory makes it ideal for the clinical practice.

References

1. Deana AM, Jesus SHC, Koshiji NH, Busadori SK and Oliveira MT (2013). Detection of early carious lesions using contrast enhancement with coherent light scattering (speckle imaging). *Laser Physics*; 23:075607.
2. Murakami C, Oliveira LB, Sheiham A, Nahás Pires Corrêa MS, Haddad AE and Bonecker M.(2011) Risk Indicators for Erosive Tooth Wear in Brazilian Preschool Children. *Caries Research* 45:121-129.
3. Bartlett D. (2007) A new look at erosive tooth wear in elderly people. *Journal of the American Dental Association* 138 (suppl 1):21S-25S.
4. Lussi A and Jaeggi T. Erosion: diagnosis and risk factors. (2008) *Clinical Oral Investigations* 12(suppl 1):5-13.
5. Amaechi BT and Higham SM. (2005) Dental erosion: possible approaches to prevention and control. *Journal of Dentistry* 33(3):243-252.
6. Zero DT and Lussi A. (2005) Erosion: chemical and biological factors of importance to the dental practitioner. *International Dental Journal* 55(S4):285-290.
7. West NX, Hughes JA and Addy M. (2001) The effect of pH on the erosion of dentine and enamel by dietary acids in vitro. *Journal of Oral Rehabilitation* 28(9):860-864.
8. Scheutzel P. (1996) Etiology of dental erosion-intrinsic factors. *European Journal of Oral Sciences* 104(2):178-190.
9. Barron RP, Carmichael RP, Marcon MA and Sandor GK. (2003) Dental erosion in gastroesophageal reflux disease. *Journal Canadian Dental Association* 69(2):84-89.
10. Grippo JO, Simring M and Schreiner S. (2004) Attrition, abrasion, corrosion and abfraction revisited: a new perspective on tooth surface lesions. *Journal of the American Dental Association* 135(8):1109-1118.
11. Grenby TH. (1996) Methods of assessing erosion and erosive potential. *European Journal of Oral Sciences* 104(2):207-214.
12. Jager DH, Vieira AM, Ruben JL and Huysmans MC. (2012) Estimated erosive potential depends on exposure time. *Journal of Dentistry* 40(12):1103-1108.
13. Shellis RP, Gans C, Ren Y, Zero DT and Lussi A. (2011) Methodology and models in erosion research: discussion and conclusions. *Caries Research* 45 (suppl 1):69-77.

14. Schluter N, Hara A, Shellis RP and Ganss C. (2011) Methods for the measurement and characterization of erosion in enamel and dentine. *Caries Research* 45 (suppl 1):13-23.
15. Young A and Tenuta LMA. (2011) Initial Erosion Models. *Caries Research* 45 (suppl 1):33-42.
16. Cheng ZJ, Wang XM, Cui FZ, Ge F and Yan JX. (2009) The enamel softening and loss during early erosion studied by AFM, SEM and nanoindentation. *Biomedical Materials* 4:015020.
17. O'driscoll P, Mitchell J, Shelton J, Knowless JC and Gulabivala K. (1998) Laser speckle photography in measurement of tooth strain. In: *International Endodontic Journal* 376-376.
18. Uchino M, Fujisaki W, Kurihara E, Matsuda K and Koseki T. (2004) Characteristics of Laser Speckle Measurement of Tooth Roughness. *Key Engineering Materials*; 261/263:1581-1586.
19. Goodman JW. *Statistical Properties of Laser Speckle Patterns* (1984) In: Dainty, J.C. (ed). Berlin: Springer 9-75.342 p
20. Briers JD and Webster S. (1996) Laser speckle contrast analysis (LASCA): a non-scanning, full-field technique for monitoring capillary blood flow. *Journal of Biomedical Optics*; 1(2):174-179.
21. Zhou SL, Wen LY, Zhou J, Xuan K and Watanabe S.(2012) In vitro study of the effects of fluoride-releasing dental materials on remineralization in an enamel erosion model. *Journal of Dentistry* 40 (3):255-263.
22. Koshiji NH, Bussadori SK, Bortoletto CC, Oliveira MT, Prates RA and Deana AM. (2015) Analysis of eroded bovine teeth through laser speckle imaging. *Proc. of SPIE*: in press

3.3. Trabalho a ser submetido: How to quantify enamel hardness shifts with laser speckle imaging: a real time analysis of an erosion model

How to quantify enamel hardness shifts with laser speckle imaging: a real time analysis of an erosion model.

N H Koshoji, S K Bussadori, C C Bortoletto, R A Prates, M T Oliveira and Alessandro M Deana.

Postgraduate Program in Biophotonics Applied to Human Health, University Nove de Julho – UNINOVE, Rua Vergueiro 235, Sao Paulo, Brazil

E-mail: amdeana@gmail.com and amdeana@uninove.br

Abstract

Usually, the laboratorial quantification of different tooth enamel lesions is currently based on the Knoop hardness test. Dental erosion is a highly prevalent condition known as non-carious cervical lesions related to progressive enamel wear due to contact with chemical agents capable of dissolving hydroxyapatite. The present study demonstrates a novel method for the indirect quantification of changes in the local microstructure of tooth enamel that are intrinsically related to the progressive loss of minerals. This novel method consists of obtaining digital images of the scattering of coherent light on the tooth surface, denominated laser speckle imaging. This method proved sensitive to the determination of the loss of enamel hardness due to the attack of acids even in the initial stages of erosion. This is the first study to demonstrate an empirical model for correlating laser speckle imaging with the loss of tooth enamel hardness.

Key words: dental erosion; non-carious cervical lesions; Knoop hardness; laser; speckle imaging

1. Introduction

Dental erosion is associated with natural wear due to friction from brushing and chewing as well as the ageing process is associated with enamel demineralization, and is highly prevalent among individuals aged 60 years or older [1]. Erosion compromises function and esthetics and increases sensitivity, which can range from slight discomfort to the impossibility of ingesting certain foods and beverages. Affected teeth lose their coloration and become transparent, with the formation of pits and fissure that alter the surface of the teeth [2-6].

The demineralization process begin on the enamel and dentin when these are in contact with substances that have a pH lower than 4.5 and 5.5, respectively, therefore acidic substances that dissolve hydroxyapatite crystals are also responsible from this process [7,8].

In recent years, dental erosion has also affected the youth due to the pace of modern life and the increase in the intake of acidic foods and beverages as well as the replacement of fresh foods with processed foods containing conservatives [9,10]. Moreover, gastric fluid has a low pH and an association has been found between this acidic substance and dental erosion in systemic conditions, such as acid reflux, bulimia and vomiting due to alcoholism [11,12].

Despite the high prevalence rate, the diagnosis of dental erosion in clinical practice continues to be based on subjective observations of the patient under normal lighting conditions and therefore subject to bias.

Under laboratory conditions, scientific studies have employed surface hardness analysis as the gold standard to quantify dental erosion [13-15]. However, this method has a number of drawbacks, such as: expensive equipment; the time-consuming indentation process and the need to extract the tooth, which makes such an analysis unviable for *in vivo* studies and clinical practice.

Illuminating the teeth with a coherent light source rather than regular illumination and photographing it is denominated laser speckle imaging, which is characterized by a set of light and dark granulated optics stemming from the diffuse reflection and back-scattering of light over a rough surface (with respect to the wavelength of the light source). This phenomenon results in different wave fronts of the same frequency and different phases that add to one another, resulting in waves with randomly varying amplitudes that generate light and dark granules [16].

According to Goodman (1984), despite its random nature, laser speckle imaging can be described in terms of statistical theory. The analysis and interpretation of laser speckle images are based on first-order and second-order statistics of the brightness of the image [17].

On the ultra-structural level, different conditions may cause shifts to the tooth enamel surface, therefore the speckle patterns are different for sound and unsound teeth regions. Thus, it is possible to extract potentially diagnostic information using this method. Indeed, Deana et al. [18] used laser speckle imaging in the spatial domain to distinguish sound and carious regions of teeth.

Being a noninvasive, non-destructive, low-cost method that offers real-time results, laser speckle imaging has stimulated our research group to concentrate efforts to estimate the microhardness of the tissue, which is the gold standard in the literature for erosion diagnosis, from laser speckle images. The aims of the present study were to correlate the speckle pattern with the traditional microhardness Knoop test as well as detect and quantify incipient changes in the microstructure of teeth using laser speckle imaging analysis.

2. Materials and Methods

2.1. Sample preparation

Using the methods proposed by Shellis et al. (2011), Schluter et al. (2011), Young et al. (2011) and Cheng et al. (2009), 32 vestibular surface fragments of bovine incisors were placed in sample holding recipients (portion of PVC tube) and secured with acrylic resin. Each recipient contained two fragments measuring approximately 6x6 mm² with the enamel exposed horizontally. Each specimen was wet sanded for 60 s using sand paper with different grits (400, 600, 1000 and 1200), polished with a felt disc with diamond paste and divided into two parts. One part was protected with two layers of enamel nail polish and was classified as the sound area (control) and the other area was submitted to chemical erosion (Figure. 1).

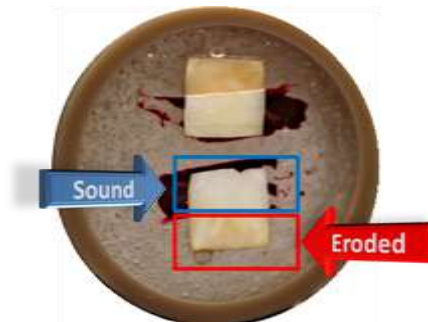


Figure 1: Specimens of bovine teeth fragments secured in PVC tube with acrylic resin

For the etching acid, the samples were divided into four groups and immersed in 30 ml of a cola-based soft drink (approximate pH: 2.5) at room temperature (approximately 25° C). Immersion occurred twice a day for seven consecutive days. The experimental protocol was as follows:

- Group 1 (n = 8) = 10 min;
- Group 2 (n = 8) = 20 min;
- Group 3 (n = 8) = 30 min;
- Group 4 (n = 8) = 40 min.

After each immersion, the specimens were washed with de-ionized water for 20 s, dried at room temperature and stored in an environment with high relative humidity until the next challenge [19-22]. The hardness Knoop test was used to quantify erosion on all specimens.

2.2. Laser speckle imaging

At the end of the erosive challenge, the surfaces of the specimens were laser speckle imaged. Each specimen was illuminated with a red helium-neon laser (wavelength: 633 nm). The laser was placed at a distance of 76 cm from the sample and the beam was expanded to illuminate the entire specimen. The images were captured with a CCD camera. Figure 2 shows a schematic diagram of the experimental setup.

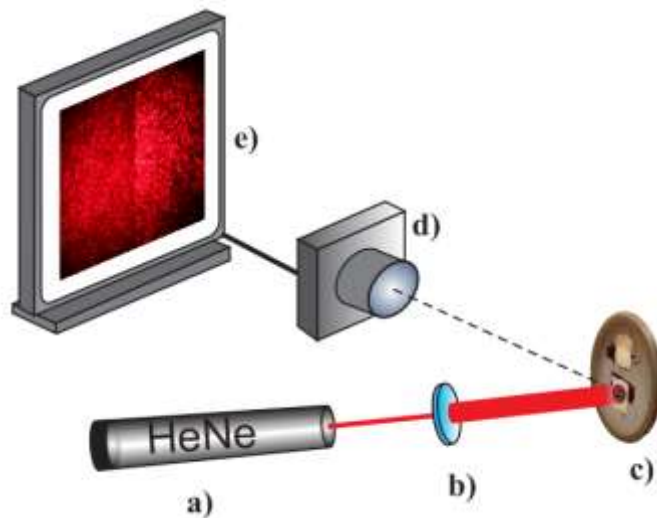


Figure 2: Schematic diagram of experimental setup: (a) HeNe laser (wavelength: 633 nm); (b) lens with focus $f = 40$ cm; (c) specimens; (d) Canon T1 camera; (e) image of specimen

The images were cropped to a standard size of 700 x 700 pixels with the eroded area on the left and the sound area on the right. One image with white light (Fig. 3a) and one with coherent light (Fig. 3b) was obtained for each specimen.

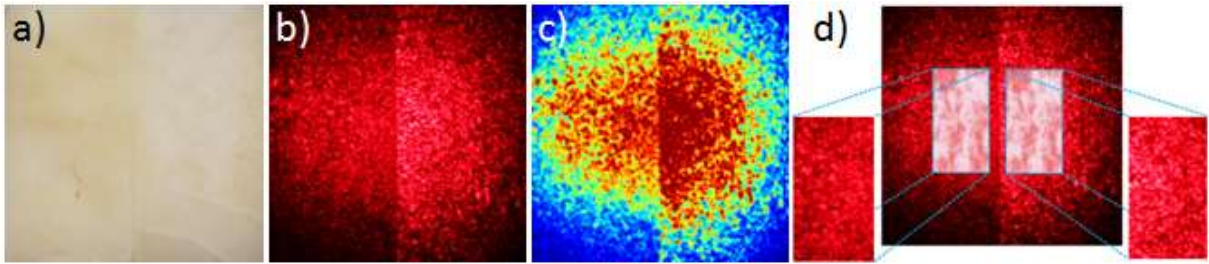


Figure 3: Procedure for speckle imaging analysis: (a) image under white light; (b) image under coherent light; (c) pre-processed images; d) Cutout of homogeneous area of sound and eroded areas

Since the laser power distribution was heterogeneous (figure 3 b and c), a matrix with approximately homogeneous illumination containing 300 x 200 pixels was extracted from each image for analysis (Fig. 3 b).

To simplify the analysis, Goodman developed a first-order statistical model to describe optical patterns based on the mean, variance and standard deviation of the intensities [17]. Equation 1 is used to calculate mean intensity $\langle I \rangle$:

$$\langle I \rangle = \frac{\sum_{i=1}^n I}{n} \quad (1)$$

in which I is intensity, $\langle I \rangle$ is mean intensity and n is sample size. In this work we found $n = 4 \times 4$ pixels presented a good spatial definition and statistical accuracy. The standard deviation of the intensity of optical scattering was obtained using Equation 2:

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (I_i - \langle I \rangle)^2}{n-1}} \quad (2)$$

Figure 5 shows typical mean intensity and standard deviation values of the light scattering pattern on sound and eroded tissue.

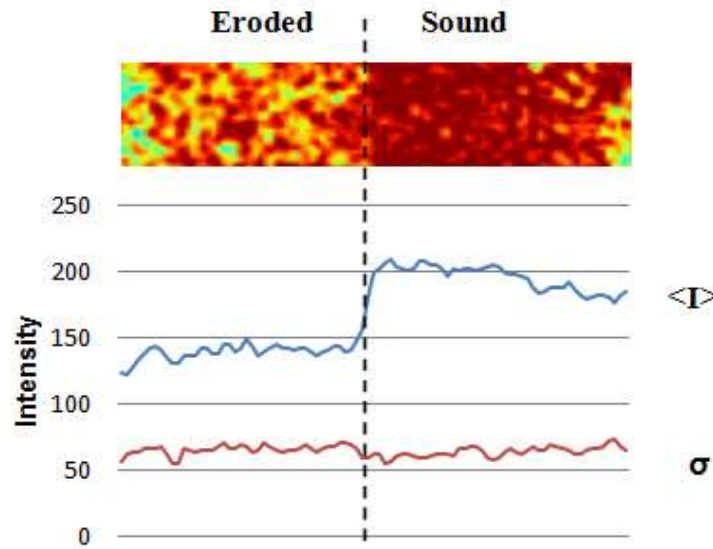


Figure 5: Mean intensity and standard deviation on sound and eroded tissue

Mean intensity was typically less on the eroded side than the sound side (Fig. 5). However, the standard deviation was slightly larger on the eroded side. Laser contrast analysis (LASCA) is highly used on dynamic speckle, in which it is possible to obtain information about micro-movement on the sample [23]. In this work, even though everything is static, we applied this method to amplify the difference between sides. The LASCA maps were calculated by using equation 3:

$$C_{i,j} = \frac{\sigma_{i,j}}{\langle I_{i,j} \rangle} \quad (3)$$

The use of LASCA demonstrated that less contrast on the sound side than the eroded side. Figure 6 shows a typical LASCA map with the different tonalities between sides.

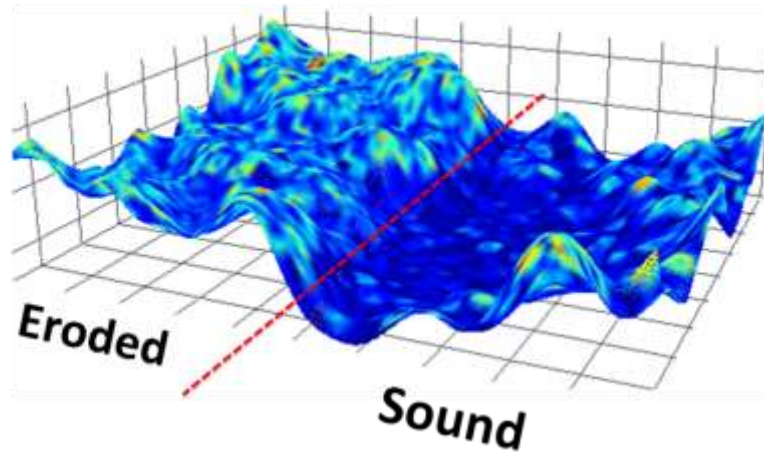


Figure 6: Typical LASCA map: (a) eroded region; (b) sound region

To avoid bias stemming from the individual baseline condition of each tooth, relative contrast of the LASCA map was calculated, as given in equation 4, rather than analyzing absolute contrast, which is dependent on lighting conditions and photometry.

The LASCA map of the eroded region has a larger signal than that of the sound area. As this signal is proportional to the degree of erosion, a relative contrast close to 0% means no difference in the LASCA maps of the eroded and control (sound tissue) and therefore no erosion. Hence, greater relative contrast denotes greater erosion in relation to the sound area.

$$\left(\frac{\langle LASCA_{eroded} \rangle}{\langle LASCA_{sound} \rangle} - 1 \right) \bullet 100\% \quad (4)$$

A previous study submitted by our research group demonstrated a strong correlation between relative contrast and the progression of erosion [24]. Thus, the proposed method allows both the qualification and quantification of erosion. In the present study, a correlation is made between the change in the light scattering pattern demonstrated by the LASCA map and a change in surface hardness of the tooth due to the acid challenge. To avoid bias

stemming from the baseline condition of each tooth, hardness was also described in relative terms in relation to the sound area, as follows:

$$\left(\frac{\langle \text{Hardness}_{\text{sound}} \rangle}{\langle \text{Hardness}_{\text{eroded}} \rangle} - 1 \right) \bullet 100\% \quad (5)$$

Equation 5 allows the determination of the percentage of how much greater is superficial hardness in the sound region in relation to the eroded region. A relative contrast close to 0% means no difference in the hardness between the dematerialized region and control (sound tissue) and therefore no erosion. Hence, greater relative contrast denotes greater hardness in the sound region with respect to the eroded region and therefore higher degree of erosion.

Besides eliminating bias stemming from the baseline condition of each tooth, the operator of the hardness meter, the photometric conditions of speckle imaging and the equipment used for the imaging of the light scattering pattern, using relative contrast reduces the two regions of the sample to a single experimental unit, which expresses the initial and final condition of the tooth with and without the acid challenge, thereby simplifying the analysis of the results.

3. Results and Discussion

Although some studies have employed laser speckle imaging from dental surfaces, this method has considerable untapped potential and can become a major diagnostic tool in dentistry [18,25,26]. The traditional method for the determination of hardness requires expensive equipment and various indentations, which is time-consuming and increases the cost of the analysis. Moreover, this method requires the specimen to be extracted from the

mouth, which renders *in vivo* analysis impossible. In contrast, laser speckle imaging is far less costly, as it only requires a camera and laser source. Using current computational resources, a large surface area can be scanned in a short span of time and the analysis of the images can be achieved in real time. Moreover, this method does not require the tooth to be extracted and therefore allows *in vivo* analysis.

A Bland-Altman plot was used to study the correlation between the analysis of the LASCA map and surface hardness of the tooth enamel. This statistical method allows the comparison of both measurement methods (Fig. 7).

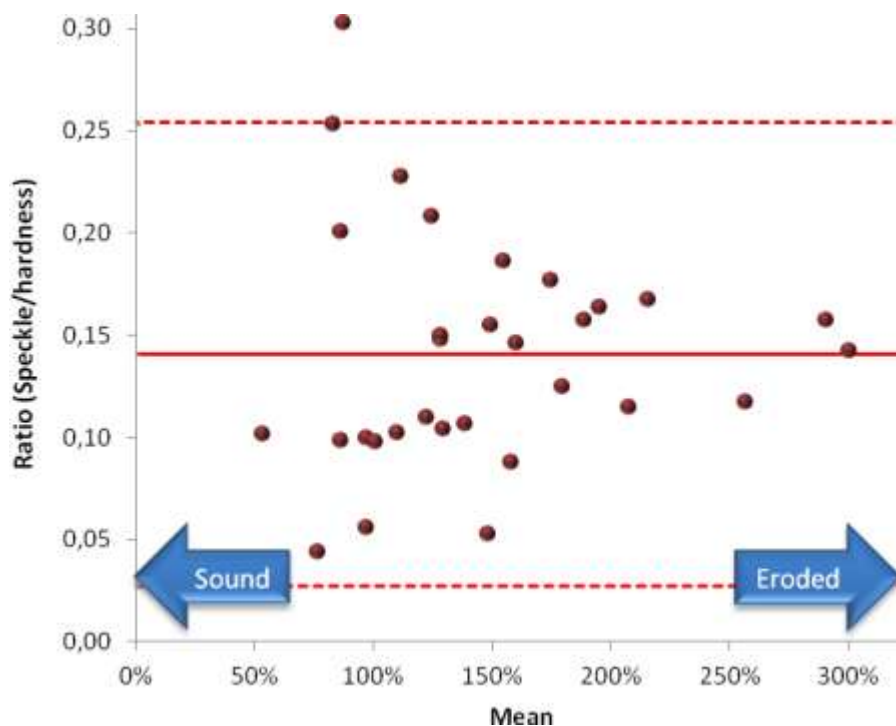


Figure 7: Bland-Altman plot demonstrating good agreement between hardness test and laser speckle imaging (Dotted lines denote 95% confidence interval.)

More than 95% of the specimens analyzed were within a narrow confidence interval, demonstrating a strong correlation between the proposed method and hardness test [27,28]. To further characterize the proposed method and correlate it with the hardness test, Figure 8

shows the dispersion plot of the relative change in hardness in function of the relative contrast in the LASCA map for each specimen.

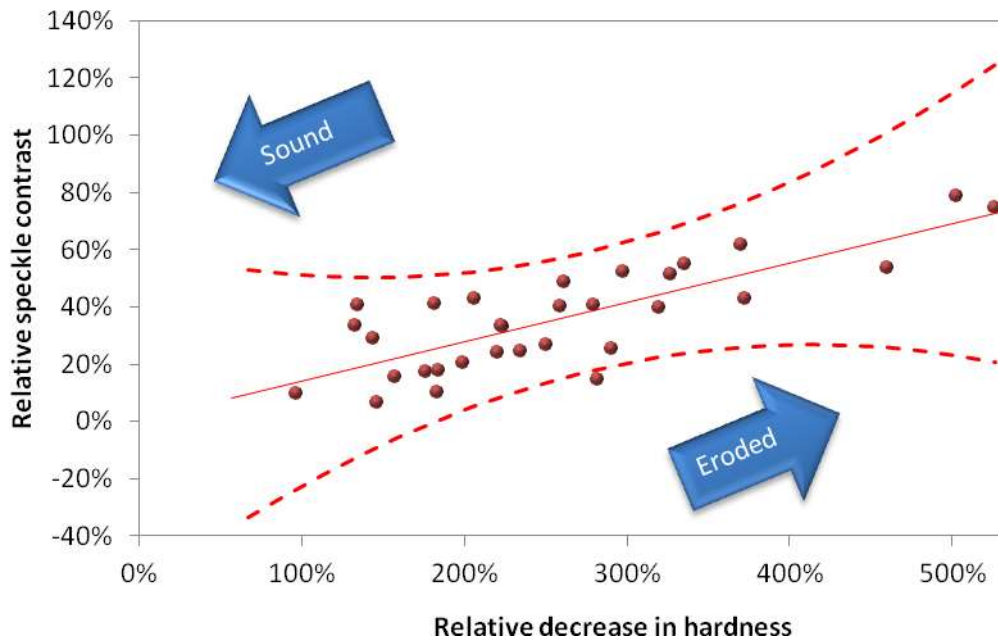


Figure 8: Dispersion plot of hardness Knoop test and LASCA map obtained using laser speckle imaging (Solid line represents linear regression adjusted to data and dotted lines denote 95% confidence interval.)

Although a controlled and incremental demineralization process was obtained by using four acid etching times, there was no need to separate the groups based on exposure time. Thus, all data were presented in a single dispersion graph. Figure 9 demonstrates a strong correlation between the hardness Knoop and change in the LASCA map with regard to erosion. The correlation coefficient was 0.80. The linear regression represented by the trend lines was determined using the minimum squares method.

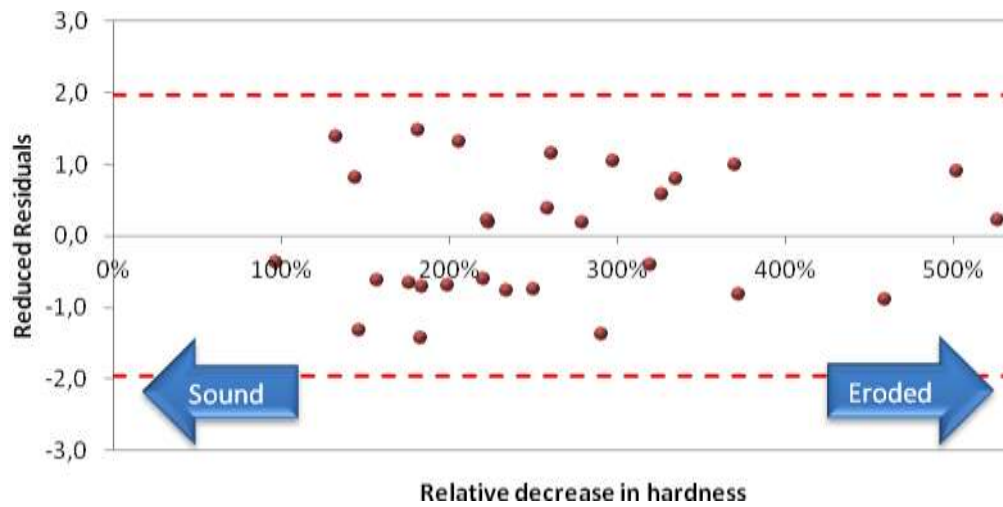


Figure 9: Analysis of reduced residuals of LASCA map (Dotted lines denote 95% confidence interval.)

The analysis of reduced residuals (Fig. 9) demonstrates that the linear regression was adequate, as the residuals were randomly distributed around the abscissa and none had an absolute value greater than 1.96. Figures 8 and 9 empirically demonstrate the linear correlation between the signal obtained from the LASCA map and the hardness of the teeth. The adjusted linear coefficient was 0.01 ± 0.16 . Considering a 5% significance level, this coefficient is compatible to zero, demonstrating that no variation in the LASCA map would be expected in the absence of variation in hardness. The analysis of the angular coefficient of the adjusted trend line (0.137 ± 0.057) demonstrates that the LASCA map should vary approximately 14% when hardness of the enamel varies 100% (i.e. eroded area exhibits half the surface hardness of the sound area).

Extrapolating these findings, in clinical practice, an indirect measurement of the change in the hardness of tooth enamel can theoretically be achieved from a single laser speckle image of the tooth using the following experimental model:

$$\frac{\langle \text{Hardness}_{\text{sound}} \rangle}{\langle \text{Hardness}_{\text{eroded}} \rangle} = 7.3 \bullet \frac{\langle \text{LASCA}_{\text{eroded}} \rangle}{\langle \text{LASCA}_{\text{sound}} \rangle} - 6.3$$

As hardness is closely correlated with different adverse oral health conditions, such as dental erosion and white lesions, the proposed method has the potential for use in the diagnosis and qualification of these conditions.

4. Conclusions

Both the Bland-Altman and dispersion plots demonstrated an interconnection between the proposed analysis method and the hardness Knoop therefore this study demonstrates for the first time to our knowledge, a strong correlation between laser speckle imaging and tooth enamel hardness.

Laser speckle imaging is: noninvasive; non-destructive; low-cost; real time and may be used *in vivo*, thus it provides the ontological community the first objective method for erosion diagnosis and quantification.

Moreover, since many pathologies affect the microstructure of the enamel resulting in loss of hardness, in theory this method may also be efficient in diagnosing qualitatively and quantitatively, diseases such as carious lesion.

In conclusion, laser speckle imaging allows an objective, low cost and accurate diagnosis of dental erosion in the early stages, which is difficult to perform and subject to bias while using conventional clinical methods.

References:

1. Bartlett D. A new look at erosive tooth wear in elderly people. *Journal of the American Dental Association*. 2007; 138 (suppl 1):21S-25S
2. Zero DT, Lussi A. Behavioral Factors. In: Lussi A, *Dental Erosion: From diagnosis to therapy*. Monogr Oral Sci. Basel, Karger. 2006; 20(7):100-105.
3. Lussi A and Jaeggi T. Erosion – diagnosis and risk factors. *Clinical Oral Investigations*. 2008, 12(suppl 1):5-13.
4. Amaechi BT and Higham SM. Dental erosion: possible approaches to prevention and control. *Journal of Dentistry*. 2005; 33(3):243-252.
5. Grenby TH. Methods of assessing erosion and erosive potential. *European Journal of Oral Sciences*. 1996; 104(2):207-214.
6. Jager DH, Vieira AM, Ruben JL and Huysmans MC. Estimated erosive potential depends on exposure time. *Journal of Dentistry*. 2012; 40(12):1103-1108.
7. Zero DT, Lussi A. Erosion-chemical and biological factors of importance to the dental practitioner. *Int Dent J*. 2005. 55(4):285-290.
8. Grippo JO, Simring M, Schreiner S. Attrition, abrasion, corrosion and abfraction revisited: a new perspective on tooth surface lesions. *J Am Dent Assoc*. 2004;135:1109-18; quiz 63-5.
9. Murakami C, Oliveira LB, Sheiham A, Nahás Pires Corrêa MS, Haddad AE and Bonecker M. Risk Indicators for Erosive Tooth Wear in Brazilian Preschool Children. *Caries Research*. 2011; 45:121-129.
10. West NX, Hughes JA and Addy M. The effect of pH on the erosion of dentine and enamel by dietary acids in vitro. *Journal of Oral Rehabilitation*. 2001; 28(9):860-864.
11. Barron RP, Carmichael RP, Marcon MA and Sandor GK. Dental erosion in gastroesophageal reflux disease. *Journal Canadian Dental Association*. 2003; 69(2):84-89.
12. Scheutzel P. Etiology of dental erosion-intrinsic factors. *European Journal of Oral Sciences*. 1996; 104(2):178-190.
13. Lussi A, Kohler N, Zero D, Schaffner M, Megert B. A comparison of the erosive potential of different beverages in primary and permanent teeth using an in vitro model. *European Journal of Oral Sciences*. 2000; 108(2):110-114.
14. Gonçalves GKM, Guglielmi CAB, Corrêa FNP, Raggio DP, Corrêa MSNP. Erosive potential of different types of grape juices. *Brazilian Oral Research*. 2012; 26(5).

15. Tantbiroj D, Huang A, Ericson MD, Poolthong S. Change in surface hardness of enamel by a cola drink and a CPP – ACP paste. *Journal of Dentistry*. 2008; 36(1): 74-79.
16. Rabal HJ, Braga JR RA, Trivi M, Rabelo GF. *Dynamic laser Speckle and applications*. New York: CRC, 2008. v. 1, 282p.
17. Goodman JW. *Statistical Properties of Laser Speckle Patterns* (Berlin: Springer). 1984; 9-75.
18. Deana AM, Jesus SHC, Koshiji NH, Busadori SK and Oliveira MT. Detection of early carious lesions using contrast enhancement with coherent light scattering (speckle imaging). *Laser Physics*, 2013; 23:075607.
19. Shellis RP, Gans C, Ren Y, Zero DT and Lussi A. Methodology and models in erosion research: discussion and conclusions. *Caries Research*. 2011; 45(suppl 1):69-77.
20. Schluter N, Hara A, Shellis RP and Ganss C. Methods for the measurement and characterization of erosion in enamel and dentine. *Caries Research*, 2011; 45(suppl 1):13-23.
21. Young A and Tenuta LMA. Initial Erosion Models. *Caries Research*. 2011; 45 (suppl 1):33-42.
22. Cheng ZJ, Wang XM, Cui FZ, Ge F and Yan JX. The enamel softening and loss during early erosion studied by AFM, SEM and nanoindentation. *Biomedical Materials*. 2009; 4:015020.
23. Briers JD and Webster S. Laser speckle contrast analysis (LASCA): a non-scanning, full-field technique for monitoring capillary blood flow. *Journal of Biomedical Optics*. 1996; 1(2):174-179.
24. Nelson H, Koshiji NK, Busadori SK, Bortoletto CC, Prates RA, Oliveira MT, Deana AM. A Novel Method for Detecting Dental Erosion. *Plos One*. 2014.
25. Uchino M, Fujisaki W, Kurihara E, Matsuda K and Koseki T. Characteristics of Laser Speckle Measurement of Tooth Roughness. *Key Engineering Materials*. 2004; 261/263:1581-1586.
26. O'driscoll P, Mitchell J, Shelton J, Knowless JC and Gulabivala K. Laser speckle photography in measurement of tooth strain. In: *International Endodontic Journal*. 1998; 376-376.
27. Bland JM and Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet*. 1986; i: 307-10.
28. Bland JM and Altman DG. Measuring agreement in method comparison studies. *Statistical Methods in Medical Research*. 1999; 8: 135-160.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados discutidos anteriormente mostram de maneira inédita que é possível detectar as lesões e erosão dental utilizando a análise de espalhamento óptico por luz coerente, permitindo visualizar a diferença na desmineralização das amostras através do mapa LASCA, pois as características dos padrões apresentados nas regiões saudias e lesionadas são diferentes, atendendo desta maneira ao objetivo (a) deste trabalho.

Ademais, foi também identificado que esse padrão é proporcional ao tempo de desafio erosivo onde a quanto mais tempo o dente é submetido ao ataque maior é a diferença relativa entre a região sadia e a lesionada, portanto além da detecção, o método proposto também permite a quantificação da lesão, desta maneira atingindo o objetivo (b) deste trabalho.

Além disso, o método proposto possui também uma boa proporcionalidade com o método de dureza Knoop, portanto foi demonstrado pela primeira vez até onde se sabe, que a partir da análise do granulado óptico oriundo de uma lesão é possível obter informações a respeito da microdureza superficial do esmalte.

Em conclusão, as imagens *speckle* permitem uma análise objetiva e de baixo custo no diagnóstico de erosão dental em seus estágios iniciais, o que é difícil de ser observado em pacientes utilizando os métodos clínicos convencionais.

5. REFERÊNCIAS

- AL-DLAIGAN YN, SHAW L, SMITH A. *Dental erosion in a group of British 14-year-old, school children. Part I: Prevalence and influence of differing socioeconomic backgrounds.* Br. Dent. J. 190:145-9; 2001.
- AMAESHI BT, HIGHAM SM. *Dental erosion: possible approaches to prevention and control.* J. Dent. 33:243-52; 2005
- BARBOSA LPB, PRADO JR RR, MENDES RF. Lesões cervicais não cariosas: etiologia e opções de tratamento restaurador. Ver Dent Online. 8(18):5-10; 2009.
- BARRON RP, CARMICHAEL RP, MARCON MA, SANDOR GK. *Dental erosion in gastroesophageal reflux disease.* J Can Dent Assoc. 69:84-9; 2003.
- CASTELAN A, GUEDES APA, SANTOS PH. *Erosão dental e suas implicações sobre a saúde bucal.* RFO. 15 (1):83-86; 2010.
- MOTA CCBO, KASHYAP HUKS, KYOTOKU, BBC, GOMES ASL. *In vivo evaluation of enamel dental restoration interface by optical coherence tomography.* Rev. Cub. Física. Vol 27 no. , p.99-101, 2010.
- BERGKVIST A. *Biospeckle-based study of the line profile of light scattered in strawberries.* 1997. 62 f. Dissertation (Master in Science) - Faculty of Technology at Lund University, La Plata, 1997.
- BREVIK SC, LUSSI A, RAKHMATULLINA. *A new optica detection method to assess the erosion inhibition by in vitro salivary pellicle layer.* Journal of Dentistry. 41: 428-435; 2013.
- BRIERS JD, WEBSTER S. *Laser speckle contrast analysis (LASCA): a non-scanning, full-field technique for monitoring capillary blood flow.* J. Biom. Opt. v.1, n.2, P.174-179; 1996.
- CHUNG S, FRIED D, STANINEE M, DARLING CL. *Multispectral near-IR reflectance and transillumination imaging of teeth.* Biomed Opt Exp. Sep; 2(10); 2011.
- DEANA AM, JESUS SHC, KOSHOJI NH, BUSSADORI SK, OLIVEIRA MT. *Detection of early carious lesions using contrast enhancement with coherent light scattering (speckle imaging).* Laser Physics. 23, p.075607, 2013.
- ECCLES JD. *Dental erosion of nonindustrial origin. A clinical survey and classification.* Journal Prosthet Dent. 42:649-653; 1979.

- FREITAS AZ. *Caracterização de Tecidos Biológicos através de Tomografia por Coerência Óptica*. Tese (Doutorado) Ciências na Área de Tecnologia Nuclear-Materiais. São Paulo,SP. 2007.
- GANSS C, LUSI A. Diagnosis of Erosive Tooth Wear. In: Lussi A, Dental Erosion: From diagnosis to therapy. Monogr Oral Sci. Basel, Karger. 20(4):32–43; 2006
- GONZALEZ RC, WOODS RE. *Processamento digital de imagens*. Pearson. São Paulo. 2008.
- GOODMAN JW. *Statistical Properties of Laser Speckle Patterns*. In: Dainty, J.C. (ed). *Laser speckle and related phenomena*. Berlin: Springer-Verlag. P. 9-75; 1984.
- GRIPPO JO, SIMRING M, SCHREINER S. *Attrition, abrasion, corrosion and abfraction revisited: a new perspective on tooth surface lesions*. J Am Dent Assoc. 135:1109-18; quiz 63-5; 2004..
- HALL A, GIRKIN JM. *A Review of Potencial New Diagnostic Modalities for Caries Lesions*. J Dent Res. 83(Spec Iss C):c89-C94); 2004.
- HOEPPNER MG, MASSAROLLO S, BREMM LL. *Considerações clínicas das lesões cervicais não cariosas*. Publ UEPG Ci. Biol. Saúde. Ponta Grossa. 13(3/4):81-86; 2007
- KARLSSON L. *Caries detection methods based on changes in optical properties between healthy and carious tissue*. Int J Dent. 270729; 2010.
- LUSI A, JAEGGI T. *Erosion-diagnosis and risk factors*. Clin Oral Investi. 12(suppl 1); S5-13 Review; 2008.
- LUSI A, JAEGGI T, ZERO D. *The role of diet in the aetiology of dental erosion*. Caries Res. 38:34-44; 2004.
- MORAES MCD. *Análise in vitro da progressão de lesões de erosão em dentina após irradiação com laser de Nd:YAG e flúor através de Tomografia por Coerência Óptica (OCT)*. Dissertação. Mestrado Profissionalizante Laser em Odontologia, USP – IPEN 2012.
- NANCI A. *TenCate – Histologia Oral*. Ed Elsevier. 7 ed. 432p, 2008
- PEDRINI H, SCHWARTZ WR. *Análise de Imagens Digitais: Princípios, Algoritmos e Aplicações*. Thomson Learning. São Paulo. 2008.
- PRETTY IA. *Caries detection and diagnosis: novel Technologies*. Journal of Dentistry. 34:727-739; 2006.

RABAL HJ, BRAGA JUNIOR RA, TRIVI M, RABELO GF. *Dynamic laser Speckle and applications*. New York: CRC. v. 1, 282p; 2008.

RODRIGUES JA. *Novas tecnologias para detecção de lesões de cárie oclusal*. Dissertação (Mestrado) faculdade de Odontologia da Universidade Paulista. Araraquara. SP. 2005.

SANTOS MPA dos, GONÇALVES L, SILVA AN da, SENNA MAA de. *Erosão no esmalte dental causada por refrigerantes: um estudo in vitro*. ISSN 1413-2966, n 35; 2011.

SOARES GG, SOUZA PR, PURGER FPCP, VASCONCELLOS AB de, RIBEIRO AA. *Methods of caries detection*. Ver. Bras. Odontol. V69, n1,p84-9, 2012.

SCHLUTER N, HARA A, SHELLIS RP, GANSS C. *Methods for the measurement and characterization of erosion in enamel and dentine*. Caries Res. 45(Suppl 1):13-23; 2011.

SHELLIS RP, GANS C, REN Y, ZERO DT, LUSSI A. *Methodology and models in erosion research: discussion and conclusions*. Caries Res. 45(1) 69-77; 2011.

SILVA RE. *Estudo das propriedades do biospeckle e suas aplicações*. Dissertação. Instituto de Física da Universidade de São Paulo. 2007.

SOBRAL MAP, LUZ MAAC, GAMA-TEIXEIRA A, GARONNE-NETO N. *Influência da dieta líquida ácida no desenvolvimento de erosão dental*. Pesq Odont Bras. 14(4):406-410; 2000.

TIPLER PA, MOSCA G. *Física para Engenheiros e Cientistas – Volume 2*. 6 ed. LTC, 2012.

WILDER-SMITH C, WILDER-SMITH P, KAWAKAMI-WONG H, VORONETS J, OSANN K, LUSSI A. *Quantification of dental erosions in patientis with GERD using Optical Coherence Tomography before and after double-blind, randomized treatment withesomeprazol or placebo*. The American Journal of Gastroenterology. 104:2788-2795; 2009.

YOUNG A, TENUTA LMA. *Initial Erosion Models*. Caries Research. 45(suppl 1):33-42; 2011.

ZERO DT, LUSSI A. *Erosion- chemical and biological factors of importance to the dental practitioner*. Int Dent J. 55(4):285-290; 2005

ZERO DT, LUSSI A. Behavioral Factors. In: Lussi A, *Dental Erosion: From diagnosis to therapy*. Monogr Oral Sci. Basel, Karger. 20(7):100-105; 2006.

APÊNDICE A: Certificado de Apresentação do Trabalho no CBEB



XXIV Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica
 XXIV Brazilian Congress on Biomedical Engineering

A Engenharia Biomédica como Propulsora de Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Saúde

13 a 17 de outubro de 2014 — Center Convention, Uberlândia, MG, Brasil
www.cbeb.org.br



CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho

DETECÇÃO DE EROÇÃO DENTAL UTILIZANDO ANÁLISE DO ESPALHAMENTO DE LUZ COERENTE – SPECKLE

Nelson Koshiji, Alessandro Melo Deana, Sandra Kalil Bussadori, Carolina Carvalho Bortoletto, Marcelo Tavares Oliveira and Renato Araujo Prates

foi apresentado no XXIV Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica, realizado na cidade de Uberlândia, Minas Gerais, de 13 a 17 de outubro de 2014.



Prof. Alcimar Barbosa Soares
 Presidente do Comitê Organizador do CBEB 2014
 Universidade Federal de Uberlândia



Prof. Sérgio Santos Mühlen
 Presidente da Sociedade Brasileira de Engenharia Biomédica



Prof. Adriano de Oliveira Andrade
 Vice-Presidente e Diretor Científico do Comitê Organizador do CBEB 2014
 Universidade Federal de Uberlândia



APÊNDICE B: Carta de Aceite do Trabalho no SPIE

SPIE Paper Number 9306-12 Acceptance and Manuscript Information

Gerstl, Annie <annieg@spie.org> Tue, Oct 7, 2014 at 8:31 PM

To: "Deana, Alessandro M., UNINOVE" <amdeana@gmail.com>

Dear Alessandro Deana,

Congratulations! The chairs of the upcoming "Lasers in Dentistry XXI" conference have accepted your paper, "Laser *speckle* imaging for detection and quantification of erosion lesions," for Oral presentation to be presented 8 February 2015.

Symposium: SPIE BiOS

Symposium Dates: 7 - 12 February 2015

Symposium Location: San Francisco, California United States

Please save this message for future reference as it provides important details for this event.

PAPER TITLE: Laser *speckle* imaging for detection and quantification of erosion lesions

PAPER NUMBER: 9306-12

PRESENTATION DATE: 8 February 2015

PRESENTATION TYPE: Oral (determined by Conference Chairs)

Oral Presentation Guidelines: <http://spie.org/x27475.xml>

Poster Presentation Guidelines: <http://spie.org/x27476.xml>

PRESENTATION DURATION: 20 minutes

For oral presentations, this time includes questions and answers

For poster presentations, this time is the duration of the poster session (you are expected to stand by your poster during the poster session)

PREPARE YOUR PRESENTATION AND PROCEEDINGS MANUSCRIPT:
<http://spie.org/x27472.xml>

VIEW THE CURRENT PROGRAM: (program should be posted no later than Wednesday 8 Oct)

The online program contains the most up-to-date information, including the conference program and additional conference-related activities. The program is subject to change at any time before or during the conference.

A PDF of the advance program will be posted online. The PDF will NOT be updated with changes or late additions, but the final printed program will be updated.

If you are presenting more than one paper, please check the program online to see if the sessions overlap.

If your presentations are at risk of overlapping, please notify me immediately so that we can adjust the program (Email: annieg@spie.org)

COMMUNICATE CHANGES by 1 December 2014

If you have changes to your title, abstract, or list of authors for the conference program, please send changes directly to me, annieg@spie.org by 1 December 2014.

Changes submitted with your manuscript will NOT automatically be reflected in the conference program.

If you are unable to attend and make your presentation, please look for an alternate speaker before canceling.

Cancellation dates and reasons are noted in your permanent record.

Last-minute cancellations and no-show authors may risk not being accepted to present at future SPIE events.

If you or a colleague are unable to make your presentation, please notify me no later than 1 December 2014 so we can remove the presentation from the final program.

SUBMIT YOUR MANUSCRIPT: DUE 12 January 2015

All authors (oral, poster, keynote, and invited) are expected to submit a manuscript containing at least 4 pages. Your work is extremely important and valuable to your fellow researchers, so we look forward to including it in this year's publications.

The manuscript submission site at <http://SPIE.org/myaccount> will open 5 weeks prior to 12 January 2015.

The Proceedings volume for this conference will be published shortly after the meeting. Manuscripts will be available on the SPIE Digital Library within 2-4 weeks of the meeting, and published in the printed 8/10/2014 Gmail - SPIE Paper Number 9306-12 Acceptance and Manuscript Information

<https://mail.google.com/mail/u/0/?ui=2&ik=2b253a6d9b&view=pt&search=inbox&th=148ecf46a449bc94&siml=148ecf46a449bc94> 2/2

Proceedings volume within 4-6 weeks of the meeting.

Your presentation must be made as scheduled in order to have your manuscript published in the conference Proceedings.

REQUEST AN INVITATION LETTER FOR VISA APPLICATION: <http://spie.org/USvisa-info>

Only authors listed on an accepted paper may request invitation letters.

Because of the number of visa applications and the need for thorough security reviews, the visa application process can take several months.

Apply for your visa as early as possible (at least 3 to 4 months before the visa is needed).

Invitation letters are processed and sent based on the order the requests are received, and the date of the meeting.

Please allow a few weeks to process invitation letter requests.

Once your invitation letter is ready, you will receive an email with the PDF copy of your letter to review.

Please carefully check your letter to verify that it is accurate, and send any needed changes to invitationletters@spie.org

Once we receive your confirmation of accuracy, the original invitation letter will be mailed to you via first class post.

BOOK YOUR HOTEL: <http://spie.org/x24984.xml>

All authors (including invited and keynote) are expected to obtain funding for their registration fees, travel, and accommodations, independent of SPIE, through their sponsoring organizations.

REGISTER FOR THE CONFERENCE between 17 October and 23 January 2015:
<http://spie.org/pw>

All authors attending the conference must register (including invited and keynote speakers).

Author rates are discounted from attendee prices.

Current SPIE Members receive an additional discount.

Full-time student authors should register as students.

Rates increase by US\$150 after 23 January 2015.

PRESENT A BETTER PAPER:

Take one of these online courses from SPIE. Find out more about:

Effective Technical Presentations at <http://spie.org/WS897>

Effective Scientific Papers at <http://spie.org/WS908>

These courses are free for Members and \$150 for non-members.

SPIE Contact Information:

Please include your SPIE Paper Number in the subject line of all Email correspondence.

For questions about your presentation, or the meeting, contact Annie Gerstl at annieg@spie.org

For questions about your manuscript, contact Joel Shields at joels@spie.org

This year's event includes an outstanding selection of presenters and we look forward to your participation!

Annie Gerstl

Conference Program Coordinator

Conference Programs & Proceedings

SPIE

Tel: +1 360 685 5519

Fax: +1 360 647 1445

annieg@spie.org

[SPIE.org](http://spie.org)

SPIE is an international society advancing an interdisciplinary approach to the science and application of light.

ANEXO A: Código-fontes dos softwares desenvolvidos

Os códigos fonte de minha autoria, desenvolvidos ao longo dessa dissertação, são listados aqui: Todos foram criados no Python versão: 2.7.6.

```
##### Bibliotecas #####

import cv2
import numpy as np

##### Carregar imagem #####

img = cv2.imread('c:amostra.jpg')

##### Atribuir o valor da linha e coluna da matriz imagem #####

x, y = img.shape[:2]

##### Ordem da matriz #####

ordem = 4

lin = x / ordem
col = y / ordem

SOMALASCA = 0

for i in range(lin):
    for j in range(col):
        celula = img[i*ordem:i*ordem+ordem,j*ordem:j*ordem+ordem,2]
        media = celula.mean()
        w = (celula - media) ** 2
        dp = (w.sum() / (ordem*ordem - 1))**0.5
        SOMALASCA = SOMALASCA + (dp/media)

MEDIALASCA = SOMALASCA/(lin*col)

print MEDIALASCA
```

Código A1: Código-fonte que calcula a média do mapa LASCA de ordem 4 x 4 de uma determinada imagem.

```
##### Bibliotecas #####

import cv2
import numpy as np
import matplotlib.pyplot as plt

##### Carregar imagem #####

img = cv2.imread('c:amostra.jpg')

##### Atribuir o valor da linha e coluna da matriz imagem #####

x, y = img.shape[:2]

##### Ordem da matriz #####

ordem = 4

lin = x / ordem
col = y / ordem

MAPALASCA = np.zeros((lin,col))

for i in range(lin):
    for j in range(col):
        celula = img[i*ordem:i*ordem+ordem,j*ordem:j*ordem+ordem,2]
        media = celula.mean()
        w = (celula - media) ** 2
        dp = (w.sum() / (ordem*ordem - 1))**0.5
        MAPALASCA[i][j] = (dp/media)

##### Exibir o mapa LASCA

plt.imshow(MAPALASCA)
plt.axis('off')
plt.show()
```

Código A2: Código-fonte que cria o mapa LASCA de ordem 4 x 4 de uma determinada imagem.