Marcella Esteves Oliveira

**Avaliação de Diferentes Parâmetros para Irradiação do Esmalte
Dental com o *Laser* de CO₂ Visando a Redução da
Desmineralização**

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

Orientador: Prof. Dr. Carlos de Paula Eduardo

Co-Orientador: Prof. Dr. Christian Apel

São Paulo

2007

FOLHA DE APROVAÇÃO

Esteves-Oliveira M. Avaliação de diferentes parâmetros para irradiação do esmalte dental com o laser de CO₂ visando a redução da desmineralização. [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia USP; 2007.

São Paulo, 14/02/2008

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: _____

Co-Tutela

Essa é a primeira tese de doutorado da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo em Co-Tutela, com uma universidade estrangeira. O contrato foi analisado pela Pró-Reitoria de Pós-Graduação e assinado pelos reitores das Universidades de São Paulo (USP) e de Aachen (RWTH), Profa. Dra. Suely Vilela, e Prof. Dr. Burkhard Rauhut respectivamente, reconhecendo a responsabilidade das duas Instituições de ensino pela tese. Sendo assim, as duas Universidades reconhecerão, após a aprovação pela banca examinadora, a validade da co-orientação realizada e a da tese defendida, outorgando o título de doutora à candidata. A tese foi orientada na Universidade de São Paulo (Brasil), pelo Prof. Dr. Carlos de Paula Eduardo na Área de pós-graduação em Odontologia – Área de Concentração Dentística e na Universidade RWTH de Aachen (Alemanha), pelo Prof. Dr. Christian Apel.

A realização da tese em co-tutela foi viabilizada pela concessão da primeira bolsa de doutorado sanduíche pelo DAAD (Serviço Alemão de Intercâmbio Acadêmico) em parceria com a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) a uma(o) aluna(o) de pós-graduação da FOU SP

Parte dessa tese foi desenvolvida na Faculdade de Odontologia da Universidade RWTH de Aachen e parte na Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP). Respeitando-se as cláusulas contratuais também a banca examinadora será composta por representantes dos dois países, sendo composta por três professores brasileiros, Prof. Dr. Carlos de Paula Eduardo, atual Diretor da Faculdade de Odontologia da USP, Prof. Dr. Armando Corbani Ferraz, Pró-Reitor de Pós-Graduação da USP, Profa. Dra. Denise Maria Zezell, pesquisadora titular do IPEN/CNEN-SP e dois professores alemães: Prof. Dr. Friedrich Lampert, diretor do departamento de Odontologia Conservadora e ex-diretor do hospital universitário da Universidade RWTH de Aachen e, Prof. Dr. Christian Apel, professor de prevenção de cáries do departamento de Odontologia Conservadora da Universidade RWTH de Aachen.

Co-Operation

This is the first doctoral thesis of FOU SP in Co-Operation with a foreign university. The contract, which was evaluated by the Graduate Pro-President Office and signed by the rectors of the universities of São Paulo (USP) and of Aachen (RWTH), Profa. Dra. Suely Vilela, and Prof. Dr. Burkhard Rauhut respectively, recognizes the responsibility of both educational institutions for the thesis. Thus, both Universities will acknowledge on the validity of the co-orientation and the thesis defended, granting the doctor title to the candidate (after the examining committee approval). The thesis was developed under the guidance of Prof. Dr. Carlos de Paula Eduardo at the University of São Paulo (Brazil) and Prof. Dr. Christian Apel, at the pos-graduation in Dentistry - Concentration Area Restorative Dentistry, and at the RWTH Aachen University (Germany).

The accomplishment of this first doctoral thesis in co-operation between the two Universities was enabled by the first scholarship for sandwich doctorate program granted by the DAAD (German Academic Exchange Service) in collaboration with CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) to a graduate student from FOU SP.

Part of this thesis was developed at the Dentistry School of the RWTH University of Aachen and part at the Dentistry School of the University of São Paulo (FOU SP). In respect to the contract rules the exam board will also be formed by scientific representatives from both countries. There will be three Brazilian professors, Prof. Dr. Carlos de Paula Eduardo, current dean of the School of Dentistry of USP, Prof. Dr. Armando Corbani Ferraz, head of the Graduate Pro-President Office of USP, Prof. Dr. Denise Maria Zezell, full researcher of IPEN;/CNEN-SP, and two German professors: Prof. Dr. Friedrich Lampert, director of the department of Conservative Dentistry and former dean of the University Hospital of the RWTH Aachen University and Prof. Dr. Christian Apel, professor of caries prevention of the Conservative Dentistry Department of the RWTH Aachen University.

Kooperation

Die vorliegende Arbeit ist die erste Doktorarbeit aus der Zahnmedizinischen Fakultät der Universität von São Paulo (USP), die in Kooperation mit einer ausländischen Universität entstanden ist. Der Vertrag, der vom Prorektorat für Studium und Lehre der Universität São Paulo entworfen und von der Rektorin der Universität São Paulo, Profa. Dra. Suely Vilela, und dem Rektor der RWTH Aachen, Prof. Dr. Burkhard Rauhut, unterzeichnet wurde, würdigt die Verantwortlichkeit beider Institutionen für diese Arbeit. Auf diese Weise erkennen beide Universitäten die gemeinsame Betreuung und jeweilige Verleihung des Dokortitels nach erfolgreicher Disputation der Dissertation an. Die Dissertation wurde betreut von Herrn Prof. Dr. Carlos de Paula Eduardo im Schwerpunkt der Zahnerhaltung an der Universität São Paulo und von Herrn Prof. Dr. Christian Apel von der RWTH Aachen.

Die Durchführung dieser gemeinsamen Dissertation wurde durch ein Forschungsstipendium für Doktoranden nach dem Sandwich-Modell des DAAD in Zusammenarbeit mit CAPES (Ministerium für Bildung, Brasilien) unterstützt. Diese Förderung wurde zum ersten Mal einem Studenten der Zahnmedizin der Universität São Paulo zugesprochen.

Die Dissertation wurde zu gleichen Teilen an der Klinik für Zahnerhaltung, Parodontologie und Präventiven Zahnheilkunde der RWTH Aachen und der Zahnmedizinischen Fakultät der Universität São Paulo durchgeführt. Dem geschlossenen Vertrag entsprechend wird das Prüfungskomitee ebenfalls mit den Repräsentanten beider Universitäten besetzt. Neben drei brasilianischen Professoren, Herr Prof. Dr. Carlos de Paula Eduardo, Dekan der Zahnmedizin Fakultät der USP, Herr Prof. Dr. Armando Corbani Ferraz, Prorektor für akademische Weiterbildung der USP, Frau Prof. Dr. Denise Maria Zezell, dauernde wissenschaftliche Mitarbeiterin des IPENs/CNEN-SP sind die beiden deutschen Professoren, Herr Univ.-Prof. Dr. Friedrich Lampert, Direktor der Klinik für Zahnerhaltung, Parodontologie und Präventiven Zahnheilkunde der RWTH Aachen und früherer Dekan der Medizinischen Fakultät sowie Herr Prof. Dr. Christian Apel, Juniorprofessor für Experimentelle Kariesprävention und –therapie der RWTH Aachen, beteiligt.

DEDICATÓRIA

À minha mãe, Sandra Maria Esteves Oliveira, meu pai, John Straus de Souza Oliveira e meu irmão, Danilo Esteves Oliveira, pelo amor e carinho que sempre me dedicaram e por serem os exemplos de conduta ética e de respeito ao próximo que eu sempre seguirei.

À meu noivo Cadu, por seu amor sincero, pelo apoio incondicional e por estar a meu lado mesmo quando um oceano inteiro esteve entre nós. Obrigada por me compreender nos momentos que eu precisei estar ausente.

À minha avó Celina Prado Esteves (*in memoriam*), que nos deixou durante a minha estadia em Aachen, por ter sido minha segunda mãe e por ter acompanhado e incentivado de perto meus primeiros passos na Odontologia.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao Prof. Dr. Carlos de Paula Eduardo, meu orientador e atual diretor da FOUSP, por ter incentivado desde muito cedo a minha integração à comunidade científica internacional. Por ser, para mim, um exemplo de pioneirismo e empreendedorismo na Odontologia, e especialmente na área de laser em Odontologia. Por sua incansável dedicação ao trabalho e por ter me ensinado muito com sua sabedoria, experiência e visão. Acima de tudo, você é uma pessoa com um grande coração, e eu lhe agradeço por ter estado sempre a meu lado nos grandes desafios que enfrentamos nesses quase três anos de convivência. Meu eterno respeito, gratidão e admiração.

Ao Prof. Dr. Christian Apel, meu co-orientador, por ter aceitado me receber como doutoranda na Universidade RWTH de Aachen e por ter ampliado a minha visão de ciência. Também por ter cuidado para que eu tivesse a infra-estrutura necessária para desenvolver meus trabalhos e, até mesmo, para que eu conseguisse morar em Aachen. Com toda certeza, aprendi muito com a sua visão clara e sistemática das pesquisas em Odontologia. Para mim foi um prazer poder trabalhar com uma pessoa tão inteligente, tranqüila, e focada como você.

AGRADECIMENTOS

Ao DAAD (Serviço Alemão de Intercâmbio Acadêmico) pela bolsa de doutorado sanduíche concedida (número do processo: A/05/50718).

À CAPES (Coordenação de Aprimoramento de Pessoal de Nível Superior) pela parceria com o DAAD que permite a concessão da bolsa de doutorado sanduíche.

Ao Prof. Dr. Friedrich Lampert, diretor do departamento de Odontologia Conservadora da Universidade RWTH de Aachen e ex-diretor do hospital universitário de Aachen, por ter me recebido como Cirurgiã-Dentista visitante e doutoranda em seu departamento e por ter dado todo o apoio possível para o desenvolvimento do meu trabalho. Agradeço especialmente a maneira simpática e acolhedora com que sempre me recebeu e dessa forma, me fez me sentir um pouquinho mais perto de casa.

Ao Prof. Dr. Norbert Gutknecht, diretor do *Aachen Center for Laser Dentistry* (AALZ), por ter me permitido conhecer de perto diversos lasers clínicos, que ainda não estão sendo comercializados no Brasil, por ter me convidado para ser co-autora do livro “*Proceedings of the 1st Workshop of Evidence Based Dentistry on Lasers in Dentistry*”, por ter me incluído na equipe do Workshop de Lasers em Odontologia de Aachen, pela confiança depositada no meu trabalho e pela oportunidade que me deu de conhecer de perto suas idéias e seus trabalhos.

À Profa. Dra. Denise M. Zezell, minha orientadora do mestrado, pessoa que eu admiro muito, agradeço por ter me ensinado todos os conceitos básicos da utilização dos lasers em Odontologia, por ter tido uma participação especial na conquista da bolsa DAAD de doutorado sanduíche, por ter me ensinado a ter uma visão mais crítica e precisa dos métodos científicos e por todo o carinho e cuidado que sempre teve comigo. Eu admiro muito a sua competência, e sua conduta pautada nos princípios éticos.

À Profa. Dra. Márcia Martins Marques, que foi coordenadora dos cursos de pós-graduação na área de Dentística durante a maior parte do meu doutorado, por ter me dado apoio e conselhos fundamentais em alguns dos momentos mais difíceis desses anos. Minha sincera admiração pela sua seriedade, competência e pela sua confiança.

Ao Prof. Dr. Walter Ferreira Velloso Jr., físico do Departamento de Ciências Básicas da FZEA-USP, pela elaboração do modelo de elementos finitos utilizado para as estimativas de temperatura. Agradeço também a grande atenção dispensada, a cooperatividade e as diversas horas de disponibilidade no skype para discussão do modelo.

À Profa. Dra. Ulrike Fritz, professora do Departamento de Ortodontia da Universidade RWTH de Aachen, pelo acordo de cooperação que permitiu que os experimentos com aparelho de QLF fossem realizados. Minha gratidão pela sua confiança e pela atenção dispensada.

À senhora Patricia Buttler Bücher, assistente de técnicas laboratoriais em medicina (MTA) e coordenadora do laboratório de Histologia do Departamento de Odontologia Conservadora da Universidade RWTH de Aachen, por todo seu assessoramento técnico, mas acima de tudo por ser a alemã com o coração mais brasileiro que eu já conheci. O seu sorriso, a sua atenção, o seu carinho e sua amizade foram, sem dúvida, essenciais para o sucesso da minha estadia em Aachen.

À Veronika Namyslo, por ter sido minha grande amiga em Aachen, por ter passado diversos fins de semana comigo no laboratório, por ter me ajudado em diversos experimentos e por ser uma pessoa muito divertida, alegre e de grande caráter. Obrigada, pela sua amizade, pelas lições de alemão e por todos os momentos bons que me fizeram esquecer um pouco a saudade de casa.

À senhora Ulrike Ernst, assistente de técnicas laboratoriais em medicina (MTA) e funcionária do laboratório científico do Departamento de Ortodontia da

Universidade RWTH de Aachen, pela maneira simpática e agradável com que me auxiliou e instruiu durante a utilização do aparelho de QLF.

À Profa. Dra. Ana Cecília Aranha e à Profa. Dra. Patrícia Freitas, professoras do Departamento de Dentística da FOUSP e ex-orientadas do professor Carlos, pelos conselhos, pela acolhida no LELO, pela troca de experiências e pelos momentos divertidos que passamos.

Aos professores do curso de Doutorado Prof. Dr. Rúbens Côrte Real de Carvalho, Profa. Miriam L. Turbino, Profa. Adrian Bona Mattos e Prof. Dr. Narciso Garone, pelos ensinamentos clínicos e teóricos durante o curso.

Ao senhor Leon Vanweersch, gerente financeiro do Departamento de Odontologia Conservadora da Universidade RWTH de Aachen e da AALZ, pela sua amizade, pela toda sua ajuda na minha fase de integração ao departamento, por sempre ter feito questão da minha presença em diversos eventos importantes e pelo seu apoio durante esses anos.

Aos meus sogros, Carlos Ronaldo e Tânia e minha cunhada Camila, pelo apoio, carinho compreensão e motivação para a conquista deste sonho.

À minha cunhada Carol, pela atenção e carinho que deu à minha mãe e meu irmão na minha ausência.

À minha amiga Karen Müller Ramalho, por ser, desde o primeiro grupo de intercâmbio em Aachen, uma grande amiga e por ter me dado muito força e me incentivado a distância durante todos esses anos.

Às minhas amigas do curso de mestrado acadêmico no IPEN, Claudinha, Renata e Patty, pela amizade e bons momentos que passamos.

Aos funcionários do LELO, Liliane, Haroldo e Jô, que me receberam de braços abertos, agradeço toda ajuda, generosidade e pelos sorrisos e a maneira alegre que vocês iluminaram diversos dias de trabalho.

Às funcionárias da Secretaria de Pós-Graduação, Cátia Tiezzi, Nair e Alessandra por toda assessoria, na elaboração e conclusão do processo de co-tutela, e pelos esclarecimentos durante todo o curso.

Ao secretário do curso de pós-graduação do Departamento de Dentística, Davi Lascalla, por toda a assessoria na entrega da tese e dos relatórios semestrais.

À funcionária Sônia, pela presteza e assistência para realização dos experimentos no laboratório do Departamento de Dentística.

À pró-reitoria de Pós-Graduação da USP, pela concessão do auxílio para participação no *1st Meeting of the European Division of the World Federation for Lasers in Dentistry*, realizado em maio de 2007, em Nice na França.

EPÍGRAFE

"A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original."

(Albert Einstein)

"O valor das coisas não está no tempo que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso, existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis."

(Fernando Sabino)

Esteves-Oliveira M. Avaliação de diferentes parâmetros para irradiação do esmalte dental com o *laser* de CO₂ visando a redução da desmineralização [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2007.

RESUMO

Embora seja conhecido que a irradiação com *laser* de CO₂ reduz a desmineralização do esmalte, efeitos colaterais como danos térmicos na superfície são comumente observados. A ocorrência dessas microfraturas e fissuras é um dos fatores que ainda comprometem uma utilização segura *in vivo*. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi encontrar parâmetros de irradiação com *laser* de CO₂ ($\lambda = 10,6 \mu\text{m}$) que resultassem no máximo efeito preventivo de cárie e no menor dano térmico. Três estudos foram conduzidos para avaliar separadamente três parâmetros da irradiação com *laser*. No primeiro estudo cinco densidades de energia diferentes, 0,1, 0,3, 0,4, 0,5 e 0,6 J/cm² combinadas com altas taxas de repetição, 500, 154, 167, 182, 187 Hz, respectivamente, e 10 μs de duração de pulso foram testadas. Após ter sido avaliado, qual delas resultou na maior inibição da progressão das lesões de cárie, um segundo estudo foi conduzido com cinco diferentes larguras de pulso, 5, 10, 20, 30 e 50 μs , combinadas à mesma densidade de energia de 0,3 J/cm². Encontrada a duração de pulso que causou o melhor resultado, um terceiro estudo foi realizado avaliando três diferentes números de pulsos sobrepostos, para a mesma densidade de energia e duração de pulso (0,3 J/cm² e 5 μs). Para os três estudos foram utilizados cubos de esmalte bovino, que tiveram as suas superfícies polidas. Após o tratamento das superfícies com *laser*, as amostras foram submetidas ao mesmo desafio cariogênico, uma

ciclagem de pH de 8 dias. A desmineralização provocada foi avaliada medindo-se a profundidade das lesões em microscópio de luz polarizada. Avaliações adicionais da desmineralização foram realizadas para os estudos 2 e 3, utilizando-se a técnica de quantificação da fluorescência induzida por luz (QLF). Análises morfológicas da superfície e também da secção transversal foram realizadas com microscópio eletrônico de varredura. Diferentes grupos irradiados por *laser* apresentaram profundidades de lesão estatisticamente menores do que o controle (ANOVA, $p < 0,05$), e a maior inibição, que foi inclusive menor do que o grupo tratado com gel de flúor fosfato acidulado (1,23%), foi observada para a irradiação com $0,3 \text{ J/cm}^2$, $5 \mu\text{s}$, 2036 pulsos sobrepostos. Morfologicamente, nenhum dos parâmetros testados causou danos térmicos na superfície. Pelos resultados observados, pode ser concluído que a irradiação por *laser* de CO_2 ($\lambda = 10,6 \mu\text{m}$) com $0,3 \text{ J/cm}^2$, $5 \mu\text{s}$, 226 Hz e 2036 pulsos sobrepostos resulta em aumento da resistência do esmalte à desmineralização e não causa danos térmicos indesejados na superfície.

Palavras-Chave: *Laser* de CO_2 , Cáries, Desmineralização, Esmalte Bovino, Prevenção, QLF, Fluorescência

Esteves-Oliveira M. Evaluation of different CO₂ laser parameters for inhibiting enamel demineralization in vitro [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2007.

ABSTRACT

Although CO₂ laser irradiation can decrease enamel demineralization, thermal damages to the surface are common side effects. The occurrence of fissures and cracks may compromise an *in vivo* application. Therefore, the aim of the present study was to find CO₂ laser ($\lambda = 10.6 \mu\text{m}$) parameters resulting in maximum caries preventive effect with the lowest thermal damage. Three studies were carried out to systematically evaluate different laser parameters. In the first study five low fluencies of 0.1, 0.3, 0.4, 0.5 and 0.6 J/cm² combined with high repetition rates of 500, 154, 167, 182, 187 Hz, respectively and 10 μs pulse duration were chosen for the experiments. After evaluating the parameter which resulted in the highest caries inhibition, a second study was conducted with five different pulse durations 5, 10, 20, 30 and 50 μs combined with 0.3 J/cm² fluence. Finally, a third study was conducted to evaluate which number of overlapping pulses of 0.3 J/cm² fluence and 5 μs duration, would result in the highest caries inhibition. For all of the three studies bovine enamel cubes, which had their surfaces polished, were used. After the laser treatment, the caries challenge was always the same, an 8-day pH-cycling regime. Demineralization was assessed by lesion depth measurements with a light polarized microscope. Additional demineralization assessments were performed for the second and third studies, using the method of quantitative light-induced fluorescence (QLF). Surface and cross-sectional morphological evaluations were

accomplished with scanning electron microscope. Several laser groups resulted in statistically significant lower lesion depths than the control group (ANOVA, $p < 0.05$). The highest inhibition was even higher than observed for the group treated with acidulated phosphate fluoride gel (1,23%) and was found for the irradiation with 0.3 J/cm^2 , $5 \mu\text{s}$ and 2036 overlapped pulses. Morphologically, all of the groups resulted in no surface damages. In the present *in vitro* study irradiation with 0.3 J/cm^2 , $5 \mu\text{s}$, 226 Hz and 2036 overlapped pulses of CO_2 laser increase enamel caries resistance without causing undesirable surface damage and excessive temperature rise.

Key-words: Laser de CO_2 , Caries, Demineralization, Bovine Enamel, Prevention, QLF, fluorescence

Esteves-Oliveira M. Wirkung verschiedener Parameter der CO₂-Laserstrahlung bei der Entmineralisierung der Rinderzahnschmelz [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2007.

ZUSAMMENFASSUNG

Es ist bekannt, dass die Bestrahlung mit dem CO₂ Laser eine Demineralisation des Zahnschmelzes vermindern kann. Nebenwirkungen wie thermisch bedingte Mikrorisse und Fissuren in der Schmelzoberfläche verhindern eine sichere klinische Anwendung. Deshalb war das Ziel der vorliegenden Untersuchung Bestrahlungsparameters für den CO₂ Laser ($\lambda = 10,6 \mu\text{m}$) zu finden, die in einer hohen kariespräventiven Wirkung ohne thermische Schädigung resultieren. Drei Teiluntersuchungen wurden durchgeführt, um den Einfluss der Energiedichte, Pulsdauer und Bestrahlungszeit unabhängig voneinander untersuchen zu können. Im ersten Versuchsteil wurden fünf verschiedene Energiedichten (0,1, 0,3, 0,4, 0,5 und $0,6 \text{ J/cm}^2$) zusammen mit hohen Pulsfrequenzen (500, 154, 167, 182, 187 Hz) bei einer festen Pulsdauer von $10 \mu\text{s}$ untersucht. Dabei erzielte die Gruppe mit $0,3 \text{ J/cm}^2$ den höchsten kariespräventiven Effekt. Im zweiten Versuchsteil wurde die Energiedichte von $0,3 \text{ J/cm}^2$ mit Pulslängen von 5, 10, 20, 30 und $50 \mu\text{s}$ kombiniert. Im dritten Versuchsteil wurde der Einfluss der Bestrahlungszeit untersucht. Mit der idealen Kombination von $0,3 \text{ J/cm}^2$ und $5 \mu\text{s}$ Pulsdauer wurden die Proben 2, 5 und 9 s (entspricht 452, 1130 und 2036 applizierte Pulse) bestrahlt.

Für alle Versuche wurden Schmelzblöcke von Rinderzähnen verwendet. Die Oberfläche war poliert. Nach der Laserbestrahlung wurden die Proben einem *pH-cycling* Modell für 8 Tagen unterzogen. Die Läsionstiefe wurde im

Polarisationsmikroskop vermessen. Zusätzlich wurden in den Versuchsteilen 2 und 3 Messungen mittels Quantitativ Lichtinduzierter Fluoreszenz (QLF) durchgeführt. Die Rasterelektronenmikroskopie diente zur Analyse morphologischer Veränderungen auf den bestrahlten Oberflächen und longitudinalen Schnitten.

Mehrere laserbestrahlte Gruppen zeigten eine signifikant niedriger Läsionstiefe als in der unbestrahlten Kontrollgruppe (ANOVA, $p < 0,05$). Die höchste Inhibition wurde bei der Laserbestrahlung mit einer Energiedichte von $0,3 \text{ J/cm}^2$, 5 μs Pulsdauer und 9 s Bestrahlungszeit beobachtet und war sogar höher als in der Gruppe mit Fluoridapplikation. Keine der getesteten Parameter führte zu thermischen Schäden oder morphologischen Veränderungen.

Basierend auf den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit kann geschlussfolgert werden, dass die CO_2 Laserbestrahlung ($\lambda = 10,6 \mu\text{m}$) mit $0,3 \text{ J/cm}^2$, 5 μs , 226 Hz bei einer Bestrahlungszeit von 9 s (2036 applizierte Pulse) zu einer erhöhten Kariesresistenz des Zahnschmelzes ohne unerwünschte thermische Schädigung führt.

Schüsselwörter: CO_2 Laser, Karies, Demineralisation, Zahnschmelz, Kariesprävention, QLF.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%	porcentagem
α	alfa
ΔF	delta F (% de perda de radiância da fluorescência)
ΔQ	delta Q (% de perda de radiância da fluorescência integrada pela área da lesão)
λ	lâmbda (comprimento de onda)
ρ	rô (densidade)
$\varnothing$	teta (diâmetro)
μm	micrometro(s)
μs	microsegundo(s)
$^{\circ}\text{C}$	grau(s) Celsius
<	menor que
>	maior que
$\approx$	aproximadamente
cm^{-1}	inverso do centímetro
cm^2	centímetro quadrado
CCD	<i>charged coupled device</i> ou dispositivo de carga acoplado
CO_2	dióxido de carbono
DP	desvio-padrão
Er:YAG	óxido de ítrio e alumínio ($\text{Y}_3\text{Al}_5\text{O}_{12}$) dopado com érbio (Er^{3+})
Hz	hertz
FFA	flúor fosfato acidulado
FTIR	<i>Fourier transformed infrared spectroscopy</i> ou espectroscopia no infravermelho com transformada de fourrier
FEM	<i>Finite element method</i> ou método de elementos finitos
HMDS	<i>Hexamethyl di-silazane</i> ($\text{C}_6\text{H}_{19}\text{NSi}_2$)
J/cm^2	joules por centímetro quadrado
mJ	miljoule(s)
ms	milissegundo(s)
m^3	metro(s) cúbicos

Nd:YAG	óxido de ítrio e alumínio ($\text{Y}_3\text{Al}_5\text{O}_{12}$) dopado com neodímio (Nd^{3+})
ns	nanossegundo(s)
OH^-	íon hidroxila
pH	logaritmo negativo da concentração hidrogeniônica ($-\log [\text{H}^+]$)
PL	profundidade de lesão
QLF	<i>quantitative ligh-induced fluorescence</i>
Q_i	calor interno
Q_{ext}	calor externo
s	segundo(s)
t	tempo
T	temperatura
TEM	<i>transversal eletromagnetic mode</i>
W	watt(s)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	24
2	REVISÃO DA LITERATURA	27
2.1	A Doença Cárie	27
2.1.1	cárie de subsuperfície de esmalte	29
2.2	Interação do <i>Laser</i> de CO₂ com o Esmalte Dental.....	30
2.3	Diminuição da Solubilidade do Esmalte após a Irradiação por <i>Laser</i>.....	33
2.4	Prevenção da Cárie com <i>Laser</i> de CO₂ (10,6 µm)	38
2.5	Métodos de Quantificação de Cáries Utilizados	47
2.5.1	microscopia de luz polarizada	48
2.5.2	quantificação da fluorescência Induzida por luz (QLF).....	50
3	PROPOSIÇÃO	57
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	58
4.1	Determinação do Diâmetro do Feixe <i>Laser</i>.....	58
4.2	Parâmetros <i>Laser</i> Avaliados	59
4.2.1	estudo 1: influência da densidade de energia	60
4.2.1.1	<i>preparo das amostras.....</i>	<i>60</i>
4.2.1.2	<i>irradiação com laser de CO₂.....</i>	<i>61</i>
4.2.1.3	<i>ciclagem de pH.....</i>	<i>63</i>
4.2.1.4	<i>análise de profundidade de lesão (PL)</i>	<i>64</i>
4.2.1.5	<i>microscopia eletrônica de varredura (MEV).....</i>	<i>66</i>
4.2.1.6	<i>estimativas de temperatura (modelo de elementos finitos).....</i>	<i>67</i>
4.2.2	estudo 2: influência da duração de pulso	70
4.2.2.1	<i>preparo das amostras.....</i>	<i>70</i>
4.2.2.2	<i>irradiação com laser de CO₂.....</i>	<i>71</i>
4.2.2.3	<i>tratamento do esmalte com flúor</i>	<i>72</i>
4.2.2.4	<i>ciclagem de pH.....</i>	<i>73</i>

4.2.2.5	<i>análise de profundidade de lesão (PL)</i>	73
4.2.2.6	<i>quantificação da fluorescência induzida por luz (QLF)</i>	73
4.2.2.7	<i>microscopia eletrônica de varredura (MEV)</i>	75
4.2.3	estudo 3: influência do número de pulsos sobrepostos	76
4.2.3.1	<i>preparo das amostras</i>	76
4.2.3.2	<i>irradiação com laser de CO₂</i>	77
4.2.3.1	<i>tratamento do esmalte com flúor</i>	78
4.2.3.2	<i>ciclagem de pH</i>	78
4.2.3.3	<i>análise de profundidade de lesão (PL)</i>	79
4.2.3.4	<i>quantificação da fluorescência induzida por luz (QLF)</i>	79
4.2.3.5	<i>microscopia eletrônica de varredura (MEV)</i>	80
5	RESULTADOS	81
5.1	Diâmetro do Feixe	81
5.2	Estudo 1: Influência da Densidade de Energia	84
5.2.1	<i>análise da profundidade de lesão (PL)</i>	84
5.2.2	<i>microscopia eletrônica de varredura (MEV)</i>	90
5.2.3	<i>estimativas de temperatura</i>	92
5.3	Estudo 2: Influência da Duração de Pulso	95
5.3.1	<i>análise da profundidade de lesão (PL)</i>	95
5.3.2	<i>quantificação da fluorescência induzida por luz (QFL)</i>	100
5.3.3	<i>microscopia eletrônica de varredura (MEV)</i>	107
5.4	Estudo 3: Influência do Número de Pulsos Sobrepostos	108
5.4.1	<i>análise da profundidade de lesão</i>	108
5.4.2	<i>quantificação da fluorescência induzida por luz (QFL)</i>	111
5.4.2.1	<i>análise inicial e após a irradiação por laser</i>	111
5.4.2.2	<i>análise após indução de cáries artificial</i>	115
5.4.3	<i>microscopia eletrônica de varredura (MEV)</i>	121
6	DISCUSSÃO	123
6.1	Influência da Densidade de Energia – Análises de PL e MEV	123
6.2	Influência da Duração de Pulso – Análises de PL e MEV	131
6.3	Influência do Número de Pulsos– Análises de PL e MEV	135

6.4	Influência da Duração de Pulso – Análises através de QLF	140
6.5	Influência do Número de Pulsos– Análises através de QLF.....	146
7.	CONCLUSÕES	152
APÊNDICE A-		154
REFERÊNCIAS		156

1 INTRODUÇÃO

A cárie ainda é uma doença de alta prevalência na população mundial. Apesar de uma diminuição significativa de sua incidência ter ocorrido nos últimos 30 anos, devido ao avanço das pesquisas com compostos fluoretados de aplicação tópica, uma alta incidência ainda é observada nas superfícies oclusais.

É justamente nos sítios oclusais que existe o maior potencial para a utilização da irradiação por *laser* de CO₂ em associação ou não com o flúor. Nesse sentido, alguns estudos têm demonstrado que a irradiação com *laser* de CO₂ tem um grande potencial para modificar a estrutura mineral do esmalte tornando-a mais resistente à cárie. O desenvolvimento dessa tecnologia tem permitido resultados cada dia melhores e é possível acreditar na sua futura utilização *in vivo*. A interação da luz *laser* com o tecido acontece de forma bastante seletiva e uma interação cada vez mais específica e controlada pode ser esperada, à medida que os conhecimentos a respeito dessa interação são aprofundados.

Diversos são os fatores que determinam a interação do *laser* com o tecido, e até hoje, após mais de 40 anos do aparecimento do primeiro *laser*, a influência detalhada de cada um deles e para cada comprimento de onda ainda não é completamente conhecida. Porém, passos importantes foram dados e a investigação cada vez mais detalhada dessas interações será a base para diversas aplicações clínicas. Sendo assim, entender como os diferentes parâmetros *laser* alteram os tecidos dentais duros e também como essas alterações resultam nos efeitos observados é passo fundamental para um maior desenvolvimento das aplicações do *laser* no tratamento de tecidos duros orais.

No campo da prevenção de cáries com *lasers*, muito se avançou no que diz respeito à utilização do comprimento de 9,6 μm , mas mesmo assim o grau de inibição de cáries *in vivo*, dos parâmetros já testados *in vitro*, ainda não pode ser encontrado na literatura. Para esse comprimento de onda ainda não existem equipamentos comercializados para a utilização clínica diária, portanto ainda há dificuldades para a realização do tratamento em pacientes.

Com o comprimento 10,6 μm , por outro lado, muitos estudos já foram publicados, mas a literatura ainda é pobre em evidências de inibição de cáries com largura de pulso de poucas dezenas de microssegundos. A maioria dos estudos tem sido conduzida com *lasers* contínuos e os poucos estudos com *lasers* pulsados avaliaram larguras de pulso da ordem de dezenas de milissegundos, que são cerca de mil vezes maiores. A única exceção a ser feita, são os estudos do grupo de Featherstone e colaboradores, mas mesmo assim a largura de pulso estudada sistematicamente é dez vezes maior (100 μs).

Segundo as pesquisas avaliando o aumento de temperatura após irradiação do esmalte por laser de CO_2 , um maior aquecimento, e também localizado na superfície do esmalte pode ser obtido com larguras de pulso menores (dezenas de microssegundos). Isso oferece vantagens do ponto de vista de menor propagação do calor gerado na superfície para o interior da estrutura dental e também, pela possibilidade de se atingir os mesmos efeitos, porém com menos energia.

Existe uma ausência na literatura de estudos sistemáticos avaliando a inibição de cáries com *laser* de CO_2 (10,6 μm) com larguras pulso próximas de 10 μs . Por esse motivo, e também devido ao potencial que esse tipo de irradiação apresenta, para aumentar a resistência à desmineralização do esmalte, promovendo menos danos térmicos superficiais e profundos, o estudo do efeito

preventivo da cárie com esses parâmetros e também das alterações morfológicas provocadas pela irradiação, pode levar à descoberta de parâmetros mais adequados e de menos riscos para uma aplicação *in vivo*.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 A Doença Cárie

A doença cárie é de natureza infecciosa, porém multifatorial e dinâmica. O processo de cárie depende da interação entre quatro fatores: microorganismos (bactérias acidogênicas), hospedeiro susceptível (característica da estrutura dental, saliva e hospedeiro), substratos (carboidratos fermentáveis da dieta) e o tempo. Portanto, a presença isolada de qualquer um dos fatores não é capaz de levar ao desenvolvimento da doença. Mesmo, a existência dos três primeiros fatores concomitantemente, não resulta em perda mineral instantânea, pois ainda assim, é necessário que essa situação perdure por algum tempo para que ocorra desmineralização (HICKS;GARCIA-GODOY;FLAITZ, 2004).

A desmineralização em si é provocada pela simples presença de ácidos na placa, que causa queda de pH e perda de mineral dos dentes para a saliva. No entanto, o conceito atual com relação à formação de cárie é que a lesão, clinicamente visível ou detectável, é o resultado do acúmulo de inúmeros episódios de desmineralização e remineralização, em vez de um processo unidirecional de desmineralização (LARSEN;FEJERSKOV, 1989; AOBA, 2004).

A colonização bacteriana é fundamental para que se instale a cárie. Animais totalmente livres de microorganismos, mesmo na presença de dieta altamente cariogênica, e em ausência de remoção da placa, não desenvolvem cárie. As bactérias capazes de fermentar carboidratos, produzir ácidos como subproduto e

ainda sobreviver no meio ácido criado, são os *Streptococcus mutans* e os *Lactobacillus*. Em lesões de cárie ativas, estes microorganismos são encontrados em grande número (FITZGERALD;JORDAN;ARCHARD, 1966; SVENSATER et al., 2003; CAUFIELD, 2005).

Uma grande variedade de microorganismos, incluindo os acima citados, coloniza a superfície do dente formando uma massa mole, concentrada e aderente, chamada placa dental. Na placa também estão presentes proteínas, lipídeos, água e alguns minerais, como Ca, P, K, Mg, Na, Zn, Cu, Pb, Fe, Li, Sr, F, Al. Do ponto de vista da sobrevivência bacteriana, as superfícies duras preferencialmente colonizáveis são aquelas que não estão continuamente expostas ao desgaste mecânico e às forças de cisalhamento durante a função mastigatória. Portanto, os acúmulos acontecem preferencialmente no esmalte ao longo da gengiva e nos sulcos e fissuras da oclusal dos dentes, sendo estes últimos também os locais mais susceptíveis à ocorrência de lesões cariosas (ZAURA;BUIJS;TEN CATE, 2002).

Os carboidratos da dieta são a principal fonte de energia das bactérias (via de produção de ATP) e se constituem em substratos essenciais para a síntese de polissacarídeos extracelulares utilizados como material de reserva. Tanto os carboidratos de resíduos alimentares que permanecem na cavidade oral quanto aqueles liberados por glicoproteínas salivares podem ser facilmente utilizados pelas bactérias para obtenção de energia. As bactérias metabolizam a glicose e frutose através de vias fermentáveis, devido ao meio ambiente anaeróbio no qual a maioria dessas bactérias cresce (ZAURA;BUIJS;TEN CATE, 2002; SVENSATER et al., 2003).

Atualmente, o mecanismo de formação da cárie é bem conhecido, apesar dos diversos aspectos envolvidos. Visto que essa é uma doença multifatorial e que

ainda não pode ser completamente evitada, o estudo sobre qualquer um dos principais fatores envolvidos permite que novos métodos de prevenção sejam explorados.

2.1.1 cárie de subsuperfície de esmalte

A primeira evidência de cárie pode ser vista, macroscopicamente, no esmalte sob o aspecto de uma mancha branca. A superfície do esmalte, nestes casos encontra-se intacta, não sendo possível distingui-la do esmalte sadio adjacente, a não ser pela opacidade aumentada. Porém, abaixo dessa superfície o esmalte já se encontra desmineralizado (KIDD;FEJERSKOV, 2004).

Esse tipo de lesão apresenta quatro zonas. A zona translúcida (40 μ m espessura), primeira região a apresentar alterações em relação ao esmalte sadio, apresentando 1% de porosidades; zona escura, onde o volume dos poros presentes na zona anterior já está aumentado, perfazendo um total de 5%; a zona denominada corpo da lesão, em que é observada maior desmineralização (25%) e aumento da parte orgânica; por fim a zona de superfície intacta, que corresponde ao esmalte superficial intacto apenas com seu índice de birrefringência alterado (SILVERSTONE, 1973).

Esse tipo de lesão é reprodutível em laboratório através de protocolos de desmineralização ácida, seguidos ou não de remineralização. Neste estudo, este será o tipo de lesão utilizado, lesões incipientes. Como mesmo as grandes lesões

de cárie se iniciam como uma lesão incipiente, este estudo se concentrará na prevenção deste tipo de lesão.

2.2 Interação do *Laser* de CO₂ com o Esmalte Dental

A interação entre o *laser* e o tecido é extremamente dependente das propriedades ópticas do tecido. Por esse motivo entender a composição do mesmo é de grande importância para se encontrar os comprimentos de onda que podem provocar as interações desejadas para a prevenção de cáries. O esmalte dental é composto em volume por 85% de mineral, 12% de água e 3% de matéria orgânica (DIBDIN, 1993; FRIED et al., 1997). A parte mineral é formada em grande parte por cristais de hidroxiapatita carbonatada organizados em prismas de aproximadamente 5 µm de diâmetro (LEGEROS, 1991).

Devido a sua composição o esmalte apresenta uma alta absorção para comprimentos de onda na região do infravermelho entre 2,7 e 3 µm, emitidos pelos *lasers* de érbio e para os comprimentos entre 9-11 µm, emitidos pelos *lasers* de CO₂. Nessas regiões do espectro o espalhamento é negligível e a deposição de energia é determinada pelo coeficiente de absorção e pela reflexão (NIEMZ, 1996; FRIED et al., 1998; ZUERLEIN et al., 1999; EDUARDO;GOUW-SOARES;HAYPEK, 2002). As duas regiões do espectro mencionadas têm portanto, teoricamente, o maior potencial para interagir com esmalte e dentina. Porém, os quatro principais comprimentos de onda emitidos pelo *laser* de CO₂ (9,3; 9,6; 10,3; 10,6 µm) apresentam um coeficiente de absorção maior no esmalte do que a apresentam os

lasers de érbio ($\mu\text{a} = 480$ e 80 cm^{-1} , respectivamente para $2,79$ e $2,94 \text{ }\mu\text{m}$), o que torna a interação mais eficiente do ponto de vista energético (Tabela 2.1).

Tabela 2.1- Tabela de propriedades ópticas do esmalte dental humano para os comprimentos de onda emitidos pelo *laser* de CO_2 . (FRIED et al., 1997; ZUERLEIN;FRIED;FEATHERSTONE, 1999; ZUERLEIN et al., 1999)

Comprimento de Onda	Coefficiente de Absorção (cm^{-1})	Coefficiente de Espalhamento (cm^{-1})	Reflectância (%)	Profundidade de Absorção (μm)
9,3 μm	5500	~ 0	37,7	2
9,6 μm	8000	~ 0	49,4	1
10,3 μm	1125	~ 0	15,8	9
10,6 μm	825	~ 0	13,2	12

A absorção dos *lasers* de CO_2 pelo esmalte está relacionada à absorção pelas bandas de fosfato da porção mineral da estrutura. Entre os quatro comprimentos de onda principais, os dois mais curtos, $9,3$ e $9,6 \text{ }\mu\text{m}$, apresentam a maior absorção e coincidem com a banda de absorção do fosfato (Figura 2.1). Para os mais compridos, $10,3$ e $10,6 \text{ }\mu\text{m}$, a absorção é menor e também o grau de coincidência com a banda de fosfato (ZUERLEIN et al., 1999).

O efeito preventivo de cárie obtido através da irradiação por *laser* tem sido relacionado ao aumento de temperatura no tecido (KURODA;FOWLER, 1984). Para que esse aumento de temperatura possa acontecer é preciso que a luz proveniente do feixe *laser* seja em grande parte absorvida. Somente quando a energia dos fótons é absorvida pelo tecido ela pode gerar calor e também a emissão de outro comprimento de onda (fluorescência). Por isso, quanto maior o coeficiente de absorção de um comprimento de onda, maior é o seu potencial para causar o aquecimento do tecido (SEKA et al., 1995a).

Figura 2.1- Espectro de transmissão obtido através de espectroscopia no infravermelho com transformada de fourrier (FTIR) de uma fatia de esmalte dental humano de 50 μm de espessura. A coincidência das bandas de fosfato com os comprimentos de onda entre 9 e 11 μm pode ser observada. Adaptado de Zuerlein et al., 1999

Além disso, o coeficiente de absorção também é inversamente proporcional à penetração da luz *laser* tecido, como descreve a Lei de Beer-Lambert (NIEMZ, 1996). Sendo assim, quanto mais uma radiação eletromagnética é absorvida por um determinado tecido, menor é a sua profundidade de penetração nele. Portanto, para tempos de interação *laser*-tecido próximos do tempo de relaxamento térmico da estrutura, a espessura da camada aquecida deve ser próxima à profundidade de absorção do comprimento de onda utilizado.

Observando-se esses princípios de interação da luz *laser* com o tecido e observando-se a Tabela 2.1, é possível inferir, para os *lasers* de CO_2 , que para uma mesma quantidade de energia e para um tempo de interação próximo ao tempo de relaxamento térmico do tecido, a irradiação com 9,6 μm causará o maior aumento de temperatura, porém nos 2 μm mais externos da superfície. Já a irradiação com

10,6 μm causará o menor aumento de temperatura, porém numa espessura de tecido um pouco maior (12 μm).

2.3 Diminuição da Solubilidade do Esmalte após a Irradiação por *Laser*

Muitos estudos têm demonstrado o efeito da irradiação com os mais diversos *lasers* na diminuição da solubilidade do esmalte dental, porém até hoje a maneira exata como essa diminuição é provocada não é completamente conhecida. Três teorias diferentes têm sido propostas para explicar as alterações do esmalte que resultam no efeito preventivo e todas elas se relacionam com o aumento de temperatura no tecido. Até hoje não é claro qual delas tem o efeito predominante, mas o mais provável é que mais de uma dessas alterações sugeridas aconteça ao mesmo tempo e que o somatório dos seus efeitos resulte na inibição da cárie.

A primeira teoria proposta relaciona a redução da solubilidade do esmalte dental com o derretimento e a fusão da camada superficial de esmalte. Como em diversos estudos a fusão e recristalização da superfície após irradiação foi observada, surgiu a teoria de que essa camada superficial fundida causaria uma diminuição da permeabilidade do íon ácido e portanto a redução da dissolução mineral (STERN;VAHL;SOGNNAES, 1972; LENZ;GILDE;WALZ, 1982; WALSH;PERHAM, 1991). Porém as evidências atualmente disponíveis indicam que a fusão não é obrigatoriamente necessária para que haja inibição da

progressão de lesão e também que as alterações ocorridas no esmalte fusionado não são as mais interessantes para redução da solubilidade.

Borggreven, Van Dijk e Driessens (1980) medindo a penetração de traçadores iônicos e não iônicos no esmalte mostraram um aumento da permeabilidade nas regiões em que houve fusão após irradiação com *laser* de CO₂ (BORGGREVEN;VAN DIJK;DRIESSENS, 1980). Nelson et al. (1987) observaram em espectroscopia no infravermelho formação de fosfato de tetracálcio, que é uma fase mais solúvel que o esmalte, após irradiação do esmalte com 50 J/cm² e fusão da superfície (NELSON et al., 1987). Além disso, é sabido que na temperatura que o esmalte superficial começa a sofrer derretimento, ao redor de 1100°C, e fusão, próximo 1280°C, as mudanças de fase da hidroxiapatita (α -TCP e tet-TCP) e alterações na sua composição resultam em aumento da solubilidade (KURODA;FOWLER, 1984; FOWLER;KURODA, 1986; NELSON et al., 1986; ELLIES;NELSON;FEATHERSTONE, 1988).

As outras duas teorias propostas para redução da desmineralização do esmalte se referem: (1) às alterações cristalográficas, que tornam o mineral menos solúvel e (2) à teoria de bloqueio da difusão de íons pela decomposição da matriz orgânica.

O aquecimento do esmalte provoca alterações da sua composição e estrutura, além de mudanças de fase da hidroxiapatita. Essas alterações são diferentes em diferentes temperaturas e por isso também as alterações de dissolução. Segundo Fowler e Kuroda (1986) na faixa entre 100-650°C o aquecimento do esmalte provoca diminuição do conteúdo de água, decomposição de proteínas, perda parcial de carbonato e formação de pirofosfatos. Entre 650-1000°C são observados, crescimento dos cristais, formação de α - e β -TCP,

redução de OH^- , e eliminação do carbonato. Entre 1100-1600°C, as fases α -TCP e TetTCP podem ser observadas juntamente com uma maior redução de OH^- . Nas duas faixas mais altas de temperatura, as fases de hidroxiapatita formada apresentam produto de solubilidade maior do que o esmalte natural, o que aumenta a solubilidade. Entre 100 e 650°C, fases menos solúveis não são formadas e a redução de carbonato e formação pirofosfato são conhecidas por diminuir a solubilidade do esmalte, portanto essa faixa tem sido descrita como a faixa interessante para as modificações induzidas por *laser*. Porém, os mesmos autores mostram evidências de que na faixa inicial do intervalo entre 650-1000°C ocorre a formação de uma segunda fase de β -TCP, que é mais semelhante à hidroxiapatita e que contém menos impurezas que o esmalte natural. Ao mesmo tempo, a relação cálcio/fósforo se torna mais estequiométrica¹, o conteúdo de carbonato e água são reduzidos e de OH^- aumentado e essas mudanças também podem tornar a parte cristalina mais pura e provavelmente também reduzem a solubilidade do esmalte (EVANS et al., 1980; FOWLER; KURODA, 1986; LEGEROS, 1991; BACHMANN; ZECELL, 2005; ANA; BACHMANN; ZECELL, 2007).

A hidroxiapatita carbonatada presente no esmalte dental contém impurezas e a redução dessas impurezas reduz a sua solubilidade. Por esse motivo quando somente a redução do carbonato é levada em consideração, a temperatura ideal para aquecimento do esmalte deveria ser entre de 800-900°C onde acontece a maior eliminação desse elemento (ZUERLEIN; FRIED; FEATHERSTONE, 1999). De fato, Featherstone e colaboradores sugerem essa faixa de temperatura como ideal para causar redução da solubilidade após irradiação por *laser*, pois nas condições de irradiação em que redução da progressão de cáries foi observada também a

¹ O termo estequiometria é utilizado para as proporções molares dos elementos em compostos estequiométricos. Em compostos estequiométricos as proporções molares são números inteiros. Como por exemplo a estequiometria do hidrogênio e do oxigênio na molécula de água (H_2O) é 2:1.

perda de carbonato foi evidenciada através de medidas em FTIR. Porém esse mecanismo ainda precisa ser mais bem estudado, pois como mencionado acima as mudanças de fase ocorridas nessa faixa de temperatura podem causar um efeito contrário (FEATHERSTONE et al., 1995; FRIED et al., 1996; GERARD et al., 2005; FEATHERSTONE;APEL, 2007).

Nesse sentido existe também uma terceira teoria, que descreve a possível influência da decomposição da matriz orgânica na redução da solubilidade. Após aquecimento do esmalte em forno em temperaturas entre 400 e 500°C ocorre diminuição da permeabilidade do esmalte e uma redução de oito ordens de magnitude da solubilidade em relação ao esmalte natural (SATO, 1983; HSU et al., 1994). Considerando-se que a decomposição das proteínas do esmalte acontece ao redor de 350°C, existe a possibilidade de que os produtos da decomposição da material orgânica obstruam os poros do esmalte e impeçam a penetração dos íons ácidos (HOLCOMB;YOUNG, 1980; FOWLER;KURODA, 1986). Em estudos com *laser* esse efeito foi demonstrado por Hsu e colaboradores (2000). Após a irradiação por *laser* de CO₂ de amostras de esmalte contendo matriz orgânica e outras em que essa matriz foi removida, uma inibição à progressão de cáries significativamente maior foi observada nas amostras irradiadas e que continham a matriz orgânica. Nesse mesmo estudo, o aumento de temperatura não foi medido, mas as alterações da birrefringência (histológica) indicaram que o aumento de temperatura não foi maior que 400°C (HSU et al., 2000). Nessa mesma faixa de temperatura também a água é eliminada do tecido e a obstrução dos poros do esmalte foi observada. Através de espectrômetro de ressonância paramagnética eletrônica, a presença de produtos da decomposição da matriz orgânica foi

observada no esmalte aquecido a 400°C (BACHMANN et al., 2004; ZECELL et al., 2005)

Ainda sustentando essa teoria, com *laser* de Er:YAG a redução dos poros e da área de superfície do esmalte foi demonstrada após irradiação por *laser* em amostras que continham matriz orgânica e não nas amostras em que a matriz orgânica foi removida (YING;CHUAH;HSU, 2004). Além disso, medidas diretas de alteração do coeficiente de difusão do esmalte irradiado indicam que a extração da matriz orgânica decresce em 34-75% o efeito do *laser* na difusão (MAUNG;WOHLAND;HSU, 2007a, 2007b) a+b.

Ainda em esmalte irradiado por *laser* de Er:YAG observações através de espectroscopia Raman indicaram redução significativa tanto da banda de carbonato tipo B (1070 cm^{-1}) quanto da banda de matriz orgânica (2940 cm^{-1}) em relação ao esmalte não irradiado (LIU;HSU, 2007).

Como observado, existem evidências que suportam todas as teorias e é provável que o efeito seja o resultado de uma combinação entre elas. Além disso, também os efeitos no tecido devem apresentar um gradiente, semelhante ao gradiente de propagação do calor para o seu interior. Sendo assim, mesmo uma camada de esmalte superficial negativamente alterada, quanto a sua solubilidade, pode apresentar sob si uma camada mais resistente à cárie e vice-versa. Porém uma melhor compreensão desses efeitos depende de novos estudos investigando de forma mais detalhada as alterações estruturais e composicionais no esmalte após irradiação com *laser* ou mesmo aquecimento em fornos.

2.4 Prevenção da Cárie com *Laser* de CO₂ (10,6 µm)

A possibilidade de se aumentar a resistência do esmalte dental à desmineralização após a irradiação por um *laser* foi demonstrada pela primeira vez em 1965 com um *laser* de rubi (STERN;SOGNNAES, 1972; STERN;VAHL;SOGNNAES, 1972). Com o passar do tempo e com o aumento do conhecimento dos pesquisadores a respeito da interação do *laser* com os tecidos duros, o *laser* de CO₂ começou a ser testado. Como bons resultados de inibição de cáries incipientes também foram observados com esse *laser* e como a sua utilização proporciona uma interação com o tecido bastante eficiente, esse *laser* tem sido desde então preferencialmente estudado.

O efeito preventivo de cárie pode ser obtido tanto com o *laser* de CO₂ operando no modo contínuo como também no modo pulsado. A irradiação do esmalte no modo contínuo com 120 J/cm² reduz a perda mineral observada em microrradiografias e também converte a fase mineral do esmalte para uma fase de hidroxiapatita significativamente menos solúvel que a do esmalte não irradiado (WONG et al., 1990; FOX et al., 1992a; FOX et al., 1992b). Em fluências ainda mais altas 1270 e 6370 J/cm² até mesmo a fusão completa de fóssulas e fissuras de dentes molares humanos é observada (WALSH;PERHAM, 1991). Além disso, diversos estudos têm demonstrado redução significativa da solubilidade do esmalte em meio ácido (HOSSAIN et al., 1999; HOSSAIN et al., 2002; TEPPER et al., 2004).

No entanto, a grande desvantagem da irradiação no modo contínuo é que ela causa um maior aumento de temperatura na superfície e também a sua maior

propagação para o interior do tecido. Considerando-se que um aumento da temperatura pulpar de apenas 5,5°C já pode causar danos irreversíveis à polpa, o modo contínuo apresenta maiores riscos para utilização *in vivo* (ZACH;COHEN, 1965; SAGI et al., 1992; FRIED;RAGADIO;CHAMPION, 2001).

Por essa razão, a maior parte das pesquisas recentes, estudando a inibição da progressão de cáries após irradiação do esmalte dental por *lasers* de CO₂, tem sido conduzida utilizando-se a emissão pulsada. Irradiando-se o tecido desse modo, no intervalo entre um pulso e o próximo, é possível que o relaxamento térmico aconteça e portanto a propagação de calor para as camadas interiores pode ser reduzida (SEKA et al., 1995b; FRIED et al., 1996).

Assim como no modo contínuo, a irradiação do esmalte dental com *laser* de CO₂ no modo pulsado também é capaz de inibir significativamente a progressão de cáries. Esse efeito tem sido observado com os mais diversos parâmetros e é difícil comparar diretamente os resultados dos diferentes grupos, pois poucas são as semelhanças entre as condições de irradiação (FEATHERSTONE et al., 1998; HSU et al., 2000; KLEIN et al., 2005; STEINER-OLIVEIRA et al., 2006). Os resultados de inibição de cáries encontrados na literatura para o comprimento de onda de 10,6 µm emitindo no modo pulsado foram resumidos na Tabela 2.2, separados somente pela duração de pulso, porém mais adiante uma revisão mais detalhada dos parâmetros de irradiação já reportados será apresentada.

As avaliações mais sistemáticas que podem ser encontradas para irradiações com *lasers* de CO₂ emitindo em 10,6 µm, são as do grupo de Featherstone e colaboradores. De acordo com esse grupo, para a mesma duração de pulso (100 µs), mesmo número de pulsos sobrepostos (25) e mesma taxa de repetição (10 Hz), as mais altas porcentagens de inibição da perda mineral são

observadas em densidade de energia ao redor de 12 J/cm^2 (FEATHERSTONE et al., 1995; FEATHERSTONE et al., 1998; KANTOROWITZ; FEATHERSTONE; FRIED, 1998).

Um porcentual de inibição da progressão de cárie bastante alto também já foi observado após irradiação com densidade de energia mais baixa ($0,3 \text{ J/cm}^2$), porém com uma taxa de repetição de 20 Hz e uma duração de pulso 50 vezes maior (HSU et al., 2000, 2001).

As reduções de progressão de cáries até hoje observadas na literatura são realmente estimulantes e mostram o potencial dos *lasers* de CO_2 para o tratamento preventivo. Porém, juntamente com o aspecto positivo do tratamento, também ocorrem efeitos colaterais, que se referem de maneira geral aos danos térmicos na estrutura. A maior parte dos parâmetros que apresentaram redução de perda mineral ao redor de 90%, também já demonstrou causar excessivo dano térmico na superfície (observados sob a forma de fissuras e microfissuras) e excessivo aumento da temperatura no interior do tecido (FEATHERSTONE et al., 1995; MCCORMACK et al., 1995a; HSU et al., 2000).

Fissuras evidentes em microscopia eletrônica de varredura também já foram observadas para irradiações com 6, 10 e $11,5 \text{ J/cm}^2$ em pulsos de 10 ms assim como também para uma energia mais alta $83,3 \text{ J/cm}^2$ em pulsos de 667 μs (TSAI et al., 2002; TAGLIAFERRO et al., 2007).

Como pode ser observado na Tabela 2.2, existe uma grande diferença entre as durações de pulsos que já foram utilizadas em estudos de prevenção de cárie.

A largura de pulso do *laser* tem influência direta no aumento da temperatura na superfície do esmalte e também na propagação do calor para as camadas dentais mais profundas. Para duas irradiações com o mesmo comprimento de onda

(10,6 μm), mesma densidade de energia e mesmo número de pulsos, porém uma com 50 μs e outra com 500 μs , uma diferença de 200°C na elevação da temperatura na superfície pode ser observada. Com os pulsos mais curtos, um aumento maior da temperatura na superfície pode ser esperado e com os pulsos mais longos um aumento menor, porém com maior propagação do calor para o interior do tecido (FRIED et al., 1996).

O carbonato presente como impureza dos cristais de hidroxiapatita no esmalte dental pode ser eliminado da estrutura após aquecimento entre 400 e 800°C. Como a duração de pulso tem uma influência direta no aumento de temperatura também uma influência na perda de carbonato da estrutura é esperada. Essa influência existe de fato, e para o comprimento de onda de 10,6 μm a redução da duração de pulso de 100 para 2 μs reduz à metade a energia necessária para que o carbonato seja eliminado da estrutura. Para a irradiação com 100 μs , a eliminação acontece com 6 J/cm^2 e para 2 μs com 3 J/cm^2 (FRIED et al., 1996; ZUERLEIN;FRIED;FEATHERSTONE, 1999).

Para comprimentos de onda altamente absorvidos pelo esmalte dental ($\mu\text{a} > 800 \text{ cm}^{-1}$) uma duração de pulso menor que o tempo de relaxamento térmico da camada absorvedora permite que a deposição de calor seja altamente localizada na superfície, causando mínimos danos térmicos ao tecido vizinho (ZUERLEIN;FRIED;FEATHERSTONE, 1999).

Por essas observações fica claro que a irradiação com larguras de pulso menores tem maior potencial para promover sim o aumento de temperatura necessário para tornar a hidroxiapatita menos solúvel, mas também com um menor aumento nas camadas profundas próximas à polpa.

No caso da irradiação do esmalte dental com *laser* de CO₂ emitindo em 10,6 µm, o tempo de relaxamento térmico da estrutura é de 90 µs, portanto, durações de pulso da mesma ordem de grandeza ou menores do que esse valor possuem um alto potencial para otimizar o aumento da temperatura na superfície e ao mesmo tempo diminuir a difusão do calor para as camadas mais profundas (FRIED;RAGADIO;CHAMPION, 2001; APEL et al., 2002). Com a diminuição da largura de pulso, diminui a quantidade de energia necessária para modificar o tecido e promover tanto o aumento da resistência ácida do esmalte como também o limiar de ablação. Portanto, quanto menor a largura de pulso utilizada, menor deve ser também a densidade de energia para permitir efeitos sub-ablativos (FRIED et al., 1999; ZUERLEIN;FRIED;FEATHERSTONE, 1999; FRIED;RAGADIO;CHAMPION, 2001).

Tabela 2.2- Resumo dos resultados das análises de perda mineral (PM), profundidade de lesão (PL) e solubilidade de cálcio (SC) encontrados para irradiações do esmalte dental com *laser* de CO₂ ($\lambda = 10,6 \mu\text{m}$) emitindo no modo pulsado com diferentes densidades de energia (DE)

Autor (ano)	DE (J/cm ²)	Desafio Cariogênico	Análise	Resultados
Duração de pulso 200 ns + 400 pulsos sobrepostos				
Nelson et al. (1986)	50	0,04 mol/l ácido láctico	PM	30-40% inibição PM
Duração de pulso 100 μs + 25 pulsos sobrepostos				
Featherstone et al. (1995)	5	Ciclagem de pH	PM	45% inibição PM
Featherstone et al. (1995)	10	Ciclagem de pH	PM	57% inibição PM
Featherstone et al. (1998)	2,5	Ciclagem de pH	PM	45% inibição PM
Featherstone et al. (1998)	12,5	Ciclagem de pH	PM	85% inibição PM
Kantorowitz et al. (1998)	12	Ciclagem de pH	PM	87% inibição PM
Duração de pulso 5 ms + 4 pulsos sobrepostos				
Hsu et al. (2000)	0,3** 3,4	Ciclagem de pH	PM	99% inibição PM
Hsu et al. (2001)	0,3** 3,4	Ciclagem de pH	PM	98% inibição PM + NaF antes da irradiação
Hsu et al. (2001)	0,3** 3,4	Ciclagem de pH	PL	91% inibição PL + NaF antes da irradiação
Duração de pulso 667 μs + 56 pulsos sobrepostos				
Tsai et al. (2002)	83,3	0,1 mol/l ácido láctico	SC	12% redução SC
Tsai et al. (2002)	83,3	0,1 mol/l ácido láctico	PL	46% redução PL
Duração de pulso 50 ms *				
Klein et al. (2005)	8	Ciclagem de pH	PM	52% inibição PM
Klein et al. (2005)	16	Ciclagem de pH	PM	64% inibição PM
Tagliaferro et al. (2007)	5	Ciclagem de pH	PM	67% inibição PM
Tagliaferro et al. (2007)	5	Ciclagem de pH	PM	97% inibição PM + APF após irradiação
Duração de pulso 10 ms *				
Steiner-Oliveira et al. (2006)	10	Ciclagem de pH	PM	67% inibição PM

* Indica que nesses estudos o número de pulsos sobrepostos não foi informado

** A energia calculada a partir dos dados fornecidos pelos autores é de 3,4 J/cm² e não 0,3 J/cm² como informado no manuscrito.

Apesar das vantagens, do ponto de vista de geração de calor nos tecidos duros dentais, observadas pela irradiação com durações de pulso ao redor de 10 μs (que são menores que o tempo de relaxamento térmico do tecido) com o comprimento de onda de 10,6 μm , pouco tem sido investigado com relação ao seu potencial de inibição de cáries.

Alguns estudos reportados na literatura se concentram na investigação dos efeitos relacionados ao aumento da temperatura no tecido, ou na eliminação de carbonato, mas não diretamente na avaliação da redução da perda mineral do esmalte causada por irradiações nessas condições (FEATHERSTONE;FRIED;DUHN, 1998).

Com o comprimento de 9,6 μm , por outro lado, durações de pulso mais curtas e densidades de energia menores têm sido recentemente testadas e os resultados mostram que esses parâmetros são capazes de provocar uma grande inibição da perda mineral. Para pulsos de 100 μs de duração, a maior inibição da solubilidade mineral é observada em irradiações com 3 a 5 J/cm^2 (GERARD et al., 2005). Para pulsos de 8 μs , com apenas 1 J/cm^2 uma taxa de redução da solubilidade de 50% pode ser atingida (SANTOS;FEATHERSTONE;FRIED, 2001). A aplicação de flúor fosfato acidulado em gel na superfície do esmalte previamente à irradiação promove uma redução ainda maior (62%), em termos de perda mineral, para os mesmos 1 J/cm^2 , porém com pulsos de 5 μs (TANGE;FRIED;FEATHERSTONE, 2000; GOODIS et al., 2004; RODRIGUES;NOBRE DOS SANTOS;FEATHERSTONE, 2006).

A qualidade e a quantidade das informações a respeito da inibição de cárie promovidas pelos *lasers* de CO_2 são nitidamente maiores para o comprimento de onda de 9,6 μm . Esse foi o comprimento de onda escolhido pelo grupo que mais

estudou esse tópico, portanto até mesmo estudos histopatológicos investigando os efeitos inflamatórios na polpa, estudos em modelos *in situ* e também em dentes decíduos com os mesmos parâmetros testados *in vitro* (1 e 1,5 J/cm², 5 e 8 µs e 10 Hz) já foram realizados (FOX et al., 1992a; FOX et al., 1992b).

A emissão em 9,6 µm apresenta um coeficiente de absorção maior no tecido, por isso é mais absorvida e penetra menos no esmalte. Porém, apesar de a absorção ser menor a irradiação com 10,6 µm pode causar a modificação de uma camada mais espessa de esmalte, e por tanto conter a desmineralização por mais tempo (TEN BOSCH;ANGMAR-MANSSON, 1991).

Com 10,6 µm as durações de pulsos já testadas sistematicamente são em geral mais longas (100-50.000 µs) do que uma dezena de microssegundos. O único estudo com pulsos bastante curtos (0,1 – 0,2 µs) foi realizado por Nelson e colaboradores ainda no início da década de 1980, porém apenas com uma densidade de energia muito alta (50 J/cm²) uma inibição de 50% de perda mineral foi observada (ver Tabela 2.3). A combinação de energias baixas, ao redor de 1 J/cm² com durações de pulsos curtas (5 a 50 µs), para o comprimento de onda de 10,6 µm, ainda não foi estudada. Observados os bons resultados que têm sido apresentados com 9,6 µm, e considerando-se que a profundidade de penetração no tecido é aproximadamente 10 µm maior em 10,6 µm, existe a hipótese de uma alta porcentagem de inibição de cáries, com poucos danos térmicos, e com uma resistência ácida mais longa, para a irradiação em 10,6 µm nessas condições.

Tabela 2.3– Parâmetros de irradiação por *laser* de CO₂ ($\lambda=10,6\ \mu\text{m}$) pulsado já testados quanto à redução da solubilidade ácida ou quanto à redução da perda mineral do esmalte dental. Dados ordenados em ordem decrescente de duração de pulso

Autor	Duração de Pulso (μs)	Densidade de Energia (J/cm^2)	Energia (mJ)	Frequência (Hz)	Número de Pulsos Sobrepostos
Klein et al. (2005)	50.000	8	400*	2	nd
		16	800*		
Tagliaferro et al. (2007)	50.000	5	1000*	1	nd
Brugnera et al. (1997)	20.000	nd	286*	7	nd
Steiner Oliveira et al. (2006)	10.000	1,5	2	50	nd
		6,0	8		
		10,0	14		
		11,5	16		
Kato et al. (2003)	10.000	15	20	15	nd
Hsu et al. (2000)	5.000	0,3**	---	20	4
		3,4			
Hsu et al. (2001)	5.000	0,3**	---	20	
		3,4			
Tsai et al. (2002)	667	83,3	1,3	750	56
Featherstone et al. (1995)	100	5	100	10	25
		10	200		
Featherstone et al. (1998)	100	2,5	50	10	25
		5	100		
		10	200		
		12,5	250		
Kantorowitz et al. (1998)	100	12	240	10	25
Este trabalho	5 a 50	0,1 a 0,6	6 a 39	70 a 500	452 a 2036
Nelson et al. (1986)	0,1 a 0,2	10	nd	0,67	400
		50			

* Indica que os números foram calculados a partir dos dados de densidade de energia e área do feixe mencionados nos artigos.

** A energia calculada a partir dos dados fornecidos pelos autores é de 3,4 J/cm^2 e não 0,3 J/cm^2 como informado no manuscrito.

nd – Indica informação não descrita nos artigos.

2.5 Métodos de Quantificação de Cáries Utilizados

O estudo de novas terapias para a prevenção da cárie exige que as lesões desenvolvidas e pequenas alterações no conteúdo mineral da estrutura possam ser quantificadas. Esse assunto tem sido muito estudado ao longo dos últimos 50 anos e por isso existem hoje diversos métodos descritos na literatura, capazes de fazer este tipo de mensuração. A quantificação das lesões pode ser feita tanto com relação à extensão de tecido já afetado, como com relação à perda mineral (ANGMAR;CARLSTROM;GLAS, 1963; ARENDS;SCHUTHOF;JONGEBLOED, 1980; FEATHERSTONE et al., 1983; THEUNS et al., 1983).

Entre os métodos desenvolvidos para quantificação da perda mineral em estudos *in vitro*, a utilização das técnicas de microrradiografia em corte transversal, microdureza em corte transversal, análises químicas da dissolução de cálcio e fósforo, bombardeamento por elétrons e microscopia de luz polarizada têm sido considerados métodos de referência (*gold standard*) para esse tipo de medida (ARENDS;SCHUTHOF;JONGEBLOED, 1980; ARENDS;TEN BOSCH, 1992).

Para a quantificação da extensão das lesões também diversos métodos têm sido propostos. A análise pode ser feita através da penetração de corantes nas lesões e observação em microscópio, microscopia eletrônica de varredura, microrradiografia, microdureza, microscopia confocal de varredura *laser* e microscopia de luz polarizada. Uma boa concordância é observada entre as medidas feitas pelos diferentes métodos (DARLING, 1956; SILVERSTONE, 1973).

Com intuito de possibilitar uma avaliação quantitativa das lesões também *in vivo*, grande atenção tem sido dedicada ao desenvolvimento de métodos não destrutivos. Esses métodos se baseiam fundamentalmente na análise das

propriedades ópticas alteradas nos tecidos cariados e com alguns deles é possível uma correlação com o conteúdo mineral. Entre os vários métodos que têm sido estudados, tomografia por coerência óptica, espalhamento por luz e quantificação da fluorescência induzida por luz, este último é o que se encontra em estágio mais avançado de desenvolvimento e para o qual já existe inclusive um equipamento disponível para o uso clínico.

2.5.1 microscopia de luz polarizada

A estrutura mineral do esmalte é composta de cristais de hidroxiapatita, organizados em primas que estendem da junção amelo-dentinária até a superfície. Esses cristais apresentam propriedade de birrefringência e, portanto, a estrutura apresenta dois índices de refração. Quando um feixe de luz polarizada atravessa a estrutura ele é dividido em dois feixes de velocidades diferentes. No esmalte humano o sinal negativo de birrefringência é dado arbitrariamente para o feixe mais lento que vibra em ângulo perpendicular à extensão dos prismas. Sendo assim, em um corte longitudinal, o esmalte apresenta uma birrefringência intrínseca negativa. No esmalteariado ocorre um aumento dos poros e do espaço inter-cristais, que dá origem a um segundo tipo de birrefringência, que é positiva em relação à orientação dos prismas. Essa birrefringência é produzida quando os poros formados são preenchidos por um meio de índice de refração diferente dos cristais de apatita ($n=1,62$). Portanto, quanto maior for a diferença entre o índice de refração dos cristais e do meio em que as fatias de esmalte são embebidas, maior

será a birrefringência positiva formada. Da mesma forma, quanto maior for a desmineralização e o volume dos poros, maior será a birrefringência positiva (SILVERSTONE, 1973). Nas amostras embebidas em água ($n=1,33$) um bom contraste entre o esmalte sadio e o cariado pode ser observado (SILVERSTONE;HICKS;FEATHERSTONE, 1988).

A possibilidade de utilização da microscopia de luz polarizada para a observação do esmalte dental sadio e cariado é há muito tempo conhecida. Os estudos realizados na metade do século passado utilizando essa técnica permitiram a caracterização histológica detalhada das alterações do esmalte cariado, que são até hoje utilizadas em cariologia (HOLMEN et al., 1985). A vantagem da observação em microscópio de luz polarizada é que ela permite uma diferenciação mais clara das várias zonas de uma lesão. Além disso, essa técnica não é útil apenas para descrições qualitativas do esmalte cariado, mas também para a análise quantitativa, fornecendo informações indiretas sobre a estrutura (WEFEL;HARLESS, 1984a).

Apesar da quantificação mineral não ser possível, sem que as lâminas sejam embebidas em soluções de diferentes índices de refração, a imagem mostra um forte contraste entre as quatro zonas da lesão e portanto permite que ela seja medida em sua completa extensão (WEFEL;HARLESS, 1984a). Por outro lado, a imagem de uma mesma lesão observada por microrradiografia revela apenas o corpo da lesão (Figura 2.2).

A medida de profundidade de lesão através de microscopia de luz polarizada tem sido utilizada em diversos estudos avaliando o efeito do flúor tópico na progressão de cárie, e também como método de referência para avaliação de novos métodos de quantificação de lesões (ARENDS;SCHUTHOF;JONGEBLOED,

1980; HICKS;SILVERSTONE, 1984; WEFEL;HARLESS, 1984b; LEGEROS, 1990; ARENDS;TEN BOSCH, 1992; HARA et al., 2003; MENDES;NICOLAU;DUARTE, 2003; LUSSE;HIBST;PAULUS, 2004; HARA et al., 2005; LUSSE et al., 2006).

Figura 2.2- Imagem de uma lesão de subsuperfície natural do lado esquerdo (a) observada em microscópio de luz polarizada e do direito (b) observada através de microrradiografia. Em a as quatro zonas da lesão podem ser observadas e em b, apenas o corpo da lesão (WEFEL;HARLESS, 1984a).

2.5.2 quantificação da fluorescência Induzida por luz (QLF)

A necessidade de uma Odontologia cada vez mais conservadora e menos restauradora motivou a comunidade científica a buscar novos métodos de detecção de cárie que permitissem não somente a identificação de lesões, mas também a quantificação de sua severidade. Entre os diversos métodos ópticos, recentemente estudados, grande atenção tem sido dada à quantificação da fluorescência induzida por luz (QLF). Isto porque além de permitir um diagnóstico de lesões em estágio inicial, os valores de redução de radiância da fluorescência também

apresentam um alto grau de correlação com a perda de volume mineral observada em microradiografia (BENEDICT, 1928; BJELKHAGEN;SUNDSTRÖM, 1981; KONIG;SCHNECKENBURGER;HIBST, 1999; BUCHALLA, 2005).

A quantificação da perda mineral através da técnica de QLF é feita de maneira não-destrutiva e permite o monitoramento de lesões (perda e ganho mineral) ao longo do tempo, o que é essencial para se determinar o grau de atividade da lesão e um correto plano de tratamento (ALFANO;YAO, 1981). Sendo assim, o método é bastante promissor do ponto de vista clínico e pode fornecer dados quantitativos para as decisões clínicas de intervenção ou preservação das lesões.

Também do ponto de vista do uso *in vitro* o método apresenta vantagens, pois permite a avaliação rápida de novos métodos preventivos de cárie, encurtando assim o tempo necessário para que eles possam ser testados *in situ* ou *in vivo*. A observação mais rápida do que nos métodos tradicionais é possível, pois longos procedimentos para obtenção de fatias dentais finas não são necessários e a mesma amostra pode ser medida várias vezes no decorrer do tempo e da aplicação da terapia (TEN BOSCH et al., 1986).

O método QLF se baseia na propriedade intrínseca da estrutura dental de apresentar fluorescência quando iluminada por fonte de luz ultravioleta e visível na região do azul-verde e vermelho do espectro eletromagnético (SPITZER;TEN BOSCH, 1977; TEN BOSCH;BORSBOOM;TEN CATE, 1980; VAARKAMP;TEN BOSCH;VERDONSCHOT, 1995; MUJAT et al., 2003). Uma boa diferenciação entre a estrutura sadia e desmineralizada é possível com os comprimentos de onda na região do azul-violeta, pois a fluorescência é menor nas áreas em que há perda

de mineral, fazendo com que elas sejam observadas como manchas escuras na imagem (MUJAT et al., 2004).

A origem exata da fluorescência resultante da excitação por comprimentos de onda na região do azul-violeta não é completamente conhecida, porém hoje se sabe, que ao contrário do que foi inicialmente teorizado, ela se origina predominantemente da dentina e da junção amelo-dentinária (VAN DER VEEN et al., 2002)

O que permite que o esmalte sadio e o cariado sejam diferenciados é a alteração das propriedades ópticas do tecido cariado. A ocorrência de cáries resulta em aumento da quantidade de água na estrutura, e também no aumento do coeficiente de espalhamento da luz na região da lesão em relação ao tecido sadio (PRETTY et al., 2002). O coeficiente de espalhamento aumentado causa a diminuição da fluorescência predominantemente devido ao bloqueio da fluorescência originária da dentina e da junção amelo-dentinária (DE JOSSELIN DE JONG et al., 1995; TRANAUEUS et al., 2002). Porém, a possibilidade de que parte desse efeito ocorra devido a uma diminuição da quantidade de luz que consegue atingir a região fluorescente e ser absorvida também tem sido mencionada (TRANAUEUS et al., 2001; ANDO et al., 2004b).

No equipamento de QLF, atualmente disponível para uso clínico, a luz emitida por uma lâmpada de xenônio, que atravessa um filtro passa bandas, na região do azul-violeta ($\lambda = 404 \pm 11$ nm), é utilizada para iluminação do dente e excitação da fluorescência. A fluorescência verde emitida pela estrutura é então capturada através de uma microcâmera CCD (*"charge coupled device"*), contendo um filtro de passa alta, que transmite apenas os comprimentos de onda maiores do que 520 nm. A partir da imagem obtida, a intensidade da fluorescência nas regiões

sadias e cariadas são analisadas através do programa Inspektor Pro™, que realiza uma interpolação dos valores registrados nas áreas sadias adjacentes à lesão para calcular a porcentagem de perda de fluorescência (ΔF). Além disso, a área em mm^2 , da região com fluorescência reduzida também é registrada e integrada ao valor de ΔF , resultando em um valor de porcentagem de perda de fluorescência por mm^2 (ΔQ).

Todos os cálculos são feitos de maneira objetiva pelo programa e apenas um dos fatores envolvidos na análise, a determinação da área a ser analisada, depende do julgamento do examinador. Como a inclusão desse fator subjetivo representa uma fragilidade do método, a sua influência nos resultados de perda de fluorescência tem sido investigada em diversos estudos. *In vitro*, os resultados de um estudo multicêntrico com dez examinadores diferentes demonstraram um alto grau de concordância das medidas de ΔQ intra- e inter-examinador (AL-KHATEEB et al., 1997; ANDO et al., 1997). Porém, *in vivo*, a repetibilidade e reprodutibilidade do método apresentaram uma variação maior, sendo que alguns estudos têm demonstrado um grau excelente e outros apenas moderado de concordância entre as medidas feitas por diferentes examinadores ou entre as diversas medidas de uma mesma lesão (HAFSTROM-BJORKMAN et al., 1992; EMAMI et al., 1996).

A capacidade do método de detectar a doença quando o tecido está realmente afetado, ou seja, a sensibilidade da técnica, é por outro lado alta, e favorece o diagnóstico precoce das lesões (ANDO et al., 1997).

Além da reprodutibilidade, repetibilidade e sensibilidade do método, também a habilidade de quantificar a perda das lesões quando comparada ao padrão-ouro precisa ser observada. Nesse sentido, os resultados são bastante positivos, pois

diversos estudos *in vitro* têm demonstrado, que a quantidade de perda de radiância da fluorescência medida em ΔQ apresenta um alto grau de correlação com a perda de volume mineral medida através de microrradiografia transversal (ALJEHANI et al., 2004), longitudinal (PRETTY;EDGAR;HIGHAM, 2002b) e também com a profundidade de lesão (ANDO et al., 2004a). Da mesma forma, a correlação entre as medidas de ΔF com a perda de volume mineral e a profundidade de lesão também tem sido demonstrada (PRETTY;EDGAR;HIGHAM, 2004a).

Na condução de estudos *in vitro* alguns cuidados precisam ser observados, para garantir uma maior acurácia dos resultados. As medidas de lesões de cárie incipientes feitas *in vitro*, são influenciadas por diversos fatores relacionados ao ambiente em que o experimento é realizado e também à lesão de cárie em si. Fatores como a iluminação da sala, o ângulo existente entre a câmera e a superfície do dente e também o grau de desidratação da lesão precisam ser padronizados para que o grau de confiabilidade dos dados seja o maior possível.

A iluminação do ambiente, por exemplo, apresenta uma influência direta nas medidas de QLF. A avaliação de medidas feitas em diferentes intensidades de luz, mostra que uma intensidade de luz ambiente maior que 88 lux causa uma queda estatisticamente significativa das medidas de ΔQ , comprometendo a confiabilidade dos dados (VAN DER VEEN et al., 2002; ANDO et al., 2003). Também a capturação das imagens em ângulos, 20° graus maiores ou menores do que 90° entre a superfície da lesão de cárie incipiente e a câmera, resulta em valores de ΔQ significativamente menores que os valores máximos obtidos na relação perpendicular (PRETTY;EDGAR;HIGHAM, 2002a; PRETTY et al., 2003; PRETTY;EDGAR;HIGHAM, 2004b).

Outro fator que pode alterar a confiabilidade dos dados é o grau de desidratação das lesões. A comparação entre a secagem com roletes de algodão, a secagem natural na bancada e a secagem através da utilização de um jato de ar comprimido por 15 s mostrou que esta última resulta no maior grau de confiabilidade das medidas de ΔQ . Sendo que o mesmo resultado foi observado tanto para amostras armazenadas em água destilada como em saliva humana total (PRETTY;ELLWOOD, 2007).

A espessura do esmalte também apresenta uma influência importante nas medidas de QLF e tanto os estudos através de simulação de Monte Carlo quanto os experimentais (*in vitro*) mostram que quanto maior a espessura do esmalte, menor é a fluorescência, resultando assim em um menor contraste entre lesão e esmalte sadio (VAN DER VEEN et al., 2002; ANDO et al., 2003).

A técnica de QLF pode ser utilizada de forma efetiva não somente para o estudo de lesões incipientes de dentes permanentes, mas também para o monitoramento de lesões em dentes decíduos e de outros tipos de lesões, como as lesões de erosão e as cáries secundárias ao redor de restaurações de amálgama, cimentos temporários e compósitos (PRETTY;EDGAR;HIGHAM, 2002a; GONZALEZ-CABEZAS et al., 2003; PRETTY et al., 2003; PRETTY;EDGAR;HIGHAM, 2004b) . Porém o método apresenta limitações para a detecção de lesões oclusais e interproximais *in vivo* (KUHNISCH et al., 2007).

Algum grau de alteração das medidas de fluorescência obtidas por QLF também pode ser esperado para lesões de cor marrom. Apesar de esse efeito ter sido demonstrado apenas através da excitação por fonte de luz *laser*, o comprimento de onda do *laser* de diodo utilizado ($\lambda = 405 \text{ nm}$) é bastante próximo do comprimento utilizado no aparelho de QLF. De um modo geral, os estudos com

laser de diodo mostram que as lesões de cor marrom resultam em uma acentuação do efeito da presença de lesão na fluorescência. Ou seja, se para a banda de emissão registrada, a fluorescência for menor na área de lesão de cárie do que no tecido sadio, ela será ainda menor se a lesão for de cor marrom, que é o caso observado para a banda de emissão ao redor de 500 nm. Para a emissão nas bandas de 455, 582 e 622 nm em que a fluorescência é maior nas lesões do que no tecido sadio, esse aumento da fluorescência é ainda mais acentuado nas lesões marrons (RIBEIRO et al., 2005; ZECELL et al., 2007).

No que se refere aos estudos *in situ*, um modelo de estudo também já foi testado e provou a habilidade do método de QLF para o monitoramento tanto da desmineralização provocada por alimentos cariogênicos como também a remineralização obtida através do uso de cremes dentais e enxaguatórios bucais (HIGHAM et al., 2005).

Estudos verificando efeito da irradiação não-ablativa do esmalte dental por *lasers* de alta intensidade nas medidas de fluorescência do esmalte, assim como estudos avaliando o efeito preventivo da irradiação com *lasers* através de QLF, ainda não puderam ser encontrados em busca nas bases de dados *Pubmed*, *Web of Science* e Biblioteca da SPIE , até o momento da publicação desta tese.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo foi avaliar de forma sistemática, através dos valores de profundidade de lesão de cárie e de análise morfológica, a influência dos parâmetros de irradiação: (1) densidade de energia, (2) duração de pulso e (3) número de pulsos sobrepostos, de um *laser* de CO₂ ($\lambda=10,6\ \mu\text{m}$), na inibição da progressão de lesões de cárie incipientes no esmalte dental e nos danos térmicos na superfície.

Também foi objetivo deste trabalho avaliar pela quantificação da fluorescência induzida por luz (QLF) a influência dos parâmetros, duração de pulso e número de pulsos sobrepostos de um *laser* de CO₂ ($\lambda=10,6\ \mu\text{m}$), na inibição da progressão da lesão de cárie.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Determinação do Diâmetro do Feixe *Laser*

Como o objetivo geral da série de estudos conduzidos foi encontrar o conjunto de parâmetros de um *laser* de CO₂ (10.6 μ m) mais adequado para prevenção de cáries, a determinação precisa do diâmetro do feixe *laser* mostrou-se fundamental importância. Por esse motivo, o primeiro experimento foi conduzido para determinação da cintura focal e do comportamento do feixe se propagando livremente no espaço.

O método escolhido para caracterizar o perfil transversal e o diâmetro do feixe foi o método da Borda de Lâmina (BACHMANN;ZEZELL;MALDONADO, 2003). Para isso uma lâmina, que se encontrava fixada em um microposicionador (LM 60, Owis GmbH, Staufen, Alemanha), foi movimentada perpendicularmente ao feixe *laser*. Durante todo o tempo em que a lâmina foi movimentada, a energia foi registrada através de um detector de energia (RJP 734, Laserprobe Inc., Nova York, EUA), posicionado atrás da lâmina e acoplado a um radiômetro (RM 6600, Laserprobe Inc, Nova York, EUA).

O movimento do microposicionador e o registro da energia por pulso medida pelo detector foram sincronizados e armazenados. Assim para cada 4 μ m percorridos pela lâmina, uma medida de energia por pulso foi realizada. As primeiras medidas foram feitas com a lâmina posicionada a 70 mm de distância da

lente e as medidas subseqüentes a cada 5 mm de intervalo até que a distância de 10 mm foi atingida. Próximo da cintura focal a distância entre as posições de medida foi reduzida para 2 mm. Em todas as posições três medidas foram realizadas e ao final os dados obtidos foram exportados e analisados através do programa Origin 6.0 (OriginLab Corporation, Northhampton, EUA).

4.2 Parâmetros Laser Avaliados

Após o perfil do feixe do *laser* de CO₂ (Rofin SC x 30, Rofin-Sinar *Laser* GmbH, Hamburg, Alemanha) ter sido caracterizado foi possível calcular os demais parâmetros *laser* para os estudos seguintes. Os demais experimentos foram então planejados de forma que a influência de diferentes parâmetros *lasers* no efeito preventivo de cárie pudesse ser analisada separadamente.

No primeiro estudo a influência da densidade foi investigada e a fluência que apresentou o melhor resultado foi mantida para o estudo da influência da duração de pulso. Em seguida, tendo sido encontrada a combinação da melhor fluência com a melhor duração de pulso, esses dois parâmetros foram fixados e a influência do número de pulsos dados ao tecido foi testada. Como base para a decisão de quais parâmetros apresentaram melhor resultado, foram considerados os resultados da análise de profundidade de lesão, através de microscopia de luz polarizada.

4.2.1 estudo 1: influência da densidade de energia

4.2.1.1 preparo das amostras

Nesse primeiro estudo foram utilizados 90 blocos de esmalte de (4 x 4 x 3 mm) obtidos de dentes incisivos bovinos, armazenados em solução de timol 0,1%, pH 7.0, a 4°C logo após a extração (PRETTY;EDGAR;HIGHAM, 2004a). As faces de esmalte vestibular dos blocos foram planificadas com lixas abrasivas de óxido de alumínio de granulação 800 e polidas com a de granulação 4000, ambos os procedimentos seguidos de banho em ultra-som de 30 segundos (PRETTY et al., 2002). Os blocos, devidamente limpos, foram observados em lupa estereoscópica a fim de assegurar a ausência de defeitos estruturais. Todas as faces dos blocos foram recobertas com verniz ácido-resistente excetuando-se uma janela de 2.5 mm de diâmetro na face vestibular.

As amostras foram aleatoriamente divididas em sete grupos (n=15) que estão descritos na Tabela 4.1. Os primeiros cinco grupos foram irradiados com o *laser* de CO₂ e no último grupo, controle, nenhum tratamento de superfície foi realizado.

Tabela 4.1 – Grupos que serão formados para o primeiro estudo

Grupos	Irradiação <i>Laser</i> CO ₂ Densidades de Energia	Ciclagem pH
Grupo 0,1 (G01)	0,10 J/cm ²	TODOS
Grupo 0,3 (G03)	0,30 J/cm ²	
Grupo 0,4 (G04)	0,40 J/cm ²	
Grupo 0,5 (G05)	0.50 J/cm ²	
Grupo 0,6 (G06)	0.60 J/cm ²	
Grupo controle (GC)	Sem irradiação, controle negativo.	

4.2.1.2 irradiação com laser de CO₂

As irradiações foram realizadas utilizando-se um *laser* de CO₂ pulsado emitindo em 10,6 µm (modelo Rofin SC x 30, Rofin-Sinar *Laser* GmbH, Hamburgo, Alemanha).

Como o equipamento *laser* utilizado permite que o operador escolha apenas o tempo de duração do pulso (*on time*) e o tempo em que o *laser* está desligado (*off time*) dentro do período total, uma série de medidas de energia foi necessária para se obter as diferentes densidades de energia a serem avaliadas neste estudo (MEISTER, 2007). Para se delimitar o universo de escolhas possíveis quatro pré-requisitos foram considerados:

1. duração de pulso deveria ser curta (< 80 µs)

2. deveria ser possível a obtenção de cinco densidades de energia diferentes para uma mesma duração de pulso.
3. as potências emitidas deveriam ter a mesma ordem de magnitude
4. deveria haver ausência de ablação visível no esmalte.

Encontradas as densidades de energia desejadas e os diferentes tempos de irradiação necessários (Tabela 4.2) para se conseguir irradiação sub-ablativa do esmalte, as amostras foram irradiadas. A distância de irradiação foi de 19,8 cm, o que determinou um diâmetro do feixe de 2,5 mm na superfície das amostras. A energia emitida pelo *laser* foi controlada previamente às irradiações de cada grupo e posteriormente num intervalo entre duas amostras, utilizando-se um medidor de energia (Coherent FieldMaster GS + Detetor LM45; Coherent, EUA).

Tabela 4.2 – Descrição dos parâmetros do *laser* de CO₂ utilizados nos grupos em que as amostras foram irradiadas.

Parâmetros	Unidades	G01	G03	G04	G05	G06
Densidade de Energia	J/cm ²	0,10	0,30	0,40	0,50	0,60
Duração de Pulso	μs	10	10	10	10	10
Potência Média	W	3	2,2	3,2	4,5	5,3
Taxa de Repetição	Hz	500	154	167	182	186
Energia por Pulso	mJ	6	14	19	25	29
Tempo de Irradiação	s	5	15	5	2	1
Número total de Pulsos	-	2500	2308	833	364	186
Ciclo Útil (<i>DutyCycle</i>)	%	0,5	0,15	0,16	0,18	0,19
Diâmetro do feixe	mm	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Perfil do feixe	-	TEM ₀₀	TEM ₀₀	TEM ₀₀	TEM ₀₀	TEM ₀₀

4.2.1.3 ciclagem de pH

Os blocos com 9 mm² de superfície de esmalte exposta foram submetidos, individualmente, ao modelo de ciclagem de pH por 8 dias a 37 °C, especial para dentes bovinos, descrito por Queiroz (2004):

1. 4 h. em 56,25 mL de banho em solução desmineralizadora (1,28 mM de cálcio, 0,74 mM de fosfato, 0,03 µg F/mL, pH 5)
2. As amostras foram individualmente enxaguadas por 10 s com água destilada e secas levemente com papel absorvente, de maneira que evitasse a diluição dos banhos individuais.
3. Após isto permaneceram por 20 horas em 28,125 mL de solução remineralizadora (1,5 mM de cálcio, 0,9 mM de fosfato, 150 mM de cloreto de potássio, 0,1 M de tampão Tris, 0,05 µg F/mL, pH 7).
4. Após 8 dias de ciclagem os blocos permaneceram por 24 horas apenas em solução remineralizadora.

As proporções de soluções desmineralizadora e remineralizadora por área de esmalte exposto foram de 6,25 e 3,12 mL/mm², respectivamente, e durante toda a ciclagem os recipientes de plástico contendo as amostras foram mantidos a 37°C e sob agitação constante de 200 rpm (Inkubator 1000 e Polymax 1040, Heidolph Instruments GmbH, Kelheim, Alemanha).

Antes da ciclagem, e também durante os experimentos seguintes, as amostras foram armazenadas em um tecido de algodão molhado à temperatura ambiente e umidade relativa de 100% (QUEIROZ, 2004).

4.2.1.4 análise de profundidade de lesão (PL)

Os blocos foram seccionados longitudinalmente no centro das lesões utilizando-se uma fita diamantada sob refrigeração com água (modelo E 300, Exakt GmbH, Norderstedt, Alemanha). Uma das metades foi armazenada e a outra foi desidratada em seqüência de álcool (70%, 80%, 90%, 96% e 100%) e embebida em resina acrílica transparente especial para cortes histológicos (K-Plast[®], Medim Histotechnologie GmbH, Giessen, Alemanha). Os blocos de resina obtidos foram então colados em lâmina de plástico de 50 x 100 x 2 mm (Exakt GmbH, Norderstedt, Alemanha) utilizando-se adesivo para fixação transparente (Technovit 7230VLC, Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Alemanha) e mantendo-se a face que continha a lesão orientada para cima. Após fixadas o excesso de resina foi cortado em cortadora a fio diamantado a fim de se expor a lesão de cárie (face do corte transversal). Essa superfície foi então polida com lixas de óxido de alumínio 800 e 4000, sob refrigeração com água e sobre ela foi colada uma lâmina de plástico de 25 x 75 x 1,5 mm (Exakt GmbH, Norderstedt, Alemanha) utilizando-se adesivo de precisão transparente (Technovit 7210 VLC, Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Alemanha). Com o objetivo de se manter o paralelismo entre as duas lâminas, a polimerização do adesivo foi feita em dispositivo fotopolimerizador de precisão, contendo uma fonte de luz azul e um suporte para manutenção da paralelidade entre as duas lâminas (Exakt 402, Exakt GmbH, Norderstedt, Alemanha) .

Após polimerizadas as amostras foram fixadas no sistema de vácuo da cortadora e cortadas com fio diamantado sob refrigeração de modo que se obtivessem lâminas de 500 µm de espessura. Para reduzi-las a 100 µm ($\pm 10 \mu\text{m}$),

essas lâminas foram polidas em equipamento de polimento especial para cortes histológicos contendo controlador digital de espessura (modelo Exakt 400 CS401, Exakt GmbH, Norderstedt, Alemanha).

Após terem sido armazenadas em água destilada ($\text{pH} = 7$) por 24 horas, as lâminas foram embebidas em água destilada e cobertas com lamínula de vidro para observação em microscópio de luz polarizada (DM-R-HR, Leica Microsysteme GmbH, Bensheim, Alemanha) com lentes de magnificação de 10X. As imagens foram transmitidas a um computador conectado ao microscópio através de uma câmera digital (Hitachi HV-C2A, Wezlar, Alemanha) e as medidas de profundidade de lesão foram feitas utilizando-se o programa Diskus versão 4.2 (Hilgers/Leica, Königswinter, Alemanha). As medidas foram feitas a partir da margem da lesão, em três distâncias diferentes: distância 1 (D1), 0-400 μm , distância 2 (D2). 400-800 μm e distância 3 (D3) 800-1200 μm e em cada distância seis medidas foram efetuadas, como pode ser observado na Figura 4.1.

Figure 4.1- Esquema representando a metodologia para obtenção das medidas de profundidade de lesão. As lesões foram medidas em três distâncias: distância 1 (D1), 0-400 μm , distância 2 (D2). 400-800 μm e distância 3 (D3) 800-1200 μm e em cada distância seis medidas foram efetuadas

4.2.1.5 microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A fim de permitir a observação das alterações de superfície provocadas pela irradiação, duas amostras adicionais para cada grupo foram irradiadas com o *laser* de CO₂ 10,6µm somente para observação em microscopia eletrônica de varredura (MEV) e comparação com a superfície das amostras não irradiadas.

As 10 amostras dos grupos irradiados juntamente com as duas amostras do grupo controle foram submetidas ao seguinte preparo para microscopia:

1. Fixação dos dentes em glutaraldeído 2,5%, por duas horas.
2. Três lavagens de 5 minutos cada, com Tampão Fosfato 0,1 M.
3. Desidratação das amostras na seqüência de alcoóis:
 - Álcool 30%, duas lavagens de 5 minutos
 - Álcool 50%, duas lavagens de 5 minutos
 - Álcool 70%, duas lavagens de 5 minutos
 - Álcool 90%, duas lavagens de 5 minutos
 - Álcool 96%, duas lavagens de 5 minutos
4. Álcool absoluto, quatro lavagens de 5 minutos
5. Fixação em Hexametil-Disilazane (HMDS) por 20 minutos
6. Evaporação do HMDS em capela por 2 horas

Depois de desidratadas as amostras foram coladas em *stubs* metálicos, identificadas, cobertas por uma fina camada de ouro e observadas no microscópio eletrônico de varredura.

4.2.1.6 *estimativas de temperatura (modelo de elementos finitos)*

A fim de calcular as mudanças de temperatura no interior do tecido durante a irradiação por *laser*, um modelo de elementos finitos de um bloco de dente bovino foi construído utilizando-se o Método de Elementos Finitos (FEM). O FEM é um bom instrumento analítico para modelar e simular as estruturas dentais e tem sido utilizado para simular tanto o comportamento mecânico como térmico dos substratos dentais (AUSIELLO et al., 2001; ANA et al., 2007). Neste modelo o contorno e as dimensões médias dos blocos de dente bovino utilizados foram considerados para o desenvolvimento do modelo geométrico. O modelo foi construído utilizando-se elementos sólidos volumétricos e procurando-se seguir contorno do esmalte e dentina.

As dimensões do bloco de dente bovino modelado correspondem a um volume externo total de $0,044 \text{ cm}^3$ e massa total de $0,1055 \text{ g}$. A região de esmalte ocupa um volume de $0,015 \text{ cm}^3$, correspondendo a uma massa de $0,0435 \text{ g}$ ($\rho = 2.9 \text{ g/cm}^3$). A dentina ocupa um volume de $0,029 \text{ cm}^3$, correspondendo a uma massa de $0,062 \text{ g}$ ($\rho = 2.1 \text{ g/cm}^3$). Os substratos, esmalte e dentina correspondem juntos a um volume de 2.1 cm^3 e uma massa total de 4.95 g (LANDIS et al., 1984).

A fim de obter uma melhor resolução, o modelo foi refinado na região do esmalte, onde o feixe *laser* atingiu o tecido. O modelo inteiro tinha 7878 elementos ligados por 8359 nós. O feixe *laser* foi modelado como um conjunto de fontes de calor aplicadas na superfície do esmalte numa área quase circular ($\varnothing 2,5 \text{ mm}$) e

utilizando-se um perfil quase-Gaussiano para a distribuição da energia. As condições de irradiação utilizadas no grupo G0,3 foram inseridas no modelo.

Figura 4.1- Modelo de elementos finitos construído a partir das dimensões dos blocos de dentes bovinos utilizados para avaliação da porcentagem de inibição da progressão de lesão de cárie. Do lado esquerdo é possível observar em corte transversal as dimensões de esmalte e dentina e a simulação do feixe *laser* atingindo a superfície. Do lado direito o modelo também em corte transversal, mostrando como a propagação do calor é observada através da escala de cores para as diferentes faixas de temperatura.

Em cada elemento o calor total é dado pelo calor interno, determinado pela densidade do material (ρ), calor específico (c), e fluxo de calor, determinado pela condutividade térmica do material do elemento (k). A densidade de potência Q_i ($[\text{Joule}/\text{m}^3 \cdot \text{s}]$) correspondente ao calor H_i absorvido ou perdido por cada elemento em cada segundo é:

$$Q_i = \frac{\partial H_i}{\partial t} = \rho \cdot c \cdot \frac{dT(\vec{r}, t)}{\partial t} \quad (1)$$

O fluxo de calor ($[\text{Joule}/\text{m}^2 \cdot \text{s}]$) em direção $\vec{r}$ é :

$$F_i = k \cdot \frac{\partial T(\vec{r}, t)}{\partial r} = k \cdot \vec{\nabla} T(\vec{r}, t) \quad (2)$$

Finalmente, o feixe *laser* pode ser considerado uma fonte externa de calor, representada pela função Q_{ext} , que adiciona a cada segundo (s) uma quantidade de calor por volume (m^3) a cada elemento irradiado ($Q_{\text{ext}} [\text{Joules}/\text{m}^3 \cdot \text{s}]$). Como premissa de simplicidade, assumiu-se que a absorção da energia do *laser* pelo esmalte aconteceu sem nenhuma perda. Em outras palavras, a resposta espectral

dos substratos à luz *laser* não foi considerada, principalmente porque o esmalte tem uma alta absorção em 10,6 μm (ZUERLEIN et al., 1999).

Assim, considerando-se que a divergência do fluxo $\vec{\nabla} \cdot \vec{F} = k \cdot \nabla^2 T(\vec{r}, t)$ ([Joules/m³.s]) corresponde à quantidade de calor perdida ou adquirida em cada elemento, o balanço energético em toda a amostra pode ser representado pela equação da matriz diferencial (a clássica equação de Poisson para a propagação de calor considerando também a energia do *laser* como uma fonte externa de calor), envolvendo todos os elementos do modelo, como:

$$[Q_i] = [\nabla \cdot F_i] + [Q_{ext}] \quad (3)$$

$$\rho \cdot c \cdot \frac{\partial T(\vec{r}, t)}{\partial t} = k \cdot \nabla^2 T(\vec{r}, t) + Q_{ext} \quad (4)$$

Uma condição inicial é necessária para se resolver essas equações diferenciais. Essa condição é dada pela suposição de que, em $t=0$, todos os elementos têm $T = 25^\circ\text{C}$. As equações foram resolvidas utilizando-se uma versão educacional do programa *Nastran FEM Solver* (Santa Ana, CA, EUA).

4.2.2 estudo 2: influência da duração de pulso

4.2.2.1 preparo das amostras

Nesse segundo estudo foram utilizados novos 105 blocos de esmalte de (4 x 4 x 3 mm) obtidos e preparados como no estudo anterior e portanto como descrito no item 4.2.1.1. Porém, como no equipamento *laser* utilizado, à medida que se aumenta a largura de pulso se aumenta também a energia mínima emitida, para as durações de pulso mais longas, um diâmetro de feixe maior foi necessário. Dessa forma, a mesma densidade de energia ($0,30 \text{ J/cm}^2$) pôde ser mantida em todos os grupos. Também por esse motivo, a área de esmalte exposta nos grupos G30 μ s e G50 μ s deste estudo foi maior que a dos demais grupos. Nos grupos G5 μ , G10 μ , G20 μ , GC2 e GF2 a janela de esmalte, que não foi coberta por verniz ácido-resistente tinha um diâmetro de 2.5 mm e nos grupos G30 μ e G50 μ , 3 e 4,5mm respectivamente

As amostras foram aleatoriamente divididas em sete grupos (n=15) que estão descritos na Tabela 4.3. Os primeiros cinco grupos foram irradiados com o *laser* de CO₂ e os dois últimos grupos serviram como controle. No grupo GC2 (controle negativo), as amostras não foram irradiadas e no grupo GF2 (controle positivo) não foram irradiadas e foram submetidas à aplicação tópica de flúor.

Tabela 4.3. Grupos que serão formados para o segundo estudo.

Grupos	Irradiação Laser CO ₂		Ciclagem pH
	Densidade de Energia	Duração de Pulso	
Grupo 5 µs (G5µ)	0,30 J/cm ²	5 µs	TODOS
Grupo 10 µs (G10µ)		10 µs	
Grupo 20 µs (G20µ)		20 µs	
Grupo 30 µs (G30µ)		30 µs	
Grupo 50 µs (G50µ)		50 µs	
Grupo controle (GC2)	Sem irradiação, controle negativo.		
Grupo flúor (GF2)	Sem irradiação + aplicação de flúor, controle positivo.		

4.2.2.2 irradiação com laser de CO₂

Com objetivo de avaliar qual duração de pulso (<80 µs) proporciona a maior inibição de cáries, nos novos parâmetros de irradiação a densidade de energia que promoveu o melhor efeito preventivo de cáries no estudo anterior foi mantida e a duração de pulso foi variada. As irradiações foram realizadas utilizando-se o mesmo *laser* de CO₂ utilizado no estudo anterior e os parâmetros testados estão descritos na Tabela 4.4.

As distâncias de irradiação utilizadas foram 19,8 cm, 20,8 e 23,35 respectivamente para os diâmetros de feixe de 2,5; 3 e 4,5 mm e todos os parâmetros escolhidos determinavam irradiação sub-ablativa do esmalte.

Assim como no estudo anterior, a energia emitida pelo *laser* foi controlada previamente às irradiações de cada grupo e posteriormente num intervalo entre

duas amostras, utilizando-se um medidor de energia (Coherent FieldMaster GS + Detetor LM45; Coherent, EUA).

Tabela 4.4- Descrição dos parâmetros do *laser* de CO₂ utilizados nos grupos em que as amostras foram irradiadas.

Parâmetros	Unidades	G5μ	G10μ	G20μ	G30μ	G50μ
Densidade de Energia	J/cm ²			0,30		
Duração de Pulso	μs	5	10	20	30	50
Potência Média	W	3,2	2,3	1,4	2,3	2,7
Taxa de Repetição	Hz	226	154	102	111	70
Energia por Pulso	mJ	14	14	14	21	39
Tempo de Irradiação	s	9	15	19	10	15
Número total de Pulsos	-	2036	2308	1939	1114	1050
Ciclo Útil (<i>DutyCycle</i>)	%	0,11	0,15	0,20	0,33	0,35
Diâmetro do feixe	mm	2,5	2,5	2,5	3	4,5
Perfil do feixe	-	TEM ₀₀	TEM ₀₀	TEM ₀₀	TEM ₀₀	TEM ₀₀

4.2.2.3 tratamento do esmalte com flúor

No grupo GF2 que inclui tratamento com flúor, as amostras foram submetidas à aplicação tópica de flúor fosfato acidulado (FFA) em gel contendo 1,23% de flúor em pH 3,5 durante 4 minutos. Feitas as aplicações as amostras foram lavadas com água destilada e secas com papel absorvente.

Como o flúor é, atualmente, o principal composto utilizado na prevenção da cárie, a sua utilização em dos grupos funcionou como um controle positivo de modo

que permitisse comparações entre o efeito do *laser* e o efeito do flúor (RIPA, 1990; DELBEM et al., 2005).

4.2.2.4 ciclagem de pH

As amostras foram cicladas da mesma maneira como descrito no item 4.2.1.3.

4.2.2.5 análise de profundidade de lesão (PL)

O preparo das amostras e a análise da profundidade das lesões formadas foram feitos exatamente como descrito no item 4.2.1.4.

4.2.2.6 quantificação da fluorescência induzida por luz (QLF)

Paralelamente ao estudo de profundidade de lesão, o efeito na prevenção de cáries também foi avaliado através da quantificação da fluorescência induzida por luz (QLF). Para isso, logo após a ciclagem de pH e anteriormente ao preparo das

amostras para análise de profundidade de lesão, imagens de todas as amostras foram capturadas, utilizando-se uma câmera de fluorescência intral-oral do aparelho Inspektor™ Pro (Inspektor Dental Care BV, Amsterdam, Holanda). As amostras foram expostas a uma luz azul-violeta, apresentando pico de intensidade em 404 nm, e a fluorescência emitida pela estrutura dental, observada através de um filtro amarelo de alta passagem ($\lambda \geq 520$ nm), foi registrada pela câmera do aparelho.

Para a aquisição das imagens, a câmera foi fixada a um suporte de laboratório de forma que a superfície das amostras permanecesse paralela à peça de mão do aparelho, onde tanto a fonte emissora de luz azul quanto a câmera de fluorescência estão localizadas. A distância entre a superfície das amostras e a peça de mão do aparelho foi ajustada, de modo que se obtivesse melhor condição de foco.

O esmalte ácido-resistente que cobria parte da superfície de esmalte das amostras foi cuidadosamente removido, com a ajuda de uma lâmina de bisturi número 11. As amostras que se encontravam armazenadas em frascos contendo água destilada, tiveram a superfície de esmalte seca com spray de ar comprimido por 15 s antes de serem submetidas à análise de fluorescência. Dessa maneira, o grau de desidratação das lesões de cárie pôde ser padronizado (FRIED et al., 1996).

As amostras foram então posicionadas sobre um disco de plástico preto e as imagens foram feitas em câmara escura. Para cada amostra, três imagens foram capturadas, a fim de possibilitar posteriormente a avaliação da precisão das medidas de perda de fluorescência.

As imagens obtidas foram examinadas utilizando-se o software Inspektor Pro version 2.0.0.32 (Inspektor Dental Care BV, Amsterdam, Holanda) e os valores de delta Q (ΔQ) foram calculados considerando-se um limiar de 5%. Ou seja, variações de fluorescência entre esmalte sadio e desmineralizado, menores do que 5% foram ignoradas. A fim de se garantir a confiabilidade das medidas, as análises foram feitas por um único examinador, cego¹ para os grupos experimentais e seguindo-se um conjunto de regras padrão para análise das imagens (GERARD et al., 2005).

4.2.2.7 microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Com objetivo de se verificar se foram causados danos nas superfícies de esmalte, após a irradiação com a condição que apresentou a melhor redução da profundidade de lesão ($G5\mu$), duas amostras adicionais foram irradiadas e preparadas para MEV da mesma forma com já descrito no item 4.2.1.5 Os grupos que apresentaram resultados piores não foram observados, pois de qualquer maneira eles não seriam os parâmetros de escolha para uma futura aplicação clínica.

Além disso, duas amostras adicionais foram preparadas para a observação da secção longitudinal do centro da área irradiada. Para isso um corte guia com disco diamatado foi preparado do lado oposto à superfície de esmalte irradiada,

¹ Estudo cego, aquele no qual o sujeito ou o investigador (ou ambos) não sabem qual produto de teste o sujeito está recebendo. No caso de estudos, *in vitro*, o examinador não sabe que grupos experimentais estão sendo testados.

extendendo-se até a junção amelo-dentinária. Após o corte, as amostras foram imersas em nitrogênio líquido por 5 minutos, removidas e clivadas para observação dos efeitos da irradiação na subsuperfície do esmalte.

4.2.3 estudo 3: influência do número de pulsos sobrepostos

4.2.3.1 *preparo das amostras*

No terceiro estudo foram utilizados novos 75 blocos de esmalte de (4 x 4 x 3 mm) obtidos e preparados como no estudo anterior e portanto como descrito no item 4.2.1.1. Porém, neste estudo foi utilizado verniz ácido-resistente transparente. As amostras foram aleatoriamente divididas em sete grupos (n=15) que estão descritos na Tabela 4.5. Os primeiros três grupos foram irradiados com o *laser* de CO₂ e os dois últimos grupos serviram como controle. No grupo GC2 (controle negativo), as amostras não foram irradiadas e no grupo GF2 (controle positivo) não foram irradiadas e foram submetidas à aplicação tópica de flúor.

Tabela 4.5- Grupos que foram formados para o terceiro estudo

Grupos	Irradiação Laser CO ₂			Ciclagem pH
	Densidade de Energia	Duração de Pulso	Número de Pulsos (tempo irradiação)	
Grupo 3 s (G3s)			452 (3s)	
Grupo 5 s (G5s)	0,30 J/cm²	5 µs	1130 (5s)	
Grupo 9 s (G9s)			2036 (9s)	TODOS
Grupo controle 3 (GC3)	Sem irradiação, controle negativo.			
Grupo flúor 3 (GF3)	Sem irradiação + aplicação de flúor, controle positivo.			

4.2.3.2 irradiação com laser de CO₂

Com objetivo de avaliar se o número de pulsos entregues ao tecido poderia influenciar efeito preventivo de cáries observado, a condição que apresentou melhor resultado no estudo anterior foi mantida e apenas o tempo de irradiação foi variado, determinando assim diferentes quantidades de pulsos entregues ao tecido. As irradiações foram realizadas utilizando-se o mesmo *laser* de CO₂ utilizado no estudo anterior e os parâmetros testados estão descritos na Tabela 4.6.

As distâncias de irradiação utilizadas foram 19,8, 20,8 e 23,35 cm respectivamente para os diâmetros de feixe de 2,5, 3 e 4,5 mm e todos os parâmetros escolhidos determinavam irradiação sub-ablativa do esmalte.

Assim como no estudo anterior a energia emitida pelo *laser* foi controlada previamente às irradiações de cada grupo e posteriormente num intervalo entre

duas amostras, utilizando-se um medidor de energia (Coherent FieldMaster GS + Detetor LM45; Coherent, EUA).

Tabela 4.6- Descrição dos parâmetros do *laser* de CO₂ utilizados nos grupos em que as amostras foram irradiadas

Parâmetros	Unidades	G2s	G5s	G9s
Densidade de Energia	J/cm ²		0,30	
Duração de Pulso	µs		5	
Potência Média	W		3,3	
Taxa de Repetição	Hz		226	
Energia por Pulso	mJ		15	
Tempo de Irradiação	s	2	5	9
Número total de Pulsos	-	452	1130	2036
Ciclo Útil (<i>DutyCycle</i>)	%		0,11	
Diâmetro do feixe	mm		2,5	
Perfil do feixe	-		TEM₀₀	

4.2.3.1 *tratamento do esmalte com flúor*

No grupo GF3 as amostras foram tratadas com gel de flúor fosfato acidulado, como descrito no item 4.2.2.3.

4.2.3.2 *ciclagem de pH*

As amostras foram cicladas da mesma maneira como descrito no item 4.2.1.3.

4.2.3.3 *análise de profundidade de lesão (PL)*

O preparo das amostras e a análise da profundidade das lesões formadas foram feitos exatamente como descrito no item 4.2.1.4.

4.2.3.4 *quantificação da fluorescência induzida por luz (QLF)*

Para este estudo, a aquisição e o processamento das imagens foram feitos da mesma forma como já descrito no item 4.2.2.6. Contudo, as imagens das amostras foram adquiridas não somente após a ciclagem de pH, mas também antes e após a irradiação das amostras com *laser*. O intervalo de tempo entre as medidas iniciais e após a irradiação foi de 48 horas e durante todos esse tempo as amostras permaneceram armazenadas em água destilada (0,1% de Timol) à 4°C. O propósito dessa análise adicional foi avaliar se o efeito da irradiação no tecido poderia alterar a fluorescência das amostras e portanto influenciar a comparação entres os grupos após a indução de cáries

4.2.3.5 microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Com objetivo de se comparar as alterações na superfície causada pelas duas condições de irradiação que apresentaram os melhores resultados de redução da profundidade de lesão, duas amostras adicionais foram irradiadas com os parâmetros descritos para o grupo G5s e preparadas para MEV da mesma forma com já descrito no item 4.2.1.5 Os demais grupos não foram observados, ou porque já haviam sido observados nos estudos anteriores ou porque causaram pouca redução da profundidade de lesão.

5 RESULTADOS

5.1 Diâmetro do Feixe

Os valores de energia registrados durante o percurso da lâmina perpendicularmente ao feixe foram transferidos para um gráfico de energia por deslocamento. Em todas as distâncias em que as medidas foram feitas, os dados demonstram um comportamento com alto grau de correlação com uma curva sigmóide, como está exemplificado na Figura 5.1.

Figura 5.1- Comportamento da energia à medida que a lâmina foi movimentada perpendicularmente ao feixe. A energia por pulso inicial é de aproximadamente 1,5 mJ e a partir do momento em que a lâmina começa a impedir a transmissão de parte do feixe ela vai diminuindo, até que chega a zero quando a transmissão de todo o feixe é bloqueada pela lâmina

Como o feixe *laser* utilizado apresenta distribuição gaussiana e simetria radial, a partir dessa curva (Figura 5.3) foi possível fazer o primeiro cálculo diferencial que resultou na curva de perfil correspondente à secção vertical do feixe. Essa segunda curva foi então ajustada a uma função gaussiana e o diâmetro do feixe foi determinado no ponto em que a intensidade decaiu para $1/e^2$ da intensidade máxima (Figura 5.2).

Os valores médios correspondentes ao raio do feixe e o erro padrão em diferentes distâncias da lente foram representados graficamente (Figura 5.3) e a distribuição dos dados foi ajustada através da equação que descreve a propagação de um feixe gaussiano se propagando livre no espaço (Equação 1).

Figura 5.2- Distribuição da energia no feixe. O raio do feixe em $1/e^2$ obtido foi igual a 500,29 μm

Figura 5.3- Médias e desvios-padrão do diâmetro do feixe medido em diferentes posições em relação à lente. O traço em vermelho representa a curva que descreve o comportamento do feixe *laser*

$$w(x) = w_0 \sqrt{1 + \left(\frac{x - x_0}{z_0} \right)^2} \quad (1)$$

Onde W_0 é o diâmetro do feixe na cintura focal, X é uma determinada posição no eixo x , X_0 é a posição inicial no eixo x e Z_0 é o intervalo de Rayleigh. Ajustando a curva segundo essa equação os seguintes valores foram obtidos: $W_0 = 39.8951 \mu\text{m}$, $X_0 = -50852.54 \mu\text{m}$, $Z_0 = 2153.54 \mu\text{m}$. Obtidos esses valores foi possível calcular as distâncias de irradiação necessárias para a obtenção dos diâmetros de feixe necessários (Tabela 5.1).

Tabela 5.1- Diferentes distâncias de irradiação e o diâmetro do feixe correspondente nestas posições

Distância da Lente	Diâmetro do Feixe
19,8 cm	2,5 mm
20,9 cm	3 mm
23.25 cm	4,5 mm

5.2 Estudo 1: Influência da Densidade de Energia

5.2.1 análise da profundidade de lesão (PL)

As médias de profundidade de lesão obtidas e os respectivos desvios-padrão estão representados na Figura 5.4.

Figura 5.4-. Médias de profundidade de lesão e desvios-padrão dos diferentes grupos nas diferentes distâncias

Das 90 amostras inicialmente irradiadas, 11 foram descartadas antes da observação no microscópio de luz polarizada, pois a espessura das fatias obtidas ficou fora do padrão ($100 \pm 10 \mu\text{m}$). Com isso o número de amostras (n), submetidas à análise estatística em cada grupo, foi 13, 10, 14, 14, 13 e 13, respectivamente para G.01, G03, G04, G05, G06 e GC. Para a análise estatística os testes de Análise de Variância de Medidas Repetidas (ANOVA-MR) para 3 fatores e comparações *post-hoc* através do teste T para dados não pareados ambos ao nível de 5% de significância foram realizados. As análises foram feitas utilizando-se o programa SAS versão 9.1 para Windows (SAS Institute Inc., Cary, EUA) e os três fatores principais considerados na análise foram grupo, em 6 níveis, distância, em 3 níveis e medidas, em 6 níveis. Os resultados obtidos revelaram haver significância na comparação entre os grupos ($p < 0,0001$), entre as

distâncias ($p < 0,0001$) e também na interação entre grupo e distância $p=0,001$. As médias e o desvio-padrão nos grupos são apresentados na Tabela 5.2.

Tabela 5.2- Médias das profundidades de lesões (μm) desvio-padrão (dp) para todos os grupos do Estudo 1 nas diferentes distâncias de medida

Grupos		D1			D2			D3		
		Média (dp)			Média (dp)			Média (dp)		
G01	0,1 J/cm ²	46,47 (±12,0)	a,e,f	A	24,56 (±11,6)	a,c	B	14,06 (±6,0)	a	C
G03	0,3 J/cm ²	32,30 (±11,2)	b,c	A	19,22 (±9,3)	a,b	B	16,00 (±9,0)	a	B
G04	0,4 J/cm ²	34,40 (±13,0)	b,c	A	25,52 (±13,0)	b,c	A,B	21,89 (±14,0)	a	B
G05	0,5 J/cm ²	37,90 (±12,8)	c,d	A	26,54 (±9,0)	a,b,c	B	20,98 (±6,7)	a	B
G06	0,6 J/cm ²	45,21 (±8,5)	d,f	A	28,70 (±10,0)	c	B	20,12 (±7,8)	a	C
GC	controle	52,61 (±7,7)	e	A	52,60 (±7,2)	d	A	49,38 (±8,0)	b	A

Diferença estatística nas colunas está representada por letras minúsculas diferentes e nas linhas por letras maiúsculas diferentes (alfa = 0,5%).

Em todos os grupos tratados com *laser*, as médias de profundidade de lesão foram menores em D2 e D3 do que em D1, apesar de em alguns grupos não ter havido diferença estatisticamente significativa. O grupo G03 foi o que apresentou as menores médias em D1 e D2, 32,30 e 19,22 μm respectivamente, e o G01 foi o que apresentou a menor média em D3 14,06 μm . Todos os grupos tratados com *laser* foram significativamente diferentes de GC, excetuando-se o grupo G01 na distância D1. Os valores de “p” obtidos nas comparações entre médias dos grupos e também a indicação das diferenças que foram estatisticamente significantes nas distâncias D1, D2 e D3 são apresentados nas Tabelas 5.3, 5.4 e 5.5. Os valores de p para as comparações entre as médias nas diferentes distâncias em cada um dos grupos estão descritos no APÊNDICE A.

Tabela 5.3- Valores de P para as comparações dos grupos em D1

	G01	G03	G04	G05	G06	GC
G01		0,0039	0,0078 *	0,0491 *	0,8387	0,0675
G03	0,0039 *		0,6400	0,2598	0,0071 *	<0,0001 *
G04	0,0078 *	0,6400		0,4691	0,0143 *	<0,0001 *
G05	0,0491 *	0,2598	0,4691		0,0791	0,0002 *
G06	0,8387	0,0071 *	0,0143 *	0,0791		0,0418 *
GC	0,0675	<0,0001 *	<0,0001 *	0,0002 *	0,0418 *	

* Indica diferença estatisticamente significativa (alfa = 0,5%).

Tabela 5.4- Valores de P para as comparações dos grupos em D2

	G01	G03	G04	G05	G06	GC
G01		0,0714	0,7287	0,9681	0,5427	<0,0001 *
G03	0,0714		0,1302	0,0727	0,0184 *	<0,0001 *
G04	0,7287	0,1302		0,7545	0,3342	<0,0001 *
G05	0,9681	0,0727	0,7545		0,5094	<0,0001 *
G06	0,5427	0,0184 *	0,3342	0,5094		<0,0001 *
GC	<0,0001 *	<0,0001 *	<0,0001 *	<0,0001 *	<0,0001 *	

* Indica diferença estatisticamente significativa (alfa = 0,5%).

Tabela 5.5- Valores de P para as comparações dos grupos em D3

	G01	G03	G04	G05	G06	GC
G01		0,7254	0,0614	0,0834	0,1263	<0,0001 *
G03	0,7254		0,1648	0,2082	0,2811	<0,0001 *
G04	0,0614	0,1648		0,8852	0,7499	<0,0001 *
G05	0,0834	0,2082	0,8852		0,8594	<0,0001 *
G06	0,1263	0,2811	0,7499	0,8594		<0,0001 *
GC	<0,0001 *	<0,0001 *	<0,0001 *	<0,0001 *	<0,0001 *	

* Indica diferença estatisticamente significativa (alfa = 0,5%).

A partir das médias apresentadas na Tabela 5.2 a porcentagem de inibição de cárie foi calculada a partir das medidas de profundidade de lesão (PL) utilizando-se a fórmula (2) e os resultados são apresentados na Tabela 5.6 :

$$\% \text{ de Inibição de Cáries} = \frac{PL \text{ Controle} - PL \text{ tratamento} \times 100}{LP \text{ Controle}} \quad (2)$$

Tabela 5.6 - Porcentagens de inibição de cáries dos grupos tratados em relação ao grupo controle para os grupos e distâncias analisados no Estudo 1

Grupos		D1	D2	D3
		% Inibição de cárie	% Inibição de cárie	% Inibição de cárie
G01	0,1 J/cm ²	12%	53%	72%
G03	0,3 J/cm ²	39%	63%	68%
G04	0,4 J/cm ²	35%	51%	56%
G05	0,5 J/cm ²	28%	50%	58%
G06	0,6 J/cm ²	14%	45%	59%
GC	controle	0%	0%	0%

Considerando-se que o grupo G03 apresentou as menores médias em D1 e D2 e não foi estatisticamente diferente do grupo que apresentou as menores médias em D3 (G1), esse grupo foi mantido para a investigação da influência dos demais parâmetros de irradiação nos próximos estudos (Tabela 2.1).

Figura 5.5- Lesões de subsuperfície observadas nos grupos irradiados com as diferentes densidades de energia (0,1; 0,3; 0,4; 0,5 e 0,6 J/cm²) e no grupo controle através de microscopia de luz polarizada. Estudo 1. É possível observar que no grupo GC as lesões se desenvolveram de forma mais homogênea, enquanto nos grupos tratados por *laser* as lesões foram mais profundas nas margens do que no centro

5.2.2 microscopia eletrônica de varredura (MEV)

30-50X

1000 X

Figura 5.6- Micrografias obtidas em MEV das superfícies esmalte irradiadas dos grupos G01, G03 e G04 do Estudo 1. Do lado esquerdo em menor (30-50X) e do lado direito em maior magnificação (1000X). Pode ser observado que nenhuma das condições de irradiações provocou fusão ou ablação e também que as superfícies não apresentam alterações morfológicas em relação às amostras controle não irradiadas.

30-50 X

1000 x

Figura 5.7- Micrografias obtidas em MEV das superfícies esmalte irradiadas dos grupos G05, G06, do grupo controle do Estudo 1 (GC1). Do lado esquerdo em menor (30-50X) e do lado direito em maior magnificação (1000X). Pode ser observado que nenhuma das condições de irradiações provocou fusão ou ablação e também que as superfícies não apresentam alterações morfológicas em relação às amostras controle não irradiadas

As micrografias das superfícies de esmalte irradiadas e controle apresentaram aspecto bastante semelhante. Em todas elas é possível observar em maior aumento a ocorrência de linhas brancas indicando possíveis fissuras. Porém como elas foram também observadas no grupo controle, esses danos na superfície são provavelmente artefatos da técnica de preparação das amostras para MEV, resultantes da grande desidratação das amostras e do vácuo criado no interior do microscópio (Figura 5.6, Figura 5.7).

5.2.3 estimativas de temperatura

A resolução do modelo para a condição de irradiação que apresentou a maior inibição da progressão de lesão (G0,3) mostrou que o aumento da temperatura nos primeiros 400 μm da superfície variou entre 684 e 733°C (intervalo entre 10 e 15s) e foi menor que 1°C, 2,8 mm abaixo da superfície (Figura 5.8).

Figura 5.8- Corte transversal do modelo de elementos finitos no centro da área irradiada, mostrando tanto o aumento da temperatura na superfície quanto os gradientes de temperatura formados devido à propagação do calor para o interior da estrutura. Situação após 15 segundos de irradiação com as condições do grupo G0,3 (0,3 J/cm²). Na região correspondente à dentina, o aumento da temperatura foi menor que 1°C, 2,8 mm abaixo da superfície

Na superfície (primeiros 400 µm) o aumento máximo da temperatura aconteceu ao término da irradiação (733°C), ou seja, após 15 s e 2,8 mm abaixo da superfície, já na região de dentina, o aumento máximo aconteceu 10 s após o término da irradiação e foi de 2,1°C (Figura 5.9).

Figura 5.9- Representação gráfica do aumento da temperatura pelo tempo em diferentes profundidades das amostras, calculados a partir do modelo de elementos finitos. A temperatura nos primeiros 400 μm teve uma variação máxima entre 684 e 733°C, entre 10 e 15 s, e 2,8 mm abaixo da superfície o aumento máximo foi de apenas 2,1°C, cerca de 10 s após o término da irradiação

5.3 Estudo 2: Influência da Duração de Pulso

5.3.1 análise da profundidade de lesão (PL)

As médias de profundidade de lesão obtidas e os respectivos desvios-padrão estão representados na Figura 5.10.

Figura 5.10 - Médias de profundidade de lesão e desvios-padrão dos diferentes grupos nas diferentes distâncias analisadas no Estudo 2

Nos grupos G10µ, G50µ e GF2 o número de amostras analisadas foi 14, porque uma amostra de cada um deles foi descartada por não apresentar a espessura necessária para observação no microscópio. Os dados foram submetidos à Análise de Variância de Medidas Repetidas para 3 fatores (ANOVA) e comparações *post-hoc* através do teste T para dados não pareados, ambos ao

nível de 5% de significância. As análises foram feitas utilizando-se o programa SAS versão 9.1 para Windows (SAS Institute Inc., Cary, EUA) e os três fatores principais considerados na análise foram grupo (7 níveis), distância (3 níveis) e medidas (6 níveis). Os resultados revelaram haver significância na comparação entre os grupos ($p < 0,0001$), porém não houve diferença significativa entre as distâncias ($p = 0.4384$) e também na interação entre grupo e distância $p=0,0604$. Por esse motivo as comparações *post-hoc* foram feitas somente para o fator grupos considerando-se os dados obtidos em D1, D2 e D3 de forma conjunta. O grupo G5 μ foi o que apresentou as menores médias (25,57 μm em D1; 20,91 μm em D2 e 13,60 μm em D3) e o grupo GC2 o que apresentou as maiores (59,40 μm em D1; 66,23 μm em D2 e 68,76 μm em D3). Todos os grupos tratados com *laser* e com flúor apresentaram médias significativamente menores que GC2. O grupo GF2 foi estatisticamente menor que GC2 ($p < 0,0001$) e apenas os grupos G5 μ e G10 μ foram estatisticamente menores que GF2 ($p < 0,0001$ e $p = 0,0012$). A descrição completa das diferenças que foram estatisticamente significantes é apresentada na Tabela 5.7 e os valores de P na Tabela 5.8.

Tabela 5.7- Médias das profundidades de lesões (μm) desvios-padrão (dp) para todos os grupos do Estudo 2, nas três distâncias analisadas individual e conjuntamente

Grupos		D1	D2	D3	Todas as Distâncias	
		Média (dp)	Média (dp)	Média (dp)	Média (dp)	
G5μ	Laser 5 μs	25,57 ($\pm 9,0$)	20,91 ($\pm 8,3$)	13,60 ($\pm 6,5$)	20,03 ($\pm 9,7$)	a
G10μ	Laser 10 μs	27,39 ($\pm 9,1$)	26,05 ($\pm 10,7$)	20,62 ($\pm 10,0$)	24,68 ($\pm 13,0$)	a
G20μ	Laser 20 μs	52,83 ($\pm 12,5$)	54,01 ($\pm 11,0$)	51,53 ($\pm 10,2$)	52,80 ($\pm 11,5$)	b,c
G30μ	Laser 30 μs	47,43 ($\pm 13,7$)	52,83 ($\pm 17,0$)	50,74 ($\pm 16,4$)	50,34 ($\pm 15,7$)	b
G50μ	Laser 50 μs	55,64 ($\pm 11,6$)	59,18 ($\pm 14,1$)	59,39 ($\pm 15,1$)	58,07 ($\pm 14,0$)	c
GC2	controle	59,40 ($\pm 14,6$)	66,23 ($\pm 15,5$)	68,76 ($\pm 16,8$)	64,79 ($\pm 15,9$)	d
GF2	flúor	33,38 ($\pm 12,6$)	33,74 ($\pm 11,8$)	35,40 ($\pm 13,2$)	34,18 ($\pm 18,7$)	e

Diferença estatística está representada por letras minúsculas diferentes ($\alpha = 0,5\%$).

Tabela 5.8- Valores de P para as comparações dos grupos do Estudo 2 considerando-se as medidas obtidas nas três distâncias (D1,D2 e D3) de forma conjunta

	G5 μ	G10 μ	G20 μ	G30 μ	G50 μ	GC2	GF2
G5μ		0,0990	<0,0001 *	<0,0001 *	<0,0001 *	<0,0001 *	<0,0001 *
G10μ	0,0990		<0,0001 *	<0,0001 *	<0,0001 *	<0,0001 *	0,0012 *
G20μ	<0,0001 *	<0,0001 *		0,3739	0,0622	<0,0001 *	<0,0001 *
G30μ	<0,0001 *	<0,0001 *	0,3739		0,0068 *	<0,0001 *	<0,0001 *
G50μ	<0,0001 *	<0,0001 *	0,0622	0,0068 *		0,0182 *	<0,0001 *
GC2	<0,0001 *	<0,0001 *	<0,0001 *	<0,0001 *	0,0182 *		<0,0001 *
GF2	<0,0001 *	0,0012 *	<0,0001 *	<0,0001 *	<0,0001 *	<0,0001 *	

* Indica diferença estatisticamente significativa ($\alpha = 0,5\%$).

A partir das médias apresentadas na Tabela 5.7 a porcentagem de inibição de cárie foi calculada utilizando-se a fórmula (2) e os resultados são apresentados na Tabela 5.9.

Tabela 5.9- Porcentagens de inibição da progressão de cáries nos grupos tratados em relação ao grupo controle nas diferentes distâncias analisadas no Estudo 2 e também o percentual geral, considerando-se a média de todas elas

Grupos		D1 % Inibição de Cárie	D2 %Inibição de Cárie	D3 %Inibição de Cárie	Todas as Distâncias %Inibição de Cárie
G5μ	<i>Laser 5μs</i>	57%	68%	80%	69%
G10μ	<i>Laser 10μs</i>	54%	61%	70%	54%
G20μ	<i>Laser 20μs</i>	11%	18%	25%	11%
G30μ	<i>Laser 30μs</i>	20%	20%	26%	20%
G50μ	<i>Laser 50μs</i>	6%	11%	14%	6%
GC2	controle	0%	0%	0%	0%
GF2	flúor	44%	49%	49%	44%

Figura 5.11- Lesões de subsuperfície observadas nos grupos irradiados com as diferentes durações de pulso (5, 10, 20, 30, 50 μ s), no grupo controle e no grupo tratado com flúor através de microscopia de luz polarizada. Estudo 2. É possível observar que as lesões apresentaram uma profundidade menor nos grupos com as durações de pulso mais curtas.

5.3.2 quantificação da fluorescência induzida por luz (QFL)

Como para cada amostra três medidas foram feitas, cada grupo era composto de 45 valores de cada uma das variáveis calculadas pelo programa, ΔF (% de perda de fluorescência), de ΔQ (% de perda de fluorescência integrada pela área da lesão) e área de lesão de mancha branca (mm^2). As médias e os desvios-padrão desses valores nos grupos foram calculados para todas as variáveis analisadas (ΔF , ΔQ e área de lesão) e estão representados graficamente nas Figuras 5.12, 5.13 e 5.14. Exemplos das imagens obtidas com o aparelho nos diferentes grupos podem ser observados na Figura 5.15.

Figura 5.12- Médias de de ΔF (% de perda de fluorescência) e desvios-padrão nos diferentes grupos do Estudo 2

Figura 5.13— Médias de ΔQ (% de perda de fluorescência integrada pela área da lesão) e desvios-padrão nos diferentes grupos do Estudo 2.

Figura 5.14— Médias de área de lesão de mancha branca (mm^2) e desvios-padrão nos diferentes grupos do Estudo 2.

Figura 5.15- Imagens das amostras do Estudo 2 obtidas através do equipamento de QLF, após indução de cárie artificial. Do lado esquerdo estão as imagens de fluorescência originais obtidas através da câmera do aparelho e do lado direito as imagens analisadas quanto à perda de fluorescência através do programa Inspektor Pro.

Pela análise dos gráficos é possível ver que os grupos G5 μ e G10 μ apresentam as menores médias de ΔF e ΔQ , o que está de acordo com os resultados das medidas de profundidade de lesão, onde esses grupos também apresentaram as menores médias. No que se refere às medidas que levam em consideração a área da lesão, ΔQ e área de lesão, os grupos G30 μ e G50 μ apresentam valores especialmente altos, pois nesses dois grupos a área em que a lesão foi induzida era maior do que nos demais. Portanto esse era o comportamento esperado e isso significa que para esses dois grupos, a comparação com os demais só faz sentido se os valores de ΔF são considerados. Nessas medidas, de ΔF , os grupos G30 μ e G50 μ apresentaram médias semelhantes a GC2, porém inesperadamente, as médias do grupo G30 μ têm valores mais altos que GC2.

Para avaliar as diferenças que foram significantes os dados de cada variável (ΔQ , ΔF e área) foram submetidos a uma análise estatística separada. Sendo assim três testes de Análise de Variância de medidas repetidas com 2 fatores de variação e três comparações *post-hoc* com teste T para dados não pareados ($\alpha = 5\%$) foram realizados. Nas três análises os dois fatores principais foram grupo (7 níveis) e medidas/mensurações (3 níveis). Nos três diferentes itens medidos a partir das imagens de fluorescência, ΔF , ΔQ e área de lesão, foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p = 0,0008$, $p < 0,0001$, $p < 0,0001$, respectivamente), mas não entre as diferentes medidas da mesma amostra ($p = 0,4427$, $p = 0,6640$, $p = 0,4643$, respectivamente para ΔF , ΔQ e de área de lesão). O fator medida foi incluído na análise somente com o intuito de se avaliar a acurácia de diferentes medidas da mesma amostra, como não houve diferença significativa entre elas, a interação entre os fatores grupo e medidas não foi

analisada, pois não era de interesse para este estudo. Todas as diferenças que foram estatisticamente significantes são representadas na Tabela 5.10 e os valores de p para as comparações entre os grupos na Tabela 5.11 para ΔF , Tabela 5.12 para ΔQ e Tabela 5.13 para área.

Tabela 5.10- Médias (desvios-padrão) de ΔF , ΔQ e de área de lesão nos grupos do Estudo 2, após a indução de cárie artificial

Grupos	Médias de ΔF (% de perda de fluorescência x -1)		Médias de ΔQ (% de perda de fluorescência x mm^2 x -1)		Médias de Área de Lesão (mm^2)	
G5 μ	22,42 ($\pm 10,5$)	a	114,53 ($\pm 84,7$)	a	4,77 ($\pm 1,2$)	a
G10 μ	20,94 ($\pm 5,8$)	a	123,43 ($\pm 45,1$)	a,e	5,77 ($\pm 1,0$)	b
G20 μ	23,39 ($\pm 6,8$)	a	131,49 ($\pm 45,5$)	a,e	5,55 ($\pm 0,5$)	b,f
G30 μ	29,92 ($\pm 4,7$)	b	252,89 ($\pm 58,0$)	b	8,40 ($\pm 1,2$)	c
G50 μ	28,84 ($\pm 8,3$)	b	460,31 ($\pm 160,1$)	c	15,81 ($\pm 2,5$)	d
GC2	29,10 ($\pm 5,4$)	b	172,07 ($\pm 45,5$)	e,f	5,85 ($\pm 0,8$)	b,e
GGF2	22,70 ($\pm 6,7$)	a	118,24 ($\pm 46,2$)	a,f	5,07 ($\pm 0,6$)	a,e,f

Diferença estatística nas colunas é representada por letras minúsculas diferentes ($\alpha = 0,5\%$)

Tabela 5.11- Valores de P para as comparações das médias de ΔF dos grupos do Estudo2

	G5 μ	G10 μ	G20 μ	G30 μ	G50 μ	GC2	GF2
G5 μ	x						
G10 μ	0,5581	x					
G20 μ	0,6895	0,3254	x				
G30 μ	0,0041*	0,0006*	0,0128*	x			
G50 μ	<0,0172*	0,0033*	0,0457*	0,6103*	x		
GC2	<0,0122*	0,0022*	0,0338*	0,7032*	0,8975	x	
GF2	0,8538	0,4417	0,8295	0,0071*	0,0274*	0,0198*	x

Tabela 5.12- Valores de P para as comparações das médias de ΔQ dos grupos do Estudo2

	G5 μ	G10 μ	G20 μ	G30 μ	G50 μ	GC2	GF2
G5 μ	x						
G10 μ	0,3989	x					
G20 μ	0,3691	0,9562	x				
G30 μ	<0,0001*	<0,0001*	0,0001*	x			
G50 μ	<0,0001*	<0,0001*	<0,0001*	<0,0001*	x		
GC2	0,0222*	0,1430	0,1584	0,0103*	<0,0001*	x	
GF2	0,5427	0,8136	0,7713	<0,0001*	<0,0001*	0,0899	x

Tabela 5.13- Valores de P para as comparações das médias de DQ dos grupos do estudo2

	G5 μ	G10 μ	G20 μ	G30 μ	G50 μ	GC2	GF2
G5 μ	x						
G10 μ	<0,0001*	x					
G20 μ	0,0027*	0,3118	x				
G30 μ	<0,0001*	<0,0001*	<0,0001*	x			
G50 μ	<0,0001*	<0,0001*	<0,0001*	<0,0001*	x		
GC2	0,0003*	0,7252	0,5082	<0,0001*	<0,0001*	x	
GF2	0,0791	0,0226*	0,1968	<0,0001*	<0,0001*	0,0524	x

Apenas o grupo G5 μ apresentou médias de ΔF , ΔQ e área de lesão estatisticamente menores do que GC2 ($p = 0,0122$, $p = 0,0222$, $p = 0,0003$), o que está de acordo com os resultados da análise de profundidade de lesão. Porém o teste correlação de Pearson revelou haver uma correlação fraca tanto na relação entre as médias de ΔF e profundidade de lesão em D3 ($r = 0,38$) quanto para as médias de ΔQ e profundidade de lesão em D3 ($r = 0,40$). Sendo que para as análises de correlação todas as amostras que possuíam valores para as duas variáveis foram consideradas (Figura 5.16 e Figura 5.17).

Figura 5.16- Gráfico das médias ΔF (% de perda de fluorescência) pelas médias de profundidade de lesão (μm) em todas as amostras do Estudo 2. Os dados apresentaram uma correlação linear fraca ($r = 0,37$), observada através do teste de Correlação de Pearson.

Figura 5.17- Gráfico das médias ΔQ (% de perda de fluorescência integrada pela área da lesão) pelas médias de profundidade de lesão (μm) em todas as amostras do Estudo 2. Os dados apresentaram uma correlação linear fraca ($r = 0,40$), observada através do teste de Correlação de Pearson.

5.3.3 microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As micrografias das amostras, do grupo que apresentou a maior inibição da progressão de cárie, G5 μ , mostraram que as superfícies irradiadas com os parâmetros utilizados nesse grupo não apresentaram alterações morfológicas diferentes das observadas nas superfícies de esmalte controle, não irradiadas (Figura 5.18). Além disso, também na secção longitudinal do centro da área irradiada nenhum dano na subsuperfície pôde ser observado (Figura 5.19).

Figura 5.18- Micrografias das superfícies das amostras do grupo G5 μ feitas em MEV . Pelas imagens é possível observar a ausência de sinais de ablação, fusão e também de danos do tipo trincas e fissuras. À esquerda, imagem em menor magnificação (40 X) e à direita, em maior magnificação (1000 X). Alterações da morfologia com relação as amostras controle, não irradiadas, não podem ser observadas

Figura 5.19- Micrografias da secção transversal do centro da área irradiada das amostras do grupo G5 μ . Tanto em menor (40X) quanto em maior magnificação (100 X) não é possível observar danos do tipo trincas e microfissuras subsuperfície

5.4 Estudo 3: Influência do Número de Pulsos Sobrepostos

5.4.1 análise da profundidade de lesão

As médias de profundidade de lesão obtidas e os respectivos desvios-padrão estão representados na Figura 5.20.

Figura 5.20- Médias de profundidade de lesão e desvios-padrão dos diferentes grupos nas diferentes distâncias analisadas no Estudo 2

Nos grupos G5s, G9s e GC3, respectivamente 3, 2 e 1, amostras foram descartadas antes da observação no microscópio por estarem com a espessura fora do padrão ($100 \mu\text{m} \pm 10$). Com isso o número de amostras (n), submetidas a análise estatística em cada grupo, foram 15, 12, 13, 14, 15 respectivamente para G2s, G5s, G9s, GC3 e GF3.

Os dados foram submetidos à análise de Variância de Medidas Repetidas para 3 fatores (ANOVA) e comparações pareadas *post-hoc* através do teste T ambos ao nível de 5% de significância. As análises foram feitas utilizando-se o programa SAS versão 9.1 para Windows (SAS Institute Inc., Cary, EUA) e os três fatores principais considerados na análise foram grupo (5 níveis), distância (3 níveis) e medidas (6 níveis). Os resultados revelaram haver significância na comparação entre os grupos ($p < 0,0001$), porém entre as distâncias ($p = 0.5653$) e na interação entre grupo e distância ($p=0,7241$) não houve diferença significativa.

Em todos os grupos tratados com *laser*, as médias de profundidade de lesão foram menores em D2 e D3 do que em D1, apesar de não ter havido diferença estatisticamente significativa. O grupo G9s foi o que apresentou as menores médias em D1, D2 e D3, 5,96 μm , 5,85 μm e 4,55 μm respectivamente. Todos os grupos tratados com *laser* foram significativamente diferentes de GC e os grupos G5s e G9s foram até mesmo estatisticamente menores que GF3 ($p < 0,0001$ e $p < 0,0001$). A descrição detalhada das diferenças estatisticamente significantes entre os grupos são apresentadas na Tabela 5.14 e os valores de P para todas as comparações na Tabela 5.15.

Tabela 5.14 - Médias e desvios-padrão (dp) das profundidades de lesão (μm) para todos os grupos do Estudo 2 nas diferentes distâncias de medida

Grupos		D1	D2	D3	Todas as Distâncias	
		Média (dp)	Média (dp)	Média (dp)	Média (dp)	
G2s	<i>Laser 2s</i>	20,48 ($\pm 8,4$)	19,98 ($\pm 9,4$)	18,38 ($\pm 9,7$)	19,61 ($\pm 9,3$)	a
G5s	<i>Laser 5s</i>	12,92 ($\pm 4,8$)	10,42 ($\pm 3,5$)	8,73 ($\pm 2,9$)	10,69 ($\pm 4,5$)	b
G9s	<i>Laser 9s</i>	5,96 ($\pm 3,7$)	5,85 ($\pm 3,3$)	4,55 ($\pm 2,2$)	5,45 ($\pm 3,3$)	c
GC3	controle	27,89 ($\pm 6,3$)	29,50 ($\pm 5,7$)	29,79 ($\pm 5,9$)	29,05 ($\pm 7,0$)	d
GF3	flúor	21,80 ($\pm 6,3$)	21,43 ($\pm 6,0$)	21,91 ($\pm 6,6$)	21,71 ($\pm 6,3$)	a

Diferença estatística entre os grupos está representada por letras minúsculas diferentes ($\alpha = 0,5\%$).

Tabela 5.15- Valores de P para as comparações dos grupos do Estudo 3 considerando-se as medidas obtidas nas três distâncias (D1,D2 e D3) de forma conjunta

	G2s	G5s	G9s	GC3	GF3
G2s		<0,0001 *	<0,0001 *	<0,0001 *	0,1183
G5s	<0,0001 *		0,0006 *	<0,0001 *	<0,0001 *
G9s	<0,0001 *	0,0006 *		<0,0001 *	<0,0001 *
GC3	<0,0001 *	<0,0001 *	<0,0001 *		<0,0001 *
GF3	0,1183	<0,0001 *	<0,0001 *	<0,0001 *	

* Indica diferença estatisticamente significativa ($\alpha = 0,5\%$).

A partir das médias apresentadas na Tabela 5.14 a porcentagem de inibição de cárie foi calculada utilizando-se a fórmula (2) e os resultados são apresentados na Tabela 5.16.

Tabela 5.16- Porcentagens de inibição de cáries dos grupos tratados em relação ao grupo controle para os grupos e distâncias analisados no Estudo 3

Grupos		D1	D2	D3	Todas as Distâncias
		<i>%Inibição de cárie</i>	<i>%Inibição de cárie</i>	<i>%Inibição de cárie</i>	<i>%Inibição de cárie</i>
G2s	<i>Laser 3s</i>	27%	32%	38%	32%
G5s	<i>Laser 5s</i>	54%	65%	71%	63%
G9s	<i>Laser 9s</i>	79%	80%	85%	81%
GC3	controle	0%	0%	0%	0%
GF3	flúor	22%	27%	26%	25%

5.4.2 quantificação da fluorescência induzida por luz (QFL)

5.4.2.1 análise inicial e após a irradiação por laser

Antes que as medidas de todos os grupos fossem comparadas, o grupo G9s foi individualmente analisado, pois nesse grupo em duas amostras uma acentuada mudança de cor (visível a olho nu) foi observada, após a irradiação com *laser*. O comportamento dessas amostras com relação às medidas de ΔF , ΔQ e de área de lesão foi comparado graficamente com as demais amostras do grupo e como pôde ser observado nas Figuras 5.21, 5.22 e 5.23, elas apresentaram para todas as variáveis de fluorescência analisadas, valores bastante distantes em relação à média do grupo.

Figura 5.21- Distribuição dos dados de ΔF medidos nas amostras do grupo G9s. Amostra 7 apresenta um comportamento bastante distante da média do grupo.

Figura 5.22- Distribuição dos dados de ΔQ medidos nas amostras do grupo G9s. Amostras 7 e 14 apresentam um comportamento bastante distante da média do grupo

Figura 5.23- Distribuição dos dados de área de lesão medidos nas amostras do grupo G9s. Amostras 7 e 14 apresentam um comportamento bastante distante da média do grupo

Observado esse comportamento diferenciado, das amostras 7 e 14 do grupo G9s, essas amostras foram excluídas da análise estatística, pois a alteração ocorrida após a irradiação poderia influenciar negativamente as medidas após a indução de cárie artificial. Na próxima análise, essas duas amostras já teriam um valor inicial de perda de fluorescência muito alto, o que não representaria exatamente a existência de lesão de mancha branca e sim uma alteração da fluorescência devido à mudança de cor das amostras após a irradiação com *laser*. Após a exclusão desses dados, as médias de ΔF , ΔQ e de área de lesão dos grupos antes e após irradiação com *laser* de CO₂ foram representadas

graficamente e comparados estatisticamente (Figura 5.24, Figura 5.25, Figura 5.26).

Figura 5.24- Média de ΔF nos grupos antes e após irradiação com *laser* de CO_2

Figura 5.25- Médias de ΔQ nos grupos antes e após irradiação com *laser* de CO_2

Figura 5.26- Médias de área de lesão nos grupos antes e após irradiação com *laser* de CO₂

Com o intuito de se comparar se houve diferença entre as medidas de fluorescência antes e após irradiação, para cada grupo um teste de T para amostras pareadas, ao nível de 5% significância, foi realizado. Os resultados mostraram que houve diferença estatisticamente significativa entre os momentos antes e após irradiação somente para as medidas de área de lesão dos grupos G9s e GC3 e para as medidas ΔQ de GC3. Nestes grupos as médias de área de lesão foram estatisticamente maiores no momento posterior à irradiação do que no momento inicial. Todos os valores de P, para as comparações realizadas, estão representados na Tabela 5.17.

Tabela 5.17- Valores de P referentes às comparações das médias de ΔF , ΔQ e de área de lesão antes e após a irradiação com *laser* de CO₂

	ΔF	ΔQ	Área da Lesão
G2s	0,5732	0,3207	0,2096
G5s	0,1571	0,6841	0,8218
G9s	0,9128	0,0764	0,0264*
GC3	0,5191	0,0125*	0,0013*
GF3	0,6092	0,2471	0,1285

* Indica diferença estatisticamente significativa ($\alpha = 0,5\%$).

5.4.2.2 análise após indução de cáries artificial

Os resultados das medidas de ΔF , ΔQ e de área de lesão obtidos nos grupos após a ciclagem de pH, estão representados nas, Figura 5.27, Figura 5.28 e Figura 5.29 e as imagens de fluorescência de todos os grupos, sem análise e analisadas estão representadas na Figura 5.30.

Figura 5.27- Médias de ΔF (% de perda de fluorescência) e desvios-padrão nos diferentes grupos do Estudo 3

Figura 5.28- Médias de ΔQ (% de perda de fluorescência integrada pela área da lesão e desvios-padrão nos diferentes grupos do Estudo 3

Figura 5.29- Médias de área de lesão de mancha branca (mm^2) e desvios-padrão nos diferentes grupos do Estudo 3

Figura 5.30- Imagens das amostras do Estudo 3 obtidas através do equipamento de QLF, após indução de cárie artificial. Do lado esquerdo estão as imagens de fluorescência originais obtidas através da câmera do aparelho e do lado direito as imagens analisadas quanto à perda de fluorescência através do programa Inspektor Pro

Pela análise dos gráficos é possível ver que os grupos G5s e G9s apresentam as menores médias de ΔF e ΔQ e de área de lesão, o que está de acordo com os resultados das medidas de profundidade de lesão, onde esses grupos também apresentaram as menores médias.

Os dados foram analisados estatisticamente da mesma forma como descrito no item 5.3.2., com apenas uma mudança no fator grupo, que nesse estudo foi analisado em cinco níveis. Nos três diferentes itens medidos a partir das imagens de fluorescência, ΔF , ΔQ e área de lesão, foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0,0001$, $p < 0,0001$, $p < 0,0001$), mas não entre as diferentes medidas da mesma amostra ($p = 0,3693$, $p = 0,3981$, $p = 0,8703$, respectivamente para ΔF , ΔQ e de área de lesão). O grupo G9s foi o que apresentou as menores médias e o grupo GC3 as maiores. Em todos os itens de fluorescência analisados (ΔF , ΔQ e área de lesão), G9s apresentou médias estatisticamente menores que GC3 ($p < 0,0001$, $p < 0,0001$, $p < 0,0001$) e também que GF3 ($p = 0,0003$, $p = 0,425$, $p = 0,0019$). O grupo G5s também apresentou médias significativamente menores que GC3, em todos os parâmetros de fluorescência analisados, porém neste grupo a média de ΔF também foi estatisticamente menor que em G9s ($p = 0,0306$). As demais diferenças que foram estatisticamente significantes estão representadas na Tabela 5.18 e os valores de p nas Tabelas 5.19, 5.20 e 5.21.

Tabela 5.18- Médias (desvios-padrão) de ΔF , ΔQ e de área de lesão nos grupos do Estudo 3, após a indução de cárie artificial

Grupos	Médias de ΔF (% de perda de fluorescência x -1)		Médias de ΔQ (% de perda de fluorescência x mm ² x -1)		Médias de Área de Lesão (mm ²)	
G2s	10,24 ($\pm 3,2$)	a,d	21,05 ($\pm 31,0$)	a,b	1,55 ($\pm 1,8$)	a,b
G5s	6,65 ($\pm 1,4$)	b	0,75 ($\pm 0,9$)	b	0,10 ($\pm 0,1$)	b
G9s	4,79 ($\pm 2,3$)	c	0,38 ($\pm 0,9$)	b	0,05 ($\pm 0,1$)	b
GC3	11,23 ($\pm 4,0$)	d	50,29 ($\pm 49,0$)	c	3,70 ($\pm 2,8$)	c
GF3	8,13 ($\pm 2,1$)	a,b	21,42 ($\pm 25,3$)	a	2,13 ($\pm 2,3$)	a

Diferença estatística nas colunas está representada por letras minúsculas diferentes ($\alpha=0,5\%$)

Tabela 5.19- Valores de P para as comparações das médias de ΔF dos grupos dos Estudo 3

	G2s	G5s	G9s	GC3	GF3
G2s	x				
G5s	0,0008	x			
G9s	<0,0001*	0,0306*	x		
GC3	0,3380	<0,0001*	<0,0001*	X	
GF3	0,0669	0,1054	0,0003*	0,0062*	x

* Indica diferença estatisticamente significante ($\alpha = 0,5\%$).

Tabela 5.20- Valores de P para as comparações das médias de ΔQ dos grupos do Estudo 3

	G2s	G5s	G9s	GC3	GF3
G2s	x				
G5s	0,2691	x			
G9s	0,2601	0,9508	x		
GC3	<0,0001*	<0,0001*	<0,0001*	X	
GF3	0,3367	0,0411	0,0425	0,0023	x

* Indica diferença estatisticamente significante ($\alpha = 0,5\%$).

Tabela 5.21- Valores de P para as comparações das médias de área de lesão dos grupos do Estudo 3

	G2s	G5s	G9s	GC3	GF3
G2s	x				
G5s	0,1171	x			
G9s	0,1048	0,9095	x		
GC3	<0,0001*	<0,0001*	<0,0001*	X	
GF3	0,1044	0,0019*	0,0019*	0,0071*	x

* Indica diferença estatisticamente significante ($\alpha = 0,5\%$).

O teste de Correlação de Pearson revelou haver uma correlação moderada tanto entre as médias de ΔF e profundidade de lesão em D3, como entre ΔQ e profundidade de lesão em D3 ($r = 0,53$ e $r = 0,052$), quando as médias dos grupos

deste estudo foram considerados. A distribuição dos dados pode ser observada nas Figuras 5.31 e 5.32.

Figura 5.31 - Gráfico das médias ΔF (% de perda de fluorescência) pelas médias de profundidade de lesão (μm) na distância D3 para todas as amostras do Estudo 3. Os dados apresentaram uma correlação linear moderada ($r = 0,53$) observada através do teste de Correlação de Pearson.

Figura 5.32- Gráfico das médias ΔQ (% de perda de fluorescência integrada pela área da lesão) pelas médias de profundidade de lesão (μm) na distância D3 para as amostras do Estudo 3. Os dados apresentaram uma correlação linear moderada ($r = 0,52$), observada através do teste de Correlação de Pearson.

5.4.3 microscopia eletrônica de varredura (MEV)

No estudo anterior micrografias das amostras irradiadas em condições iguais às utilizadas no grupo G9s (grupo G5 μ , do Estudo 2) já foram apresentadas. Portanto, somente as micrografias do grupo que apresentou a segunda maior inibição de cáries, G5s, foram realizadas. As superfícies irradiadas com os parâmetros utilizados nesse grupo não apresentaram alterações morfológicas diferentes das observadas nas superfícies de esmalte controle não irradiadas (Figura 5.33). Além disso também na secção longitudinal do centro da área irradiada nenhum dano na subsuperfície pôde ser observado (Figura 5.34)

Figura 5.33- Micrografias das superfícies das amostras do grupo G5s feitas em MEV. Pelas imagens é possível observar a ausência de sinais de ablação, fusão e também de danos do tipo trincas e fissuras. À esquerda imagem em menor magnificação (40 X) e à direita em maior magnificação (1000 X). Alterações da morfologia com relação às amostras controle, não irradiadas, não podem ser observadas.

Figura 5.34- Micrografias da secção transversal do centro da área irradiada das amostras do grupo G5μ. Tanto em menor (40X) quanto em maior magnificação (100 X) não é possível observar danos do tipo trincas e microfissuras subsuperfície

6 DISCUSSÃO

6.1 Influência da Densidade de Energia – Análises de PL e MEV

Os resultados do Estudo 1 mostram significativa redução da profundidade das lesões de subsuperfície após a irradiação do esmalte por *laser* de CO₂ com densidades de energia menores do que 0,5 J/cm² (0,1 e 0,3 J/cm²). Como mostrado nas Tabelas 2.2 e 2.3, a inibição de cáries após a irradiação do esmalte com *laser* de CO₂ ($\lambda = 10,6 \mu\text{m}$) só tinha sido demonstrada para densidades de energia mais altas (2,5 a 83,3 J/cm²) e durações de pulsos muito mais altas (100 a 50.000 μs) ou muito menores (0,1 a 0,2 μs). Uma busca nas bases de dados *Pubmed*, *Web of Science* e biblioteca da SPIE¹ até dezembro de 2007 indica que esta é primeira vez que a inibição da progressão de lesão de cárie após a irradiação do esmalte com densidades de energia menores que 0,5 J/cm² é demonstrada. Estes resultados são extremamente positivos pois mostram que de fato é possível se obter o efeito de aumento da resistência do esmalte à desmineralização com baixas densidades de energia e assim reduzir também os efeitos colaterais, como danos térmicos de superfície e danos pulpares irreversíveis.

Os únicos estudos encontrados, que teriam aparentemente demonstrado a inibição da desmineralização do esmalte dental após a irradiação com 0,3 J/cm²

¹ SPIE é uma sociedade internacional que busca o avanço da abordagem interdisciplinar para a ciência e aplicação da luz.

foram conduzidos por Hsu et al. (2000, 2001). Porém, assumindo-se que os dados de potência média, taxa de repetição e diâmetro do feixe reportados pelos autores estão corretos, a densidade de energia do estudo foi na verdade $3,4 \text{ J/cm}^2$ e não $0,3 \text{ J/cm}^2$, como mencionado.

Esse pode ser um dos motivos pelos quais a inibição encontrada por esses autores foi tão alta (99%), enquanto no presente trabalho a porcentagem de inibição máxima atingida com a irradiação com $0,3 \text{ J/cm}^2$ (5 μs , 2036 pulsos sobrepostos) foi um pouco menor, 85% (no centro da lesão). Porém, além da densidade de energia dez vezes mais alta (uma ordem de grandeza maior), também a duração de pulso mais longa (5.000 μs) pode ter contribuído para esse efeito.

Em pulsos de 50.000 μs , Klein et al. (2005) observaram uma inibição significativa de 48 e 64% em 50 e 100 μm de distância, respectivamente, da margem de restaurações de resina composta irradiadas com *laser* de CO_2 com 16 J/cm^2 , enquanto Tagliaferro et al. (2007) observaram, na superfície vestibular de dentes decíduos, uma inibição ainda maior (67%) para a irradiação com uma densidade de energia cerca de três vezes menor, 5 J/cm^2 . Em pulsos cinco vezes mais curtos, 10.000 μs , Steiner-Oliveira et al. (2006) observaram uma inibição também de 67% para a irradiação com 10 J/cm^2 .

Ao contrário do que se esperava inicialmente, as menores densidades de energia (0,1 e $0,3 \text{ J/cm}^2$) foram as que causaram as maiores reduções da progressão da lesão, para uma mesma duração de pulso de 10 μs . Um relacionamento diferente entre densidade de energia e efeito foi observado por Featherstone et al. (1998), estudando pulsos de 100 μs . Com as densidades de energia mais altas, as maiores porcentagens de inibição foram observadas,

considerando-se o intervalo entre 2,5 e 12,5 J/cm² (ZUERLEIN;FRIED;FEATHERSTONE, 1999).

Porém, diferentemente do estudo de Feathrestone e colaboradores (1998), em que para todos os grupos também a taxa de repetição e o número de pulsos sobrepostos eram os mesmos, neste estudo a taxa de repetição e o número de pulsos sobrepostos foram diferentes nos grupos. Inicialmente, também era a intenção desta avaliação sistemática que o maior número possível de parâmetros *lasers* fossem iguais nos grupos e apenas um deles fosse variado em cada estudo. Porém a principal limitação nesse sentido foi o modo de operação do equipamento *laser* utilizado, que permite que o operador determine apenas o valor da duração de pulso e o valor do *off time*. Isso determinou, por exemplo que, as taxas de repetições tivessem que ser necessariamente diferentes nos grupos, para que a condição inicialmente estabelecida, de que todos os grupos tivessem a mesma duração de pulso, pudesse ser mantida. Assim, como a taxa de repetição do *laser* utilizado é dada automaticamente após a escolha do valor do *off time*, também a mudança da quantidade de energia emitida só pode ser obtida mudando-se a duração do *off time*. Portanto, foi impossível obter para uma mesma área de irradiação, densidades de energia diferentes sem que a taxa de repetição não mudasse automaticamente.

O outro fator diferente nos grupos, o número de pulsos sobrepostos, foi determinado através da observação dos efeitos no tecido, em testes piloto. Como não poderia haver ablação, carbonização ou trincas nas superfícies, o tempo de irradiação das amostras com as densidades de energia encontradas foi determinado através de irradiações em tempos regressivos, até que nenhum desses efeitos fosse observado. Por isso, é interessante notar que para as

densidades de energia mais altas, em poucos segundos de irradiação, um início de ablação já podia ser observado, enquanto para as densidades de energia mais baixas um maior número de pulsos pôde ser sobreposto sem que houvesse ablação ou danos térmicos visíveis no tecido. Sendo assim, nos grupos com maior densidade de energia o número de pulsos sobrepostos foi menor do que nos grupos com menor densidade de energia.

A interação com o tecido acontece dessa forma porque para uma duração de pulso e um diâmetro de feixe igual, quanto maior a densidade de energia, maior é a potência pico do feixe, e maior também é o aumento de temperatura gerado na superfície do esmalte quando da sua absorção. Além disso, esse fator é potencializado pelo número de pulsos sobrepostos, pois o pulso seguinte eleva ainda mais a temperatura do que o pulso anterior, até que a temperatura atinja a faixa em que a vaporização da hidroxiapatita acontece ($\approx 1600^{\circ}\text{C}$) (FRIED et al., 1996). Portanto, para as densidades de energia maiores, um menor número de pulsos de 10 μs sobrepostos já foi suficiente para causar ablação; e abaixo do limiar de ablação as modificações da estrutura não foram as ideais para causar uma redução significativa da desmineralização (NELSON et al., 1987; MCCORMACK et al., 1995b; TAKAHASHI; KIMURA; MATSUMOTO, 1998; HSU et al., 2001; TSAI et al., 2002).

Provavelmente isso aconteceu porque o aumento da densidade de energia aumenta a inibição de cárie até um limiar, relacionado ao aumento de temperatura. Após esse limiar a irradiação do esmalte pode promover modificações da estrutura que acabam por tornar o esmalte mais solúvel. Nesse caso a hidroxiapatita carbonatada de estrutura é transformada para fases mais solúveis como difosfato

de tetracálcio (TTCP) e fosfato de tricálcio (TCP) como observado por Nelson et al.(1987).

Esse efeito também foi claramente demonstrado em pesquisa recente com o comprimento de onda de 9,6 μm . Nesse estudo, a irradiação com pulsos de 8 μs , 10 pulsos sobrepostos e densidades de energia menores que $1\text{J}/\text{cm}^2$ causou redução da solubilidade ácida em relação às amostras não irradiadas. Porém, com densidades de energia maiores que $1\text{J}/\text{cm}^2$ (1 a $3\text{J}/\text{cm}^2$), um aumento, ao invés de uma redução em relação ao controle foi observado (GERARD et al., 2005).

Em irradiações do esmalte por *laser* de CO_2 em que todos os parâmetros *lasers* são fixos e somente a densidade de energia é aumentada, um maior aumento de temperatura na superfície pode ser esperado. Como as alterações que tornam o esmalte menos solúvel em ácido são dependentes da temperatura e diferentes faixas de temperatura causam diferentes efeitos, é compreensível que uma densidade de energia maior possa causar aumento ao invés de redução da solubilidade. De acordo com Fowler e Kuroda (1986) um aquecimento da superfície do esmalte maior do que 1100°C promove a formação de fases de apatita (TTCP e α -TCP) mais solúveis do que o esmalte natural e que são geralmente observadas nas superfícies de esmalte irradiadas, em que houve fusão.

Com o modelo de elementos finitos usado neste trabalho foi possível observar que nos primeiros 400 μm abaixo da superfície, a temperatura para a condição de irradiação G0,3 (que mostrou a maior inibição de lesão), se manteve na faixa entre 600 e 700°C durante aproximadamente 11 s. Este resultado está de acordo com as observações de Fowler e Kuroda (1986), que descreveram que as modificações da porção mineral do esmalte na região inicial da faixa entre 650 e 1100°C são capazes de produzir cristais mais semelhantes à hidroxiapatita pura,

ou seja, com menos impurezas e defeitos que o esmalte natural. Isso significa que concomitantemente à formação de β -TCP, a razão Ca/P da apatita se torna mais estequiométrica, seu conteúdo de carbonato e água é menor e de radicais hidroxila é maior do que no esmalte natural. Esse conjunto de modificações torna o esmalte dental modificado mais semelhante à hidroxiapatita pura e provavelmente reduz a sua solubilidade.

O modelo também mostrou que o aumento da temperatura foi gradualmente menor em direção ao interior das amostras. Isso indica dois comportamentos importantes: primeiro que nas camadas mais profundas do esmalte, onde o aumento de temperatura foi bem menor do que na superfície (ao redor de 200°C em 950 μ m de profundidade), a resistência à solubilidade ácida provavelmente também foi menor ou inexistente, em segundo lugar, indica que na região mais próxima ao teto da câmara pulpar (2,8 mm abaixo da superfície), o aumento de temperatura foi de apenas 2°C, que está abaixo do limiar em que danos pulpares são observados. Segundo trabalho clássico de Zach e Cohen, a elevação da temperatura pulpar acima de 11 °C e 5,5 °C causa danos irreversíveis à polpa em 60% e 18% dos casos respectivamente. No entanto, com elevações de até 2,2°C não existe evidência de danos pulpares irreversíveis.

Na faixa de temperatura ocorrida 950 μ m abaixo da superfície, apenas a diminuição do conteúdo de água, de radical hidroxila, desnaturação parcial da matriz orgânica e formação de pirofosfatos são observadas. Porém, uma redução significativa da solubilidade do esmalte dental não tem sido observada (HOLCOMB;YOUNG, 1980; SATO, 1983).

No presente estudo, as menores densidades de energia causaram as maiores inibições de lesão de cáries, porém nestas condições também um maior

número de pulsos foi sobreposto durante a irradiação. Estes resultados estão de acordo com as observações Kantorowitz e colaboradores (1998) que observaram após a irradiação do esmalte dental por *laser* de CO₂ ($\lambda=10,6\ \mu\text{m}$) com diferentes números de pulsos sobrepostos (1, 5, 25 e 100), porém com a mesma densidade de energia, taxa de repetição e largura de pulso ($12\ \text{J}/\text{cm}^2$, 10 Hz e 100 μs) uma maior inibição da perda mineral do esmalte, quando um maior número de pulsos foi utilizado. A diferença variou entre 48 e 87% de inibição e houve uma estabilização do efeito entre 25 e 100 pulsos onde já não houve uma diferença estatisticamente significativa entre as duas condições.

Também a eliminação do carbonato da estrutura do esmalte aumenta com o aumento do número de pulsos. Em irradiações com pulsos de 2 μs ($\lambda=10,6\ \mu\text{m}$) e com demais condições de irradiação sendo idênticas, uma redução de 100% do conteúdo de carbonato na superfície do esmalte é obtida com 5 pulsos sobrepostos, enquanto com 1 pulso a redução é de apenas 60% (FRIED et al., 1999). Portanto, existem indícios de que, para irradiações sub-ablativas, a sobreposição de um maior número de pulsos na mesma área tem um potencial para aumentar a resistência do esmalte à desmineralização até que um patamar de estabilização seja atingido.

Devido à distribuição Gaussiana da energia no interior do feixe, também foi possível notar uma maior intensidade dos efeitos no centro do que nas margens da lesão onde a densidade de energia, que atinge o tecido, é menor. No grupo com a menor densidade de energia utilizada, $0,1\ \text{J}/\text{cm}^2$, essa diferença foi mais pronunciada do que nos demais, porém para todos os grupos do Estudo 1 ela foi significativa.

Com relação às análises morfológicas da superfície, com todas as densidades de energia nenhuma diferença com relação às características das superfícies controle, não irradiadas, foi observada. Em nenhum grupo foram observados sinais de ablação, fusão, recristalização, ou trincas mais pronunciadas que as observadas nas amostras controle. Portanto, os danos térmicos, que têm sido comumente observados após a irradiação do esmalte por *laser* de CO₂, puderam ser evitados (FRIED et al., 1996; FRIED; RAGADIO; CHAMPION, 2001). Esses danos podem comprometer a utilização do *laser in vivo*, portanto o seu controle é de fundamental importância.

A ausência de danos observáveis em MEV é um primeiro indicativo de manutenção da integridade do tecido, porém outras análises de propriedades mecânicas e por outros métodos ópticos precisam ser realizadas para que essas observações possam ser avaliadas em detalhes e a segurança da irradiação seja garantida. A análise em microscópio confocal a *laser* pode ser uma opção para a observação mais detalhada das alterações do esmalte dental após irradiação, já que Apel e colaboradores (2005) analisando o esmalte irradiado por *laser* de Er:YAG puderam constatar a ocorrência de microfissuras na subsuperfície do esmalte através desse método (APEL et al., 2005).

Além disso, a ausência de fusão e ressolidificação observáveis nas micrografias em MEV corroboram os resultados obtidos através do modelo de elementos finitos, que mostraram que temperaturas no intervalo entre 800 e 1200°C, faixa onde ocorre fusão da hidroxiapatita, não foram atingidas (FRIED et al., 1996; FRIED et al., 1997; DELA ROSA et al., 2004).

No segundo estudo, para a avaliação do efeito da variação da largura de pulso na redução da progressão de cárie, a fluência de 0,3 J/cm² foi escolhida e as

condições de irradiação de G03 foram repetidas. O motivo para escolha dessa fluência e não de $0,1 \text{ J/cm}^2$, que também apresentou uma redução significativa da progressão da lesão em relação ao grupo controle, se deu porque G03 resultou num comportamento mais uniforme de inibição ao longo da lesão, do que G01 que foi apenas altamente inibidora no centro da lesão.

6.2 Influência da Duração de Pulso – Análises de PL e MEV

Os experimentos foram realizados com durações de pulso entre 5 e 50 μs , pois para comprimentos de onda altamente absorvidos no esmalte, durações de pulso de algumas dezenas de microssegundos têm o potencial para gerar um grande aumento da temperatura na superfície (400 a 1600°C), porém localizado numa camada fina do tecido (FRIED et al., 1999).

As profundidades de lesão dos grupos G5 μ e G10 μ foram significativamente menores do que as dos grupos controle GC2 e GF2. Entre G5 μ e G10 μ não houve diferença estatisticamente significativa, porém o porcentual mais alto de inibição da progressão das lesões, 80% na região D3, foi observado para G5 μ . O melhor resultado obtido com a duração de pulso de 5 μs está de acordo com os resultados recentemente observados pelo grupo de Featherstone e colaboradores com o comprimento de 9,6 μm (FEATHERSTONE;LE;FRIED, 2005).

A duração de pulso do *laser* tem influência direta no aumento da temperatura na superfície do esmalte irradiado e também na propagação do calor para as camadas dentais mais profundas. Para duas irradiações com o mesmo

comprimento de onda (10,6 μm), a mesma densidade de energia e mesmo número de pulsos, porém uma com 50 μs e outra com 500 μs , uma diferença de 200°C na elevação da temperatura na superfície pode ser observada. Com os pulsos mais curtos, um aumento maior da temperatura na superfície pode ser esperado e com pulsos mais longos um aumento menor, porém com maior propagação do calor para o interior do tecido (FRIED et al., 1996).

As estimativas de temperatura não foram o objetivo principal deste trabalho, porém, com o intuito de se entender melhor os efeitos da irradiação na estrutura dental e de se ter uma idéia do aumento da temperatura nas camadas próximas à polpa, o modelo de elementos finitos foi utilizado. Observado que a temperatura pulpar se manteve em níveis seguros para a irradiação com 0,3 J/cm² (G0,3) do Estudo 1, optou-se por implementar um refinamento do modelo antes que as demais condições de irradiação fossem simuladas. Esse refinamento permitirá a observação da variação da temperatura a cada 10 μm , e portanto também a identificação da espessura da camada de esmalte dental alterada, e mais resistente à desmineralização. Também a verificação detalhada das modificações no aumento de temperatura provocado por pequenas variações nos parâmetros de irradiação poderá ser observada e permitirá uma otimização dos parâmetros de irradiação.

Por esse motivo as estimativas para a irradiação com 5 μs de duração de pulso ainda não foram realizadas. Porém, como a duração de pulso e número de pulsos sobrepostos foram menores em G5 μ do que em G10 μ (mesma densidade de energia), é provável que tenha havido uma menor propagação do calor para o interior da estrutura, e possivelmente um aumento da temperatura na superfície, como reportado por Fried e colaboradores em 1996.

Neste estudo todos os grupos foram irradiados com a mesma densidade de energia, porém, novamente, foi impossível que os grupos tivessem também a mesma taxa de repetição e o mesmo número de pulsos sobrepostos. O modo de operação do *laser* e a pré-condição de que a densidade de energia fosse a mesma nos grupos foram os fatores limitantes. A idéia inicial era que todos os grupos tivessem, pelo menos, número de pulso ao redor de 2000, na tentativa de diminuir as variáveis influenciadoras dos resultados. Porém, durante o estudo piloto para as condições de irradiação com pulsos mais longos (30 e 50 μ s) a sobreposição de um número de pulsos menor já causava danos térmicos, do tipo fissuras na superfície e, por isso, o tempo de irradiação teve que ser reduzido nos grupos G30 μ e G50 μ .

Para as três condições de irradiação, em que também o número de pulsos sobrepostos foi ao redor de 2000, ou seja, em G5 μ , G10 μ e G20 μ , a inibição da desmineralização foi significativamente menor no grupo irradiado com pulsos de 20 μ s (G20 μ) do que nos demais. Isto indica, provavelmente, que o fator determinante do efeito tenha sido realmente a duração de pulso.

Fried e colaboradores (1999) mostraram que a densidade de energia necessária para promover a eliminação completa das bandas de carbonato da superfície do esmalte foi reduzida pela metade, quando a duração de pulso do *laser* de CO₂ ($\lambda=10,6 \mu$ m) foi reduzida de 100 para 2 μ s (FRIED et al., 1999). Em irradiações com o comprimento de 9,6 μ m, Gerard e colaboradores (2005) observaram uma redução de 15% na dissolução ácida do esmalte quando a duração de pulso foi reduzida de 20 para 5 μ s.

Embora com o comprimento de onda de 10,6 μ m a quantidade de carbonato presente no esmalte após a irradiação, com os parâmetros que têm mostrado uma

alta porcentagem de inibição de lesão, ainda não tenha sido medida, a eliminação do carbonato da estrutura tem sido diretamente relacionada com a redução da desmineralização do esmalte. Dessa forma, os resultados observados no Estudo 2 parecem primeiro confirmar que também para o comprimento de onda de 10,6 μm , uma redução da duração de pulso para poucos microssegundos aumenta a inibição da progressão de lesão; e segundo, que as observações com relação à perda de carbonato encontradas na literatura estão de acordo com as medidas diretas de inibição de cáries.

Além de ter resultado na maior inibição de cárie deste estudo, 80%, a análise morfológica das superfícies irradiadas com as condições utilizadas em G5 μ mostrou tanto em menor quanto em maior aumento estruturas semelhantes as observadas no esmalte natural não irradiado. A irradiação com pulsos de 5 μs de duração e 0,3 J/cm^2 também não causou fusão ou ablação da estrutura. Nas micrografias da secção longitudinal do centro da área irradiada também não é possível observar nenhum dano ou fissuras se estendendo para a subsuperfície.

○ fato de a redução observada no grupo G5 μ ter sido significativamente menor que o grupo GF2, também é bastante importante, pois o tratamento com FFA já demonstrou em diversos estudos a sua capacidade de reduzir a progressão de lesão. Neste estudo a aplicação de FFA durante 4 min. foi escolhida como controle positivo, porque a sua aplicação sobre o esmalte causou em estudo recente 60% de inibição da progressão da lesão após ciclagem de pH. Além disso, em estudos mais antigos, com aplicações variando de 1 a 5 minutos, inibições significativas da profundidade de lesão variando entre 37 e 55% já foram observadas (FEATHERSTONE et al., 1991; GARCIA-GODOY et al., 1995; TAKAGI;LIAO;CHOW, 2000; DELBEM;CURY, 2002; TAGLIAFERRO et al., 2007).

Ainda suportando essa escolha, para aplicação de gel de FFA uma maior absorção de flúor pelo esmalte e até uma profundidade maior são observadas quando comparadas a outros compostos de fluoretados para aplicação tópica (PAI et al., 2007).

A maneira como o gel de alta concentração de flúor reduz a desmineralização do esmalte dental, tem sido relacionada à formação de fluoreto de cálcio na superfície, que serve como um reservatório de flúor e também pela formação de depósitos minerais contendo flúor no interior do esmalte, que podem impedir parcialmente a difusão de íons ácido (MARGOLIS;MORENO, 1990; TAKAGI;LIAO;CHOW, 2000; OGAARD, 2001).

Pelos resultados do Estudo 2 é possível observar que a redução da largura da pulso dos 10 μ s utilizados no Estudo 1, para 5 μ s, causou um aumento de 28% na inibição da progressão de lesão e também não provocou danos térmicos na superfície, observáveis em MEV.

6.3 Influência do Número de Pulsos Sobrepostos – Análises de PL e MEV

No último estudo, finalmente todos os demais parâmetros de irradiação puderam ser fixados e somente o número de pulsos sobrepostos foi variado. Os três diferentes números de pulsos sobrepostos testados (452, 1130 e 2036) resultaram em profundidades de lesão estatisticamente menores do que no grupo controle, porém a redução foi significativamente maior no grupo com 2036 pulsos sobrepostos (G9s). Neste grupo a porcentagem de redução (inibição) da

progressão de lesão foi de 85% em D3 e 81% em geral. Os números de pulsos menores foram testados na tentativa de se reduzir o tempo de irradiação necessário clinicamente para se obter os mesmos efeitos. A irradiação com cinco segundos de irradiação (G5s) apesar de ter provocado reduções significativamente menores que com nove segundos (G9s), a redução provocada ainda foi significativamente menor que nos grupos controle, GC3, e tratado com flúor, GF3.

Esses resultados mostram que a irradiação por 9 segundos (2036 pulsos sobrepostos) causa uma inibição maior da progressão das lesões que todos os demais grupos. O tempo de irradiação está dentro de um limite razoável para a utilização clínica além de não causar danos térmicos, observáveis em MEV, na superfície. Apesar das limitações existentes em estudo *in vitro*, a observação deste efeito é bastante interessante, pois mostra a possibilidade de redução dos danos térmicos na superfície, sem que o efeito de aumento da resistência à desmineralização do esmalte seja perdido. O aumento da resistência do esmalte à desmineralização após da irradiação com a combinação de parâmetros testada neste estudo ainda não tinha sido estudado na literatura e os resultados foram bastante positivos. Portanto, a combinação de uma taxa de repetição alta (226 Hz) com baixa densidade de energia ($0,3 \text{ J/cm}^2$) e duração de pulso curta (5 μs) parece ser promissora e merece ser investigada sobre outros aspectos (alterações mecânicas da superfície e *in situ*) em estudos futuros.

Em irradiações com o comprimento de onda de $9,6 \mu\text{m}$, uma maior redução da solubilidade ácida do esmalte também é observada quando um maior número de pulsos é sobreposto. Com o aumento de 20 para 60 pulsos de 1 J/cm^2 sobrepostos, houve um aumento de 10 minutos no tempo em que o esmalte permaneceu com solubilidade reduzida e também um aumento na espessura da

camada de esmalte modificada de 2 μm (TANGE;FRIED;FEATHERSTONE, 2000; YOUNG;FRIED;FEATHERSTONE, 2000 ; SANTOS;FEATHERSTONE;FRIED, 2001; GERARD et al., 2005; RODRIGUES;NOBRE DOS SANTOS;FEATHERSTONE, 2006).

Dentro dos possíveis modelos para se simular cáries *in vitro*, o modelo de ciclagem de pH é o que apresenta resultados mais comparáveis ao possíveis resultados clínicos de terapias preventivas de cárie e por esse motivo foi o modelo utilizado neste estudo. Com esse modelo não apenas a desmineralização causada pelos ácidos provenientes da placa é simulada, mas também o processo de remineralização (FEATHERSTONE;MELLBERG, 1981). O modelo utilizado neste estudo é uma modificação do modelo inicialmente proposto por Ten Cate e Duijsters (1982). Neste modelo foram feitas adaptações para permitir que amostras de esmalte bovino, em vez de humano, fossem utilizadas e tanto o efeito inibidor de desmineralização quanto estimulador de remineralização de dentifrícios fluoretados pudessem ser testados (TEN CATE;DUIJSTERS, 1982; TEN CATE;EXTERKATE;BUIJS, 2006).

Os dentes bovinos têm sido utilizados em diversos estudos com simulação de cáries, *in vitro*. As vantagens observadas na utilização destes são a possibilidade de obtenção de maiores áreas planas de esmalte e a maior disponibilidade deles em relação aos dentes humanos. Além disso, estes dentes apresentam estrutura e propriedades ópticas bastante semelhantes aos seus similares humanos.(ARENDS;SCHUTHOF;JONGEBLOED, 1980; BORGGREVEN;VAN DIJK;DRIESSENS, 1980; SHELLIS, 1984; DUPLAIN;BOULAY;BELANGER, 1987; FRIED et al., 1997).

No entanto, apesar de o mecanismo de formação de cáries ser o mesmo, a taxa de progressão das desmineralizações é comprovadamente maior. O fator determinante, da maior velocidade de progressão das lesões em esmalte bovino, parece ser o maior volume de poros presentes na junção dos prismas. Isso porque, nestes dentes, o espaço interprismático (outra área sugerida como caminho para desmineralização) apresenta grande concentração de prismas e os cristais se mostram agrupados de forma tão densa quanto no corpo deles (SHELLIS, 1984).

Enfim, o modelo de simulação de cáries artificiais e o substrato utilizado (dentes bovinos), são reconhecidos na literatura como modelos eficientes para a observação dos efeitos de novas terapias preventivas de cáries *in vitro*. Portanto cumpriram a função desejada de permitir a avaliação do efeito preventivo da cárie de diversos parâmetros de irradiação por *laser* de CO₂. Por esse modelo *in vitro* foi possível eliminar uma variedade de parâmetros que não causaram bons resultados e que portanto não precisam ser estudados em modelos mais complexos, como os modelos *in situ* e *in vivo* (CURY et al., 2001; CURY et al., 2005).

Apesar de estudos *in vitro* serem ideais para avaliação de métodos preventivos de cárie, somente os estudos *in situ* e *in vivo*, são capazes de fornecer as evidências clínicas necessárias para comprovar a efetividade de uma terapia. Os estudos *in situ* são uma ponte entre a situação altamente controlada de um estudo *in vitro* e a situação clínica complexa, dos estudos *in vivo*, em que diversos fatores são difíceis de serem controlados (TEN CATE, 1994). Nos dois tipos de estudos, a formação de cáries acontece dentro do ambiente oral, acompanhada de toda a complexidade de eventos, e alterações da colonização bacteriana e da composição química salivar, que são apenas simuladas nos estudos *in vitro* (FEATHERSTONE;ZERO, 1992; ZERO, 1995). Portanto, apesar de uma redução

de 80% de inibição de cáries ter sido observada no presente estudo, os parâmetros que causaram esta redução ainda precisam ser testados em modelos *in situ*, antes que possam ser utilizados *in vivo*.

Porém antes que estes parâmetros sejam testados em estudos *in situ* e *in vivo*, também o aumento da temperatura pulpar sob essas condições de irradiação precisa ser testado. A baixa de densidade de energia ($0,3 \text{ J/cm}^2$) e a curta duração de pulso ($5 \mu\text{s}$) provavelmente contribuíram para um aumento de temperatura, mais restrito às camadas superficiais da estrutura. Porém a maneira como a sobreposição de um alto número de pulsos (2036) afetou a propagação do calor para o interior da estrutura ainda não é clara. Os estudos investigando o aumento de temperatura após a irradiação com *laser* de CO_2 emitindo em $10,6 \mu\text{m}$ ainda são poucos e muitos deles foram conduzidos com *lasers* operando no modo contínuo (MISERENDINO et al., 1989; POWELL;MORTON;LARSEN, 1989).

Dos estudos realizados com *laser* operando em modo pulsado, apesar de os parâmetros serem bastante diferentes dos que foram utilizados nestes trabalho, é possível se perceber que um maior número de pulsos sobrepostos parece contribuir para uma maior propagação de calor para o interior do tecido. Fried e colaboradores (1996) observaram para irradiações de 10 J/cm^2 (10 Hz e $100 \mu\text{s}$) uma diferença de $27,5^\circ\text{C}$ no aumento da temperatura 2 mm abaixo da superfície do esmalte, quando o número de pulsos sobrepostos foi aumentado de 5 para 100.

Porém a diminuição da densidade de energia, quando todas a demais condições de irradiação são mantidas, diminui o aumento da temperatura na polpa. Steiner-Oliveira e colaboradores (2006) observaram um aumento de temperatura pulpar baixo, variando entre $0,72$ e $2,54^\circ\text{C}$ para irradiações de $1,5$ a $11,5 \text{ J/cm}^2$ (50

Hz e 10 ms), sendo que as variações mais baixas foram observadas para as menores densidades de energia.

Como no presente estudo foram utilizados simultaneamente parâmetros que causam uma redução do aquecimento do tecido (baixas densidades de energia), redução da propagação do calor para o interior do tecido (baixa duração de pulso) e um aumento do aquecimento e da propagação do calor para o interior do tecido (alto número de pulsos) a confirmação dos resultados obtidos pelo método de elementos finitos, através de medidas com câmeras termográficas são necessárias antes de uma aplicação *in vivo*.

6.4 Influência da Duração de Pulso – Análises através de QLF

Adicionalmente às análises de profundidade de lesão, a perda mineral das amostras dos estudos 2 e 3 foi analisada através da técnica de QLF. Como o QLF ainda é uma metodologia relativamente recente, e as suas limitações ainda não são completamente conhecidas na literatura, esse método de análise não foi usado como método principal de verificação do efeito da irradiação por *laser* na inibição da progressão de cárie, mas apenas como método adicional para comprovação dos efeitos observados em microscopia de luz polarizada

Para o Estudo 1 esta técnica não foi utilizada, pois o equipamento ainda não estava disponível no instituto em que os experimentos foram conduzidos. Assim o primeiro estudo em que a desmineralização das amostras foi também medida através de QLF foi o Estudo 2.

A avaliação da perda mineral pela técnica de QLF resultou numa variabilidade muito grande das medidas nos grupos. Mesmo nos grupos controle negativo e positivo (tratamento com flúor), essa variabilidade foi alta indicando que ela não resulta somente das alterações das propriedades ópticas do esmalte e dentina após a irradiação com *laser*. Devido aos altos desvios em relação às médias, um menor número de diferenças significantes entres os grupos foi observado por esse método. A análise das médias de ΔQ e ΔF dos grupos G5 μ , G10 μ e G20 μ revelou não haver diferenças estatisticamente significantes entre eles. Porém em todos eles as médias de ΔQ e ΔF foram menores que no grupo controle, indicando uma menor desmineralização nos grupos tratados por *laser* nas condições que apresentavam as menores durações de pulso. Com relação à comparação com o grupo tratado com flúor, em nenhum dos grupos a perda mineral foi menor que em GF2.

Também é importante observar que nos grupos G30 μ e G50 μ a área de esmalte exposta para a formação de lesão era maior do que nos demais grupos. Nesses grupos a área de esmalte irradiada foi aumentada para que a densidade de energia pudesse ser a mesma que nos demais grupos. Por isso, para G30 μ e G50 μ a comparação com os demais só faz sentido para a medida de perda de fluorescência que não leva em consideração a área de lesão, que é o valor de ΔF . Para essa medida as médias de G30 μ e G50 μ não foram estatisticamente diferentes do grupo controle, porém foram estatisticamente maiores que o grupo tratado com flúor. Nos demais itens avaliados, ΔQ e área de lesão, esses grupos apresentaram como esperado as maiores médias.

O valor de ΔQ é calculado integrando-se o valor de ΔF (porcentagem de perda da radiância da fluorescência) sobre a área da lesão. Por esse motivo, para

uma mesma porcentagem de perda de fluorescência, ΔF , em lesões de área maior, o valor de ΔQ será sempre maior. Também por isso o valor de ΔQ é o valor de escolha para estudos *in vivo*, em que o acompanhamento longitudinal das lesões é desejado. Ou seja, medindo-se a mesma lesão em tempos diferentes, é possível observar por esse valor tanto mudanças na porcentagem de perda de fluorescência quanto no tamanho das lesões. Já pelo valor de ΔF as alterações de tamanho das lesões não podem ser observadas, pois ele representa apenas a média das diferenças de radiância em cada pixel da imagem, independentemente do número de *pixels* medidos (DE JOSSELIN DE JONG et al., 1995).

Com relação à área de lesão de subsuperfície formada, o grupo G5 μ apresentou médias estatisticamente menores que todos os demais grupos, excetuando-se o grupo tratado com flúor. Esses resultados foram diferentes da análise de profundidade de lesão, onde as médias deste grupo não foram significativamente menores que G10 μ , porém foram significativamente menores que todos os demais grupos, incluindo-se o grupo tratado com flúor, GF2.

Para as medidas de profundidade de lesão, o grupo G5 μ foi o grupo que apresentou as menores médias, porém para as medidas de QLF ele apresentou as menores médias somente para ΔQ e área de lesão. Para as medidas de ΔF , a média de G5 μ foi baixa, mas a menor média entre todos os grupos foi observada no grupo G10 μ .

Além disso, é interessante notar que, ao contrário do que foi observado nas medidas de profundidade de lesão, em nenhum grupo a perda mineral foi menor do que no grupo tratado com flúor tópico (GF2).

A grande variação observada nas medidas de perda de fluorescência se deve provavelmente às variações biológicas na estrutura do esmalte e dentina, que

alteram também suas propriedades ópticas (ROBINSON;WEATHERELL;HALLSWORTH, 1971; ROBINSON;WEATHERBELL;HALLSWORTH, 1972; SPITZER;TEN BOSCH, 1977). Em dentes com esmalte de cor mais clara, por exemplo, é sabido que o espalhamento da luz é maior, e portanto um menor contraste entre o tecido sadio e o cariado pode ser esperado (TEN BOSCH;COOPS, 1995). Também as amostras com espessura de esmalte diferente resultam em medidas de perda de fluorescência diferentes, devido a mudanças no caminho óptico dos fótons no interior do tecido. Quanto maior é a espessura do esmalte, menor é a fluorescência do esmalte sadio e das lesões de subsuperfície (VAN DER VEEN et al., 2002; AMAECHI et al., 2003; ANDO et al., 2003; ANDO et al., 2004a).

Além disso, a estrutura dental não é homogênea e existem diferenças na composição da estrutura dentro de um mesmo dente e de um dente para outro. A densidade dos cristais de hidroxiapatita e o conteúdo de flúor, por exemplo, decrescem da superfície externa do esmalte em direção à dentina. Concomitantemente também há um aumento da porosidade e do conteúdo de material orgânico nessa direção. O comportamento da estrutura diante dos desafios cariogênicos é determinado por essas diferenças de composição química nas camadas mais externas e internas do esmalte. Dessa forma, dentes diferentes apresentam uma composição diferente e por isso podem ser mais ou menos resistentes à desmineralização (ROBINSON;WEATHERBELL;HALLSWORTH, 1972; ROBINSON et al., 2000).

As condições em que as imagens de fluorescência são obtidas podem causar uma variação nos valores de medidos por QLF. A iluminação do ambiente com iluminância maior do que 88 lux, a obtenção de imagens em ângulos 20° maiores

ou menores do que 90° e a não-desidratação das amostras causam diminuição da intensidade da radiância da fluorescência e portanto podem causar diferenças nas medidas, caso essas condições não sejam padronizadas (PRETTY;EDGAR;HIGHAM, 2002a; PRETTY et al., 2003; PRETTY;EDGAR;HIGHAM, 2004a) .

Por esse motivo, no presente estudo todas as imagens foram obtidas em câmara escura, em completa ausência de luz, com a câmera posicionada em relação de 90° com a superfície e com as amostras padronizadamente desidratadas por 15 s utilizando-se jato de ar comprimido.

Além disso, as imagens e as mensurações de todos os grupos foram realizadas por um único operador cego quanto aos grupos em estudo e treinado para a realização das avaliações segundo os padrões sugeridos por Pretty e colaboradores (PRETTY et al., 2002). Essas medidas foram tomadas para se reduzir a probabilidade de viés (*bias*) do operador durante as avaliações e também garantir que as decisões subjetivas implícitas ao método fossem baseadas em padrões e regras objetivos (SPITZER;TEN BOSCH, 1977; TEN BOSCH;VAN DER MEI;BORSBOOM, 1984). Adicionalmente, atenção especial foi dispensada para que a distância entre a faixa de esmalte sadio e a borda da lesão fosse a mínima possível (HARA et al., 2003).

Um alto desvio-padrão nas medidas de ΔQ e ΔF também foi observado em outros estudos *in vitro* (AL-KHATEEB et al., 1997; PRETTY;EDGAR;HIGHAM, 2002a). Esse grande desvio nas medidas provavelmente se deve às diferenças biológicas existentes entre os dentes, tanto em termos de espessura de esmalte como também em termos de conteúdo mineral e, conseqüentemente, nas diferentes resistências à desmineralização apresentadas por eles (FRIED et al.,

1995). Observando-se o desvio-padrão dessas mesmas amostras, porém quanto às medidas de profundidade de lesão, é possível notar que, também para essas medidas, houve um alto desvio-padrão, indicando que essas variações na resistência à formação de lesão realmente aconteceram.

O teste do grau de correlação das medidas de profundidade de lesão com medidas de ΔQ e ΔF , revelou para ambos os casos uma correlação fraca ($r = 0,53$ e $r = 0,52$ respectivamente). A ausência de uma forte correlação entre as medidas indica, que o método de QLF não foi capaz de quantificar a severidade das lesões da mesma forma que os cortes histológicos e a posterior observação em microscópio de luz polarizada permitiram.

Porém os mesmos grupos que apresentaram as menores medidas de profundidade de lesão (G5 μ e G10 μ) apresentaram também para as medidas de ΔQ e ΔF as menores médias que foram também significativamente menores que o grupo controle. Portanto, apesar de a correlação entre as medidas feitas pelos 2 métodos ter sido fraca, as diferenças entre os grupos com extremos de comportamento foram mantidas. Esse comportamento indica que o método de QLF é sim capaz de identificar as lesões de esmalte de subsuperfície, mas a acurácia dos dados obtidos *in vitro* ainda precisa ser aprimorada através da identificação e do controle dos fatores influenciadores das medidas. Os dados atualmente disponíveis na literatura indicam que a utilização de amostras de espessura de esmalte semelhante, com a mesma área de esmalte exposta e obtidas de dentes da mesma idade e provenientes da mesma região, podem contribuir para a redução da variabilidade das medidas (PRETTY;EDGAR;HIGHAM, 2002b; ANDO et al., 2004a; MUJAT et al., 2004; PRETTY;EDGAR;HIGHAM, 2004a)

6.5 Influência do Número de Pulsos Sobrepostos – Análises através de QLF

A análise das medidas feitas através do método de QLF primeiro, antes e após a irradiação por *laser*, mostrou comportamento diferente dos grupos para as diferentes medidas (ΔF , ΔQ e área de lesão). Com relação às medidas de ΔF , poucas mudanças nas médias antes e depois foram observadas e em nenhum grupo ela foi estatisticamente significativa. Já as medidas de ΔQ e área de lesão apresentaram um comportamento diferente. Para esse parâmetro houve uma diminuição das médias após a irradiação nos grupos G2s e G5s e um aumento das médias no segundo momento de mensuração nos grupos G9s, GC3 e GF3. Provavelmente essas alterações se originam das alterações observadas na área de lesão como pode ser observado na Figura 5.22. A origem dessa alteração da área de lesão é diferente para os diferentes grupos. Nos grupos controle e tratado com flúor, em que as amostras permaneceram apenas armazenadas em água destilada (pH= 7,0) entre um momento e outro, ela só pode ser explicada por uma possível ocorrência de desmineralização na solução de armazenamento, ou pela imprecisão ou sensibilidade do equipamento de medida (QLF). Porém, visto que as amostras foram armazenadas em água destilada e que o pH desta era neutro, é mais provável que o aumento da fluorescência se origine da repetibilidade moderada do método de QLF, em experimentos *in vitro*, o que contradiz observações *in vivo* (TRANAEUS et al., 2002). Para os grupos tratados com *laser*, dois comportamentos precisam ser diferenciados. Nos dois primeiros (G2s e G5s), as mudanças não foram significantes e no G9s ela foi para a medida de área de lesão.

Esse aumento significativo da área de lesão provavelmente se deve às ligeiras alterações de cor provocadas no tecido (superfície ligeiramente mais amarelada) que pode ter alterado as suas propriedades ópticas e portanto também a fluorescência.

A alteração das medidas de fluorescência obtidas por QLF pode ser observada para lesões que apresentam descoloração. Apesar de esse efeito ter sido demonstrado apenas através da excitação por fonte de luz *laser*, o comprimento de onda do *laser* de diodo utilizado ($\lambda = 405 \text{ nm}$) é bastante próximo do comprimento utilizado no aparelho de QLF. De um modo geral, os estudos com *laser* de diodo mostram que as lesões de cor marrom resultam em uma acentuação do efeito da presença de lesão na fluorescência. Ou seja, se para a banda de emissão registrada, a fluorescência for menor na área de lesão de cárie do que no tecido sadio, ela será ainda menor se a lesão for de cor marrom, que é o caso observado para a banda de emissão ao redor de 500 nm. Para a emissão nas bandas de 455, 582 e 622 nm em que a fluorescência é maior nas lesões do que no tecido sadio, esse aumento da fluorescência é ainda mais acentuado nas lesões marrons (RIBEIRO et al., 2005; ZECELL et al., 2007). Portanto no grupo G9s a superfície ligeiramente mais amarelada após irradiação pode ter aumentado a área que apresentou a fluorescência alterada. Sendo assim, tanto as médias de ΔQ como de área apresentaram-se aumentadas.

Este comportamento apresentado pelo grupo G9s poderia ter causado uma influência negativa nas medidas após a indução de cárie artificial, pois para esse grupo o valor inicial de ΔQ já era mais alto que nas demais amostras. Porém isso não foi observado, pelo contrário, após a ciclagem de pH esse grupo apresentou para todos os itens de fluorescência medidos (ΔF , ΔQ e área de lesão) médias

estatisticamente mais baixas que os demais grupos. Portanto, parece claro que as alterações que provocaram as mudanças das propriedades ópticas do esmalte também o tornaram mais resistente à desmineralização. Além disso, alterações de fluorescência do esmalte devido à irradiação com os parâmetros utilizados em G9s não foram tão severas quanto a provocada pela desmineralização através do modelo de ciclagem de pH utilizado. Em outros modelos em que a desmineralização seja menor do que nesse, é possível que a alteração da fluorescência devido à irradiação possa ser da mesma ordem do que a redução da fluorescência provocada pelo processo cariioso. Dessa forma, parece prudente que, em novos estudos utilizando QLF para medir a desmineralização de amostras irradiadas por laser, tanto medidas iniciais após irradiação quanto medidas após a ciclagem sejam realizadas.

Nesse estudo investigando a influência do número de pulsos sobrepostos na progressão das lesões de cárie, todos os grupos tinham a mesma área de esmalte exposta, portanto um comportamento um pouco mais semelhante dos grupos com relação às medidas de profundidade de lesão foi observado.

Sendo assim, também para as medidas feitas por QLF (ΔF e ΔQ), o grupo G9s apresentou médias estatisticamente menores tanto para o grupo controle negativo não tratado, quanto para o grupo tratado com gel de flúor (FFA 1,23%). Além disso, os grupos apresentaram de maneira geral um comportamento semelhante ao observado para as medidas de profundidades de lesão. Porém as diferenças entre os grupos que foram estatisticamente significantes foram diferentes e, mais uma vez, o fator determinante para isso parece ter sido o alto

desvio-padrão apresentado pelas medidas, como mencionado acima nessa discussão.

Considerando-se que as medidas foram feitas de maneira padronizada e seguindo-se as recomendações atualmente existentes na literatura, é provável que essa variabilidade dos dados resulte mesmo da variabilidade biológica das amostras e que especialmente, a espessura de esmalte diferente das amostras tenha contribuído para a variação das medidas.

A influência da espessura de esmalte nas medidas de perda de fluorescência tem sido descrita na literatura. Alguns estudos mostram que quanto maior a espessura do esmalte, menor é o valor de ΔF (VAN DER VEEN et al., 2002; ANDO et al., 2003). No presente estudo a espessura de esmalte nos cubos obtidos de dentes bovinos não foi controlada e portanto provavelmente influenciou a variabilidade das medidas.

O controle da espessura de esmalte em cubos de esmalte não é tão simples devido à curvatura inerente da estrutura. Dessa forma, em amostras de 4x4 mm como as utilizadas nesse estudo, uma menor espessura no centro do bloco do que nas extremidades distal e mesial é impossível de ser evitada. Sendo assim, novos estudos devem ser realizados com amostras pequenas o suficiente para garantir uma mesma espessura de esmalte dentro de uma mesma amostra, e também com um número maior de amostras, que permita o descarte das que, após corte no centro da lesão, apresentem espessura diferente das demais amostras.

Figura 6.1- Fatia de esmalte bovino em que é possível observar o esmalte (E), dentina (D) e a diferença da espessura do esmalte no centro e nas extremidades (setas), devido à curvatura apresentada pelos dentes.

O teste de Correlação de Pearson das medidas de ΔF e ΔQ com as medidas de profundidade de lesão revelou haver uma correlação fraca de cada uma delas com a profundidade de lesão ($r=0,53$ e $r=0,51$, respectivamente). Esses resultados contradizem os reportados por Hafström-Björkman e colaboradores (1992) que observaram um alto grau de correlação ($r=0,97$). Porém, esses autores fizeram a correlação das medidas ΔF e perda mineral (medida em microrradiografia longitudinal) para cada amostra separadamente. Quando um grupo de amostras foi considerado de forma conjunta e não individualmente, Emami e colaboradores (1996) encontraram uma correlação um pouco mais fraca ($r=0,73$), também correlacionando com a microrradiografia longitudinal.

Por outro lado, os resultados do presente estudo se aproximam dos apresentados por Al-Kahateeb et al. (1997), que em medidas feitas com esmalte bovino encontraram uma correlação moderada ($r=0,64$), correlacionando ΔF com a perda mineral medida em microradioradiografia transversal. Além disso, também se aproximam dos resultados apresentados por Ando e colaboradores (1997) que

observaram para a correlação entre ΔF e medidas de profundidade de lesão feitas através de microrradiografia transversal uma correlação moderada ($r=0,51$).

Essa diferença entre as medidas de PL e perda mineral em relação às medidas de ΔF também podem ser causadas porque os valores medidos tanto em PL como em microrradiografia transversal refletem a profundidade de lesão e a perda mineral numa fatia de apenas 100 μm , enquanto as medidas de ΔF refletem uma média da perda mineral em toda área da lesão. Portanto os outros métodos são representativos de apenas uma fina região dentro de toda a área experimental enquanto ΔF é a média de toda a área da lesão.

De qualquer maneira, mesmo que tenha havido uma correlação baixa entre as medidas de PL e ΔF , as principais diferenças de desmineralização entre os grupos foram observadas pelos dois métodos. Em ambos, o grupo com o maior número de pulsos sobrepostos (2036) e maior tempo de irradiação (9s) resultou numa inibição significativa da progressão da lesão de cárie. O método de QLF ainda apresenta a fragilidade de resultar em medidas com alto grau de variabilidade, mas é possível que o controle cada vez mais severo das condições experimentais possa, diminuir a diferença entre as medidas de um mesmo grupo. O método é de fato bastante promissor pela facilidade e rapidez com que as análises podem ser realizadas, diminuindo custos com materiais e tempo, porém novos estudos precisam ser conduzidos para que uma acurácia maior das medidas possa ser obtida.

7. CONCLUSÕES

Sob as condições desse estudo *in vitro* é possível concluir que a irradiação do esmalte dental por *laser* de CO₂ ($\lambda = 10,6 \mu\text{m}$) é capaz de inibir a progressão de lesões de cárie de esmalte. Com relação aos parâmetros *laser* testados pode-se concluir que:

1. Entre as densidades de energia testadas a irradiação com $0,3 \text{ J/cm}^2$ foi a que resultou na maior inibição significativa da progressão da lesão de cárie.
2. Entre as durações de pulso testadas, com essa densidade de energia ($0,3 \text{ J/cm}^2$), a irradiação com pulsos de duração mais curta, $5 \mu\text{s}$, resultou na maior inibição significativa da progressão da lesão de cárie. .
3. Entre os diferentes números de pulsos sobrepostos testados, para a combinação da densidade de energia e da duração de pulso que apresentaram os melhores resultados ($0,3 \text{ J/cm}^2$ e $5 \mu\text{s}$), a irradiação com 2036 pulsos sobrepostos foi a que resultou no maior aumento significativo da resistência do esmalte à desmineralização, tanto em relação ao grupo controle, não tratado, quanto ao grupo tratado com gel de flúor fosfato acidulado (1,23%).

O parâmetro de irradiação obtido ao final do estudo ($0,3 \text{ J/cm}^2$, $5 \mu\text{s}$, 226Hz e 2036 pulsos sobrepostos) foi capaz de reduzir, *in vitro*, a progressão da cárie em 81% sem causar danos térmicos, visíveis em MEV, na superfície e na subsuperfície.

As análises através do método de QLF também revelaram que a irradiação com 0.3 J/cm^2 , $5 \mu\text{s}$, 226Hz e 2036 pulsos sobrepostos resultou na maior inibição da progressão de cárie.

APÊNDICE A- Tabelas com os valores de p, para as comparações entre as médias de profundidade de lesão obtidas nas distâncias D1, D2 e D3, para cada um dos grupos estudados no Estudo 1.

Grupo 1

	D1	D2	D3
D1		<0,0001 *	<0,0001 *
D2	<0,0001 *		0,0007 *
D3	<0,0001 *	0,0007 *	

Grupo 2

	D1	D2	D3
D1		0,0125 *	<0,0001 *
D2	0,0125 *		0,3313
D3	0,0006 *	0,3313	

Grupo 3

	D1	D2	D3
D1		0,0713	0,0023*
D2	0,0713		0,1978
D3	0,0023*	0,1978	

Grupo 4

	D1	D2	D3
D1		0,0268*	0,0001*
D2	0,0268*		0,0805
D3	0,0001*	0,0805	

Grupo 5			
	D1	D2	D3
D1		0,0014*	<0,0001*
D2	0,0014*		0,0123*
D3	<0,0001*	0,0123*	

Grupo 6			
	D1	D2	D3
D1		0,9130	0,7510
D2	0,9130		0,6698
D3	0,7510	0,6698	

REFERÊNCIAS¹

al-Khateeb S, ten Cate JM, Angmar-Mansson B, de Josselin de Jong E, Sundstrom G, Exterkate RA, *et al.* Quantification of formation and remineralization of artificial enamel lesions with a new portable fluorescence device. *Adv Dent Res* 1997; 11(4):502-6.

Alfano RR , Yao SS. Human teeth with and without dental caries studied by visible luminescent spectroscopy. *J Dent Res* 1981; 60(2):120-2.

Aljehani A, Tranaeus S, Forsberg CM, Angmar-Mansson B , Shi XQ. In vitro quantification of white spot enamel lesions adjacent to fixed orthodontic appliances using quantitative light-induced fluorescence and DIAGNOdent. *Acta Odontol Scand* 2004; 62(6):313-8.

Amaechi BT, Podoleanu A, Higham SM , Jackson DA. Correlation of quantitative light-induced fluorescence and optical coherence tomography applied for detection and quantification of early dental caries. *J Biomed Opt* 2003; 8(4):642-7.

Ana PA, Bachmann L , Zezell DM. Laser effects on enamel for caries prevention. *Laser Phys* 2007; 16(5):865-75.

Ana PA, Blay A, Miyakawa W , Zezell DM. Thermal analysis of teeth irradiated with Er,Cr:YSGG at low fluences. *Laser Phys Lett* 2007; 4(11):827-34.

Ando M, Eckert GJ, Stookey GK , Zero DT. Effect of imaging geometry on evaluating natural white-spot lesions using quantitative light-induced fluorescence. *Caries Res* 2004a; 38(1):39-44.

Ando M, Gonzalez-Cabezas C, Isaacs RL, Eckert GJ , Stookey GK. Evaluation of several techniques for the detection of secondary caries adjacent to amalgam restorations. *Caries Res* 2004b; 38(4):350-6.

Ando M, Hall AF, Eckert GJ, Schemehorn BR, Analoui M , Stookey GK. Relative ability of laser fluorescence techniques to quantitate early mineral loss in vitro. *Caries Res* 1997; 31(2):125-31.

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

Ando M, Schemehorn BR, Eckert GJ, Zero DT , Stookey GK. Influence of enamel thickness on quantification of mineral loss in enamel using laser-induced fluorescence. *Caries Res* 2003; 37(1):24-8.

Angmar B, Carlstrom D , Glas JE. Studies on the ultrastructure of dental enamel. IV. The mineralization of normal human enamel. *J Ultrastruct Res* 1963; 8:12-23.

Aoba T. Solubility properties of human tooth mineral and pathogenesis of dental caries. *Oral Dis* 2004; 10(5):249-57.

Apel C, Franzen R, Meister J, Sarrafzadegan H, Thelen S , Gutknecht N. Influence of the pulse duration of an Er:YAG laser system on the ablation threshold of dental enamel. *Lasers Med Sci* 2002; 17(4):253-7.

Apel C, Meister J, Gotz H, Duschner H , Gutknecht N. Structural changes in human dental enamel after subablative erbium laser irradiation and its potential use for caries prevention. *Caries Res* 2005; 39(1):65-70.

Arends J, Schuthof J , Jongebloed WG. Lesion depth and microhardness indentations on artificial white spot lesions. *Caries Res* 1980; 14(4):190-5.

Arends J , ten Bosch JJ. Demineralization and remineralization evaluation techniques. *J Dent Res* 1992; 71 (nº spec):924-8.

Ausiello P, Apicella A, Davidson CL , Rengo S. 3D-finite element analyses of cusp movements in a human upper premolar, restored with adhesive resin-based composites. *J Biomech* 2001; 34(10):1269-77.

Bachmann L, Baffa O, Gomes ASL , Zezell DM. Chemical origin of the native ESR signals in thermally treated enamel and dentin. *Physica B* 2004; 349(1-4):119-23.

Bachmann L , Zezell DM. Estrutura e composição do esmalte e da dentina - tratamento térmico e irradiação Laser. ed. São Paulo: Editora Livraria da Física; 2005.

Bachmann L, Zezell DM , Maldonado EP. Determination of beam width and quality for pulsed lasers using the knife-edge method. *Instrum Sci Technol* 2003; 31(1):47-52.

Benedict HC. A Note On The Fluorescence Of Teeth In Ultra-Violet Rays. *Science* 1928; 67(1739):442.

Bjelkhagen H , Sundström F. A clinically applicable laser luminescence method for the early detection of dental caries. *IEEE J Quant Elect* 1981; 17(12):2580-2.

Borggreven JM, van Dijk JW , Driessens FC. Effect of laser irradiation on the permeability of bovine dental enamel. *Arch Oral Biol* 1980; 25(11-12):831-2.

Buchalla W. Comparative fluorescence spectroscopy shows differences in noncavitated enamel lesions. *Caries Res* 2005; 39(2):150-6.

Caufield PW. Dental caries: an infectious and transmissible disease where have we been and where are we going? *N Y State Dent J* 2005; 71(2):23-7.

Cury JA, Hashizume LN, Del Bel Cury AA , Tabchoury CP. Effect of dentifrice containing fluoride and/or baking soda on enamel demineralization/remineralization: an in situ study. *Caries Res* 2001; 35(2):106-10.

Cury JA, Simoes GS, Del Bel Cury AA, Goncalves NC , Tabchoury CP. Effect of a calcium carbonate-based dentifrice on in situ enamel remineralization. *Caries Res* 2005; 39(3):255-7.

Darling AI. Studies of the early lesion of enamel caries with transmitted light, polarised light and radiography. *Br Dent J* 1956; 101:289-329.

de Josselin de Jong E, Sundstrom F, Westerling H, Tranaeus S, ten Bosch JJ , Angmar-Mansson B. A new method for in vivo quantification of changes in initial enamel caries with laser fluorescence. *Caries Res* 1995; 29(1):2-7.

Dela Rosa A, Sarma AV, Le CQ, Jones RS , Fried D. Peripheral thermal and mechanical damage to dentin with microsecond and sub-microsecond 9.6 microm, 2.79 microm, and 0.355 microm laser pulses. *Lasers Surg Med* 2004; 35(3):214-28.

Delbem AC, Carvalho LP, Morihisa RK , Cury JA. Effect of rinsing with water immediately after APF gel application on enamel demineralization in situ. *Caries Res* 2005; 39(3):258-60.

Delbem AC , Cury JA. Effect of application time of APF and NaF gels on microhardness and fluoride uptake of in vitro enamel caries. *Am J Dent* 2002; 15(3):169-72.

Dibdin GH. The water in human dental enamel and its diffusional exchange measured by clearance of tritiated water from enamel slabs of varying thickness. *Caries Res* 1993; 27(2):81-6.

Duplain G, Boulay R , Belanger PA. Complex index of refraction of dental enamel at CO₂ wavelengths. *Appl Opt* 1987; 26:4447-51.

Eduardo CP, Gouw-Soares S , Haypek P. Utilização clínica dos lasers. In: ed. São Paulo: Artes Médicas; 2002. cap. p. 441-61.

Ellies LG, Nelson DGA , Featherstone JDG. Crystallographic structure and surface morphology of sintered carbonate apatites. *J Biomed Mater Res* 1988; 22(541-53).

Emami Z, al-Khateeb S, de Josselin de Jong E, Sundstrom F, Trollsas K , Angmar-Mansson B. Mineral loss in incipient caries lesions quantified with laser fluorescence and longitudinal microradiography. A methodologic study. *Acta Odontol Scand* 1996; 54(1):8-13.

Evans JR, Robertson WG, Morgan DB , Fleisch H. Effects of pyrophosphate and diphosphonates on the dissolution of hydroxyapatites using a flow system. *Calcif Tissue Int* 1980; 31:153-9.

Featherstone JD, Fried D , Duhn CW Surface dissolution kinetics of dental hard tissue irradiated over a fluence range of 1-8 J/cm² In: *Lasers in Dentistry IV. Proceedings of the SPIE Meeting.*; 1998; San Jose. Washington: Bellingham; 1998. p. 146-51.

Featherstone JD , Mellberg JR. Relative rates of progress of artificial carious lesions in bovine, ovine and human enamel. *Caries Res* 1981; 15(1):109-14.

Featherstone JD , Zero DT. An in situ model for simultaneous assessment of inhibition of demineralization and enhancement of remineralization. *J Dent Res* 1992; 71 (n° spec):804-10.

Featherstone JDB , Apel C. Application of laser light for caries prevention. In: Gutknecht N. *Proceedings of the 1st International Workshop of Evidence Based Dentistry on Lasers in Dentistry.* ed. Berlin: Quintessence; 2007. cap. 3, p. 41-66.

Featherstone JDB, Barreett-Vespone NA, Fried D, Kantorowitz Z, Lofthouse J , Seka W Rational choice of laser conditions for inhibition of caries progression In: *Lasers in Dentistry. Proceedings of the SPIE Meeting.*; 1995; San Jose. Washington: Bellingham; 1995. p. 57-67.

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

Featherstone JDB, Le CQ , Fried D Increasing pulse number during CO₂ laser irradiation of dental enamel extends acid dissolution time In: Lasers in Dentistry XI. Proceedings of the SPIE Meeting.; 2005; San Jose. Washington: Bellingham; 2005. p. 59-62.

Featherstone JDB, Tencate 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, Zhang SH, Shariati M , McComark SM Carbon dioxide laser effects on caries-like lesions of dental enamel In: Proceedings of the SPIE Meeting; 1991; San Jose. Washington: Bellingham; 1991. p. 145-9.

Fitzgerald RJ, Jordan HV , Archard HO. Dental caries in gnotobiotic rats infected with a variety of Lactobacillus acidophilus. Arch Oral Biol 1966; 11(5):473-6.

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.

Fox JL, Yu D, Otsuka M, Higuchi WI, Wong J , Powell G. Combined effects of laser irradiation and chemical inhibitors on the dissolution of dental enamel. Caries Res 1992a; 26(5):333-9.

Fox JL, Yu D, Otsuka M, Higuchi WI, Wong J , Powell GL. Initial dissolution rate studies on dental enamel after CO₂ laser irradiation. J Dent Res 1992b; 71(7):1389-98.

Fried D, Glana RE, Featherstone JDB , Seka W. Nature of Light-Scattering in Dental Enamel and Dentin at Visible and near-Infrared Wavelengths. Appl Optics 1995; 34(7):1278-85.

Fried D, Glana RE, Featherstone JDB , Seka W. Permanent and transient changes in the reflectance of CO₂ laser-irradiated dental hard tissues at $\lambda=9.3, 9.6, 10.3,$ and $10.6 \mu m$ and at fluences of 1-20 J/cm². Lasers Surg Med 1997; 20(1):22-31.

Fried D, Murray MW, Featherstone JDB, Akrivou M, Dickenson KM, Duhn C, *et al.* Dental hard tissue modification and removal using sealed TEA lasers operating at $\lambda=9.6 \mu m$ and $10.6 \mu m$. In: Lasers in Dentistry V. Proceedings of the SPIE Meeting.; 1999; San Jose. Washington: Bellingham; 1999. p. 196-203.

Fried D, Ragadio J , Champion A. Residual heat deposition in dental enamel during IR laser ablation at 2.79, 2.94, 9.6, and 10.6 microm. *Lasers Surg Med* 2001; 29(3):221-9.

Fried D, Seka W, Glana RE , Featherstone JDB. Thermal response of hard dental tissues to 9- through 11- μ m CO₂-laser irradiation. *Opt Eng* 1996; 35(7):1976-84.

Fried D, Zuerlein M, Featherstone JDB, Seka W, Duhn C , McCormack SM. IR laser ablation of dental enamel: mechanistic dependence on the primary absorber. *Appl Surf Sci* 1998; 129:852-6.

Garcia-Godoy F, Hicks MJ, Flaitz CM , Berg JH. Acidulated phosphate fluoride treatment and formation of caries-like lesions in enamel: effect of application time. *J Clin Pediatr Dent* 1995; 19(2):105-10.

Gerard DE, Fried D, Featherstone JD , Nancollas GH. Influence of laser irradiation on the constant composition kinetics of enamel dissolution. *Caries Res* 2005; 39(5):387-92.

Gonzalez-Cabezas C, Fontana M, Gomes-Moosbauer D , Stookey GK. Early detection of secondary caries using quantitative, light-induced fluorescence. *Oper Dent* 2003; 28(4):415-22.

Goodis HE, Fried D, Gansky S, Rechmann P , Featherstone JDB. Pulpal safety of 9.6 μ m TEA CO₂ laser used for caries prevention. *Laser Surg Med* 2004; 35(2):104-10.

Hafstrom-Bjorkman U, Sundstrom F, de Josselin de Jong E, Oliveby A , Angmar-Mansson B. Comparison of laser fluorescence and longitudinal microradiography for quantitative assessment of in vitro enamel caries. *Caries Res* 1992; 26(4):241-7.

Hara AT, Queiroz CS, Freitas PM, Giannini M, Serra MC , Cury JA. Fluoride release and secondary caries inhibition by adhesive systems on root dentine. *Eur J Oral Sci* 2005; 113(3):245-50.

Hara AT, Queiroz CS, Paes Leme AF, Serra MC , Cury JA. Caries progression and inhibition in human and bovine root dentine in situ. *Caries Res* 2003; 37(5):339-44.

Hicks J, Garcia-Godoy F , Flaitz C. Biological factors in dental caries enamel structure and the caries process in the dynamic process of demineralization and remineralization (part 2). *J Clin Pediatr Dent* 2004; 28(2):119-24.

Hicks MJ , Silverstone LM. Acid-etching of caries-like lesions of enamel: a polarized light microscopic study. *Caries Res* 1984; 18(4):315-26.

Higham SM, Pretty IA, Edgar WM , Smith PW. The use of in situ models and QLF for the study of coronal caries. *J Dent* 2005; 33(3):235-41.

Holcomb DW , Young RA. Thermal decomposition of human tooth enamel. *Calcif Tissue Int* 1980; 31(3):189-201.

Holmen L, Thylstrup A, Ogaard B , Kragh F. A polarized light microscopic study of progressive stages of enamel caries in vivo. *Caries Res* 1985; 19(4):348-54.

Hossain M, Nakamura Y, Kimura Y, Ito M, Yamada Y , Matsumoto K. Acquired acid resistance of dental hard tissues by CO2 laser irradiation. *J Clin Laser Med Surg* 1999; 17(5):223-6.

Hossain MM, Hossain M, Kimura Y, Kinoshita J, Yamada Y , Matsumoto K. Acquired acid resistance of enamel and dentin by CO2 laser irradiation with sodium fluoride solution. *J Clin Laser Med Surg* 2002; 20(2):77-82.

Hsu CY, Jordan TH, Dederich DN , Wefel JS. Effects of low-energy CO2 laser irradiation and the organic matrix on inhibition of enamel demineralization. *JDent Res* 2000; 79(9):1725-30.

Hsu CY, Jordan TH, Dederich DN , Wefel JS. Laser-matrix-fluoride effects on enamel demineralization. *J Dent Res* 2001; 80(9):1797-801.

Hsu J, Fox JL, Higuchi WI, Otsuka M, Yu D , Powell GL. Heat-treatment-induced reduction in the apparent solubility of human dental enamel. *J Dent Res* 1994; 73(12):1848-53.

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.

Kidd EA , Fejerskov O. What constitutes dental caries? Histopathology of carious enamel and dentin related to the action of cariogenic biofilms. *J Dent Res* 2004; 83 (n° spec):C35-8.

Klein AL, Rodrigues LK, 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(3):239-44.

König K, Schneckenburger H, Hibst R. Time-gated in vivo autofluorescence imaging of dental caries. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 1999; 45(2):233-9.

Kühnisch J, Ifland S, Tranaeus S, Hickel R, Stosser L, Heinrich-Weltzien R. In vivo detection of non-cavitated caries lesions on occlusal surfaces by visual inspection and quantitative light-induced fluorescence. *Acta Odontol Scand* 2007; 65(3):183-8.

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.

Landis WJ, Navarro M, Neuringer JR, Kurz K. Single bovine enamel particles examined by electron optics. *J Dent Res* 1984; 63(5):629-34.

Larsen MJ, Fejerskov O. Chemical and structural challenges in remineralization of dental enamel lesions. *Scand J Dent Res* 1989; 97(4):285-96.

LeGeros RZ. Chemical and crystallographic events in the caries process. *J Dent Res* 1990; 69 (n° spec):567-74; discussion 634-6.

LeGeros RZ. Calcium phosphates in oral biology and medicine. *Monogr Oral Sci* 1991; 15:201.

Lenz P, Gilde H, Walz R. [Enamel sealing studies with the CO₂ laser]. *Dtsch Zahnärztl Z* 1982; 37(6):469-78.

Liu Y, Hsu CY. Laser-induced compositional changes on enamel: a FT-Raman study. *J Dent* 2007; 35(3):226-30.

Lussi A, Hack A, Hug I, Heckenberger H, Megert B, Stich H. Detection of approximal caries with a new laser fluorescence device. *Caries Res* 2006; 40(2):97-103.

Lussi A, Hibst R, Paulus R. DIAGNOdent: an optical method for caries detection. *J Dent Res* 2004; 83 (n° spec):C80-3.

Margolis HC, Moreno EC. Physicochemical perspectives on the cariostatic mechanisms of systemic and topical fluorides. *J Dent Res* 1990; 69 (n° spec):606-13.

Maung NL, Wohland T, Hsu CY. Enamel diffusion modulated by Er:YAG laser (Part 1)--FRAP. *J Dent* 2007a; 35(10):787-93.

Maung NL, Wohland T , Hsu CY. Enamel diffusion modulated by Er:YAG laser (Part 2). Organic matrix. J Dent 2007b; 35(10):794-9.

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

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

Meister J. Basic research. In: Gutknecht N. Proceedings of the 1st International Workshop of Evidence Based Dentistry on Lasers in Dentistry. ed. Berlin: Quintessence; 2007. cap. 1, p. 3-27.

Mendes FM, Nicolau J , Duarte DA. Evaluation of the effectiveness of laser fluorescence in monitoring in vitro remineralization of incipient caries lesions in primary teeth. Caries Res 2003; 37(6):442-4.

Miserendino LJ, Neiburger EJ, Walia H, Luebke N , Brantley W. Thermal effects of continuous wave CO₂ laser exposure on human teeth: an in vitro study. J Endod 1989; 15(7):302-5.

Mujat C, van der Veen MH, Ruben JL, Dogariu A , ten Bosch JJ. The influence of drying on quantitative laser fluorescence and optical pathlengths in incipient natural caries lesions. Caries Res 2004; 38(5):484-92.

Mujat C, van der Veen MH, Ruben JL, ten Bosch JJ , Dogariu A. Optical path-length spectroscopy of incipient caries lesions in relation to quantitative light-induced fluorescence and lesion characteristics. Appl Opt 2003; 42(16):2979-86.

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

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

Niemz MH. Laser-tissue interactions: fundamentals and applications. first ed. ed. Berlin: Springer-Verlag; 1996.

Ogaard B. CaF₂ formation: cariostatic properties and factors of enhancing the effect. Caries Res 2001; 35 (Suppl 1):40-4.

Pai N, McIntyre J, Tadic N , Laparidis C. Comparative uptake of fluoride ion into enamel from various topical fluorides in vitro. Aust Dent J 2007; 52(1):41-6.

Powell GL, Morton TH , Larsen AE. Pulpal response to irradiation of enamel with continuous wave CO₂ laser. J Endod 1989; 15(12):581-3.

Pretty IA, Edgar WM , Higham SM. Detection of in vitro demineralization of primary teeth using quantitative light-induced fluorescence (QLF). Int J Paediatr Dent 2002a; 12(3):158-67.

Pretty IA, Edgar WM , Higham SM. The effect of ambient light on QLF analyses. J Oral Rehabil 2002b; 29(4):369-73.

Pretty IA, Edgar WM , Higham SM. The effect of dehydration on quantitative light-induced fluorescence analysis of early enamel demineralization. J Oral Rehabil 2004a; 31(2):179-84.

Pretty IA, Edgar WM , Higham SM. The validation of quantitative light-induced fluorescence to quantify acid erosion of human enamel. Arch Oral Biol 2004b; 49(4):285-94.

Pretty IA , Ellwood RP. Comparison of paired visual assessment and software analyses of changes in caries status over 6 months from fluorescence images. Caries Res 2007; 41(2):115-20.

Pretty IA, Hall AF, Smith PW, Edgar WM , Higham SM. The intra- and inter-examiner reliability of quantitative light-induced fluorescence (QLF) analyses. Br Dent J 2002; 193(2):105-9.

Pretty IA, Smith PW, Edgar WM , Higham SM. Detection of in vitro demineralization adjacent to restorations using quantitative light induced fluorescence (QLF). Dent Mater 2003; 19(5):368-74.

Queiroz CS. Modelos de estudos *in vitro* para avaliar o efeito do fluoreto na desmineralização e remineralização do esmalte e dentina. [Tese de Doutorado]. Piracicaba: Faculdade de Odontologia da UNICAMP; 2004.

Ribeiro A, Rousseau C, Girkin J, Hall A, Strang R, John Whitters C, *et al.* A preliminary investigation of a spectroscopic technique for the diagnosis of natural caries lesions. *J Dent* 2005; 33(1):73-8.

Ripa LW. An evaluation of the use of professional (operator-applied) topical fluorides. *J Dent Res* 1990; 69 (n° spec):786-96.

Robinson C, Shore RC, Brookes SJ, Strafford S, Wood SR, Kirkham J. The chemistry of enamel caries. *Crit Rev Oral Biol Med* 2000; 11(4):481-95.

Robinson C, Weatherbell JA, Hallsworth AS. The effect of variations in enamel composition on the progress of carious attack. *Caries Res* 1972; 6(1):84.

Robinson C, Weatherell JA, Hallsworth AS. Variation in composition of dental enamel within thin ground tooth sections. *Caries Res* 1971; 5(1):44-57.

Rodrigues LK, Nobre Dos Santos M, Featherstone JD. In situ mineral loss inhibition by CO₂ laser and fluoride. *J Dent Res* 2006; 85(7):617-21.

Sagi A, Avidorzehavi A, Shitzer A, Gerstmann M, Akselrod S, Katzir A. Heating of Biological Tissue by Laser Irradiation - Temperature Distribution during Laser Ablation. *Optical Engineering* 1992; 31(7):1425-31.

Santos MN, Featherstone JDB, Fried D. Effect of a new carbon dioxide laser and fluoride on sound enamel and demineralized enamel. In: *Lasers in Dentistry VII. Proceedings of the SPIE Meeting.*; 2001; San Jose. Washington: Bellingham; 2001. p. 169-74.

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

Seka W, Fried D, Featherstone JD, Borzillary SF. Light deposition in dental hard tissue and simulated thermal response. *J Dent Res* 1995a; 74(4):1086-92.

Seka W, Fried D, Featherstone JD, Borzillary SF. Light deposition in dental hard tissue and simulated thermal response. *J Dent Res* 1995b; 74(4):1086-92.

Shellis RP. Relationship between human enamel structure and the formation of caries-like lesions in vitro. *Arch Oral Biol* 1984; 29(12):975-81.

Silverstone LM. Structure of carious enamel, including the early lesion. *Oral Sci Rev* 1973; 3:100-60.

Silverstone LM, Hicks MJ , Featherstone MJ. Dynamic factors affecting lesion initiation and progression in human dental enamel. Part I. The dynamic nature of enamel caries. *Quintessence Int* 1988; 19(10):683-711.

Spitzer D , ten Bosch JJ. Luminescence quantum yields of sound and carious dental enamel. *Calcif Tissue Res* 1977; 24(3):249-51.

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

Stern RH , Sognnaes RF. Laser inhibition of dental caries suggested by first tests in vivo. *J Am Dent Assoc* 1972; 85(5):1087-90.

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

Svensater G, Borgstrom M, Bowden GH , Edwardsson S. The acid-tolerant microbiota associated with plaque from initial caries and healthy tooth surfaces. *Caries Res* 2003; 37(6):395-403.

Tagliaferro EP, Rodrigues LK, Nobre Dos Santos M, Soares LE , Martin AA. Combined effects of carbon dioxide laser and fluoride on demineralized primary enamel: an in vitro study. *Caries Res* 2007; 41(1):74-6.

Takagi S, Liao H , Chow LC. Effect of tooth-bound fluoride on enamel demineralization/ remineralization in vitro. *Caries Res* 2000; 34(4):281-8.

Takahashi K, Kimura Y , Matsumoto K. Morphological and atomic analytical changes after CO₂ laser irradiation emitted at 9.3 microns on human dental hard tissues. *J Clin Laser Med Surg* 1998; 16(3):167-73.

Tange T, Fried D , Featherstone JDB TEA-CO₂ laser inhibition of artificial carieslike lesion progression in primary and permanent tooth enamel In: *Lasers in Dentistry VI*; 2000; San Jose, CA, USA. SPIE; 2000. p. 306-13.

Ten Bosch JJ , Angmar-Mansson B. A review of quantitative methods for studies of mineral content of intra-oral caries lesions. *J Dent Res* 1991; 70(1):2-14.

Ten Bosch JJ, Angmar-Mansson B, Boonji M, Sundström F. Long wave-length fluorescence of bovine tooth components. *Caries Res* 1986; 20(186).

ten Bosch JJ, Borsboom PC, ten Cate JM. A nondestructive method for monitoring de- and remineralization of enamel. *Caries Res* 1980; 14(2):90-5.

ten Bosch JJ, Coops JC. Tooth color and reflectance as related to light scattering and enamel hardness. *J Dent Res* 1995; 74(1):374-80.

ten Bosch JJ, van der Mei HC, Borsboom PC. Optical monitor of in vitro caries. A comparison with chemical and microradiographic determination of mineral loss in early lesions. *Caries Res* 1984; 18(6):540-7.

ten Cate JM. In situ models, physico-chemical aspects. *Adv Dent Res* 1994; 8(2):125-33.

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

ten Cate JM, Exterkate RA, Buijs MJ. The relative efficacy of fluoride toothpastes assessed with pH cycling. *Caries Res* 2006; 40(2):136-41.

Tepper SA, Zehnder M, Pajarola GF, Schmidlin PR. Increased fluoride uptake and acid resistance by CO₂ laser-irradiation through topically applied fluoride on human enamel in vitro. *J Dent* 2004; 32(8):635-41.

Theuns HM, van Dijk JW, Jongebloed WL, Groeneveld A. The mineral content of human enamel studied by polarizing microscopy, microradiography and scanning electron microscopy. *Arch Oral Biol* 1983; 28(9):797-803.

Tranaeus S, Al-Khateeb S, Bjorkman S, Twetman S, Angmar-Mansson B. Application of quantitative light-induced fluorescence to monitor incipient lesions in caries-active children. A comparative study of remineralisation by fluoride varnish and professional cleaning. *Eur J Oral Sci* 2001; 109(2):71-5.

Tranaeus S, Shi XQ, Lindgren LE, Trollsas K, Angmar-Mansson B. In vivo repeatability and reproducibility of the quantitative light-induced fluorescence method. *Caries Res* 2002; 36(1):3-9.

Tsai CL, Lin YT, Huang ST, Chang HW. In vitro acid resistance of CO₂ and Nd-YAG laser-treated human tooth enamel. *Caries Res* 2002; 36(6):423-9.

Vaarkamp J, ten Bosch JJ , Verdonschot EH. Propagation of light through human dental enamel and dentine. *Caries Res* 1995; 29(1):8-13.

van der Veen MH, Ando M, Stookey GK , de Josselin de Jong E. A Monte Carlo simulation of the influence of sound enamel scattering coefficient on lesion visibility in light-induced fluorescence. *Caries Res* 2002; 36(1):10-8.

Walsh LJ , Perham SJ. Enamel fusion using a carbon dioxide laser: a technique for sealing pits and fissures. *Clin Prev Dent* 1991; 13(3):16-20.

Wefel JS , Harless JD. Comparison of artificial white spots by microradiography and polarized light microscopy. *J Dent Res* 1984a; 63(11):1271-5.

Wefel JS , Harless JD. Topical fluoride application and lesion progression in vitro. *J Dent Res* 1984b; 63(11):1276-8.

Wong J, Otsuka M, Higuchi WI, Powell GL , Fox JL. Effect of laser irradiation on the dissolution kinetics of hydroxyapatite preparations. *J Pharm Sci* 1990; 79(6):510-5.

Ying D, Chuah GK , Hsu CY. Effect of Er:YAG laser and organic matrix on porosity changes in human enamel. *J Dent* 2004; 32(1):41-6.

Young DA, Fried D , Featherstone JD. Treating occlusal pit and fissure surfaces by IR laser irradiation In: In: *Lasers in Dentistry V. Proceedings of the SPIE Meeting.*; 1999; San Jose. Washington: Bellingham; 2000 p. 247-53.

Zach L , Cohen G. Pulp Response To Externally Applied Heat. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1965; 19(5):15-30.

Zaura E, Buijs MJ , ten Cate JM. The effects of the solubility of artificial fissures on plaque pH. *J Dent Res* 2002; 81(8):567-71.

Zero DT. In situ caries models. *Adv Dent Res* 1995; 9(3):214-30; discussion 31-4.

Zezell DM, da Ana PA, Ribeiro AD, de Freitas AZ, Rocha RME, Oliveira ME, *et al.* Lasers in caries diagnosis and prevention. *Lasers Surg Med* 2005; 19-.

Zezell DM, Ribeiro AC, Bachmann L, Gomes AS, Rousseau C , Girkin J. Characterization of natural carious lesions by fluorescence spectroscopy at 405-nm excitation wavelength. *J Biomed Opt* 2007; 12(6):064013.

Zuerlein MJ, Fried D , Featherstone JDB. Modeling the modification depth of carbon dioxide laser-treated dental enamel. *Lasers Surg Med* 1999; 25(4):335-47.

Zuerlein MJ, Fried D, Featherstone JDB , Seka W. Optical properties of dental enamel in the mid-IR determined by pulsed photothermal radiometry. *IEEE J Sel Top Quant* 1999; 5(4):1083-9.