



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE PRÓTESE E CIRURGIA BUCO-FACIAL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

GISELE CRUZ CAMBOIM

**UTILIZAÇÃO DE NANOESTRUTURAS DE OURO COMO  
AGENTES DE COMPENSAÇÃO ÓPTICA PARA ANÁLISE DE  
CÁRIE INCIPIENTE NA TOMOGRAFIA POR COERÊNCIA  
ÓPTICA**

Recife

2019

GISELE CRUZ CAMBOIM

**UTILIZAÇÃO DE NANOESTRUTURAS DE OURO COMO AGENTES DE  
COMPENSAÇÃO ÓPTICA PARA ANÁLISE DE CÁRIE INCIPIENTE NA  
TOMOGRAFIA POR COERÊNCIA ÓPTICA**

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Odontologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Odontologia.

**Área de concentração:** Clínica Integrada.

**Orientador:** Prof. Dr. Anderson Stevens Leonidas Gomes

Recife

2019

Catálogo na fonte:  
Bibliotecário: Aécio Oberdam, CRB4:1895

C176u      Camboim, Gisele Cruz.  
              Utilização de nanoestruturas de ouro como agentes de compensação óptica  
              para análise de cárie incipiente na tomografia por coerência óptica / Gisele Cruz  
              Camboim. – Recife: o autor, 2019.  
              57f. ; 30 cm.

              Orientador: Anderson Stevens Leônidas Gomes.  
              Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de  
              Ciências da Saúde. Programa de Pós-graduação em Odontologia.  
              Inclui referências, apêndices e anexos.

              1. Tomografia de coerência óptica. 2. Nanoestruturas. 3. Diagnóstico por  
              imagem. 4. Cárie dental. I. Gomes, Anderson Stevens Leônidas (orientador). II.  
              Título.

617.6 CDD (23.ed.)

UFPE (CCS 2019 - 057)

**GISELE CRUZ CAMBOIM**

**UTILIZAÇÃO DE NANOESTRUTURAS DE OURO COMO AGENTES DE  
COMPENSAÇÃO ÓPTICA PARA ANÁLISE DE CÁRIE INCIPIENTE NA  
TOMOGRAFIA POR COERÊNCIA ÓPTICA**

Aprovado em 26 de fevereiro de 2019

**Orientador: Prof. Dr. ANDERSON STEVENS LEONIDAS GOMES**

**Banca Examinadora:**

**1°**

---

**Prof. Dr. Emery Lins  
(examinador interno)  
Universidade Federal de Pernambuco**

**2°**

---

**Profa. Dra. Maria Luiza dos Anjos Pontual  
(examinador interno)  
Universidade Federal de Pernambuco**

**3°**

---

**Profa. Dra. Aronita Rosenblatt  
(examinador externo)  
Universidade de Pernambuco**

*Dedico este trabalho aos meus pais Natalício e Denise e à minha querida avó Iolanda (in memoriam) que deixou uma enorme saudade e legado de amor em minha vida.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente à Deus!

À toda minha família em especial aos meus pais que fizeram tudo por mim, pensando sempre na minha educação e me dando muito amor e os meus irmãos Taciana e Felipe pela cumplicidade e apoio.

Ao meu noivo Romero, meu companheiro e maior incentivador.

Ao meu orientador, Anderson, por todos os ensinamentos que me passou ao longo desses dois anos, com muita atenção e carinho.

À equipe Labfoton, pessoas especiais que estão sempre dispostas a ajudar uns aos outros. Em especial agradeço a Evair, Dani e Vanda por toda a ajuda durante a realização desse trabalho e a Michele sempre esteve comigo incentivando.

À todas as minhas amigas que sempre pelo incentivo e momentos de alegria. Em especial, Andrea por todo o apoio e compreensão durante esse período. E à Natália e Katharina que sempre me ajudaram mesmo à distância.

À Diná pelo apoio e disposição para ajudar.

À minha turma da pós-graduação que dividiu comigo momentos de alegria e conhecimento e tornaram mais leve essa jornada.

Aos funcionários do programa de pós-graduação, Ozi, Tamires, Tânia e Isaac pela colaboração e ajuda.

Aos professores da pós-graduação e do estágio em docência da clínica integral pelos ensinamentos.

À Marcello Magri pela ajuda nas análises das imagens.

À Renato Silva pelo fornecimento das nanopartículas.

À FACEPE pela bolsa de estudo que foi uma grande ajuda durante esse processo.

À todos, agradeço imensamente pela contribuição! Muito Obrigada!

## RESUMO

As lesões de cárie incipiente em fossas e fissuras de dentes posteriores são de difícil diagnóstico, sendo muitas vezes subestimadas e somente detectadas em estágios avançados. A tomografia por coerência óptica (OCT) tem se mostrado uma ferramenta promissora para diagnóstico e monitoramento dessas lesões, porém apresenta algumas limitações, como o grande espalhamento da luz incidente nos tecidos reduzindo a penetração da luz e o contraste no mesmo. Para superar essa limitação, os agentes de compensação ótica (ACO), visam permitir um melhor contraste e visualização de estruturas biológicas. As nanopartículas de ouro têm sido destaque na bioimagem devido as suas propriedades físicas e químicas além de biocompatibilidade. O objetivo deste estudo foi avaliar nanopartículas esféricas de ouro (AuNP), nanobastões de ouro (AuNR) e glicerol como ACOs em imagens de tomografia de coerência óptica (OCT) de molares com lesões de cárie incipientes para melhorar o diagnóstico desta condição. Dez dentes molares extraídos com lesões de cárie incipientes foram visualizados com tomografia de coerência óptica (OCT). O grupo (G1) consistiu de uma amostra sem adição de ACO, enquanto outros grupos tiveram a adição dos seguintes componentes: glicerol (G2), AuNP (G3), AuNP diluído em glicerol (G4), AuNR (G5) e AuNR diluído em glicerol (G6). Os grupos foram investigados quanto ao realce das lesões com os ACO pelas alterações do coeficiente de extinção da luz com o OCT. Um aumento na atenuação de luz ocorreu em todos os grupos testados quando comparado ao G1 (0,184). Os grupos G3 e G6 apresentaram maior coeficiente de atenuação (0,224), ( $p = 0,341$ ). A diferença do coeficiente de atenuação entre a região afetada e a não afetada permitiu a localização das áreas desmineralizadas. Foi demonstrado que nanopartículas de ouro (AuNP e AuNR) demonstraram bons resultados como ACOs de lesões incipientes de cárie. A aplicabilidade desses resultados é bem adequada para o diagnóstico precoce de lesões de cárie em odontologia.

Palavras-chave: Tomografia de coerência óptica. Nanoestruturas. diagnóstico por imagem. cárie dental.

## **ABSTRACT**

Incipient caries lesions in posterior tooth fissures are difficult to diagnose and are often underestimated and only detected in advanced stages. Optical coherence tomography (OCT) has been shown to be a promising tool for the diagnosis and monitoring of these lesions. However, it presents some limitations, such as the large scattering of incident light on the analyzed surface, which reduces the penetration of light into the tissue, and decreasing the contrast between different structures. In order to overcome this limitation, the optic clearing agents (OCA), aim to allow a better contrast and visualization of biological structures. Gold nanoparticles have been prominent in bioimaging because of their physical and chemical properties as well as biocompatibility. The aim of this study was to evaluate gold spherical nanoparticles (AuNP), gold nanorods (AuNR) and glycerol as OCAs in OCT images of molars with incipient caries lesions to enhance the diagnostic of this condition in dental practice. Ten extracted molar teeth with incipient caries lesions were imaged with OCT. Group (G1) was a control sample, whereas the other groups had the addition of the following components: glycerol (G2), AuNP (G3), AuNP diluted on glycerol (G4), AuNR (G5) and AuNR diluted on glycerol (G6). The groups were investigated for enhancement as optical clearing agents by the alterations of the light extinction coefficient with OCT. An increase in the light attenuation occurred in all tested groups when compared to G1 (0.184). Groups G3 and G6 demonstrated a higher attenuation coefficient (0,224), ( $p=0,341$ ). The difference of the attenuation coefficient between the affected and non-affected region permitted the location of demineralized areas. It was demonstrated that gold nanoparticles (AuNP and AuNR) are effective as OCAs of incipient caries lesions. The applicability of these results is well suited for caries lesions early diagnostic in dentistry.

Keywords: Tomography optical coherence. Nanostructures. diagnostic imaging. dental caries.

## SUMÁRIO

|            |                                                                                                                                                         |           |
|------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1</b>   | <b>INTRODUÇÃO.....</b>                                                                                                                                  | <b>9</b>  |
| <b>2</b>   | <b>METODOLOGIA.....</b>                                                                                                                                 | <b>12</b> |
| <b>2.1</b> | <b>Caracterização do Estudo.....</b>                                                                                                                    | <b>12</b> |
| <b>2.2</b> | <b>Critérios de inclusão.....</b>                                                                                                                       | <b>12</b> |
| <b>2.3</b> | <b>Critérios de exclusão.....</b>                                                                                                                       | <b>12</b> |
| <b>2.4</b> | <b>Preparo das amostras.....</b>                                                                                                                        | <b>12</b> |
| <b>2.5</b> | <b>Nanopartículas e Nanobastões de Ouro.....</b>                                                                                                        | <b>13</b> |
| <b>2.6</b> | <b>Análise das Amostras .....</b>                                                                                                                       | <b>13</b> |
| 2.6.1      | Tomografia por Coerência Óptica.....                                                                                                                    | 13        |
| 2.6.2      | Mensuração do Coeficiente de Atenuação.....                                                                                                             | 15        |
| 2.6.3      | Microscopia Óptica de transmissão por polarização cruzada.....                                                                                          | 17        |
| <b>2.7</b> | <b>Análise Estatística.....</b>                                                                                                                         | <b>17</b> |
| <b>3</b>   | <b>RESULTADOS.....</b>                                                                                                                                  | <b>18</b> |
| <b>4</b>   | <b>CONCLUSÃO.....</b>                                                                                                                                   | <b>19</b> |
|            | <b>REFERÊNCIAS.....</b>                                                                                                                                 | <b>20</b> |
|            | <b>APÊNDICE A - Artigo - Gold nanostructures as optical clearing agents for incipient occlusal caries analyses by Optical Coherence Tomography.....</b> | <b>25</b> |
|            | <b>ANEXO A – PARECER CEP.....</b>                                                                                                                       | <b>41</b> |
|            | <b>ANEXO B – NORMAS DA REVISTA.....</b>                                                                                                                 | <b>48</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

A topografia complexa da superfície oclusal de dentes posteriores representa um desafio na rotina clínica. Dentro desse contexto, as cáries incipientes são difíceis de detectar em estágios iniciais, sendo frequentemente subestimadas em seu diagnóstico (ITO *et al.*, 2016). São caracterizadas por apresentar a superfície do esmalte sem cavitação, com a camada superficial rica em minerais com menor suscetibilidade à dissolução, diferente da área subsuperficial onde a dissolução ocorre e tem menos conteúdo mineral (ARENDS; CHRISTOFFERSEN, 1985). Como consequência, é mais comum a identificação de tais lesões em um estágio já avançado, o que implica na necessidade de intervenção restauradora e assim, uma maior perda de estrutura (FRIED *et al.*, 2002).

Para detecção de cáries incipientes os recursos comumente empregados incluem o exame clínico por inspeção visual e exames radiográficos (MELO *et al.*, 2016). Entretanto em virtude das limitações inerentes do exame radiográfico, novas técnicas de diagnóstico tem sido desenvolvidas com o intuito de proporcionar a detecção precoce da doença de maneira não invasiva, dentre as quais a tomografia por coerência óptica (OCT) (OTIS *et al.*, 2000)(COLSTON JR. *et al.*, 2000).

A tomografia por coerência óptica é uma técnica não invasiva e que utiliza radiação não ionizante de alta resolução espacial baseada na interferometria de baixa coerência, que utiliza uma fonte de luz que produz imagens transversais e tridimensionais dos tecidos biológicos em profundidades de até 2 mm com uma resolução espacial de 5-15  $\mu\text{m}$  no comprimento de onda da faixa do infravermelho próximo (NIR) (BRAZ *et al.*, 2012; ITO *et al.*, 2016; ZAGAYNOVA *et al.*, 2008)

Na odontologia, a técnica de OCT tem diversas aplicabilidades, incluindo a detecção precoce de cárie (KANG; DARLING; FRIED, 2014; POPESCU DP, SOWA MG, HEWKO MD, 2009). O método é baseado em medidas quantitativas da intensidade da luz refletida e retroespalhada sobre o material de maneira não destrutiva de acordo com as alterações morfológicas nas amostras (FRIED *et al.*, 2002). Uma das maneiras de se quantificar as alterações óticas é medindo o coeficiente de atenuação, que tem mostrado resultados promissores na discriminação entre estados saudáveis e

patológicos de vários tecidos, incluindo tecidos epiteliais, artérias, pele e linfonodos, assim como em relação à desmineralização e remineralização do esmalte (MANDURAH *et al.*, 2013). Entretanto, o alto espalhamento em tecidos biológicos turvos limita a penetração da luz, e tanto a resolução da imagem quanto o contraste diminuem à medida que a luz se propaga mais profundamente no tecido (ZHU *et al.*, 2013)

No intuito de superar essa limitação, os agentes de compensação ótica surgem com o objetivo de melhorar as propriedades de espalhamento da amostra e consequentemente, a qualidade da imagem do OCT. (BRAZ *et al.*, 2012). Tradicionalmente, a água e fluidos como o glicerol, são utilizados com o propósito de fornecer um ganho significativo com relação a visibilidade de estruturas como a junção dentina-esmalte e lesões de caries, visto que permitem uma penetração mais profunda da luz (KANG; DARLING; FRIED, 2014; YANG; CURTIS; FRIED, 2019). Nesse sentido, nanopartículas de metal nobre têm sido aplicadas com o objetivo de aprimorar as imagens obtidas pelo OCT, dentre as quais, as nanopartículas de ouro, que tem se mostrado eficientes agentes de contraste para imagens ópticas de tecidos biológicos. (BRAZ *et al.*, 2012; OLDENBURG *et al.*, 2009; TUCKER-SCHWARTZ *et al.*, 2012; ZAGAYNOVA *et al.*, 2008)

As nanopartículas de ouro têm sido amplamente utilizadas na área de bioimagem, pois proporcionam um melhor retroespalhamento da luz devido à sua forte absorção e dispersão derivada de uma intensa ressonância plasmônica de superfície localizadas na região da banda espectral do visível-infravermelho próximo (NIR). Além disso, apresentam uma baixa toxicidade, excelente estabilidade coloidal e facilidade de sintetização (JAIN *et al.*, 2006). O trabalho de Zagaynova *et al.*, 2008 confirmou a possibilidade de contrastar limites de camada e estruturas da pele pela aplicação de nanopartículas de ouro, permitindo a visualização das interfaces entre camadas da pele, além de contraste de estruturas como um folículo piloso.

As características das nanopartículas, como tamanho, forma e propriedades dielétricas vão influenciar as propriedades ópticas, permitindo ser ajustadas. Uma de suas características físicas mais relevantes é ressonância de plasmon de superfície (SPR). A banda plasmônica de superfície surge da oscilação coletiva dos elétrons de

condução devido à excitação ressonante pelos fótons (ZHOU *et al.*, 2009). As AuNPs esféricas geralmente mostram um pico de absorção relativo de 500 a 550 nm (YEH; CRERAN; ROTELLO, 2012). Os nanobastões (nanorods) de ouro possuem, além da banda plasmônica de superfície ao redor 528 nm (plasmons transversais), também visto em nanoesferas de ouro, uma banda em comprimentos de onda mais longos, em torno de 800nm, devido à oscilação dos elétrons no plasma do longo eixo (plasmons longitudinais). Isso permite que o máximo de plasmons dos nanobastões se encontre na região desejável do NIR, tornando potencialmente úteis para aplicações *in vivo*. (JAIN *et al.*, 2006). A ressonância plasmônica aumenta o campo elétrico na interface metal-dielétrico (ouro-dente nesta dissertação) o que induz aumento no contraste da imagem.

Diante do potencial de nanopartículas de ouro como agentes de contraste, esse trabalho teve como objetivo analisar lesões de cárie incipiente em dentes posteriores utilizando nanopartículas de ouro esféricas e nanobastões como agentes de compensação ótica para imagens em OCT. O trabalho ainda comparou o uso de água e glicerol como diluentes para os nanomateriais utilizados como agentes de compensação óptica, obtendo os coeficientes de atenuação do decaimento exponencial do sinal do A-Scan em imagens de OCT identificando o comportamento do mesmo em áreas hípidas e cariadas.

## **2 METODOLOGIA**

### **2.1 Caracterização do Estudo**

Nesta dissertação realizamos um estudo laboratorial experimental *ex vivo* utilizando dentes humanos para avaliar cáries incipientes através da Tomografia por Coerência Óptica com as nanopartículas e nanobastões de ouro como agente de compensação óptica.

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Fotônica e Biofotônica do Departamento de Física da Universidade Federal de Pernambuco, que disponibilizou o aparelho de Tomografia por Coerência Óptica, o Microscópio Óptico com Luz Polarizada, assim como a confecção das nanopartículas de ouro.

### **2.2 Critérios de Inclusão**

Foram utilizados dentes molares permanentes com presença de manchas brancas e amarronzadas nas fossas e fissuras que se enquadram no critério 1 e 2 do Internacional Caries Detection and Assessment System (ICDAS). Sendo o critério 1 caracterizado por mancha branca ou marrom visível em esmalte seco e o critério 2 descrito como primeiras mudanças visíveis em esmalte úmido.

### **2.3 Critérios de Exclusão**

Foram excluídos os elementos que apresentavam cavidades de cárie ao exame visual ou restaurações.

### **2.4 Preparo das amostras**

Molares permanentes com coroa íntegra (n=10) extraídos nos últimos 6 meses foram obtidos através do Banco de Dentes do Centro Universitário Tabosa de Almeida (ASCES-UNITA). Todas amostras foram descontaminadas com Cloramina T 0,5% e higienizados com escova de Robinson acoplada ao contra ângulo (GNATUS, São Paulo, SP, BR) e detergente neutro, sendo armazenadas em soro fisiológico para hidratação.

Utilizando uma matriz de metal previamente confeccionada e padronizada, os dentes tiveram suas raízes incluída em blocos de resina acrílica transparente (Jet Clássico, São Paulo, SP, BR) sempre deixando livre a junção amelocementária. Isso permitiu o posicionamento do espécime em uma base de PVC específica para o

escaneamento no OCT permitindo o reposicionamento das amostras a fim de comparar um mesmo elemento sob distintos ACOs.

## **2.5 Nanopartículas e Nanobastões de Ouro**

As nanopartículas esféricas de ouro (AuNP) foram produzidas e caracterizadas no Departamento de Física e Química da Universidade Federal de Pernambuco pelo Dr. Renato Silva através do tratamento de tetracloroaurato de hidrogênio ( $\text{HAuCl}_4$ ) com polivinilpirrolidona (PVP - $M_w \cong 55.000$ ) em água fervente, onde a PVP atua como agente estabilizante. As nanopartículas de ouro coloidal resultantes são esféricas e têm um tamanho de  $2,0 \pm 1,0$  nm disperso em solução aquosa, e o pico de ressonância plasmônica é em 550 nm (BRITO-SILVA *et al.*, 2013). Os nanobastões de ouro (AuNR) foram adquiridos da Nanopartz<sup>TM</sup>, com diâmetros de 50 nm e comprimento de 160 nm também dispersos em solução aquosa, com dois picos de ressonância plasmônica em 520 nm e 825 nm.

Com o objetivo de testar as propriedades do glicerol juntamente com as AuNP e AuNR as soluções aquosas de nanopartículas e nanobastões foram diluídas em glicerol. Uma balança de precisão foi utilizada para a diluição na proporção de 50% do peso da solução contendo a AuNP com 50% de glicerol, a mesma proporção será utilizada para as AuNR.

## **2.6 Análise das Amostras**

### **2.6.1 Tomografia por Coerência Óptica**

O sistema de OCT selecionado para este estudo foi um modelo comercial, o Callisto (Thorlabs Inc, Nova Jersey, EUA), operando no domínio espectral (SD-OCT). A fonte de luz utilizada é um diodo superluminescente com comprimento de onda central de 930 nm e largura de banda de 100 nm e potência máxima de saída de 3 mW. Este sistema possui um espectrômetro de alta velocidade de captura de dados, permitindo a geração de imagens transversais bi e tridimensionais, com resolução axial de  $5,3/7 \mu\text{m}$  (ar/água) e resolução lateral de  $8 \mu\text{m}$  e  $1,7 \text{ mm}$  de profundidade de penetração da luz no interior da amostra. As imagens foram capturadas na forma de matriz com 2000 colunas x 512 linhas e 400 colunas x 400 linhas, respectivamente. A frequência de

varredura axial deste sistema é 1,2 kHz, o que permite a captura de duas imagens por segundo com 105 dB de sensibilidade.

As amostras foram analisadas de forma padronizada, através do posicionamento em uma plataforma de PVC com uma marcação linear coincidindo com a marcação da plataforma da mesa do OCT (Figura 1). Essa calibração serviu para controle e confirmação do reposicionamento correto, para permitir que as diversas tomadas da mesma amostra fossem comparadas.

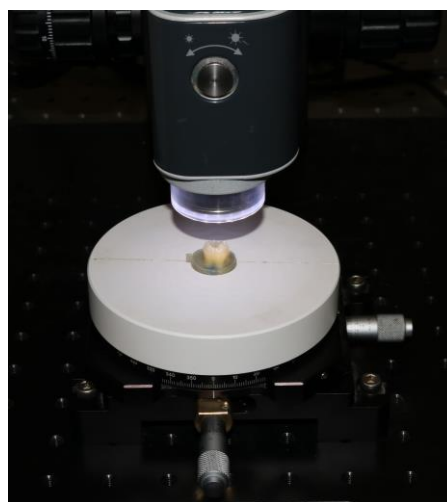


Fig.1 Base de PVC para posicionamento no OCT

Cada amostra foi analisada num total de 6 vezes. Inicialmente foi realizada a leitura do controle negativo (1) sem nenhum ACO, e em seguida foi feita a leitura com os 5 diferentes ACOs. O primeiro ACO foi o glicerol puro como controle positivo (2). Os outros ACOs foram: (3) nanopartículas esféricas de ouro (AuNP) dispersa em água ( $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ); (4) AuNP dispersas em água e diluída em 50% de peso de glicerol; (5) nanobastões (AuNR) disperso em água ( $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ); (6) (AuNR) disperso em água e diluído em 50% de peso de glicerol (Tabela 1).

Tabela 1: Distribuição dos grupos

| <b>GRUPO</b> | <b>AGENTE DE COMPENSAÇÃO</b> |
|--------------|------------------------------|
| G1           | Controle negativo            |
| G2           | Glicerol                     |
| G3           | AuNP + água                  |
| G4           | AuNP + água + glicerol       |
| G5           | AuNR + água                  |
| G6           | AuNR + água + glicerol       |

Após a aplicação do agente de compensação ótica, toda a superfície dental foi escaneada obtendo a captura das imagens da varredura do elemento a cada 250  $\mu\text{m}$  de deslocamento da plataforma. Terminada a varredura a amostra era removida da plataforma, lavada com água corrente e realizada a profilaxia com detergente neutro e escova de Robinson, seguido de banho na cuba ultrassônica com água deionizada. Em seguida a amostra era novamente colocada na base para a confirmação do posicionamento correto e da remoção completa do ACO, somente depois era iniciada uma nova varredura com um agente de compensação seguinte.

#### 2.6.2 Mensuração do coeficiente de atenuação

Após a aquisição, as imagens foram analisadas em software criado para mensuração do coeficiente de atenuação óptica (CAO) (Figura 2). CAO é um valor quantitativo que caracteriza o decaimento do sinal da luz do OCT quando a luz se propaga através do tecido analisado. Assim, através do CAO, é possível usar o sinal OCT para discriminar quantitativamente entre diferentes tipos de tecidos e seu estado de saúde.

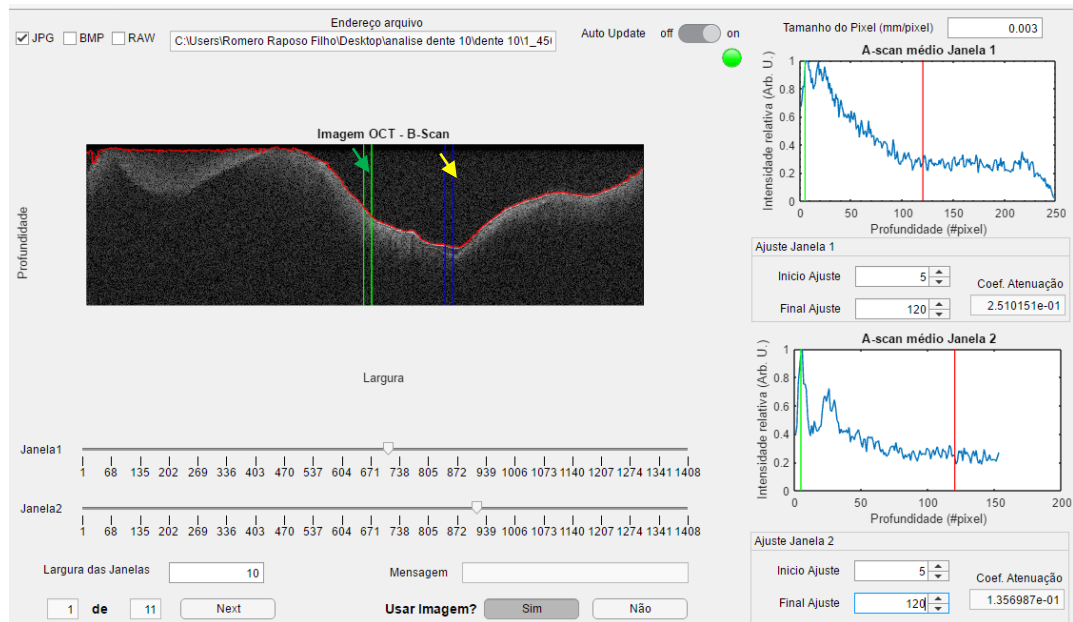


Fig. 2 Software para mensuração do coeficiente de atenuação, janela 1 (seta verde) selecionando uma área hígida e janela 2 (seta amarela) na região de fossa e fissura.

Para obter o coeficiente de atenuação as imagens obtidas eram importadas para um software para seu processamento. Em cada imagem, o operador seleciona a largura e a posição da janela de duas regiões de interesse (ROI). Para padronização, a largura da janela será mantida constante (10 A-scan) durante todas as análises. Como cada amostra biológica apresenta características morfológicas distintas, a posição das janelas era ajustada para cada imagem, sempre posicionando uma janela em uma região de tecido saudável e a outra em uma região de tecido anormal.

Usando modo B-scan, o software identifica a superfície do tecido (interface ar-tecido ou OCA-tecido) e usa-o como referência para realizar uma média do A-scan normalizado dentro de cada janela de ROI, iniciando a leitura a partir deste ponto. O A-scan foi normalizado pelo valor máximo para evitar valores errados devido à possível reflexão na primeira superfície.

A média A-scan de cada janela de ROI foi usada para ajustar um decaimento exponencial, baseado na lei de Beer-Lambert (MAIA *et al.*, 2016; POPESCU DP, SOWA MG, HEWKO MD, 2009), onde  $I(z)$  é a intensidade em função da profundidade  $z$  e  $\mu$  é

o coeficiente de atenuação óptica. O valor obtido foi registrado para posterior análise. Este procedimento foi repetido para cada imagem até que todas fossem analisadas.

$$I(z) = I_0 \exp(-\mu z)$$

### 2.6.3 Microscopia Óptica de transmissão por polarização cruzada

Para a confirmação das lesões da cárie incipiente em cicatrículas e fissuras foi realizada a Microscopia Óptica de transmissão por polarização cruzada como método comparativo a análise em OCT.

Para tal, os espécimes foram seccionados em fatias com aproximadamente 800  $\mu\text{m}$  de espessura com disco diamantado dupla face (Buehler Ltd., Lake Bluff, IL, EUA) acoplado a uma cortadeira de precisão (Isomet 1000 Speed Saw, Buehler Ltd., Lake Bluff, IL, EUA). Em seguida as fatias foram lixadas manualmente na sequência das lixas de carbono números 600, 800, 1000, 1200 e 2000 até obter 80  $\mu\text{m}$  de espessura. A planificação e padronização de espessura foi controlada com auxílio de um paquímetro digital.

Em seguida as fatias foram analisadas no microscópio óptico Olympus BX-31 (Olympus Optical Co. Ltd., Tokyo, Japan) para análise com luz transmitida e uso de polarizadores. O meio de imersão utilizado foi água e as imagens foram capturadas com uma câmera acoplada ao microscópio, com aumento de magnitude de 50x.

## 2.7 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o software GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, Inc.). Foram calculadas a média e o desvio-padrão de cada grupo. A distribuição normal foi determinada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Em todos os grupos, foi realizado o teste t de Student. Para verificar se há diferença entre os grupos, foi usado o teste "repeated measures analysis of variance RM-ANOVA". A significância estatística de todos os testes deve ser considerada como  $p < 0,05$ .

### **3 RESULTADOS**

Os resultados obtidos nesta dissertação estão descritos na forma de artigo anexo e parte da dissertação. Os resultados mostraram um aumento do coeficiente de atenuação na região da lesão cariada quando utilizada as nanopartículas de ouro esféricas ou em bastão como agente de compensação ótica. Além disso, ao utilizar as nanopartículas aumentou a diferença desse coeficiente entre a área hígida e cariada. Sendo assim, esses resultados são promissores para a melhora da visualização de cárie incipiente através do OCT.

#### **4 CONCLUSÃO**

Esse estudo concluiu que as nanopartículas de ouro no formato de esferas e bastões são promissoras para o monitoramento de lesões de cárie em esmalte baseada na atenuação do sinal de OCT. As aplicações in vivo e a segurança da técnica devem ser estudadas mais profundamente. No entanto, o método deve ser testado para uma maior variedade de lesões com várias formas, estruturas e profundidades nos estudos posteriores antes dos procedimentos clínicos.

As nanopartículas de ouro possuem grande potencial como ferramentas de diagnóstico na área da saúde. Têm sido utilizadas para a bioimagem, como sensores e para desenvolvimento da nanotecnologia. Seu papel na bioimagem é promissor devido as suas propriedades óticas que permitem que essas nanopartículas sejam utilizadas como agentes de compensação ótica. Dentro desse cenário, os nanobastões tem se destacado devido a suas propriedades como a capacidade de sintonizar as suas bandas de plasmons na região visível do espectro eletromagnético, essa entre outras características tornou as nanopartículas objeto de estudo para diversas aplicações biológicas.

## REFERÊNCIAS

- ARENDS, J.; CHRISTOFFERSEN, J. The Nature of Early Caries Lesions in Enamel Ne-  
No. n. L, p. 2–11, 1985.
- BRAZ, A. K. S. *et al.* In situ gold nanoparticles formation : contrast agent for dental  
optical coherence tomography for dental optical coherence tomography. *Journal of  
biomedical optics*, v. 17, n. 6, p. 1–5, 2012.
- BRITO-SILVA, A. M. *et al.* Improved synthesis of gold and silver nanoshells. *Langmuir :  
the ACS journal of surfaces and colloids*, v. 29, n. 13, p. 4366–4372, 2013. Disponível  
em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23472978>>.
- CARA, A. C. B. DE *et al.* Comparative analysis of optical coherence tomography signal  
and microhardness for demineralization evaluation of human tooth enamel. *Proc. of  
SPIE*, v. 8427, p. 1–10, 2012.
- CARNEIRO, V. S. M. *et al.* Silver nanoparticles as optical clearing agent enhancers to  
improve caries diagnostic by optical coherence tomography Vanda. *Proc. SPIE 10507*,  
v. 1050719, n. February, 2018.
- COLSTON JR., B. W. *et al.* Imaging of the oral cavity using optical coherence  
tomography. *Monogr Oral Sci*, v. 17, p. 32–55, 2000. Disponível em:  
<[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10949834](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10949834)>.
- FEJERSKOV, O. Changing Paradigms in Concepts on Dental Caries : Consequences  
for Oral Health Care. *Caries Research*, v. 38, p. 182–191, 2004.
- FERREIRA-NÓBILO, N. D. P.; ROSÁRIO, L. Cariology in Curriculum of Brazilian Dental  
Schools. v. 25, p. 265–270, 2014.

FRIED, D. *et al.* Imaging caries lesions and lesion progression with polarization sensitive optical coherence tomography. *Journal of Biomedical Optics*, v. 7, n. 4, p. 618, 2002.

Disponível em:

<<http://biomedicaloptics.spiedigitallibrary.org/article.aspx?doi=10.1117/1.1509752>>.

ITO, S. *et al.* Assessment of occlusal fissure depth and sealant penetration using optical coherence tomography. v. 35, n. 3, p. 432–439, 2016.

JAIN, P. K. *et al.* Calculated Absorption and Scattering Properties of Gold Nanoparticles of Different Size , Shape , and Composition : Applications in Biological Imaging and Biomedicine. *journal phys chem b*, v. 110, p. 7238–7248, 2006.

JONES, R. S.; FRIED, D. The effect of high index liquids on PS-OCT imaging of dental caries. *Lasers in Dentistry XI*, v. 5687, n. 2, p. 34–41, 2005.

KANG, H.; DARLING, C. L.; FRIED, D. Enhancing the detection of hidden occlusal caries lesions with OCT using high index liquids. *Proceedings of SPIE--the International Society for Optical Engineering*, v. 8929, p. 89290O, 2014.

KANG, H.; DARLING, C. L.; FRIED, D. Use of an optical clearing agent to enhance the visibility of subsurface structures and lesions from tooth occlusal surfaces lesions from tooth occlusal surfaces. *Journal of Biomedical Optics*, v. 21, n. 8, 2016.

LARIN, K. V. *et al.* Optical clearing for OCT image enhancement and in-depth monitoring of molecular diffusion. *IEEE Journal on Selected Topics in Quantum Electronics*, v. 18, n. 3, p. 1244–1259, 2012.

LIAO, H.; NEHL, C. L.; HAFNER, J. H. Biomedical applications of plasmon resonant metal nanoparticles. *Nanomedicine*, v. 1, n. 2, p. 201–208, 2006.

LUO, D. *et al.* Gold Nanorod Mediated Chlorhexidine Microparticle Formation and Near-

Infrared Light Induced Release. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*, v. 33, p. 7982–7993, 2017.

MAIA, A. M. A. *et al.* Evaluation of dental enamel caries assessment using Quantitative Light Induced Fluorescence and Optical Coherence Tomography. *Journal of Biophotonics*, v. 9, n. 6, p. 596–602, 2016.

MANDURAH, M. M. *et al.* Monitoring remineralization of enamel subsurface lesions by optical coherence tomography. *Journal of Biomedical Optics*, v. 18, n. 4, p. 046006, 2013. Disponível em:  
<<http://biomedicaloptics.spiedigitallibrary.org/article.aspx?doi=10.1117/1.JBO.18.4.046006>>.

MELO, M. *et al.* Caries diagnosis using light fluorescence devices in comparison with traditional visual and tactile evaluation: a prospective study in 152 patients. *Odontology*, v. 105, n. 3, p. 283–290, 2016.

MOON, K. *et al.* Near-infrared laser-mediated drug release and antibacterial activity of gold nanorod – sputtered titania nanotubes. *journal of tissue engineering*, v. 9, p. 1–9, 2018.

OLDENBURG, A. L. *et al.* Imaging gold nanorods in excised human breast carcinoma by spectroscopic optical coherence tomography †. *journal of materials chemistry*, v. 19, p. 6407–6411, 2009.

OTIS, L. L. *et al.* Optical coherence tomography: A new imaging technology for dentistry. *Journal of the American Dental Association*, v. 131, n. 4, p. 511–514, 2000. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.14219/jada.archive.2000.0210>>.

POPESCU DP, SOWA MG, HEWKO MD, C.-S. L. Assessment of early demineralization

in teeth using the signal attenuation in optical coherence tomography images. *J Biomed Opt.*, v. 13, n. 5, p. 1–17, 2009.

STONE, J.; JACKSON, S.; WRIGHT, D. Biological applications of gold nanorods. *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology*, v. 3, p. 100–109, 2011.

TUCHIN, V. V. Optical clearing of tissues and blood using. *JOURNAL OF PHYSICS D: APPLIED PHYSICS*, v. 38, p. 2497–2518, 2005.

TUCKER-SCHWARTZ, J. M. *et al.* In vivo photothermal optical coherence tomography of gold nanorod contrast agents. *biomedical optics express*, v. 3, n. 11, p. 2881–2895, 2012.

XIA, Q. *et al.* The effect of particle size on the genotoxicity of gold nanoparticles. *journal of biomedical materials research*, v. 00A, n. 00, p. 1–10, 2016.

YANG, V. B.; CURTIS, D. A.; FRIED, D. Use of Optical Clearing Agents for Imaging Root Surfaces With Optical Coherence Tomography. *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*, v. 25, n. 1, p. 1–7, 2019. Disponível em: <<https://ieeexplore.ieee.org/document/8378061/>>.

YEH, Y.-C.; CRERAN, B.; ROTELLO, V. M. Gold nanoparticles: preparation, properties, and applications in bionanotechnology. *Nanoscale*, v. 4, n. 6, p. 1871–1880, 2012. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=C1NR11188D>>.

ZAGAYNOVA, E. V. *et al.* Contrasting properties of gold nanoparticles for optical coherence tomography: Phantom, in vivo studies and Monte Carlo simulation. *Physics in Medicine and Biology*, v. 53, n. 18, p. 4995–5009, 2008.

ZHOU, J. *et al.* Functionalized gold nanoparticles: Synthesis, structure and colloid stability. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 331, n. 2, p. 251–262, 2009.

Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2008.12.002>>.

ZHU, D. *et al.* Recent progress in tissue optical clearing. v. 757, n. 5, p. 732–757, 2013.

## APÊNDICE A – Artigo

### Gold nanostructures as optical clearing agents for incipient occlusal caries analyses by Optical Coherence Tomography

#### ABSTRACT

Incipient caries lesions in posterior tooth fissures are difficult to diagnose and are often underestimated in early stages. Optical coherence tomography (OCT) has been shown to be a promising tool for the visualization of these lesions. In order to improve the OCT images, optical clearing agents aim to allow a better contrast and visualization of biological structures. This study evaluated gold spherical nanoparticles (AuNP), gold nanorods (AuNR) and glycerol as optical clearing agents in OCT images of incipient caries lesions to enhance its diagnosis. Ten extracted permanent molars affected by incipient caries lesions were imaged with OCT. Group (G1) was the control, whereas other groups were observed using the following components: glycerol (G2), AuNP (G3), AuNP diluted on glycerol (G4), AuNR (G5) and AuNR diluted on glycerol (G6). The groups were investigated for enhancement as OCA by the alterations of the light extinction coefficient with OCT. An increase in the light attenuation occurred in all tested groups when compared to G1 (0.179). Groups G3 and G6 demonstrated a higher attenuation coefficient (0.224), ( $p=0.341$ ). The difference of the attenuation coefficient between the affected and non-affected region permitted the localization of demineralized areas.

Descriptors: Optical coherence tomography, nanostructures, diagnostic imaging, dental caries

#### 1 INTRODUCTION

The complex topography of the occlusal surface of the posterior teeth represents a challenge for diagnosis in dentistry. In this context, incipient caries are difficult to detect in the early stages and are generally underdiagnosed (FRIED *et al.*, 2002; ITO *et*

*al.*, 2016). Furthermore, caries remains one of the most prevalent problems in dentistry in public health (FERREIRA-NÓBILO; ROSÁRIO, 2014). Microscopic analysis can show occlusal fissures that appear clinically round and shallow, occasionally harbor deep grooves that are occluded with debris and microorganisms (ITO *et al.*, 2016).

Occlusal caries lesions are routinely detected using visual, tactile and exploratory methods in combination with radiographic exam (MELO *et al.*, 2016). Radiographic methods have low sensitivity for occlusal lesions, and when they are radiolucent, there is already a deep progression in dentin, making inevitable the restorative treatment (FEJERSKOV, 2004). Therefore, the early detection of these cavities is important to avoid damage to the dental tissues, thus allowing minimally invasive dentistry.

Optical coherence tomography (OCT) is a non-invasive imaging technique that provides high-resolution images of microanatomic structures in living tissues. These systems offer cross-sectional and 3D images with resolution on the order of few microns and a depth of penetration of one to two millimeters (BRAZ *et al.*, 2012). OCT can provide diagnostic information in dentistry regarding dental materials, soft and hard tissues analysis and can effectively be used to identify demineralized tissues as in carious lesions (MAIA *et al.*, 2016). However, tissue scattering properties may represent a major limiting factor for deeper images from biological samples by optical techniques (ZHU *et al.*, 2013).

Optical clearing agents (OCAs) have routinely been used in biological microscopy and have found recent application in clinical imaging, including OCT (TUCHIN, 2005; ZHU *et al.*, 2013). When analyzing a tooth surface with the OCT device, the presence of a caries lesions typically promotes a large increase in light scattering due to demineralization limiting the light penetration, thereby reducing the OCT signal before it even reaches the dentin-enamel junction (KANG; DARLING; FRIED, 2016). In this way, contrast agents may enhance OCT image quality *in situ*, whereas an agent that modifies the diffusion properties of a sample may improve the image contrast.

There are some examples of OCAs in the literature, as glycerol, transparent vinyl polysiloxane impression material, silver nanoparticles, titanium oxide and gold nanoparticles (CARNEIRO *et al.*, 2018)(YANG; CURTIS; FRIED, 2019)(KANG;

DARLING; FRIED, 2016)(ZAGAYNOVA *et al.*, 2008). Among these, gold is biocompatible, and nanoparticles can be manufactured with appreciable colloidal stability. A relevant feature of these nanostructures is due to an effect called surface plasmon resonance (SPR). This resonant effect can be tuned into the near-infrared, allowing the nanoparticles to act as molecular contrast agents in a spectral region where the tissue is relatively transparent, such as enamel (LIAO; NEHL; HAFNER, 2006). Studies have shown that the visibility of occlusal lesions occult and hidden in OCT images can be significantly improved using optical brightening agents and image analysis methods (KANG; DARLING; FRIED, 2016; ZAGAYNOVA *et al.*, 2008).

The use of nanoparticles as OCAs to improve OCT image contrast in incipient caries lesions has not yet been fully explored and there is great potential due to increased diagnostic information. In dentistry, it has been used for drug release in implant surface (MOON *et al.*, 2018) and for contrast agent for visualization of dentin structures (BRAZ *et al.*, 2012). Thus, the aim of this study was to evaluate gold nanoparticles (AuNP) and gold nanorods (AuNR) as OCAs, comparing with glycerol to enhance the detection of incipient occlusal caries lesions in OCT images.

## **2 MATERIALS AND METHODS**

### **2.1. Ethics**

This experimental laboratory in vitro study was carried out in accordance to the Helsinki Declaration, after approval by the Ethics Committee on Humans Research, under process CAAE 63824216.8.0000.5207.

### **2.2. Sample preparation**

Ten permanent molars teeth, with incipient carious lesions were obtained from a teeth bank (Centro Universitário Tabosa de Almeida (ASCES-UNITA), Caruaru, Pernambuco, Brazil). Those teeth contained white or brownish spots accompanying anatomical accidents of the occlusal surfaces, but they did not have evident cavitation when analyzed by visual examination in accordance with the ICDAS code (1) first visual change in dry enamel and (2) distinct visual change in moist enamel. Teeth were excluded when caries cavities were observed by visual examination or restorations.

The teeth selected for this study had their root portions included in colorless chemically activated acrylic resin matrix with the occlusal surface parallel to the ground. Afterwards they were placed on a PVC platform so they could be repositioned to receive the OCAs for OCT scanning.

### **2.3. OCAs**

Each sample was analyzed in a total of 6 times, the first one was the negative control (G1), and then they were analyzed with five different OCAs. The pure glycerol was the positive control (G2). The other OCAs were: (G3) gold spherical nanoparticles (AuNP) dispersed in water ( $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ); (G4) AuNP dispersed in water and diluted to 50% by weight of glycerol; (G5) nanorods (AuNR) dispersed in water ( $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ); (G6) (AuNR) dispersed in water and diluted to 50% by weight of glycerol.

After applying the OCAs, the specimens were scanned by OCT, and then the samples were washed with neutral detergent with Robinson's brush, followed by ultrasonic bath in deionized water for 15 minutes between each NP-enhanced OCA application. In this way, all samples were able to be observed using OCT in the presence of all NP-enhanced OCA.

#### **2.3.1 Preparation and acquisition of Gold Nanoparticles (spherical and nanorods)**

The spherical gold nanoparticles (AuNP) were produced in the Department of Physics and Chemistry of the Universidade Federal de Pernambuco, Brazil by treating hydrogen tetrachloroaurate ( $\text{HAuCl}_4$ ) with polivinilpirrolidona (PVP - $M_w \cong 55.000$ ) in boiling water, where the PVP acts as stabilizing agent. The resulting colloidal gold nanoparticles are spherical and have an  $2.0 \pm 1.0$  nm in size dispersed in aqueous solution, and the peak of plasmon resonance is at 550 nm (BRITO-SILVA *et al.*, 2013). The nanorods (AuNR) were purchased from Nanopartz<sup>TM</sup>, with diameters of 50 nm and length of 160 nm also dispersed in aqueous solution, have two plasmon resonance peaks at 520 nm and 825 nm, corresponding to the transverse and longitudinal plasmon resonances, respectively.

### **2.4. Optical Coherence Tomography System**

The OCT system employed in this work was a commercially available Callisto (Thorlabs Inc, New Jersey, USA), operating in the spectral domain (SD-OCT), with 930 nm of central wavelength, 100 nm of bandwidth, maximum output power of 5 mW, resolution of

5.3/7  $\mu\text{m}$  in air and water, respectively, lateral resolution of 8  $\mu\text{m}$  and depth of light penetration of 1.7 mm. The analysis was performed along the occlusal surface, capturing two-dimensional images with 8 mm transverse scan of the specimens. To standardize the scanning the samples were positioned on a in the x-y translation stage with the aid of a micrometric screw, with 250  $\mu\text{m}$  interval between each image. The two-dimensional images constitute a numerical matrix of 2000 columns at the x-axis, corresponding to maximum 8-mm scanning, and 512 rows at the y-axis, with 1,7 mm maximum depth (in air, considering refractive index 1).

#### **2.4.1 Optical Attenuation Coefficient Measurement**

After the acquisition, the images were analyzed on a homemade software to measure the optical attenuation coefficient (OAC). The OAC is a quantitative value that characterize the decay of OCT signal when light propagates trough the tissue analyzed. Thus, by measuring the OAC it is possible to use the OCT signal to quantitatively discriminate between different types of tissues and their state of health.

For OAC analyzes, the software operator upload the images of each studied group. In each image the operator selected the width and position of two region of interest (ROI) window. For standardization, the window width was maintained constant (10 A-scan) during all the analyses. As each biological sample presents distinct morphological characteristics, the position of the windows was adjusted for each image, always positioning one window in a region of healthy tissue and the other in a region of abnormal tissue.

Using the B-scan mode, the software identifies the surface of the tissue (air-tissue interface) and uses it as a reference to perform an average of the normalized A-scan inside each ROI window. The A-scan was normalized by the maximum value to avoid erroneous values due to possible reflection on first surface.

The average A-scan of each ROI window was used to fit an exponential decay, based on Beer-Lambert law, as Equation (1), where  $I(z)$  is the intensity as a function of depth  $z$  and  $\mu$  is the optical attenuation coefficient and obtain the AOC. The obtained value was recorded for posterior analysis. This procedure was repeated for each image.

$$I(z) = I_0 \exp(-\mu z)$$

## 2.5. Statistics

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 7 software (GraphPad Software, Inc). A mean and standard deviation of each group were calculated. Normal distribution was not performed by the Kolmogorov-Smirnov test. To analyze differences between the groups, the Kruskal-Wallis test was used. In all groups, Student's t-test was performed. To verify if there was difference between groups, the "repeated measures of variance RM-ANOVA" test was used. The statistical significance of all tests should be considered as  $p < 0.05$ .

## 3 RESULTS

The OCT images of 10 molars were examined. OCT B-scan and A-scan mode across the occlusal surface of molars are presented in Figure 1 as transversal and bidimensional OCT images, with and without OCAs, of an occlusal surface of a molar that clinically presented a brown stain in the pit and fissures suspecting of incipient caries lesions. Fig. 1A shows the B-scan OCT mode without any OCAs (G1).

The other images were taken after application of the following OCAs: fig. 1B, glycerol (G2); fig. 1C, gold spherical nanoparticles (AuNP) dispersed in water ( $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ) (G3); fig. 1D, AuNP dispersed in water and diluted to 50% by weight of glycerol (G4); fig. 1E nanorods (AuNR) dispersed in water ( $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ) (G5); fig. 1F, AuNR dispersed in water and diluted to 50% by weight of glycerol (G6). In order to quantify the OCT signal intensity in the DEJ area, the attenuation coefficient was obtained (Table 01). The figure 2 shows the A-scan graphic of the control group, G3 (AuNP) and G6 (AuNR + glycerol) which evidence the greatest difference of the attenuation coefficient comparing with the control group.

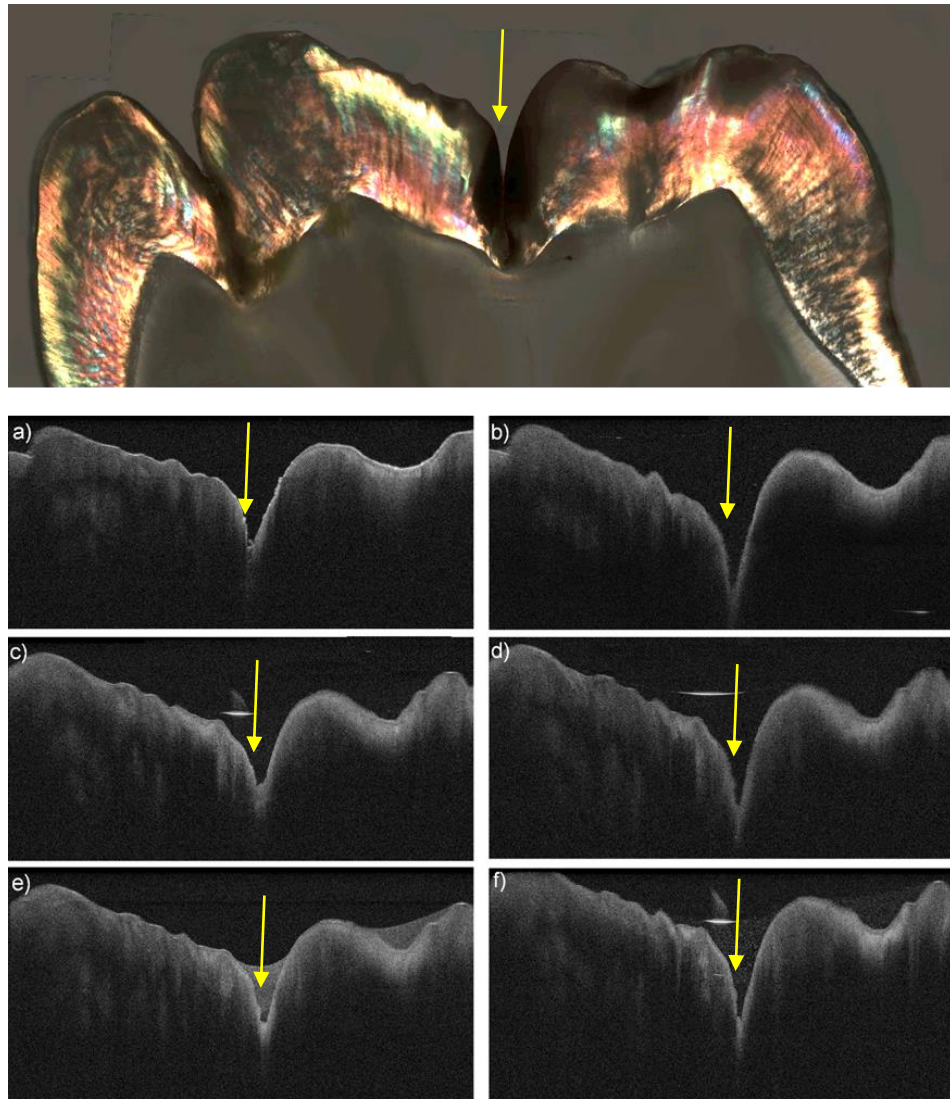
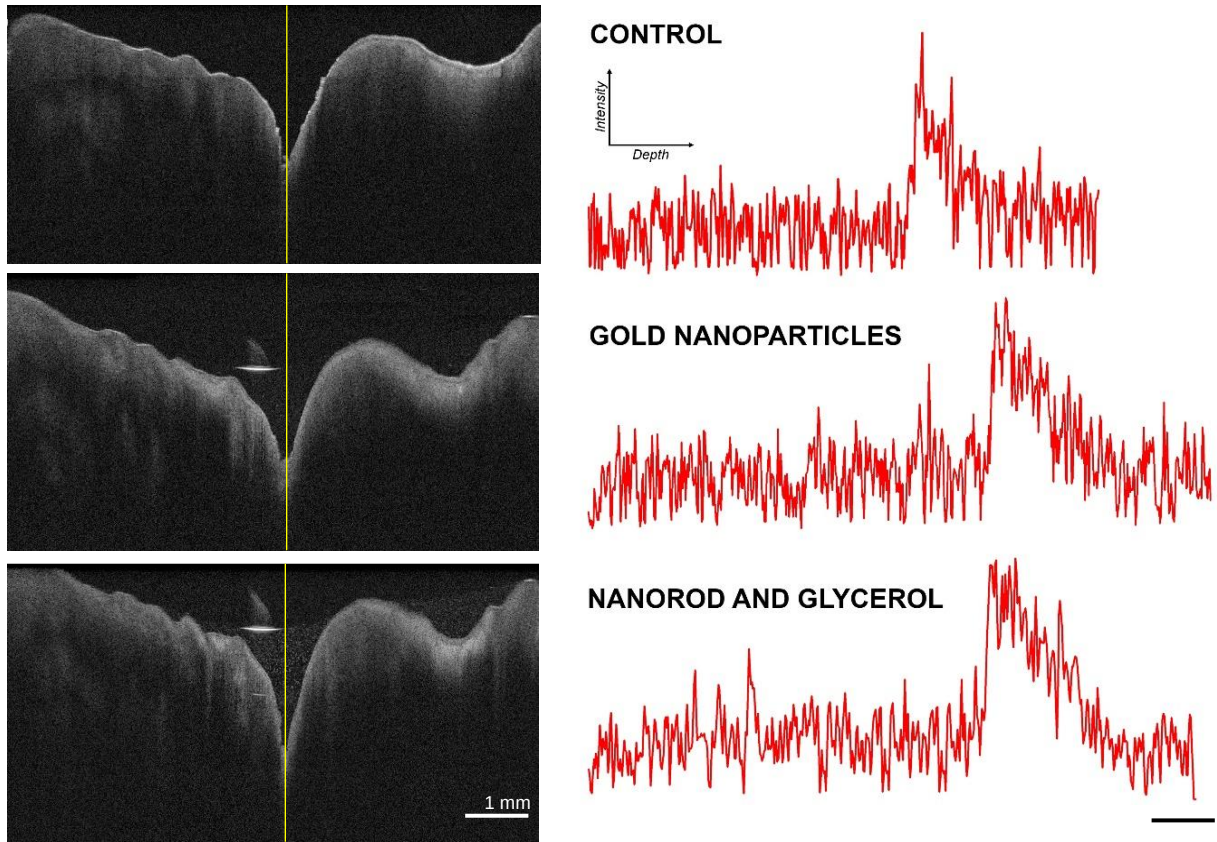


Figure 1: Optical polarization microscopy and OCT B-scan images across the occlusal surface of molars. (A) G1; (B) G2; (C) G3; (D) G4; (E) G5; (F) G6. The bright line in figs C to F are reflections at the air-liquid solution interface.



1 mm

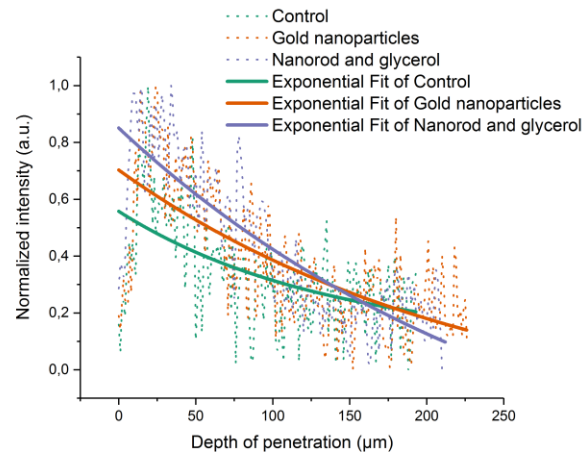


Figure 2: OCT image and A-scan of group control (G1), (G3) using gold spherical nanoparticles and (G6) nanorod and glycerol as OCA. An exponential fit is shown in the lower plot evidencing the difference in intensity and the greater light decay in groups 3 and 6.

**Table 1:** Mean  $\pm$  S.D. of attenuation coefficient ( $\text{mm}^{-1}$ ) values taken from OCT Imaging of higid and carious teeth with Optical Clearing Agents. The test RM-ANOVA indicate that the values are statistically not different in the groups of higid and caries sufaces ( $p>0,05$ )

| Surface       | Group (G)                            | N  | Mean<br>( $\text{mm}^{-1}$ ) | SD   | Minimum | Maximum | p-value <sup>1</sup> |
|---------------|--------------------------------------|----|------------------------------|------|---------|---------|----------------------|
| <b>Higid</b>  | Control (G1)                         | 10 | 0,161                        | 0,04 | 0,093   | 0,251   | <0,0001              |
|               | Glycerol (G2)                        | 10 | 0,169                        | 0,06 | 0,087   | 0,257   | <0,0001              |
|               | Gold Nanoparticles(G3)               | 10 | 0,133                        | 0,06 | 0,036   | 0,25    | 0,0001               |
|               | Gold Nanoparticles and glycerol (G4) | 10 | 0,143                        | 0,05 | 0,063   | 0,242   | <0,0001              |
|               | Nanorod (G5)                         | 10 | 0,135                        | 0,07 | 0,007   | 0,233   | 0,0002               |
|               | Nanorod and glycerol (G6)            | 10 | 0,168                        | 0,04 | 0,086   | 0,248   | <0,0001              |
| <b>Caries</b> | Control (G1)                         | 10 | 0,184                        | 0,05 | 0,136   | 0,292   | <0,0001              |
|               | Glycerol (G2)                        | 10 | 0,198                        | 0,07 | 0,069   | 0,307   | <0,0001              |
|               | Gold Nanoparticles (G3)              | 10 | 0,224                        | 0,03 | 0,145   | 0,276   | <0,0001              |
|               | Gold Nanoparticles and glycerol (G4) | 10 | 0,191                        | 0,03 | 0,116   | 0,259   | <0,0001              |
|               | Nanorod (G5)                         | 10 | 0,214                        | 0,04 | 0,158   | 0,269   | <0,0001              |
|               | Nanorod and glycerol (G6)            | 10 | 0,224                        | 0,05 | 0,109   | 0,291   | <0,0001              |

<sup>1</sup> One sample t test

An increase in the light attenuation was found in all carious tested groups when compared with G1 (0.184). It was observed that groups 3 and 6 obtained a higher attenuation coefficient (0.224) on carious surface. However, at the higid areas, gold nanorods diluted in glycerol (G6 = 0.168) showed an attenuation coefficient with similar results to those of the isolated samples of glycerol, G2 (0.169).

#### 4 DISCUSSION

Preliminary studies have demonstrated that OCT has great potential for imaging early caries lesions and for monitoring lesion progression in enamel. In addition, OCAs may enhance OCT image quality *in situ*, whereas an agent that modifies the diffusion properties of a sample may improve the image contrast. Therefore, in present research,

gold nanoparticles were also studied to improve the OCT imaging, adding knowledge to the use of this technology in early diagnostic in complex tooth anatomy.

OCT provides cross-sectional images of biological tissues over penetration depths of typically 1-2 mm. In agreement, the OCT device used in this study shows 1.7 mm of light penetration depth within the analyzed samples. The penetration depth of OCT is fundamentally limited by the attenuation of ballistic light propagation via scattering and absorption. As an OCT beam penetrates deeper into a tissue, the signal strength diminishes (LARIN *et al.*, 2012).

One way of quantifying optical changes is by measuring the attenuation coefficient, which has shown promising results in discriminating between healthy and pathological states of various tissues as well as demineralization and remineralization of enamel (MANDURAH *et al.*, 2013). This study confirmed that the use of optical clearing agents increased the attenuation coefficient of subsurface lesions located under enamel in the occlusal surface.

Demineralization in the fissures typically strongly attenuates the OCT signal preventing (KANG; DARLING; FRIED, 2014). Differently from some studies in which the use of optical clearing agents - generally a fluid - decreased the attenuation of light, in this study it was observed that the use of the NP as agent promoted a greater attenuation of light in the lesion's areas, which helped to improve the contrast. Furthermore, the difference between the attenuation coefficients between the healthy and carious lesion increased, making the gold NP a potential tool to improve the identification of lesions.

Researchers proposed the use of optical-clearing agents (OCAs) in order to reduce scattering and improve penetration of light (TUCHIN, 2005; ZHU *et al.*, 2013). Studies indicated that higher index fluids, as glycerol, influenced OCT imaging of caries lesions on enamel surfaces (JONES; FRIED, 2005). The viscosity of the optical clearing agent may also be important because penetration of the agent into the lesion pores and dentinal tubule network can decrease the lesion contrast and allow deeper penetration of light. (YANG; CURTIS; FRIED, 2019)

Glycerol has a much higher viscosity and presents refractive index of 1.47. This is well suited for use in dental imaging due to its high biocompatibility (KANG; DARLING; FRIED, 2016), which is an important advantages for OCT imaging. It is widely used as tissue optical clearing with various efficiencies, a fact that justifies the use of glycerol in some groups (G2, G4 and G6). Within the spectral range of interest in this study, the addition of glycerol caused the attenuation coefficient to remain the same as in the groups where the gold nanoparticles were diluted. This shows that it is indifferent to use combined agents to highlight images.

In contrast with the literature, the glycerol increased the attenuation coefficient, which means that the light penetrated less than in the control group. In order to improve the nanoparticles properties, such as viscosity, the dispersion of the nanoparticles in glycerol was tested. However, the results did not show a statistically significant difference with respect to the other agents tested.

Gold nanoparticles play a key role in nanotechnology, with applications in many fields and can have the potential to infiltrate deep into demineralized area (BRAZ *et al.*, 2012). The capacity to control size, shape and the colloid stability of nanoparticle dispersions are important issues related to their practical applications (ZHOU *et al.*, 2009). The advantages of the gold nanoparticles are low toxicity and an ability for maintenance of localized surface plasmon resonances in the NIR region providing enhanced backscattering of laser radiation (XIA *et al.*, 2016). Although it is widely used in bioimaging, there are few studies that aim at the use of gold nanoparticles as clearing agents in incipient caries, which justified its application in this experiment. Our results showed a remarkable increase in the attenuation coefficient when using spherical nanoparticles (G3) and gold nanorods diluted in glycerol (G6) in comparison to the control (G1).

Studies suggest that optical clearing agents act by filling the pores and tubules structures to reduce internal light scattering and as index matching agents by reducing scattering and reflection at surfaces (KANG; DARLING; FRIED, 2016; YANG; CURTIS; FRIED, 2019). By analyzing different lines of the same sample with demineralization, it was possible to detect exponential characteristic decay of light, due to the increase of

the attenuation coefficient of light at demineralized areas, showing similar results as other studies conducted (CARNEIRO *et al.*, 2018; MAIA *et al.*, 2016; MANDURAH *et al.*, 2013). However, with reference to the sample of the present research, divergent results have been observed in the literature showing a decrease of attenuation coefficient in the lesion area (CARA *et al.*, 2012; POPESCU DP, SOWA MG, HEWKO MD, 2009; YANG; CURTIS; FRIED, 2019).

One of the early biological application of gold nanospheres was as contrast agents for imaging in dark or brightfield imaging systems. Since then, other gold nanostructures as gold nanorods has been tested (OLDENBURG *et al.*, 2009; STONE; JACKSON; WRIGHT, 2011). Moreover, parameters such as mechanisms and characteristics of optical clearing, tissues type, and different experimental protocols are differentials for obtaining quality contrast. Based on this, AuNR is a promising biocompatible agent, with colloidal stability and so, a truly valid option in Dentistry imaging. In the literature, to date, only few studies have used it (LUO *et al.*, 2017; MOON *et al.*, 2018).

Another explanation for the use of optical clearing agents is that in the posterior surfaces the occlusal slopes near the pit and fissures promotes large angles with the OCT beam. Application of the liquid agents on the occlusal surfaces, fills the fissure region with the liquid, and reduces the initial angle of incidence at the liquid interface toward normal incidence. As the beam propagates, the reflective interface of the liquids to the enamel will be less affected from the high angle slopes because the indexes of refractions of the agents are closer to enamel. By decreasing the surface scattering and reflection of the incident beam and increasing the critical angle with a liquid layer applied to the occlusal surfaces, more light penetrates and exits the tooth enamel (JONES; FRIED, 2005).

## 5 CONCLUSION

Monitoring of an enamel lesion based on the OCT signal attenuation over time appears to be a promising approach. *In vivo* applications and the safety of the optical clearing technique should be further pursued. However, the method should be tested for a larger range of lesions with various shapes, structures, and depths in the further studies before clinical procedures.

## REFERENCES

- ARENDS, J.; CHRISTOFFERSEN, J. The Nature of Early Caries Lesions in Enamel Ne-No. n. L, p. 2–11, 1985.
- BRAZ, A. K. S. *et al.* In situ gold nanoparticles formation : contrast agent for dental optical coherence tomography for dental optical coherence tomography. *Journal of biomedical optics*, v. 17, n. 6, p. 1–5, 2012.
- BRITO-SILVA, A. M. *et al.* Improved synthesis of gold and silver nanoshells. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*, v. 29, n. 13, p. 4366–4372, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23472978>>.
- CARA, A. C. B. DE *et al.* Comparative analysis of optical coherence tomography signal and microhardness for demineralization evaluation of human tooth enamel. *Proc. of SPIE*, v. 8427, p. 1–10, 2012.
- CARNEIRO, V. S. M. *et al.* Silver nanoparticles as optical clearing agent enhancers to improve caries diagnostic by optical coherence tomography Vanda. *Proc. SPIE 10507*, v. 1050719, n. February, 2018.
- COLSTON JR., B. W. *et al.* Imaging of the oral cavity using optical coherence tomography. *Monogr Oral Sci*, v. 17, p. 32–55, 2000. Disponível em: <[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10949834](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10949834)>.
- FEJERSKOV, O. Changing Paradigms in Concepts on Dental Caries : Consequences for Oral Health Care. *Caries Research*, v. 38, p. 182–191, 2004.
- FERREIRA-NÓBILO, N. D. P.; ROSÁRIO, L. Cariology in Curriculum of Brazilian Dental Schools. v. 25, p. 265–270, 2014.
- FRIED, D. *et al.* Imaging caries lesions and lesion progression with polarization sensitive optical

coherence tomography. *Journal of Biomedical Optics*, v. 7, n. 4, p. 618, 2002. Disponível em: <<http://biomedicaloptics.spiedigitallibrary.org/article.aspx?doi=10.1117/1.1509752>>.

ITO, S. *et al.* Assessment of occlusal fissure depth and sealant penetration using optical coherence tomography. v. 35, n. 3, p. 432–439, 2016.

JAIN, P. K. *et al.* Calculated Absorption and Scattering Properties of Gold Nanoparticles of Different Size , Shape , and Composition : Applications in Biological Imaging and Biomedicine. *journal phys chem b*, v. 110, p. 7238–7248, 2006.

JONES, R. S.; FRIED, D. The effect of high index liquids on PS-OCT imaging of dental caries. *Lasers in Dentistry XI*, v. 5687, n. 2, p. 34–41, 2005.

KANG, H.; DARLING, C. L.; FRIED, D. Enhancing the detection of hidden occlusal caries lesions with OCT using high index liquids. *Proceedings of SPIE--the International Society for Optical Engineering*, v. 8929, p. 89290O, 2014.

KANG, H.; DARLING, C. L.; FRIED, D. Use of an optical clearing agent to enhance the visibility of subsurface structures and lesions from tooth occlusal surfaces lesions from tooth occlusal surfaces. *Journal of Biomedical Optics*, v. 21, n. 8, 2016.

LARIN, K. V. *et al.* Optical clearing for OCT image enhancement and in-depth monitoring of molecular diffusion. *IEEE Journal on Selected Topics in Quantum Electronics*, v. 18, n. 3, p. 1244–1259, 2012.

LIAO, H.; NEHL, C. L.; HAFNER, J. H. Biomedical applications of plasmon resonant metal nanoparticles. *Nanomedicine*, v. 1, n. 2, p. 201–208, 2006.

LUO, D. *et al.* Gold Nanorod Mediated Chlorhexidine Microparticle Formation and Near-Infrared Light Induced Release. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*, v. 33, p. 7982–7993, 2017.

MAIA, A. M. A. *et al.* Evaluation of dental enamel caries assessment using Quantitative Light Induced Fluorescence and Optical Coherence Tomography. *Journal of Biophotonics*, v. 9, n. 6,

p. 596–602, 2016.

MANDURAH, M. M. *et al.* Monitoring remineralization of enamel subsurface lesions by optical coherence tomography. *Journal of Biomedical Optics*, v. 18, n. 4, p. 046006, 2013. Disponível em:

<<http://biomedicaloptics.spiedigitallibrary.org/article.aspx?doi=10.1117/1.JBO.18.4.046006>>.

MELO, M. *et al.* Caries diagnosis using light fluorescence devices in comparison with traditional visual and tactile evaluation: a prospective study in 152 patients. *Odontology*, v. 105, n. 3, p. 283–290, 2016.

MOON, K. *et al.* Near-infrared laser-mediated drug release and antibacterial activity of gold nanorod – sputtered titania nanotubes. *journal of tissue engineering*, v. 9, p. 1–9, 2018.

OLDENBURG, A. L. *et al.* Imaging gold nanorods in excised human breast carcinoma by spectroscopic optical coherence tomography †. *journal of materials chemistry*, v. 19, p. 6407–6411, 2009.

OTIS, L. L. *et al.* Optical coherence tomography: A new imaging technology for dentistry. *Journal of the American Dental Association*, v. 131, n. 4, p. 511–514, 2000. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.14219/jada.archive.2000.0210>>.

POPESCU DP, SOWA MG, HEWKO MD, C.-S. L. Assessment of early demineralization in teeth using the signal attenuation in optical coherence tomography images. *J Biomed Opt.*, v. 13, n. 5, p. 1–17, 2009.

STONE, J.; JACKSON, S.; WRIGHT, D. Biological applications of gold nanorods. *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology*, v. 3, p. 100–109, 2011.

TUCHIN, V. V. Optical clearing of tissues and blood using. *JOURNAL OF PHYSICS D: APPLIED PHYSICS*, v. 38, p. 2497–2518, 2005.

TUCKER-SCHWARTZ, J. M. *et al.* In vivo photothermal optical coherence tomography of gold nanorod contrast agents. *biomedical optics express*, v. 3, n. 11, p. 2881–2895, 2012.

XIA, Q. *et al.* The effect of particle size on the genotoxicity of gold nanoparticles. *journal of biomedical materials research*, v. 00A, n. 00, p. 1–10, 2016.

YANG, V. B.; CURTIS, D. A.; FRIED, D. Use of Optical Clearing Agents for Imaging Root Surfaces With Optical Coherence Tomography. *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*, v. 25, n. 1, p. 1–7, 2019. Disponível em:

<<https://ieeexplore.ieee.org/document/8378061/>>.

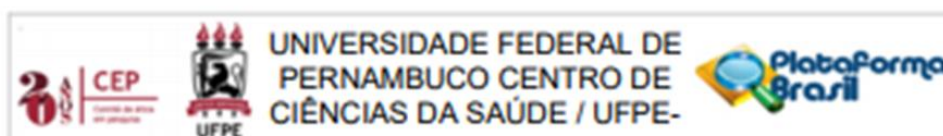
YEH, Y.-C.; CRERAN, B.; ROTELLO, V. M. Gold nanoparticles: preparation, properties, and applications in bionanotechnology. *Nanoscale*, v. 4, n. 6, p. 1871–1880, 2012. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=C1NR11188D>>.

ZAGAYNOVA, E. V. *et al.* Contrasting properties of gold nanoparticles for optical coherence tomography: Phantom, in vivo studies and Monte Carlo simulation. *Physics in Medicine and Biology*, v. 53, n. 18, p. 4995–5009, 2008.

ZHOU, J. *et al.* Functionalized gold nanoparticles: Synthesis, structure and colloid stability. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 331, n. 2, p. 251–262, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2008.12.002>>.

ZHU, D. *et al.* Recent progress in tissue optical clearing. v. 757, n. 5, p. 732–757, 2013.

## ANEXO A - Parecer Consubstanciado do CEP



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** AGENTES DE COMPENSAÇÃO PARA MELHORAR O IMAGEAMENTO DE ESTRUTURAS DENTÁRIAS NA TOMOGRAFIA POR COERÊNCIA ÓPTICA

**Pesquisador:** Marleny Elizabeth Márquez de Martínez Gerbi

**Área Temática:** Equipamentos e dispositivos terapêuticos, novos ou não registrados no País;

**Versão:** 1

**CAAE:** 63824216.8.3001.5208

**Instituição Proponente:** FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DE PERNAMBUCO

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

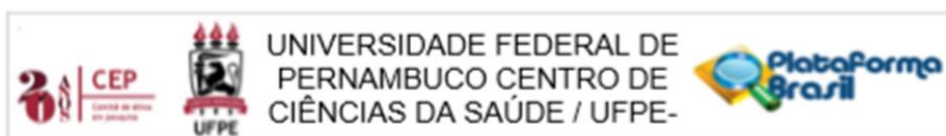
**Número do Parecer:** 2.001.287

#### Apresentação do Projeto:

Trata-se de projeto de pesquisa de Programa de Doutorado em Odontologia da Faculdade de Odontologia de Pernambuco, área de concentração Dentística, apresentado pela dentista Vanda Sanderana Macêdo Carneiro, que busca avaliar o uso de agentes de compensação óptica à base de nanopartículas de titânio e prata para melhorar a profundidade de penetração da luz nos tecidos dentais mineralizados ex vivo, estejam eles hígidos ou com lesões de cárie oculta, utilizando a Tomografia de Coerência Óptica (OCT).

A Tomografia por coerência óptica é uma técnica não invasiva de geração de imagens transversais de estruturas biológicas internas, que já tem sido utilizada para imagens de cáries dentais, superfícies oclusais e tecidos moles. A técnica proporciona imagens em alta resolução de estruturas microanatômicas em tecidos vivos, todavia a profundidade da imagem é limitada devido à elevada dispersão de luz em tecidos biológicos, dificultando as potenciais aplicações, principalmente onde é necessária uma imagem com maior penetração nos tecidos. Na última década as técnicas ópticas de imagem, a exemplo da Tomografia de Coerência Óptica (OCT), tem recebido considerável atenção entre outras modalidades de diagnóstico. A utilização de técnicas ópticas de escaneamento e geração de imagens é bastante limitada em termos de profundidade

**Endereço:** Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde  
**Bairro:** Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600  
**UF:** PE **Município:** RECIFE  
**Telefone:** (81) 2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br

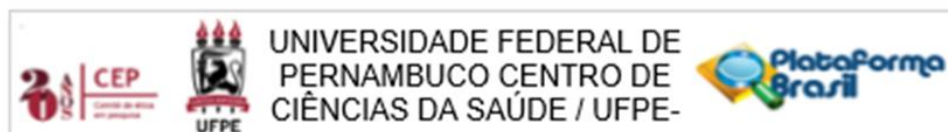


Continuação do Parecer: 2.001.287

em tecidos mineralizados devido à natureza altamente dispersante dos tecidos biológicos. Para contornar essa limitação, a compensação óptica surge como alternativa para promover maior homogeneidade das amostras biológicas, de forma a permitir uma maior profundidade de penetração da luz nos tecidos.

A técnica de compensação óptica consiste na interposição ou imersão/permeabilização de substâncias químicas biocompatíveis sobre os tecidos biológicos; baseada em uma série de efeitos dessa substância sobre a amostra, como compatibilidade dos índices de refração, efeito da desidratação celular e aumento da solubilidade do colágeno por causa das propriedades osmóticas dos agentes de compensação, ela consegue promover um aumento significativo da penetração de luz nos tecidos, tornando o diagnóstico não invasivo mais viável. Dessa forma, este trabalho propõe o uso de agentes para compensação óptica para melhoria do espalhamento de luz, baseadas na imersão de espécimes nesses agentes, utilizando o princípio do índice de refração (RI) correspondente entre os agentes de compensação/meios de montagem e tecido sob observação, de forma a melhorar a profundidade de penetração da luz em tecidos dentais mineralizados, estejam eles hígidos ou com lesões de cárie oculta, para imagens *in vitro* desses tecidos obtidas através de OCT.

A pesquisa será desenvolvida no laboratório de Fotônica do departamento de Física da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Os dados devem ser processados no laboratório de implantologia da Universidade de Pernambuco (UPE). Os dentes a serem utilizados para a pesquisa serão fornecidos pelo banco de dentes Centro Universitário Tabosa de Almeida (ASCES – UNITA. Vide anexo C). Serão utilizados 15 elementos dentários (molares), que serão submetidos a distintos agentes de compensação óptica, em toda sua superfície oclusal. Estes agentes constituir-se-ão de nanopartículas de nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ,  $1,18 \times 10^{14}$  partículas/mL de água, diâmetro aproximado de 10nm) e nanopartículas de dióxido de titânio ( $\text{TiO}_2$  P.A. diâmetro aproximado de 160nm) homogeneamente dispersas em glicerol em concentrações conforme específicas verificadas na tabela 1. As nanopartículas a serem utilizadas foram sintetizadas no laboratório de Fotônica e Biofotônica do Departamento de Física da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) Após sua manipulação, os agentes de compensação serão depositados sobre as amostras dentárias, de forma recobrir toda a superfície oclusal. Para assegurar o alcance dos agentes de superfície sobre os sulcos e fissuras mais profundos será utilizada uma sonda exploradora de ponta romba para distribuição do material juntamente com pincéis de pelo de marta e toray. As



Continuação do Parecer: 2.001.287

amostras serão completamente recobertas por uma fina camada do agente de compensação, e então analisadas pela tomografia de coerência óptica (OCT), buscando-se obter uma espessura ligeiramente homogênea sobre o corpo de prova, respeitando a distância focal do equipamento. Além disso, será realizada a leitura pelo equipamento de Tomografia de Coerência Óptica (OCT) sem artefatos interpostos entre a superfície dentária e a ponteira.

#### Objetivo da Pesquisa:

A pesquisa tem por objetivo primário avaliar o uso de nanopartículas como agentes de compensação de superfícies dentárias para geração de imagens de Tomografia por Coerência Óptica e, por objetivo secundário: 1) avaliar o uso de diferentes concentrações de nanopartículas de Dióxido de Titânio ( $\text{TiO}_2$ ) diluídas em glicerol como agente de compensação para formação de imagens de Tomografia por Coerência Óptica (OCT) em superfícies oclusais dentárias; 2) avaliar o uso de diferentes concentrações de nanopartículas de Nitrato de Prata ( $\text{AgNO}_3$ ) diluídas em água e glicerol como agente de compensação para formação de imagens de Tomografia por Coerência Óptica (OCT) em superfícies oclusais dentárias e 3) comparar os agentes de compensação entre si e com as imagens de superfícies que não receberam os agentes (Controle).

#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

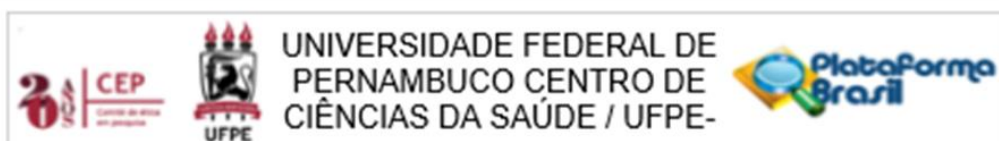
A pesquisa não oferece riscos à sociedade ou aos pesquisadores envolvidos, uma vez que trata-se de uma pesquisa *in vitro*, com dentes obtidos a partir de um banco de dentes e, portanto, previamente descontaminados. Com relação à toxicidade dos compostos empregados como agentes de superfície, os mesmos não oferecem riscos a quem os manipular, sendo considerados materiais quimicamente seguros.

Quanto aos benefícios, os pesquisadores esperam apresentar à comunidade científica e aos profissionais de odontologia um composto de baixo custo capaz de melhorar a sensibilidade de imagens de Tomografia Óptica de Coerência (OCT) para determinação de informações de lesões incipientes de superfície oclusal uma vez que "com o aumento da penetração de luz nos tecidos, pode-se obter uma otimização das técnicas de Tomografia óptica de Coerência (OCT), que é uma técnica de imagens obtidas por radiação não ionizante, que poderá então se tornar um substituto a radiografias periapicais e interproximais, que é baseada em radiação ionizante e com alto índice de "falsos negativos" no diagnóstico de lesões de cárie incipientes em superfícies oclusais."

#### Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Um dos objetivos da biofotônica consiste na aplicação de técnicas ópticas para análise estrutural e

**Endereço:** Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde  
**Bairro:** Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600  
**UF:** PE **Município:** RECIFE  
**Telefone:** (81)2126-8588 **E-mail:** cepcos@ufpe.br

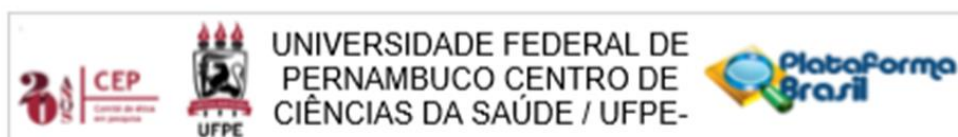


Continuação do Parecer: 2.001.287

funcional de tecidos e células com boa resolução e contraste. Seus principais desafios estão associados à necessidade de aumentar a resolução e a profundidade de imagem, bem como torná-los aplicáveis para estudos in vivo. Os tecidos biológicos são densamente compostos por diversos tipos de substâncias, incluindo partículas dispersantes contornadas por um meio circundante. Esta arquitetura tecidual faz com que a luz se propague em diferentes velocidades e ângulos, em função das variações do índice de refração dos mais distintos componentes, limitando, assim, a propagação da mesma no tecido. A tomografia por coerência óptica (OCT) é uma técnica não invasiva de geração de imagens transversais de estruturas biológicas internas a partir da incidência e propagação de um feixe de luz de baixa coerência. Na odontologia, esta técnica tem sido utilizada para imageamento de cáries dentais, superfícies oclusais e tecidos moles, todavia, devido à limitação de profundidade de propagação da luz, o seu emprego na análise de tecidos dentais ainda é restrito. Para contornar este problema, pode-se lançar mão dos agentes de compensação óptica, substâncias químicas biocompatíveis aplicadas sobre os tecidos biológicos para promover maior homogeneidade de propagação da luz, permitindo uma maior profundidade de penetração da luz nos tecidos. Baseado nesta premissa, o presente estudo busca avaliar o uso de agentes de compensação óptica à base de nanopartículas de titânio e prata para melhorar a profundidade de penetração da luz nos tecidos dentais mineralizados ex vivo, estejam eles hígidos ou com lesões de cárie oculta, através de Tomografia de Coerência Óptica (OCT).

A pesquisa será desenvolvida no laboratório de Fotônica do departamento de Física da Universidade Federal de Pernambuco e os dados processados no laboratório de implantologia da Universidade de Pernambuco. Os dentes a serem utilizados para a pesquisa serão fornecidos pelo banco de dentes Centro Universitário Tabosa de Almeida. Serão utilizados 15 elementos dentários (molares), que serão submetidos a distintos agentes de compensação óptica, em toda sua superfície oclusal. "Estes agentes constituir-se-ão de nanopartículas de nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ,  $1,18 \times 10^{14}$  partículas/mL de água, diâmetro aproximado de 10nm) e nanopartículas de dióxido de titânio ( $\text{TiO}_2$  P.A. diâmetro aproximado de 180nm) homogeneamente dispersas em glicerol (Amresco, Ohio, EUA). As nanopartículas a serem utilizadas foram sintetizadas no laboratório de Fotônica e Biofotônica do Departamento de Física da Universidade Federal de Pernambuco." Os agentes de compensação serão depositados sobre as amostras dentárias, de forma recobrir toda a superfície oclusal. "Para assegurar o alcance dos agentes de superfície sobre os sulcos e fissuras mais profundos será utilizada uma sonda exploradora de ponta romba para distribuição do material juntamente com pincéis de pelo de marta e toray. As amostras serão completamente recobertas por uma fina camada do agente de compensação, e então analisadas pela tomografia

**Endereço:** Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde  
**Bairro:** Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600  
**UF:** PE **Município:** RECIFE  
**Telefone:** (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 2.001.287

de coerência óptica (OCT), buscando-se obter uma espessura ligeiramente homogênea sobre o corpo de prova, respeitando a distância focal do equipamento. Além disso, será realizada a leitura pelo equipamento de OCT sem artefatos interpostos entre a superfície dentária e a ponteira."

Diante do exposto, o projeto é relevante, com metodologia adequada aos objetivos propostos.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

O protocolo foi submetido na Plataforma Brasil em nome da orientadora e os termos de apresentação obrigatória (Carta de anuência/declaração e Infraestrutura da UFPE, da UPE e do Centro Universitário Tabosa de Almeida; Lattes de Marleny Elizabeth Márquez de Martínez Gerbi e Vanda Sanderana Macêdo Carneiro e termo de confiabilidade) foram anexados à Plataforma Brasil. No entanto não foi anexado à Plataforma Brasil o Lattes do Professor Anderson Esteves Leônidas Gomes e da pós-doutoranda Claudia Cristina Brainer de Oliveira Mota.

Por se tratar de uma pesquisa in vitro os pesquisadores solicitaram dispensa de TCLE.

**Recomendações:**

Por se tratar de pesquisa na qual a UFPE é Centro Coparticipante a pesquisadora deveria ter anexado à Plataforma Brasil os currículos de toda a equipe de pesquisa em atendimento as normas do CEP/UFPE mas tendo em vista que a pesquisa foi aprovada pelo CEP da Universidade de Pernambuco (PROPEGE), recomendamos que em outra oportunidade (emenda p. ex.), a pesquisadora verifique as normas do CEP da Instituição Coparticipante.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

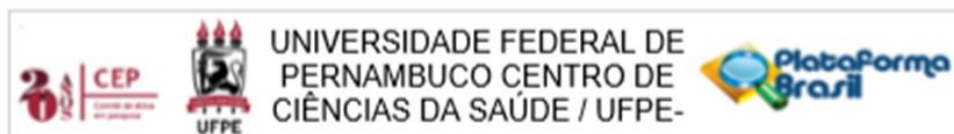
Protocolo Aprovado.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

O Protocolo foi avaliado na reunião do CEP e está APROVADO para iniciar a coleta de dados. Informamos que a APROVAÇÃO DEFINITIVA do projeto só será dada após o envio da Notificação com o Relatório Final da pesquisa. O pesquisador deverá fazer o download do modelo de Relatório Final para enviá-lo via "Notificação", pela Plataforma Brasil. Siga as instruções do link "Para enviar Relatório Final", disponível no site do CEP/UFPE. Após apreciação desse relatório, o CEP emitirá novo Parecer Consubstanciado definitivo pelo sistema Plataforma Brasil.

Informamos, ainda, que o (a) pesquisador (a) deve desenvolver a pesquisa conforme delineada neste protocolo aprovado, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao voluntário participante (item V.3., da Resolução CNS/MS Nº 466/12).

**Endereço:** Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde  
**Bairro:** Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600  
**UF:** PE **Município:** RECIFE  
**Telefone:** (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 2.001.287

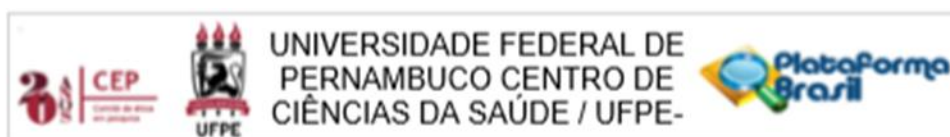
Eventuais modificações nesta pesquisa devem ser solicitadas através de EMENDA ao projeto, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

Para projetos com mais de um ano de execução, é obrigatório que o pesquisador responsável pelo Protocolo de Pesquisa apresente a este Comitê de Ética, relatórios parciais das atividades desenvolvidas no período de 12 meses a contar da data de sua aprovação (item X.1.3.b., da Resolução CNS/MS N° 466/12). O CEP/UFPE deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (item V.5., da Resolução CNS/MS N° 466/12). É papel do/a pesquisador/a assegurar todas as medidas imediatas e adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e ainda, enviar notificação à ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, junto com seu posicionamento.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

| Tipo Documento                                   | Arquivo                                          | Postagem               | Autor                        | Situação |
|--------------------------------------------------|--------------------------------------------------|------------------------|------------------------------|----------|
| Informações Básicas do Projeto                   | PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P<br>ROJETO_779389.pdf | 16/01/2017<br>15:46:19 |                              | Aceito   |
| Outros                                           | Curriculo_Vanda_Carneiro.pdf                     | 16/01/2017<br>15:45:38 | VANDA<br>SANDERANA<br>MACEDO | Aceito   |
| Projeto Detalhado / Brochura Investigador        | projeto_alterado_CEP.docx                        | 16/01/2017<br>15:43:56 | VANDA<br>SANDERANA<br>MACEDO | Aceito   |
| Informações Básicas do Projeto                   | PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P<br>ROJETO_779389.pdf | 15/01/2017<br>15:51:47 |                              | Aceito   |
| Outros                                           | Curriculo_Lattes_Marieny_Gerbi.pdf               | 15/01/2017<br>15:35:59 | VANDA<br>SANDERANA<br>MACEDO | Aceito   |
| Projeto Detalhado / Brochura Investigador        | projeto_alterado_CEP.docx                        | 15/01/2017<br>15:29:44 | VANDA<br>SANDERANA<br>MACEDO | Aceito   |
| Informações Básicas do Projeto                   | PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P<br>ROJETO_779389.pdf | 03/01/2017<br>12:53:30 |                              | Aceito   |
| Declaração de Pesquisadores                      | termo_confidencialidade.pdf                      | 03/01/2017<br>12:48:59 | VANDA<br>SANDERANA<br>MACEDO | Aceito   |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de | dispensa_tcle.pdf                                | 03/01/2017<br>12:44:30 | VANDA<br>SANDERANA<br>MACEDO | Aceito   |

**Endereço:** Av. da Engenharia s/n° - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde  
**Bairro:** Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600  
**UF:** PE **Município:** RECIFE  
**Telefone:** (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 2.001.287

|                                            |                                              |                        |                              |        |
|--------------------------------------------|----------------------------------------------|------------------------|------------------------------|--------|
| Ausência                                   | dispensa_tcle.pdf                            | 03/01/2017<br>12:44:30 | VANDA<br>SANDERANA<br>MACEDO | Aceito |
| Informações Básicas do Projeto             | PB INFORMACOES BÁSICAS DO PROJETO_779389.pdf | 01/10/2016<br>10:39:06 |                              | Aceito |
| Declaração de Instituição e Infraestrutura | Anexo_C_ASCES.pdf                            | 01/10/2016<br>09:22:12 | VANDA<br>SANDERANA<br>MACEDO | Aceito |
| Declaração de Instituição e Infraestrutura | Anexo_B_UPE.pdf                              | 01/10/2016<br>09:21:33 | VANDA<br>SANDERANA<br>MACEDO | Aceito |
| Declaração de Instituição e Infraestrutura | Anexo_A_UFPE.pdf                             | 01/10/2016<br>09:21:18 | VANDA<br>SANDERANA<br>MACEDO | Aceito |
| Folha de Rosto                             | Folha_de_rosto_CEP.pdf                       | 22/09/2016<br>16:00:07 | VANDA<br>SANDERANA<br>MACEDO | Aceito |

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

RECIFE, 06 de Abril de 2017

Assinado por:  
LUCIANO TAVARES MONTENEGRO  
(Coordenador)

**Endereço:** Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde  
**Bairro:** Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600  
**UF:** PE **Município:** RECIFE  
**Telefone:** (81)2126-8588 **E-mail:** cepcos@ufpe.br

## ANEXO B – Normas da revista

Sample manuscript showing style and formatting specifications for SPIE journal papers

First Author,<sup>a</sup> Second Author,<sup>a</sup> Third Author,<sup>b</sup> Fourth Author<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup>University Name, Faculty Group, Department, Street Address, City, Country, Postal Code

<sup>b</sup>Company Name, Street Address, City, Country, Postal Code

**Abstract.** This document shows the required format and appearance of a manuscript prepared for SPIE e-journals. The abstract should consist of a single paragraph containing no more than 200 words. It should be a summary of the paper and not an introduction. Because the abstract may be used in abstracting and indexing databases, it should be self-contained (i.e., no numerical references) and substantive in nature, presenting concisely the objectives, methodology used, results obtained, and their significance. A list of up to six keywords should immediately follow, with the keywords separated by commas and ending with a period.

**Keywords:** optics, photonics, light, lasers, templates, journals.

\*Fourth Author, E-mail: [myemail@university.edu](mailto:myemail@university.edu)

### 1 Introduction

This document shows the suggested format and appearance of a manuscript prepared for SPIE journals. Accepted papers will be professionally typeset. This template is intended to be a tool to improve manuscript clarity for the reviewers. The final layout of the typeset paper will not match this template layout.

#### 1.1 *Use of This Template*

Authors may use this Microsoft (MS) Word template by employing the relevant styles from the Styles and Formatting list (which is accessed from the Styles group in the Home ribbon, Fig. 1):

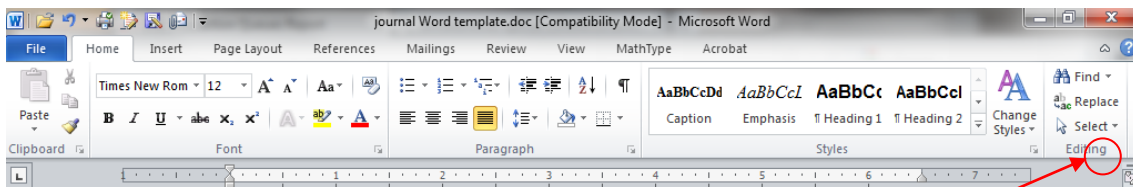


Fig. 1 MS Word 2010 Home ribbon. Red arrow indicates where to access Styles window.

To view which style is being used in any part of this document, place the cursor on the line and look in the style list (Fig. 2):

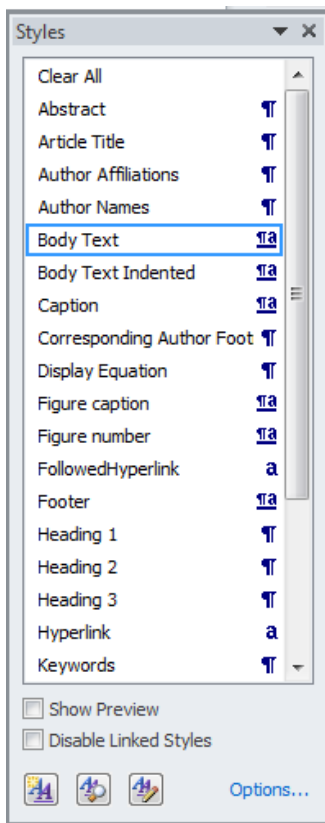


Fig. 2 Styles window.

If you are using Word 2003 you can select Format on the menu bar and Reveal Formatting to view the style palette.

## 1.2 English

Authors are strongly encouraged to follow the principles of sound technical writing. Manuscripts that do not meet acceptable English standards or lack clarity may be rejected. Authors whose native language is not English may wish to collaborate with a colleague whose English skills are more advanced. Alternatively, you may wish to have

your manuscript professionally edited prior to submission by Editage, our recommended independent editorial service: <http://www.editage.com/spie>. SPIE authors will receive a 15% discount off their services.

### 1.3 Page Setup and Fonts

Top, bottom, left, and right margins should be 1 inch. Use Times New Roman font throughout the manuscript, in the sizes and styles shown in Table 1.

Table 1 Recommended fonts and sizes.

| Style name          | Brief description    |
|---------------------|----------------------|
| Article Title       | 16 pt, bold          |
| Author Names        | 12 pt, bold          |
| Author Affiliations | 10 pt                |
| Abstract            | 10 pt                |
| Keywords            | 10 pt                |
| Heading 1           | 12 Pt, bold          |
| <i>Heading 2</i>    | <i>12 pt, italic</i> |
| <i>Heading 3</i>    | <i>11 pt, italic</i> |
| Body Text           | 12 pt                |
| Figure caption      | 10 pt                |
| Table caption       | 10 pt                |

## 2 Parts of a Manuscript

This section describes the normal structure of a manuscript and how each part should be handled.

### 2.1 Title and Author Names

The article title appears left justified at the top of the first page. The title font is 16 pt, bold. The rules for capitalizing the title are the same as for sentences; only the first word, proper nouns, and acronyms should be capitalized. Do not begin titles with articles (e.g., a, an, the) or prepositions (e.g., on, by, etc.). The word “novel” should not appear in the title, as publication will imply novelty. Avoid the use of acronyms in the title, unless they are widely understood. Appendix A contains more about acronyms.

The list of authors immediately follows the title. The font is 12 pt bold and the author names are left justified. The author affiliations and addresses follow the names, in 10 pt normal font and left justified. For multiple affiliations, each affiliation should appear on a separate line. Superscript letters (a, b, c, etc.) should be used to associate multiple authors with their respective affiliations. The corresponding author should be identified with an asterisk, and that person's email address should be provided below the keywords.

## *2.2 Abstract*

The abstract should be a summary of the paper and not an introduction. Because the abstract may be used in abstracting journals, it should be self-contained (i.e., no numerical references) and substantive in nature, presenting concisely the objectives, methodology used, results obtained, and their significance. It should be 200 words, maximum. For further guidelines, please read the brief article titled "[How to Write an Abstract \(PDF\)](#)," by Philip Koopman. (Courtesy of Philip Koopman, Carnegie Mellon University.)

## *2.3 Subject Terms/Keywords*

Keywords are required. Please provide 3-6 keywords related to your paper.

## *2.4 Body of Paper*

The body of the paper consists of numbered sections that present the main findings. These sections should be organized to best present the material.

It is often important to refer back (or forward) to specific sections. Such references are made by indicating the section number, for example, "In Sec. 2 we showed..." or "Section 2.1 contained a description...." If the word Section, Reference, Equation, or Figure starts a sentence, it is spelled out. When occurring in the middle of a sentence, these words are abbreviated Sec., Ref., Eq., and Fig.

At the first occurrence of an acronym, spell it out followed by the acronym in parentheses, e.g., charge-coupled diode (CCD).

## *2.5 Footnotes*

Use textual footnotes only when necessary to present important documentary or explanatory material whose inclusion in the text would be distracting.\*

## 2.6 *Appendices*

SPIE journals do not accept supplementary materials. However, it is acceptable to include an Appendix when necessary, such as derivations of equations, proofs of theorems, and details of algorithms. Equations and figures appearing in Appendices should continue sequential numbering from earlier in the paper.

## 2.7 *Disclosures*

Conflicts of interest should be declared under a separate header, above Acknowledgments. If the authors have no competing interests to declare, then a statement should be included declaring no conflicts of interest. For assistance generating a disclosure statement, see the form available from the International Committee of Medical Journal Editors website: <http://www.icmje.org/conflicts-of-interest/>

## 2.8 *Acknowledgments*

Acknowledgments and funding information should be added after the conclusion, and before references. Include grant numbers and the full name of the funding body. The acknowledgments section does not have a section number.

## 2.8 *References*

The References section lists books, articles, and reports that are cited in the paper. The references are numbered in the order they are cited. Examples of reference styles are given at the end of this template.

For books<sup>1,2</sup> the listing includes the list of authors (initials plus last name), book title (in italics), page or chapter numbers, publisher, city, and year of publication. Journal article references<sup>3,4</sup> include the author list, title of the article (in quotes), journal name (in italics,

---

\* Due to problems with HTML display, use of footnotes should be avoided. If absolutely necessary, the footnote mark must come at the end of a sentence. To insert a footnote, use the Insert menu, select Reference, then Footnote, change the number format to the style of asterisk, dagger, double-dagger, etc., and click OK.

properly abbreviated), volume number (in bold), inclusive page numbers or citation identifier, and year. A reference to a proceedings paper or a chapter in an edited book<sup>5,6</sup> includes the author list, title of the article (in quotes), conference name (in italics), editors (if appropriate), volume title (in italics), volume number if applicable (in bold), inclusive page numbers, publisher, city, and year.

The references are numbered in the order of their first citation. Citations to the references are made using superscripts, as demonstrated in the preceding paragraph. One may also directly refer to a reference within the text, for example, “as shown in Ref. 5 ...” Two or more references should be separated by a comma with no space between them. Multiple sequential references should be displayed with a dash between the first and last numbers.<sup>1–5</sup>

#### *2.8.1 Reference linking and DOIs*

A Digital Object Identifier (DOI) is a unique alphanumeric string assigned to a digital object, such as a journal article or a book chapter, that provides a persistent link to its location on the internet. The use of DOIs allows readers to easily access cited articles. Authors should include the DOI at the end of each reference in brackets, if a DOI is available. See examples at the end of this manuscript. A free DOI lookup service is available from CrossRef at <http://www.crossref.org/freeTextQuery/>. The inclusion of DOIs will facilitate reference linking and is highly recommended.

#### *2.9 Author Biographies and Photographs*

Author biographies are encouraged, especially for primary and corresponding authors. Biographies are not to exceed 75 words. Biographies should be placed at the end of the manuscript. Personal information such as hobbies or birthplace/birthdate should not be included.

### **3 Section Formatting (Heading 1)**

Type each section heading on a separate line using the appropriate style from the style list. Sections should be numbered sequentially.

Paragraphs that immediately follow a section heading are leading paragraphs and should not be indented, according to standard publishing style. The same goes for leading paragraphs of subsections and sub-subsections. In this MS Word template, use

the Body Text style for leading paragraphs and the Body Text Indented style for all subsequent paragraphs.

### 3.1 Subsection Headings (Heading 2)

Subsection headings should be numbered 1.1, 1.2, etc.

#### 3.1.1 Sub-subsection headings (Heading 3)

Sub-subsection headings should be numbered 1.1.1, 1.1.2, etc. Only the first word is capitalized.

## 4 Figures and Tables

### 4.1 Figures

Figures are numbered in the order in which they are called out in the text. Figures should be embedded in the manuscript for the initial submission, and individual figure files will be requested for the first revision in .tif, .eps, .png, or PDF format. We cannot accept application files, i.e., Corel Draw, Microsoft Word, PowerPoint, etc. All figure parts must be labeled (a), (b), etc. Each figure file should contain all parts of the figure. For example, Fig. 3 contains two parts (a) and (b); therefore, all of the labeled parts should be combined in a single file for Fig. 3. Further details about figure formatting can be found in the author guidelines for each specific SPIE journal:

<https://www.spiedigitallibrary.org/journals/journal-authors>. A figure caption list should be provided after the references.

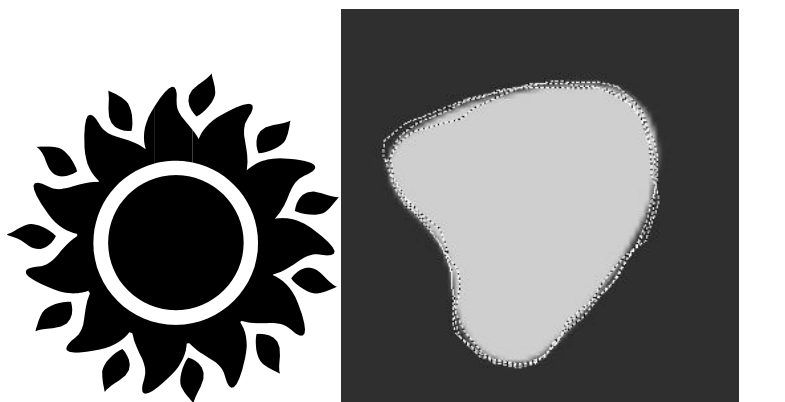


Fig. 3 Example of a figure caption: (a) sun and (b) blob.

### 4.2 Tables

Tables are numbered in the order in which they referred to. They should appear in the document in numerical order and as close as possible to their first reference in the text. Table captions are handled identically to those for figures, except that they appear above the table, and when called out in the text, the word “Table” is always spelled out. See Table 1 for an example.

### *4.3 Multimedia*

Please refer to the multimedia section of the author guidelines (see link above) for specific submission guidelines and requirements. The following types of multimedia files are accepted: QuickTime Non-Streaming video (.qt or .mov), MPEG (.mpg or .mp4). The recommended maximum size for each multimedia file is 10-12 MB. Authors must insert a representative “still” image from the video file in the manuscript as a “figure.” This still image will be linked by the publisher to the actual video file, as will the caption label. Video files should be named Video 1, Video 2, etc. Otherwise multimedia files are treated in the same manner as figures. The multimedia file type should be included in parentheses at the end of the figure caption, along with the file size. See Video 1 for an example.



Video 1 Example of a multimedia still image (MPEG, 2.5 MB).

## Appendix A: Miscellaneous Formatting Details

### *A.1 Formatting Equations*

Equations may appear inline with the text, if they are simple, short, and not of major importance; e.g.,  $a = b/c$ . Important equations appear on their own line. For example, “The expression for the field of view is

$$2a = \frac{(b+1)}{3c}, \quad (1)$$

where  $a$  is the ...” Principal equations are numbered, with the equation number placed within parentheses and right justified. Authors are strongly encouraged to use MS Word Equation Editor or MathType to create both in-text and display equations. Equations are considered to be part of a sentence and should be punctuated accordingly.

### A.2 *Formatting Theorems*

To include theorems in a formal way, the theorem identification should appear in a 10-pt, bold font, left justified and followed by a period. Formal statements of lemmas and algorithms receive a similar treatment. The text of the theorem continues on the same line in normal, 10-pt font. For example,

Theorem 1. For any unbiased estimator...

### *Disclosures*

Conflicts of interest should be declared under a separate header. If the authors have no relevant financial interests in the manuscript and no other potential conflicts of interest to disclose, a statement to this effect should also be included in the manuscript.

### *Acknowledgments*

This unnumbered section is used to identify people who have aided the authors in accomplishing the work presented and to acknowledge sources of funding.

### *References*

G. J. Alred, C. T. Brusaw, and W. E. Oliu, *Handbook of Technical Writing*, 7th ed., St. Martin's, New York (2003).

L. C. Perelman, J. Paradis, and E. Barrett, *Mayfield Handbook of Technical and Scientific Writing*, Mayfield, Mountain View, California (1997).

A. Harris et al., “Free-space optical wavelength diversity scheme for fog mitigation in a ground-to-unmanned-aerial-vehicle communications link,” *Opt. Eng.* 45(8), 086001 (2006) [[doi:10.1117/1.2338565](https://doi.org/10.1117/1.2338565)].

N. Metropolis et al., "Equations of state calculations by fast computing machine," *J. Chem. Phys.* 21(6), 1087-1091 (1953).

S. F. Gull, "Developments in maximum-entropy data analysis," in *Maximum Entropy and Bayesian Methods*, J. Skilling, Ed., pp. 53-71, Kluwer Academic, Dordrecht, Netherlands (1989).

K. M. Hanson, "Introduction to Bayesian image analysis," in *Image Processing*, M. H. Loew, Ed., *Proc. SPIE* 1898, 716-731 (1993) [[doi:10.1117/12.154577](https://doi.org/10.1117/12.154577)].

First Author is an assistant professor at the University of Optical Engineering. He received his BS and MS degrees in physics from the University of Optics in 1985 and 1987, respectively, and his PhD degree in optics from the Institute of Technology in 1991. He is the author of more than 50 journal papers and has written three book chapters. His current research interests include optical interconnects, holography, and optoelectronic systems. He is a member of SPIE.

Biographies and photographs for the other authors are not available.

### Caption List

Fig. 1 MS Word 2010 Home ribbon. Red arrow indicates where to access Styles window.

Fig. 2 Styles window.

Fig. 3 Example of a figure caption: (a) sun and (b) blob.

Video 1 Example of a multimedia still image (MPEG, 2.5 MB).

Table 1 Recommended font sizes and styles.