THAYANNE MONTEIRO RAMOS-OLIVEIRA

Avaliação *in vitro* do potencial do *laser* de CO₂, associado ou não a produtos fluoretados, em inibir erosão em esmalte dental humano

Versão Corrigida

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

Área de Concentração: Dentística

Orientador: Profa. Dra. Patricia Moreira de Freitas

São Paulo

2012

FICHA CATALOGRÁFICA

Ramos-Oliveira TM. Avaliação *in vitro* do potencial do *laser* de CO₂, associado ou não a produtos fluoretados, em inibir erosão em esmalte dental humano. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Aprovado em: / / 2012.

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

À minha preciosa mãe, **Flavia**, meu chão, meu eterno porto-seguro, fonte inesgotável de amor e carinho, quem mais me ajuda na realização de meus sonhos.

Como disse José Alencar: “milhões de frases bonitas jamais alcançariam o que eu sinto por você”. Obrigada por TUDO, Mainha!

À **Thaysa**, minha irmã, minha maior amiga, maior companheira, maior incentivadora. Palavras são insuficientes para demonstrar sua importância ao longo desta jornada.

Ao meu pai, **Gutemberg**, que tão cedo partiu de minha vida. Mais um sonho realizado na sua ausência física. Sei que está orgulhoso e feliz com mais essa grande conquista. Saudades.

A vocês, tão especiais em minha vida, dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao meu marido **George**, que nunca mediu esforços para me ajudar, sempre buscou a minha felicidade e realização de nossos sonhos e compreendeu as minhas ausências. Seu carinho, sua paciência e seu companheirismo foram fundamentais nesta jornada! Muito Obrigada, de coração, por me fazer tão bem, te amo!

À minha irmã **Tâmisa**, meu cunhado **Fábio** e à minha querida **Bia**. Pessoas especiais que sempre estiveram ao meu lado. Desde o início, vocês me incentivaram a “largar tudo” em Aracaju para viver São Paulo por um momento. A saudade sempre se tornava pequena quando estávamos juntos. Obrigada pelo amor, pela torcida e por fazerem parte da minha vida. Amo vocês!

Ao meu cunhado **Chico**, por me querer tão bem e pela enorme assistência a Mainha durante esse tempo em que estive ausente. Obrigada pelo carinho e pela amizade especial;

À Profa. Dra. **Patrícia Freitas**, à qual tive a honra de tê-la como minha orientadora. Exemplo de competência e dedicação, sempre me guiou para os melhores caminhos com disposição e muita paciência. A admiração e seus ensinamentos ficarão guardados para sempre!

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, pela proteção e por me guiar para as melhores escolhas da vida e para o alcance de meus ideais. Com sua luz divina, enfrentar a distância e a saudade de pessoas tão queridas foi muito mais fácil;

À **Profa. Dra. Alaíde Hermínia**, minha inspiradora, exemplo de mestre e profissional, que há 7 anos despertou em mim o amor pela Dentística e pelo ensino. Obrigada por todo o incentivo nesta maravilhosa jornada;

Às Amigas do Mestrado, em especial **Anely, Bruna, Carol, Cynthia, Jú, Livia, Mayra, Tati e Thayne**. Amigas gatas e super queridas. A amizade, o companheirismo e o entusiasmo de vocês foram essenciais para tornar cada dia em São Paulo tão inesquecível! Serei eternamente grata por tudo que me proporcionaram quando estivemos juntas. Adoro vocês!

À **Universidade Federal de Sergipe**, minha gratidão pelos ensinamentos herdados ao longo de minha formação em odontologia;

À **Universidade de São Paulo**, representada pelo magnífico Reitor Prof. Dr. João Grandino Rodas;

À **Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo – FOUSP**, representada por seu Diretor Prof. Dr. Rodney Garcia Rocha;

À **Profa. Dra. Márcia Martins Marques**, chefe do Departamento de Dentística da FOUSP e coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Dentística;

A todos os **Professores do Departamento de Dentística da FOUSP**, pelos preciosos ensinamentos transmitidos e pela participação no meu amadurecimento profissional, em especial à **Profa. Ana Cecília**, pelo carinho e ao **Prof. Carlos de Paula**, por sua imensurável competência e por todas as palavras de incentivo e contribuição neste trabalho;

Aos Professores **Dalton Ramos, Maria Gabriela Biazevic e Márcia Wanderley**, pela valiosa colaboração em relação ao CEP e CONEP;

À **Washington Steagall Jr.**, pela realização da análise estatística deste trabalho;

Aos **Funcionários do Departamento de Dentística**, em especial David e Soninha. Sem a ajuda de vocês, nossos dias com certeza seriam mais difíceis;

Às **Funcionárias do LELO**: Lili, Gê, Elaine e Selma, pela simpatia e boa vontade em me ajudar sempre que precisei;

Às **Funcionárias da Secretaria de Pós Graduação**, sempre dispostas a nos ajudar;

Aos **Funcionários da Biblioteca**, pela eficiência e orientação deste trabalho;

À **Profa. Dra. Marcella Esteves-Oliveira**, pela colaboração neste estudo e por tornar possível a realização da pesquisa na Universidade de Aachen, na Alemanha;

À **Patrícia Büttler**, da RWTH, pela grande ajuda no laboratório da Universidade de Aachen;

À **CAPES** (Coordenação de Aprimoramento de Pessoal de Nível Superior), pelo apoio financeiro.

*"Para realizar grandes conquistas, devemos não apenas agir, mas também
sonhar; não apenas planejar mas também acreditar"*

(Anatole France).

RESUMO

Ramos-Oliveira TM. Avaliação *in vitro* do potencial do *laser* de CO₂, associado ou não a produtos fluoretados, em inibir erosão em esmalte dental humano [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2012. Versão Corrigida.

Considerando a eficácia limitada do flúor na proteção dos tecidos duros dentais contra a erosão, o objetivo do presente estudo foi investigar o potencial do *laser* de gás carbônico (CO₂) (10,6 µm), associado ou não a produtos fluoretados, na inibição da erosão de esmalte dental. Amostras de esmalte dental humano foram obtidas e divididas aleatoriamente em 8 grupos (n = 11): G1: controle (sem tratamento), G2: gel de Flúor Fosfato Acidulado (FFA), G3: gel de fluoreto de sódio (AmF/NaF), G4: solução de fluoreto estanhoso (AmF/SnF₂), G5: *laser* de CO₂ (0,3 J/cm², 15 µs, 226 Hz), G6: *laser* de CO₂ + gel de FFA, G7: *laser* de CO₂ + gel de AmF/NaF e G8: *laser* de CO₂ + solução de AmF/SnF₂. Após os tratamentos de superfície, as amostras foram imersas em ácido cítrico a 1% (pH 4,0, 3 minutos). Antes dos tratamentos de superfície e após o desafio ácido, a microdureza de superfície foi mensurada (0,49 N, 20 segundos) e os dados foram analisados estatisticamente através do teste ANOVA com subseqüentes comparações entre pares (p < 0,05). Os resultados mostraram que o grupo G3 (403,5 ± 25,0) apresentou a maior média de microdureza Knoop após o desafio ácido, seguido pelos grupos G2 (396,6 ± 45,0) e G6 (392,8 ± 24,9), sem diferença estatística entre eles. Dentre os grupos tratados com produtos fluoretados, o grupo G4 (305,5 ± 17,7) resultou em microdureza significativamente mais baixa que o G3 (403,5 ± 25,0) e o G2 (396,6 ± 45,0), os quais foram estatisticamente semelhantes entre si. Dentre os grupos tratados com *laser*, os grupos G5 (341,1 ± 23,8), G7 (374,9 ± 42,1) e G8 (328,6 ± 26,9) apresentaram valores de dureza estatisticamente semelhantes entre si. Dentro dos limites do presente estudo *in vitro*, pôde-se concluir que o tratamento com gel de AmF/NaF e gel de FFA (com ou sem irradiação prévia com o *laser* de CO₂) mostrou potencial para controlar a progressão da erosão no esmalte dental humano.

Palavras-chave: *Laser* de CO₂. Erosão. Esmalte Dental Humano. Flúor. Microdureza.

ABSTRACT

Ramos-Oliveira TM. *In vitro* evaluation of the potential of CO₂ laser associated or not to fluorides in inhibiting human enamel erosion [dissertation]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2012. Corrected version.

Considering the limited effectiveness of fluoride in protecting dental hard tissues against erosion, the aim of the present study was to investigate the potential of the CO₂ laser (10.6 µm) associated to fluoride agents in inhibiting human enamel erosion. Human enamel samples were obtained and randomly divided into 8 groups (n = 11): G1: control (no treatment), G2: APF gel, G3: AmF/NaF gel, G4: AmF/SnF₂ solution, G5: CO₂ laser (0.3 J/cm², 15 µs, 226 Hz), G6: CO₂ laser + APF gel, G7: CO₂ laser + AmF/NaF gel and G8: CO₂ laser + AmF/SnF₂ solution. After surface treatment, samples were immersed in 1% citric acid (pH 4.0, 3 min). Knoop Surface microhardness (SMH) (0.49 N, 20 s) was measured before surface treatments and after surface softening. The data were statistically analyzed by ANOVA model with subsequent pairwise comparisons (p < 0,05). Group G3 (403.5 ± 25.0) presented the highest SMH means after softening, followed by Groups G2 (396.6 ± 45.0) and G6 (392.8 ± 24.9) with no statistically significant difference between them. Between the fluoride-treated groups, G4 (305.5 ± 17.7) resulted in significantly low SMH mean than G3 (403.5 ± 25.0) and G2 (396.6 ± 45.0), which were statistically similar to each other. Between the laser-treated groups, G5 (341.1 ± 23.8), G7 (374.9 ± 42.1) and G8 (328.6 ± 26.9) presented SMH means statistically similar to each other. Within the limits of the present *in vitro* study, AmF/NaF and APF application (with or without previous CO₂ laser irradiation) have shown a potential to control erosion progression in human dental enamel.

Keywords: CO₂ laser. Erosion. Human enamel. Fluoride. Microhardness.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DA LITERATURA	14
2.1 Considerações sobre erosão dental	15
2.2 O papel do flúor na erosão dental	16
2.3 Laser de CO ₂ no esmalte dental	20
2.4 Laser de CO ₂ (10,6 µm) na prevenção de erosão.....	24
3 PROPOSIÇÃO	27
4 METODOLOGIA	29
4.1 Aspectos éticos	30
4.2 Local da pesquisa.....	30
4.3 Desenho do estudo	31
4.4 Preparo das amostras	31
4.5 Tratamento com flúor	33
4.6 Irradiação com laser de CO ₂	34
4.7 Desafio erosivo	35
4.8 Avaliação da microdureza de superfície.....	36
4.9 Análise estatística	37
5 RESULTADOS	38
6 DISCUSSÃO	42
7 CONCLUSÕES	49
REFERÊNCIAS	51
APÊNDICES.....	61
ANEXOS	67

Introdução

1 INTRODUÇÃO

Durante muitos anos a Odontologia atuou de forma a amenizar a agressividade das lesões erosivas. Definida como uma dissolução patológica do esmalte dental causada por agentes quelantes ou ácidos de origem não bacteriana (Imfeld, 1996), a erosão dental tem sido rotineiramente diagnosticada, principalmente em virtude do aumento da longevidade da população, do aumento do consumo de alimentos ácidos e também do crescente relato de transtornos alimentares e gastroesofágicos.

No entanto, estratégias como mudanças de hábitos alimentares e de higiene dental, estimulação salivar, otimização dos regimes de flúor, restaurações e identificação de fatores de risco, ainda não são capazes de impedir o surgimento da erosão dental.

Desde a introdução do uso de *lasers* em tecido duro dental, em 1964, estudos foram realizados e, com eles, o crescente conhecimento sobre os efeitos da interação dos *lasers* com os tecidos duros dentais (Nelson et al., 1986b; Featherstone; Nelson, 1987; McCormack et al., 1995). Vários estudos (Featherstone et al., 1998; Kantorowitz et al., 1998; Hsu et al., 2000, 2001; Ching-Ying et al., 2004; Rodrigues et al., 2004; Tepper et al., 2004; Klein et al., 2005; Steiner-Oliveira et al., 2006; Esteves-Oliveira et al., 2008; Esteves-Oliveira et al., 2009; Tagliaferro et al., 2009) mostraram os efeitos positivos da irradiação com o *laser* de CO₂, associado ou não ao uso de flúor, na inibição da desmineralização, reduzindo a perda mineral do esmalte dental diante de desafios ácidos cariogênicos.

Algumas hipóteses são sugeridas para justificar o mecanismo de ação do *laser* de CO₂ no esmalte. Segundo Featherstone et al. (1998), o *laser* de CO₂ produz radiação na região do espectro infravermelho, o que coincide com as bandas de absorção dos fosfato, carbonato e hidroxila da apatita do esmalte. Isso significa que a irradiação com este tipo de *laser*, com parâmetros específicos, pode ser utilizada para provocar alterações térmicas na hidroxiapatita carbonatada, o que, conseqüentemente, formaria uma hidroxiapatita modificada mais resistente à dissolução ácida (Meurman et al., 1997; Klein et al., 2005). Além de alterações químicas, acredita-se que o aumento de temperatura que ocorre na superfície do esmalte após irradiação com *laser* de CO₂ pode provocar alterações morfológicas no

esmalte, tornando-o menos permeável e menos solúvel aos ácidos (Stern et al., 1972; Nelson et al., 1987).

Mais recentemente, estudos começaram a avaliar a ação do *laser* de CO₂ na prevenção da erosão de esmalte. Os resultados são promissores, mas ainda inconclusivos em virtude da variedade de metodologias e parâmetros de irradiação utilizados.

O aumento da prevalência de lesões de erosão, somado ao aumento do consumo de bebidas ácidas pela população e à dificuldade de diagnóstico precoce desse tipo de lesão, reforçam a necessidade da otimização dos métodos preventivos já existentes e do desenvolvimento de terapias realmente eficazes em inibir a perda de mineral frente a um desafio erosivo, antes que a perda irreversível da estrutura dental possa ocorrer.

Considerando os resultados positivos da literatura quanto à utilização do *laser* de CO₂ na prevenção de cárie e os resultados promissores em relação à redução da erosão de esmalte, o objetivo deste estudo *in vitro* foi avaliar o potencial de um *laser* de CO₂ (10,6 µm), com pulsos curtos, associado ou não a diferentes produtos fluoretados, na inibição da desmineralização do esmalte dental humano quando submetido ao desafio erosivo.

Revisão da Literatura

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Considerações sobre Erosão Dental

A erosão dental é um processo químico, caracterizado pela dissolução dos tecidos duros dentais, decorrente da exposição a uma variedade de ácidos de origem não-bacteriana (Imfeld, 1996; Lussi et al., 2011). É uma patologia comumente associada a fatores intrínsecos, como vômitos recorrentes ou regurgitações decorrentes de desordens alimentares (anorexia e/ou bulimia) ou de refluxos gastroesofágicos, respectivamente. Também pode estar associada a fatores extrínsecos, os quais estão diretamente relacionados a uma dieta ácida ou a condições inerentes à profissão (Zero, 1996).

A presença de ácidos é um pré-requisito para a erosão dental, mas o desgaste erosivo tem origem multifatorial e seu desenvolvimento está diretamente associado à interação de fatores químicos, biológicos e comportamentais. Fatores químicos, como tipo e quantidade de ácido, pH, capacidade tampão, conteúdo mineral (fosfato, cálcio e flúor) e presença de agentes quelantes, podem determinar o potencial erosivo de bebidas e alimentos ácidos. Dentre os fatores biológicos relacionados com a patogênese da erosão dental tem-se a saliva, película adquirida, estrutura dental e seu posicionamento em relação aos tecidos moles e língua. Por último, fatores comportamentais, como hábitos dietéticos, alcoolismo crônico e desordens alimentares, podem contribuir para o desenvolvimento dessas lesões (Levitch et al., 1994; Zero, 1996; Lussi et al., 2006; Lussi; Jaeggi, 2008).

Em função da mudança dos hábitos dietéticos da população, que tem consumido com maior frequência bebidas esportivas, refrigerantes, sucos industrializados e frutas cítricas, os ácidos extrínsecos, tal como o ácido cítrico, cujo pH normalmente é menor que 4,5, têm sido considerados os principais fatores causadores da erosão dentária (Scheutzel, 1996; Zero, 1996; Lussi et al., 2008; Magalhães et al., 2009).

Para Levitch et al. (1994) e Zero e Lussi (2005) o efeito desmineralizador do ácido cítrico é bastante acentuado devido, principalmente, à sua ação quelante. Ele é capaz de se ligar aos íons cálcio da superfície do esmalte, formando compostos de

citrato de cálcio mais solúveis, como também aos íons cálcio da saliva, reduzindo seu grau de supersaturação em relação aos minerais do dente (Meurman; ten Cate, 1996), o que favorece ainda mais a dissolução dos cristais de hidroxiapatita do esmalte dental.

Além da ação quelante, acredita-se ainda que íons hidrogênio (H^+), derivados de ácidos, são capazes de atacar os cristais do esmalte, se combinando com os íons carbonato e fosfato, sendo capaz de dissolver diretamente a superfície do esmalte (Featherstone; Lussi, 2006).

Meurman e Frank (1991), através da avaliação morfológica de esmalte erodido com microscopia eletrônica de varredura, verificaram que após 15 – 30 minutos de tratamento, as bebidas contendo ácido cítrico (pH 2,8) foram mais erosivas do que as que continham ácido málico (pH 3,4) ou ácido fosfórico (pH 2,6). No entanto, estudos mostram que o potencial erosivo de uma bebida não depende exclusivamente do seu pH mas também de sua capacidade tampão, de sua propriedade quelante, da frequência e duração de ingestão e de sua composição química (Lussi, 1996; Meurman; ten Cate, 1996; Barbour et al., 2011). Quanto maior a capacidade tampão da bebida, mais tempo é necessário para a saliva restabelecer o pH do meio bucal.

O processo de erosão se inicia com a desmineralização parcial da superfície do esmalte dental resultando na diminuição de sua dureza (amolecimento superficial) e no aumento da rugosidade superficial. Desafios erosivos prolongados podem levar à perda irreversível de tecido duro dental, que pode ser agravada com a ação de abrasão (Lussi et al., 2011; Schlueter et al., 2011a). Considerando que o estágio inicial da erosão não é detectável clinicamente (Imfeld, 1996), o diagnóstico precoce e a identificação de fatores de risco pelo cirurgião-dentista são de fundamental importância para a prevenção da perda de esmalte.

2.2 O Papel do Flúor na Erosão Dental

O objetivo de qualquer tratamento ou medidas preventivas para erosão de esmalte consiste em modificar a superfície desse substrato, aumentando sua resistência ácida. Diferentes métodos para prevenir o desenvolvimento da lesão por

erosão ou controlar sua progressão são bastante discutidos na literatura. O mais comum deles é a aplicação de fluoretos.

Estudos *in vitro* (Sorvari et al., 1994; Büyükyilmaz et al., 1997; Ganss et al., 2001; van Rijkom et al., 2003; Vieira et al., 2005; Hove et al., 2006; Schlueter et al., 2007; Schlueter et al., 2009c; Wiegand et al., 2009; Yu et al., 2010; Schlueter et al., 2011b) e *in situ* (Ganss et al., 2004; Ganss et al., 2008) mostraram a eficácia de diferentes produtos fluoretados na proteção e remineralização de lesões de erosão em esmalte dental. A maioria destes estudos utilizou compostos fluoretados utilizados, com sucesso, na prevenção e controle da cárie dental, como fluoreto de sódio (NaF), fluoreto de amina (AmF), flúor fosfato acidulado (FFA), fluoreto de estanho (SnF₂) e tetrafluoreto de titânio (TiF₄), os quais apresentam diferentes interações com o tecido mineralizado dental e efeitos na progressão da erosão (Ganss et al., 2008).

Pouco se sabe sobre o modo de ação dos fluoretos na prevenção e controle da erosão dental, pois um desafio erosivo é muito mais agressivo que um desafio cariogênico e somente uma fina camada superficial, parcialmente desmineralizada, permanece para fornecer estrutura para remineralização de uma superfície erodida (Ganss et al., 2001). Acredita-se que a ação dos compostos fluoretados mais comuns, como NaF, AmF e FFA, na inibição da desmineralização por erosão seja atribuída, principalmente, à precipitação de minerais tipo fluoreto de cálcio (CaF₂) na superfície erodida, formando uma camada protetora que age não só como uma barreira física - impedindo o contato do ácido com o esmalte subjacente - como também serve de reservatório de flúor, liberando íons flúor durante desafios erosivos, antes que o esmalte subjacente seja atacado (Bruun; Givskov, 1991; ten Cate, 1997; Ganss et al., 2001; Ganss et al., 2004; Wiegand et al., 2009). Esta liberação de íons flúor induz a reprecipitação de mineral na forma de fluorapatita, a qual previne adicionais perdas minerais (ten Cate, 1997; Wiegand et al., 2009).

Fluoretos que apresentam cátions polivalentes, como SnF₂ e TiF₄, apresentaram resultados promissores em diferentes estudos, embora pouco se sabe sobre seu real mecanismo de ação anti-erosivo. Em relação ao SnF₂, acredita-se que sua eficácia seja atribuída não só à camada de CaF₂, mas também à reação do estanho com a hidroxiapatita pura do esmalte, o que reduz a sua solubilidade. Estudos prévios (Babcock et al., 1978) mostraram que Sn₂OHPO₄ (hidróxido fosfato de estanho 2), Sn₃F₃PO₄ (fosfato de flúor estanhoso), Ca(SnF₃)₂ (fluoreto estanhoso

de cálcio) e CaF_2 são possíveis subprodutos desta reação, os quais formam uma “cobertura protetora” insolúvel, rica em estanho, que pode ser visualizada mesmo após 2 minutos de inserção em ácido cítrico (pH 2,3) (Ganss et al., 2004; Ganss et al., 2008; Hove et al., 2006). Além disso, supõe-se que, sob altas concentrações e baixo pH, o estanho pode ser incorporado ao esmalte (até 20 μm de profundidade), resultando na formação de uma ampla zona estruturalmente modificada e resistente a desafios ácidos (Schlueter et al., 2009b).

O efeito anti-erosivo do TiF_4 tem sido atribuído à formação de uma película, chamada por alguns autores de “*glaze*”, na superfície do esmalte. O mecanismo de reação com a superfície do dente e sua estabilidade em pH ácido ainda não estão completamente elucidados. No entanto, acredita-se que os íons de titânio podem desempenhar um papel importante na redução da perda mineral do esmalte por apresentarem forte tendência em se unir com o oxigênio dos grupos fosfato, favorecendo a formação da cobertura protetora, formada por dióxido de titânio (Büyükyilmaz et al., 1997). Além disso, a presença de moléculas de fluoreto de hidrogênio (HF) também podem favorecer a ação do TiF_4 . O baixo pH das soluções de TiF_4 causa desmineralização do esmalte superficial e formação de HF, capazes de penetrar na estrutura do esmalte, promovendo a formação de CaF_2 na matriz de hidroxiapatita. Esta camada subsuperficial de CaF_2 apresenta, possivelmente, maior resistência ácida em relação à camada superficial (Hove et al., 2006; Schlueter et al., 2007; Hjortsjö et al., 2009).

A formação da camada de precipitados e seu efeito protetor depende do pH, concentração do flúor e tipo de fluoreto. Fatores como baixo pH do produto fluoretado e altas concentrações de flúor (maior que 100 ppm F^-) na forma de enxaguatórios, géis ou vernizes são mais favoráveis para a formação de uma camada mais estável de precipitados e, conseqüente, inibição da perda de esmalte (Øgaard, 2001; Ganss et al., 2001; Ganss et al., 2004). Por ser um fenômeno de superfície, onde não há lesão subsuperficial - como acontece com lesões de cárie - o flúor vai agir apenas na fina camada de esmalte superficial amolecido, passível de remineralização (ten Cate, 1997; Amaechi; Higham, 2005).

Petzold (2001), através de análises por microscopia de força atômica, varredura e transmissão, não encontrou diferenças na quantidade, na microestrutura cristalina e na composição dos precipitados de CaF_2 formados na superfície do esmalte após aplicação de soluções ácidas de AmF e NaF , ambas na concentração

de 0,1%. Além disso, como os precipitados iniciaram sua formação em menos de 20 segundos após a aplicação dos fluoretos, o autor sugeriu a possibilidade de haver formação de precipitados mesmo durante curtas aplicações de fluoreto, como acontece durante escovação e uso de bochechos fluoretados.

Ao contrário do estudo anterior, Ganss et al. (2008) encontraram diferenças significativas na eficácia de NaF, AmF e SnF₂ na inibição da progressão erosão. Os resultados mostraram que as soluções de AmF/SnF₂ e SnF₂ foram bastante efetivas na inibição da perda mineral, enquanto as soluções de NaF foram menos efetivas. O AmF/NaF não apresentou efeito significativo, mesmo contendo 250 ppm F⁻ nas soluções. Os autores concluíram, portanto, que não somente o flúor, mas também seu respectivo cátion pode influenciar na eficácia do composto fluoretado.

Confirmando os resultados do estudo supracitado, Wiegand et al. (2009), Schlueter et al. (2009b) e Schlueter et al. (2009c), mostraram que a eficácia do fluoreto não depende da intensidade e frequência de aplicação, mas principalmente do tipo de composto fluoretado e de sua reação com o tecido duro dental, uma vez que, quando consideradas concentrações de flúor iguais ou similares, soluções contendo íons de estanho foram mais efetivas em proteger o esmalte da erosão do que soluções contendo NaF.

Ren et al., 2011 avaliaram *in situ* a eficácia de dentrífcios contendo 5.000 ppm e 1.450 ppm de flúor em prevenir erosão dental causada por suco de laranja (pH 3,8). Os autores verificaram que o melhor efeito protetor contra a erosão foi obtido com o dentrífcio de maior concentração de flúor, corroborando com os achados de Ganss et al. (2001) e Lagerweij et al. (2006).

Embora a aplicação de flúor seja uma opção de tratamento para prevenção da erosão em esmalte, não há um consenso na literatura sobre sua real efetividade. O mecanismo de ação na erosão ainda é limitado e controverso (Ganss et al., 2000; Ganss et al., 2001; Yu et al., 2010), pois supõe-se que a camada de precipitados de CaF₂ formada na superfície do dente, após a aplicação tópica de flúor, seja rapidamente dissolvida quando o pH do meio diminui diante da exposição a bebidas ácidas, mesmo na presença de altas concentrações de flúor (Larsen, 2001; Larsen; Richards, 2002; Ganss et al., 2007). Além disso, alguns autores (Fan et al., 2009) mostraram, sob determinadas condições *in vitro*, que o flúor pode ser incorporado diretamente na hidroxiapatita fluoretada do esmalte erodido sem haver, necessariamente, a formação das partículas de CaF₂.

Diante do exposto e em virtude da variabilidade de desenhos e condições experimentais reportados na literatura, os resultados em relação ao potencial de determinados tratamentos na redução ou inibição de perdas minerais diante de desafio erosivo não são conclusivos, variando de nenhuma ou limitada proteção (Larsen, 2001; Larsen; Richards, 2002; van Rijkom et al., 2003; Vieira et al., 2005) até uma proteção quase completa (Hove et al., 2006) da estrutura de esmalte.

2.3 Laser de CO₂ no Esmalte Dental

Diferentes tipos de *lasers* de alta potência, como *laser* de CO₂, Nd:YAG e argônio, com diferentes modos de operação e parâmetros de irradiação, são estudados quanto ao seu potencial preventivo de perda mineral do esmalte dental.

Considerando a eficácia limitada do flúor em prevenir ou reduzir a progressão da erosão em esmalte (Larsen, 2001; Larsen; Richards, 2002; van Rijkom et al., 2003; Lussi et al., 2008) e os efeitos positivos dos *lasers* de alta potência nos tecidos duros dentais, vários estudos têm mostrado que a irradiação com *laser* de CO₂, associada ou não a produtos fluoretados, pode ser um método alternativo para inibição da dissolução ácida, protegendo o esmalte contra desafios ácidos cariogênicos (Featherstone et al., 1998; Kantorowitz et al., 1998; Hsu et al., 2000, 2001; Ching-Ying et al., 2004; Rodrigues et al., 2004; Tepper et al., 2004; Klein et al., 2005; Steiner-Oliveira et al., 2006; Esteves-Oliveira et al., 2008; Esteves-Oliveira et al., 2009; Tagliaferro et al., 2009). A porcentagem de inibição de cárie reportada na literatura varia de 17 a 98%, de acordo com o tipo de *laser* e os parâmetros de irradiação utilizados.

Dentre os *lasers* usados em odontologia, os de CO₂ parecem ser os mais apropriados para uso em tecidos dentais por apresentarem alta absorção por componentes da estrutura dental. Isso pode ser explicado pelo fato de o *laser* de CO₂ produzir radiação na região do infravermelho, que coincide com as bandas de absorção dos grupos fosfato, carbonato e hidroxila da apatita do esmalte (Featherstone et al., 1998).

O real mecanismo de ação dos *lasers* de CO₂ na inibição de cárie permanece incerto. Várias hipóteses tentam explicar o aumento da resistência ácida do esmalte

dental após tratamento com o *laser* de CO₂. A primeira hipótese baseia-se na redução da permeabilidade e solubilidade do esmalte causada por um selamento físico resultante da fusão, derretimento e recristalização dos cristais de hidroxiapatita do esmalte, formando uma barreira parcial que dificultaria a difusão de ácidos para o interior do tecido (Stern et al., 1972; Nelson et al., 1986a, Nelson et al., 1987; Zuerlein et al., 1999). Outra hipótese baseia-se na formação de compostos fosfatados menos solúveis, também resultante do aumento de temperatura da hidroxiapatita (Fried et al., 1997; Rodrigues et al., 2004). Decomposição parcial da matriz orgânica (Nelson et al., 1986b; Hsu et al., 2000; Esteves-Oliveira et al., 2008), redução na concentração de carbonato na estrutura química do esmalte (Nelson et al., 1987; Featherstone; Nelson, 1987; Featherstone et al., 1998; Esteves-Oliveira et al., 2008) e transformação de hidroxiapatita em fluorapatita quando da presença de flúor (Meurman et al., 1997) também são fatores que podem justificar a ação do *laser* de CO₂ na inibição da desmineralização.

Todas essas mudanças químicas e morfológicas que podem diminuir a susceptibilidade do esmalte à desmineralização ácida são diretamente influenciadas pelo comprimento de onda, pela fluência da radiação *laser*, duração de pulso, número de pulsos e taxa de repetição (McCormack et al., 1995; Kantorowitz et al., 1998; Zuerlein et al., 1999). No entanto, dependendo dos parâmetros utilizados, alterações morfológicas indesejáveis relacionadas a danos térmicos à estrutura dental, podem ocorrer sob a forma de danos pulpares, fissuras, trincas, ablação e carbonização do substrato (McCormack et al., 1995; Hsu et al., 2000; Tsai et al., 2002; Tagliaferro et al., 2007; Esteves-Oliveira et al., 2009).

Estudos mostram uma relação direta entre perda de carbonato pelo esmalte irradiado e diminuição da taxa de dissolução ácida (Zuerlein et al., 1999). Alterações químicas dos cristais de esmalte, como eliminação parcial de carbonato, resultam na formação de uma fase mineral que, embora seja semelhante à hidroxiapatita, é menos solúvel que o esmalte hígido, tornando o esmalte irradiado com *laser* de CO₂ menos susceptível à dissolução ácida (Featherstone et al., 1998).

O *laser* de CO₂ pode ser utilizado em diferentes comprimentos de onda: 9,3, 9,6, 10,3 ou 10,6 µm. O coeficiente de absorção do tecido vai depender de comprimento de onda utilizado. Imagens de microscopia eletrônica de varredura mostram que a absorção do *laser* pelos grupos fosfato e carbonato do dente nos comprimentos de onda de 9,3 e 9,6 µm é muito mais eficiente do que nos de 10,3 e

10,6 μm (Nelson et al., 1987; Featherstone; Nelson, 1987). O *laser* de CO_2 emitindo no comprimento de onda de 10,6 μm , é quase 10 vezes menos absorvido (825 cm^{-1}) em relação ao de 9,6 μm (8.000 cm^{-1}), o que resulta em maior profundidade de penetração, modificando uma camada mais espessa de esmalte (cerca de 12 μm) (Fox et al., 1992a).

Segundo observações de McCormack et al. (1995), os diferentes comprimentos de onda disponíveis para o *laser* de CO_2 produzem efeitos distintos entre si no esmalte dental. No seu estudo, os comprimentos de onda de 9,3, 9,6 e 10,3 μm produziram um significativo derretimento superficial e fusão de cristais com poucos números de pulso e baixa energia, enquanto o de 10,6 μm aparentemente apenas produziu uma alteração química e estrutural dos cristais, não detectável nas imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura.

Apesar de vários estudos já publicados, ainda não há um consenso sobre o melhor parâmetro de irradiação para prevenção e controle da desmineralização de esmalte, com o menor efeito colateral possível. Alguns estudos reportam o uso de *lasers* de pulso contínuo, mas acredita-se que esta não seja a melhor opção para aplicação clínica em virtude do excesso de calor produzido na superfície do dente, o que poderia causar injúrias à polpa dental (Hossain et al., 1999; Tepper et al., 2004).

Os *lasers* pulsados têm a vantagem de fornecer alta densidade de energia por um curto período de tempo, com tempo de intervalo entre os pulsos suficiente para que o calor gerado possa ser dissipado (Fried et al., 2001). A duração de pulso influencia o grau de fusão dos cristais da superfície do dente (Fried et al., 2001). Estudos mostram forte relação entre largura de pulso, aumento de temperatura, tempo de relaxamento térmico e propagação de calor para o interior do substrato (Zuerlein et al., 1999; Rodrigues et al., 2004).

O esmalte irradiado com *laser* de CO_2 , no comprimento de onda de 10,6 μm , apresenta tempo de relaxamento térmico de 90 - 100 μs . Quanto mais próximo a duração de pulso estiver deste tempo, mais localizado será o efeito térmico do *laser* no tecido, diminuindo a difusão de calor para o interior do substrato. Caso a duração de pulso seja maior que o tempo de relaxamento térmico, poderá ocorrer a ablação, efeito indesejável quando o objetivo é inibição de desmineralização (McCormack et al., 1995; Featherstone et al., 1998; Zuerlein et al., 1999; Fried et al., 2001; Rodrigues et al., 2004). Para Fried et al. (2001), a deposição de calor residual pode ser fortemente reduzida utilizando duração de pulso menor que 20 μs .

A utilização de *laser* pulsado com diferentes densidades de energia (2,5 a 83,33 J/cm²) também já foi estudada por diversos autores (Featherstone et al., 1998; Kantorowitz et al., 1998; Tsai et al., 2002; Klein et al., 2005), porém, apesar do efeito positivo no aumento da resistência ácida, simultaneamente, houve formação indesejável de ablações, trincas e fissuras na superfície do esmalte.

No estudo de Esteves-Oliveira et al. (2008), os autores relataram que a redução da solubilidade ácida do esmalte pode ser obtida com *laser* pulsado de CO₂, 10,6 µm, com densidades de energia abaixo de 1 J/cm², sem qualquer alteração física da superfície, com um aumento máximo de temperatura de 2°C, a uma distância de aproximadamente 3 mm da superfície externa do esmalte. No ano seguinte, Esteves-Oliveira et al., 2009 reportaram ter conseguido 81% de aumento na resistência ácida de esmalte bovino após irradiação, *in vitro*, com *laser* de CO₂ pulsado com densidade de energia de 0,3 J/cm², duração de pulso de 5 µs, taxa de repetição de 226 Hz em 9 segundos de irradiação.

Alguns estudos já mostraram que a inibição da desmineralização do esmalte pelo *laser* de CO₂ pode ser potencializado quando da sua associação com o flúor (Tagomori; Morioka, 1989; Fox et al., 1992a; Hsu et al., 1998; Hsu et al., 2001; Hossain et al., 2002; Tepper et al., 2004; Rodrigues et al., 2006; Tagliaferro et al., 2007; Esteves-Oliveira et al., 2008; Chen; Huang, 2009). Acredita-se que isso pode estar relacionado com a capacidade do *laser* em aumentar a absorção do flúor pelos tecidos dentais (Chin-Ying et al., 2004; Tepper et al., 2004). Segundo Chin-Ying et al., em 2004, o tratamento com *laser* de alta potência associado ao flúor produz numerosos precipitados esféricos, morfologicamente semelhantes ao CaF₂, os quais serviriam de reservatório de flúor, favorecendo a precipitação de íons cálcio e flúor na superfície. Já Meurman et al., 1997, defende a hipótese de que há uma incorporação de flúor na estrutura cristalina do esmalte na forma de flúor fortemente ligado – fluorapatita - tornando-o mais resistente a desafios ácidos. Além disso, a formação de pequenas fendas e poros no substrato irradiado poderia facilitar a retenção e difusão de íons flúor no interior do tecido, dificultando a solubilização do substrato.

2.4 Laser de CO₂ (10,6 µm) na Prevenção de Erosão

Embora o entendimento dos efeitos do *laser* de CO₂ na inibição da cárie esteja em estágio mais avançado, poucos estudos investigaram o efeito deste *laser* na prevenção da erosão. O primeiro estudo a avaliar o efeito do *laser* de CO₂ na prevenção de erosão foi o de Wiegand et al. (2010). Os autores analisaram a influência *in vitro* do *laser* de CO₂ (10,6 µm; 10 µs; 50 Hz; 28,6 J/cm²) na eficácia do tetrafluoreto de titânio (TiF₄) e fluoreto de amina (AmF) em proteger esmalte e dentina contra a erosão. O desafio erosivo foi realizado durante 5 dias com ciclos de desmineralização com Sprite Zero[®] (pH 2,6, 4x/dia durante 90 segundos) e remineralização com saliva artificial (pH 7,0) durante 2 horas. Após o último desafio erosivo do ciclo, as amostras foram armazenadas em saliva artificial durante a noite. A perda de esmalte e dentina foi quantitativamente analisada através da perfilometria, a qual foi realizada em três momentos: após o pré-tratamento de superfície e após o 1º e 5º dia de ciclagem. Os resultados mostraram que o *laser* sozinho não foi capaz de inibir a erosão. O AmF diminuiu a erosão em esmalte e dentina, mas a irradiação com *laser* de CO₂ não melhorou a sua eficácia. O TiF₄, por sua vez, apresentou, isoladamente, capacidade limitada em prevenir erosão, porém, quando associado ao *laser*, teve sua eficácia significativamente aumentada.

Outros autores (Steiner-Oliveira et al., 2010) avaliaram *in vitro* se o *laser* pulsado de CO₂ (10,6 µm), associado ou não com prévia aplicação tópica de flúor, poderia aumentar a resistência do esmalte e da dentina à erosão. Os tratamentos de superfície foram: 1) aplicação de flúor fosfato acidulado (One Minute APF gel[®], contendo 1,23% de F, pH 3,5) por 1 minuto; 2) irradiação com *laser* de CO₂ (esmalte: 1 J/cm², 3W, 5 ms, 10 Hz e dentina: 0,6 J/cm², 2 W, 5 ms, 2 Hz); 3) aplicação do flúor, como descrito anteriormente, seguido da irradiação com *laser* de CO₂. O desafio erosivo foi realizado com ciclos de desmineralização (ácido cítrico a 0,3%, pH 2,45 por 5 minutos) e remineralização (saliva artificial por 60 minutos), 3x por dia durante 3 dias. A perda mineral, assim como a concentração de cálcio, fósforo e flúor nas soluções desmineralizadoras foram determinados após cada ciclo diário. Os resultados mostraram que o *laser* pulsado de CO₂ (10,6 µm) isoladamente não foi capaz de evitar erosão nas superfícies de esmalte ou dentina. A associação

do *laser* com o flúor apresentou efeito protetor, mas, segundo os autores, este efeito foi devido principalmente ao efeito de flúor.

No mesmo ano, Ramalho (2010) avaliou se o *laser* de CO₂ associado ou não ao flúor poderia prevenir a erosão ácida causada por ácido cítrico em esmalte, tanto *in vitro* como *in situ*. Quatro tratamentos foram testados: G1 – controle, sem tratamento; G2 – irradiação com *laser* de CO₂ com os parâmetros: 0,3 J/cm², 5 µs, 226 Hz; G3 – aplicação tópica de flúor (1,25% - 3 minutos); G4 – aplicação tópica de flúor + *laser* de CO₂. Os resultados mostraram que os grupos *laser* e flúor + *laser* apresentaram uma redução significativa ($p < 0,05$) na perda de estrutura de esmalte em todos os tempos, tanto no modelo *in situ* quanto *in vitro*. O grupo flúor apresentou uma redução significativa apenas no modelo *in vitro* ($p < 0,05$).

Esteves-Oliveira et al. (2011a) avaliaram *in vitro* se o *laser* de CO₂ seria capaz de prevenir amolecimento de superfície tanto de esmalte hígido como de esmalte erodido. Metade dos grupos foi submetida a diferentes tratamentos de superfície antes do desafio erosivo e a outra metade, após o desafio. O desafio erosivo foi realizado com imersão em ácido cítrico a 1% (pH 4,0) por 3 minutos e os tratamentos de superfície foram: 1) irradiação com *laser* de CO₂, 2) irradiação com *laser* de CO₂ seguida da aplicação de flúor gel (Elmex Gel[®], contendo 1,25% de F, pH 4,8 – 6,0) por 4 minutos; 3) aplicação do mesmo flúor gel seguida de irradiação com *laser* de CO₂; 4) aplicação do flúor gel e 5) lavagem da superfície com água destilada. A perda de mineral foi medida através da microdureza de superfície e a incorporação de fluoreto no esmalte também foi quantificada. Os resultados mostraram que a irradiação do esmalte com *laser* de CO₂ (10,6 µm, 0,3 J/cm², 5 µs, 226 Hz) não só reduziu 97% da perda mineral por erosão, como também aumentou, comparado aos valores iniciais, a dureza do esmalte previamente erodido *in vitro*.

Recentemente, Ramalho et al. (2012) analisaram *in vitro* o efeito da irradiação com *laser* de CO₂ (10,6 µm) com 5 µs de largura de pulso na prevenção da erosão do esmalte exposto a ácido cítrico 0,05 M (pH 2,3) durante 20 minutos, duas vezes/dia durante 5 dias. Os tratamentos de superfície foram: (L) irradiação com *laser* de CO₂ (0,3 J/cm², 5 µs, 226 Hz); (F) aplicação tópica de flúor 1,25% F⁻ (AmF/NaF) durante 3 minutos e (FL) aplicação de flúor seguida de irradiação com *laser* de CO₂ nos mesmos parâmetros mencionados anteriormente. Após dias 1, 3 e 5, a perda de substrato foi medida com o auxílio de perfilômetro digital. Os resultados mostraram que todos os tratamentos propostos apresentaram redução

significativa da perda de esmalte, em comparação com grupo controle, em todos os tempos investigados. Com isso, os autores puderam concluir que a irradiação com *laser* de CO₂ (0,3 J/cm², 5 μs, 226 Hz) pode reduzir efetivamente a perda de esmalte superficial após exposição ao ácido cítrico, *in vitro*.

Até a presente data, não existem resultados conclusivos que suportam o uso dos *lasers* de CO₂ na prevenção ou inibição da progressão da erosão dental, limitando o seu uso na prática clínica.

Dessa maneira, o objetivo deste estudo *in vitro* foi avaliar o potencial do *laser* pulsado de CO₂ (λ = 10,6 μm), associado ou não a diferentes produtos fluoretados, em inibir o amolecimento superficial de esmalte humano frente a um desafio erosivo.

Proposição

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo *in vitro* foi avaliar o potencial de um *laser* de CO₂ (10,6 µm) com pulsos curtos, associado ou não a diferentes produtos fluoretados, na inibição da desmineralização do esmalte dental humano quando submetido ao desafio erosivo.

Metodologia

4 METODOLOGIA

4.1 Aspectos Éticos

No presente estudo foram utilizados 104 terceiros molares humanos inclusos (90 foram destinados à fase experimental e 14 foram utilizados no estudo piloto) extraídos por motivos não relacionados a esta pesquisa. Todos os dentes, os quais foram estritamente utilizados para fins desta pesquisa, foram cedidos pelo Banco de Dentes Humanos (BDH) da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP) e com a prévia aprovação da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) (Protocolo n. 40/11 – Anexo A e Protocolo n. 453/2011 – Anexo B).

4.2 Local da Pesquisa

O presente estudo foi realizado no Departamento de Dentística da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (Brasil) (fase de preparo das amostras) e no Departamento de Dentística, Periodontia e Odontologia Preventiva da Faculdade de Odontologia da Universidade RWTH de Aachen (fase dos tratamentos de superfície e análise da microdureza de superfície) (Anexo C).

4.3 Desenho do Estudo

As unidades experimentais do presente estudo consistiram em 88 amostras de esmalte dental humano, aleatoriamente divididas em 8 grupos ($n = 11$), de acordo com o tratamentos de superfície apresentados no quadro 4.1. O fator em estudo foi o tratamento de superfície e a variável de resposta foi a microdureza superficial, avaliada quantitativamente através do teste de microdureza Knoop.

Grupos	Tratamentos de Superfície do Esmalte	Desafio ácido
1	Sem tratamento	
2	Aplicação de FFA (gel)	
3	Aplicação de AmF/NaF (gel)	
4	Aplicação de AmF/SnF ₂ (solução)	
5	Irradiação com <i>laser</i> de CO ₂	
6	Irradiação com <i>laser</i> de CO ₂ + Aplicação de FFA (gel)	
7	Irradiação com <i>laser</i> de CO ₂ + Aplicação de AmF/NaF (gel)	
8	Irradiação com <i>laser</i> de CO ₂ + Aplicação de AmF/SnF ₂ (solução)	

*FFA gel (Flúor Fosfato Acidulado - DFL[®]); AmF/NaF gel (Fluoreto de amina/Fluoreto de sódio – Elmex Gelée[®]); AmF/SnF₂ (Fluoreto de amina/Fluoreto estanhoso - Meridol[®]).

Quadro 4.1 – Descrição dos grupos experimentais do estudo, de acordo com os tratamentos de superfície do esmalte

4.4 Preparo das Amostras

Foram utilizados 44 dentes terceiros molares humanos hígidos e totalmente inclusos. Os dentes foram submetidos à raspagem com curetas periodontais e profilaxia com pedra pomes/água e taça de borracha. Com o auxílio de uma cortadeira automática (Isomet 1000[®], Buehler Ltda, Lake Buff, IL, EUA), as raízes dentais foram seccionadas no nível de junção cimento-esmalte e as porções coronárias foram lavadas em ultrassom (Kondortech[®], São Carlos, SP, Brasil) com água destilada e deionizada (ADD) por 10 minutos. Todos os espécimes foram armazenados em solução de timol 0,1%, pH 7,0, sob refrigeração (4°C), até o início da fase experimental, como objetivo de não desidratarem. Das faces vestibulares e linguais dos dentes foram obtidos 88 fragmentos de esmalte com dimensões aproximadas de 5 x 5 x 2 mm (largura x altura x espessura), com disco diamantado dupla face adaptado em peça reta de mão.

Com o auxílio de tubos de polivinilcianoacrilato (PVC) (2 cm de diâmetro e 1 cm de espessura), as amostras foram incluídas em resina epóxi (Release[®], São Paulo, SP, Brasil), manipulada de acordo com as instruções do fabricante. Após a

presa total da resina (24 h), cada bloco obtido foi planificado em uma politriz com discos abrasivos de óxido de alumínio (Struers®, Ballerup, Dinamarca) sob refrigeração, nas granulações de #1200, #2400 e #4000 e polido com disco de feltro e pasta diamantada abrasiva com 6 µm de granulação (Buehler®, Deutschand, EUA). Entre cada série de polimento, os espécimes foram lavados em ADD em lavadora ultrassônica (Kondortech®, São Carlos, SP, Brasil) por 3 minutos, para remoção de quaisquer debris da superfície. Todos os espécimes, devidamente limpos (Figura 4.1A), foram observados em lupa estereoscópica (aumento de 40x) para assegurar a ausência de qualquer defeito estrutural e, posteriormente, foram armazenados em ambiente fechado, úmido e sob refrigeração.

Em seguida, uma fita adesiva isolante (Scotch 3M®, Sumaré, São Paulo, Brasil) com 2,5 mm de diâmetro foi fixada no centro da superfície polida de esmalte (Figura 4.1B) e as amostras foram completamente cobertas com duas camadas de esmalte para unhas (Revlon®, Buenos Aires, Argentina) (Figura 4.1C). Após a secagem, a fita adesiva foi cuidadosamente removida com uma cureta plástica, deixando exposta uma janela de esmalte de aproximadamente 2,5 mm de diâmetro (Figura 4.1D). As superfícies foram limpas com algodão embebido em ADD para remover possíveis resíduos de adesivo e, então, todos os espécimes foram armazenados em 100% de umidade até o início do experimento. Todas as amostras do grupo controle foram armazenadas em ADD durante todo o experimento, até a leitura final de microdureza.

Figura 4.1 - Preparo das amostras: A – Amostra com superfície plana, paralela e polida, B – Disco adesivo com diâmetro de 2,5 mm colados no centro da superfície de esmalte; C – Superfície da amostra coberta com esmalte de unha; D – Após remoção do disco adesivo, amostra com janela de esmalte exposta para os tratamentos

4.5 Tratamento com Flúor

Os produtos utilizados nos grupos tratados com flúor foram (Figura 4.2):

- Grupos 2 e 6 – Flúor Fosfato Acidulado (FFA) em gel (DFL[®] Gel contendo 1,23% NaF, pH 3,6 - 3,9) por 4 minutos;
- Grupos 3 e 7 - AmF/NaF em gel (Elmex[®] Gel, 1,25% AmF, pH 4,8 - 6,0) por 4 minutos;
- Grupos 5 e 8 – Solução de AmF/SnF₂ (Meridol[®] Mouthrinse, 0,16% AmF e 0,05% SnF₂, pH 4,2) por 3 minutos.

Todos os produtos foram aplicados de acordo com as instruções do fabricante. Para melhor simular as condições clínicas, os géis de FFA e de AmF/NaF foram aplicados com o auxílio de aplicadores descartáveis, e as amostras tratadas com a solução de AmF/SnF₂ foram imersas por 3 minutos a 25°C em recipiente plástico contendo a solução, mantendo o conjunto sob constante agitação em mesa agitadora (GFL 1086[®], Burgwedel, Alemanha). Após os tratamentos com fluoretos, as amostras foram cuidadosamente secas com papel absorvente.

Nos grupos 6, 7 e 8, o produto fluoretado foi aplicado imediatamente após a irradiação com o *laser* de CO₂.

Figura 4.2 – Produtos fluoretados utilizados no estudo

4.6 Irradiação com *laser* de CO₂

A irradiação das amostras foi realizada com um *laser* pulsado de CO₂ com comprimento de onda de 10,6 μm (modelo Rofin SC x 30, Rofin-Sinar *Laser* GmbH, Hamburgo, Alemanha) (Figura 4.3), pertencente ao Departamento de Dentística, Periodontia e Odontologia Preventiva, RWTH, Aachen, Alemanha. O equipamento *laser* utilizado é um protótipo de *laser* de CO₂ que permite a utilização de curtas larguras de pulso (dezenas de microsegundos) e, conseqüentemente, menores densidades de energia. Isso gera um aquecimento superficial mais localizado com menor propagação de calor para o interior do substrato e menores riscos de danos pulpare.

A distância de irradiação foi de 19,8 cm e o diâmetro do feixe de 2,5 mm na superfície da amostra. A energia emitida pelo *laser* foi mensurada antes da irradiação de cada grupo e em um intervalo entre quatro amostras, utilizando um medidor de energia (Coherent FieldMaster GS + Detector LM45, Coherent, EUA) (Figura 4.4). Antes da irradiação, as amostras foram secas com papel absorvente. Os parâmetros utilizados foram: 0,3 J/cm², 226 Hz, 15 μs /pulso, 15 mJ e 9 segundos de irradiação.

Figura 4.3 - *Laser* de CO₂ (Rofin model SC x 30, Rofin-Sinar *Laser* GmbH, Hamburg, Alemanha)

Figura 4.4 - Medidor de energia (Coherent FieldMaster GS + Detector LM45, Coherent, EUA)

4.7 Desafio Erosivo

Após os tratamentos de superfície, cada grupo foi imerso em 220 mL de ácido cítrico a 1% (pH 4,0), a 30°C, sob constante agitação em mesa agitadora (GFL 1086®, Burgwedel, Alemanha) por 3 minutos. Todas as amostras foram lavadas em ADD por 30 segundos e secas com papel absorvente (Lussi et al., 2008). Após o desafio erosivo, as amostras foram armazenadas em solução mineral supersaturada [1,5 mmol/L de cloreto de cálcio (CaCl_2), 1,0 mmol/L KH_2PO_4 , 50 mmol/L de cloreto de sódio (NaCl), pH 7,0] (Zero et al., 1990) por 24 horas.

4.8 Avaliação da Microdureza de Superfície

As amostras, devidamente planas, paralelas e polidas, tiveram sua microdureza superficial mensurada antes (*baseline*) e após o desafio erosivo, utilizando-se um microdurômetro (Zwick®, Zwick GmbH & Co. KG, Alemanha) com penetrador Knoop (Figura 4.5), com carga estática de 0,49 N (50 g) aplicada durante 20 segundos (Featherstone et al., 1983; Featherstone, 1992; Lussi et al., 2008;

Esteves-Oliveira et al., 2011a). Foram realizadas seis indentações em cada tempo, a 50 μm de distância uma da outra (Lussi et al., 1995), conforme ilustrado na Figura 4.6, e as médias dos valores de dureza de cada tempo foram consideradas para a análise estatística. O valor médio de microdureza Knoop (KHN) obtido no *baseline* foi de $355,39 \pm 27,90$. As medições das indentações foram feitas utilizando um microscópio e um *software* específico (DM 4000M, Leica, Wetzlar, Germany, and a4i Analysis, Aquinto, Enfield, EUA).

Figura 4.5 – Ensaio de Microdureza Superficial. A) Microdurômetro da Zwick®; B) Penetrador Knoop perpendicular à superfície da amostra de esmalte

Figura 4.6 – Representação esquemática das indentações

4.9 Análise Estatística

Os dados foram analisados estatisticamente através da Análise de Variância ANOVA (um fator), utilizando-se o *software* SPSS, versão 17.0, para Windows. A comparação de valores entre grupos foi realizada através do Teste de Games-Howell, sendo considerado nível de significância de 5% (Apêndice A).

Resultados

5 RESULTADOS

A análise estatística dos dados de microdureza obtidos no presente estudo foi realizada considerando-se uma variável dependente (Microdureza Knoop) e um fator de variação (tratamentos de superfície) em oito níveis (controle, flúor gel de FFA, flúor gel de AmF/NaF, solução fluoretada de AmF/SnF₂, *laser* de CO₂, *laser* de CO₂ + gel de FFA, *laser* de CO₂ + gel de AmF/NaF e *laser* de CO₂ + solução de AmF/SnF₂).

Inicialmente foi realizada a avaliação da normalidade e homogeneidade dos dados. O teste de Shapiro Wilk não apresentou significância estatística, indicando que os resíduos apresentaram distribuição normal ($p = 0,10$) e, de acordo com o Teste de Levene, os valores de microdureza medidos após o desafio erosivo não apresentaram homogeneidade ($p = 0,04$).

Após a obtenção dos resultados das premissas de normalidade (Teste de Shapiro Wilk) e de homogeneidade (Teste de Levene), seguiu-se a aplicação do teste de ANOVA de fator único.

O resultado do teste de ANOVA foi significativo, indicando que houve pelo menos uma diferença estatisticamente significante entre os níveis do fator em estudo (tratamentos de superfície). O resultado também apontou que os tratamentos propostos exerceram influência nos resultados de microdureza de superfície.

Seguindo a significância do teste de ANOVA, as diferenças pontuais entre os níveis do fator “tratamentos de superfície” foram identificadas pelo teste complementar de múltipla comparação de Games-Howell (Tabela 5.1). Este teste foi aplicado devido à falta da premissa de homogeneidade, sendo as médias comparadas duas a duas, ajustando o erro a cada comparação.

Tabela 5.1 – Média e desvio padrão dos valores de microdureza Knoop (KHN) obtidos para cada grupo experimental e diferenças obtidas pelo teste de múltiplas comparações Games-Howell

Games-Howell		Agrupamentos		
Tratamentos	N	A	B	C
AmF/SnF ₂	11			305,53±17,69 ^c
Laser de CO ₂ + AmF/SnF ₂	11		328,64±26,87 ^{bc}	328,64±26,87 ^{bc}
Controle	11		332,64±26,65 ^{bc}	332,64±26,65 ^{bc}
Laser de CO ₂	11		341,09±23,82 ^b	
Laser de CO ₂ + AmF/NaF	11	374,91±42,06 ^{ab}	374,91±42,06 ^{ab}	
Laser de CO ₂ + FFA	11	392,83±24,87 ^a		
FFA	11	396,64±44,96 ^a		
AmF/NaF	11	403,55±25,00 ^a		

Letras diferentes significam diferenças estatisticamente significantes.

Os resultados do teste de Games-Howell, descritos na tabela 5.1 e ilustrado no gráfico 5.1, apontam que o tratamento com Flúor AmF/NaF apresentou o maior valor de microdureza superficial, seguido pelo tratamento com FFA e *laser* de CO₂ + FFA, não havendo diferenças estatísticas significativas entre eles. O grupo tratado com solução de AmF/SnF₂ apresentou o menor valor de microdureza superficial.

Dentre os grupos tratados apenas com flúor, o grupo AmF/SnF₂ apresentou valores estatisticamente diferentes dos grupos AmF/NaF e FFA, os quais foram estatisticamente semelhantes entre si.

Dentre os grupos tratados com *laser* de CO₂, os grupos *Laser* + AmF/SnF₂, *Laser* e *Laser* + AmF/NaF apresentaram valores estatisticamente semelhantes entre si, e o grupo *Laser* + FFA, mostrou ser estatisticamente semelhante aos grupos *Laser* + AmF/NaF, Flúor FFA e Flúor AmF/NaF.

Com exceção dos grupos Flúor AmF/NaF, FFA e *laser* de CO₂ + FFA, todos os outros grupos apresentaram valores médios de microdureza semelhantes ao grupo controle.

Gráfico 5.1 – Ilustração comparativa dos intervalos de confiança de 95% dos grupos experimentais

Discussão

6 DISCUSSÃO

Nos últimos anos, o interesse em relação à erosão de esmalte vem se expandindo em virtude de resultados de estudos epidemiológicos que indicam um aumento na prevalência desse tipo de patologia, principalmente por causa do aumento da longevidade da população brasileira e das mudanças de hábitos alimentares da população, a qual vem consumindo indiscriminadamente bebidas e alimentos ácidos. Isso desencadeia extenso interesse clínico porque a erosão, quando não tratada em seus estágios iniciais, pode levar a perdas irreversíveis do tecido duro dental (Lussi et al., 2011).

Embora vários tratamentos sejam indicados, nenhum deles ainda é capaz de inibir completamente a desmineralização da superfície de esmalte diante de desafios ácidos agressivos. Quando o estudo aborda lesão de erosão, o desafio ácido normalmente é realizado com ácido cítrico puro, refrigerantes (Coca-Cola® ou Sprite®: pH 2,3 – 3,2) ou sucos de fruta (pH 3,0 – 4,0) (Young; Tenuta, 2011). Considerando o objetivo principal do presente estudo, que foi avaliar a eficácia de diferentes terapias em lesões incipientes de erosão, o desafio ácido foi realizado com uma única exposição ao ácido cítrico a 1% (pH 4,0), por 3 minutos (Esteves-Oliveira et al., 2011a) visando promover apenas um amolecimento na superfície.

Neste estudo, o ácido cítrico foi escolhido como solução desmineralizadora do esmalte por ser comumente encontrado em bebidas à base de frutas e refrigerantes e, sob determinadas condições, apresentar alto potencial erosivo. Segundo Hjortsö et al. (2009), o ácido cítrico é considerado ideal quando o objetivo é avaliar o potencial de fluoretos em prevenir erosão de esmalte. Quanto ao tempo de exposição na cavidade bucal, o período em que o pH permanece baixo após o consumo de uma bebida ácida é de aproximadamente 2 minutos (Millward et al., 1997) e, portanto, recomenda-se que, para a realização de estudos *in vitro* no qual o objetivo seja a formação de uma lesão de erosão incipiente, a exposição ao ácido também seja por tempo reduzido (Young; Tenuta, 2011). A irradiação com *laser* de CO₂ e os tratamentos com flúor foram aplicados uma única vez, com o intuito de melhor simular as condições clínicas, quando o profissional decide por realizar o tratamento em apenas uma sessão de atendimento (Wiegand et al., 2010).

Quanto à escolha do substrato, foram utilizados terceiros molares humanos totalmente inclusos, com o objetivo de minimizar a influência de variáveis como mudanças pós-eruptivas na composição do esmalte ou preparo de amostras de diferentes grupos de dente, o que dificultaria a interpretação e comparação dos resultados (Ganss et al., 2000).

O método de avaliação selecionado para avaliar os efeitos dos diferentes tratamentos de superfície do esmalte erodido foi a microdureza de superfície. Esta consiste em um método indireto bastante utilizado para avaliação do conteúdo mineral antes e após episódios de desmineralização e remineralização do esmalte e, além disso, apresenta sensibilidade suficiente para permitir observar estágios iniciais da erosão de esmalte, quando este se encontra apenas com amolecimento da superfície externa, sem perda quantitativa de tecido mineralizado (Zero et al., 1990; Barbour; Rees, 2004; Stenhagen et al., 2010). Utilizou-se penetrador Knoop com carga estática de 50 gramas durante 20 segundos, conforme reportado por estudos prévios (Zero et al., 1990; Featherstone, 1992; Lussi et al., 1993; Lussi et al., 2008; Esteves-Oliveira et al., 2011a).

O processo de erosão se inicia com desmineralização parcial da superfície do esmalte, o que resulta na diminuição de sua dureza. Considerando que os estágios iniciais da desmineralização não são clinicamente detectáveis, maior ênfase deverá ser dada nas estratégias de prevenção e/ou inibição da perda de esmalte (Ganss et al., 2001; Amaechi; Higham, 2005; Lussi et al., 2011).

O uso de produtos fluoretados como meio de prevenir ou reduzir a perda mineral nos estágios iniciais da erosão, causada por ácidos extrínsecos, vem sendo estudado há décadas, mas segundo Ganss et al. (2008), a eficácia destes fluoretos depende essencialmente da natureza do composto fluoretado. Por esta razão, considerou-se, no presente estudo, a avaliação dos efeitos de diferentes produtos fluoretados, associados ou não à irradiação com *laser* de alta potência de CO₂, sobre a redução da perda mineral do esmalte dental submetido ao desafio erosivo.

Evidências *in vitro* mostram que o pré-tratamento do esmalte com SnF₂ pode proteger a superfície do esmalte, inibindo ou reduzindo o efeito erosivo dos ácidos, através da formação de uma película, chamada por alguns autores de “*glaze*”, com baixa taxa de dissolução (Ganss et al., 2001; Ganss et al., 2008; Hove et al., 2006; Hjortsjö et al., 2009; Wiegand et al., 2009; Schlueter et al., 2009a; Schlueter et al., 2009b; Ganss et al., 2011). Wei (1974) e Babcock (1978) afirmaram que íons Sn⁺⁺

reagem com a hidroxiapatita pura do esmalte superficial, reduzindo sua solubilidade através da precipitação de sais Sn_2OHPO_4 , $\text{Sn}_3\text{F}_3\text{PO}_4$, $\text{Ca}(\text{SnF}_3)_2$ ou CaF_2 . Schlueter et al. (2009b) sugerem que o tratamento do esmalte com soluções à base de SnF_2 favorece a incorporação de íons Sn^{++} e, talvez íons F^- , no substrato dental, resultando em uma zona superficial estruturalmente modificada, rica em estanho e resistente a desafios ácidos.

Contrariando a literatura citada, os resultados de microdureza deste estudo revelaram que o tratamento menos efetivo na inibição da erosão foi com o uso da solução de fluoreto estanhoso. Nesse sentido, algumas hipóteses podem ser levantadas. A primeira delas está relacionada com a possível diferença entre a eficácia de flúor em gel e flúor em solução (Vieira et al., 2005). Mesmo com a limpeza da superfície do esmalte após a aplicação dos produtos fluoretados, o produto em gel pode ter permanecido por mais tempo na superfície do que os produtos em solução, e ter apresentado resultado melhor, pois períodos mais prolongados de contato entre o produto e o substrato resultam em maior absorção de flúor e, conseqüentemente, maior formação de sais de CaF_2 (Vieira et al., 2005). A segunda hipótese baseia-se na concentração de flúor no produto e no tempo de exposição do substrato dental ao produto. O produto à base de SnF_2 possui a menor concentração de flúor (0,16% AmF e 0,05% SnF_2) em relação aos géis à base de AmF (1,25% F^-) e de FFA (1,23% F^-) e, além disso, foi aplicado apenas uma vez na superfície do esmalte. Acredita-se que quanto maior a concentração de flúor e o tempo de exposição do substrato dental ao mesmo, maior a resistência ácida do esmalte em relação à erosão (Ganss et al., 2001; Ganss et al., 2004; Austin et al., 2010; Ren et al., 2011). O tempo de aplicação executado neste estudo (3 minutos) provavelmente não foi suficiente para a formação da camada protetora composta de alguns sais. No estudo de Wei (1974), os produtos da reação do fluoreto estanhoso a 10% com a hidroxiapatita do esmalte apenas foram visualizados com o aumento do tempo de imersão, ou seja, o tempo de aplicação de 4 minutos não foi suficiente para visualização, em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), dos sais. Além disso, a variedade de metodologia dos estudos utilizando diferentes produtos, com diferentes pH e formulações (géis, soluções e vernizes), torna mais difícil a interpretação dos resultados em relação ao papel do composto fluoretado (Ganss et al., 2008).

Por outro lado, os géis de AmF/NaF e FFA, independente da irradiação com *laser* de CO₂, mostraram-se mais efetivos em controlar a progressão da erosão de esmalte em relação aos outros tratamentos de superfície. O efeito anti-erosivo destes compostos pode ser justificado pela formação de uma camada de precipitados esféricos de CaF₂ que se forma após as aplicações tópicas dos produtos (Schlueter et al., 2009b). Esta camada age como um reservatório de íons flúor, os quais induzem a formação de fluorapatita, ou como uma barreira física capaz de isolar o esmalte de futuros ataques ácidos (Ren et al., 2011), prevenindo, desta forma, a perda de minerais. Outros autores, como Sorvari et al. (1994), também utilizaram NaF em seus estudos e mostraram que o tratamento tópico do esmalte humano com NaF solução (1,2% de F⁻) por 48 h causou um aumento significativo da dureza do esmalte quando comparado com o valor inicial mensurado, sendo, portanto, capaz de inibir o amolecimento de superfície e proteger o esmalte da erosão durante subsequente exposição *in vitro* a um refrigerante tipo cola.

Em relação ao uso de *lasers* de alta potência, estudos têm mostrado resultados promissores com os *lasers* de CO₂ em aumentar a resistência ácida do esmalte dental (Featherstone; Nelson 1987; Fox et al., 1992a,b; Kantorowitz et al., 1998; Hsu et al., 2000; Steiner-Oliveira et al., 2006). Os possíveis mecanismos envolvidos no aumento da resistência ácida do esmalte são a diminuição da permeabilidade do esmalte, dificultando a difusão de ácidos para o interior do tecido, e a diminuição da solubilidade do esmalte como consequência de uma alteração na fase mineral do dente, ambos contribuindo para um substrato menos solúvel (Stern et al., 1972; Nelson et al., 1987; Steiner-Oliveira et al., 2006). O *laser* de CO₂ produz radiação na região do infravermelho, o qual coincide com as bandas de absorção do fosfato (Featherstone et al., 1998). Isso significa que a irradiação com *laser* de CO₂, com parâmetros seguros e efetivos de irradiação, é capaz de estimular termicamente a transformação de hidroxiapatita carbonatada em hidroxiapatita pura, a qual é mais ácido-resistente (Meurman et al., 1997).

Empregou-se neste estudo um protótipo de *laser* pulsado de CO₂ com comprimento de onda de 10,6 µm. Os parâmetros de irradiação utilizados nesta pesquisa basearam-se em estudos prévios reportados na literatura (Esteves-Oliveira et al., 2011a,b; Ramalho et al., 2012). Os autores observaram que o *laser* pulsado de CO₂ com 0,3 J/cm², 5 µs, 226 Hz não só reduziu 97% da perda mineral do esmalte submetido ao desafio erosivo, como também foi capaz de aumentar a

dureza do substrato previamente erodido *in vitro*. Entretanto, os resultados de microdureza do presente estudo revelaram que a irradiação com densidade de energia $0,3 \text{ J/cm}^2$ e duração de pulso de $15 \text{ }\mu\text{s}$ no esmalte dental não promoveu significativo efeito preventivo da erosão dental quando comparado ao grupo controle, o qual não foi submetido a qualquer tratamento preventivo de superfície. Diferenças específicas nos parâmetros de irradiação e/ou na metodologia empregada em cada estudo podem justificar este resultado controverso encontrado. A primeira diferença está na duração de pulso empregada no presente estudo ($15 \text{ }\mu\text{s}$), a qual foi maior que a utilizada por Esteves-Oliveira et al. (2011a,b) correspondente à $5 \text{ }\mu\text{s}$. Além disso, o polimento da superfície do esmalte dental durante o preparo das amostras pode alterar significativamente o resultado, uma vez que, quando não se é possível controlar a quantidade de desgaste por limitações técnicas, a exposição de uma camada mais profunda de esmalte pode deixá-lo mais susceptível à desmineralização (Meurman; Frank, 1991), contribuindo para a divergência nos resultados entre diferentes estudos.

Considerando a eficácia limitada dos agentes fluoretados em inibir a perda mineral durante desafios erosivos (Larsen, 2001; Larsen; Richards, 2002) e que o flúor sozinho pode não ser eficaz contra a erosão de esmalte (Lussi et al., 2008), este estudo também avaliou o efeito da irradiação do *laser* de CO_2 combinada com diferentes produtos fluoretados na desmineralização do esmalte. Estudos prévios (Meurman et al., 1997; Hsu et al., 1998; Hossain et al., 2002; Ching-Ying et al., 2004; Tepper et al., 2004; Rodrigues et al., 2006; Wiegand et al., 2010) concluíram que pode haver um sinergismo entre ambos os tratamentos na redução da desmineralização do esmalte. No entanto, os resultados deste estudo não mostraram qualquer influência significativa do *laser* sobre os efeitos de produtos à base de AmF/NaF e de FFA. Dentre os grupos tratados com *laser* associado ao flúor, o grupo *Laser* + FFA foi o único que mostrou significativo potencial em inibir a erosão de esmalte. Concordando com os nossos resultados, Wiegand et al. (2010) concluíram que o AmF foi capaz de reduzir a erosão do esmalte (Sprite Zero®, pH 2,6, 4x/dia durante 90 segundos/5 dias), mas a irradiação com *laser* de CO_2 ($10,6 \text{ }\mu\text{m}$, $28,6 \text{ J/cm}^2$, $10 \text{ }\mu\text{s}$, 50 Hz) não potencializou a sua eficácia.

É importante ressaltar que, em virtude da variedade de parâmetros de irradiação e de metodologias empregadas na literatura, torna-se difícil fazer comparações precisas dos resultados desta pesquisa com estudos prévios. Além

disso, diferentemente dos dados publicados sobre o uso de *lasers* de alta potência na prevenção de lesões de cárie dental, poucos são os estudos que reportaram (Steiner-Oliveira et al., 2010; Wiegand et al., 2010; Esteves-Oliveira et al., 2011a,b; Ramalho et al., 2012), até a presente data, a ação do *laser* pulsado de CO₂, 10,6 µm, na prevenção da erosão de esmalte e, segundo Sorvari et al. (1994), o processo de erosão não deve ser comparado com o processo de cárie, já que os desafios ácidos na erosão são muito mais fortes.

Considerando as limitações dos estudos *in vitro*, os resultados mencionados neste trabalho apontam para diferentes possibilidades de tratamentos para a prevenção da erosão dental, que devem ser posteriormente consideradas para estudos *in situ* e *in vivo*. Além disso, novos parâmetros de irradiação com o *laser* de CO₂ (10,6 µm) e sua associação com os produtos fluoretados devem ser propostos e avaliados, em busca de abordagens efetivas para a erosão dental.

Conclusões

7 CONCLUSÕES

Dentro dos parâmetros de irradiação e dos limites deste estudo *in vitro*, os resultados indicam que os tratamentos com produtos fluoretados à base de AmF/NaF e FFA (associados ou não à irradiação prévia com *laser* de CO₂) realizados em esmalte dental humano foram efetivos no controle da progressão de erosão.

Referências

REFERÊNCIAS¹

Amaechi BT, Higham SM. Dental erosion: possible approaches to prevention and control. J Dent. 2005; 33:243-52.

Austin RS, Rodriguez JM, Dunne S, Moazzez R, Bartlett DW. The effect of increasing sodium fluoride concentrations on erosion and attrition of enamel and dentine *in vitro*. J Dent. 2010;38:782-7.

Babcock FD, King JC, Jordan TH. The reaction of stannous fluoride and hydroxiapatite. J Dent Res. 1978;57(9-10):933-8.

Barbour ME, Lussi A, Shellis RP. Screening and prediction of erosive potential. Caries Res. 2011;45(suppl 1):24-32. doi: 10.1159/000325917.

Barbour ME, Rees JS. The laboratory assessment of enamel erosion: a review. J Dent. 2004;32:591-602.

Bruun C, Givskov H. Formation of CaF₂ on sound enamel and in caries-like enamel lesions after different forms of fluoride applications *in vitro*. Caries Res. 1991; 25(2):96-100.

Büyükyilmaz T, Øgaard B, Rølla G. The resistance of titanium tetrafluoride- treated human enamel to strong hydrochloric acid. Eur J Oral Sci. 1997;105:473–7.

Chen C-C, Huang S-T. The effects of lasers and fluoride on the acid resistance of decalcified human enamel. Photomed Laser Surg. 2009;27(3):447-52.

Ching-Ying SH, Xiaoli G, Jisheng P, Wefel JS. Effects of CO₂ laser on fluoride uptake in enamel. J Dent. 2004;32:161-7.

Esteves-Oliveira M, Apel C, Gutknecht N, Velloso Jr WF, Cotrim MEB, Eduardo CP, Zezell DM. Low-fluence CO₂ laser irradiation decreases enamel solubility. Laser Phys. 2008;18:478-85.

¹ De acordo com Estilo Vancouver.

Esteves-Oliveira M, Pasaporti C, Heussen N, Eduardo CP, Lampert F, Apel C. Rehardening of acid-softened enamel and prevention of enamel softening through CO₂ laser irradiation. *J Dent.* 2011a;39(6):414-21.

Esteves-Oliveira M, Pasaporti C, Heussen N, Eduardo CP, Lampert F, Apel C. Prevention of toothbrushing abrasion of acid-softened enamel by CO₂ laser irradiation. *J Dent.* 2011b;39:604-11.

Esteves-Oliveira M, Zezell DM, Meister J, Franzen R, Stanzel S, Lampert F, Eduardo CP, Apel C. CO₂ laser (10.6µm) parameters for caries prevention in dental enamel. *Caries Res.* 2009;43:261-8.

Fan Y, Sun Z, Moradian-Oldak J. Effect of fluoride on the morphology of calcium phosphate crystals grown on acid-etched human enamel. *Caries Res.* 2009;43:132–6.

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

Featherstone JDB, Nelson DGA. Laser effects on dental hard tissue. *Adv Dent Res.* 1987;1:21-6.

Featherstone JD: Consensus conference on intra-oral models: evaluation techniques. *J Dent Res.* 1992;71:955–6.

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; 77:1397-403.

Featherstone JDB, Lussi A. Understanding the chemistry of dental erosion. *Monogr Oral Sci.* 2006;20:66-76.

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

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.* July 1992b; 71(7):1389-98.

Fried D, Glana RE, Featherstone JD, 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 $10.6 \mu\text{m}$ and at fluences of $1\text{--}20 \text{ J/cm}^2$. *Lasers Surg Med.* 1997;20(1):22–31.

Fried D, Ragadio J, Champion A. Residual heat deposition in dental enamel during IR laser ablation at $2.79, 2.04, 9.6$ and $10.6 \mu\text{m}$. *Lasers Surg Med.* 2001;29:221-9.

Ganss C, Klimek J, Schwarz N. A comparative profilometric *in vitro* study of the susceptibility of polished and natural human enamel and dentine surfaces to erosive demineralisation. *Arch Oral Biol.* 2000;45:897–902.

Ganss C, Klimek J, Schäffer U, Spall T. Effectiveness of two fluoridation measures on erosion progression in human enamel and dentine *in vitro*. *Caries Res.* 2001;35:325-30.

Ganss C, Klimek J, Brune V, Schürmann A. Effects of two fluoridation measures on erosion progression in human enamel and dentine *in situ*. *Caries Res.* 2004;38:561-6.

Ganss C, Lussi A, Klimek J. Comparison of calcium/phosphorus analysis, longitudinal microradiography and profilometry for the quantitative assessment of erosive demineralisation. *Caries Res.* 2005;39:178-84.

Ganss C, Schlueter N, Klimek J. Retention of KOH-soluble fluoride on enamel and dentine under erosive conditions – a comparison of *in vitro* and *in situ* results. *Arch Oral Biol.* 2007;52:9-14.

Ganss C, Schlueter N, Hardt M, Schattenberg P, Klimek J. Effect of fluoride compounds on enamel erosion *in vitro*: a comparison of amine, sodium and stannous fluoride. *Caries Res.* 2008;42:2-7.

Ganss C, Lussi A, Grunau O, Klimek J, Schlueter N. Conventional and anti-erosion fluoride toothpastes: effect on enamel erosion and erosion-abrasion. *Caries Res.* 2011;45:581-9.

Hjortsjö C, Jonski G, Thrane PS, Saxegaard E, Young A. The effects of acidic fluoride solutions on early enamel erosion *in vivo*. *Caries Res.* 2009;43:126-31.

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

Hossain MMI, 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. Apr 2002;20(2):77-82.

Hove L, Holme B, Øgaard B, Willumsen T, Tveit AB. The protective effect of TiF₄, SnF₂ and NaF on erosion of enamel by hydrochloric acid *in vitro* measured by white light interferometry. Caries Res. 2006;40:440–3.

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

Hsu CYS, 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, Wang Z, Powell GL, Otsuka M, Higuchi WI. Combined effects of laser irradiation/solution fluoride ion on enamel demineralization. J Clin Laser Med Surg. 1998;16(2):93-105.

Imfeld T. Dental erosion - definition, classification and links. Eur J Oral Sci. 1996; 104:151-5.

Kantorowitz ZVI, Featherstone JDB, Fried D. Caries prevention by CO₂ laser treatment: dependency on the number of pulses used. JADA. 1998 May;129:585-91.

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

Lagerweij MD, Buchalla W, Kohnke S, Becker K, Lennon AM, Attin T. Prevention of erosion and abrasion by a high fluoride concentration gel applied at high frequencies. Caries Res. 2006;40:148–53.

Larsen MJ. Prevention by means of fluoride of enamel erosion as caused by soft drinks and orange juice. Caries Res. 2001;35:229–34.

Larsen MJ, Richards A. Fluoride is unable to reduce dental erosion from soft drinks. *Caries Res.* 2002;36:75-80.

Levitch LC, Bader JD, Shugars DA, Heymann HO. Non-carious cervical lesions. *J Dent.* 1994; 22:195-207.

Lussi A, Jaeggi T, Schärer S. The influence of different factors on *in vitro* enamel erosion. *Caries Res.* 1993;27(5):387-93.

Lussi A, Jaeggi T, Jaeggi-Schärer S. Prediction of the erosive potential of some beverages. *Caries Res.* 1995;29(5):349-54.

Lussi A. Dental erosion: clinical diagnosis and case history taking. *Eur J Oral Sci.* 1996;104:191-8.

Lussi A, Hellwig E, Zero DT, Jaeggi T. Erosive tooth wear: diagnosis, risk factors and prevention. *Am J Dent.* 2006;19:319–25.

Lussi A, Megert B, Eggenberger D, Jaeggi T. Impact of different toothpastes on the prevention of erosion. *Caries Res.* 2008;42:62-7.

Lussi A, Jaeggi T. Erosion – diagnosis and risk factors. *Clin Oral Invest.* 2008;12 (Suppl 1):S5–S13. doi: 10.1007/s00784-007-0179-z.

Lussi A, Schlueter N, Rakhmatullina E, Ganss C. Dental Erosion – An overview with emphasis on chemical and histopathological aspects. *Caries Res.* 2011;45(suppl 1): 2-12.

Magalhães AC, Wiegand A, Rios D, Honório HM, Buzalaf MAR. Insights into preventive measures for dental erosion. *J Appl Oral Sci.* 2009;17(2):75-86.

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

Meurman JH, Frank RM. Progression and surface ultrastructure of *in vitro* caused erosive lesions in human and bovine enamel. *Caries Res.* 1991;25:81-7.

Meurman JH, ten Cate JM. Pathogenesis and modifying factors of dental erosion. *Eur J Oral Sci.* 1996;104:199-206.

Meurman JH, Hemmerlé J, Voegel J-C, Rauhamaa-Mäkinen R, Luomanen M. Transformation of hydroxiapatite to fluorapatite by irradiation with high-energy CO₂ laser. *Caries Res.* 1997;31:397-400.

Millward A, Shaw L, Harrington E, Smith AJ. Continuous monitoring of salivary flow rate and pH at the surface of the dentition following consumption of acidic beverages. *Caries Res.* 1997;31:44–9.

Nelson DGA, Jongebloed WL, Featherstone JDB. Laser irradiation of human dental enamel and dentine. *N Z Dent J.* 1986b;82:74-7.

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

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

Øgaard B. CaF₂ formation: cariostatic properties and factors of enhancing the effect. *Caries Res.* 2001;35:40–4.

Petzold M. The influence of different fluoride compounds and treatment conditions on dental enamel: a descriptive *in vitro* study of the CaF₂ precipitation and microstructure. *Caries Res.* 2001;35(suppl 1):45–51.

Ramalho KM. Prevenção da erosão em esmalte dental irradiado com laser de CO₂: estudo *in situ* [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2010.

Ramalho KM, Eduardo CP, Heussen N, Rocha RG, Lampert F, Apel C, Esteves-Oliveira M. Protective effect of CO₂ laser (10.6 µm) and fluoride on enamel erosion *in vitro*. *Lasers Med Sci.* 2012 feb 28. [epub ahead of print] doi: 10.1007/s10103-012-1071-x.

Ren Y-F, Liu X, Fadel N, Malmstrom H, Barnes V, Xu T. Preventive effects of dentrifice containing 5000 ppm fluoride against dental erosion *in situ*. J Dent. 2011; doi:10.1016/j.jdent.2011.07.009.

Rodrigues LKA, Nobre dos Santos M, Featherstone JDB. *In situ* mineral loss inhibition by CO₂ laser and fluoride. J Dent Res. 2006;85:617–21.

Rodrigues LKA, Nobre dos Santos M, Pereira D, Assaf AV, Pardi V. Carbon dioxide laser in dental caries prevention. J Dent. 2004;32:531–40.

Scheutzel P. Etiology of dental erosion – intrinsic factors. Eur J Oral Sci. 1996;104:178-90.

Schlueter N, Ganss C, Mueller U, Klimek J. Effect of titanium tetrafluoride and sodium fluoride on erosion progression in enamel and dentine *in vitro*. Caries Res. 2007;41:141-5.

Schlueter N, Duran A, Klimek J, Ganss C. Investigation of the effect of various fluoride compounds and preparations thereof on erosive tissue loss in enamel *in vitro*. Caries Res. 2009a;43:10-6.

Schlueter N, Hardt M, Lussi A, Engelmann F, Klimek J, Ganss C. Tin-containing fluoride solutions as anti-erosive agents in enamel: an *in vitro* tin-uptake, tissue loss, and scanning electron micrograph study. Eur J Oral Sci. 2009b;117:427-34.

Schlueter N, Klimek J, Ganss C. Efficacy of an experimental tin-F-containing solution in erosive tissue loss in enamel and dentine *in situ*. Caries Res. 2009c;43:415-21.

Schlueter N, Hara A, Shellis RRP, Ganss C. Methods for the measurement and characterization of erosion in enamel and dentine. Caries Res. 2011a;45(suppl 1):13-23.

Schlueter N, Klimek J, Ganss C. Efficacy of tin-containing solutions on erosive mineral loss in enamel and dentine *in situ*. Clin Oral Invest. 2011b;15:361-7.

Sorvari R, Meurman JH, Alakuijala P, Frank RM. Effect of fluoride varnish and solution on enamel erosion *in vitro*. Caries Res. 1994;28:227–32.

Stenhagen KR, Hove LH, Holme B, Taxt-Lamolle S, Tveit AB. Comparing different methods to assess erosive lesion depths and progression *in vitro*. Caries Res. 2010;44:555-61.

Steiner-Oliveira C, Nobre dos Santos M, Zero DT, Eckert G, Hara AT. Effect of a pulsed CO₂ laser and fluoride on the prevention of enamel and dentine erosion. Arch Oral Biol. 2010;55:127–33.

Steiner-Oliveira C, Rodrigues LKA, Soares LES, Martin AA, Zezell DM, Nobre dos Santos M. Chemical, morphological and thermal effects of 10,6 µm CO₂ laser on the inhibition of enamel demineralization. Dent Mater J. 2006;25(3):455-62.

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

Tagliaferro EPS, Rodrigues LKA, Nobre dos Santos M, Soares LES, Martin AA. Combined effects of carbon dioxide laser and fluoride on demineralized primary enamel: an *in vitro* study. Caries Res. 2007;41:74–6.

Tagliaferro EPS, Rodrigues LKA, Soares LES, Martin AA, Nobre dos Santos M. Physical and compositional changes on demineralized primary enamel induced by CO₂ laser. Photom Laser Surg. 2009;27(4):585-90.

Tagomori S, Morioka T. Combined effects of laser and fluoride on acid resistance of human dental enamel. Caries Res. 1989;23:225-31.

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;32:635-41.

ten Cate JM. Review on fluoride, with special emphasis on calcium fluoride mechanisms in caries prevention. Eur J Oral Sci. 1997;105:461–5.

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.

van Rijkom H, Ruben J, Vieira A, Huysmans MC, Truin GJ, Mulder J. Erosion-inhibiting effect of sodium fluoride and titanium tetrafluoride treatment *in vitro*. Eur J Oral Sci. 2003;111:253–7.

Vieira A, Ruben JL, Huysmans MCDNJM. Effect of titanium tetrafluoride, amine fluoride and fluoride varnish on enamel erosion *in vitro*. Caries Res. 2005;39: 371-9.

Young A, Tenuta LMA. Initial erosion models. Caries Res. 2011;45(suppl 1):33-42. doi: 10.1159/000325943.

Yu H, Attin T, Wiegand A, Buchalla W. Effects of various fluoride solutions on enamel erosion *in vitro*. Caries Res. 2010;44: 390-401.

Wei SHY. Scanning electron microscope study of stannous fluoride-treated enamel surfaces. J Dent Res. 1974;53(1):57-63.

Wiegand A, Bichsel D, Magalhães AC, Becker K, Attin T. Effect of sodium, amine and stannous fluoride at the same concentration and different pH on *in vitro* erosion. J Dent. 2009;37:591-5.

Wiegand A, Magalhães AC, Navarro RS, Schmidlin PR, Rios D, Buzalaf MA et al. Effect of titanium tetrafluoride and amine fluoride treatment combined with carbon dioxide laser irradiation on enamel and dentin erosion. Photom Laser Surg. 2010;28:219–26.

Zero DT, Rahbek I, Fu J, Proskin HM, Featherstone JD. Comparison of the iodide permeability test, the surface microhardness test, and mineral dissolution of bovine enamel following acid challenge. Caries Res. 1990;24(3):181–8.

Zero DT. Etiology of dental erosion – extrinsic factors. Eur J Oral Sci. 1996;104: 162-77.

Zero DT, Lussi A. Erosion—chemical and biological factors of importance to the dental practitioner. Int Dent J. 2005;55(4 Suppl 1):285–90.

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

Anexos

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

APROVAÇÃO
Protocolo 40/11
CAAE 0041.0.017.000-11
REGISTRO CONEP 16.522

O Comitê de Ética em Pesquisa da FOU SP comunica que a CONEP/CNS/MS **APROVOU** o protocolo de pesquisa "**Avaliação in vitro do potencial do laser de CO2 associado ao flúor em prevenir erosão em esmalte dental humano**", de responsabilidade das Pesquisadoras Thayanne Monteiro Ramos e Thaysa Monteiro Ramos, sob orientação dos Professores Doutores Patricia Moreira de Freitas, Carlos de Paula Eduardo e Marcela Esteves Oliveira, conforme cópia do parecer em anexo.

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

São Paulo, 24 de agosto de 2011.

Prof. Dra. Marcia Furillo Wanderley
Coordenadora do CEP-FOUSP

ANEXO B – Parecer do Conselho Nacional de Saúde/Comissão Nacional de Ética em Pesquisa:

**CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE
COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA**

PARECER nº 453/2011

Registro CONEP 16522 (Este nº deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)

Folha de Rosto – 416739

Processo nº 25000.097675/2011-55

Projeto de Pesquisa: *“Avaliação in vitro do potencial do laser de CO₂ associado ao flúor em prevenir erosão em esmalte dental humano”.*

Pesquisador Responsável: Thyanne Monteiro Ramos

Instituição: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo - FOU SP (CENTRO ÚNICO)

CEP de origem: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo - FOU SP

Área Temática Especial: Pesquisa com cooperação estrangeira

Patrocinador: FOU SP e recursos da pesquisadora responsável

Sumário geral do protocolo

Introdução: Fatores como mudanças de hábitos na população e o crescente diagnóstico de transtornos alimentares fizeram aumentar a incidência de lesões cervicais não-cariosas nos tecidos duros dentais. Definida como uma dissolução patológica do esmalte dental por ácidos de origem não bacteriana, a erosão dental é, hoje, uma preocupação. Durante muitos anos a Odontologia atuou de forma a amenizar a agressividade das lesões erosivas. No entanto, considerando a natureza multifatorial e irreversível na perda de substâncias dentais pela erosão, verifica-se a importância do desenvolvimento de um tratamento realmente eficaz na prevenção destas lesões, uma vez que mudanças de hábitos alimentares e de higiene dental, estimulação salivar, otimização dos regimes de flúor, restaurações e identificação de fatores de risco ainda não são capazes de impedir o surgimento da erosão dental.

Desde a admissão do uso de lasers em tecido dental, em 1964, vários estudos foram realizados e com eles o crescente conhecimento sobre os efeitos da interação dos lasers com os tecidos duros dentais. Os efeitos positivos da irradiação do laser de CO₂ na inibição da desmineralização do esmalte mostram resultados promissores do uso deste laser, associado ou não ao uso de flúor, na prevenção da cárie.

Os possíveis mecanismos envolvidos no aumento da resistência ácida do esmalte dental são diminuição da permeabilidade do esmalte dificultando a difusão de ácidos para o interior do esmalte e diminuição da solubilidade do esmalte como consequência de uma alteração na fase mineral do dente resultando num substrato menos solúvel. No entanto, apesar do efeito positivo na diminuição da perda mineral pelo dente, dependendo do comprimento de onda e da fluência da radiação laser utilizados, podem ocorrer alterações morfológicas indesejáveis relacionadas com danos térmicos à estrutura sob a forma de fissuras, trincas, *melting* superficial, ablação e carbonização do substrato.

Com o avanço da tecnologia, novos equipamentos laser surgiram e com eles a possibilidade de obter efeitos preventivos de cárie com fluências mais baixas e largura de pulso ultracurta, com o mínimo de danos térmicos. Com uma menor largura de pulso, a quantidade de energia necessária para modificar o tecido e promover o aumento da resistência ácida do esmalte é menor. Isso é possível graças aos 85% de conteúdo

Cont. Parecer CONEP nº 453/2011

mineral na estrutura do esmalte dental, o que favorece a alta absorção do laser de CO₂ emitido nos comprimentos de onda entre 9 e 11 µm.

Em relação à prevenção da erosão com irradiação laser, poucos estudos são encontrados na literatura. Desta forma, considerando-se a escassez de trabalhos que relacionem o laser de CO₂ com a prevenção de erosão dental, este estudo *in vitro* tem como objetivo avaliar o potencial de aumento da resistência ácida do esmalte dental através da irradiação com um equipamento laser de CO₂ (10,6 µm), recentemente introduzido na Odontologia (Luxar LX-20SP Novapulse Laser System), associando ou não o uso de flúor. Se esta tecnologia laser tornar-se disponível a um custo razoável e os resultados puderem ser aplicados na prática clínica, haverá um futuro promissor para este equipamento na prevenção da erosão.

Objetivos: Avaliar *in vitro*, o potencial do laser de CO₂ (10,6 µm), com diferentes parâmetros e associado ou não ao uso de flúor, em prevenir lesão de erosão em esmalte dental humano induzida por imersão em solução de ácido cítrico.

Desenho do estudo: A pesquisa será realizada em 104 terceiros molares humanos inclusos (90 serão utilizados no projeto de pesquisa propriamente dito e 14 serão utilizados previamente no estudo piloto.) extraídos por motivos não relacionados a esta pesquisa. Após o término do estudo, os fragmentos serão repatriados e armazenados em estufa até que sejam publicados os dados e posteriormente, serão descartados segundo a Resolução RDC no. 306 de 07 de dezembro de 2004.

Métodos: Para realização desse experimento, 90 terceiros molares humanos totalmente inclusos serão coletados e armazenados em solução de Timol 0,1%, pH 7, sob refrigeração (4°C), até o início da fase experimental, para não desidratarem. Os dentes serão submetidos à raspagem e polimento coronário com curetas periodontais e posterior profilaxia com pedra pomes/água e taça de borracha, terão suas raízes seccionadas com ponta diamantada em alta rotação, sob refrigeração e, em seguida, serão colocados em ultrassom com água destilada e deionizada (ADD) por 10 minutos.

Das faces lisas dos dentes serão obtidos 270 fragmentos de esmalte (Isomet, Buehler, Illinois, E.U.A.) (Labcut 1010 – Extec Corp., Enfield, CT, USA), com dimensões 5 x 5 x 2mm.

Todas as superfícies de esmalte serão polidas com lixa de carbetto de silício com granulação de #800, #1200 e #4000 (Buehler, Illinois, E.U.A.), seguido de polimento da superfície do esmalte com solução diamantada de 1 µm de granulação (Buehler, Illinois, E.U.A.). Entre cada série de polimento, os fragmentos serão lavados em ADD por 3 minutos, em ultrassom. As amostras, devidamente limpas, serão observadas em lupa estereoscópica (aumento de 30x) para garantir a ausência de defeitos estruturais e, posteriormente, armazenados novamente em ADD. Os fragmentos que apresentarem irregularidades no esmalte serão excluídos do estudo.

Os fragmentos serão distribuídos aleatoriamente em 10 grupos, sendo 08 grupos de tratamento de superfície com laser (n=13) e 02 grupos controles (n=13), sendo 01 positivo (flúor) e 01 negativo (sem tratamento). Os grupos controles não serão submetidos à irradiação com o laser de CO₂ (10,6 µm), apenas submetidos ao desafio erosivo e colocados em solução tampão.

Nesse estudo será utilizado o laser pulsado de CO₂ (Luxar LX-20SP Novapulse Laser System) com comprimento de onda de 10,6 µm, conforme ilustrado na figura 1. As condições de irradiação como potência média e taxa de repetição serão determinadas em estudo piloto, de maneira que fluências de 0,3 até 1,5 J/cm² possam ser testadas sem causar ablação ou fusão visíveis em lupas estereoscópica. A distância de irradiação será de determinada de forma a resultar em um feixe de aproximadamente 2,5 mm de diâmetro, na superfície da amostra. A energia emitida pelo laser será mensurada antes da irradiação de cada grupo e em um intervalo entre duas amostras, utilizando um medidor

Cont. Parecer CONEP nº 453/2011

de energia (Coherent Detector FieldMaster GS + LM45, coerente, EUA). Antes da irradiação, as amostras serão secas com papel absorvente.

As amostras terão suas microdurezas (n=13) medidas antes e após a irradiação, bem como após o desafio erosivo, o qual será realizado com imersão em solução de ácido cítrico 1%. A microscopia eletrônica de varredura (n=2) permitirá a observação das alterações da morfologia superficial antes e após o desafio erosivo. Por último, a perfilometria (n=10) será utilizada para avaliação quantitativa das alterações na superfície do esmalte submetido a diferentes tratamentos. Os resultados obtidos serão avaliados de acordo com os conceitos da estatística clássica.

Local de realização

Trata-se de um projeto nacional e unicêntrico, com cooperação estrangeira. Além do Brasil a Alemanha participará do estudo. Nenhum sujeito será recrutado. Serão utilizados dentes cedidos pelo Banco de Dentes Humanos da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP) e com a concordância do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da mesma Instituição.

O presente estudo será realizado no Departamento de Dentística da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, Brasil, sob orientação da Profª. Drª. Patrícia Moreira de Freitas e no Departamento de Dentística, Periodontia e Odontologia Preventiva da Faculdade de Odontologia da Universidade RWTH de Aachen, sob co-orientação da Profª. Drª. Marcella Esteves Oliveira.

Apresentação do protocolo

Os seguintes documentos foram apresentados no CD-ROM do protocolo em tela: 01. Ofício impresso de encaminhamento pelo CEP de origem; 02. Folha de Rosto; 03. Parecer Consubstanciado; 04. Currículo do Pesquisador; 05. Justificativa para isenção do TCLE; 06. Cronograma de Execução da Pesquisa; 07. Orçamento Financeiro; 08. Lista dos países participantes; 09. Declaração de instituição coparticipante; 10. País de origem do projeto; 11. CAAE; 12. Projeto de Pesquisa.

Comentários e considerações

1. Tendo em vista que a Resolução CNS 441/2011, recentemente homologada, institui um conjunto de normas para a constituição de biobancos e estabelece o prazo de um ano para a adequação dos bancos de amostras biológicas já constituídos, recomenda-se que o CEP acompanhe a adequação do banco de dentes referido no projeto frente às normas instituídas pela Resolução CNS 441/2011.

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto, devendo o CEP verificar o cumprimento das questões acima, antes do início do estudo.

Situação: Protocolo aprovado com recomendação.

Brasília, 28 de julho de 2011.

Gysélle Saddi Tannous
 Coordenadora da CONEP/CNS/MS

ANEXO C - Declaração da Co-participação da Universidade de Aachen (Alemanha)

**UNIVERSITÄTSKLINIKUM
AACHEN**

Klinik für Zahnerhaltung, Parodontologie und Präventive Zahnheilkunde
Universitätsklinikum der RWTH - Pauwelsstraße 30 - D-52074 Aachen

Para
Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da
Universidade de São Paulo
Av Prof. Lineu Prestes, 2227
05508-000 São Paulo-SP
Brasil

**Klinik für Zahnerhaltung,
Parodontologie
und Präventive Zahnheilkunde**
Komm. Direktor:
Univ.-Prof. Dr. med. dent. Stefan Wolfart

**MEDIZINISCHE FAKULTÄT
RWTH AACHEN**

D-52074 AACHEN
Pauwelsstraße 30
Telefon: (0241) 80 88 241
Telefax: (0241) 80 82 410
E-mail: swolfart@ukaachen.de

Ihr Zeichen
Ihr Schreiben vom
Unser Zeichen
Datum: **01. 03. 2010**

DECLARAÇÃO DA INSTITUIÇÃO COPARTICIPANTE

“Esta instituição está ciente de suas co-responsabilidades como instituição co-participante do projeto de pesquisa intitulado “ *Avaliação in vitro do potencial do laser de CO₂ associado ao flúor em prevenir erosão em esmalte dental humano* de autoria da pesquisadora Thayanne Monteiro Ramos, aluna regularmente matriculada no Programa de Pós-Graduação em Odontologia, área de concentração em Dentística, da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (USP), sob orientação da Professora Doutora Patrícia Moreira de Freitas, Professora Titular do Departamento de Dentística da Faculdade de Odontologia da USP, Brasil e supervisão da Profa. Dra. Marcella Esteves-Oliveira, Professora do Departamento de Dentística, Periodontia e Odontologia Preventiva da Universidade RWTH de Aachen, Alemanha. Declaro conhecer e cumprir as Resoluções Éticas Brasileiras, em especial a Resolução CNS 196/96.

Dr. med. dent. Marcella Esteves Oliveira
Klinik für Zahnerhaltung, Parodontologie und
Präventive Zahnheilkunde
Universitätsklinikum - RWTH Aachen
Pauwelsstr. 30, 52074 Aachen
Deutschland

Apêndice

APÊNDICE A – Análise Estatística

Tabela 5.1 - Parâmetros estatísticos e estatística descritiva dos dados experimentais

Tratamentos	N	Média	DP	EP	Lim.Inf (95%)	Lim.Sup. (95%)	Mínimo	Máximo
Controle	11	332,64	26,65	8,04	314,73	350,54	291,00	369,00
FFA	11	396,64	44,96	13,56	366,43	426,84	303,00	464,00
AmF/NaF	11	403,55	25,00	7,54	386,76	420,35	377,00	441,00
AmF/SnF ₂	11	305,53	17,69	5,33	293,64	317,41	269,00	332,00
Laser de CO ₂ + FFA	11	392,83	24,87	7,50	376,12	409,53	342,00	432,00
Laser de CO ₂ + AmF/NaF	11	374,91	42,06	12,68	346,65	403,17	291,00	430,00
Laser de CO ₂ + AmF/SnF ₂	11	328,64	26,87	8,10	310,58	346,69	279,00	369,00
Laser de CO ₂	11	341,09	23,82	7,18	325,09	357,09	318,00	396,00

DP= Desvio-Padrão; **EP** = Erro- Padrão; **Lim.Inf(95%)** = Limite inferior do intervalo de Confiança de 95%;

Lim.Sup(95%) = Limite Superior do Intervalo de Confiança de 95%. **Min** = Mínimo; **Max** = Máximo

Tabela 5.2 - Análise de Variância de fator único para a variável Microdureza Knoop

Fonte de Variação	SQ	Gl	QM	F	Sig(p).	F crit
Entre Grupos	105534,42	7	15076,35	16,42	5,06E-122	2,13
Dentro (Resíduo)	73472,544	80	918,41			
Total	179006,96	87				

SQ = Soma dos Quadrados; **gl** = Graus de Liberdade; **QM** = Quadrado Médio; **F** = Valor F calculado; **Fcrit**=Valor F crítico.

Alfa = 0,05.