WANEISSA CHRISTINE DE SOUZA ZARONI

**DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS SEGUROS E EFETIVOS DO
LASER DE CO₂ ($\lambda = 10,6 \mu\text{m}$) NA REDUÇÃO DA
DESMINERALIZAÇÃO DA DENTINA RADICULAR –
ESTUDO *IN VITRO***

São Paulo

2007

Wanessa Christine de Souza Zaroni

**Determinação de parâmetros seguros e efetivos do laser de CO₂ (λ =
10,6 μ m) na redução da desmineralização da dentina radicular –
Estudo *in vitro***

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, para obter o título de Doutor pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Área de Concentração: Dentística

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Aparecida A. de Cerqueira Luz

São Paulo

2007

Catálogo-na-Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Souza-Zaroni, Wanessa Christine de

Determinação de parâmetros seguros e efetivos do laser de CO₂ ($\lambda = 10,6 \mu\text{m}$) na redução da desmineralização da dentina radicular – estudo *in vitro* / Wanessa Christine de Souza-Zaroni; orientador Maria Aparecida A. de Cerqueira Luz. -- São Paulo, 2007.

87p. : fig., tab.; 30 cm.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de Concentração: Dentística) -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

1. Laser – Cárie dentária – Prevenção 2. Cárie radicular 3. Dentística

Local 615.83:D

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE E COMUNICADO AO AUTOR A REFERÊNCIA DA CITAÇÃO.

São Paulo, ____/____/____

Assinatura:

E-mail:

FOLHA DE APROVAÇÃO

Souza-Zaroni WC. Determinação de parâmetros seguros e efetivos do laser de CO₂ ($\lambda = 10,6 \mu\text{m}$) na redução da desmineralização da dentina radicular – estudo in vitro [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2007.

São Paulo, 28/06/2007

Banca Examinadora

1) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

2) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

3) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

4) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

5) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

A Deus, fonte de amor, por estar sempre presente em minha vida, iluminando e abençoando meu caminho.

Ao meu pai, **Luiz Gonzaga de Souza** (*in memoriam*), meu herói... Exemplo de honestidade, coragem e amor. Você me ensinou a ser forte sem perder a ternura, só não teve tempo de me ensinar a viver sem você...

A minha mãe, **Clélia**, mulher forte e corajosa, que nunca mediu esforços para fazer de seus filhos pessoas melhores. Obrigada pelo amor, apoio e incentivo em todos os momentos!

Aos meus amigos e irmãos, **Thanisy e Allan**, pelos momentos de alegria que sempre compartilhamos quando estamos juntos. Amo vocês!

Ao meu filho, **Luiz Eduardo**, um presente enviado por Deus, que mostrou o verdadeiro sentido da minha vida...

E, por fim, mas não por último, ao meu amor, **Pety**, por completar minha vida com seu carinho, apoio, compreensão, incentivo e, sobretudo, amor! Sou uma pessoa muito abençoada por ter você em minha vida!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao Prof. Dr. Michel Nicolau Youssef, por sempre guiar e orientar meus passos, e, principalmente, por me incentivar a caminhar sozinha. Obrigada por todos os ensinamentos recebidos, pela confiança, amizade e carinho demonstrados em todos os momentos.

À Profa. Dra. Marinês Nobre dos Santos Uchôa, pela orientação, amizade e pelos ensinamentos recebidos. Agradeço também o incentivo, a força nas horas difíceis e a disponibilidade em ajudar demonstrada em todos os momentos.

À Profa. Dra. Maria Aparecida A. de Cerqueira Luz, pelos ensinamentos e agradável convivência na FOU SP.

AGRADECIMENTOS

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudo durante o curso de Doutorado.

À Universidade de São Paulo, representada pela Magnífica Reitora Profa. Dra. Suely Vilela.

À Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, representada por seu Diretor, Prof. Dr. Carlos de Paula Eduardo.

Ao Prof. Dr. Reinaldo Brito e Dias, Coordenador Geral da Pós-Graduação da FOUSP.

À Profa. Dra. Márcia Martins Marques, Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Dentística, pela competência e atenção para com os alunos.

Ao Prof. Dr. Antonio Carlos Bombana, Chefe do Departamento de Dentística e Endodontia da FOUSP e a todos os docentes, pela competência e por todos os ensinamentos recebidos.

Às Professoras Patrícia Freitas e Ana Cecília, pela amizade, carinho, ajuda e ensinamentos recebidos. Quando crescer quero ser igualzinha a vocês!

Às Professoras Miriam Lacalle Turbino e Adriana Bona Matos, pela orientação em muitas das minhas atividades acadêmicas.

À Profa. Dra. Margareth Oda, pelas palavras de carinho, apoio e incentivo nos momentos difíceis.

À Profa. Dra. Dalva Lúcia Faria, do Instituto de Química da USP, por ter disponibilizado o equipamento de espectroscopia FT-Raman e pelos valiosos ensinamentos recebidos.

Às Profas. Regina Guenka Palma Dibb e Silmara Aparecida Milori Corona da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - USP, as grandes responsáveis pelo meu amor à pesquisa e à vida acadêmica. Mesmo estando longe, sei que sempre poderei contar com os ensinamentos, apoio e carinho de vocês. Muito obrigada!

À Soninha, Funcionária do Departamento de Dentística, por ser meu “anjo da guarda”. Muito obrigada pela forma carinhosa com que sempre me ajudou e cuidou de mim e do Dudu.

Aos funcionários do Departamento de Dentística, David, Ana e Aldo, pela ajuda e atenção sempre demonstradas.

Aos funcionários do Laboratório Especial de Laser em Odontologia (LELO), da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, Lili, Jô e Haroldo pela paciência, disponibilidade e boa vontade em ajudar.

Ao físico Paulo Ricardo S. Wagner que prestou imenso auxílio tanto durante a irradiação dos espécimes quanto na elucidação das dúvidas.

Às funcionárias da Secretaria de Pós-Graduação, Kátia, Nair e Alessandra, pela paciência e ajuda durante o curso de Doutorado.

À Carol Steiner-Oliveira e Lidiany Rodrigues, da FOP – UNICAMP, pela ajuda imprescindível em várias fases deste trabalho.

Aos meus amigos do curso de Pós-Graduação, Camillinha, Carol, Cidão, Daiane, João Paulo, Bruno, Val, Arlene, Marcella, Sheila, Thaís, Beto, Sérgio, Yuri, Luciana, Clarissa, Robles, Frederico, Simone, Vinicius, Alessandra e Angela, por tantos momentos de alegria compartilhados.

Às amigas de todas as horas, Carina e Maitê, pela grande amizade, carinho e apoio que foram fundamentais para minha caminhada!

Ao amigo Washington, pela paciência e carinho com que me ajudou na realização de parte da estatística deste estudo. Aprendi e sei que ainda vou aprender muito com você!

Às minhas amigas da FORP – USP, Juzinha, Michelle e Renata, por me acompanharem e me darem força e carinho em todos os momentos de minha vida.
Amo vocês!

A todas as pessoas que, com a mais simples palavra, atitude ou auxílio, contribuíram direta ou indiretamente na elaboração deste trabalho.

***“Deus nos concede, a cada dia, uma
página de vida nova no livro do tempo. Aquilo
que colocarmos nela, corre por nossa conta.”***

Chico Xavier

Souza-Zaroni WC. Determinação de parâmetros seguros e efetivos do laser de CO₂ ($\lambda = 10,6 \mu\text{m}$) na redução da desmineralização da dentina radicular – Estudo *in vitro* [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2007.

RESUMO

Estudos têm mostrado que a dentina pode ser modificada pelo laser pulsado de CO₂ tornando-a um substrato mais ácido-resistente. Este estudo *in vitro* se propôs a estabelecer parâmetros seguros e efetivos de um laser pulsado de CO₂ com comprimento de onda 10,6 μm e avaliou seu efeito sobre a morfologia superficial e a composição química, assim como sobre a redução da desmineralização da dentina radicular. Noventa e cinco superfícies radiculares humanas obtidas de quarenta e oito terceiros molares foram aleatoriamente divididas em 5 grupos (n=15 para o grupo de controle e n=20 para os grupos irradiados com laser): G1 - Nenhum tratamento (controle), G2 - 2,5 J/cm², G3 - 4,0 J/cm², G4 - 5,0 J/cm² e G5 - 6,0 J/cm². A temperatura intrapulpar foi mensurada por meio de análise termográfica com termômetro de radiação infravermelha, as modificações químicas, por meio de espectroscopia FT-Raman e as alterações morfológicas por meio de microscopia eletrônica de varredura. Após o tratamento da superfície, os espécimes foram submetidos a 7 dias de ciclagem de pH, permanecendo diariamente em soluções desmineralizadora e remineralizadora por 3 h e 21 h, respectivamente. Após o desafio ácido, os espécimes foram seccionados e a perda mineral foi determinada por meio do teste de microdureza Knoop (5 g, 5 seg) em profundidades pré-determinadas em relação à superfície de dentina radicular (20 μm – 275 μm). Para todos os grupos irradiados, as mudanças de temperatura intrapulpar mostraram-se

abaixo de 0,9°C. A espectroscopia FT-Raman não evidenciou alterações químicas entre os espécimes não-irradiados e os irradiados com laser de CO₂. Entretanto a análise em microscópio eletrônico de varredura indicou que as densidades de energia a partir de 4,0 J/cm² foram suficientes para induzir mudanças morfológicas na dentina radicular. Adicionalmente, para as densidades de energia iguais ou superiores a 4,0 J/cm², foram observados efeitos de redução da desmineralização da dentina radicular induzidos pela irradiação laser. Pode-se concluir que densidades de energia em torno de 4,0 a 6,0 J/cm² podem ser aplicadas à dentina radicular, a fim de promover mudanças morfológicas e reduzir a reatividade ácida da mesma, sem comprometer a vitalidade pulpar.

Palavras-Chave: Dentina radicular; Ciclagem de pH; Espectroscopia FT-Raman; MEV; Microdureza; Laser de CO₂

Souza-Zaroni WC. Determination of safe and effective parameters of CO₂ laser (λ = 10.6 μ m) on the reduction of root dentin demineralization – an *in vitro* study [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2007.

ABSTRACT

Studies have shown that dentin can be modified by pulsed CO₂ laser to form a more acid-resistant substrate. This *in vitro* research aimed to establish safe parameters of a pulsed study 10.6 μ m CO₂ laser and evaluate its effect on chemical and morphological features in dentinal surface, as well as on the reduction of root dentin demineralization. Ninety five human root surfaces obtained from forty eight third molars were randomly divided in 5 groups (n=15 for control group and n=20 for laser groups): G1 – No treatment (control), G2 -2.5 J/cm², G3 – 4.0 J/cm², G4 – 5.0 J/cm² and G5 – 6.0 J/cm². Intrapulpal temperature was evaluated during dentin irradiation by an infrared thermometer, chemical modifications by FT-Raman spectroscopy, and morphological modifications by SEM. After the surface treatment, the specimens were submitted to a 7 days pH-cycling model, consisted of the daily immersion in demineralizing and remineralizing solutions for 3 h and 21 h, respectively. After the acid challenge, the specimens were sectioned and the mineral loss was determined by means of cross-sectional Knoop microhardness (5 g, 5 sec) at different depths from the dentin root surface (20 μ m – 275 μ m). For all irradiated groups, intrapulpal temperature changes were below 0.9°C. FT-Raman spectroscopy did not show chemical changes in the irradiated specimens. However, scanning electron microscopy images indicated that fluences as low as 4.0 J/cm² were sufficient to induce morphological changes in root dentin. Additionally, for fluences reaching or

exceeding 4.0 J/cm^2 , laser-induced inhibitory effects on root dentin demineralization were observed. It was thus concluded that the laser energy density in the range of 4.0 to 6.0 J/cm^2 could be applied to dental root dentin in order to produce morphological changes and reduce the acid reactivity of dentin without compromising the pulp vitality.

Key-works: Root dentin; pH cycling; FT-Raman spectroscopy; SEM; Cross-sectional microhardness; CO_2 laser

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 4.1 -	Ilustração representativa do delineamento experimental realizado no presente estudo.....	46
Figura 4.2 -	Termômetro de radiação infravermelha e termômetro posicionado no dispositivo que também permitia a fixação das amostras.....	50
Figura 4.3 -	Equipamento de laser de CO ₂ e ponta utilizada para o procedimento de irradiação dos espécimes.....	52
Figura 4.4 -	Ilustração representativa da análise de microdureza e das impressões realizadas nos espécimes durante esta análise.....	56
Figura 5.1 -	Representação gráfica da variação de temperatura de acordo com as densidades de energia (J/cm ²) empregadas. As barras representam o desvio-padrão. Letras distintas indicam diferença estatisticamente significativa pelo teste de Tukey (p<0,05).....	62
Figura 5.2 -	Representação gráfica da perda mineral da dentina radicular de acordo com os tratamentos empregados. As barras representam o desvio-padrão.....	64
Figura 5.3 -	Espectros médios de Raman do grupo G2 antes e após a irradiação com 2,5 J/cm ² , destacando-se a fase mineral (A) e a fase orgânica (B) da dentina radicular.....	65
Figura 5.4 -	Espectros médios de Raman do grupo G5 antes e após a irradiação com 6,0 J/cm ² , destacando-se a fase mineral (A) e a fase orgânica (B) da dentina radicular.....	66
Figura 5.5 -	Fotomicrografia de espécime do grupo controle. Presença de superfície mineralizada com discreta exposição das embocaduras dos túbulos dentinários.....	68

Figura 5.6 - Fotomicrografia de espécime do grupo G2 (laser de CO ₂ - 2,5 J/cm ²). Aspecto morfológico semelhante àquele notado na dentina não-irradiada.....	68
Figura 5.7 - Fotomicrografias de espécime do grupo G3 (laser de CO ₂ - 4,0 J/cm ²). Presença de áreas com aparência amorfa (setas).....	69
Figura 5.8 - Fotomicrografias de espécime do grupo G4 (laser de CO ₂ - 5,0 J/cm ²). Pode-se verificar que a dentina apresenta um padrão distinto da dentina normal. Há o aumento da irregularidade superficial e encontram-se embocaduras dos túbulos dentinários abertos. Observa-se a presença de fendas maiores (*) e sulcos mais profundos entre os picos (setas).....	70
Figura 5.9 - Fotomicrografias de espécime do grupo G5 (laser de CO ₂ - 6,0 J/cm ²). Pode-se verificar que a dentina apresenta um padrão distinto da dentina normal. Há aumento da irregularidade superficial, com as embocaduras dos túbulos dentinários abertos. Observa-se a presença de fendas maiores (*) e sulcos mais profundos entre os picos (setas).....	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1 - Valor médio e desvio-padrão para a área sob cada pico para os espécimes não-irradiados e irradiados dos grupos G2 e G5.....	63
Tabela 5.2 - Médias e desvios-padrão da perda mineral (ΔZ) e porcentagem de inibição da desmineralização da dentina radicular após a ciclagem de pH.....	66

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

%vol Porcentagem de volume mineral

µg/mL micrograma(s) por mililitro

µm micrômetro(s)

µs microsegundo(s)

cm centímetro(s)

cm² centímetro(s) quadrado(s)

CO₂ dióxido de carbono

DES desmineralizadora

EF esmalte fluoretado

EFi esmalte fissurado

EFiC esmalte fissurado e com crateras

EN esmalte normal

ESMO esmalte sem matriz orgânica

Hz Hertz

J/cm² Joule(s) por centímetro quadrado

KHN *Knoop hardness number*

M Molar

mm milímetro

mL mililitro(s)

mm² milímetro(s) quadrado(s)

mmol/L milimol(s) por litro

n número

pH Logarítimo negativo da concentração hidrogeniônica ($-\log[H^+]$)

ppm parte(s) por milhão

ΔZ delta Z (parâmetro que corresponde à perda mineral)

OH^- íon hidroxila

LISTA DE SÍMBOLOS

°C grau(s) celsius

g grama(s)

h hora(s)

s segundo(s) (de tempo)

W watt(s)

λ comprimento de onda

SUMÁRIO

p.

1 INTRODUÇÃO	22
2 REVISÃO DA LITERATURA	24
2.1 Cárie Radicular	24
2.2 Emprego do Laser de CO₂ na Prevenção de Cárie em Esmalte	28
2.3 Emprego do Laser de CO₂ na Prevenção de Cárie em Dentina e Cárie Radicular	38
3 PROPOSIÇÃO	41
4 MATERIAL E MÉTODOS	42
4.1 Material	42
4.2 Métodos	44
4.2.1 Aspectos éticos	44
4.2.2 Delineamento experimental	45
4.2.3 Preparo dos espécimes	46
4.2.4 Variação de temperatura	47
4.2.5 Tratamento da superfície de dentina radicular com laser pulsado de CO ₂	51
4.2.6 Ciclagem de pH	53
4.2.7 Análise de microdureza	54
4.2.8 Análise por Espectroscopia FT-Raman e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	57
4.2.9 Análise Estatística	59

5 RESULTADOS	61
5.1 Variação de temperatura	61
5.2 Efeito do laser de CO₂ na desmineralização da dentina radicular	62
5.3 Aspectos químicos da dentina irradiada	64
5.4 Aspectos morfológicos da dentina irradiada	66
6 DISCUSSÃO	72
7 CONCLUSÃO	79
REFERÊNCIAS	80
ANEXO	87

1 INTRODUÇÃO

A média de idade da população mundial vem crescendo rapidamente nas últimas décadas. No Brasil, segundo dados do IBGE, a expectativa média de vida aumentou de 43,3 em 1950, para 60,1 anos em 1980 e para 71,6 anos em 2004. Tal aumento, associado à crescente difusão de conceitos da Odontologia Preventiva entre profissionais e pacientes, tem contribuído, de maneira geral, para a manutenção de um maior número de elementos dentais em adultos e idosos.

Em virtude da permanência dos elementos dentais na cavidade bucal, por um período mais prolongado de tempo, estudos epidemiológicos realizados mundialmente demonstram que a cárie radicular constitui-se no tipo mais freqüente desta doença a atingir a população idosa. A presença de raízes expostas associada à colonização por um biofilme patogênico específico, controle de placa deficiente e uso de dieta cariogênica, aumentam o risco de lesões cariosas radiculares.

Em superfícies expostas, a possibilidade de desenvolvimento da cárie radicular, frente a um mesmo desafio cariogênico, é maior que a coronária devido à diferença na composição química e estrutural dos tecidos minerais dos dentes, de forma que o cemento e a dentina possuem um pH crítico de dissolução de aproximadamente 6,7 (HOPPENBROUWERS; DRIESSENS; BORGGREVEN, 1987) enquanto que o pH crítico para o esmalte é de 5,5.

Embora grandes avanços tenham sido realizados na técnica restauradora de lesões de superfície radicular, sobretudo devido à evolução da Odontologia Adesiva, limitações clínicas são ainda observadas devido ao difícil acesso à lesão e isolamento do campo operatório. Frente a esse quadro, o conhecimento da doença

cárie radicular, bem como das medidas de prevenção já estabelecidas ou que estão em estudo, parece ser a maneira mais racional de se controlar essa doença e dessa forma evitar, num futuro próximo, a alta prevalência da mesma num grupo populacional que se torna cada vez maior, como é o caso dos idosos.

Uma opção promissora para a prevenção da doença cárie é a utilização da irradiação laser e mais especificamente do laser de CO₂, desenvolvido por Patel, McFarlane e Faust em 1964.

O papel do laser de CO₂ na prevenção de cárie dental tem sido explorado desde os anos 70. Estudos sobre os efeitos deste laser têm se concentrado no aumento da resistência à cárie através da redução da velocidade de desmineralização da subsuperfície de esmalte e dentina, contudo se desconhece as exatas razões que levam à inibição da formação de lesões cariosas com a utilização deste laser.

Os relatos da literatura têm demonstrado que a irradiação do esmalte dental com laser de CO₂, utilizando densidades de energia de 0,3 a 12,5 J/cm², tem promovido redução significativa da perda mineral (FEATHERSTONE et al., 1998; KANTOROWITZ; FEATHERSTONE; FRIED, 1998; KLEIN et al., 2005; TANGE; FRIED; FEATHERSTONE, 2000). Já em relação à dentina, alguns autores relataram a ocorrência de inibição do processo de desmineralização através da formação de zonas de recristalização, fusão e derretimento deste tecido em virtude da utilização de altas densidades de energia. No entanto, considerando que o conteúdo mineral da dentina é muito menor que do esmalte e ela possui características estruturais diferentes, a densidade de energia necessária para modificá-la positivamente em relação à resistência ácida, parece ser menor do que a utilizada para o esmalte.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Nesta Revisão de Literatura serão abordados os temas abaixo relacionados:

2.1 Cárie Radicular

2.2 Emprego do Laser de CO₂ na Prevenção de Cárie em Esmalte

2.3 Emprego do Laser de CO₂ na Prevenção de Cárie em Dentina e Cárie Radicular

Considerando que a quantidade de trabalhos referentes a estes temas é muito grande, optou-se nesta revisão, pela apresentação dos autores de maneira agregada segundo o assunto, a fim de tornar a leitura mais agradável.

2.1 Cárie Radicular

A cárie radicular é uma doença cuja ocorrência está intimamente relacionada com a população adulta e idosa (FURE; ZICKERT, 1990; GUSTAFSSON et al., 1954; JOSHI et al., 1994). Dessa maneira, ao se considerar o fenômeno de envelhecimento populacional observado no Brasil, segundo dados do IBGE(2007), torna-se previsível um aumento na prevalência e incidência das lesões radiculares, como observado em países desenvolvidos (FURE, 1998; HAND; HUNT; BECK, 1988; LOCKER, 1996).

O aumento da expectativa de vida, entretanto, não pode ser considerado um fator determinante para o desenvolvimento da cárie radicular, já que tal doença

pode ser descrita como uma doença multifatorial (MCCOMB, 1994), pois além do fator idade é necessário existir uma interação de condições específicas que levem à formação e progressão das lesões cariosas, tais como a manutenção do elemento dental e subsequente exposição de sua superfície radicular ao ambiente bucal, colonização por um biofilme patogênico específico e uso de dieta cariogênica (FEJERSKOV; NYVAD, 1996).

A cárie radicular requer prévia exposição do cemento e/ou dentina ao meio bucal, sendo que seu desenvolvimento se dá preferencialmente na junção amelo-cementária, considerada como um sítio de maior retenção de placa bacteriana (FEJERSKOV, 1994; FEJERSKOV; NYVAD, 1996; NYVAD; FEJERSKOV, 1982; WEFEL, 1994). A sua etiologia assemelha-se bastante à da cárie coronária, entretanto na raiz a susceptibilidade à desmineralização é maior, já que o pH crítico para que esta lesão ocorra está muito acima do pH crítico para o desenvolvimento da lesão de cárie em esmalte. Enquanto que o pH crítico para o esmalte está em torno de 5,2-5,7, o pH crítico para a dentina ou cemento está em torno de 6,0-6,7 (ELIASSON; KRASSE; SOREMARK, 1992; HOPPENBROUWERS; DRIESSENS; BORGGREVEN, 1987; KELTJENS; SHAEKEN; VAN DER HOEVEN, 1993; WEFEL, 1994).

De acordo com essa maior predisposição à perda de minerais, observa-se que uma dieta mesmo sem altas concentrações de carboidratos pode ser cariogênica para a superfície radicular, se associada à uma microbiota específica (FURE; ZICKERT, 1990; KELTJENS; SHAEKEN; VAN DER HOEVEN, 1993; SEICHTER, 1987; SUMNEY; JORDAN, 1974).

A microbiota da cárie de esmalte tem sido extremamente estudada e parece que os microrganismos que estão intimamente ligados a este processo são

Streptococcus mutans e os *Lactobaccillus* (KIDD, 1989). Em contraste com a cárie de esmalte, a microbiota da cárie radicular tem sido menos estudada (ZAMBON; KASPRZAK, 1995) e compreendida (BRAILSFORD et al., 2001), por este motivo menos informação está disponível sobre os aspectos relacionados com a microbiota da mesma (KIDD, 1989).

Estudos prévios demonstraram a espécie *Actinomyces* como o agente etiológico da cárie radicular, principalmente *A. viscosus* e *A. naeslundii* (JORDAN; KEYES; BELLACK, 1972; SUMNEY; JORDAN, 1974). Entretanto, segundo Van Houte et al. (1990) não há uma correlação positiva entre o aumento de *Actinomyces* e a presença da cárie de raiz, pois a quantidade desses microrganismos foi sempre elevada na superfície radicular, independente do risco e atividade de cárie, levando à conclusão de que não possuem necessariamente potencial de desenvolvimento de cárie em humanos. A reduzida ação dos *Actinomyces* na etiologia da cárie de raiz pode ser atribuída ao seu baixo grau de acidogenicidade (VAN HOUTE et al., 1990), apesar da habilidade dessa espécie em induzir cárie radicular em animais, com dieta rica em carboidratos (JORDAN; KEYES; BELLACK, 1972). Em contrapartida, a superfície da raiz é progressivamente colonizada por *Streptococcus mutans* em função do risco e atividade de cárie, também o aumento da espécie *Lactobaccilli* parece estar relacionado ao desenvolvimento da cárie radicular (ELLEN; BANTING; FLLERY, 1985; RAVALD; HAMPS; BIRKHED, 1986; VAN HOUTE et al., 1990).

A histopatologia da cárie de superfície radicular mostra uma precoce penetração bacteriana no cimento e na dentina (FEJERSKOV; NYVAD, 1996; NYVAD; FEJERSKOV, 1990; SEICHTER, 1987). As bactérias penetram nos espaços mais superficiais e atingem as camadas incrementais do cimento, por onde promovem desmineralização e desorganização (FURSETH, 1971; SCHUPBACH;

GUGGENHEIM; LUTZ, 1990). Assim chegam à dentina, colonizando as fibras colágenas expostas, sendo, provavelmente, responsáveis pelo rompimento das mesmas (NYVAD; FEJERSKOV, 1990; SCHUPBACH; GUGGENHEIM; LUTZ, 1990). Muitas vezes a invasão bacteriana se dá diretamente na dentina, pois em alguns casos o cemento é inexistente, principalmente após a execução de tratamento periodontal (FEJERSKOV, 1994; FEJERSKOV; NYVAD, 1996; WEFEL, 1994). Independente do tipo de tecido envolvido, para que haja degradação enzimática ou até mesmo a remoção mecânica da parte orgânica, é preciso que ocorra uma prévia desmineralização (WEFEL, 1994).

A evolução da cárie radicular é lenta, apesar da solubilidade do cemento e da dentina ser alta e da penetração bacteriana ser mais intensa (FEJERSKOV; NYVAD, 1996; SEICHTER, 1987). Esse fato pode ser atribuído ao menor número de túbulos dentinários na dentina radicular e pela sua maior mineralização, em função da idade (FEJERSKOV; NYVAD, 1996). Outro fator que reduz a velocidade de progressão da cárie radicular é que o biofilme bacteriano formado sobre a raiz é normalmente mais fino, possibilitando um melhor acesso da saliva, o que facilita a redeposição de minerais (NYVAD; FEJERSKOV, 1982).

O processo físico-químico de desmineralização *versus* remineralização que ocorre entre esmalte e o ambiente oral é observado também na superfície radicular. Como a raiz é formada de tecidos mais porosos, esse intercâmbio iônico é mais intenso, e a depender das condições do pH, favorecer-se-á ou não a perda de minerais por parte da raiz, que acontece preferencialmente na subsuperfície (FEJERSKOV; NYVAD, 1996; NYVAD; TEN CATE; FEJERSKOV, 1997). Já a camada superficial da raiz apresenta uma maior mineralização. De acordo com Nyvad, Ten Cate e Fejerskov (1997), não há diferença na quantidade de minerais

entre raízes expostas ou não à cavidade oral, porém, as raízes que tiveram contato com o meio bucal mostram um padrão diferente de distribuição do conteúdo mineral, sendo sua concentração mais intensa na superfície. Isso não só demonstra que a raiz que não esteve em contato com o meio bucal é mais reativa, como também mais susceptível ao desafio cariogênico (HALS; SELVIG, 1977).

Nos últimos anos tem se dado grande ênfase para a prevenção da cárie radicular e até mesmo sua inativação e preservação em estágios iniciais onde ainda não houve cavitação nem envolvimento estético. O controle mecânico do biofilme bacteriano obtido através da escovação, aliado ao uso diário de fluoretos presente nos dentífrícios ou ainda associado à aplicação tópica profissional de flúor, são medidas preventivas e terapêuticas já comprovadas, não só para a cárie coronária, como também para a cárie radicular (FEATHERSTONE, 1994; FEJERSKOV; NYVAD, 1996; WEFEL, 1994). Os íons flúor podem interferir no processo físico-químico da formação e progressão da cárie, inibindo a desmineralização e potencializando a remineralização (TEN CATE, 1999; THEVADASS et al., 1996). Em altas concentrações podem atuar ainda sobre o metabolismo bacteriano, reduzindo a formação de ácidos (HAMILTON, 1990). Contudo, o efeito do flúor é parcial uma vez que não impede a instalação da doença frente a um alto desafio cariogênico, sendo, portanto, necessário o desenvolvimento de métodos alternativos que busquem este objetivo.

2.2 Emprego do Laser de CO₂ na Prevenção de Cárie em Esmalte

Os primeiros pesquisadores a estudar o emprego do laser de CO₂ para o tratamento preventivo da cárie dental foram Stern, Vhal e Sognnaes (1972), os quais relataram uma diminuição da solubilidade do esmalte dental através da fusão e selamento dos poros do esmalte e das irregularidades da superfície.

Desde então uma grande variedade de explicações tem sido dada com relação à alteração da reatividade ácida do esmalte causada pelo emprego do laser de CO₂. Uma das explicações está focada na diminuição da permeabilidade do esmalte aos agentes químicos, causada pela fusão física da superfície do esmalte, como foi relatado anteriormente por Stern, Vhal e Sognnaes (1972). Entretanto, esta hipótese parece ser improvável, considerando-se que o único estudo que executou testes de permeabilidade foi realizado por Borggreven, van Dijk e Driessens (1980), onde encontraram que a irradiação laser aumentou a permeabilidade do esmalte ao invés de diminuí-la. Tais autores sugeriram que a relatada resistência do esmalte irradiado à desmineralização subsuperficial, pode ser devido às mudanças químicas, tais como a perda da matéria orgânica e do carbonato.

Uma outra explicação está focada na combinação da permeabilidade reduzida do esmalte com a redução de sua solubilidade, provocada pelo derretimento, fusão e a recristalização dos cristais do esmalte, selando a superfície do mesmo (NELSON et al., 1986, 1987). Adicionalmente, um composto menos solúvel (monóxido tetracálcico difosfato) foi identificado como sendo um componente da superfície de derretimento e esta camada apresentava redução do conteúdo de carbonato (NELSON et al., 1987). Por outro lado, uma análise da secção transversal

em microscopia eletrônica de transmissão revelou que o derretimento da superfície do esmalte não era homogêneo e ocorria geralmente em áreas limitadas (FERREIRA et al., 1989; POGREL; MUFF; MARSHALL, 1993). Desta forma, parece que o derretimento e a fusão da superfície não são necessários para aumentar a resistência do esmalte à desmineralização (KANTOROWITZ; FEATHERSTONE; FRIED, 1998; MCCORMACK et al., 1995), o que acaba por enfraquecer esta teoria.

Muitos estudos, no entanto, apontam para as alterações químicas que ocorrem na estrutura dental quando irradiada com laser de CO₂ (FOWLER; KURODA, 1986; SATO, 1983) e acreditam que elas sejam as principais responsáveis pelo aumento da resistência ácida do esmalte (FEATHERSTONE, 2000). Algumas das alterações mencionadas nos trabalhos incluem a redução do conteúdo de carbonato, o aumento da concentração de íons hidroxila, a formação de pirofosfatos e a decomposição de proteínas. Acredita-se que essas alterações são capazes de reduzir a solubilidade do esmalte diante de um desafio ácido.

Tais alterações químicas foram verificadas em alguns estudos por meio da espectroscopia FT-Raman (STEINER-OLIVEIRA et al., 2006; YAMADA et al., 2004). Este método não-destrutivo é utilizado para investigar espécies de moléculas, e pode ser aplicado praticamente para análise de qualquer biomolécula, fornecendo informações valiosas e seletivas sobre as mesmas. O espectro Raman de qualquer estrutura mineral, e especialmente de dentes humanos, pode revelar a composição química e estrutural dos componentes orgânicos e minerais. Dessa forma, as bandas geralmente encontradas nos espectros de esmalte e dentina humana são as bandas mais fortes dos modos vibracionais de fosfato ν_1 e de carbonato ν_1 , em uma região que se estende de 300 a 1.100 cm^{-1} (CARTER; EDWARDS, 2001; FATTIBENE et al., 2005; NAUMANN, 2001; NELSON; WILLIAMSON, 1985; TSUDA;

RUBEN; ARENDS, 1996); uma outra região, representativa da fase de colágeno, mostra os modos vibracionais dos grupos orgânicos (amida e CH) na região de 1.200-3.000 cm^{-1} (TRAMINI et al., 2000). A banda na escala de 1026-1072 cm^{-1} pode também representar a vibração do carbonato ν_1 (carbonato tipo B). Observam-se também as bandas que possuem seus picos ao redor de 1243 e 1665 cm^{-1} , as quais podem ser atribuídas às bandas de amida III e de amida I, e a banda em torno de 1450 cm^{-1} aos modos vibracionais de CH_2 e de NH. Há ainda a ocorrência das bandas em torno de 2900 cm^{-1} , atribuídas aos modos vibracionais de ligações C-H (CARTER; EDWARDS, 2001; NAUMANN, 2001).

De acordo com Fowler e Kuroda (1986), as mudanças químicas induzidas pelo laser no esmalte dental supostamente resultam do aquecimento localizado. Assim, os pesquisadores, embasados em resultados de estudos prévios em que o esmalte dental foi progressivamente aquecido em fornos convencionais, correlacionaram as principais mudanças induzidas no esmalte pela elevação da temperatura com os prováveis efeitos na solubilidade do mineral.

Segundo os autores, o aquecimento do esmalte entre 100°C e 650°C promove diminuição do conteúdo de água e de carbonato, sendo que à aproximadamente 350°C ocorre a decomposição protéica. De 650°C a 1100°C, há recristalização térmica com aumento do tamanho dos cristais de hidroxiapatita, formação de fosfato β -tricálcico, perda de água e de carbonato. Temperaturas maiores que 1100°C levam à formação de fosfato tetracálcico e à conversão de fosfato β -tricálcico em fosfato α -tricálcico, compostos substancialmente mais solúveis em ácido que fosfato β -tricálcico, esmalte dental e hidroxiapatita e, portanto, podem aumentar a solubilidade da superfície do mineral. Os pesquisadores sugeriram que as condições de irradiação com laser que produzam temperaturas

localizadas acima de 1200°C podem ter efeitos deletérios na solubilidade do esmalte, aumentando sua susceptibilidade à dissolução ácida.

Por fim, estudo de Hsu et al. (2000) verificou que a matriz orgânica no esmalte também exerce influência sobre a redução da desmineralização do esmalte durante desafio ácido. Os autores investigaram os efeitos da irradiação com laser de CO₂ com densidade de energia de 0,3 J/cm² sobre a desmineralização do esmalte humano com ou sem matriz orgânica. Molares humanos foram separados em dois grupos: a) esmalte normal (EN), com matriz orgânica; b) esmalte sem matriz orgânica (ESMO). Após a irradiação, as amostras foram submetidas à ciclagem de pH (soluções: desmineralizadora pH 4,6 e remineralizadora pH 7,0) durante 4 dias. Na microscopia de luz polarizada, os autores observaram que as amostras irradiadas permaneceram negativamente birrefringentes, sugerindo que a temperatura induzida pelo laser não alcançou 400°C. A microscopia eletrônica de varredura não evidenciou qualquer derretimento superficial, formação de cratera ou elevação das superfícies de esmalte nos grupos irradiados. A extração orgânica não pareceu afetar a morfologia da superfície do esmalte desmineralizado. Por sua vez, a microrradiografia de contato revelou que a irradiação promoveu redução da perda mineral superior a 98% no EN e de 70% no ESMO, demonstrando significativa interação da matriz orgânica com o laser, resultando em efeito cárie-protetora com relação à perda mineral e profundidade de lesão.

Neste contexto, é possível concluir que ainda se desconhece as exatas razões que levam à redução da formação de lesões cáries em esmalte com a utilização do laser de CO₂. Contudo, já está comprovado na literatura que o laser de CO₂, com seu diferentes comprimentos de onda, é capaz de reduzir o processo de desmineralização deste substrato, sendo que cada comprimento de onda

demonstrou promover taxas de redução e mudanças morfológicas distintas quando utilizado para irradiação do esmalte dental.

Os lasers de CO₂ estão incluídos dentro do campo de radiação infravermelha, e apresentam mais de cem diferentes emissões de linhas laser com comprimento de onda que variam de 9 a 11µm, sendo que os quatro principais comprimentos de onda utilizados são: 9,3 µm, 9,6 µm, 10,3 µm e 10,6 µm. Dentre eles, os mais indicados para uso na prevenção da doença cárie, por serem mais bem absorvidos pelos tecidos duros dentais, são o 9,3 µm e o 9,6 µm, entretanto, até o momento, não há laser comercial disponível que possa produzir tais condições (FEATHERSTONE, 2000), de modo que as pesquisas realizadas com estes parâmetros utilizaram protótipos. Assim, vários estudos têm empregado o comprimento de onda 10,6 µm que está presente na maioria dos aparelhos disponíveis no mercado.

Quanto aos comprimentos de onda do laser de CO₂, Nelson et al. (1986) procuraram investigar quais os mais indicados à redução da formação de lesões de cárie *in vitro*. Para tanto, irradiaram o esmalte de dentes humanos com laser TEA-CO₂ (TEA = *transversely excited atmospheric pressure*), com comprimentos de onda 9,3 µm, 9,6 µm, 10,3 µm e 10,6 µm, e densidades de energia de 10-50 J/cm². Após a irradiação, as amostras foram imersas em solução desmineralizadora (pH 5,0) durante 14 dias para formar lesões de cárie. A análise de microdureza demonstrou que os comprimentos de onda 9,3 µm e 10,6 µm foram os mais efetivos na redução de cárie. Lesões significativamente mais rasas e menos desmineralizadas foram encontradas nas amostras irradiadas com o λ 9,3 µm, chegando a reduzir em 50% a desmineralização quando comparadas às do grupo controle. A análise química das soluções desmineralizadoras demonstrou menores concentrações de cálcio e fósforo

por unidade de área que o grupo controle, confirmando os resultados obtidos na microdureza. Segundo os autores, as alterações causadas no esmalte pela irradiação influenciaram a permeabilidade e a hidratação do mineral, alterando seu comportamento de solubilidade durante a formação da lesão de cárie artificial.

No ano seguinte, o estudo de Nelson et al. (1987) examinou a morfologia e a cristalografia da superfície do esmalte humano, bem como o aspecto histológico das lesões de cárie produzidas artificialmente após tratamento com laser TEA-CO₂. A irradiação foi efetuada com os comprimentos de onda 9,3 µm, 9,6 µm, 10,3 µm e 10,6 µm e densidade de energia de 10-50 J/cm². Adicionalmente, a temperatura alcançada na superfície do esmalte durante a irradiação com densidade de energia de 50 J/cm² foi mensurada com auxílio de um pirômetro infravermelho.

Considerando a máxima densidade de energia utilizada (50 J/cm²), os picos de temperatura foram de 1050 ± 40°C, 980 ± 30°C, 835 ± 30°C e 810 ± 30°C para os comprimentos de onda 9,3 µm, 9,6 µm, 10,3 µm e 10,6 µm, respectivamente, e a condutibilidade ficou limitada a 10-20 µm sob a superfície derretida. As profundidades médias das lesões formadas no esmalte irradiado, analisadas pela microscopia de luz polarizada e pela microrradiografia transversal, foram menores que as lesões do grupo controle, chegando a exibir reduções de até 40% em profundidade. Sob microscopia de luz refletida, o λ 10,6 µm não causou qualquer rugosidade significativa na superfície; em contrapartida, 9,6 µm e 9,3 µm produziram, na parte central da região irradiada, uma área bem mais rugosa. A microscopia eletrônica de varredura demonstrou que o λ 10,6 µm produziu no esmalte uma zona de derretimento cuja área central aparentava uma superfície vítrea, lisa e fina. A espectroscopia de infravermelho revelou que as amostras irradiadas com o λ 9,6 µm apresentaram menor conteúdo de carbono (0,59%) que

aquelas não irradiadas (1,63%). Segundo os autores, a irradiação com laser de CO₂ pode ter resultado na redução da permeabilidade e da solubilidade do esmalte, levando à inibição da formação de lesão de cárie.

Os efeitos do laser de CO₂, com diferentes comprimentos de onda, sobre o esmalte dental também foram avaliados por McCormack et al. (1995) com auxílio de MEV. Espécimes de esmalte humano e bovino foram irradiados com os comprimentos de onda 9,3 µm, 9,6 µm, 10,3 µm e 10,6 µm em modo pulsado e densidades de energia de 2, 5, 10 e 20 J/cm² por pulso. O λ 10,6 µm com densidades de energia de 5 ou 10 J/cm² não produziu derretimento do esmalte e fusão dos cristais da superfície, porém promoveu a formação de fendas superficiais distintas associadas com o estresse térmico criado pela interação com o laser. Segundo os autores, este λ pode ter alterado a composição química e estrutural dos cristais de esmalte. Por sua vez, o calor gerado pelos comprimentos de onda 9,3 µm ou 9,6 µm e, em menor extensão 10,3 µm, foi suficiente para causar rápido derretimento da superfície e fusão dos cristais de esmalte em densidades tão baixas quanto 5 J/cm² por pulso.

Featherstone et al. (1998) procuraram determinar os parâmetros ótimos da irradiação com laser de CO₂ que efetivamente potencializariam a redução de cárie no esmalte. Para tanto, coroas de molares e pré-molares foram irradiadas com um dos quatro comprimentos de onda: 9,3 µm, 9,6 µm, 10,3 µm e 10,6 µm e densidades de energia de 1 a 12,5 J/cm² por pulsos. Após a irradiação, as amostras foram submetidas ao processo de ciclagem de pH realizado durante 9 dias (soluções: desmineralizadora pH 4,3 e remineralizadora pH 7,0). A análise de microdureza revelou que as máximas inibições de cárie foram de 85%, 73%, 71% e 68% para os comprimentos de onda 10,6 µm, 10,3 µm, 9,6 µm e 9,3 µm, empregando as

densidades de energia de 12,5 J/cm², 10 J/cm², 5 J/cm² e 1 J/cm², respectivamente. Estes resultados, segundo os autores, foram comparáveis com a redução de cárie produzida por tratamentos diários com dentifrícios fluoretados no mesmo modelo *in vitro*.

Também Kantorowitz, Featherstone e Fried (1998) conduziram um estudo com o objetivo de avaliar o potencial preventivo de várias condições de irradiação, explorar o efeito do número de pulsos usados e correlacionar a redução de cárie com as mudanças na superfície do esmalte por meio da análise de microdureza e da microscopia eletrônica de varredura. Para os comprimentos de onda 9,6 µm e 10,6 µm, a densidade de energia foi de 5 J/cm² e 12 J/cm² por pulso, respectivamente. Após a irradiação, uma ciclagem de pH foi realizada durante 9 dias (soluções: desmineralizadora pH 4,3 e remineralizadora pH 7,0). A microscopia eletrônica de varredura revelou a presença de alterações morfológicas na maior parte das superfícies irradiadas com o λ 9,6 µm, as quais pareceram estar fundidas e compostas por novos cristais maiores que os do esmalte normal. Por sua vez, as áreas tratadas com o λ 10,6 µm mostraram pouca ou nenhuma mudança morfológica, com poucos pontos de fusão, recristalização ou expulsão do esmalte. Na análise de microdureza, todos os grupos tratados com laser apresentaram lesões de cárie significativamente menores quando comparadas às do grupo controle, chegando a promover de 48% a 87% e de 28% a 59% de inibição de cárie para os comprimentos de onda 10,6 µm e 9,6 µm, respectivamente. Segundo os autores, os melhores resultados obtidos com o λ 10,6 µm indicaram que o derretimento da superfície e a fusão não são necessários para aumentar a resistência do esmalte ao desafio ácido.

Klein et al. (2005) investigaram *in vitro* o efeito do laser de CO₂ λ 10,6 μ m, em modo pulsado, sobre a inibição da desmineralização do esmalte ao redor de restaurações de resina composta. Assim, preparos cavitários em blocos de esmalte dental humano tiveram a margem do ângulo cavosuperficial dos espécimes submetida à irradiação com densidades de energia de 8 J/cm² ou 16 J/cm² associada ou não à aplicação posterior de condicionamento ácido + adesivo. Após os tratamentos, os preparos foram restaurados com resina composta e os espécimes submetidos à ciclagem térmica e de pH (soluções: desmineralizadora pH 4,6 e remineralizadora pH 7,0). A desmineralização do esmalte ao redor das restaurações foi quantificada pela análise de microdureza. De acordo com os resultados, as porcentagens de inibição de cárie variaram de 42,7% a 52,8% para os grupos irradiados com 8 J/cm² e de 48,0% a 64,0% para aqueles irradiados com 16 J/cm². O autor concluiu que o uso de laser de CO₂ (λ 10,6 μ m) foi efetivo em inibir a desmineralização adjacente à restauração de resina composta.

Por fim, Steiner-Oliveira et al. (2006) avaliaram os efeitos do laser de CO₂ (λ 10,6 μ m) na morfologia superficial e composição química do esmalte, assim como monitoraram as mudanças de temperatura intrapulpar durante a irradiação de molares humanos com densidades de energia de 1,5-11,5 J/cm². Tais autores observaram que para todos os grupos irradiados, a variação de temperatura intrapulpar foi inferior a 3°C e concluíram que densidades de 10,0 e 11,5 J/cm² poderiam ser aplicadas no esmalte dental no intuito de produzir mudanças químicas e morfológicas capazes de reduzir a reatividade ácida do esmalte sem comprometer a vitalidade pulpar. Tal afirmação em relação à vitalidade pulpar é baseada no estudo de Zach e Cohen (1965), que utilizaram macacos como sujeitos de sua pesquisa e relataram que um aumento na temperatura na ordem de 5,6°C por 5-20 s

foi capaz de causar necrose pulpar em 15% dos casos estudados, enquanto que um aumento de 11°C causou necrose em 60% dos casos, e ainda que um aumento de 16°C por 5-20 s causou necrose pulpar em todos os casos avaliados.

Neste contexto, poucos estudos como o de Steiner-Oliveira et al. (2006), avaliaram o efeito do laser de CO₂ λ 10,6 μm, aplicado no modo pulsado, sobre a variação de temperatura no interior da câmara pulpar. Dentre eles, Malmström et al. (2001) mostraram que, tanto para o esmalte coronário quanto para a superfície radicular, a aplicação de baixos níveis de energia por curto período de tempo (densidade de energia por pulso de 1,2 a 2,6 J/cm², duração do pulso de 100 ou 200 μs, e tempo de exposição de 0,1 ou 0,5 s), não causaria efeitos deletérios ao tecido pulpar, pois a variação de temperatura intrapulpar não excederia 4°C.

2.3 Emprego do Laser de CO₂ na Prevenção de Cárie em Dentina e Cárie Radicular

Em relação à dentina, alguns autores (KANTOLA, 1972; NAMMOUR; RENNEBOOG-SQUILBIN; NYSSSEN-BEHETS, 1992; NELSON; LONGEBLOED; FEATHERSTONE, 1986) relataram a ocorrência de redução do processo de desmineralização através da formação de zonas de recristalização, fusão e derretimento deste tecido em virtude da utilização de altas densidades de energia.

Kantola (1972) avaliou a susceptibilidade da dentina irradiada por diferentes tipos de laser, inclusive o laser de CO₂ com comprimento de onda 10,6 μm, à formação de lesões de cárie artificiais, verificando que a irradiação da dentina

poderia ser usada para aumentar o conteúdo mineral da mesma através da remoção preferencial da água e proteínas inerentes a este tecido. Os pesquisadores sugeriram que a irradiação com laser de CO₂ em modo contínuo e densidade de potência de 0,6 mW/cm² promoveu a recristalização da dentina, crescimento do tamanho dos cristais de hidroxiapatita, e formação de uma dentina de menor grau de cristalinidade, estruturalmente modificada, que se assemelhava à estrutura cristalina da hidroxiapatita do esmalte normal.

Nelson, Longebloed e Featherstone (1986) mostraram a ocorrência de fusão e derretimento em dentina radicular irradiada com o laser de CO₂ com comprimento de onda 9,3 µm e densidade de energia de 50 J/cm², alterações estas que foram relacionadas à porcentagem de redução da formação de lesões de cárie de 50% encontrada neste estudo.

Nammour, Renneboog-Squilbin e Nyssen-Behets (1992) encontraram bons resultados de redução de cárie em dentina irradiada com laser de CO₂ com o comprimento de onda 10,6 µm em modo contínuo e utilizando densidades de energia de 280 a 715 J/cm². Após a irradiação, as amostras foram imersas por 4 semanas em um gel contendo 0,05 mol/L de ácido láctico (pH 4,5). Os autores verificaram a presença de selamento da camada superficial da dentina, a qual dificultou a difusão de ácidos para a dentina sadia subjacente e reduziu significativamente a extensão da lesão de cárie formada. Entretanto, neste estudo, a irradiação a laser não selou completamente a abertura dos túbulos dentinários, possibilitando a difusão dos ácidos pela grande superfície de crateras criada durante o processo de irradiação.

No entanto, considerando que o conteúdo mineral da dentina é muito menor (em torno de 47%) que do esmalte (em torno de 85%) e ela possui características

estruturais diferentes (FEATHERSTONE, 1994), o que também interfere na sua interação com a luz laser (WIDGOR et al., 1995), a densidade de energia necessária para modificá-la positivamente em relação à resistência ácida, parece ser menor do que a utilizada para o esmalte (RODRIGUES et al., 2004).

Desta forma, apenas o estudo de Gao, Pan e Hsu (2006), o qual empregou o laser de CO₂ (λ 10,6 μ m) com densidade de energia de 1,14 J/cm² para irradiação de espécimes de superfície radicular, parece ter empregado parâmetro de irradiação coerente com as características do substrato estudado. Tais autores verificaram através de microscopia de luz polarizada que as profundidades das lesões de cárie radicular formadas após irradiação com laser de CO₂ eram menores do que as do grupo controle e semelhantes as do grupo que utilizou gel de fluoreto de sódio a 2,0%. Adicionalmente, os autores observaram um efeito sinérgico do uso combinado da irradiação laser e aplicação de gel fluoretado, o qual apresentou profundidades de lesão estatisticamente menores do que as do grupo que utilizou somente o laser ou somente o gel fluoretado, e demonstrou uma taxa de inibição de desmineralização de 84,5%, enquanto que o grupo que utilizou somente o laser e o que utilizou somente o gel fluoretado, demonstrou taxa de inibição de 29,8% e 30,8%, respectivamente.

Neste contexto, pode-se observar que são escassos estudos que tenham avaliado o efeito do laser de CO₂ com comprimento de onda 10,6 μ m sobre a prevenção de lesões de cárie de superfície radicular. Assim, é importante a realização de estudos *in vitro* que avaliem parâmetros seguros e ideais de irradiação da dentina radicular com o laser de CO₂ para que se consiga determinar o potencial cariostático que tal laser apresenta.

3 PROPOSIÇÃO

(1) estabelecer a menor densidade de energia do laser do CO₂ que pode ser aplicada à superfície de dentina radicular humana com o intuito de reduzir sua reatividade ácida sem causar danos ao tecido pulpar; (2) investigar as mudanças químicas e morfológicas promovidas nesta superfície pela irradiação com laser pulsado de CO₂, comprimento de onda 10,6 μm com emprego de diferentes densidades da energia.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

Foram utilizados no presente estudo os seguintes materiais e equipamentos:

1- Equipamentos pertencentes ao Laboratório Especial de Laser em Odontologia (LELO) do Departamento de Dentística da FOUSP:

- Equipo odontológico Kavo: seringa tríplice.
- Laser de CO₂ e óculos de proteção (UM-L30, Union Medical Engineering Co., Yangju-si, Gyeongii-Do, Korea – PROJETO FAPESP CEPID/CEPOF, Processo n. 98/14270-8).

2- Equipamentos pertencentes ao Departamento de Dentística da FOUSP:

- Cortadeira metalográfica Labcut Modelo 1010 (Exttec, EUA)
- Disco de corte diamantado (Buehler, Lake Bluff, IL, EUA)
- Lupa estereoscópica (Carl Zeiss 475200/9001- Jena, Alemanha)
- Microdurômetro (HNV-2000, SHIMADZU Corporation, Kyoto, Japão)
- Politriz Ecomet 3 (Buehler, Lake Bluff, IL, EUA)

- Termômetro de radiação infravermelha (IRTEC MINIRAY 100XL NON-CONTACT INFRARED THERMOMETER, E Instruments Group LLC, Trenton, NJ, USA)
- Ultra-som (THORNTON, INPEC Eletrônica SA, Vinhedo, Brasil)

3- Equipamento pertencente ao Instituto de Química da USP:

- Espectrômetro FT-Raman (RFS 100/S – Bruker Inc., Karlsruhe, Alemanha)

4- Equipamento pertencente ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares:

- Microscópio eletrônico de varredura Philipps XL, série 30 (Eindhoven)

5- Materiais utilizados:

- Água destilada e deionizada
- Cera utilidade (Polidental Indústria e Comércio Ltda., Brasil)
- Cera pegajosa (Kerr Corporation, EUA)
- Cola à base de silicone
- Detergente líquido
- Discos de feltro e pastas diamantadas de 6 μm e 3 μm (Buehler, Lake Bluff, IL, EUA)
- Escovas tipo Robinson (KG Sorensen, Brasil)
- Esmalte cosmético vermelho (Risqué, Niasi, São Paulo, Brasil)
- Fio ortodôntico n. 08 (Morelli, Brasil)
- Lixas abrasivas de óxido de alumínio (3M ESPE, Brasil)

- Quarenta e oito (48) terceiros molares humanos hígidos
- Papel absorvente
- Pasta de alumina de 5 µm (Buehler, Lake Bluff, IL, EUA)
- Pinça metálica
- Pistola para cola quente
- Recipientes de poliestireno – 50 mL (Falcon)
- Resina acrílica quimicamente ativada
- Solução remineralizadora e desmineralizadora
- Solução de timol a 0,1% e 0,01%
- *Sample cups*
- Vidrarias (béquer, pipetas, balão volumétrico)

4.2 Métodos

4.2.1 Aspectos éticos

O presente estudo foi conduzido após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, conforme Protocolo 148/06 (Anexo A).

4.2.2 Delineamento experimental

O fator em estudo foi o Tratamento Superficial aplicado à superfície de dentina radicular, analisado em dois estudos conforme ilustrado na Figura 4.1:

- Determinação dos parâmetros do laser de CO₂ seguros e efetivos para redução da desmineralização da superfície de dentina radicular. Nesta etapa, o fator em estudo foi dividido em 5 níveis, sendo 4 experimentais e um controle (sem tratamento). As unidades experimentais foram compostas de 75 espécimes de dentina radicular obtidos de 38 terceiros molares humanos hígidos (n = 15). A variável de resposta Redução da desmineralização da dentina radicular foi avaliada por meio do cálculo da área de perda mineral (ΔZ) enquanto aquela da Variação de temperatura no interior da câmara pulpar foi avaliada por meio de mensuração com termômetro de radiação infravermelha.

- Efeito do laser de CO₂ na morfologia e composição química da dentina radicular: avaliação de possíveis mudanças químicas e morfológicas ocorridas nos espécimes de dentina radicular decorrentes da irradiação com laser de CO₂. Nesta etapa o fator em estudo foi dividido em 4 níveis, correspondentes aos quatro diferentes parâmetros do laser de CO₂ utilizados na etapa anterior. As unidades experimentais foram compostas de 20 espécimes de dentina radicular (n = 5) obtidos de 10 terceiros molares humanos hígidos. As variáveis de resposta Mudança Química e

Morfológica foram avaliadas por meio da análise dos espectros obtidos pela Espectroscopia FT-Raman e pela análise visual comparativa das fotomicrografias obtidas pela Microscopia Eletrônica de Varredura.

Figura 4.1 - Ilustração representativa do delineamento experimental realizado no presente estudo

4.2.3 Preparo dos espécimes

Os dentes foram armazenados em solução de timol 0,1% pelo período mínimo de 30 dias, após limpeza com curetas periodontais, seguida de uma profilaxia com escova Robinson em baixa rotação e pasta de alumina (5 μm) durante 30 s e a dois banhos de ultra-som de 30 s cada. Posteriormente, os dentes foram examinados sob lupa estereoscópica com aumento de 10X, descartando-se aqueles

com trincas ou anomalias de estrutura e mantidos em meio úmido a 4°C até a sua utilização.

Para a obtenção dos espécimes de dentina radicular, os dentes foram fixados a uma máquina de corte para remoção da porção coronária, a 1 mm além da junção amelo-cementária (Figura 4.4A), a qual foi descartada. Novas secções foram feitas na porção radicular de cada elemento dental de modo a obter dois espécimes (Figura 4.4B). As secções foram identificadas para que os dois espécimes do mesmo dente não fossem usados no mesmo grupo.

Em seguida, os espécimes de dentina foram aleatoriamente divididos entre os 5 grupos de tratamento, como descrito na Figura 4.1.

4.2.4 Variação de temperatura

Com o objetivo de se garantir que os parâmetros do laser de CO₂ utilizados neste estudo não causariam uma variação de temperatura na parte interna da amostra (região dos canais radiculares) acima dos limites considerados seguros para a vitalidade pulpar (ZACH; COHEN, 1965), foi realizada uma análise termográfica durante as irradiações com o laser de CO₂, com o auxílio de um termômetro de radiação infravermelha.

Para a análise termográfica foi utilizado o termômetro de Radiação Infravermelha, que é uma ferramenta empregada na manutenção e monitoramento periódico de processos na medição rápida e simples das temperaturas em contato com o alvo ou a certa distância. Uma ponteira metálica auxiliar com superfície plana

de 6 mm de diâmetro ou uma mira a laser com 12 mm de diâmetro podem ser utilizadas para a identificação da área da superfície a ser medida.

Esse equipamento liga e desliga através de um gatilho presente na sua haste e basta acioná-lo apenas uma vez para qualquer uma dessas funções. O mesmo desliga-se automaticamente se nenhuma tecla for pressionada por mais de 40 segundos. Possui teclas localizadas logo abaixo do visor que comandam as funções básicas do termômetro e um foco espectral de 8 a 14 μm e faixa de operação entre -32°C e 520°C (Figura 4.2). O termômetro foi calibrado contra uma fonte de radiação de emissividade previamente calibrada por um padrão de transferência Land Modelo Cyclops300, Certificado de Calibração nº 4274/05, emitido pelo IMETRO. O termômetro tem emissividade ajustável de 0,30 a 1,0.

A emissividade é uma medida da capacidade de um objeto absorver, transmitir e emitir energia infravermelha. De acordo com os objetos, essa emissividade pode variar de 0,0 (espelho brilhante) a 1,0 (corpo negro). Para o correto monitoramento da variação da temperatura, houve a necessidade de se padronizar a emissividade das amostras. Desta forma, a emissividade das amostras foi determinada da seguinte forma:

- Utilizou-se uma tinta spray preta que foi aplicada sobre toda a superfície de uma amostra. Um objeto inteiramente coberto por tinta preta possui uma emissividade padrão de 0,98;
- A amostra preta foi então posicionada perpendicularmente à sonda acessória do termômetro de radiação infravermelha, de forma que toda a sua superfície tocava na sonda do termômetro. O gatilho do termômetro foi mantido pressionado até aparecer no visor os valores da emissividade e esta foi ajustada até o valor de

0,98. Após o ajuste da emissividade, o gatilho do termômetro foi novamente acionado para obtenção da temperatura, por exemplo, 22°C;

- Obtida a temperatura, uma amostra que não foi pintada com tinta preta foi posicionada perpendicularmente à sonda do termômetro de forma que as superfícies se tocavam perfeitamente. A emissividade foi ajustada até atingir a mesma temperatura (22°C).

Assim, foi padronizada a emissividade das amostras em 0,95.

Para padronização das irradiações e das medições de temperatura, foi utilizado um dispositivo desenvolvido por Ciaramicoli (2004), o qual permite a fixação das amostras e do termômetro de irradiação infravermelha (Figura 4.2).

A temperatura inicial foi padronizada em 24°C para possibilitar o monitoramento da variação de temperatura, à medida que a irradiação laser era aplicada.

No dia anterior à realização das irradiações, os espécimes foram colocados em estufa a 37°C e mantidos a esta temperatura até o início das irradiações. Posteriormente, cada espécime era fixado no centro do dispositivo e as irradiações tinham início somente após as amostras terem atingido a temperatura de 24°C. Tal temperatura era determinada utilizando-se o termômetro de radiação infravermelha com auxílio de sua ponteira metálica, de modo que esta ficava totalmente em contato com o espécime no lado oposto ao que seria irradiado.

Este íntimo contato da ponteira do termômetro com o espécime foi conseguido através da planificação prévia da porção interna, correspondente à dentina do canal radicular de cada espécime, com auxílio de lixas abrasivas em

Politriz. Posteriormente, a espessura de dentina de cada espécime foi mensurada em três pontos distintos, sendo o primeiro no centro do espécime, o segundo em sua extremidade direita e o terceiro em sua extremidade esquerda. Assim, foi obtida uma média de espessura para cada espécime, a qual foi posteriormente relacionada com a variação de temperatura registrada.

As irradiações foram então realizadas com os diferentes parâmetros do laser de CO₂, de forma que para cada espécime a temperatura foi monitorada por todo o período de irradiação, acrescentando-se alguns segundos após o término das mesmas, visando à observação do declínio da temperatura.

Figura 4.2 - Termômetro de radiação infravermelha e termômetro posicionado no dispositivo que também permite a fixação das amostras

4.2.5 Tratamento da superfície de dentina radicular com laser pulsado de CO₂

A irradiação das superfícies de dentina radicular foi realizada no Laboratório Especial de Laser em Odontologia (LELO), da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo usando um laser de CO₂ pulsado, com comprimento de onda de 10,6 μm (Figura 4.3). Segundo as especificações do aparelho, o modo de emissão pode ser contínuo com potência média de até 10 W, ou pulsado com potência de até 6 W, enquanto a duração de pulso pode variar de 50 a 500 ms. A seleção dos parâmetros da irradiação foi baseada em estudo prévio de Steiner-Oliveira et al. (2006) realizado em esmalte.

A irradiação dos espécimes foi realizada com a taxa de repetição fixa de 50 Hz, duração do pulso de 10 ms, 10 ms de *time off*, diâmetro do feixe de 0,3 mm e as potências utilizadas para os grupos G2, G3, G4 e G5 foram 0,5 W, 0,6 W, 0,7 W e 0,8 W, respectivamente. A potência ajustada no aparelho foi confirmada através de medição por meio de potenciômetro (Coherent Radiation – Palo Alto Model – 201), de modo que as potências médias aferidas para tais grupos foram 0,17 W, 0,27 W, 0,37 W e 0,42 W. As densidades de energia, nessas condições de irradiação, foram de aproximadamente 2,5 J/cm² (G2), 4,0 J/cm² (G3), 5,0 J/cm² (G4) e 6,0 J/cm² (G5). A irradiação foi realizada com a ponta ativa do laser perpendicular à superfície dental a uma distância de 5 mm da mesma por um período de 10 segundos, percorrendo-se toda a superfície de dentina radicular previamente delimitada (área de 4 x 4 mm) com auxílio de lápis preto.

Figura 4.3 - Equipamento de laser de CO₂ e ponta utilizada para o procedimento de irradiação dos espécimes

4.2.6 Ciclagem de pH

Após a irradiação dos espécimes, foi realizada a delimitação da área de dentina que seria exposta às soluções desmineralizadora e remineralizadora durante a ciclagem de pH. Cada espécime foi recoberto totalmente com verniz ácido resistente (esmalte de unha cosmético na cor vermelho), deixando-se uma área de dentina exposta (janela) medindo 2 x 2 mm (Figura 4.4C).

Para a realização da ciclagem de pH foi utilizado o modelo descrito por Kawasaki e Featherstone (1997).

Cada espécime foi fixado, com cola à base de silicone aquecida com auxílio de uma pistola específica (“pistola para cola quente”), à ponta de um fio ortodôntico (n. 08), preso à tampa do recipiente de poliestireno (Falcon), a qual, por sua vez, apresentava-se fixada juntamente com outras 14 tampas, também com auxílio de cola à base de silicone, à tampa de um recipiente plástico de utilidade doméstica (Figura 4.4D), de modo que os 15 espécimes de cada grupo estudado ficassem suspensos nas soluções desmineralizadora e remineralizadora durante a ciclagem de pH (Figura 4.4E).

A ciclagem de pH foi realizada durante 5 dias, nos quais os espécimes de dentina foram imersos por 3 h em solução desmineralizadora e por aproximadamente 21 h em solução remineralizadora. Durante este período, os espécimes foram lavados com água deionizada duas vezes ao dia (antes e após imersão na solução desmineralizadora) por 10 segundos e secos com papel absorvente. Após o quinto dia, os espécimes permaneceram em solução remineralizadora por dois dias (correspondente aos dias do final de semana).

Os espécimes foram mantidos individualmente em solução desmineralizadora contendo 2,0 mmol/L Ca, 2,0 mmol/L P em 75 mmol/L de tampão acetato, pH 4,8. A solução remineralizadora utilizada continha 1,5 mmol/L Ca, 0,9 mmol/L P, 150 mmol/L KCl em 20 mmol/L tampão Tris, pH 7,0. A composição química desta solução aproxima-se do grau de saturação dos minerais da apatita encontrados na saliva, sendo semelhante à usada por Ten Cate e Duijsters (1982). Ambas as soluções continham cristais de timol para evitar o crescimento bacteriano e foram preparadas usando os mesmos reagentes como fontes de cálcio e fosfato.

Foram utilizados 6,25 ml/mm² e 3,12 ml/mm² das soluções des e remineralizadora respectivamente, por área de tratamento. Durante todo o processo, os espécimes permaneceram em estufa ajustada a 37°C, exceto nos intervalos de lavagem e alternância das soluções. Terminada a ciclagem de pH, os espécimes foram lavados com jatos de água destilada e deionizada durante 10 s, secos com papel absorvente e mantidos em ambiente fechado, úmido e sob refrigeração até o preparo para leitura de microdureza.

4.2.7 Análise de microdureza

Concluída a ciclagem de pH, os espécimes foram seccionados no centro da janela de dentina exposta (Figura 4.4F), utilizando-se a máquina de corte de precisão Labcut com disco diamantado de 0,3 mm de espessura, sob refrigeração. Posteriormente, uma das metades de cada espécime foi selecionada, e posicionada no centro de um tubo de plástico semi-rígido (*Sample cups*), de modo que ficasse

incluída na resina acrílica que foi vertida sobre esta, deixando a parte interna (seccionada) do espécime exposta (Figura 4.4G). Após a polimerização da resina, os tubos plásticos foram removidos e os espécimes foram polidos com lixas d'água em ordem decrescente de granulação #600 e #1000, pelo tempo de 1 e 5 minutos, respectivamente. Discos de feltro com pasta de diamante de 6 μm (2 minutos) e 3 μm (4 minutos) também foram utilizados após o polimento com as lixas. Entre a troca das lixas todos os espécimes foram submetidos a banho de ultra-som com água destilada e deionizada, durante 3 min, e entre as pastas/suspensão com detergente líquido comum diluído em água, durante 5 min. Em seguida, foram lavados abundantemente em água destilada e deionizada e armazenados em ambiente úmido, fechado e sob refrigeração até sua utilização.

A avaliação da resistência da dentina à desmineralização foi realizada por meio do teste de microdureza Knoop. As impressões foram realizadas mantendo-se o longo eixo do diamante do penetrador perpendicular à superfície de dentina e utilizando-se carga estática de 5 g durante 5 s, em pontos distintos, porém com distâncias padronizadas. Duas colunas com 15 impressões cada (30 impressões por espécime), foram realizadas em cada corpo-de-prova, iniciando-se a partir de 20 μm da superfície de dentina, seguindo-se até a profundidade de 100 μm , com intervalos de 10 μm entre as impressões, e de 125-250 μm , com intervalos de 25 μm entre elas, conforme ilustra a Figura 4.4H.

Figura 4.4 - Ilustração representativa da análise de microdureza e das impressões realizadas nos espécimes durante esta análise

Para verificação do potencial do laser de CO₂ de reduzir a desmineralização da superfície de dentina, foi realizado o cálculo da perda mineral, onde as médias dos valores de dureza Knoop, obtidos em cada profundidade, foram transformadas em porcentagem de volume mineral (% vol) pela fórmula proposta por Featherstone et al. (1983), onde KNP (*Knoop Hardness Number*) representa a dureza Knoop média em cada profundidade avaliada:

$$\% \text{ vol} = 4,3 \times (\text{KHN})^{1/2} + 11,3$$

Os valores de microdureza utilizados no presente estudo, representam uma quantificação indireta do conteúdo mineral. Featherstone et al., (1983) verificaram,

em estudo comparativo, que a porcentagem de volume mineral (%vol) determinada pela microrradiografia, também pode ser calculada por meio da microdureza em corte transversal aplicando-se a fórmula descrita acima. O coeficiente de correlação encontrado foi de 0,919 e os pesquisadores concluíram que a técnica de microdureza pode ser utilizada não somente na comparação de alterações de dureza, bem como uma medida de perda/ganho mineral resultante de processos de desmineralização e remineralização.

Adicionalmente, a porcentagem de redução de desmimeralização da dentina radicular (% ΔZ_{des}) foi calculada para os grupos experimentais, utilizando-se a seguinte relação:

$$\% \Delta Z_{des} = \frac{(\Delta Z_{Controle} - \Delta Z_{Tratamento}) \times 100}{\Delta Z_{Controle}}$$

4.2.8 Análise por Espectroscopia FT-Raman e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Adicionalmente, com o intuito de avaliar as mudanças químicas e morfológicas promovidas pelos tratamentos sem a interferência do processo de ciclagem de pH, 20 espécimes foram obtidos e tratados de acordo com o parâmetro de cada grupo experimental descrito anteriormente (n=5), excetuando-se o grupo controle negativo que não recebeu nenhuma forma de tratamento, e foram

analisados através do teste espectroscopia Raman com Transformada de Fourier (FT-Raman) seguido da análise por microscopia eletrônica de varredura.

Para a espectroscopia FT-Raman, os espécimes foram colocados no posicionador de espécimes e as lentes IR354 coletaram a dispersão de radiação em torno de 180°. Os espectros dos espécimes foram obtidos utilizando-se o equipamento FT-Raman Spectrometer com um Ge detector de diodo refrigerado por N₂ líquido. Para a excitação do espectro, foi utilizada a linha $\lambda = 1.064,1$ nm focada de um equipamento de laser de Nd:YAG ar-refrigerado. A maior potência de laser incidente sobre as superfícies das amostras foi de aproximadamente 70 mW e a resolução do espectro foi de 4 cm⁻¹. Os espectros FT-Raman foram obtidos realizando-se 150 varreduras com frequência explorada variando de 100 a 3.500 cm⁻¹, sendo que foram obtidos 5 espectros de 5 diferentes pontos de uma área circular de 2 mm de diâmetro delimitada com lápis preto na superfície de cada espécime. Os espectros foram obtidos antes e após a irradiação da área delimitada.

A avaliação das mudanças nas estruturas minerais e orgânicas foi executada comparando-se a relação entre as intensidades relativas dos picos em 1070 (carbonato/fosfato), 1250-1700 (proteínas – essencialmente colágeno), e 3.000 cm⁻¹ (amida e CH) com o pico de 970 cm⁻¹ (fosfato). Este procedimento baseia-se na suposição de que a relação das intensidades integradas dos modos de estiramento simétrico e anti-simétrico do íon fosfato não deve mudar (WENTRUP-BYRNE et al., 1997). Desta forma, os cinco espectros obtidos antes da irradiação laser foram comparados entre si quanto à intensidade das referidas bandas e foi obtida uma média de intensidade para cada banda. O mesmo procedimento foi realizado para os espectros obtidos após a irradiação laser, e posteriormente as médias obtidas antes e após a irradiação foram utilizadas para análise estatística.

Após a análise com a espectroscopia FT-Raman, os espécimes foram clivados longitudinalmente através da área exposta de dentina. Posteriormente, uma das metades de cada espécime foi preparada para análise em Microscópio Eletrônico de Varredura da seguinte maneira: imersão em solução de glutaraldeído 2,5% por 4 horas, seguido de 3 lavagens de 5 min cada com Tampão Fosfato 0,1 M, desidratação em graus ascendentes de etanol: 30% (10 min), 50% (10 min), 70% (10 min), 90% (10 min), 96%(10 min) e 100% (20 min). Após a desidratação, os espécimes foram submetidos a um processo de secagem química com o objetivo de minimizar as alterações da superfície a ser examinada, favorecendo a deposição subsequente da camada de ouro, a fim de tornar o campo a ser visualizado mais nítido. Para a secagem química, os espécimes foram mantidos por 20 minutos em uma solução de HMDS. Todos estes procedimentos foram realizados no interior de uma capela de exaustão de gases.

Em seguida, foram colados em *stubs*, onde a superfície e o lado do corte de cada espécime foram cobertos com uma fina camada de ouro (aproximadamente 10-12 nm de espessura). As observações através da análise em MEV foram então realizadas em um Microscópio Eletrônico de Varredura com 15 kV e aumento de 2.500 e 5.000 $\times$.

4.2.9 Análise estatística

A primeira variável de resposta analisada foi a perda mineral do substrato, representada pelo parâmetro ΔZ , tendo os tratamentos da dentina como fonte de

variação. Para a análise dos dados utilizou-se o Programa SPSS 14.0 para Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA). Foram verificadas as pressuposições necessárias para a Análise de Variância (ANOVA). Os dados referentes à variável de resposta Desmineralização do Substrato (ΔZ), apresentaram distribuição normal e homogeneidade de variâncias. Comparações múltiplas entre médias, por meio do Teste de Tukey, ao nível de significância de 5%.

Para a análise termográfica, foi inicialmente realizada uma análise geral das médias de espessura dos espécimes, observando-se que a distribuição das mesmas era normal e homogênea, o que permitiu a realização da Análise de Variância (ANOVA). Este teste, por sua vez, não demonstrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos, permitindo assim a comparação direta dos valores de variação de temperatura (ΔT) dos diferentes grupos de irradiação com o laser de CO₂. Desta forma, como os valores de ΔT apresentaram uma distribuição normal e homogênea, foi realizada ANOVA e o teste de Tukey para comparações múltiplas entre as médias.

Por fim, para a espectroscopia FT-Raman, as áreas relativas sob os picos foram calculadas pelo software Microcal Origin5.0[®] e utilizadas para determinação da intensidade de cada banda. As mudanças em estruturas minerais e orgânicas foram avaliadas comparando a intensidade relativa dos picos. Após o teste de Kolmogorov e de Smirnov ter verificado a distribuição normal dos dados de FT-Raman, a análise estatística dos resultados de FT-Raman foi executada pelo teste t em um nível de confiança de 95%, usando o software BioEstat 3.0, a fim de se comparar a área relativa sob os picos dos dados da dentina normal e irradiada com os diferentes parâmetros do laser de CO₂.

5 RESULTADOS

5.1 Variação de temperatura

Pela análise termográfica observou-se uma pequena variação de temperatura, menor que $0,9^{\circ}\text{C}$ para todos os grupos irradiados. Os grupos G4 e G5, irradiados com $5,0$ e $6,0 \text{ J/cm}^2$, respectivamente, apresentaram variação de temperatura semelhante entre si e estatisticamente superior ao grupo G2, irradiado com $2,5 \text{ J/cm}^2$.

A Figura 5.1 ilustra a variação de temperatura de acordo com as densidades de energia (J/cm^2) dos grupos irradiados com o laser de CO_2 .

Figura 5.1 - Representação gráfica da variação de temperatura de acordo com as densidades de energia (J/cm^2) empregadas. As barras representam o desvio-padrão. Letras distintas indicam diferença estatisticamente significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

5.2 Efeito do laser de CO_2 na desmineralização da dentina radicular

Os valores de perda mineral ($\Delta Z = \% \text{ vol} \times \mu\text{m}$) para cada tratamento, bem como a porcentagem de redução da desmineralização da dentina radicular de acordo com os tratamentos realizados, estão descritos na Tabela 5.1.

Tabela 5.1 Médias e desvios-padrão da perda mineral (ΔZ) e porcentagem de redução da desmineralização da dentina radicular após a irradiação com laser de CO₂ e ciclagem de pH

Grupos (n=15)	ΔZ (% vol x μm)	Redução da desmineralização (%)
G1 - Controle	2587,32 $\pm$ 378,99 b	
G2 - 2,5 J/cm ²	2513,42 $\pm$ 303,12 b	2,86
G3 - 4,0 J/cm ²	2114,27 $\pm$ 290,25 a	18,28
G4 - 5,0 J/cm ²	2145,53 $\pm$ 227,87 a	17,05
G5 - 6,0 J/cm ²	2054,46 $\pm$ 282,36 a	20,59

Médias seguidas por letras distintas diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey (p<0,05).

No presente estudo, observou-se uma redução de desmineralização da dentina radicular que variou de 2,86% a 20,59%. Em relação aos grupos G1 (controle) e G2 (2,5 J/cm²), a irradiação da dentina radicular com densidades de energia de 4,0 J/cm² (G3), 5,0 J/cm² (G4) e 6,0 J/cm² (G5) promoveu uma redução de perda mineral da dentina significativamente maior (p<0,05) (Tabela 5.1). A análise da Tabela 5.1 evidencia também que com a densidade de energia de 4,0 – 6,0 J/cm² não foram observadas diferenças significativas na redução da perda mineral (ΔZ) dos espécimes de dentina submetidos à irradiação com laser de CO₂ (p>0,05). Adicionalmente, verificou-se que a perda mineral do grupo G1 não diferiu significativamente (p>0,05) daquela obtida para o grupo G2.

A Figura 5.2 ilustra a perda mineral média dos grupos estudados.

Figura 5.2 - Representação gráfica da perda mineral da dentina radicular de acordo com os tratamentos empregados. As barras representam o desvio-padrão

5.3 Aspectos químicos da dentina irradiada

Os espectros médios obtidos pela Espectroscopia FT-Raman dos grupos G2 e G5, que foram escolhidos para representar todos os grupos irradiados, pois se tratam das duas extremidades de densidades de energia utilizadas, são mostrados na Figura 5.3 e Figura 5.4. A análise espectral mostrou duas partes características: primeiramente, uma região que se estende de 300 a 1.100 cm^{-1} , característica de agrupamentos de fosfato e representativa da fase mineral da dentina; uma outra região, representativa

da fase de colágeno, mostra os modos vibracionais dos grupos orgânicos (amida e CH) na região de 1.200-3.000 cm^{-1} . As bandas de FT-Raman em ν_2 (430-450 cm^{-1}), em ν_4 (585-612 cm^{-1}), em ν_1 (960 cm^{-1}) e em ν_3 (1026-1072 cm^{-1}) representam as vibrações do fosfato na hidroxiapatita. A banda na escala de 1026-1072 cm^{-1} pode também representar a vibração do carbonato ν_1 (carbonato tipo B). Todos os espectros dos espécimes irradiados com ambas as densidades de energia do laser de CO_2 foram estatisticamente semelhantes aos espectros dos espécimes não-irradiados ($p > 0,05$). A Tabela 5.2 mostra os valores médios e os desvios-padrão para a área sob cada pico para os espécimes não-irradiados e irradiados dos grupos G2 e G5.

Figura 5.3 - Espectros médios de Raman do grupo G2 antes e após a irradiação com 2,5 J/cm^2 , destacando-se a fase mineral (A) e a fase orgânica (B) da dentina radicular

Figura 5.4 - Espectros médios de Raman do grupo G5 antes e após a irradiação com $6,0 \text{ J/cm}^2$, destacando-se a fase mineral (A) e a fase orgânica (B) da dentina radicular

Tabela 5.2 - Valor médio e desvio-padrão para a área sob cada pico para os espécimes não-irradiados e irradiados dos grupos G2 e G5

Picos Raman													
Grupos J/cm2	430				580 - 612				960				
	NI		I		NI		I		NI		I		
G2 2,5	0.42	0.01	0.41	0.02	0.33	0.01	0.31	0.02	1.00	0.00	1.00	0.00	
G5 6,0	0.41	0.01	0.39	0.01	0.33	0.01	0.31	0.01	1.00	0.00	1.00	0.00	

5.4 Aspectos morfológicos da dentina irradiada

As fotomicrografias apresentadas nas figuras de 5.5 a 5.9 ilustram o aspecto morfológico da superfície de dentina não-irradiada como também daquela irradiada com densidades de energia de $2,5$ a $6,0 \text{ J/cm}^2$. Na figura

5.5 observa-se o aspecto morfológico da dentina não-irradiada com a presença de superfície mineralizada de aspecto granular e discreta exposição das embocaduras dos túbulos dentinários, compatíveis com a estrutura normal da superfície dentinária radicular. Da mesma forma, a dentina irradiada com densidade de energia de $2,5 \text{ J/cm}^2$ (Figura 5.6) mostrou um aspecto morfológico semelhante àquele notado na dentina não-irradiada. Por outro lado, quando a dentina foi irradiada com densidades de energia de 4,0 a $6,0 \text{ J/cm}^2$ (Figuras 5.7, 5.8 e 5.9), foram observadas alterações morfológicas, como a formação de irregularidades na dentina radicular, indicativas de fusão e resolidificação deste tecido, alterações estas que se mostraram com graus variados conforme o aumento da densidade de energia. Adicionalmente, verificou-se a presença de trincas na superfície dentinária irradiada, as quais foram mais evidentes nos espécimes irradiados com 5,0 e $6,0 \text{ J/cm}^2$.

Figura 5.5 – Fotomicrografia de espécime do grupo controle. Presença de superfície mineralizada e discreta exposição das embocaduras dos túbulos dentinários

Figura 5.6 - Fotomicrografia de espécime do grupo G2 (laser de CO₂ - 2,5 J/cm²). Aspecto morfológico semelhante àquele notado na dentina não-irradiada, exceto pela presença de fendas

Figura 5.7 - Fotomicrografias de espécime do grupo G3 (laser de CO₂ – 4,0 J/cm²). Presença de áreas com aparência amorfa (setas) (B)

Figura 5.8 - Fotomicrografias de espécime do grupo G4 (laser de CO₂ – 5,0 J/cm²). Pode-se verificar que a dentina apresenta um padrão distinto da dentina normal (A). Há o aumento da irregularidade superficial e as embocaduras dos túbulos dentinários encontram-se abertas. Observa-se a presença de fendas maiores (*) (A) e sulcos mais profundos entre os picos (seta) (B)

Figura 5.9 - Fotomicrografias de espécime do grupo G5 (laser de CO₂ – 6,0 J/cm²). Pode-se verificar que a dentina apresenta um padrão distinto da dentina normal (A). Há aumento da irregularidade superficial, com as embocaduras dos túbulos dentinários abertos. Observa-se a presença de fendas maiores (*) e sulcos mais profundos entre os picos (setas) (B)

6 DISCUSSÃO

Há na literatura um grande número de estudos que relatam à ação do laser de CO₂ na prevenção de cárie no esmalte (FEATHERSTONE, 2000; NELSON; LONGEBLOED; FEATHERSTONE, 1986; NELSON et al., 1986, NELSON et al., 1987; STEINER-OLIVEIRA et al., 2006; STERN; VAHL; SOGNAES, 1972). Durante a irradiação do esmalte dental com laser de CO₂ há eficiente conversão da luz laser em calor, o que causa o aquecimento da hidroxiapatita na superfície e na subsuperfície próxima, a uma temperatura superior à 400°C (FEATHERSTONE, 2000). Isto pode promover desde a redução do conteúdo de carbonato até o derretimento e a recristalização da hidroxiapatita (FERREIRA et al., 1989; KANTOLA; LAINE; TARNA, 1973; KURODA; FOWLER, 1984; MCCORMACK et al., 1995; NELSON et al., 1987) e reduzir a dissolução do esmalte durante o desafio ácido.

O laser de CO₂ apresenta quatro principais comprimentos de onda no espectro infravermelho: 9,3 µm, 9,6 µm, 10,3 µm e 10,6 µm. Dentre esses, os mais indicados para uso na prevenção da cárie, por serem melhor absorvidos pela hidroxiapatita e promoverem o aquecimento eficiente e rápido deste mineral, são os comprimentos de 9,3 µm e 9,6 µm. Até o momento, entretanto, não há laser comercial disponível que possa produzir tais condições (FEATHERSTONE, 2000), de modo que as pesquisas realizadas com estes parâmetros utilizaram protótipos.

Estudos que utilizaram o laser de CO₂ com comprimento de onda 10,6 µm densidades de energia de 0,3 a 12,5 J/cm², tem promovido redução significativa da perda mineral (FEATHERSTONE et al., 1998; KANTOROWITZ; FEATHERSTONE;

FRIED, 1998; KLEIN et al., 2005; TANGE; FRIED; FEATHERSTONE, 2000; STEINER-OLIVEIRA et al., 2006). Estes resultados, juntamente com a possibilidade de utilizar essa tecnologia disponível no mercado na prevenção da cárie, têm estimulado o desenvolvimento de novas pesquisas com o λ 10,6 μm .

No entanto, quando se refere à dentina e/ou ao cimento, tecidos que compõem a superfície radicular, poucos estudos foram realizados com o objetivo de demonstrar o efeito do laser de CO_2 na redução da desmineralização desses substratos. A dentina possui um conteúdo mineral em torno de 47%, 33% de proteínas e lipídios e 20% de água (FEATHERSTONE, 1994), o que diminui a contribuição da fase mineral e enfatiza o papel da água e da proteína na absorção de luz por este tecido (WIDGOR et al., 1995). Como o esmalte, a absorção da luz pela dentina é baixa na região do espectro visível, porém, esse tecido possui a característica de promover maior espalhamento de energia do que o esmalte (FEATHERSTONE, 2000; WIDGOR et al., 1995). Esse fato pode ter consequências negativas sobre a interação da luz laser com o tecido, tais como a vaporização subsuperficial, o aparecimento de fendas e a necrose pulpar. A dentina encontra-se em uma posição mais próxima à polpa do que o esmalte, e dessa forma, o calor aplicado à sua superfície é transmitido mais rapidamente ao tecido pulpar.

Neste contexto, o objetivo do presente estudo foi estabelecer a menor densidade de energia do laser de CO_2 com comprimento de onda 10,6 μm que pudesse ser aplicada à dentina radicular humana a fim de aumentar a resistência ácida da mesma, sem que houvesse qualquer dano ao tecido pulpar.

Na presente pesquisa, a análise termográfica mostrou uma pequena variação de temperatura durante a irradiação da superfície radicular, que não excedeu 0,9°C, mesmo quando a maior densidade de energia, 6,0 J/cm^2 (duração do

pulso de 10 ms e tempo de exposição de 10 s), foi empregada. Até o presente, poucos estudos avaliaram o efeito do laser de CO₂ λ 10,6 μ m, aplicado no modo pulsado, sobre a variação de temperatura no interior da câmara pulpar (MALMSTRÖM et al., 2001; STEINER-OLIVEIRA et al., 2006). Dentre eles, Malmström et al. (2001) mostraram que, tanto para o esmalte coronário quanto para a superfície radicular, a aplicação de baixos níveis de energia por curto período de tempo (densidade de energia por pulso de 1,2 a 2,6 J/cm², duração do pulso de 100 ou 200 μ s, e tempo de exposição de 0,1 ou 0,5 s), não causaria efeitos deletérios ao tecido pulpar.

Tal variação de temperatura deve-se, provavelmente, à capacidade dos lasers pulsados de aumentar o pico de densidade de potência ao mesmo tempo em que mantêm a densidade de energia do pulso em níveis baixos (centenas de mJ/cm²), e desse modo, minimizar a deposição cumulativa de energia (WIDGOR et al., 1995) e a geração de calor excessivo.

Para prevenir a cárie dental, a luz laser deve alterar a composição ou a solubilidade do substrato dental, e a energia deve ser fortemente absorvida e eficientemente convertida em calor sem causar danos aos tecidos subjacentes ou que estão ao redor do tecido irradiado. Tais condições foram provavelmente alcançadas no presente estudo, uma vez que a irradiação com o laser de CO₂ foi capaz de promover uma redução significativa da desmineralização da dentina radicular quando comparada àquela do grupo controle, que não foi submetido a qualquer tratamento preventivo.

Os resultados deste estudo *in vitro* revelaram que a redução da desmineralização da dentina radicular foi estatisticamente superior nos espécimes irradiados com as densidades de energia de 4,0 J/cm², 5,0 J/cm² e 6,0 J/cm²,

quando comparada àquele obtida para os espécimes do grupo G2 (densidade de energia 2,5 J/cm²). A porcentagem de redução de desmineralização observada neste estudo variou de 2,86% a 20,59%, obtidas nos espécimes irradiados com densidades de energia de 2,5 J/cm² e 6,0 J/cm², respectivamente.

Vários pesquisadores evidenciaram o efeito protetor do laser de CO₂ na dentina e/ou na superfície radicular submetida a desafios cariogênicos *in vitro* (KANTOLA, 1972; NAMMOUR; RENNEBOOG-SQUILBIN; NYSSSEN-BEHETS, 1992; NELSON; LONGEBLOED; FEATHERSTONE, 1986). É importante salientar, contudo, que uma comparação direta destes resultados com aqueles relatados na literatura torna-se difícil, visto que as condições de irradiação empregadas são bastante distintas, com diferentes densidades de energia, durações de pulso, taxas de repetição, etc. Por outro lado, verifica-se que os achados deste estudo se aproximam dos relatos de Gao, Pan e Hsu (2006), em que a redução de desmineralização da superfície radicular, com emprego do laser de CO₂ λ 10,6 μm e densidade de energia de 1,14 J/cm², foi de 29,8%. No entanto, para comparar os diferentes tratamentos realizados na superfície radicular, tal estudo empregou o método de mensuração da profundidade das lesões formadas e observadas por meio de microscopia de luz polarizada, enquanto que a presente pesquisa utilizou o método de análise de microdureza da secção transversal dos espécimes, que se trata de um método quantitativo de análise de perda mineral relativa dos substratos.

Quanto ao mecanismo de ação do laser de CO₂ sobre a dentina radicular humana, ainda desconhece-se as exatas razões que levam à redução da perda mineral deste substrato com a utilização deste laser. Contudo, a hipótese mais frequentemente mencionada para o efeito do laser de dióxido de carbono sobre a redução de cárie em dentina baseia-se na formação de zonas de recristalização,

fusão e derretimento deste tecido em virtude da utilização de altas densidades de energia (KANTOLA, 1972; NAMMOUR; RENNEBOOG-SQUILBIN; NYSSEN-BEHETS, 1992; NELSON; LONGEBLOED; FEATHERSTONE, 1986). No presente estudo, as fotomicrografias sugerem que a ocorrência de fusão e resolidificação da dentina radicular (Figuras 5.5, 5.6 e 5.7) podem explicar parcialmente os resultados de redução de perda mineral, e, conseqüentemente, redução do processo de desmineralização, encontrados nos grupos irradiados com o laser de CO₂ com densidades de energia de 4,0 a 6,0 J/cm². Tais achados corroboram os relatos de Kantola (1972), Nammour, Renneboog-Squibin e Nyssen-Behets (1992) e Nelson, Longebloed e Featherstone (1986), ainda que as densidades de energia empregadas em tais estudos tenham sido superiores às empregadas na presente pesquisa.

Diferentemente do esmalte, onde o derretimento e a fusão da superfície podem não ser necessários para aumentar a resistência ácida (HSU et al., 2000; KANTOROWITZ; FEATHERSTONE; FRIED, 1998), mas sim a redução do conteúdo de carbonato promovida pela irradiação com laser de dióxido de carbono (KURODA; FOWLER, 1984; NELSON et al., 1987), pode resultar em menor solubilidade da hidroxiapatita (FEATHERSTONE, 2000); a dentina parece necessitar da ocorrência de alterações morfológicas como as acima citadas para que se evidencie algum aumento da resistência ácida deste substrato. Ao se considerar que para que haja a redução do conteúdo de carbonato é necessário atingir temperaturas entre 100-650°C, e que à 100°C ocorre a vaporização da água e ainda à aproximadamente 350°C ocorre a decomposição protéica (FOWLER; KURODA, 1986), a promoção de redução da solubilidade da dentina humana por meio da redução do conteúdo de

carbonato levaria ao desaparecimento de grande parte dos constituintes deste tecido, já que o mesmo é preferencialmente composto por água e proteínas (53%).

Neste contexto, verificou-se por meio da espectroscopia FT-Raman que não foi evidenciada diferença estatisticamente significativa entre as áreas relativas sob os picos dos espécimes irradiados quando comparadas às áreas relativas sob os picos dos espécimes não-irradiados com laser de CO₂, para todos os picos identificados nos espectros. Tal fato indica que com as densidades de energia empregadas nesta pesquisa não houve alteração da composição química da dentina radicular capaz de promover a formação de compostos mais ácido-resistentes e que, provavelmente, a taxa de redução de desmineralização obtida no presente estudo foi promovida pelas alterações morfológicas já relatadas.

Nos resultados da espectroscopia FT-Raman, as bandas mais fortes dos modos vibracionais de fosfato ν_1 e de carbonato ν_1 , que foram previamente reportadas (CARTER; EDWARDS, 2001; FATTIBENE et al., 2005; NAUMANN, 2001; NELSON; WILLIAMSON, 1985; TSUDA; RUBEN; ARENDS, 1996) foram prontamente identificadas. De forma semelhante, a fase orgânica também foi observada no espectro da dentina radicular, com bandas dentro da faixa de 1100-1700 cm^{-1} do espectro (TRAMINI et al., 2000). Estes resultados podem ser explicados devido ao uso da espectroscopia FT-Raman, que apresenta uma redução no fundo de fluorescência, o que torna possível identificar faixas tanto na região dos componentes inorgânicos quanto dos orgânicos. As bandas que possuem seus picos ao redor de 1243 e 1665 cm^{-1} podem ser atribuídas às bandas de amida III e de amida I, e na banda em torno de 1450 cm^{-1} os modos vibracionais de CH₂ e de NH. Deve-se atentar que as bandas de amida que ocorrem devido aos modos vibracionais do grupo orgânico de peptídeo (- CONH-) são associadas ao modo de

estiramento do C-O (amido I), o modo angulado de N-H (amida II) e uma combinação dos modos angulado de N-H e de estiramento de C-N (amida III). Há ainda a ocorrência das bandas em torno de 2900 cm^{-1} , atribuídas aos modos vibracionais de ligações C-H (CARTER; EDWARDS, 2001; NAUMANN, 2001).

De modo distinto dos resultados do presente estudo, a pesquisa realizada por Yamada et al. (2004) observou que os picos de colágeno desapareceram, bem como surgiram picos atribuídos ao carbono amorfo após a irradiação da superfície dentinária com laser de CO_2 com densidade de energia em torno de $97,0\text{ J/cm}^2$. Tal achado permitiu aos autores sugerirem que a irradiação laser aqueceu imediatamente a superfície dental a uma alta temperatura e carbonizou o colágeno e outras proteínas, tendo como resultado a formação de uma cavidade de superfície preta. Alterações visíveis como as relatadas por Yamada et al. (2004) não foram observadas no presente estudo, provavelmente devido ao emprego de densidades de energia muito inferiores às utilizadas pelos mesmos. É válido salientar ainda, que se torna difícil a comparação dos resultados obtidos pelo presente estudo por meio da espectroscopia FT-Raman, uma vez que são escassos na literatura estudos que tenham empregado tal método para avaliar possíveis alterações químicas decorrentes da ação do laser de CO_2 sobre a dentina radicular.

Desta forma, considerando os resultados da presente pesquisa, sugere-se que estudos futuros sejam conduzidos com o objetivo de comparar os efeitos do laser de CO_2 com métodos de prevenção de cárie já estabelecidos como é o caso do flúor, bem como avaliar o possível efeito sinérgico promovido pela associação de laser de CO_2 e flúor. Adicionalmente, a utilização de modelos *in situ*, que forneçam dados complementares para uma avaliação mais ampla do comportamento da dentina radicular irradiada frente a desafios cariogênicos, torna-se necessária.

7 CONCLUSÃO

Dentro das limitações de um estudo *in vitro*, pode-se concluir que densidades de energia em torno de 4,0 a 6,0 J/cm² podem ser aplicadas à dentina radicular, a fim de promover mudanças morfológicas e reduzir a reatividade ácida da mesma, sem comprometer a vitalidade pulpar.

REFERÊNCIAS¹

Borggreven JMP, van Dijk JW, Driessens FCM. Effect of laser irradiation on the permeability of bovine dental enamel. Arch Oral Biol 1980;25:831-2.

Brailsford SR, Shah B, Simons D, Gilbert S, Clark D, Ines I, et al. The predominant aciduric microflora of root-caries lesions. J Dent Res 2001;80(9):1828-33.

Carter EA, Edwards HGM. Biological applications of Raman spectroscopy. Practical Spectroscopy #:24 In: Gremlich HU, Yan B (eds). Infrared and raman spectroscopy of biological materials. New York: Marcel Dekker Inc.; 2001. v. 24, p. 421-75.

Ciaramicoli MT. Avaliação da variação da temperatura em amostras de esmalte/dentina e dentina, após irradiação com os laser de Nd:YAG, Er:YAG (Kavo Key Laser[®]) e Er:YAG (Kavo Key Laser 3[®]): análise com termômetro de radiação infravermelha [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2004.

Eliasson S, Krasse BO, Soremark R. Root caries. A consensus conference statement. Swed Dent J 1992;16(1-2):21-5.

Ellen RP, Banting DW, Filley ED. *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus* detection in the assessment of dental root surface caries risk. J Dent Res 1985;64(10):1245-9.

Fattibene P, Carosi A, De Coste V, Sacchetti A, Nucara A, Postorino P, Dore P. A comparative EPR, infrared and Raman study of natural and deproteinated tooth enamel and dentin. Phys Med Biol 2005;50(6):1095-108.

Featherstone JDB. Caries detection and prevention with laser energy. Dent Clin North Am 2000;44(4):955-69.

Featherstone JDB. Fluoride, remineralization and root caries. Am J Dent 1994;7(5):271-4.

¹ De acordo com Estilo Vancouver. Abreviatura de periódicos segundo base de dados MEDLINE.

Featherstone JD, ten Cate JM, Shariati M, Arends J. Comparison of artificial caries-like lesions by quantitative microradiography and microhardness profiles. *Caries Res* 1983;17(5):385–91.

Featherstone JDB, Barret-Vesponne NA, Fried D, Kantorovitz Z, Seka W. CO₂ laser inhibitor of artificial caries-like lesion progression in dental enamel. *J Dent Res* 1998;77(6):1397-403.

Fejerskov O. Recent advancements in the treatment of root surface caries. *Int Dent J* 1994;44(2):139-40.

Fejerskov O, Nyvad B. Dental caries in the aging individual. In: Holm-Pedersen P, Løe H. Textbook of geriatric dentistry. Copenhagen: Munksgaard; 1996.

Ferreira JM, Palamara J, Phakey PP, Rachinger WA, Orams HJ. Effects of continuouswave CO₂ laser on the ultrastructure of human dental enamel. *Arch Oral Biol* 1989;34(7):551-62.

Fowler BO, Kuroda S. Changes in heated and in laser-irradiated human tooth enamel and their probable effects on solubility. *Calcif Tissue Int* 1986;38(4):197-208.

Fure S. Five-year incidence of caries, salivary and microbial conditions in 60-, 70- and 80-year-old Swedish individuals. *Caries Res* 1998;32(3):166-74.

Fure S, Zickert I. Salivary conditions and cariogenic microorganisms in 55, 65 and 75-year-old Swedish individuals. *Scand J Dent Res* 1990;98(3):197-210.

Furseth R. Further observations on the fine structure of orally exposed and carious human dental cementum. *Arch Oral Biol* 1971;16(1):71-85.

Gao XL, Pan JS, Hsu CY. Laser-fluoride effect on root demineralization. *J Dent Res* 2006;85(10):919-23.

Gustafsson BE, Quensel CE, Lanke LS, Lundqvist C, Grahnen H, Bonow BE, et al. The Vipeholm dental caries study; the effect of different levels of carbohydrate intake on caries activity in 436 individuals observed for five years. *Acta Odontol Scand* 1954;11(3-4):232-64.

Hals E, Selvig KA. Correlated electron probe microanalysis and microradiography of carious and normal cementum. *Caries Res* 1977;11:62-75.

Hamilton IR. Biochemical effects of fluoride on oral bacteria. *J Dent Res* 1990;69(spec issue):660-7.

Hand JS, Hunt RJ, Beck JD. Incidence of coronal and root caries in an older adult. *J Public Health Dent* 1988;48(1):14-9.

Hoppenbrouwers PM, Driessens FC, Borggreven JM. The mineral solubility of human tooth roots. *Arch Oral Biol* 1987;32(5):319-22.

Hsu CYS, Jordan TH, Dederich DN, Wefel JS. Effects of low-energy CO₂ laser irradiation and the organic matrix on inhibition of enamel demineralization. *J Dent Res* 2000;79:1725-30.

IBGE. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/brasil_em_sintese/ [2007 04 21]

Jordan HV, Keyes PH, Bellack S. Periodontal lesions in hamsters and gnotobiotic rats infected with *Actinomyces* of human origin. *J Periodontol Res* 1972;7:21-8.

Joshi A, Douglass CW, Jette A, Feldman H. The distribution of root caries in community-dwelling elders in New England. *J Public Health Dent* 1994;54(1):15-23.

Kantola S. Laser-induced effects on tooth structure. IV. A study of changes in the calcium and phosphorus contents in dentine by electron probe microanalysis. *Acta Odontol Scand* 1972;30(4):463-74.

Kantola S, Laine E, Tarna T. Laser-induced effects on tooth structure. VI. X-ray diffraction study of dental enamel exposed to a CO₂ laser. *Acta Odontol Scand* 1973;31(6):369-79.

Kantorowitz Z, Featherstone JDB, Fried D. Caries prevention by CO₂ laser treatment: dependency on the number of pulses used. *J Am Dent Assoc* 1998;129(5):585-91.

Kawasaki K, Featherstone JDB. Effects of collagenase on root demineralization. *J Dent Res* 1997;76(1):588-95.

Keltjens H, Shaeken T, van der Hoeven. Preventive aspects of root caries. *Int Dent J* 1993;43(2):143-8.

Kidd EM. Caries diagnosis within restored teeth. *Oper Dent* 1989;14(3):149-58.

Klein ALL, Rodrigues LKA, Eduardo CP, Nobre dos Santos M, Cury JA. Caries inhibition around composite restorations by pulsed carbon dioxide laser application. *Eur J Oral Sci* 2005;113(5):239-44.

Kuroda S, Fowler BO. Compositional, structural, and phase changes in *in vitro* laser irradiated human tooth enamel. *Calcif Tissue Int* 1984;36(4):361-9.

Locker D. Incidence of root caries in an older Canadian population. *Community Dent Oral Epidemiol* 1996;24(6):403-7.

Malmström HS, McCormack SM, Fried D, Featherstone JDB. Effects of CO₂ laser on pupal temperature and surface morphology: an *in vitro* study. *J Dent* 2001;29(8):521-9.

McComb D. Operative dentistry considerations for the elderly. *J Prosthet Dent* 1994;72(5):517-24.

McCormack SM, Fried D, Featherstone JDB, Glena RE, Seka W. Scanning electron microscope observations of CO₂ laser effects on dental enamel. *J Dent Res* 1995;74(10):1702-8.

Nammour S, Renneboog-Squilbin C, Nyssen-Behets C. Increased resistance to artificial caries-like lesion in dentin treated with CO₂ laser. *Caries Res* 1992;26(3):170-5.

Naumann D. FT-infrared and FT-Raman spectroscopy in biomedical research. *Practical Spectroscopy* #:24 In: Gremlich HU, Yan B (eds). *Infrared and raman spectroscopy of biological materials*. New York : Marcel Dekker Inc; 2001. v. 24, p. 323-77.

Nelson DG, Williamson BE. Raman spectra of phosphate and monofluorophosphate ions in several dentally-relevant materials. *Caries Res* 1985;19(2):113-21.

Nelson DG, Longebloed WL, Featherstone JDB. Laser irradiation of human dental enamel and dentine. *N Z Dent J* 1986;82(369):74-7.

Nelson DG, Wefel JS, Jongebloed WL, Featherstone JDB. Morphology, histology and crystallography of human dental enamel treated with pulsed low-energy infrared laser irradiation. *Caries Res* 1987;21(5):411-26.

Nelson DG, Shariati M, Glena R, Shields CP, Featherstone JDB. Effect of pulsed low energy infrared laser irradiation on artificial caries-like lesion formation. *Caries Res* 1986;20(4):289-99.

Nyvad B, Fejerskov O. Root surface caries: clinical, histopathological and microbiological features and clinical implications. *Int Dent J* 1982;32(4):312-26.

Nyvad B, Fejerskov O. An ultrastructural study of bacterial invasion and tissue breakdown in human experimental root surface caries. *J Dent Res* 1990;69(5):1118-25.

Nyvad B, Ten Cate JM, Fejerskov O. Arrest of root surface caries *in situ*. *J Dent Res* 1997;76(12):1845-53.

Patel CKN, McFarlane RA, Faust WL. Selective excitation through vibrational energy transfer and optical maser action in N₂-CO₂. *Physiol Rev* 1964;13:617-9.

Pogrel MA, Muff DF, Marshall GW. Structural changes in dental enamel induced by high energy continuous wave carbon dioxide laser. *Lasers Surg Med* 1993;13(1):89-96.

Ravald N, Hamps SE, Birkhed D. Long-term evaluation of root surface caries in periodontally treated patients. *J Clin Periodontol* 1986;13(8):759-67.

Rodrigues LKA, Santos MN, Pereira D, Assaf AV, Pardi V. Carbon dioxide laser in dental caries prevention. *J Dent* 2004;32:531-40.

Sato K. Relation between acid dissolution and histological alteration of heated tooth enamel. *Caries Res* 1983;17(6):490-5.

Schupbach P, Guggenheim B, Lutz F. Histopathology of root surface caries. *J Dent Res* 1990;69(5):1195-204.

Seichter U. Root surface caries: a critical literature review. J Am Dent Ass 1987;115(2):305-10.

Steiner-Oliveira C, Rodrigues LKA, Soares LES, Martin AA, Zezell DM, Nobre-dos-Santos M. Chemical, morphological and thermal effects of 10.6 μm CO₂ laser on the inhibition of enamel demineralization. Dent Mater J 2006;25(3):455-62.

Stern RH, Vahl J, Sognnaes RF. Lased enamel: ultrastructural observations of pulsed carbon dioxide laser effects. J Dent Res 1972;51(2):455-60.

Sumney DL, Jordan HV. Characterization of bacteria isolated from human root surface carious lesions. J Dent Res 1974;53(2):343-51.

Tange T, Fried D, Featherstone JDB. TEA-CO₂ laser inhibition of artificial caries-like lesion progression in primary and permanent tooth enamel. Lasers in Dentistry VI. 2000; SPIE 3910:306-13.

Ten Cate JM. Current concepts on the theories of the mechanism of action of fluoride. Acta Odont Scand 1999;23(6):81-6.

Ten Cate JM, Duijsters PPE. Alternating demineralization and remineralization of artificial enamel lesions. Caries Res 1982;16(3):201-10.

Thevadass KP, Pearson GJ, Anstice HM, Davies EH. Method for enhancing the fluoride release of a glass-ionomer cement. Biomaterials 1996;17(4):425-9.

Tramini P, Pelissier B, Valcarcel J, Bonnet B, Maury L. A Raman spectroscopic investigation of dentin and enamel structures modified by lactic acid. Caries Res 2000;34(3):233-40.

Tsuda H, Ruben J, Arends J. Raman spectra of human dentin mineral. Eur J Oral Sci 1996;104(2 Pt 1):123-31.

Van Houte J, Jordan HV, Laraway R, Kent R, Soparkar PM, DePaola PF. Association of the microbial flora of dental plaque and saliva with human root-surface caries. J Dent Res 1990;69(8):1463-8.

Yamada MK, Uo M, Ohkawa S, Akasaka T, Watari F. Three-dimensional topographic scanning electron microscope and Raman spectroscopic analyses of the irradiation

effect on teeth by Nd:YAG, Er:YAG, and CO₂ lasers. J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater 2004;71(1):7-15.

Wefel JS. Root caries histopathology and chemistry. Am J Dent 1994;7(5):261-5.

Wentrup-Byrne E, Armstrong CA, Armstrong RS, Collins BM. Fourier transform Raman microscopic mapping of the molecular components in a human tooth. J Raman Spectrosc 1997;28:151-8.

Widgor HA, Walsh Jr JT, Featherstone JDB, Visuri SR, Fried D, Waldvogel JL. Lasers in dentistry. Lasers Surg Med 1995;16:103-33.

Zach L, Cohen C. Pulp response to externally applied heat. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1965;19:515-30.

Zambon JJ, Kasprzak SA. The microbiology and histopathology of human root caries. Am J Dent 1995;8(6):323-57.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

PARECER DE APROVAÇÃO
Protocolo 148/06

O Grupo de Trabalho indicado pelo Comitê de Ética em Pesquisa APROVOU o protocolo de pesquisa "**Avaliação *in vitro* do efeito do laser de CO₂, associado ou não à aplicação tópica de flúor, na prevenção de cárie de superfície radicular**", de responsabilidade da Pesquisadora **Wanessa Christine de Souza Zaroni**, sob orientação do Professor Doutor **Michel Nicolau Youssef**.

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados a este Comitê relatórios anuais referentes ao andamento da pesquisa e ao término cópia do trabalho em "cd". Qualquer emenda do projeto original deve ser apresentada a este CEP para apreciação, de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

São Paulo, 02 de outubro de 2006

Prof. Dr. Rogério Nogueira de Oliveira
Coordenador do CEP-FOUSP