DEBORA SOARES GERALDO

ADERÊNCIA BACTERIANA À SUPERFÍCIE DE ESMALTE DENTAL IRRADIADO POR LASERS COM PARÂMETROS PARA PREVENÇÃO DE CÁRIE

São Paulo
2009

Debora Soares Geraldo

Aderência bacteriana à superfície de esmalte dental irradiado por lasers com parâmetros para prevenção de cárie

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

Orientadora: Profa. Dra. Patrícia Moreira de Freitas

São Paulo

2009

FOLHA DE APROVAÇÃO

Soares-Geraldo D. Aderência bacteriana à superfície irradiada com lasers com parâmetros para prevenção de cárie [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2009

São Paulo, ___/___/2010

Banca Examinadora

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

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

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

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

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

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, meus maiores exemplos de vida.

Agradeço do fundo do meu coração por sua verdade, seu digno caráter, sua força, garra, determinação, humildade e companheirismo, sempre recheados de muito amor e bom humor. Agradeço sobremaneira pelos princípios bíblicos que souberam com uma mágica encantadora instaurar em meu coração, princípios que de uma forma fantástica guiam minha vida.

Serei eternamente grata por vossa paciência, dedicação, compreensão, por darem tudo de si em prol de minha pessoa. Agradeço pelos infindáveis votos de confiança, por acreditarem, incentivarem e também por estarmos sempre unidos para recolhermos as dádivas resultantes.

“Vocês sabem que são a peça chave e a razão de tudo ter sido possível.”

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao meu irmão Igor, por sempre de uma forma ou de outra me impulsionar. Por todos os momentos prazerosos quer curtimos juntos em nossa vida.

À Mila por fazer parte da nossa família e nos dar o presente mais esperado por todos: Nicolas.

Nicolas, a pessoa certa na hora certa, quanta alegria e esperança trouxe a todos nós. Alguém que me faz a cada dia sorrir e chorar, aprender e amar. Me faz voltar a ser criança, traz toda a pureza e alegria num simples gesto, num olhar, num sorriso.

Paty Mercedes, quatro anos de amizade que parecem que foram uma vida toda. Que sintonia linda, quanta energia, quanto amor e alegria sinto por tê-la em minha vida. Obrigada por existir, por me apoiar, por me introduzir a um mundo novo e proporcionar uma das mudanças mais importantes da minha vida: English Congregation. Obrigada por ser quem tu és. Nossa amizade é para sempre.

Aos meus queridos amigos, a família que escolhi, que tornaram esta jornada mais leve e passível de ser concluída: Patrícia Mercedes, Giuliano, Solange, Vanessa, Tepinha & Sam, Claudinha, Rita, Marcelo, Andreza, Sillas & Renata, Viviane, Cíntia, Elaine, Carol, Patrícia, Gilson & Cia. Cada um com seu jeito todo especial… Obrigada por serem tão presentes em minha vida e por trazerem a ela cada dia uma experiência marcante, inesquecível. Cada momento que juntos passamos estão gravados em meu coração, e muito mais ainda está por vir.

Aos meus queridos colegas de Pós Graduação:

Amandinha, a vida sempre reserva pessoas especiais para momer especiais. Nossos 7 anos de convívio me fizeram admirá-la de maneira inimaginável. Quanta força de vontade, determinação, atitude, responsabilidade, combinados com uma paciência imensa e com uma serenidade encantadora. Minha eterna parceira de clínicas, estágios, consultório, cirurgias (nosso timing perfeito), cursos, congressos, viagens, sucessos, "furadas", esportes, assuntos sérios, "primeiro de Abril" e muitas gargalhadas. Saiba que estes anos não teriam sido tão significativos sem a sua presença em minha vida. Agradeço por tudo o que representa para mim, passado, presente e futuro. Digo sem receio que você é a pessoa dentro desta instituição, da qual eu mais me orgulho de ter conhecido, e com certeza absoluta uma amiga verdadeira quer levo pra toda vida. Você tem um futuro brilhante pela frente. E estarei sempre na platéia da vida para lhe aplaudir de pé.

Bru e Jú. Minha Turma 93... Obrigada por tudo o que representam para mim. Obrigada pela amizade, companheirismo dia a dia… 7 anos… mas devo admitir que a Pós-graduação nos uniu sobremaneira. Fico muito feliz de saber quer tenho amigas com as quais posso contar em momentos de alegria e tristeza, amigas para desfrutar de momentos lindos, e amigas pra sofrer comigo horas a fio no laboratório ou em atividades que não tinham a menor obrigação de estar lá, mas estavam para me apoiar. Além disso, com vocês aprendi algo importante: "Quando se empenhar por algo, e no fim descobrir que é algo que não deseja, não se decepcione, pois esta certeza já te leva a algum lugar."

Yuri, tão querida. A parte mais ativa das "Luluzinhas Running Team". Quanta competência, disciplina e perfeição em tudo o que faz. Quanto amor e carinho

demonstra por sua família, por seus amigos e por seu trabalho. Quanta alegria. Desde já, saudades de nossos turnos da noite, trabalho pesado, concentração, Office novo, Photoshop, animações, novas instalações no Pedro, musicalidade, chazinhos, bolachinhas e coreografias. Quem disse quer seria fácil? Definitivamente não, mas conseguimos dar nosso toque especial a todo processo, tornando-o possível. Obrigada por tudo o que fez e por tudo o quer representa para mim. Pra sempre em meu coração.

Washington, obrigada por tudo, pelo profissionalismo, amizade e conhecimento quer não retém para si, mas quer tem o prazer de compartilhar com os demais. Aprendi muito com você, muitíssimo obrigada. Sucesso.

Simone, Lú, Gí, Carol, Letícia Pan, Leila, Camilinha, Milinha, Dênis, Fer, Sérgio, saiba quer foi um prazer compartilhar estes anos e tantas experiências novas com todos vocês, cada um a seu jeito. Vocês são para mim um exemplo de que profissionalismo e competência se comprovam na prática, no convívio diário, nas atitudes, na ética moral e profissional e não em Q.I. ou números. Nunca percam sua essência e continuem a primar pela qualidade, esta se prova a escolha mais certa a logo prazo.

Ao Thomas…

Esta vida é realmente muito interessante, quando menos se espera, nos vemos surpreendidos com uma dádiva.

Agradeço a ti meu Amor, por me fazer enxergar que “Há muito mais nesta vida do que sonha nossa vã filosofia.”

Agradeço a Deus dia após dia, mesmo estando a 10.000 km de distância, por tê-lo em minha vida, por estar sempre presente. Por me amar, me apoiar, por ser meu melhor amigo, conselheiro, instrutor de matemática, estatística, Word, Excel e afins. Por passar horas me ouvindo falar de “Caries Prevention”, “Laser”, com a maior atenção e paciência do mundo, por passar horas pela madrugada a fora me ajudando em correções do trabalho de dissertação ou dando apoio moral via internet enquanto eu realizava minhas atividades intermináveis.

Obrigada pelas palavras e atos de amor e carinho quer me sustentaram de maneira grandiosa em momentos nada fáceis vividos durante todo o período de Pós-Graduação. Obrigada pelo seu bom humor adorável, contagiante quer tanto me faz bem. Além da criatividade fantástica e surpresas inesquecíveis.

Obrigada por sua paciência e compreensão essenciais para nossas vidas.

De você não se poderia esperar nada menos do que isso.

Te amo

AGRADECIMENTOS

À Prof. Patrícia Moreira de Freitas pela colaboração na elaboração do projeto e pela orientação deste Trabalho de Pesquisa.

À Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo- FOUSP, representada por seu diretor, Prof. Dr. Carlos de Paula Eduardo ao qual agradeço por seus pensamentos.

À Prof. Ana Cecília Correia Aranha pelo privilégio de ter seu companheirismo e amizade. Aprendi muitíssimo com você e aprendo mais a cada dia. Sua dedicação, iniciativa, prontidão e profissionalismo em tudo o que faz são notáveis e louváveis. Com certeza, um exemplo como ser humano e profissional a ser seguido de perto.

À Prof. Márcia Martins Marques pela excelente direção desenvolvida na pós-graduação, por todo seu conhecimento e prontidão em ajudar a todos. Agradeço imensamente pela ajuda na execução deste projeto, desde itens de consumo até opiniões importantes no delineamento experimental e realização da tese. Uma profissional de visão, foco e competência inquestionável, uma energia contagiante. Um ser humano que nasceu para o que faz, que impõe seus próprios limites e demonstra respeito aos outros e a si próprio.

Ao Laboratório de Laser em Odontologia que tornou possível a realização deste trabalho deixando à disposição dos alunos de Pós-Graduação a utilização dos equipamentos de pesquisa. A seus funcionários Lili, Gê, Haroldo e Joelma, obrigada por sua amizade e colaboração nestes 6 anos de convívio. Foi um grande prazer estar em vossa companhia.

À Prof. Marcia Pinto Alves Mayer, pela colaboração na execução do ensaio microbiológico. Agradeço por sua prontidão em abrir as portas do Instituto de Ciências Biológicas (ICB USP), por todo conhecimento compartilhado, e por sua disposição em nos ajudar.

À Cirurgiã Dentista Daniela Zacarias Mercaldi, por toda dedicação, paciência e cuidado que teve durante todo o processo de ensaio microbiológico. Agradeço imensamente por toda atenção e ensinamentos a mim transmitidos, pelas horas extras (domingos e feriados), por ser uma excelente orientadora e também por sua amizade, fatores que foram essenciais para que este projeto fosse bem sucedido. Em momentos como estes, descobrimos grandes seres humanos. Obrigada por tudo.

Ao Prof. Anderson Zanardi Freitas por toda colaboração, na parte prática e teórica relativa à técnica OCT, pela constante busca de pesquisar e validar métodos inovadores. Muito obrigada por colaborar com o projeto em um momento crucial. Agradeço sua prontidão, rapidez, eficiência e pela transmissão de tantos conhecimentos.

Ao Doutorando do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), Marcelo Magri do Amaral, pela dedicação, companheirismo e conhecimento compartilhado durante a execução da técnica de OCT.

À Prof. Dra. Adriana Paes Leme por sua prontidão e pelo compartilhamento de tantos conhecimentos à distância, via Skype.

À técnica do Laboratório Lincon Steagall, Soninha, por toda dedicação carinho e disposição em nos ajudar no que for preciso.

À Beatrice Seiner, Irenen Priska, Denise, Hans Becker, Susie, Tati e toda equipe do departamento de Periodontia e Cariologia da Universidade de Zurique por todo o apoio, companheirismo e conhecimentos compartilhados nestes meses

de estágio. Experiência inesquecível de valor inestimável.

À Escola Politécnica, Setor de Fenômenos de Superfície, pelo auxílio durante o estudo piloto desta pesquisa, em especial ao Doutorando Mário Vitor por sua colaboração.

À FAPESP pela concessão da bolsa de mestrado e pelo financiamento deste Projeto de Pesquisa(Processo Nº07/56876-0). Ter o nome desta instituição vinculado a este trabalho é um grande privilégio, e muito engrandece este projeto de pesquisa.

“Bom mesmo é ir a luta com determinação, abraçar a vida com paixão, perder com classe e vencer com ousadia, pois o triunfo pertence a quem se atreve... A vida é muito para ser insignificante.”

Charlie Chaplin

Soares-Geraldo D. Aderência bacteriana à superfície de esmalte dental irradiado por lasers com parâmetros para prevenção de cárie [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2009.

RESUMO

O desenvolvimento e aprimoramento de novas tecnologias para prevenção/controle da doença cárie têm ocorrido nos últimos anos, destacando-se a utilização dos lasers na Odontologia. Estudos revelam o potencial dos lasers de alta potência para o aumento da resistência ácida do esmalte dental. Porém, ainda se questiona se as possíveis alterações morfológicas na superfície do esmalte, resultante da interação dos lasers com o tecido mineralizado, podem promover o aumento da aderência bacteriana e, conseqüentemente, aumentar o risco de desenvolvimento de lesões de cárie. O objetivo deste estudo *in vitro* foi avaliar a aderência bacteriana à superfície de esmalte dental irradiado por diferentes lasers de alta potência com parâmetros para prevenção de cárie, correlacionando com a rugosidade superficial do substrato, além da avaliação da perda mineral do substrato dental. Sessenta amostras de esmalte dental humano (4 X 4 mm) foram distribuídas aleatoriamente em 6 grupos (n=10): G1 – controle negativo (sem tratamento); G2 - controle positivo (flúor); G3 – Laser de Er:YAG; G4 – Laser de Er,Cr:YSGG; G5 – Laser de Nd:YAG e G6 – Laser de CO_2. A avaliação da rugosidade superficial foi realizada através da técnica OCT, seguida do ensaio de aderência bacteriana que foi realizada utilizando-se o *Streptococcus mutans* como organismo do teste. A análise de perda mineral foi realizada pelo ensaio de microdureza Knoop. Os resultados

foram avaliados pelo testes de ANOVA e Tukey (α=5%). Concluiu-se que não houve correlação entre o tratamento de superfície e a adesão de *Streptococcus mutans*. As superfícies de esmalte tratadas com flúor ou laser de CO_2 apresentaram os menores valores de rugosidade enquanto o laser de Er:YAG os maiores valores. O grupo flúor apresentou menor taxa de formação de biofilme, enquanto Controle e Er:YAG as maiores. Além do mais, verificou-se que todos os tratamentos de superfície mostraram-se efetivos, sendo os tratamentos com flúor fosfato acidulado e laser de CO_2 os mais efetivos na prevenção de cárie e redução da perda de volume mineral.

Palavras-Chave: Esmalte dentário, Cárie Dentária, Prevenção & Controle, Lasers, Aderência Bacteriana, Testes de Dureza

Soares-Geraldo D. Bacterial adhesion to enamel surface irradiated by lasers using caries preventive parameters [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2009.

ABSTRACT

The development and improvement of new technologies for prevention/control of dental caries has increased in the last years, specially the use of lasers in Dentistry. Studies show the potential of high power lasers to enhance the dental enamel acid resistance. However, it is still questioned if the morphological changes on the enamel surface, as a result of laser irradiation, can increase the surface bacterial adhesion and as a result, increase the risk for development of dental caries. The main objective of this *in vitro* study was to evaluate bacterial adhesion to enamel surface previously irradiated by different high power lasers using parameters for caries prevention, correlating with surface roughness after treatments, and besides that, the evaluation of dental substrate mineral loss. Sixty specimens of dental enamel (4 x 4 mm) were randomly distributed in 6 groups (n=10): G1 - negative control (no surface treatment); G2 - positive control (fluoride); G3 - Er:YAG laser; G4 - Er,Cr:YSGG laser; G5 - Nd:YAG laser and G6 - CO_2 laser. The surface roughness test was developed using the OCT method, followed by the evaluation of bacterial adhesion that was performed using *Streptococcus mutans* as the tested microorganism. The evaluation of mineral loss was done by Knoop microhardness test. The results were evaluated by means of ANOVA and Tukey tests (α=5%). It was concluded that there is no correlation between surface treatment and adhesion of

Streptococcus mutans. The enamel surfaces treated with fluoride or CO_2 laser showed the lesser roughness values, while Er:YAG laser the higher values. The fluoride group showed the lesser biofilm formation tax, while Control and Er:YAG the higher ones. Besides that, it was verified that all the surface treatments were effective, and the treatments with fluoride and CO_2 laser the most effective on caries prevention and mineral loss reduction.

Keywords: Dental Enamel, Dental caries, Prevention & Control, Lasers, Bacterial Adhesion, Surface Properties, Hardness Tests

SUMÁRIO

p.

1 INTRODUÇÃO 18

2 REVISÃO DA LITERATURA 21

2.1 Cárie 21
2.2 Prevenção de cárie 23
2.2.1 Flúor 23
2.2.2 Lasers de Alta Potência 25
2.2.2.1 Laser de Er:YAG 29
2.2.2.2 Laser de Er,Cr:YSGG 32
2.2.2.3 Laser de Nd:YAG 34
2.2.2.4 Laser de CO_2 38
2.3 Aderência Bacteriana 44

3 PROPOSIÇÃO 50

4 MATERIAL E MÉTODOS 51

4.1 Aspectos Éticos 51
4.2 Delineamento experimental 51
4.3 Preparo das amostras 53
4.4 Tratamento da superfície de esmalte 56
4.4.1 Grupos controle - G1, G2 56
4.4.2 Laser de Er: YAG (λ=2,94 μm) - G3 57
4.4.3 Laser de Er, Cr:YSGG - G4 58
4.4.4 Laser de Nd: YAG (λ=1064 nm) - G5 59
4.4.5 Laser de Dióxido de Carbono (λ=10.6 μm) – G6 60
4.5 Subdivisão dos grupos experimentais 61
4.5.1 Grupo 1: Ciclagem de pH/ Avaliação da microdureza 61
4.5.1.1- Ciclagem de pH 61
4.5.1.2 Avaliação da Estrutura Mineral (Ensaio de microdureza) 66

4.5.2 Grupo 2: Avaliação da Rugosidade Superficial/ Avaliação Aderência Bacteriana 67
4.5.2.1 Caracterização topográfica dos espécimes 67
4.5.2.2 Esterilização por radiação gama 71
4.5.2.3 Indução de cárie e Aderência Bacteriana 72
4.6 Analise Estatística 78

5 RESULTADOS 79

5.1 Perda de volume mineral 79
5.2 Rugosidade 89
5.3 Aderência bacteriana 94
5.4 Correlação entre Taxa de Formação de Biofilme e Rugosidade 96

6 DISCUSSÃO 98

7 CONCLUSÕES 112

REFERÊNCIAS 113

APÊNDICE 124

ANEXO 145

1 INTRODUÇÃO

A cárie é uma patologia infecto contagiosa multifatorial que consiste em um processo dinâmico alternado de períodos de desmineralização e remineralização (DES-RE) do elemento dental, com predominância do primeiro. O desequilíbrio desse processo dinâmico pode culminar em desmineralização por ácidos orgânicos, provenientes da metabolização de carboidratos pelas bactérias presentes no meio bucal. Em conseqüência deste desequilíbrio, ocorre a desmineralização da porção inorgânica e desorganização da porção orgânica com desnaturação do colágeno.

Com a mudança de enfoque da Odontologia de curativa à preventiva nos últimos anos, o que se observa é o surgimento considerável de novas tecnologias para prevenção/controle da doença cárie, dentre elas, a utilização dos lasers de alta potência para a irradiação dos tecidos duros.

O LASER (acrônimo de Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation) é uma tecnologia que vem sendo progressivamente incorporada na Odontologia, e sua utilização tem sido amplamente investigada. Stern e Sognnaes (1966) foram os primeiros pesquisadores a realizarem estudos específicos nesta área, e através de seus resultados comprovaram a redução na solubilidade do esmalte dental após irradiação com laser de Rubi. A partir de então, diversos trabalhos têm sido realizados na área de prevenção de cárie, demonstrando a eficácia dos lasers de alta potência no aumento da resistência do esmalte à desmineralização.

Dentre os lasers de alta potência estudados com enfoque na prevenção de cárie, têm se destacado os lasers de Er:YAG (2,94 μm), Er,Cr:YSGG (2,78 μm),

Nd:YAG (1.064 nm) e CO_2 (10.600 nm). A eficácia do laser no tratamento preventivo da cárie dental está altamente relacionada com a interação da luz laser com alguns componentes do esmalte. A composição básica do esmalte se resume a 85% de volume de hidroxiapatita de cálcio carbonatado, 12% água e 3% de proteína e lipídios, de modo que a utilização de comprimentos de onda que sejam altamente absorvidos pela água e hidroxiapatita é essencial para que haja alterações térmicas no esmalte, capazes de alterar química ou morfologicamente a sua estrutura, promovendo a redução da solubilidade do substrato.

Estudos têm revelado a existência de alterações na morfologia superficial do esmalte irradiado com os lasers de alta potência, com a existência de rugosidade moderada na superfície do substrato, ainda que utilizando parâmetros sub-ablativos. O aumento ou diminuição da rugosidade superficial, bem como alterações na morfologia do esmalte, parecem ser dependentes dos parâmetros utilizados.

A literatura reporta relação significativa e direta entre rugosidade superficial e aderência bacteriana ao esmalte que passou por algum tipo de tratamento na superfície, como por exemplo, o tratamento clareador. Estas mudanças estruturais no esmalte pós-tratamento podem aumentar a susceptibilidade à aderência de microorganismos influenciando o risco do desenvolvimento de lesões de cárie. Atualmente, questiona-se se a alteração morfológica resultante da interação dos lasers com o tecido mineralizado, ainda que utilizando parâmetros sub-ablativos, possa promover o aumento da aderência bacteriana. Considerando a presença da microbiota um dos fatores de grande importância para o início das lesões de cárie, considera-se relevante o presente estudo.

Desta forma, torna-se importante avaliar a aderência da bactéria *S. mutans* ao esmalte dental submetido à irradiação com lasers de alta potência com parâmetros para prevenção de lesões de cárie, correlacionando com a alteração morfológica da superfície do esmalte (rugosidade superficial) e a perda mineral desse substrato.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Cárie

No processo de desenvolvimento das lesões de cárie, em estágios detectáveis ou não clinicamente, há um processo dinâmico de desmineralização e remineralização, e não apenas um processo contínuo, irreversível e definitivo de perda mineral (FEATHERSTONE, 2000b). O processo de desmineralização do esmalte dental humano começa a ocorrer quando o pH no meio bucal atinge níveis entre 5,0 e 5,5 e não é neutralizado pelo sistema tampão alcalino da saliva.

O processo que leva à lesão de cárie inicia-se na superfície do esmalte com a passagem de ácidos bacterianos através das estrias de Retzius, a partir delas se propaga ao longo dos espaços interprismáticos, e, finalmente, para o interior dos prismas. A exposição do esmalte a ácidos, como íons hidrogênio, rapidamente dissolve os minerais do cristal, liberando cálcio, fosfato e carbonato (FEATHERSTONE, 2000a; FEATHERSTONE; DUNCAN; CUTRESS, 1979). Nesta situação, a tendência físico-química é o esmalte dental perder íons para o meio, tentando estabelecer um novo equilíbrio em relação ao pH, de modo que a quantidade de íons perdidos é maior do que a quantidade de íons adquiridos, gerando um rompimento do equilíbrio dinâmico. O efeito cumulativo de uma série de períodos de dissolução do esmalte, associado ao baixo pH e precipitação parcial de íons cálcio e fosfato, tem como conseqüência final a formação de lesão subsuperficial com vias de comunicação entre os prismas de esmalte, o que leva à

progressão da lesão para a superfície que, devido à desmineralização, torna-se mais porosa e é caracterizada clinicamente por uma mancha branca. A desmineralização continuará a ocorrer enquanto o pH da placa permanecer ácido e o fluido da placa menos saturado que a porção mineral do dente(LARSEN; BRUN, 1995).

A Tríade de Keys, concepção que esteve em voga nos anos 70 e 80 no âmbito da medicina preventiva de Leavell & Clark, toma emprestado da parasitologia termos tais como hospedeiro, agente infectante, meio ambiente, entre outros. Esta tríade correlaciona dentes, sacarose e microrganismos. Na confluência dos fatores, desenvolve-se a lesão de cárie; contrariamente, removendo-se um dos fatores não se ocorre o seu desenvolvimento. O caso da fragilidade de tal arranjo tem sido discutido, devido à inexistência de quaisquer referências ao mundo exterior, ao meio circundante e, mesmo, aos fatores socioeconômicos (BOTAZZO, 2008).

Atestadamente, a doença cárie é uma patologia complexa, com fatores etiológicos relacionados ao hospedeiro, à microbiota, ao tipo e freqüência de ingestão de carboidratos fermentáveis na dieta, à higiene, à constituição e fluxo salivar (ação mecânica, química e antibacteriana), ao acesso ao flúor, às condições sociais, econômicas, políticas, culturais, bem como aos hábitos familiares. Deve-se analisar de forma criteriosa o contexto em que o paciente está inserido, para a real avaliação do risco de desenvolvimento da doença e correto diagnóstico clínico, para, então, serem tomadas decisões de conduta preventivo-terapêutica (KIDD; FEJERSKOV, 2004; MOSHA et al., 1988; THYLSTRUP, 1988).

2.2 Prevenção de cárie

2.2.1 Flúor

O flúor é um íon que pode ser incorporado à estrutura dental na forma de fluoreto de cálcio (CaF_2) ou apatita fluoretada (FA), agindo como inibidor da desmineralização e ativador do processo de remineralização do esmalte (FEATHERSTONE, 2000b).

Agentes fluoterápicos na forma de dentifrícios, gel, verniz ou materiais restauradores, como os cimentos de ionômero de vidro e algumas resinas compostas, apresentam potencial inibidor do processo de desmineralização e/ou aumentam a remineralização da estrutura dental, atuando como importante fator na prevenção e/ou controle das lesões de cárie na superfície dental (HARA et al., 2002; MILLAR; ABIDEN; NICHOLSON, 1998; PEREIRA; INOKOSHI; TAGAMI, 1998; RAGGIO et al., 2004; TAKEUTI et al., 2007).

O flúor quando presente na fase de formação e mineralização da hidroxiapatita fica firmemente aderido a esta, formando um complexo conhecido como fluorapatita e não pode ser extraído a menos que o cristal seja dissolvido (LARSEN; BRUN, 1995). Durante o processo de maturação do esmalte, período no qual elementos como carbonato e cálcio são dissolvidos e liberados para o meio bucal, ocorre também a retenção de elementos com afinidade à hidroxiapatita, como, por exemplo, o íon flúor. O flúor aplicado nesta fase favorece a formação de fluoreto de cálcio, que é o principal produto da reação do flúor com a apatita e se

precipita na forma de glóbulos (ROLLA, 1988), que são revestidos tardiamente por uma camada protetora formada pela deposição de cálcio criando uma espécie de reservatório de flúor, o qual, regulado pelo pH do meio, libera fluoreto de cálcio (em situações de baixo pH) ou retém este elemento (em condições de pH favorável) (ROLLA, 1988). A dissolução dos glóbulos de fluoreto de cálcio é fator primordial para a prevenção de cárie, pois apenas o radical de flúor livre exerce efeito na redução da solubilidade do esmalte (TEN CATE; DUIJSTERS, 1983).

O flúor atua na redução do pH no qual ocorrem as descalcificações primárias. Em sua presença, o pH necessário para desencadear a desmineralização do esmalte dental é alterado de aproximadamente 5,5 para 4,5, ou seja, na presença de flúor há redução da perda mineral pois como o pH necessário para iniciar a perda de mineral fica reduzido, há um intervalo de tempo maior para que a saliva exerça seu efeito tampão e seja restabelecida uma condição estável e favorável de pH (LARSEN; BRUN, 1995). Já na fase de remineralização, o flúor presente no meio bucal favorece o revestimento dos cristais de apatita no momento em que estes estão se reestruturando, de modo que, após serem revestidos, os cristais demonstram características de fluorapatita. Além disso, o flúor na saliva atua exercendo efeito contrário à colonização bacteriana e fermentação de hidratos de carbono (LARSEN; BRUN, 1995).

Ainda que métodos que utilizem produtos fluoretados sejam altamente reconhecidos e eficazes na prevenção de cárie e atuem como agentes cariostáticos, anti-enzimáticos, antimicrobianos e bactericidas (CURY et al., 2003; NEGRI; CURY, 2002), outras técnicas e produtos não contendo flúor têm sido estudadas com o objetivo de prevenir a progressão dessa patologia (CLARKSON; RAFTER, 2001), como por exemplo, de tratamentos alternativos como a irradiação da superfície

dental com lasers de alta potência, associado ou não ao uso de fluoretos (ANDERSON et al., 2000; HOSSAIN et al., 2002; MORIOKA; TAGOMORI; NARA, 1988; MORIOKA; TAGOMORI; TSUTSUNI, 1986; TAGOMORI; MORIOKA, 1989; WESTERMAN et al., 1999).

2.2.2 Lasers de Alta Potência

O LASER é uma tecnologia que vem sendo progressivamente incorporada na odontologia, e sua utilização nas diversas áreas, entre elas na Dentística, tem sido amplamente investigada.

Os lasers de alta potência apresentam efeitos térmicos que podem promover alterações morfológicas na estrutura dental, como redução da permeabilidade, fusão e ressolidificação, criação de microespaços na estrutura mineral do dente (MORIOKA; TAGOMORI; OHO, 1991; TAGOMORI; MORIOKA, 1989), bem como alterações químicas que podem estar relacionadas com o aumento da resistência ácida do esmalte (FEATHERSTONE, 2000b; FOWLER; KURODA, 1986; FREITAS et al., 2008; HOSSAIN et al., 1999a; HOSSAIN et al., 1999b), sendo observadas alterações nas características cristalográficas dos cristais de hidroxiapatita, redução do conteúdo de carbonato (CO_3), conversão do fosfato (HPO_4^{2-}) em pirofosfato($P_2O_7^{4-}$), aumento da concentração de íons hidroxila (OH-), decomposição protéica resultando na redução da solubilidade mineral, ressolidificação, crescimento dos cristais e formação de novos compostos cristalinos (CECCHINI et al., 2005; HSU et al., 1994).

Observa-se que à medida que a irradiação com os lasers de alta potência é realizada, alterações físico-químicas acontecem gradualmente com o aumento da temperatura (BEVILACQUA et al., 2008; CASTELLAN et al., 2007; LIU; LIU; STEPHEN, 2006).

Entre 100-650 ºC

-evaporação de água (redução abrupta entre 250-300°C) (FOWLER; KURODA, 1986; HOLCOMB; YOUNG, 1980);

-início da redução de carbonato;

-íons fosfato condensam para formar pirofosfato (200-400°C) (FOWLER; KURODA, 1986);

-conversão de fosfato ácido em pirofosfato;

-oxidação de compostos orgânicos;

-decomposição protéica (350-400ºC); o "efeito bloqueador da difusão" exercido pela matriz orgânica atinge seu ápice, porém acima deste valor há decomposição;

-discreta contração na dimensão axial do cristal (250-400ºC) (FOWLER; KURODA, 1986; HOLCOMB; YOUNG, 1980; OHO; MORIOKA, 1990);

-o conteúdo de hidróxido aumenta progressivamente atingindo um limite de aproximadamente 1,8 vezes a quantidade original (300-500ºC) (FOWLER; KURODA, 1986);

-aumento na ordenação das estruturas cristalinas com uma concomitante redução na solubilidade do esmalte (250-400ºC).

Entre 650-1200 ºC

-recristalização térmica;

-aumento do crescimento do cristal de hidroxiapatita;

-eliminação total de carbonato;

-fusão superficial (900-1200ºC) (MCCORMACK et al., 1995);

-pirofosfato reage com apatita formando PO_4, além da formação de novas fases α-TCP (tricálcio fosfato) e ß-TCP menos resistentes à desmineralização (FOWLER; KURODA, 1986).

-ß-TCP é transformado em α-TCP (tricálcio fosfato) (1100ºC)

1430ºC

-componente se transforma em um polimorfo de alta temperatura e alta solubilidade em ambiente ácido.

Tem sido sugerido que o potencial para inibição de formação de lesões de cárie ideal pode ser alcançado pelo aumento de temperatura superficial do esmalte, induzido por laser, quando a temperatura superficial atinge aproximadamente 650ºC (HSU et al., 2000). No entanto, ao atingir temperaturas de 800 a 1200 ºC pode ocorrer o efeito inverso, no qual há o aumento da solubilidade do esmalte (FOWLER; KURODA, 1986; HSU et al., 2000).

Com relação ao fator que levaria ao aumento da resistência do esmalte, existem basicamente três teorias, que tentam explicar tal fato: a teoria da alteração morfológica, a da alteração química e a teoria baseada na alteração da matriz orgânica.

A primeira teoria sobre o mecanismo pelo qual os lasers de alta potência reduzem a solubilidade do esmalte dental em meio ácido, a teoria morfológica, sustenta que a fusão e ressolidificação do substrato são as responsáveis pela resistência conferida ao esmalte, justificando que este efeito promove um bloqueio dos canais de difusão de esmalte, reduzindo significativamente a sua dissolução (HSU et al., 2000). No entanto, tal teoria não tem sido muito aceita atualmente.

A segunda teoria, a teoria da alteração química, sustenta que o aumento de temperatura promovido pela irradiação com os lasers de alta potência seja capaz de gerar modificações de ordem química que seriam as principais responsáveis pelo aumento da resistência do esmalte ao desafio ácido, como explanado anteriormente através das temperaturas alcançadas pela irradiação a laser, e principais alterações a elas relacionadas.

A terceira teoria, a teoria da matriz orgânica, sugere que um aumento de temperatura entre 300-400ºC promoveria uma distensão da matriz orgânica e até mesmo uma decomposição parcial desta, que seria capaz de bloquear espaços inter e intra-prismáticos, conseqüentemente comprometendo a difusão iônica pelo esmalte, o que resultaria no retardamento da desmineralização (FOWLER; KURODA, 1986; HOLCOMB; YOUNG, 1980). Uma porcentagem de inibição da desmineralização entre 25-57% alcançada por esta teoria justificaria sua utilização (HSU et al., 2000).

Alguns lasers de alta potência têm apresentado um potencial para prevenção de cárie através de alterações morfológicas e/ou químicas, como os lasers de Er:YAG (2,94 μm) (APEL et al., 2004; APEL et al., 2005; FREITAS et al., 2008; HOSSAIN et al., 2001; HOSSAIN et al., 1999b), Er,Cr:YSGG (2,78 μm) (FREITAS et al., 2008; HOSSAIN et al., 1999b), Nd:YAG (1.064 nm) (BOARI; ZEZELL; EDUARDO, 1999) e CO_2 (9.6 e 10.6 μm) (FEATHERSTONE et al., 1998; KLEIN et al., 2005; RODRIGUES et al., 2004).

2.2.2.1 Laser de Er:YAG

Desde a introdução dos lasers na odontologia um ponto primordial nas pesquisas foi a utilização de diferentes comprimentos de onda para prevenção de cárie, dentre estes, os comprimentos de onda dos lasers de érbio (APEL et al., 2004; APEL et al., 2002; CECCHINI et al., 2005; COLUZZI, 2000; LIU; LIU; STEPHEN, 2006; MORIOKA; TAGOMORI; OHO, 1991).

O laser de Er:YAG (Érbio: Alumínio-Ítrio-Granada) foi o primeiro laser a ser aprovado pela FDA (Food and Drug Administration) em 1997 para aplicação em tecidos duros (KANTOROWITZ; FEATHERSTONE; FRIED, 1998). Este laser emite na faixa do espectro de 2,94 μm, tem grande absorção pela água, tornado possível o corte do esmalte através do processo de ablação. Este processo ocorre quando da absorção da energia laser pela água contida no esmalte, resultando em expansão da água e ejeção do tecido duro (BEVILACQUA et al., 2008). Considerando o fato de o laser de érbio ter sido introduzido na odontologia para preparo do tecido dental mineralizado, a sua utilização para prevenção de cáries requer algumas alterações, como a utilização de densidades de energia sub-ablativas, visto que a intenção não é ablacionar ou provocar fusão do substrato, mas sim a de gerar mudanças químicas (APEL et al., 2005).

Diversos estudos *in vitro* e *in situ* têm sido realizados e demonstraram a eficácia deste laser no aumento da resistência do esmalte ao desafio ácido (APEL et al., 2004; APEL et al., 2005; CECCHINI et al., 2005; CHIMELLO et al., 2008; HOSSAIN et al., 2000; MORIOKA; TAGOMORI; OHO, 1991)

São três as principais teorias existentes, que tentam explicar as alterações ocorridas durante a irradiação com o laser de Er:YAG: (1) redução na permeabilidade do esmalte devido à fusão e recristalização da superfície de esmalte (STERN; SOGNNAES; GOODMAN, 1966); (2) redução na solubilidade do esmalte devido à formação de substâncias menos solúveis como o $Ca_4(PO_4)_2O$, também conhecido como monóxido difosfato de tetracálcio ou fosfato de tetracálcio (NELSON et al., 1987), redução no conteúdo de água e carbonato, aumento do conteúdo de íons hidroxila, formação de pirofosfatos, e (3) redução na permeabilidade do esmalte devido à mudanças na ultra-estrutura, decorrente da decomposição protéica.

À medida que a irradiação com o laser promove o aumento de temperatura, alterações físico-químicas ocorrem no substrato, dentre elas, a perda do elemento carbonato. Tem sido observado que durante a desmineralização, a perda mineral inicia-se preferencialmente na parte central e só então na parte externa dos cristais do esmalte; é como se a existência de carbonato causasse algum defeito no cristal, propiciando que esta seja a área de tensão ou fragilidade. No entanto, o tratamento com o laser de Er:YAG é capaz de remover o carbonato e aumentar a estabilidade do cristal, deixando o esmalte menos vulnerável ao ataque ácido (LIU; LIU; STEPHEN, 2006).

Além disso, através da medição de íons Ca^{+2} em solução (ppm) (CECCHINI et al., 2005; HOSSAIN et al., 2000), foi demonstrado que a irradiação com laser de Er:YAG utilizando parâmetros para prevenção, com ou sem jato de água, é eficaz. Uma análise por microscopia eletrônica de varredura mostrou que a superfície irradiada apresentava-se fusionada, ressolidificada e termicamente alterada (HOSSAIN et al., 2000).

Outro mecanismo responsável pelo aumento da resistência diante do desafio ácido tem sido discutido por vários autores, os quais têm demonstrado (LIU; LIU; STEPHEN, 2006; MAUNG; WOHLAND; HSU, 2007; STERN; SOGNNAES; GOODMAN, 1966; YING; CHUAH; HSU, 2004) que após a irradiação, o esmalte apresenta redução da área superficial e do volume de poros, devido à fusão e selamento dos microporos do esmalte em resultado da indução do bloqueio da matriz orgânica. Ying et al. (2004) através da difração de raios-X, observaram que o efeito da irradiação com o laser de Er:YAG se limitou ao bloqueio parcial dos poros com concomitante decréscimo da área superficial, sem detecção de formação de novas fases, excluindo a possibilidade da fusão dos cristais de hidroxiapatita. Além do mais, testes induzindo a remoção de matéria orgânica foram executados e seguidos da irradiação com laser, após a qual não houve nenhuma redução significativa da área superficial ou redução dos poros, demonstrando quão vital é neste processo a manutenção da matriz orgânica como barreira protetora no processo de formação de lesões de cárie, visto que esta desempenha o papel de bloqueadora no processo de difusão, reduzindo a difusão iônica em até 30% (MAUNG; WOHLAND; HSU, 2007) e, conseqüentemente, reduzindo a desmineralização do esmalte (LIU; LIU; STEPHEN, 2006; STERN; SOGNNAES; GOODMAN, 1966; YING; CHUAH; HSU, 2004).

Estudos relatam também a eficácia do sinergismo Laser de Er:YAG + Flúor, na prevenção de lesões de cárie (APEL et al., 2002; BEVILACQUA et al., 2008; DELBEM et al., 2003). O substrato dental, nestes casos, apresenta um aumento na incorporação de flúor quando comparado ao grupo controle. Além do mais, as fluências mais baixas geram mudanças estruturais no esmalte que favorecem a maior incorporação de flúor.

2.2.2.2 Laser de Er,Cr:YSGG

Dos lasers em questão no presente estudo, o laser de Er,Cr:YSGG (Érbio, Cromo: Ítrio, Escândio e Gálio) foi o mais recente a ser introduzido na odontologia. As referências a este laser em odontologia iniciam-se no ano de 1995, quando Belikov, Moroz e Skripnik (1995) realizaram um estudo utilizando o laser Er,Cr:YSGG, variando a densidade de energia e tempo de exposição, na remoção de substrato contaminado, e avaliaram a viabilidade de bactérias remanescentes na estrutura dental. Desde então, diversos estudos têm sido realizados e várias observações e progressos foram feitos na utilização deste laser na odontologia.

O laser de Er,Cr:YSGG é um equipamento relativamente novo, e trabalha no comprimento de onda de 2,78 μm. Apresenta potencial de ablacionar tecidos duros com mínima injúria à polpa e tecidos circundantes, quando utilizado com os corretos protocolos (EVERSOLE; RIZOIU; KIMMEL, 1997). Sua capacidade efetiva de ablação é devida a sua alta absorção pela água e pelo radical hidroxila presente na estrutura da hidroxiapatita (FEATHERSTONE; FRIED, 2001; FRIED et al., 1996; HADLEY et al., 2000). Supõe-se que, relativo à prevenção de cárie, o laser de Er,Cr:YSGG não promova ablação da superfície, mas antes, uma mudança química na estrutura de esmalte através do aumento superficial de temperatura (FREITAS et al., 2008).

Fried et al.(1996) realizaram um dos primeiros trabalhos em prevenção de lesões de carie com o laser de Er,Cr:YSGG e obtiveram inibição das mesmas entre 25 e 60%, trabalhando com parâmetros sub-ablativos. Desde então, tem sido

sugerido que a irradiação com o laser Er,Cr:YSGG é efetiva para o aumento da ácido resistência do esmalte dental.

Por meio de análises químicas na estrutura dental pós-irradiação com o laser de Er,Cr:YSGG, Yu et al. (2000) demonstraram um aumento de íons cálcio na superfície do esmalte, com manutenção da proporção Ca/P antes e após a irradiação. Segundo os autores, acredita-se que tenha ocorrido uma reorganização dos cristais de hidroxiapatita após o efeito foto térmico do laser.

Hossain et al. (2001) comprovaram que o esmalte pós irradiação apresenta-se termicamente alterado, e que após o desafio ácido, esmalte e dentina pareciam não alterados morfologicamente, demonstrando aumento na sua resistência.

No intuito de encontrar o ponto ideal para a redução da desmineralização, ao mesmo tempo preservando o substrato dental, diversas densidades de energia têm sido testadas. Apel et al. (2002) avaliaram o efeito cariostático da irradiação do esmalte bovino com diferentes densidades de energia do laser de Er,Cr:YSGG, conseguindo registrar uma redução na solubilidade do esmalte de até 20%. Freitas et al. (2008) testaram diversos comprimentos de onda e densidades de energia, concluindo que a irradiação com a densidade de 8,5 J/cm^2 pode ser uma alternativa para o aumento da resistência à desmineralização, tendo apresentado capacidade de inibição de lesão de cárie de 64%. Mesmo assim, densidades de energia mais baixas também se mostraram efetivas, com um potencial cariostático semelhante ao alcançado pelo dentifrício fluoretado.

Ana (2007) avaliando protocolos de irradiação com laser de Er,Cr:YSGG que promovessem efeitos fototérmicos, alterações ultra-estruturais e aumento da resistência no esmalte à desmineralização, também chegou à conclusão de que a densidade de 8,5 J/cm^2 teve relevância estatística na redução da perda mineral,

além de segurança para a vitalidade pulpar. O mesmo estudo ainda demonstrou a efetividade do sinergismo com o flúor fosfato acidulado (FFA) após a irradiação, com maior absorção deste pelo substrato irradiado.

2.2.2.3 Laser de Nd:YAG

O laser de Nd:YAG (Neodímio: Alumínio-Ítrio-Granada) tem sido estudado para aplicação na prevenção de cárie/desmineralização há muitos anos. Na década de 70, juntamente com o laser de argônio, o laser de neodímio surgiu como nova alternativa de comprimento de onda para irradiação de esmalte. A vantagem dos lasers de neodímio e de argônio, e um dos fatores que contribuíram para o uso destes em prevenção, é a possibilidade de serem conduzidos por fibra óptica de quartzo. A fibra óptica, tecnologia bastante conhecida na década de 70 devido ao seu uso em telecomunicações, foi adaptada para utilização em equipamentos laser possibilitando o fácil acesso do comprimento de onda desses lasers nos sulcos e fissuras dos dentes na cavidade oral.

Yamamoto e Sato (1980) foram pioneiros neste assunto; realizaram um trabalho no qual as amostras, previamente irradiadas com laser Nd:YAG, foram imersas em solução ácida desmineralizante com pH de aproximadamente 4,5 durante o período de 5 dias. Os resultados mostraram que em 73% das amostras não houve nenhuma desmineralização e em 27% houve resistência moderada à desmineralização. O mesmo estudo ainda demonstrou que, macroscopicamente, o esmalte irradiado apresentava-se mais translúcido quando comparado ao esmalte

não irradiado; no entanto, a mesma área não apresentou desmineralização subsuperficial. Esta observação demonstrou claramente que o esmalte exposto à irradiação laser efetivamente inibiu a formação de lesões de cárie. Desde então, muitos estudos têm sido realizados comprovando a efetividade do tratamento com o laser Nd:YAG na prevenção de lesões de cárie.

Os lasers em prevenção de cárie interagem com o esmalte dental, cujo conteúdo inorgânico consiste basicamente de fosfato de cálcio cristalino e hidroxiapatita; esta, por sua vez, possui bandas de absorção no ultravioleta, em 2.9 μm, 7.9 μm e 9.6 μm. Tendo em vista o fato do laser de neodímio operar com comprimento de onda de 1.064 μm, o resultado é que a hidroxiapatita não absorve este comprimento de onda. Outros lasers, como o laser de érbio e principalmente o laser de CO_2 pulsado (9.6 μm) apresentam interação com este substrato. No entanto, a pouca absorção do comprimento de onda do laser de Nd:YAG pela hidroxiapatita pode ser compensada pela adição de um foto-iniciador.

O foto-iniciador deve ser um material com pigmento escuro, que pode ser líquido ou sólido, e deve ser aplicado sobre a superfície do esmalte previamente à irradiação com o laser. Alguns dos pigmentos reportados na literatura são: solução composta por carvão em pó (partículas de 10 mm) diluído em partes iguais de água deionizada e etanol 99% - e tinta nanquim. Este mecanismo tem sido utilizado por diversos autores e tem demonstrado ser eficaz. Alguns trabalhos demonstraram, entre outros fatores, que a sua utilização diminui a densidade de energia necessária para ocorrer alterações no esmalte (HARGREAVES; PISKO-DUBIENSKY, 1984), potencializa o efeito da irradiação laser (BOARI; ZEZELL; EDUARDO, 1999), e a superfície de esmalte recoberta com pigmento escuro pode promover o aumento da absorção do laser (BAHAR; TAGOMORI, 1994). Referente à utilização de

pigmentos foto-iniciadores previamente à irradiação, desta vez recobrindo a superfície radicular, foi constatado que as alterações alcançadas foram ainda mais significativas do que apenas o tratamento com o laser sem a utilização de pigmento (ZHANG; KIMURA; MATSUMOTO, 1996).

Quando o objeto em estudo são lasers, um fator muito importante a ser analisado é a densidade de energia que deve ser utilizada, pois ela está diretamente relacionada com a efetividade ou não do tratamento, com a sub ou super exposição à radiação e seus efeitos deletérios. Morioka, Tagomori e Tsutsumi(1985) fizeram um estudo avaliando densidades de energia de 10 a 50 J/cm^2 com o laser de Nd:YAG, e concluíram que quanto maior a densidade de energia utilizada, maior a resistência adquirida do esmalte no combate à desmineralização. Morioka, Tagomori e Nara (1988) comparando a eficiência de nove tipos de laser no aumento da resistência do esmalte à ação de ácidos com potencial desmineralizante, chegaram à conclusão de que esta resistência aumenta com o aumento da densidade de energia aplicada, e se torna estável em torno de 50 J/cm^2 para o laser de Nd:YAG. Trabalhos mais recentes, no entanto, têm utilizado densidades de energia maiores como 84,9 J/ cm^2, 99,5 J/cm^2 e 113 J/cm^2, e tem comprovado a sua eficácia (BOARI; ZEZELL; EDUARDO, 1999; CASTELLAN et al., 2007; KORYTNICKI et al., 2006; ZEZELL et al., 2009).

Com relação à profundidade de atuação do tratamento com o laser de Nd:YAG, Korytnicki et al.(2006) demonstraram, através do teste de microdureza transversal Knoop, que o esmalte dental irradiado pelo laser apresentou valores maiores de microdureza até a profundidade de 60 µm, quando comparado com o grupo controle (não-irradiado), sendo que ambos foram submetidos ao teste de desafio cariogênico *in situ*.

Fato demonstrado favoravelmente pela literatura é a associação da irradiação laser com flúor fostato acidulado (FFA). Estudos têm demonstrado que nestes casos, o esmalte tratado com laser de Nd:YAG seguido de aplicação de FFA, tem maior grau de resistência ao desafio ácido do que os grupos que passaram por apenas um destes tratamentos (TAGOMORI; MORIOKA, 1989; ZEZELL et al., 2009), especialmente em relação ao tratamento de fóssulas e fissuras (HUANG et al., 2001). Um estudo realizado por Oho e Morioka (1990) propôs um mecanismo que explicaria o sucesso desta associação: a irradiação do esmalte com laser de Nd:YAG criaria espaços microscópicos, pela perda de substâncias orgânicas, que atuariam como sítios de deposição de íons flúor, liberados pelo ataque ácido promovido pelo flúor fosfato acidulado. Estudos subseqüentes ainda comprovaram a efetividade desta associação na promoção da remineralização de lesões artificiais de cárie de esmalte. Através de técnicas microradiográficas, testes de microdureza e microscopia eletrônica de varredura (MEV), os autores demonstraram que a remineralização se processava desde o fundo da área da lesão até a superfície (MORIOKA et al., 1991).

A distribuição do flúor mostra-se acentuadamente maior nos casos de associação (laser+FFA), principalmente na camada superficial e nas áreas ao redor das fendas produzidas pelo laser. Estudos ainda relatam maior penetração de flúor no esmalte previamente irradiado pelo laser de Nd:YAG, atingindo profundidade de aproximadamente 100-200 µm no esmalte em superfície livre, 60 µm na região de sulcos e fissuras (BAHAR; TAGOMORI, 1994; MORIOKA; TAGOMORI; TSUTSUNI, 1986), e uma faixa de 20 µm na superfície radicular.

Um trabalho realizado por Morioka, Morita e Suzuki (1982) descreveu clinicamente a utilização do laser de Nd:YAG com o intuito de verificar o grau de

sensibilidade dos pacientes. Os autores chegaram à conclusão de que entre 11 pacientes analisados, 9 apresentaram sensação de calor durante a aplicação, e apenas 1 apresentou uma sensibilidade dolorosa leve e passageira e outro apresentou uma sensação de impacto no momento da aplicação do laser.

Em relação ao mecanismo de ação do laser de Nd:YAG, acredita-se que este laser, por meio de um aumento de temperatura superficial de aproximadamente 1100ºC (FOWLER; KURODA, 1986; MORIOKA; TAGOMORI; NARA, 1988), seja capaz de induzir alterações morfológicas na superfície de esmalte, como fusão e ressolidificação do substrato dental, além de alterações químicas na sub-superfície, reduzindo sua permeabilidade e perda mineral (KORYTNICKI et al., 2006; MORIOKA; TAGOMORI; NARA, 1988; TAGOMORI; MORIOKA, 1989), além de promover o aumento dos cristais de hidroxiapatita, reduzindo os espaços interprismáticos e, por conseqüência, a difusão de ácidos durante o desafio ácido.

2.2.2.4 Laser de CO_2

Stern e Sognaes (1972) deram início a uma série de estudos que tem tido continuidade até o dia de hoje, concernente ao aumento da resistência à desmineralização, do esmalte irradiado pelo laser de dióxido de carbono (CO_2). Os referidos autores, em um estudo *in vivo,* após irradiarem amostras de esmalte dental, conseguiram comprovar o aumento da resistência à dissolução mineral diante da presença de ácidos produzidos pela placa bacteriana. Desde então, estudos têm sido realizados no intuito de avaliar o real potencial desse laser na

prevenção de cárie, valendo-se dos diversos comprimentos de onda e densidades de energia possíveis.

O esmalte dental é basicamente composto por hidroxiapatita carbonatada que possui uma grande ressonância com bandas de absorção na região do infravermelho, devido à presença de grupos fosfato, carbonato e hidroxila presentes na estrutura do cristal (NELSON; FEATHERSTONE, 1982).

O laser de CO_2 (λ= 9 μm a 11 μm) tem uma grande interação com as bandas de absorção do fosfato presente na apatita, especificamente nos comprimentos de onda entre 9,3-9,6 μm. Estes comprimentos de onda estão muito perto das freqüências de transição, das vibrações moleculares do íon fosfato na hidroxiapatita carbonatada, fato que se traduz nos altos coeficientes de absorção (até 10 vezes mais do que o λ de 10,6 μm), baixa profundidade de absorção e alto índice de refletância alcançados, levando-o ser considerado o comprimento de onda mais promissor para a utilização em prevenção de lesões de cárie (ZUERLEIN; FRIED; FEATHERSTONE, 1999). Já os comprimentos de onda de 10,3 μm e 10,6 μm estão no lado mais longo da banda de absorção do comprimento de onda, e estão sujeitos a freqüências de ressonância mais baixas, resultando em baixa refletância (MCCORMACK et al., 1995), menores coeficientes de absorção e maiores profundidades de absorção; por esta razão, é sugerido que o efeito obtido à 10,6 μm seja mais duradouro e equilibrado (ESTEVES-OLIVEIRA et al., 2009; FOX et al., 1992).

Conforme demonstrado por medições da temperatura da superfície irradiada, o laser de CO_2 tende a ser intensamente absorvido próximo à superfície de esmalte, e a energia é rapidamente transformada em calor (MCCORMACK et al., 1995), o qual consiste no ponto importante para as transformações físico-químicas

do substrato dental. O ponto de fusão e ressolidificação (melting) da hidroxiapatita carbonatada varia de acordo com o conteúdo de carbonato (ELLIES; NELSON; FEATHERSTONE, 1988). A superfície de esmalte, que contém aproximadamente 2% de carbonato, começa o processo de fusão à 1100ºC e se funde à temperatura de 1280ºC ou temperaturas mais elevadas (KURODA; FOWLER, 1984). Um estudo realizado por McCormack et al.(1995) após avaliar resultados referentes à temperatura, coeficiente de absorção e valores de refletância, chegou à conclusão de que as alterações morfológicas resultantes da irradiação com os lasers de CO_2 deveriam ocorrer de acordo com a absorção de energia (fluência = energia/área superficial), respeitando a seguinte ordem 9,6 µm > 9,3 µm > 10,3 µm > 10,6 µm. Embora o esmalte dental seja mais refletivo à 9,3 µm e 9,6 µm, a absorção do laser nestes comprimentos de onda é mais eficiente do que a 10,3 µm e 10,6 µm, resultando em uma maior quantidade de energia absorvida por volume e em maiores temperaturas superficiais.

Um estudo realizado por Featherstone et al. (1998) avaliou o aumento da temperatura na sub-superfície e demonstrou que com o comprimento de onda de 9,6 µm (1-3J/cm^2) o aumento foi de 1ºC ou menos, o que indica que haveria preservação da vitalidade pulpar pós-irradiação. Já o laser com comprimento de onda de 10,6 µm (10 J/cm^2) promoveu um aumento de temperatura na ordem de 100ºC, indicando que o potencial inibidor ocorreria em detrimento da vitalidade pulpar. Para atingir completa eficácia e segurança do tratamento preventivo, um maior número de estudos *in vitro* e *in situ* foi sugerido para, então, os resultados serem aplicados na prática clínica.

Análises de microscopia eletrônica de varredura comparando os dois comprimentos de onda (9,6 µm e 10,6 µm) demonstram que em 9,6 µm, a

superfície parece ser fusionada, composta de novos cristais, maiores do que os cristais comuns, e com alguns pontos de esfoliação. Já com 10,6 μm não há mudanças morfológicas na superfície (KANTOROWITZ; FEATHERSTONE; FRIED, 1998). Este fato, aliado ao fato de ambos os comprimentos de onda apresentarem potencial de inibição de lesões de cárie, reforça a idéia da existência de diferentes mecanismos responsáveis por este potencial inibidor. Não apenas o selamento físico, obtido pela fusão e ressolidificação superficial seria o responsável, mas até mesmo em sua ausência, alterações estruturais químicas não visíveis teriam a mesma importância no estabelecimento deste potencial inibidor, a exemplo da redução do carbonato na superfície de esmalte que está associada à redução da reatividade e dissolução do substrato (FEATHERSTONE; FRIED; BITTEN, 1997; FEATHERSTONE; NELSON, 1987; KANTOROWITZ; FEATHERSTONE; FRIED, 1998; MCCORMACK et al., 1995).

A esfoliação superficial é um efeito observado exclusivamente no esmalte dental não polido, e consiste na esfoliação de fragmentos de 1-5 μm de diâmetro da superfície irradiada, deixando para trás irregularidades de pequena profundidade. No entanto, este efeito não é observado ou é mascarado após fusão e ressolidificação da superfície. A causa principal desta esfoliação seria um elevado stress térmico gerado em sistemas rapidamente irradiados por lasers, porém com temperaturas inferiores às necessárias para causar a fusão do substrato. Este stress térmico está diretamente relacionado à profundidade de absorção e tempo de relaxamento térmico do substrato, e foi observado em algumas áreas após a irradiação do esmalte dental com laser de CO_2 à 9,6 μm (KANTOROWITZ; FEATHERSTONE; FRIED, 1998) e 10,6 μm (MCCORMACK et al., 1995).

Featherstone e Nelson (1987) sugeriram que a utilização do laser CO_2 resulta em uma efetiva deposição de energia nas camadas superficiais do esmalte. Além disso, sugeriram que deveriam ser utilizados laser pulsados - ao invés de lasers contínuos- com o objetivo de criar maiores picos de densidade de energia na superfície ao mesmo tempo em que minimizava a deposição de energia cumulativa. Os autores atestaram que desta forma ocorreriam alterações morfológicas, como fusão e recristalização, sem efeitos adversos às camadas subjacentes. Em seu estudo, os resultados chegaram à inibição da progressão de lesões de cárie em até 50%.

Trabalho realizado por Kantorowitz, Featherstone e Fried (1998) alcançou um potencial de inibição de lesões de cárie de 87% com o laser de CO_2 10,6 μm, e demonstrou que o aumento do número de pulsos aumenta o grau de inibição de cárie no substrato; no entanto, este aumento no grau de inibição tem um limite. Segundo o mesmo estudo, nos dois comprimentos de onda testados, 9,6 μm e 10,6 μm, um número ótimo de pulsos deve ser menor do que 25. Este padrão corrobora com a literatura, que demonstra existir um ponto máximo, após o qual o aumento da densidade de energia não significa aumento do potencial de inibição (FEATHERSTONE et al., 1998). O fato de ocorrer um aumento no potencial de inibição quando vários pulsos são utilizados pode ser explicado através de mensurações na temperatura superficial, tomadas durante e após a utilização de pulsos individuais. Estas demonstram que o segundo pulso interage de forma diferenciada com a superfície do que o pulso antecedente. Pode ser sugerido que cada pulso modifica as propriedades óticas e térmicas da superfície, até que se atinja um ponto de equilíbrio.

Com relação à densidade de energia, relata-se que o aumento da ácido-resistência está proporcionalmente relacionado ao aumento da densidade de energia utilizada; quanto maior a densidade de energia, menor o desenvolvimento de lesões, especialmente na presença de flúor (HSU et al., 1998).

A irradiação do esmalte dental com laser de CO_2 já foi capaz de atingir redução da perda mineral em 98% (HSU et al., 2000), sugerindo que aplicação deste laser pode levara uma inibição quase completa da desmineralização. No entanto, esta porcentagem se reduz a 70% quando a matriz orgânica do esmalte é removida, demonstrando que esta matriz, presente nos espaços inter e intra-prismáticos, desempenha um papel importante no potencial de inibição de lesões de cárie. Isto ocorre porque a lesão de cárie não se restringe apenas à solubilidade do substrato, mas também depende da difusão de íons no esmalte, e a matriz orgânica tem demonstrado ser capaz de retardar a desmineralização durante o ataque ácido, agindo de certa forma como controlador nos canais de difusão do esmalte (HSU et al., 2000).

Estudos utilizando a associação laser de CO_2 associado ao uso do flúor têm comprovado a maior eficácia do uso concomitante destes tratamentos na inibição da desmineralização do substrato, potencializando o efeito já alcançado pelos tratamentos individualmente (HSU et al., 2001; RODRIGUES; NOBRE DOS SANTOS; FEATHERSTONE, 2006; SCHMIDLIN et al., 2007). Este fato tem se provado verdadeiro tanto concernente ao esmalte hígido, quanto ao previamente desmineralizado (HSU et al., 2001; SCHMIDLIN et al., 2007).

Referente ao esmalte previamente desmineralizado, tem sido demonstrado que a matriz orgânica é removida nos primeiros estágios da desmineralização, de modo que uma aplicação de flúor seguida da irradiação com o laser de CO_2 seria o

passo ideal para a obtenção de melhores resultados clínicos, isto devido ao “efeito flúor” (HSU et al., 2001) que ocorre na ausência da matriz orgânica. Neste caso, a simples irradiação do substrato teve um sucesso de 74% na inibição da desmineralização, enquanto o substrato em que o flúor foi aplicado e posteriormente irradiado teve 96% de sucesso (HSU et al., 2001). Uma possível explicação do sucesso do “efeito flúor” pode ser o aumento da captação de flúor pelo substrato, pelo fato da remoção da matriz orgânica promover uma área livre maior ao redor do cristal de hidroxiapatita, favorecendo a ligação de íons, inclusive flúor e cálcio (HSU et al., 2001). Outra possibilidade relatada pela literatura seria a transformação da hidroxiapatita em fluorapatita. Este fenômeno ocorreria quando da irradiação do esmalte, previamente exposto ao flúor, com o laser de CO_2. A irradiação e o calor gerado por esta seriam capazes de levar a alguma formação de fluorapatita como demonstrado em estudo de Meurman et al. (1997).

2.3 Aderência Bacteriana

As bactérias da cavidade oral não aderem diretamente ao esmalte, mas sim a uma fina camada acelular, amorfa, sem bactérias e de origem salivar, chamada de película adquirida. As glicoproteínas salivares da película adquirida agem como receptores para as bactérias que se aproximam juntamente com o fluxo salivar. Os primeiros microrganismos que colonizam a película são os Streptococcus e os Actinomyces (cocos G+ e bacilos G-, respectivamente). Os *S. mutans* constituem 60 a 80% desta placa inicial e os Actinomyces, 3 a 40%. Estas bactérias liberam a

neuramidase, uma enzima que expõe novos receptores sobre a superfície dental, facilitando a colonização por bacilos G- e a aderência interbacteriana, através dos polissacarídeos extracelulars (PEC), resultando em um aumento da espessura do biofilme.

O *Streptococcus mutans* é uma bactéria gram positiva, de diâmetro aproximado 0,8-1μm, encontrada no ambiente bucal de aproximadamente 90% dos humanos, e atua como um dos principais patógenos responsáveis pelo desenvolvimento da cárie dental (DANESHMEHR et al., 2008). O *Streptococcus mutans* apresenta uma extensa diversidade que pode ter influência na patogenicidade do clone. A atividade e quantidade de glicosil-tranferase(GTF), a produção de mutacina, a capacidade de formação de biofilme e potencial cariogênico in vitro, podem variar entre as diferentes espécies (LEMBO et al., 2007). Porém, fato comprovado e essencial na virulência do *S. mutans* é sua habilidade de produzir polissacarídeo extracelular (PEC) a partir da sacarose. O *S. mutans* possui a enzima GTF, que promove a quebra da sacarose em monômeros de glicose; estes são rearranjados sob a forma de PEC, promovendo e facilitando a adesão do *S. mutans* e de outras bactérias, levando a um aumento da espessura do biofilme, e, além disso, funciona como um reservatório nutritivo em períodos de nutrição limitada (KURAMITSU; SMORAWINSKA; YAMASHITA, 1994).

Um grande número de clones de S. *mutans* é correlacionado com o aumento da prevalência de cárie, possivelmente em resultado da atividade simultânea de diversos genótipos com diferentes potenciais cariogênicos em um mesmo local. A persistência e proporção de determinado clone de *S. mutans* em um local pode estar associado com a habilidade de colonização e a resistência ao estresse provocado pelo meio ambiente. Fatores como o potencial de formação de biofilme

e a habilidade de resistir ao desafio ácido podem contar para a sobrevivência de certo genótipo(LEMBO et al., 2007).

Os mecanismos de adesão bacteriana ao substrato podem ser subdivididos em 2 fases (AN; FRIEDMAN, 1998; KATSIKOGIANNI; MISSIRLIS, 2004; THYLSTRUP; FEJERSKOV, 1995):

Fase 1: Interações físico-químicas entre bactéria e superfícies (Ligações Inespecíficas)

Adesão bacteriana a superfícies consiste na atração inicial das células à superfície, seguida de adesão e conexão entre estas.

O esmalte dentário possui uma força de atração predominantemente negativa, devido aos grupos fosfato que formam a hidroxiapatita. Sobre esta superfície, se forma uma camada composta, na sua maioria, por íons cálcio (com carga positiva), denominada camada de hidratação. Sobre esta camada, se adsorvem diversos componentes salivares e microbianos através de efeitos ou forças físicas tais quais os movimentos Brownianos, forças de van der Waals, forças gravitacionais, efeito da força eletrostática superficial e interações hidrofóbicas, enquanto a quimiotaxia (movimento em direção ao gradiente químico) e talvez a haptotaxia (movimento em direção ao gradiente adesivo da superfície) também contribuam neste processo. Esta camada, formada predominantemente de glicoproteínas e proteínas ricas em aminoácidos prolina, é denominada de película adquirida do esmalte (PA), e a conexão da bactéria a esta superfície é parte inicial do processo de adesão que torna possível a fase molecular ou celular.

Fase 2: Interações moleculares e celulares entre bactérias e superfícies (Ligações Específicas)

Na segunda fase de adesão, reações moleculares específicas entre a superfície bacteriana e a superfície do substrato se tornam predominantes. Isto implica em uma adesão mais firme da bactéria à superfície, em função de conexão seletiva das estruturas poliméricas bacterianas, que incluem cápsula, pili, fímbrias e polímeros extra-celulares. A parte funcional destas estruturas são as adesinas, especialmente quando a superfície em questão é o substrato hospedeiro, visto que esta proteína distinta tem o potencial de mediar a adesão específica da célula bacteriana a diferentes substratos. Após a finalização da adesão obtida na segunda fase, torna-se possível a colonização com o objetivo final da formação de biofilme (QUIRYNEN; BOLLEN, 1995).

O estabelecimento da película adquirida e a formação do biofilme são extremamente influenciados por algumas características peculiares ao meio ambiente e à superfície. Com relação ao meio ambiente, fatores tais quais temperatura, tempo e período de exposição, concentração bacteriana, tratamento químico ou presença de antibióticos afetam a adesão bacteriana. Além disso, a concentração de eletrólitos, CO_2 e valores de pH no meio de cultura também influenciam na adesão (AN; FRIEDMAN, 1998). Quanto às características relacionadas à superfície, pode-se citar a rugosidade, energia livre de superfície e composição química como fatores influentes. A literatura reporta que superfícies rugosas promovem a formação e maturação do biofilme, e superfícies com elevada energia livre de superfície são conhecidas por seu potencial em agregar mais biofilme, aderir o biofilme de modo mais firme, e selecionar bactérias específicas; e embora ambas variáveis interajam entre si, a influência da rugosidade de superfície parece ser superior à da energia livre de superfície (DANESHMEHR et al., 2008; QUIRYNEN; BOLLEN, 1995).

Bactérias preferencialmente se aderem e colonizam superfícies porosas e materiais que apresentem sulcos e reentrâncias do que aqueles que se apresentam lisos ou extremamente lisos; isto se dá provavelmente devido ao aumento da área de superfície proporcionado pelas áreas irregulares (KATSIKOGIANNI; MISSIRLIS, 2004). As superfícies irregulares de certa forma protegem a bactéria contra forças de remoção que incidem sobre ela durante a fase inicial e reversível de aderência, e promove uma maior área para a colonização, favorecendo a adesão e formação de biofilme. Sendo este fenômeno observado de modo marcante após incubação à longo prazo (DANESHMEHR et al., 2008).

Estudos têm revelado a existência de alterações na morfologia superficial do esmalte irradiado com os lasers de alta potência, com a existência de rugosidade moderada na superfície do substrato, ainda que utilizando parâmetros sub-ablativos. O aumento ou diminuição da rugosidade superficial, bem como alterações na morfologia do esmalte, parecem ser dependentes dos parâmetros utilizados (ARCORIA; LIPPAS; VITASEK, 1993; NELSON; JONGEBLOED; FEATHERSTONE, 1986). Korytnicki et al. (2006) realizaram um estudo *in situ* no qual irradiaram fragmentos de esmalte humano com o laser de Nd:YAG em alta dosagem (113 J/cm^2) e, após 28 dias de exposição da amostra in situ, observou que toda a amostra (fragmentos irradiados ou não) perdeu seu brilho inicial e apresentava-se fosca e rugosa. Os fragmentos irradiados pareciam mais rugosos do que os não irradiados possivelmente influenciando na adesão bacteriana inicial e posterior estagnação. No entanto, os dados microbiológicos não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos para nenhum dos microorganismos encontrados.

A literatura, no entanto, reporta relação significativa e direta entre rugosidade superficial e aderência bacteriana ao esmalte que passou por algum tipo de tratamento na superfície (GURGAN; BOLAY; ALACAM, 1997), a exemplo do estudo realizado por Hosoya et al. (2003) no qual realizando tratamento clareador, toda amostra clareada utilizando peróxido de hidrogênio 35%, apresentou aumento na adesão de colônias de *Streptococcus mutans*; os autores ainda alertam ao fato de que a adesão bacteriana pode ser favorecida, e ser ainda maior após tratamentos repetitivos. Estas mudanças estruturais no esmalte pós-tratamento podem aumentar a susceptibilidade à aderência de microorganismos e possivelmente influenciar no risco do desenvolvimento de lesões de cárie.

De modo que questiona-se se a alteração morfológica resultante da interação dos lasers com o tecido mineralizado, ainda que utilizando parâmetros sub-ablativos, possa promover o aumento da aderência bacteriana e interferir negativamente no equilíbrio do processo de desmineralização e remineralização desse substrato na cavidade bucal.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo *in vitro* foi avaliar a aderência bacteriana à superfície de esmalte dental irradiado por diferentes lasers de alta potência com parâmetros para prevenção de cárie, correlacionando-a com a rugosidade superficial pós-tratamento.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Aspectos Éticos

Foram utilizados dentes terceiros molares humanos inclusos, extraídos por motivos não relacionados a esta pesquisa. O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da FO-USP e recebeu o parecer de aprovação (Protocolo 02/08) (Anexo A).

4.2 Delineamento experimental

O fator em estudo, *Tratamento Superficial*, foi realizado em 6 níveis, sendo 4 experimentais (Lasers de Er:YAG, Er,Cr:YSGG, Nd:YAG e CO_2), um controle positivo (tratamento com flúor) e um controle negativo (amostra não irradiada e/ou exposta ao flúor) (Tabela 4.1). As unidades experimentais foram compostas por 120 espécimes (fragmentos de esmalte dental humano), distribuídas aleatoriamente em dois grupos de 60 espécimes cada, para duas avaliações: avaliação quantitativa da *Perda Mineral* através do teste de microdureza transversal, e avaliação da *Rugosidade Superfícial e Aderência Bacteriana ao substrato* (Figura 4.1) (Apêndice G).

Tabela 4.1 - Grupos experimentais

Grupo	N	Potência (W)	Energia (mJ)	Fluência (J/cm^2)	Taxa de Repetição (Hz)
G1 (controle negativo)	**10**	**Sem tratamento**			
G2 (controle positivo)	**10**	**Tratamento com FFA por 4 minutos**			
G3 (Nd:YAG)	**10**	**0,6**	**60**	**84,90**	**10**
G4 (Er:YAG)	**10**	**-**	**64**	**20**	**2**
G5 (Er,Cr:YSGG)	**10**	**0,75**	**-**	**8,5**	**20**
G6 (CO_2)	**10**	**2**	**-**	**16**	**2**

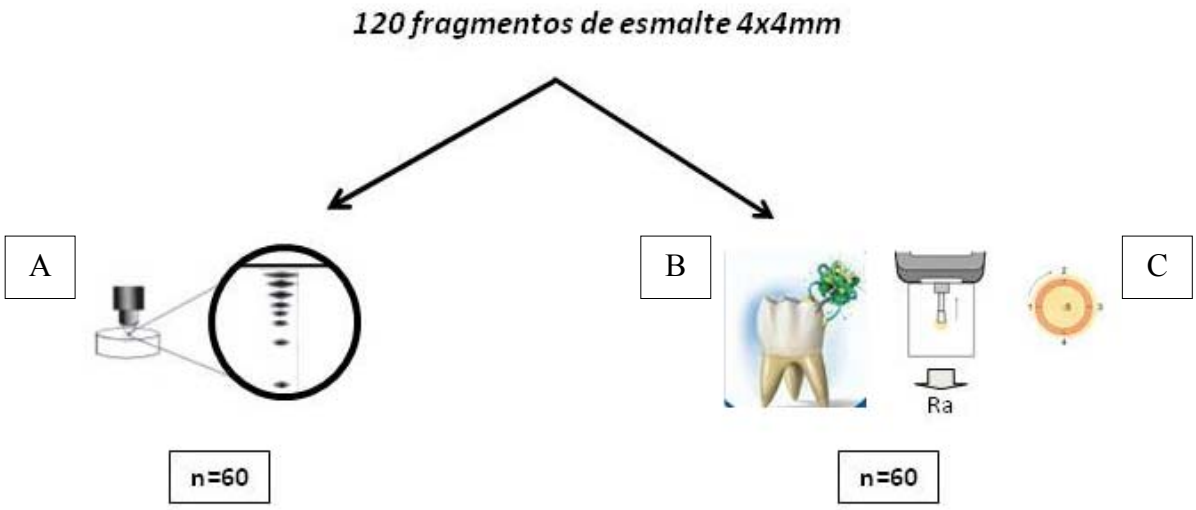


Figura 4.1 - Divisão da amostra entre os ensaios experimentais. A- ensaio de microdureza transversal, B- ensaio de aderência bacteriana e C- ensaio de rugosidade superficial

4.3 Preparo das amostras

Foram coletados terceiro molares inclusos, extraídos por razões não relacionadas a esta pesquisa. Os dentes foram armazenados em água destilada e mantidos em geladeira (4ºC) até o início da fase experimental (2 semanas). A limpeza dos dentes foi realizada com curetas periodontais e, em seguida, a profilaxia com pedra pomes, água e taça de borracha, em baixa rotação (Kavo, Joinville, SC, Brasil). Os dentes foram seccionados na junção amelo-cementária e, posteriormente, submetidos a cortes longitudinais com o auxílio de um disco diamantado dupla-face (KG Sorensen, Barueri, SP, Brasil), sob refrigeração à água, resultando em espécimes de esmalte, com dimensões aproximadas de 4x4 mm. Após a limpeza e secção, a amostra foi colocada em ultra-som com água destilada e deionizada por 10 minutos, objetivando a remoção de debris da superfície. A amostra foi analisada em Microscópio de Luz (30X) e os espécimes que apresentaram manchas ou trincas foram descartados da pesquisa.

Dos 120 espécimes obtidos, 60 foram destinados ao teste de rugosidade e aderência bacteriana. Estes foram incluídos em resina acrílica autopolimerizável com o auxílio de moldes em aço inoxidável com diâmetro interno de 6 mm (Figuras 4.2 e 4.3).

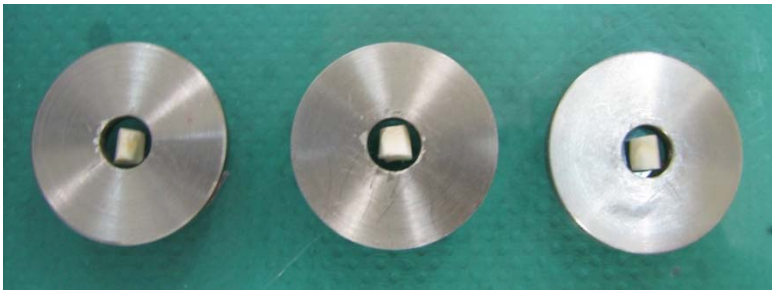


Figura 4.2 - Matriz em aço inoxidável para a confecção dos espécimes

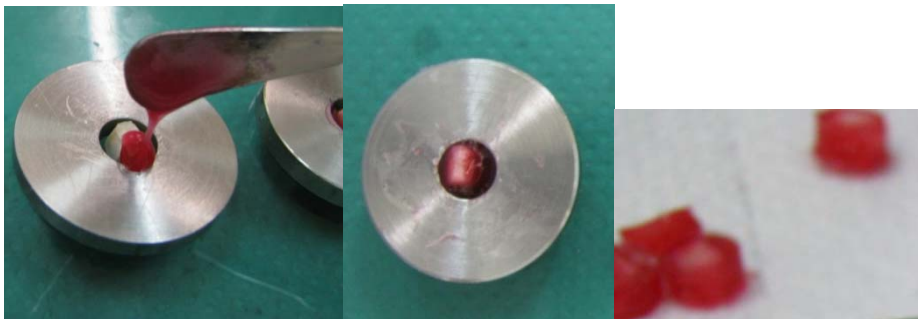


Figura 4.3 -Resina acrílica vertida sobre o fragmento de esmalte posicionado no centro da matriz. Finalização do processo de polimerização e retirada dos espécimes da matriz de inox

Após a polimerização, a amostra foi planificada em Politriz (Ecomet 3, Buehler, USA), a 250 rpm, com o auxílio de um dispositivo em aço inox que favorece e possibilita a planificação da amostra, seguindo o polimento com as lixas de granulação decrescente (Figura 4.4): #240 para remoção das arestas, #400 por 1 minuto, #600 por 1 minuto, #1200 por 2 minutos, #4000 por 2 minutos.`

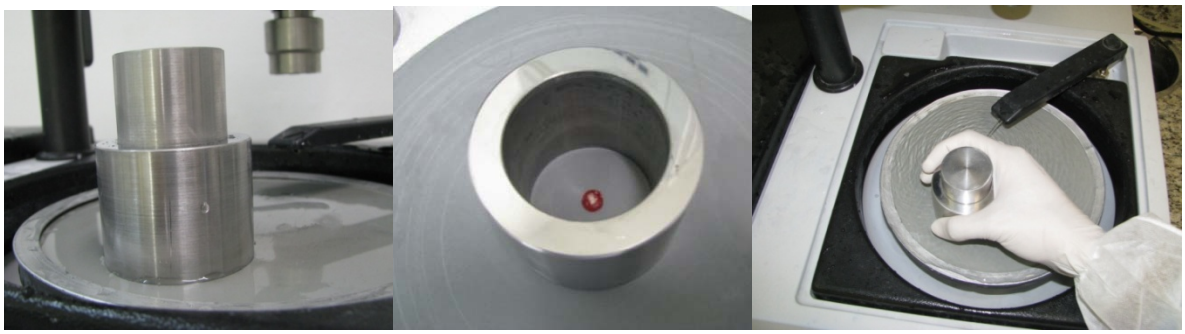


Figura 4.4 - Dispositivo em aço inox; espécime no centro do dispositivo; dispositivo em ação, no momento da planificação no equipamento Politriz Ecomet

Esta etapa foi seguida por polimento com pasta de granulação 3 microns (METADI®-Buehler-USA) (Figura 4.5), e disco de feltro por 40 segundos. A amostra foi lavada com água destilada e deionizada e, em seguida, levada ao ultra-som com água destilada e deionizada por 20 minutos para a remoção de debris.

Figura 4.5 - Pasta de granulação 3 microns (METADI®- Diamond polishing compound for metalography-Buehler-USA)

Após a fase na qual 60 fragmentos de esmalte foram incluídos em resina acrílica individualmente e polidos, todos os 120 espécimes do estudo passaram conjuntamente por uma nova fase.

Foram criadas janelas com a dimensão de 3 X 3 mm nas faces livres. Para a padronização, foram recortadas fitas auto-adesivas com 9 mm^2 de área. Estas foram posicionadas sobre a superfície do esmalte que, em seguida, foi impermeabilizado com esmalte cosmético, para que a irradiação e indução de cárie ocorressem somente nos lugares pré-estabelecidos. Após a remoção das fitas, a superfície de esmalte de 3x3 mm foi exposta. Os espécimes foram novamente divididos em seus respectivos grupos: o primeiro direcionado para o ensaio de desafio ácido e microdureza, enquanto o segundo para análise da rugosidade superficial e aderência bacteriana (Figura 4.1).

4.4 Tratamento da superfície de esmalte

Durante o período de irradiação dos grupos experimentais, os espécimes dos grupos **G1** (controle negativo – sem tratamento) e **G2** (controle positivo - flúor) ficaram armazenados em umidade relativa a 4°C. Os espécimes dos grupos experimentais **G3-G6** foram submetidos à irradiação com os lasers de alta potência, como descrito a seguir.

4.4.1 Grupos controles - G1, G2

Os espécimes do grupo G1 (controle negativo) permaneceram sem tratamento até o início da fase de indução de cárie *in vitro* pelo método da ciclagem química DES-RE. Os espécimes do grupo G2 (controle positivo) foram submetidos ao tratamento da superfície com flúor fosfato acidulado (DFL Indústria e Comércio S.A- Brasil) antes de serem expostos aos testes. Um gel contendo flúor a 1,23% (NaF) com o pH variando de 3.6 a 3.9 (Figura 6) foi aplicado por 4 minutos utilizando pincéis descartáveis. Após a exposição ao flúor, a superfície de esmalte foi enxaguada com água destilada por 1 minuto e seca por jato de ar.

Figura 4.6 - Flúor fosfato acidulado

4.4.2 Laser de Er: YAG[1] (λ=2,94 μm) - G3

Neste estudo foi utilizado o laser em alta intensidade, Er:YAG (KaVo Key 3, KaVo, Alemanha)(Figura 7), infra-vermelho, com comprimento de onda de 2,94 μm. A irradiação foi realizada com spray de refrigeração ar/água (5,0 mL/min), com a taxa de repetição de 2 Hz e energia de 64 mJ durante 20 segundos, com densidade de energia de 20 J/cm^2. A peça-de-mão utilizada foi a # 2055, com a fibra 50/10 e diâmetro do feixe de irradiação de 0,32 mm. A energia utilizada para a irradiação das amostras foi ajustada no equipamento levando-se em consideração o fator de transmissão da fibra 50/10 (0,54). A irradiação foi realizada com a ponta ativa do laser de maneira perpendicular à superfície, no modo contato, percorrendo toda a área do esmalte no sentido horizontal e vertical (CECCHINI et al., 2005).

Figura 4.7 - Laser de Er:YAG, 2,94 μm; ponta 2055 (fibra óptica 50/10)

[1] Equipamento adquirido com recurso financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo n. 97/10823-0

4.4.3 Laser de Er, Cr:YSGG[2] - G4

Neste estudo foi utilizado o laser em alta intensidade Er,Cr:YSGG (Waterlase Millennium™, Biolase Technologies Inc., San Clemente, CA, USA) (Figura 4.8), com comprimento de onda de 2.78 µm. A potência de saída do equipamento varia de 0.25 to 6.0 W, sendo fixada a potência de 0,75 W, e a taxa de repetição é fixa em 20 Hz, com densidade de energia de 8,5 J/cm^2. A duração do pulso varia de 140 a 200 µs. O diâmetro do feixe na área focal, para a peça de mão com a ponta de safira S75, é de 0,75 mm. A ponteira foi posicionada perpendicularmente a 1 mm da superfície do esmalte (modo focado), e para assegurar o tamanho do foco, uma lima endodôntica foi fixada à peça de mão a uma distância de 1 mm da área a ser irradiada. A irradiação foi executada durante 20 segundos, com spray de ar (20%) e sem resfriamento por água (FREITAS et al., 2008).

Figura 4.8 - Laser de Er,Cr:YSGG, 2.78 µm; peça de mão MVP Ponta de safira S75 Ø 0,75 mm

[2] *Equipamento adquirido com recurso financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), projeto CEPID/CEPOF processo n. 98/14270-8

4.4.4 Laser de Nd: YAG (λ=1064 nm) - G5

Neste estudo foi utilizado o laser em alta intensidade, pulsado de Nd:YAG (Pulse Master 1000, American Dental Technology, USA) (Figura 4.9), infra-vermelho, com comprimento de onda de 1.064 nm. Os espécimes foram previamente cobertos com uma fina camada de pó de carvão diluído em partes iguais de água destilada/deionizada e etanol 99%, com o objetivo de otimizar o efeito do laser de neodímio (BOARI; ZEZELL; EDUARDO, 1999). A irradiação foi realizada com uma fibra óptica de 300 μm em contato, varrendo a superfície do esmalte em posição perpendicular durante 20 segundos com a taxa de repetição de 10 Hz, potência de 0,6 W, 60 mJ, resultando em densidade de energia de 84,9 J/cm^2. O procedimento foi realizado três vezes para promover a fusão do esmalte.

Figura 4.9 - Laser de Nd:YAG, 1064 nm

4.4.5 Laser de Dióxido de Carbono (λ=10.6 μm) – G6

Neste estudo foi utilizado o laser em alta intensidade, CO_2 (Sharplan 40C) (Figura 4.10), com comprimento de onda de 10.6 μm. A irradiação foi realizada com taxa de repetição de 2 HZ, duração de pulso 50 ms (sendo o *offtime* de 0,45 s e largura de pulso de 0,05 s) e 2 W de potência durante 20 segundos (movimentos na horizontal e vertical), com densidade de energia de 16 J/cm^2 (KLEIN et al., 2005). O diâmetro do feixe de irradiação é de 0,3 mm de diâmetro. A irradiação foi feita com a ponteira posicionada a 5 mm de distância da superfície de esmalte e executada com spray de ar sem resfriamento por água.

Figura 4.10 - Laser de CO_2, 10.6 μm

4.5 Subdivisão dos grupos experimentais

4.5.1 Grupo 1: Ciclagem de pH/ Avaliação da microdureza

Os espécimes destinados ao testes de ciclagem de pH e avaliação de microdureza passaram pelas seguintes etapas:

4.5.1.1- Ciclagem de pH

Os espécimes, previamente cobertos com uma fina camada de esmalte cosmético, com exceção de uma janela de 3X3 mm, foram fixados em fios ortodônticos com auxílio de cera pegajosa, e imersos individualmente nas soluções contidas em tubo Falcon™ (BD-USA), solução 1: desmineralizante (DES) e solução 2: remineralizante (RE) (Figura 4.11).

Figura 4.11 - Corpos de prova evidenciando janela de 3x3mm; corpo-de-prova fixado em fio ortodôntico com auxílio de cera pegajosa; conjunto inserido em solução DES contida em tubo Falcon

A solução remineralizante foi constituída por cálcio (1,5mmol/l), fosfato (0,9 mmol/l), cloreto de potássio (150 mmol/l), e cacodilato (20 mmol/l), tamponado em pH 7. Esta solução tem aproximadamente o mesmo grau de saturação com respeito à hidroxiapatita em saliva, e é similar à solução utilizada por Ten Cate e Duijsters (1982). Já a solução desmineralizante consistiu-se em cálcio (2,0 mmol/l), fosfato (2,0 mmol/l) e acetato (0,075 mol/l), tamponado em pH 4.4.

A ciclagem sempre teve início com a imersão individual dos espécimes em 40 mL de solução desmineralizante por 6 horas a 37°C. Após este período, os espécimes foram manipulados individualmente, retirados da solução DES, lavados abundantemente com água destilada e deionizada e imersos na solução RE a 37°C, desta vez por 18 horas. Após as 18 horas, os espécimes foram removidos da solução, lavados abundantemente e reinseridos na solução DES.

O teste foi realizado em regime de 24h (desmineralização por 6 horas seguida de remineralização por 18 horas) e transcorreu por 14 dias. Destes, 5 dias consecutivos de teste com intervalos de 2 dias (fim de semana) nos quais os espécimes ficavam imersos apenas em solução remineralizante, e em seguida mais 5 dias de teste e 2 de intervalo, como demonstrado na Figura 4.12.

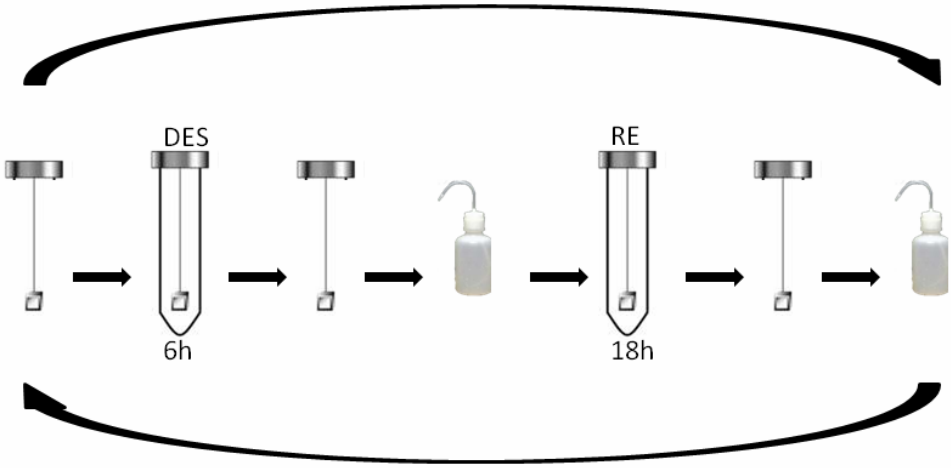


Figura 4.12 - Esquematização da Ciclagem de pH

Após o período de ciclagem de pH, os espécimes foram mantidos em umidade em estufa a 37°C. A próxima fase consistiu na secção dos espécimes com disco diamantado dupla-face (KG Sorensen, Barueri, Brasil), adentrando aproximadamente 1 mm a janela de 3x3 mm (Figura 4.13).

Figura 4.13 - Secção longitudinal dos espécimes com disco diamantado dupla face

A amostra foi aderida a um "sample cup" com cera utilidade ao seu redor; o posicionamento foi realizado de forma padronizada, estando a face livre sempre voltada para a porção externa e a face oclusal posicionada à esquerda. O sample cup foi, então, vaselinado e a resina acrílica foi vertida sobre o conjunto. Cada sample cup continha 10 espécimes de cada grupo, totalizando 6 grupos. Após a

polimerização da resina acrílica, o conjunto foi removido do sample cup e mantido em umidade em estufa a 37°C. (Figura 4.14)

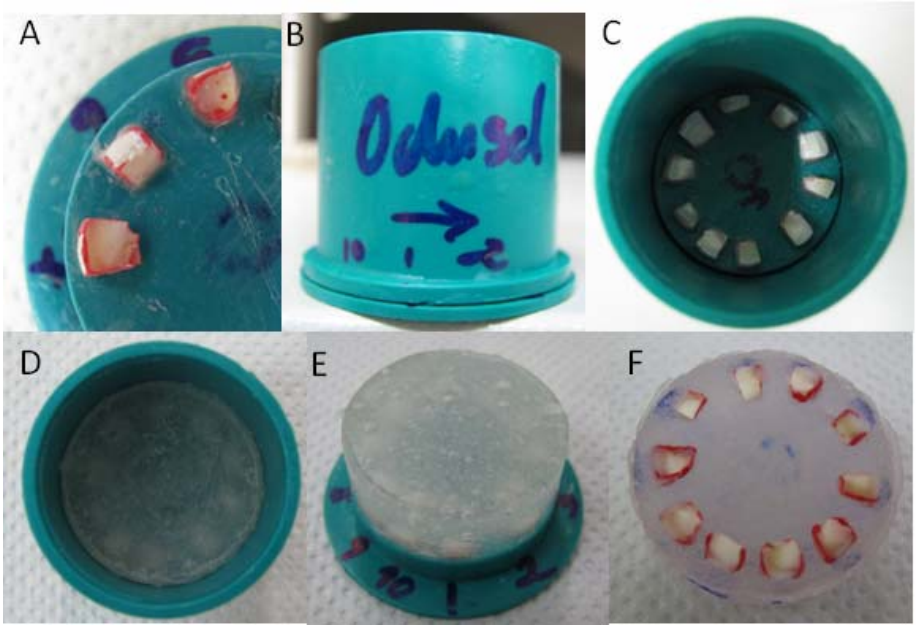


Figura 4.14 - A- Espécime seccionado é aderido à base do sample cup com auxílio de cera utilidade; B-Inscrição no sample cup realizada para promover padronização do processo, todas as faces oclusais direcionadas à direita do aparato no sentido anti-horário; C-Amostra aderida ao sample cup e fundo do aparato é vaselinado evitando que resina fique aderida; D- Resina Acrílica é vertida sobre o conjunto; E- Conjunto após polimerização da resina acrílica e retirada das paredes do aparato; F- configuração final da amostra (grupo Er:YAG) após inclusão em resina acrílica, permitindo a visualização e o acesso transversal

Por fim, os discos experimentais, cada qual contendo 10 espécimes, foram planificados em Politriz (Ecomet 3, Buehler, USA), a 250 RPM, com o auxílio de um dispositivo em aço inox que favorece e possibilita a planificação da amostra (figura 4.15), na seguinte ordem de lixas: #240 para remoção das arestas, #400 por 1 minuto, #600 por 1 minuto, #1200 por 2 minutos, #4000 por 2 minutos.

Figura 4.15 – Disco experimental contendo espécimes do grupo Er,Cr:YSGG, dentro do dispositivo com a face voltada para a lixa em politriz; conjunto é fechado e começa o acabamento e polimento da amostra

Esta etapa foi seguida por polimento com pasta de granulação 3 microns (METADI®- Diamond polishing compound for metalography-Buehler-USA) (Figura 4.16), e disco de feltro por 40 segundos. A amostra foi lavada com auxílio de uma almotolia com água destilada e deionizada e posteriormente levada ao ultra-som com água destilada e deionizada por 20 minutos para a remoção de debris.

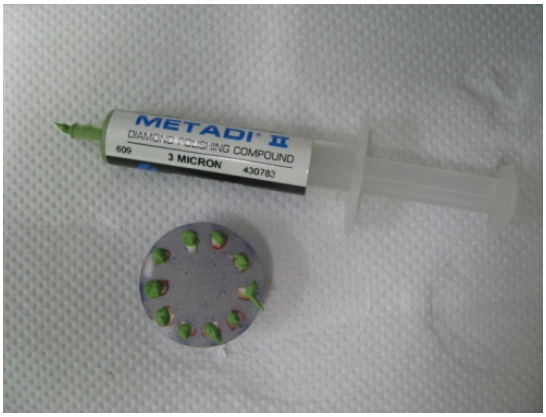


Figura 4.16 - Pasta de granulação 3 microns posicionada sobre cada um dos espécimes do grupo antes de ser levada ao disco de feltro para polimento por 40 segundos

4.5.1.2 Avaliação da Estrutura Mineral (Ensaio de microdureza)

Nesta etapa, após a ciclagem de pH, o valor da dureza Knoop foi determinado na face transversal para cada um dos espécimes, com a utilização do microdurômetro Knoop (HMV-2000 Shimadzu), utilizando-se uma carga estática de 25g por 5 segundos. Duas colunas de 8 indentações cada foram realizadas nas seguintes profundidades: 10, 20, 40, 60, 80, 100, 140 e 220 µm da superfície do esmalte(Figura 4.17).

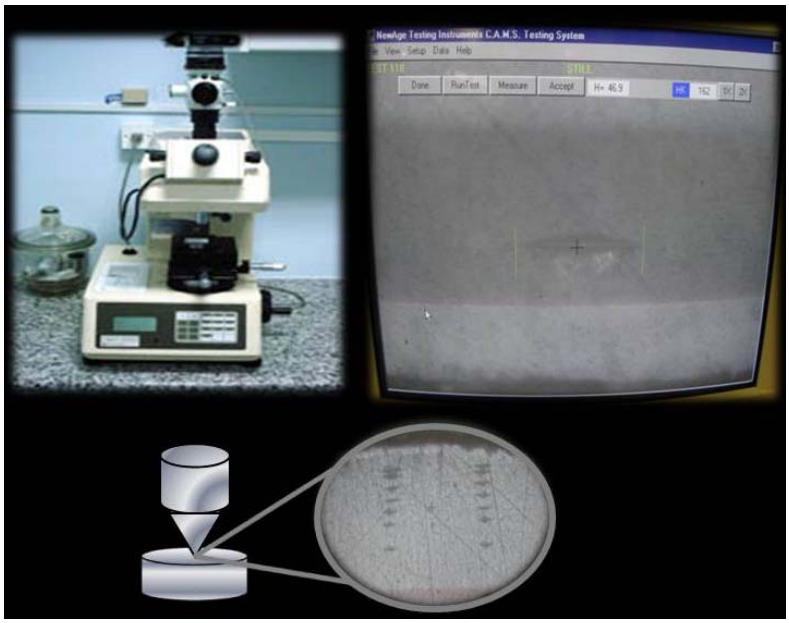


Figura 4.17 - Tela do programa NewAge Testing instruments C.A.M.S Testing System (USA) no momento de mensuração da microdureza; duas colunas de indentações obtidas no grupo CO_2

A partir da microdureza da secção transversal foi possível avaliar a quantidade de perda mineral, em diferentes profundidades da lesão e do tecido mineralizado utilizando para tal a fórmula descrita por Featherstone et al. (1983), (% vol= 4,3 X (KHN)½ + 11,3), na qual a porcentagem de volume mineral perdido

(%vol) é obtida a partir dos valores médios de microdureza Knoop (KHN- Knoop Hardness Number).

4.5.2 Grupo 2: Avaliação da Rugosidade Superficial/ Avaliação Aderência Bacteriana

Os espécimes destinados aos testes de avaliação da rugosidade superficial e aderência bacteriana (60 espécimes, n=10) passaram pelas seguintes etapas:

4.5.2.1 Caracterização topográfica dos espécimes

A técnica de tomografia por coerência óptica - OCT (do inglês Optical Coherence Tomography) é uma técnica de diagnóstico por imagem, que faz uso da propriedade de coerência temporal da luz, produzindo imagens que representam um corte transversal de uma amostra, de forma não invasiva e com alta resolução e que não utiliza radiação ionizante, podendo atingir a resolução de alguns micrômetros (FREITAS et al., 2006; FREITAS, 2007).

A capacidade da técnica OCT de realizar imagens de secções ópticas, é devido a curta coerência temporal da fonte de luz, possibilitando obter imagens microscópicas das estruturas do substrato em profundidades que vão além das imagens convencionais obtidas por técnicas convencionais como os microscópios de

luz e microscópios confocais. A OCT tem atingido profundidades de até 2,0cm em tecidos transparentes e 1-2 mm abaixo da superfície em outros tecidos altamente espalhadores. Sua relativa simplicidade além do baixo custo dos equipamentos, nos quais os sistemas de OCT estão baseados, são outras vantagens importantes (FREITAS, 2007).

Clinicamente o sistema OCT é utilizado para diagnósticos em oftalmologia. Em odontologia, uma série de relatos ocorreram em 1998, com imagens de tecido mole e duro. A luz infra-vermelha pode penetrar toda a extensão do esmalte, possibilitando a criação de imagens 2-D ou 3D da estrutura dental (DE MELO et al., 2005; FREITAS et al., 2009). Embora em odontologia a OCT ainda não esteja clinicamente disponível, o potencial da técnica promete um rápido desenvolvimento tecnológico o que requer mais avaliações laboratoriais pré-clínicas.

A configuração mais comum empregada hoje em dia nos sistemas de OCT (Figura 4.18) é a luz conduzida através de uma fibra óptica até um divisor de feixe formando dois outros feixes com aproximadamente metade da intensidade cada um. Um deles é conduzido pela fibra óptica até um espelho de referência e o outro, é conduzido até a amostra objeto de estudo. A radiação retro refletida pelo espelho e a retro espalhada pela amostra são recombinadas formando os padrões de interferência no detector. Como a fonte luminosa utilizada é de baixa coerência temporal (grande largura de banda espectral) a interferência ocorre no detector somente quando a diferença entre o comprimento óptico do braço da amostra e o braço de referência é menor que o comprimento de coerência da fonte luminosa.

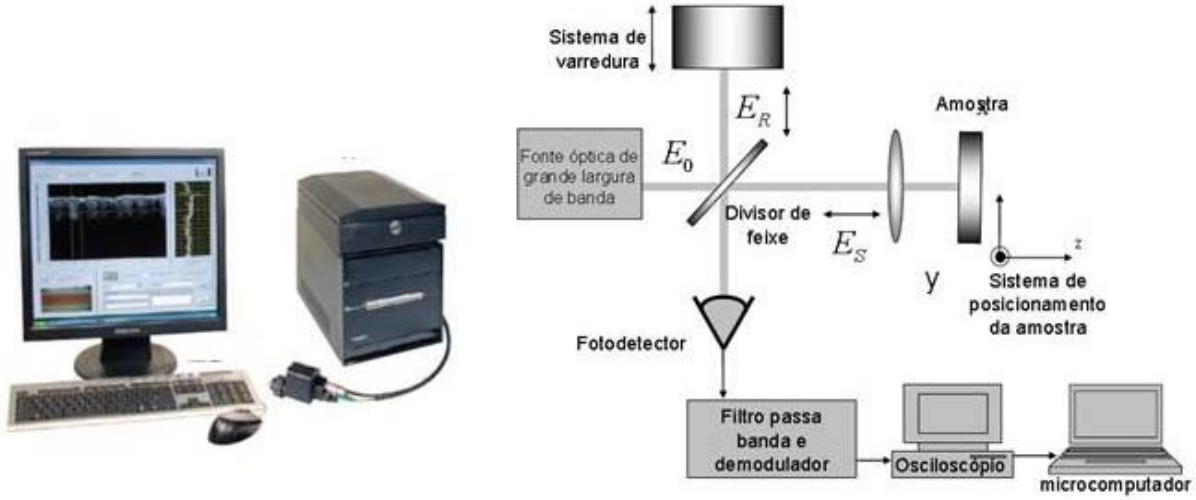


Figura 4.18 - Principais componentes de um sistema de tomografia por coerência óptica

No presente estudo foi utilizado um equipamento de OCT (OCP-930-SR), de comprimento de onda 930nm (Figura 4.18,4.19). Foi realizada varredura num espaço de 3 mm, correspondente à extensão do espécime, com 5 leituras por espécime, com a obtenção de 2,35 imagens (com 2000 colunas) por segundo.

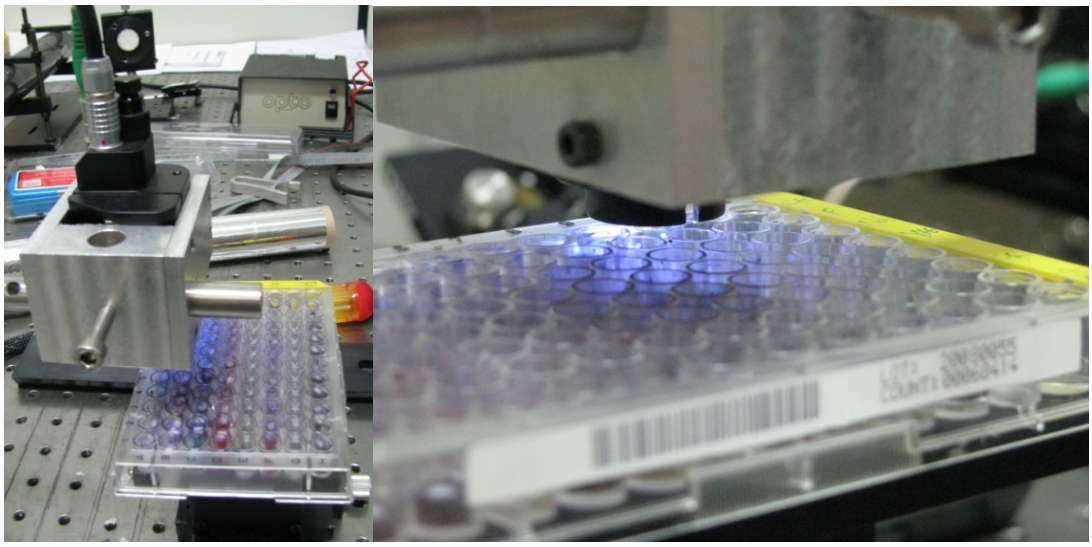


Figura 4.19 - Sistema de varredura da amostra por OCT

As imagens obtidas foram processadas por um software desenvolvido pelo Dr. Anderson Zanardi e Freitas no Centro de Lasers e Aplicações - IPEN-CNEN/SP, onde foram calculados os valores de Ra e Rz segundo a definição da norma DIN 4768 (AMARAL et al., 2009).

O parâmetro de rugosidade Ra corresponde à média aritmética dos valores absolutos das ordenadas de afastamento (yi), dos pontos do perfil de rugosidade em relação à linha média, dentro do percurso de medição (lm). Este parâmetro de medição é o mais utilizado em todo o mundo (Figura 4.20).

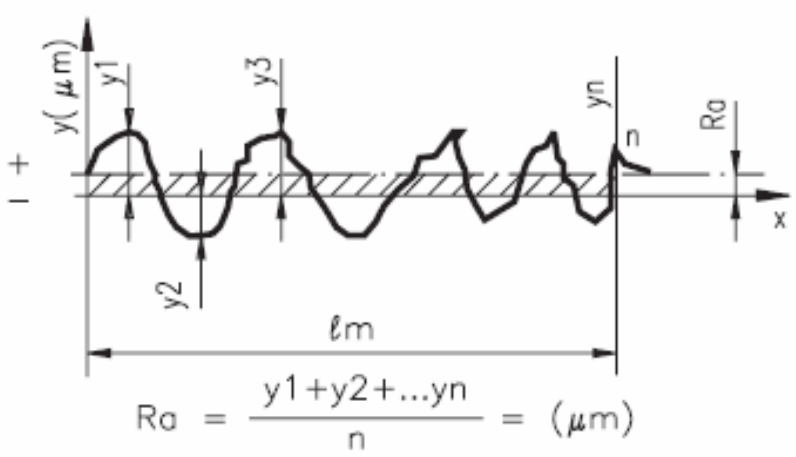


Figura 4.20 - Representação do parâmetro de medição Ra

O parâmetro de rugosidade Rz corresponde à média aritmética dos cinco valores de rugosidade parcial. Rugosidade parcial (Z i) é a soma dos valores absolutos das ordenadas dos pontos de maior afastamento, acima e abaixo da linha média, existentes no comprimento de amostragem. Na representação gráfica do perfil, esse valor corresponde à altura entre os pontos máximo e mínimo do perfil, no comprimento de amostragem (le) (Figura 4.21).

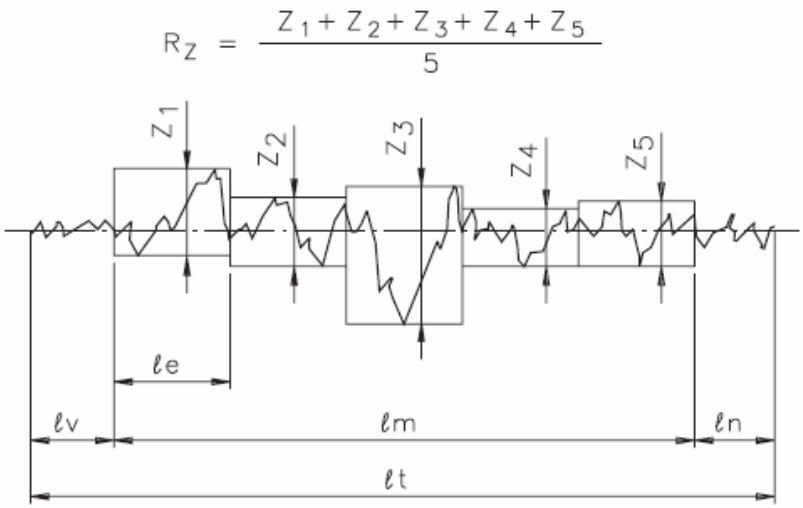


Figura 4.21 - Representação do parâmetro de medição Rz

4.5.2.2 Esterilização por radiação gama

Após análise da rugosidade superficial a amostra foi disposta em placa de 96 poços (Nunc, Wiesbaden, Alemanha) e levada ao IPEN (Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares) no Centro de Tecnologia das Radiações (CTR) onde foi esterilizada por radiação gama (RODRIGUES; CURY; NOBRE DOS SANTOS, 2004), propiciando que os espécimes estivessem livres de contaminação antes do teste de aderência bacteriana (Figura 4.22).

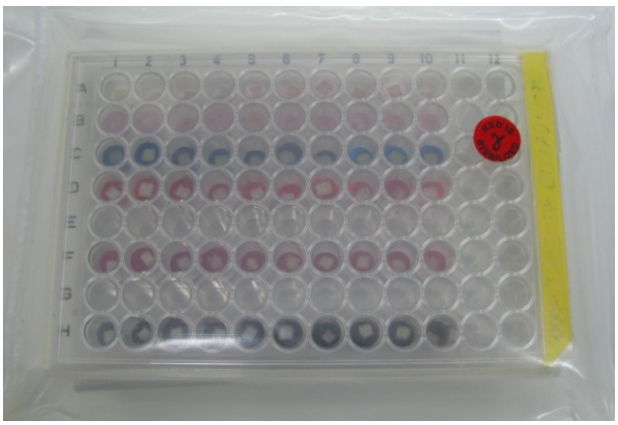


Figura 4.22 - Amostra disposta em placa de 96 poços, após esterilização por radiação gama

4.5.2.3 Indução de cárie e Aderência Bacteriana

Esta fase experimental foi realizada no Laboratório de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB-USP), sob a coordenação da Profa. Dra. Márcia Pinto Alves Mayer, com o objetivo promover a formação de biofilme *in vitro*, possibilitando a análise da aderência bacteriana nos estágios iniciais da formação do biofilme dental, momento na qual a rugosidade do esmalte desempenha um papel crítico (QUIRYNEN; BOLLEN, 1995).

Para avaliar a capacidade da formação de biofilme dental *in vitro*, uma cepa de *Streptococcus mutans* (GS-5) foi utilizada seguindo a metodologia utilizada por Mattos-Graner *et al*., (2004).

No início do experimento, 37 g de Brain Heart Infusion (BHI) agar, em pó, foram adicionados a 1 L de água destilada, e o conjunto foi autoclavado, plaqueado em placas de petri e mantido em geladeira à 4ºC. No próximo passo, 9 g de Todd Hewit-Broth foi misturado a 300 mL de água destilada, autoclavado e mantido em geladeira a 4ºC.

A amostra de *Streptococcos mutans* (GS-5) foi retirada de glicerol à -80 ºC e mantida à temperatura ambiente para degelo. Após o descongelamento, 30 µl de GS-5 foi cultivado em placas de petri através do método de espalhamento com o auxílio de uma alça de Drigalsky. A partir de então, deu-se início a um período de incubação de 48 horas em estufa de CO_2 à 37ºC (Figura 4.23).

Figura 4.23 - Amostra retirada do glicerol à -80 ° e mantida à temperatura ambiente para degelo; 30µl da amostra GS-5 é pipetada em placa petri; método de cultivo de espalhamento; incubação de 48 horas em estufa de CO_2 à 37ºC

Observou-se, após as 48 horas, o crescimento das colônias e ausência de contaminação por fungos. Uma alça de Níquel-Cromo foi deslizada sobre a placa de petri em movimentos no sentido horizontal, removendo parte das colônias. Estas foram imediatamente colocadas em um tubo de ensaio contendo 1 mL de meio de cultura, caldo Todd Hewitt (Acumedia, Baltimore, Maryland, EUA). O conjunto foi levado à estufa CO_2 a 37ºC por aproximadamente 18 horas (Figura 4.24).

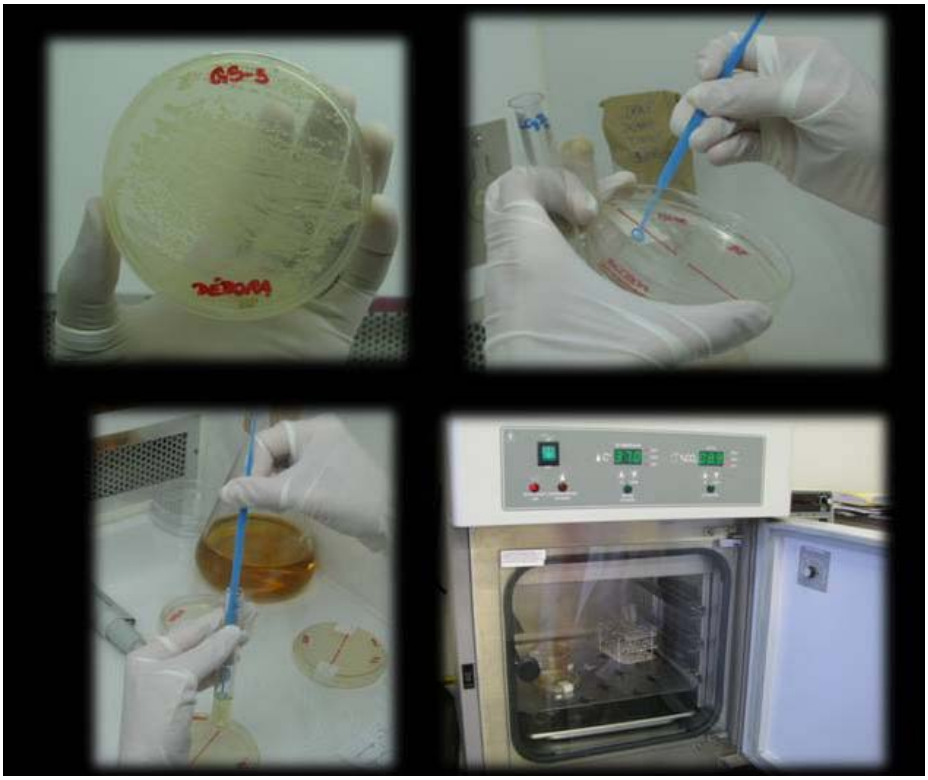


Figura 4.24 - Placa petri evidenciando o crescimento de colônias GS-5; remoção de parte das colônias com alça realizando movimento delicados; colônias removidas são levadas ao tubo de ensaio com meio de cultura; conjunto levado à estufa 37ºC

Após as 18 horas, a absorbância do meio foi ajustada até A550 nm = 0.3 (Espectofotômetro 20 Genesys®), e este passou por diluição 1:1000 em caldo estéril (Figura 4.25).

Figura 4.25 - Espectrofotômetro Genesys®; tubo de ensaio contendo meio de cultura, colocado no encaixe pronto para leitura; absorbância ajustada a 550nm e resultado da leitura 0,3 A

Alíquotas de 70 µL foram incubadas em cada um dos 60 poços da placa de fundo chato (Cartel, Milão, Itália), no fundo da qual discos de esmalte dental embutidos em resina acrílica estavam previamente situados. As culturas diluídas em caldo foram também incubadas em tubos, para a estimativa do crescimento planctônico (Figura 4.26).

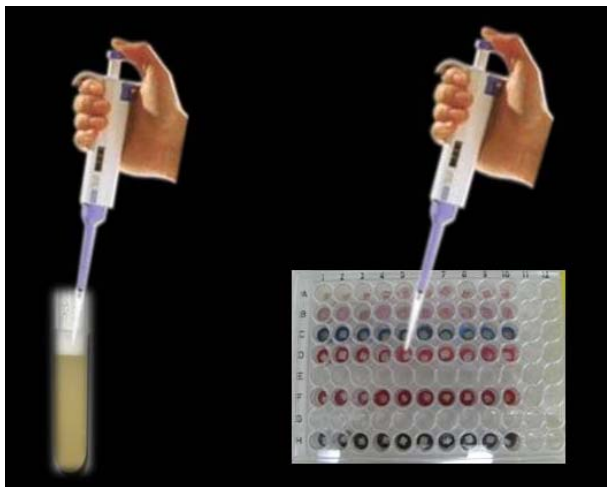


Figura 4.26 - Alíquotas de 70µl de meio dispensadas sobre os espécimes localizados no fundo dos poços da placa de fundo chato

Após 18 h de incubação a 37°C, sob condições de anaerobiose (80% N_2, 10% H_2, e 10% CO_2, Oxilúmen, São Paulo, Brasil) em câmara de anaerobiose (855-AC, Plas-Labs, Lansing, Michigan, EUA) (Figura 4.27), o meio foi removido dos poços com o auxílio de uma bomba à vácuo.

Figura 4.27 - Câmara de anaeróbios; placa de fundo chato dentro da câmara durante processo de descompressão

Em cada poço da placa, 100 µL de PBS (Phosphate buffered saline- Solução salina tamponada) foi adicionado e removido também por sucção à vácuo, este processo foi repetido por 3 vezes. Por fim, o biofilme foi corado pela adição em cada poço, de 150 µL de solução de cristal violeta 1% filtrado (Merck, Darmstadt, Alemanha), por 30 minutos.

O cristal de violeta foi sugado da placa, e cada poço foi lavado com 150 µL de água destilada por 3 vezes. Na etapa seguinte o cristal violeta foi eluído em 150 µL de álcool etílico absoluto (Synth, São Paulo, Brasil) por 30 minutos (Figura 4.28).

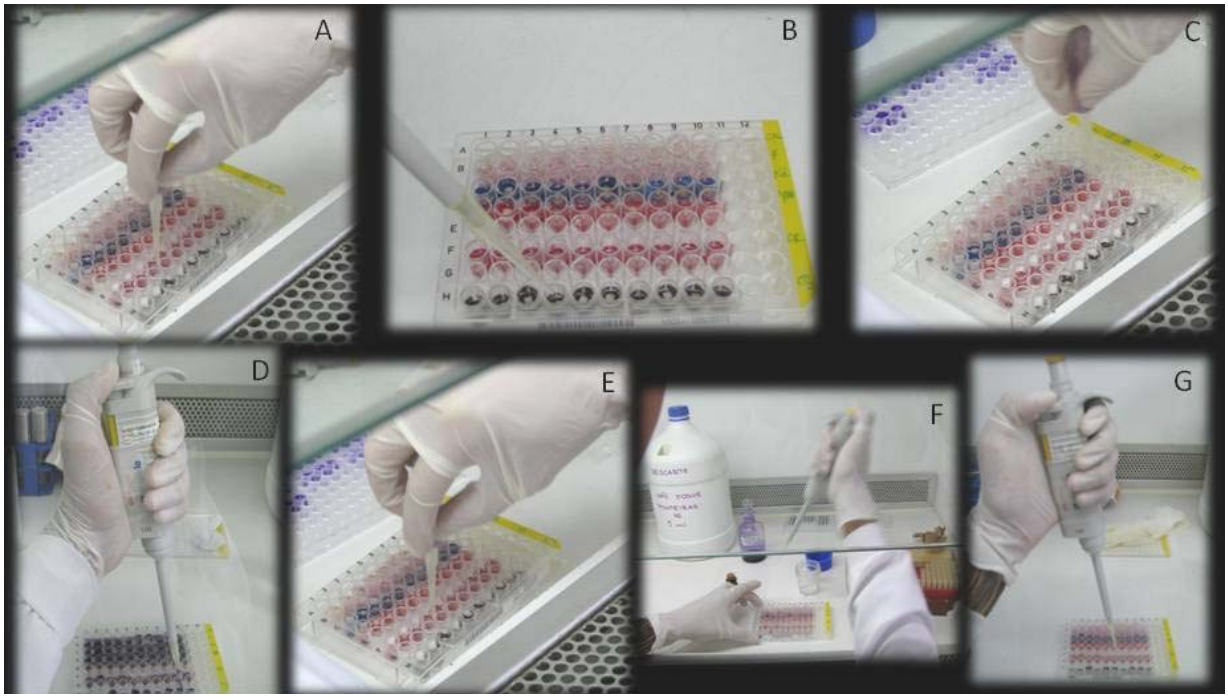


Figura 4.28 - A-O meio de cultura é removido dos poços com o auxílio de uma bomba à vácuo; B-100 µL de PBS é adicionado em cada poço e C-removido por bomba à vácuo(3 vezes). D- biofilme corado por 150 µL de solução de cristal violeta, por 30 minutos; E- cristal de violeta é sugado da placa; F- cada poço é lavado com 150 µL de água destilada (3 vezes). G-cristal violeta é eluído em 150 µL de álcool etílico absoluto, por 30 min

Por fim, uma solução de cristal violeta em etanol foi transferida (uma a uma) para uma placa de 96 poços vazia. Esta nova placa então foi levada à leitura da absorbância no espectrofotômetro 6405UV/Vis (Jenway, Felsted, Dunmow, Essex, Inglaterra) a A570 nm. A absorbância das culturas para a estimativa do crescimento planctônico também foi medida em triplicata em microplacas a A550 nm (Figura 4.29).

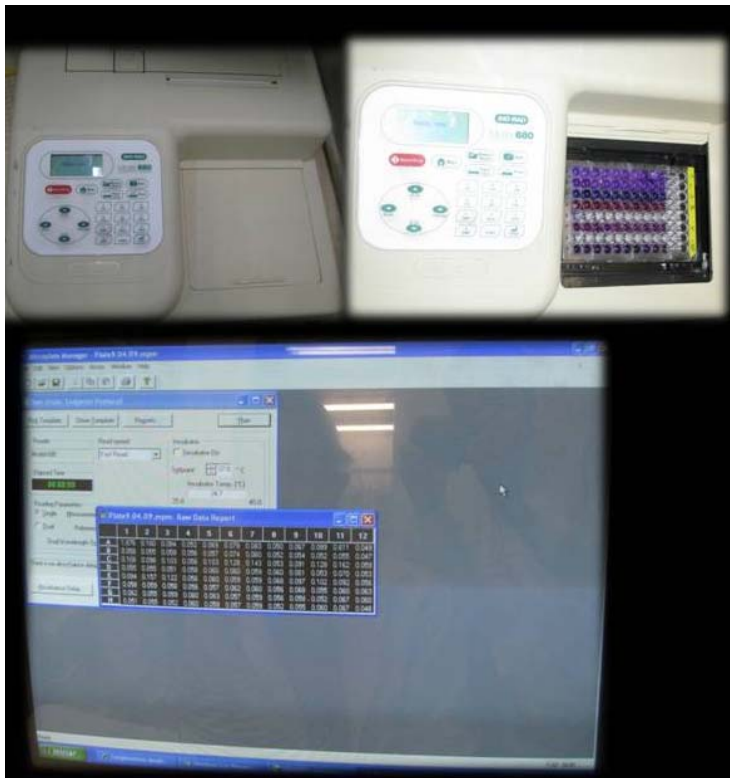


Figura 4.29 - Espectofotômetro; placa de 96 poços inserida no dispositivo de leitura; tela do programa Microplate manager evidenciando os resultados da leitura

Após a obtenção dos valores em triplicata do crescimento planctônico e da formação de biofilme, foi obtida a taxa de formação de biofilme, calculada através da razão entre o valor da absorbância do cristal violeta (A570 nm) eluído dos biofilmes sobre o valor da absorbância do crescimento planctônico (A550 nm).

4.6 Analise Estatística

Foi utilizado um modelo de Análise de Variância (ANOVA), e em caso de significância estatística, foi utilizado o método das comparações múltiplas de Tukey para verificar quais grupos apresentaram diferença significativa entre si.

Para a análise de correlações, foi utilizado o método de Pearson.

Significância estatística foi considerada para valores de $p<0,05$. Todos os resultados e gráficos foram obtidos com a utilização do software estatístico Minitab, versão 15.1.

5 RESULTADOS

5.1 Perda de volume mineral

Foi realizado o teste de microdureza, com 2 colunas de indentação à partir de 10 µm da superfície do esmalte. A primeira coluna em um ponto central e a outra a 180 µm de distância desta (os valores originais de microdureza constam no Apêndice A). Para o cálculo da perda mineral, as médias das duas colunas de leitura de microdureza Knoop, obtidas por cada grupo, foram transformadas em porcentagem de volume mineral (% vol) pela fórmula proposta por Featherstone et al. (1983), na qual KHN (Knoop Hardness Number) representa a dureza Knoop média em cada profundidade avaliada: $(4,3X(KHN)^{1/2}+11,3)$. Os valores de porcentagem de volume mineral obtidos possibilitaram o cálculo de ΔZ (%volume mineral x µm)- os valores originais de ΔZ constam no Apêndice B.

Com os resultados obtidos foram realizadas projeções da porcentagem de volume mineral do esmalte hígido e de cada um dos grupos de estudo, permitindo avaliar graficamente a perda mineral ocorrida em cada uma das profundidades avaliadas (Figuras 5.1, 5.3, 5.5, 5.7, 5.9, 5.11). A mesma projeção permite avaliar a área de perda mineral, ocorrida em cada grupo de estudo, bem como a avaliação do comportamento do processo desmineralização em cada grupo através da análise da configuração da área obtida (∆Z) por cada um deles (Figuras 5.2, 5.4, 5.6, 5.8, 5.10).

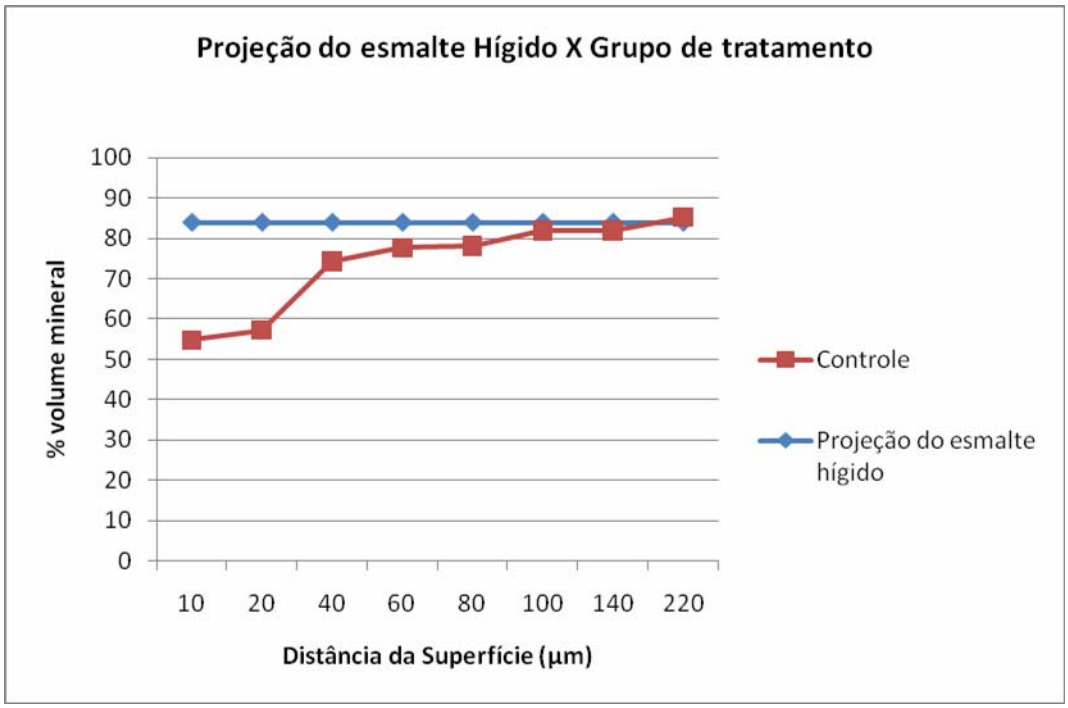


Figura 5.1 - Gráfico da projeção do esmalte hígido *versus* projeção da amostra do grupo controle

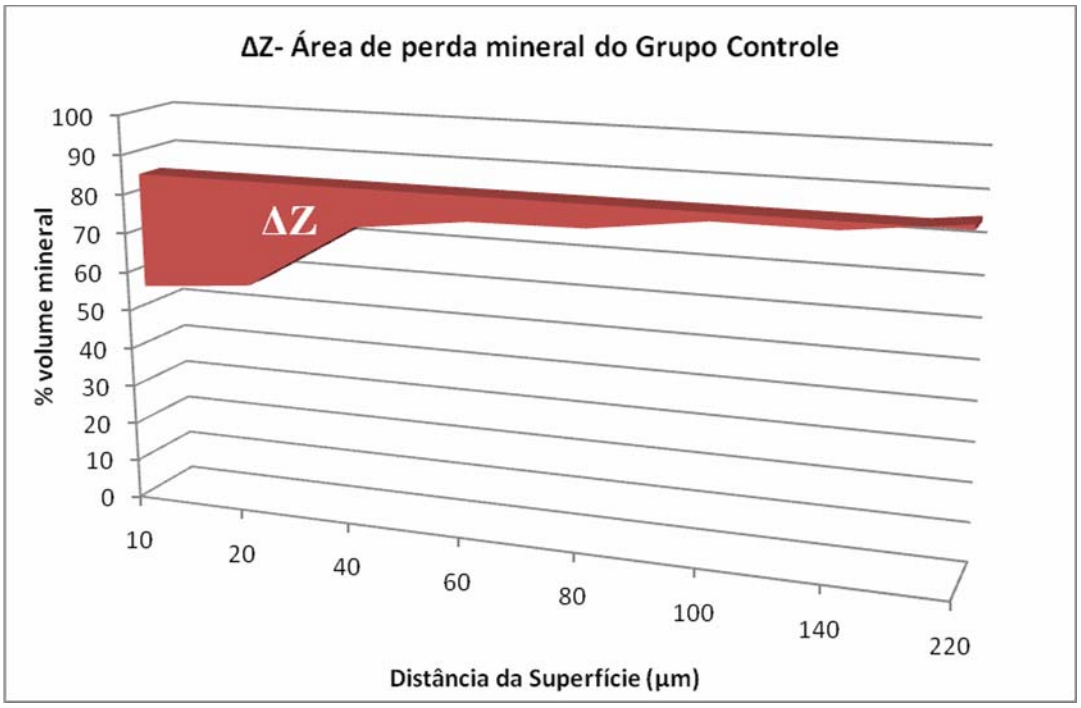


Figura 5.2 - Gráfico de ΔZ (diferença entre a projeção do esmalte hígido e a projeção da amostra do grupo controle)

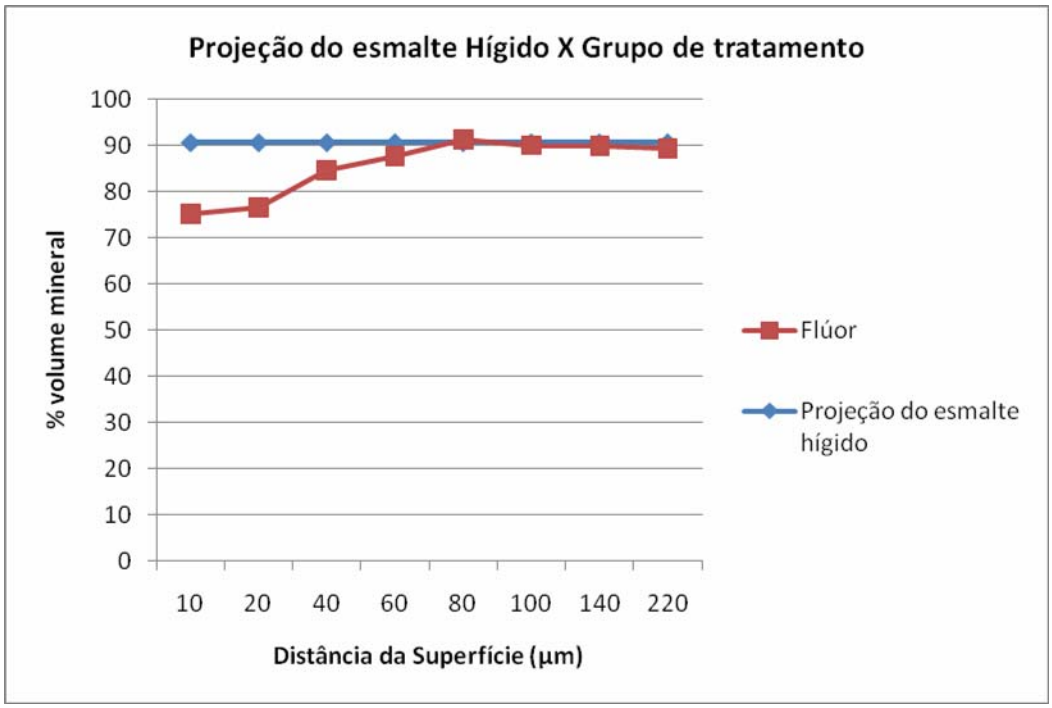


Figura 5.3 - Gráfico da projeção do esmalte hígido versus projeção da amostra do grupo de tratamento flúor

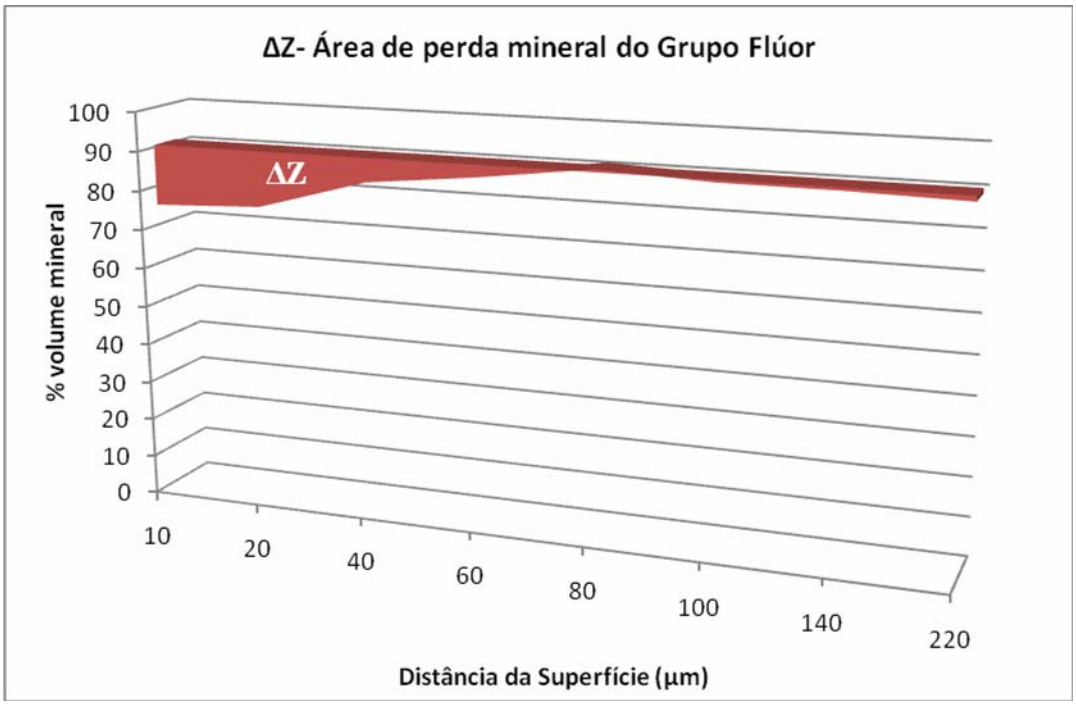


Figura 5.4 - Gráfico de ΔZ (diferença entre a projeção do esmalte hígido e a projeção da amostra do grupo de tratamento flúor)

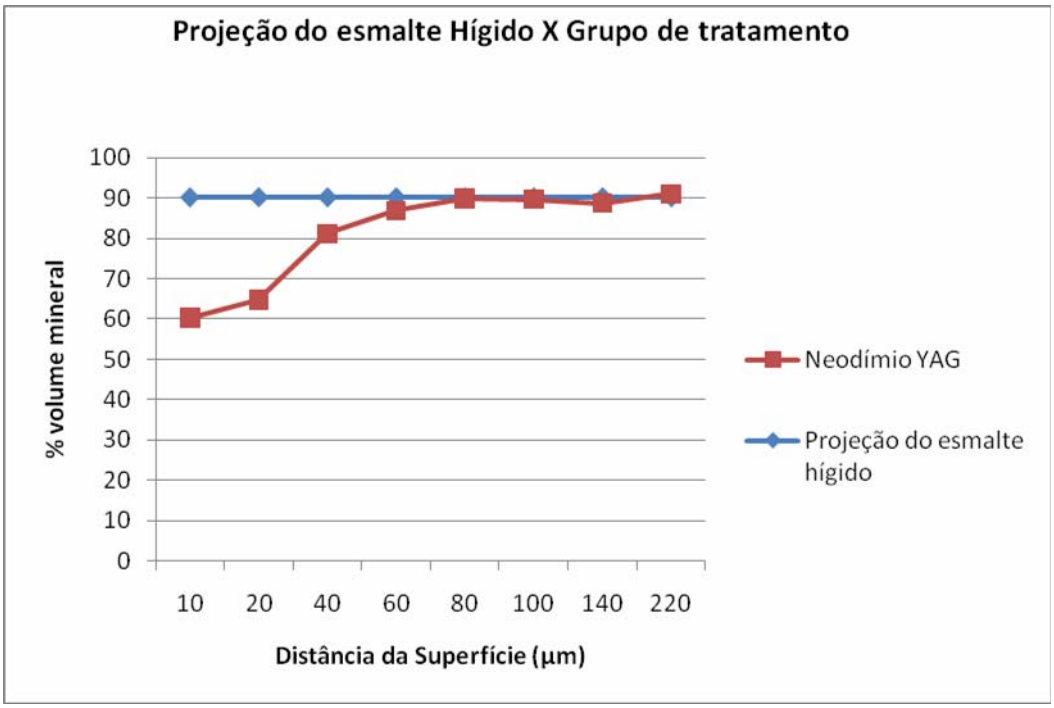


Figura 5.5 - Gráfico da projeção do esmalte hígido versus projeção da amostra do grupo de tratamento Neodímio YAG

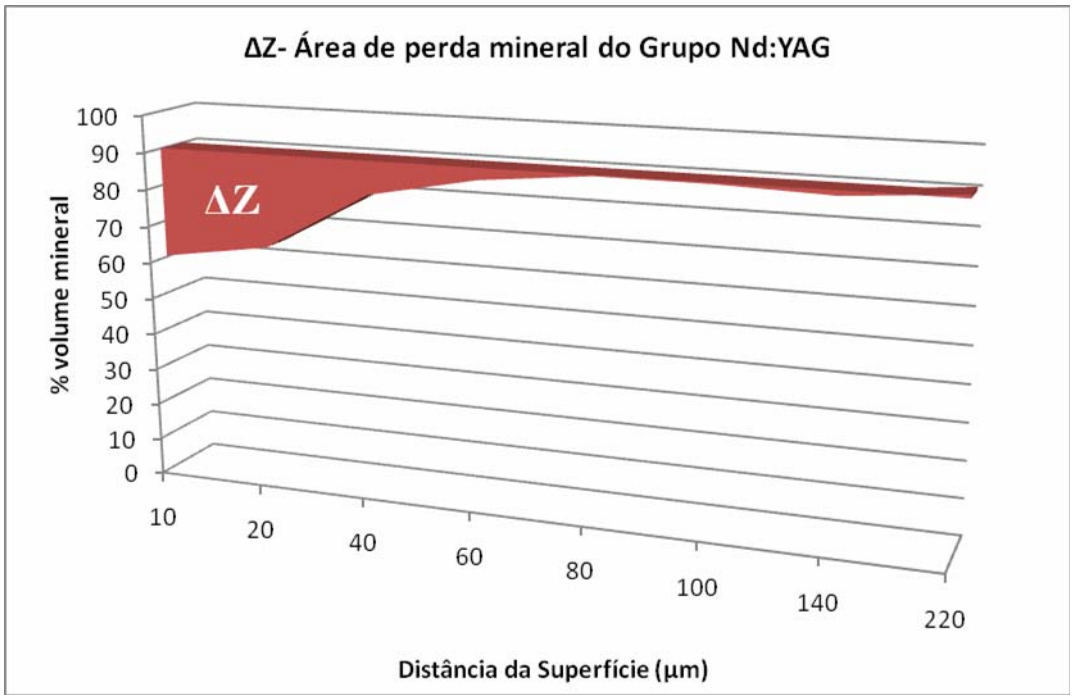


Figura 5.6 - Gráfico de ΔZ (diferença entre a projeção do esmalte hígido e a projeção da amostra do grupo de tratamento Neodímio YAG)

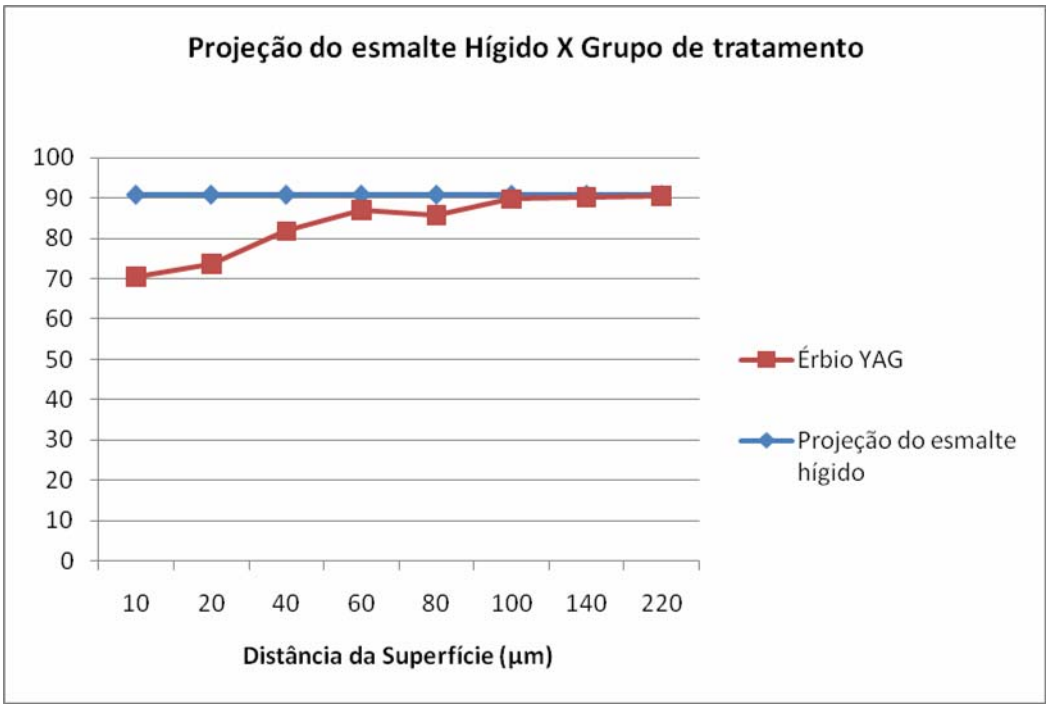


Figura 5.7 - Gráfico da projeção do esmalte hígido versus projeção da amostra do grupo de tratamento Érbio YAG

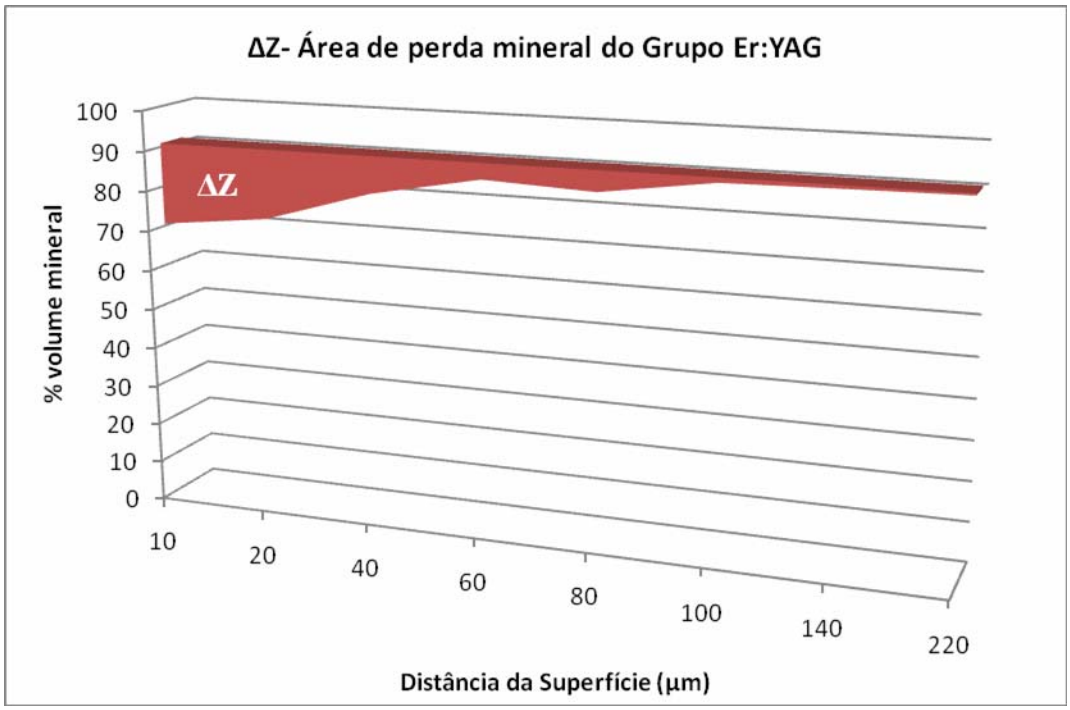


Figura 5.8 - Gráfico de ΔZ (diferença entre a projeção do esmalte hígido e a projeção da amostra do grupo de tratamento Érbio YAG)

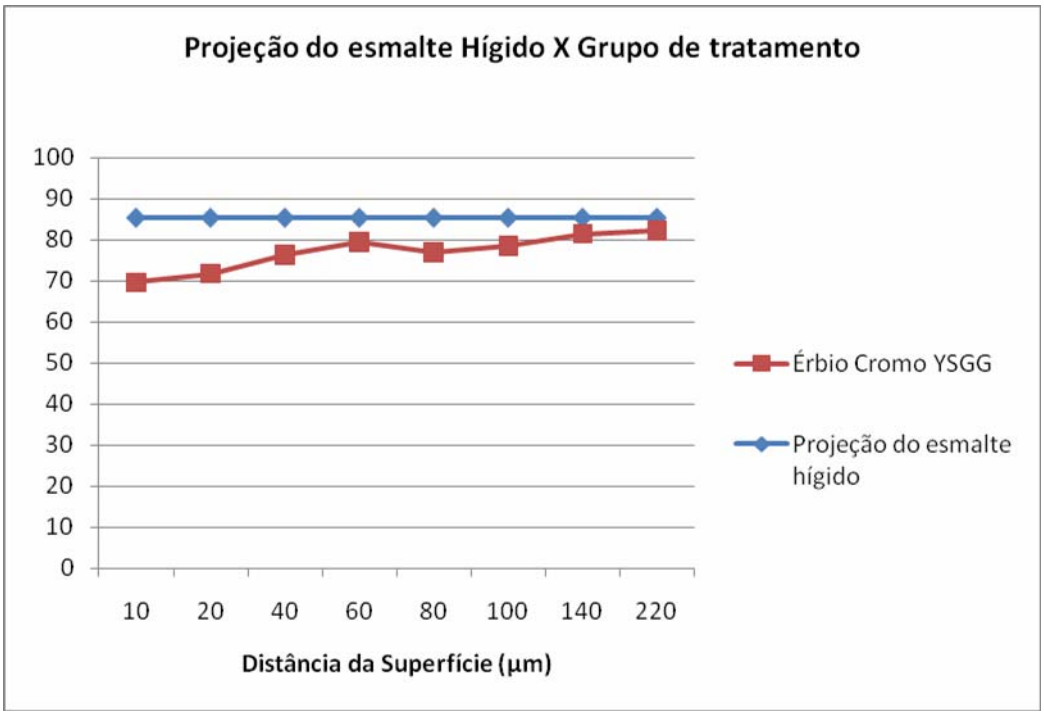


Figura 5.9 - Gráfico da projeção do esmalte hígido *versus* projeção da amostra do grupo de tratamento Érbio Cromo YSGG

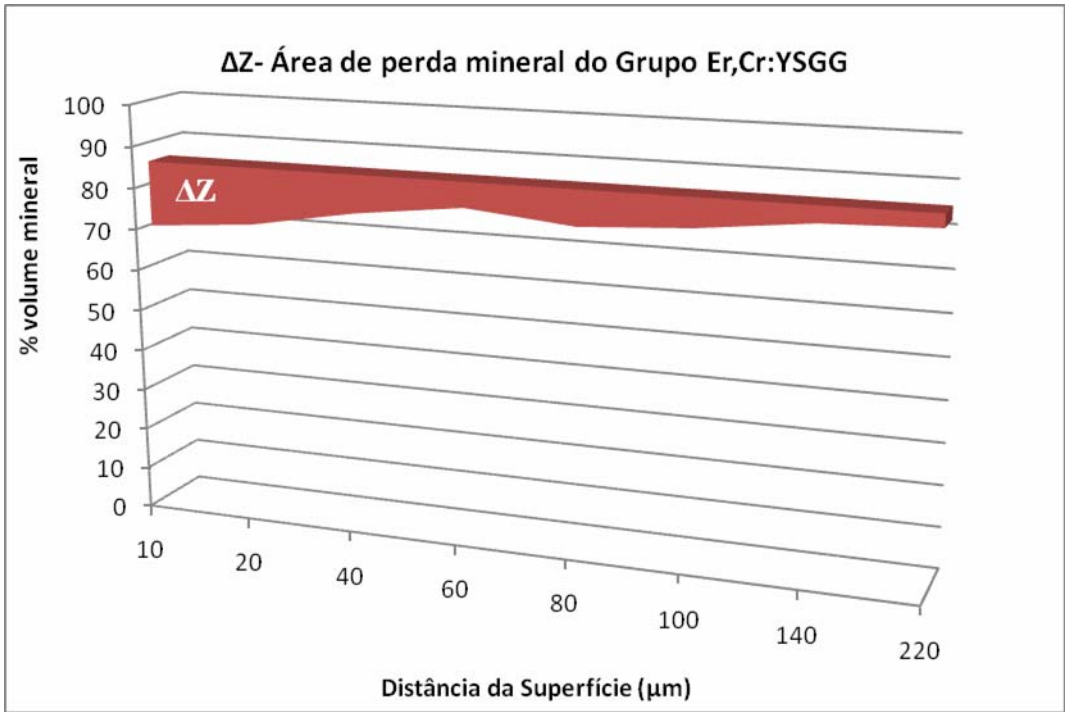


Figura 5.10 - Gráfico de ΔZ (diferença entre a projeção do esmalte hígido e a projeção da amostra do grupo de tratamento Érbio Cromo YSGG)

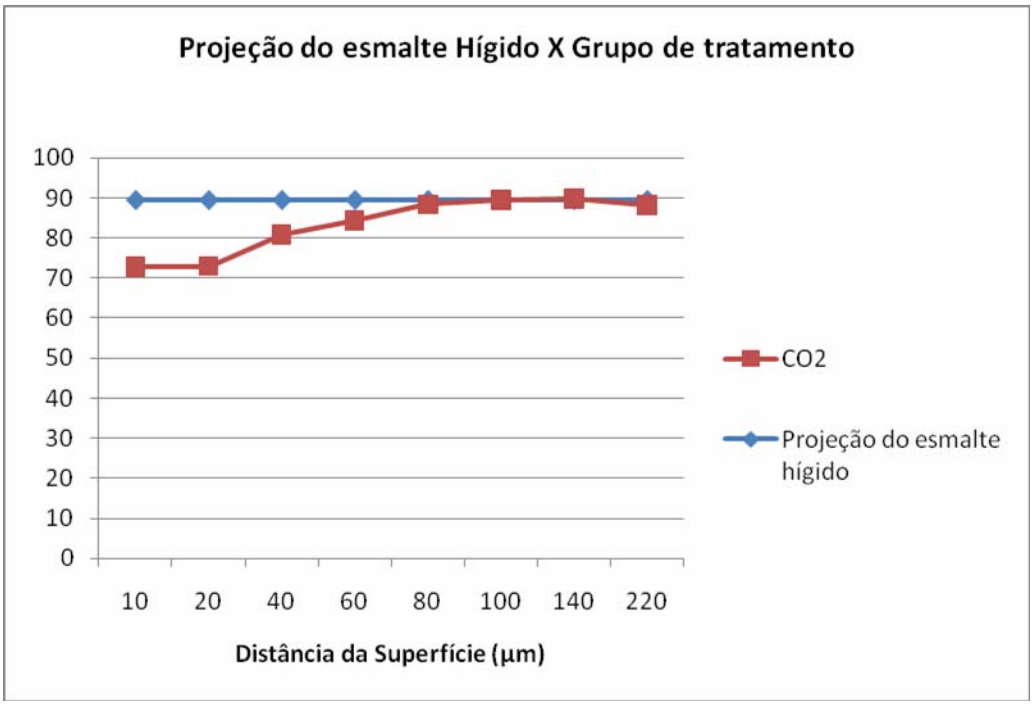


Figura 5.11 - Gráfico da projeção do esmalte hígido versus projeção da amostra do grupo de tratamento CO_2

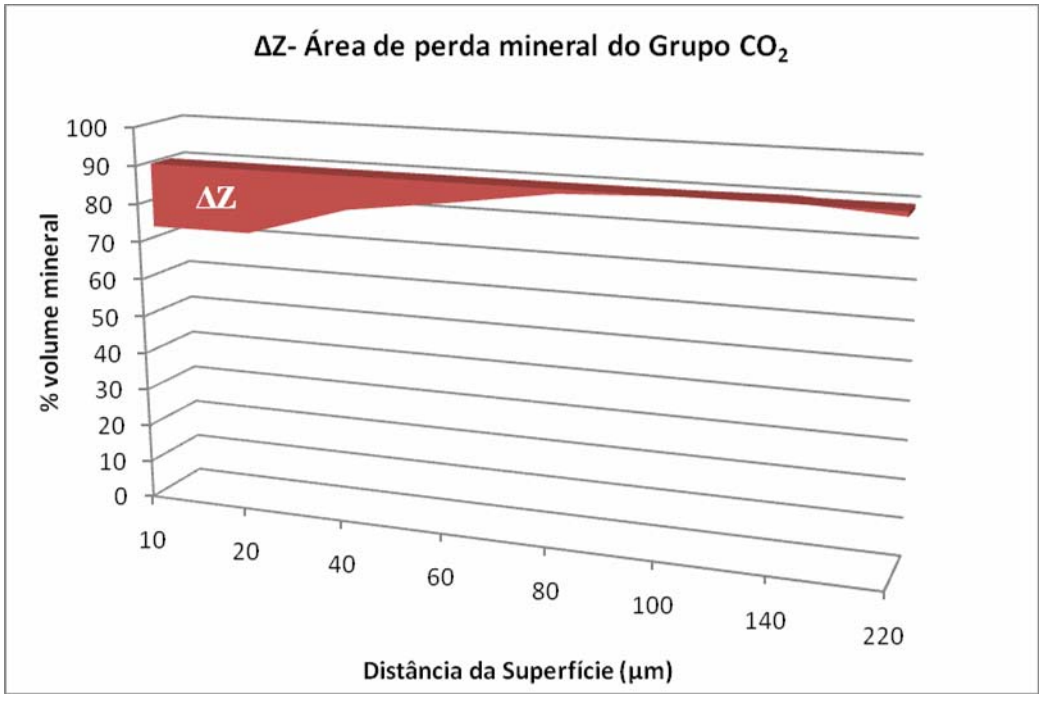


Figura 5.12 - Gráfico de ΔZ (diferença entre a projeção do esmalte hígido e a projeção da amostra do grupo de tratamento Érbio Cromo YSGG)

Em uma comparação entre os grupos: **Controle**, **Flúor**, **Nd:YAG**, **Er:YAG**, **Er,Cr:YSGG** e **CO_2,** a Análise de Variância (ANOVA) indicou que, de um modo geral, houve diferença estatística significativa entre os grupos (p=0,006) quanto a área de perda mineral (∆Z) (Tabela 5.1, Figura 5.13, Apêndice E1).

Tabela 5.1 - Resumo da área de perda mineral (∆Z) por grupo

Grupo	N	Média	d.p.
Flúor	10	476,2 a	234,3
CO_2	10	608,6 a	223,4
Er,Cr:YSGG	10	654 ab	415
Er:YAG	10	747 ab	361
Nd:YAG	10	814,7 ab	197,8
Controle	10	1077 b	491

Nota-se que a menor área de perda (∆Z) ocorreu no grupo **Flúor**, e a maior no grupo **Controle**.

Através do método das comparações múltiplas de Tukey, as diferenças significativas ocorreram somente entre os grupos **Controle** *versus* **Flúor**, e **Controle** *versus* **CO_2**. Os demais grupos não apresentaram diferenças significativas entre si.

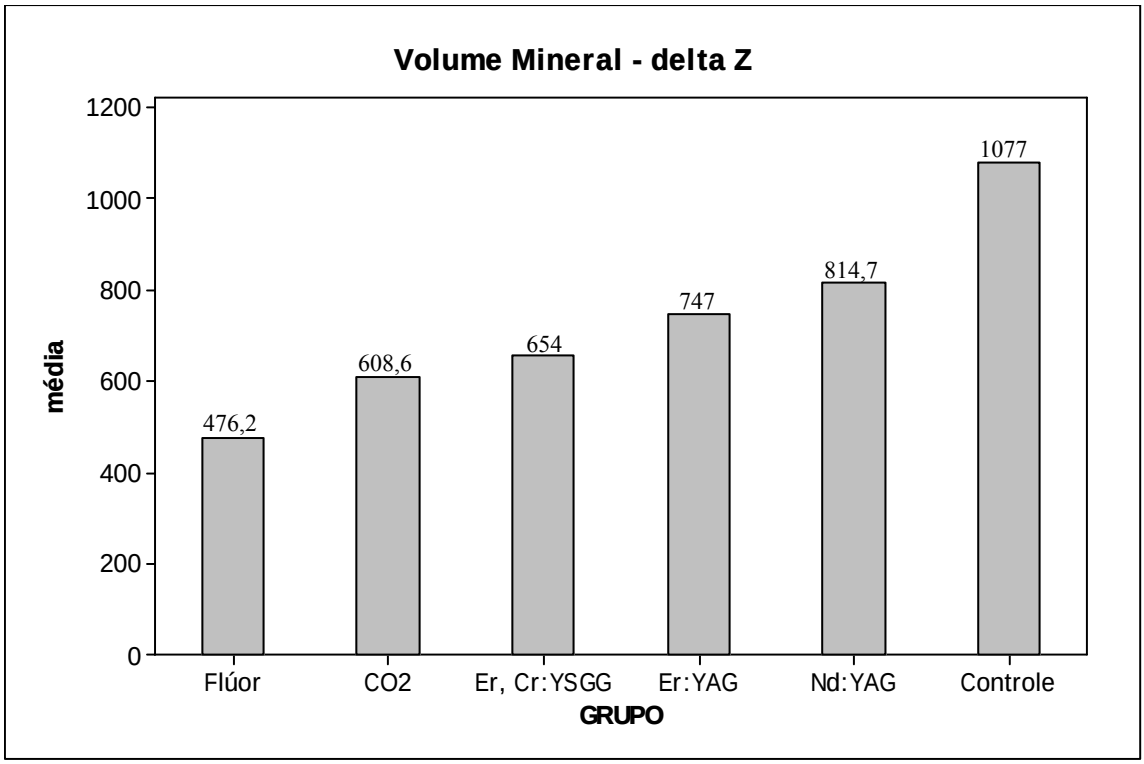


Figura 5.13 - Gráfico da Área de perda mineral - ΔZ

Já a porcentagem de inibição de cárie, foi calculada para os grupos experimentais (Tabela 5.2), utilizando-se a média ΔZ, por meio da fórmula:

$$\% \text{ de Inibição} = \frac{(\Delta Z \text{ Controle} - \Delta Z \text{ Tratamento}) \times 100}{\Delta Z \text{ Controle}}$$

Tabela 5.2 - Tabela demonstrativa da porcentagem da inibição de lesões de cárie por grupo com base nos dados obtidos de ΔZ

GRUPOS	% INIBIÇÃO DE CÁRIE
Controle	–
Flúor	**56**
Nd:YAG	**24**
Er:YAG	**31**
Er,Cr:YSGG	**39**
CO_2	**43**

De acordo com os resultados obtidos verificou-se que o grupo flúor apresentou os maiores valores de inibição de lesões de cárie (56%), seguido pelo grupo de tratamento CO_2 (43%), o grupo de tratamento a laser que alcançou os melhores resultados. Enquanto a menor porcentagem de inibição ficou por conta do grupo Nd:YAG com apenas 24%.

5.2 Rugosidade

Para o teste de rugosidade foram realizadas 5 mensurações por espécime, pelo sistema de varredura OCT, gerando cortes tomográficos (Figuras 5.14 e 5.15).

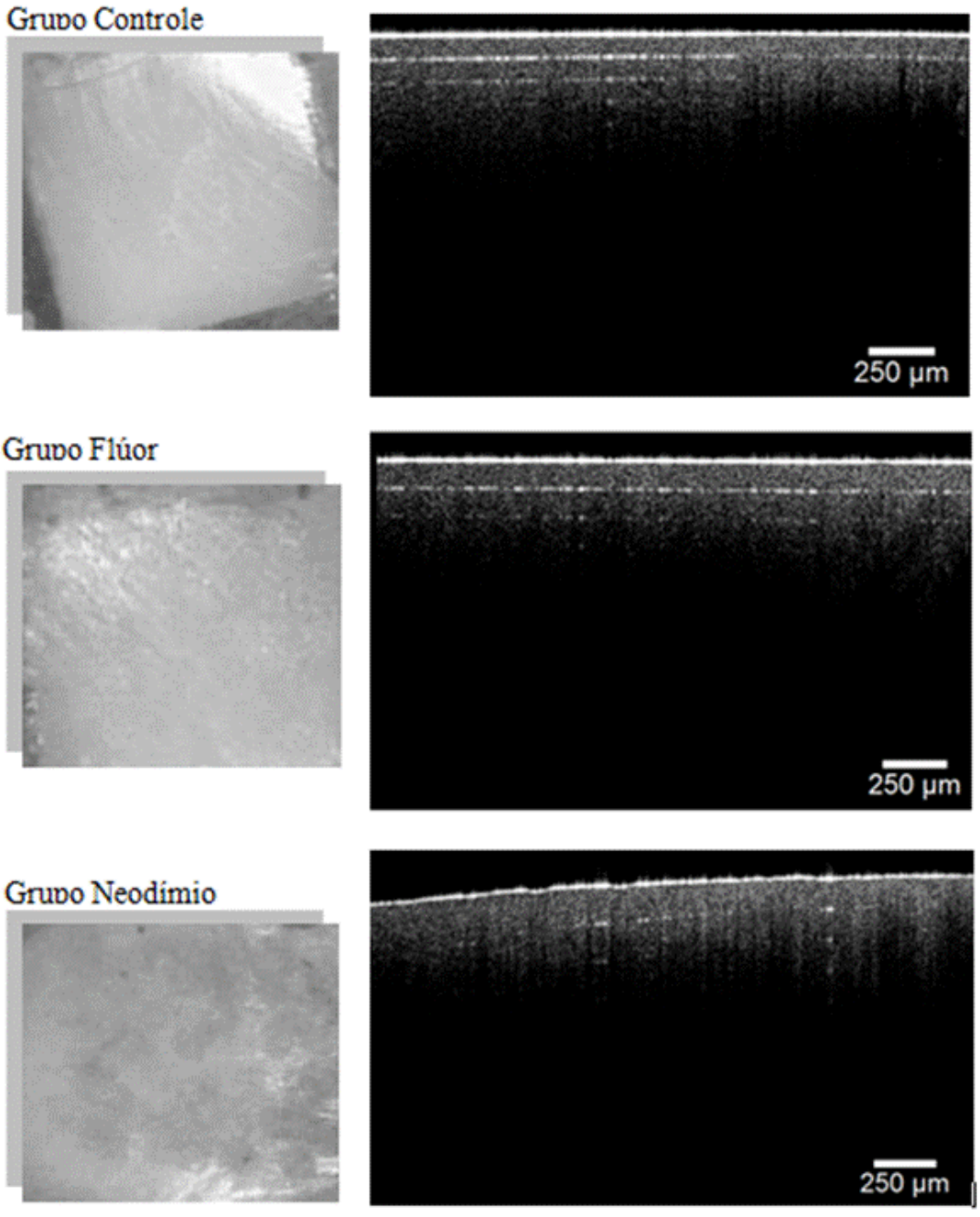


Figura 5.14 - Representação das Imagens obtidas pelo sistema OCT (controle, flúor, neodímio)

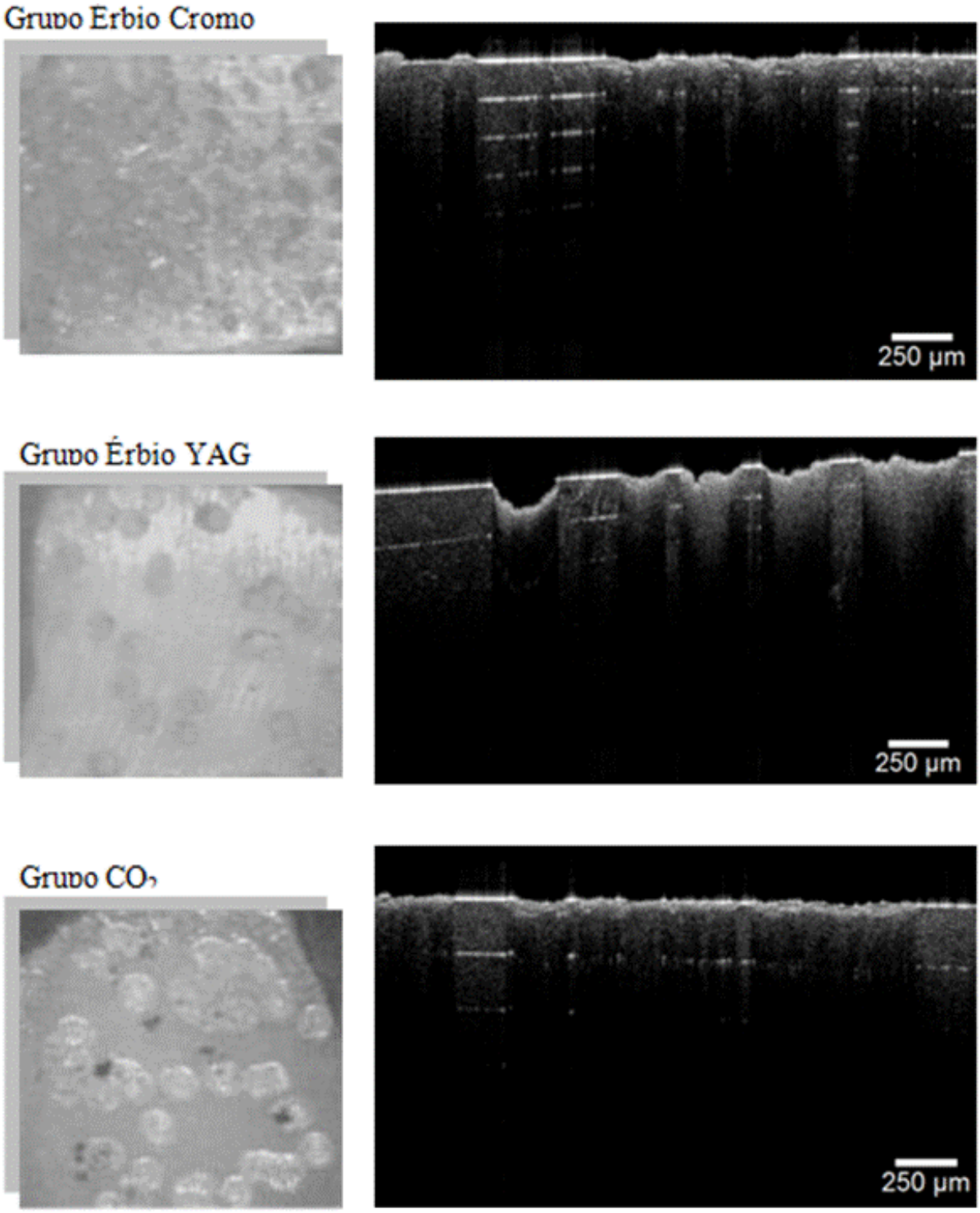


Figura 5.15 - Imagens de tomografia por coerência óptica (Érbio Cromo, Érbio YAG e CO_2)

As imagens de obtidas por OCT foram processadas por um software específico, gerando resultados de rugosidade média Ra e Rz, como exposto nas Tabelas 5.3 e 5.4. Os valores originais de rugosidade constam no Apêndice C.

Os dados de rugosidade média (Ra) não apresentavam distribuição normal e portanto, para efeito de análise, foram transformados em log na base 10. A Análise de Variância (ANOVA) indicou que, de um modo geral, houve diferença estatística significativa entre os grupos (p=0,003) quanto à rugosidade (Ra). Nota-se pela Tabela 5.3, Figura 5.16 e Apêndice E2, que a menor rugosidade ocorreu no grupo CO_2, e a maior no grupo Er:YAG.

Através do método das comparações múltiplas de Tukey, as diferenças significativas ocorreram somente entre os grupos CO_2 versus Er:YAG, controle versus Er:YAG e flúor versus Er:YAG. Os demais grupos não apresentaram diferenças significativas entre si.

Tabela 5.3 - Resumo da rugosidade Ra por grupo

Grupo	N	média	d.p.
CO_2	10	0,614 a	0,093
Controle	10	0,617 a	0,358
Flúor	10	0,649 a	0,408
Nd:YAG	10	0,886 ab	0,299
Er,Cr:YSGG	10	0,897 ab	0,289
Er:YAG	10	1,062 b	0,184

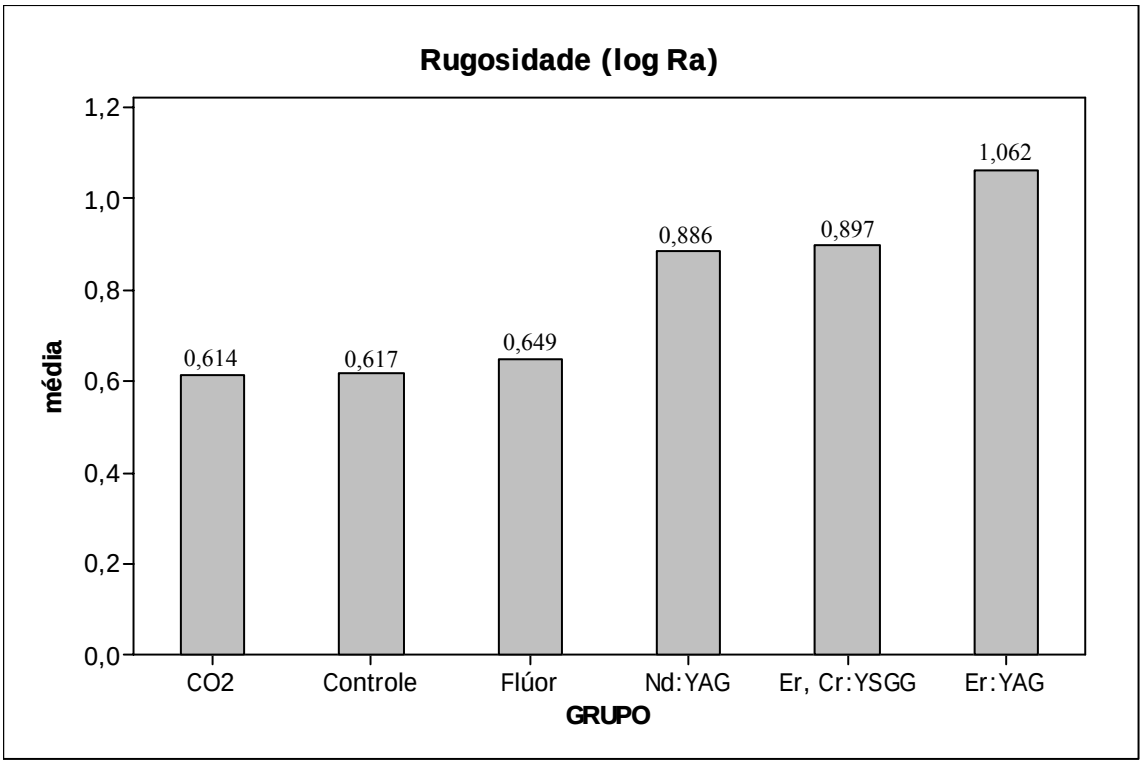


Figura 5.16 - Gráfico da Rugosidade média Ra

Os dados de rugosidade Rz, não apresentavam distribuição normal e portanto, para efeito de análise, foram transformados em log na base 10. A Análise de Variância (ANOVA) indicou que, de um modo geral, houve diferença estatística significativa entre os grupos ($p<0,001$) quanto à rugosidade (log Rz). Nota-se pela tabela 5.4, Figura 5.17 e Apêndice E3, que a menor rugosidade ocorreu no grupo controle, e a maior no grupo Er:YAG.

Através do método das comparações múltiplas de Tukey, as diferenças significativas ocorreram somente entre os grupos controle versus Er,Cr:YSGG, controle versus Er:YAG, flúor versus Er,Cr:YSGG, flúor versus Er:YAG, Nd:YAG versus Er,Cr:YSGG e Nd:YAG versus Er:YAG. Os demais grupos não apresentaram diferenças significativas entre si.

Tabela 5.4 - Resumo da rugosidade Rz por grupo

Grupo	N	Media	d.p.
Controle	10	1,064 a	0,270
Flúor	10	1,093 a	0,253
Nd:YAG	10	1,195 a	0,224
CO_2	10	1,224 ab	0,093
Er,Cr:YSGG	10	1,397 b	0,189
Er:YAG	10	1,473 b	0,120

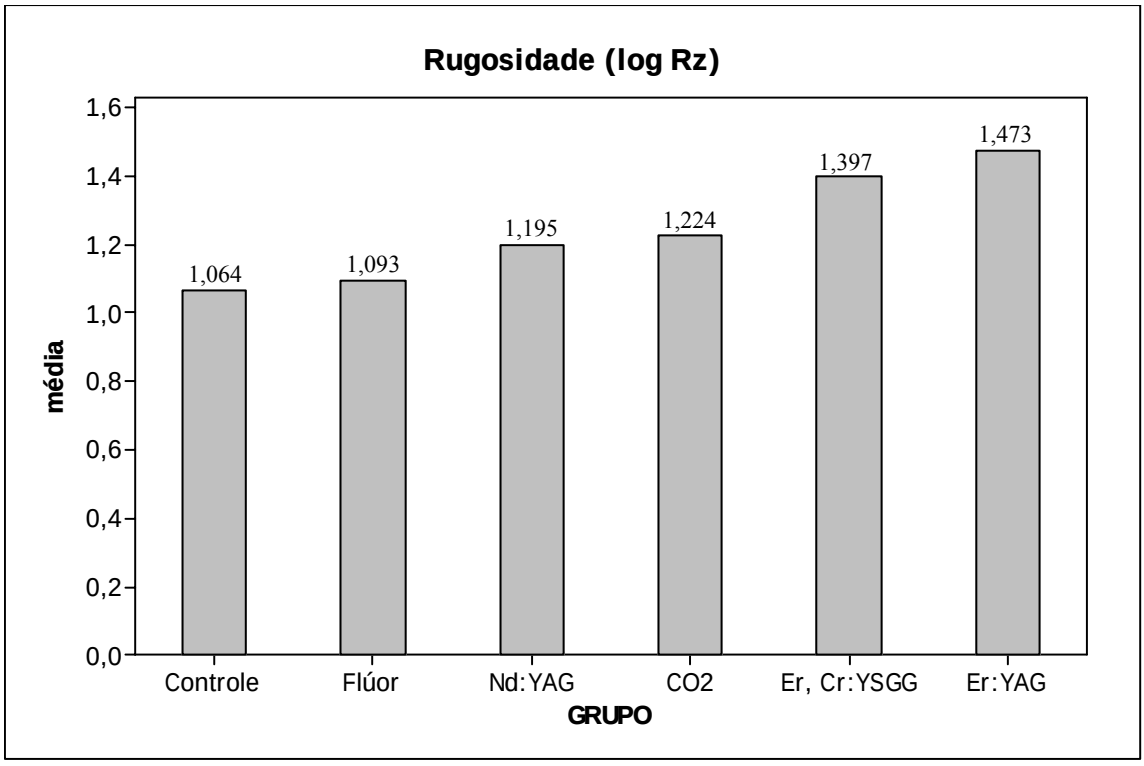


Figura 5.17 - Gráfico de Rugosidade média Rz

5.3 Aderência bacteriana

Após a obtenção dos valores de absorbância do cristal violeta, foi aplicada aos valores obtidos a fórmula de taxa de formação de biofilme para cada um dos espécimes. A fórmula da taxa de formação de biofilme considerado foi:

$$\frac{\text{Absorbância do cristal violeta}}{\text{Taxa de crescimento planctônico}}$$

A taxa de crescimento planctônico no referido estudo foi de 0,550. Os resultados exibidos na Tabela 5.5 e Apêndice D expressam os valores finais da taxa de formação de biofilme.

Em uma comparação entre os grupos: **Controle**, **Flúor**, **Nd:YAG**, **Er:YAG**, **Er,Cr:YSGG** e **CO_2**, o modelo de Análise de Variância (ANOVA) mostrou que, de um modo geral, houve diferença estatística significativa entre os grupos (p=0,003) quanto a taxa de formação de biofilme.

Tabela 5.5 - Resumo da taxa de formação do biofilme por grupo

Grupo	N	Média	d.p.
Flúor	10	0,844 a	0,374
Nd:YAG	10	1,549 ab	0,841
Er,Cr:YSGG	10	1,788 ab	0,843
CO_2	10	1,864 ab	1,128
Controle	10	2,302 b	0,778
Er:YAG	10	2,408 b	1,139

Nota-se que a menor taxa de formação de biofilme ocorreu no grupo **Flúor**, e a maior taxa no grupo **Er:YAG** (Figura 5.18, Apêndice E4). Através do método das comparações múltiplas de Tukey, as diferenças significativas ocorreram somente entre os grupos **Flúor** *versus* **Controle**, e do **Flúor** *versus* **Er:YAG**. Os demais grupos não apresentaram diferenças significativas entre si.

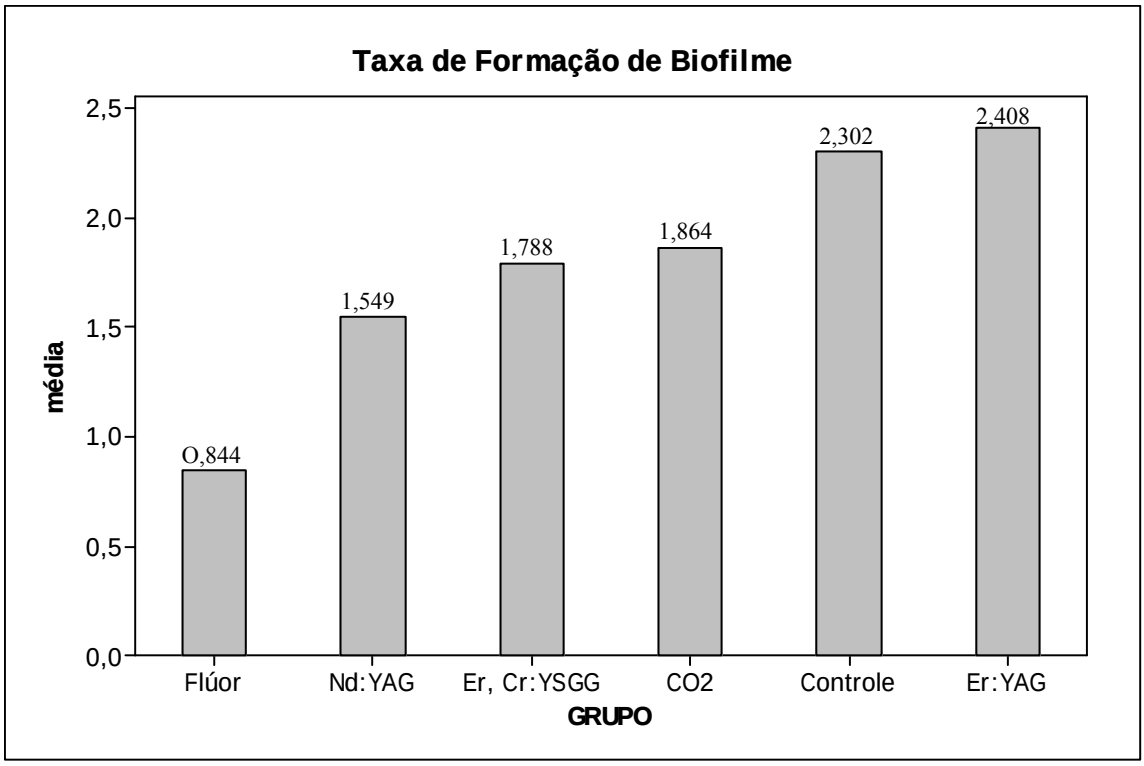


Figura 5.18 - Gráfico da taxa de formação de biofilme

5.4 Correlação entre Taxa de Formação de Biofilme e Rugosidade

Tendo em vista que os dados de rugosidade (Ra e Rz) não seguiam uma distribuição normal, estes foram transformados em log na base 10.

O índice de correlação entre a taxa de formação do biofilme e a rugosidade foi de r=0,057 (p=0,666) para os dados de log Ra, e de r=0,114 (p=0,386) para os dados de log Rz. Ou seja, não se pode afirmar que exista uma relação linear (positiva ou negativa) entre a taxa de formação de biofilme e rugosidade, considerando toda a amostra de 60 corpos de prova.

Observando a mesma correlação, para cada grupo separadamente, verifica-se que apenas no grupo Er,Cr:YSGG, houve correlação negativa significativa entre a taxa de formação do biofilme e a rugosidade (log Rz), sendo r=-0,642 (p=0,045), indicando que, quando maior a taxa do biofilme, menor a rugosidade (log Rz). Vale observar que, nesse mesmo grupo, a correlação com rugosidade (log Ra) foi de r=-0,550 (p=0,100), não significativa, mas bem mais próximo da significância estatística do que nos demais casos.

A tabela 5.6 mostra todas as correlações obtidas (calculadas pelo método de Pearson), juntamente com a significância estatística. Gráficos de dispersão encontram-se no Apêndice F.

Tabela 5.6 - Correlação entre taxa de formação de biofilme e rugosidade

	Taxa de formação de biofilme versus rugosidade (log Ra)	Taxa de formação de biofilme versus rugosidade (log Rz)
Todos os grupos (N=60)	r = 0,057	r = 0,114
	(p=0,666)	(p=0,386)
Controle (N=10)	r = 0,215	r = 0,366
	(p=0,551)	(p=0,299)
Flúor (N=10)	r = -0,057	r = -0,346
	(p=0,876)	(p=0,327)
Nd:YAG (N=10)	r = -0,078	r = -0,111
	(p=0,831)	(p=0,760)
Er:YAG (N=10)	r = 0,111	r = 0,279
	(p=0,761)	(p=0,435)
Er,Cr:YSGG (N=10)	**r = -0,550**	**r = -0,642**
	(p=0,100)	**(p=0,045)**
CO_2 (N=10)	r = 0,029	r = -0,009
	(p=0,937)	(p=0,981)

6 DISCUSSÃO

O objetivo deste estudo *in vitro* foi avaliar a aderência bacteriana ao substrato irradiado com lasers de alta potência com parâmetros de prevenção de cárie. Uma das questões iniciais e principais em relação a estudos que apresentam esse propósito consiste na questão de avaliar os parâmetros de irradiação em superfícies polidas ou não polidas. Com relação a esta questão, a literatura comprova que os efeitos nas superfícies de esmalte não polidas são similares aqueles observados nas superfícies polidas (MCCORMACK et al., 1995). No entanto, com relação à irradiação com lasers, em uma análise mais detalhada, pode-se observar que a temperatura alcançada por ambas as superfícies é diferente, uma vez que a rugosidade e a curvatura natural do dente reduzem a absorção da densidade de energia pelo aumento superficial da área a ser irradiada. Considerando ainda que esta é a realidade encontrada clinicamente, o uso de superfícies não polidas deve ser priorizado.

No trabalho realizado, para todos os grupos testados, foram atingidos percentuais de redução de cárie em conformidade com os resultados obtidos na literatura (APEL et al., 2002; DE FREITAS et al., 2008; FRIED et al., 1996; HSU et al., 2001; LIU; LIU; STEPHEN, 2006). Dentro da metodologia utilizada, o flúor, tratamento convencional, continua a sendo o mais efetivo dentre os analisados, sendo o grupo que mais se destacou neste quesito, com uma redução no percentual de redução de cárie de 56%, mais uma vez demonstrando sua eficácia, como comprovado pela literatura (FEATHERSTONE, 2000b; LARSEN; BRUN, 1995; PEREIRA;

INOKOSHI; TAGAMI, 1998; ROLLA, 1988), promovendo o aumento da resistência do substrato ao desafio ácido, sem promover efeitos deletérios na superfície.

O grupo flúor e CO_2 mostraram-se diferentes do controle negativo, resultado que corrobora com a literatura (ESTEVES-OLIVEIRA et al., 2009; FEATHERSTONE, 2000b; HSU et al., 2000; KANTOROWITZ; FEATHERSTONE; FRIED, 1998; LARSEN; BRUN, 1995; ROLLA, 1988; STERN; SOGNNAES, 1972). O laser de CO_2 aparece como o laser mais promissor para prevenção(ZUERLEIN; FRIED; FEATHERSTONE, 1999); este grupo, dentro da avaliação do presente estudo foi o segundo melhor tratamento de superfície, apresentando uma redução na porcentagem de formação de lesões de cárie de 43%, seguindo a tendência de trabalhos mais recentes que têm mostrado sua efetividade, sem causar danos à superfície irradiada e atingindo valores de prevenção até 81%, suplantando a efetividade do flúor (FFA) (ESTEVES-OLIVEIRA et al., 2009). Já os lasers de Er:YAG e Nd:YAG não diferiram entre si.

Os resultados obtidos por Delbem et al.(2003) corroboram com os resultados obtidos neste estudo. Os autores demonstraram que em relação à microdureza transversal, não houve diferença estatística entre os grupos Er:YAG e Flúor; o laser de Er:YAG apresentou uma ação anti-cariogênica superficial, mas não em profundidade.

Na tentativa de explicar a fragilidade do processo envolvendo a irradiação do esmalte com laser de Er:YAG, um estudo realizado por Apel et al. (2005) fez considerações importantes a respeito deste tratamento de superfície. Nota-se que a irradiação mesmo com parâmetros sub-ablativos produz trincas, rachaduras na superfície de esmalte. Estas podem agir como pontos de fragilidade, pontos iniciais de ação do desafio ácido, favorecendo a desmineralização em profundidade. Estas alterações têm o potencial de reduzir ou eliminar os efeitos positivos obtidos pela

irradiação com o laser, demonstrando claramente uma fragilidade apresentada por este tipo de tratamento. Baseado neste fato a utilização do laser de Er:YAG, em parâmetros sub-ablativos, para prevenção de lesões de cárie ainda não se mostra favorável, de acordo com as condições alcançadas neste estudo.

No mesmo estudo de Apel et al.(2005) a superfície irregular obtida após irradiação com o laser de Er:YAG, foi atribuída à desidratação ocorrida do esmalte. Esta poderia ser explicada através de duas teorias, uma seria que a desidratação e perda de carbonato leva a uma contração no eixo-α do cristal de apatita, resultando em redução de volume (OHO; MORIOKA, 1990); outra teoria explica que a água presente na estrutura do esmalte passa por um processo de expansão como resultado do aquecimento, causando um colapso da estrutura de esmalte levando à ablação. Ambas as teorias são embasadas no fato de que as trincas seguem um padrão peculiar, estas acompanham a linha de fragilidade das estruturas- neste caso, a junção entre os prismas, sendo notável a desmineralização ao redor destas trincas. E mais uma vez, os autores descartam a possibilidade das fissuras serem causadas por estresse térmico, visto que estas deveriam reproduzir a forma de um pulso laser individualizado, o que não pode ser observado em nenhuma fotografia obtida no estudo, analisado por microscopia confocal a laser.

O tratamento com o laser de Er,Cr:YSGG reduziu em 39% o potencial de desmineralização do esmalte dental. Estudos com este laser têm demonstrado que a densidade de energia necessária para se alcançar um potencial ácido-resistente no esmalte seja aproximadamente 8-13 J/cm^2 (APEL et al., 2004; FRIED et al., 1996). Freitas et al.(2008) trabalhando com fluências de 2,54 a 8,52 J/cm^2, demonstraram a efetividade e segurança na utilização destes comprimentos de onda na prevenção de cárie, visto que a variação de temperatura pulpar não

excedeu 0,1ºC, valor este, dentro da margem de segurança até 5,5 ºC. Seguindo a mesma preocupação com a saúde pulpar, e visando transpor futuramente os benefícios obtidos *in vitro* para trabalhos *in situ* e *in vivo*, no presente estudo foi adotado o mesmo protocolo do estudo acima mencionado, tendo sido utilizada a fluência de 8,5J/cm^2.

O laser de Nd:YAG durante o presente estudo, apresentou redução na formação de lesões de cárie de 24%. Este laser é reconhecido por sua capacidade de causar o "melting" da superfície, ou seja, causar a fusão e ressolidificação da mesma. Levando-se em consideração que para a ocorrência de fusão e ressolidificação do substrato uma temperatura acima de 1100ºC é necessária (FOWLER; KURODA, 1986; MORIOKA; TAGOMORI; NARA, 1988), pode-se dizer que esta superfície alterada morfologicamente apresenta um maior número de componentes ácido-solúveis, como TCP α e ß, do que o esmalte sem tratamento, fato corroborado por Fowler e Kuroda (1986). Estes autores demonstraram que à medida que o feixe laser é absorvido pelo substrato, os efeitos promovidos nas camadas sub-superficiais é diferenciado do efeito promovido na superfície irradiada, isto devido à queda de temperatura através da estrutura de esmalte-dentina. De tal forma que a sub-superfície irradiada pode apresentar menos compostos solúveis do que a superfície, e em decorrência deste fato, apresenta um potencial ácido-resistente maior durante um desafio ácido, como, por exemplo, uma ciclagem de pH.

Este fato observado por Fowler, pode justificar o que ocorreu com o grupo Nd:YAG no presente estudo. Os valores de perda mineral, bem como a observação dos gráficos de projeção do esmalte hígido versus projeção da amostra do grupo de tratamento (Figura 5.2), e o gráfico de ΔZ (Figura 5.3) demonstram que a

desmineralização deste grupo é basicamente superficial, esta possui grandes proporções até 20µm de profundidade, e redução considerável a partir deste ponto, demonstrando uma capacidade de efeito preventivo em profundidade deste laser, mas não de forma eficiente em superfície.

Sabe-se que o desenvolvimento das lesões de cárie tem relação não só com a solubilidade mineral, mas também com a difusão de íons através dos espaços inter-prismáticos (FEATHERSTONE, 2000b). Acredita-se que esta difusão possa ser reduzida ou bloqueada pela matriz orgânica que preenche os espaços entre os prismas de esmalte (MORIOKA; TAGOMORI; OHO, 1991; TAGOMORI; MORIOKA, 1989; YING; CHUAH; HSU, 2004).

Em dentes permanentes humanos, a espessura aproximada da camada da matriz orgânica é de 30-35Å, e a área da interface orgânica - inorgânica aproximadamente 1800-2000cm^2/mm^3 (HSU et al., 2000). Os autores sugerem que um aumento de temperatura entre 300-400ºC promoveria uma distensão da matriz orgânica e até mesmo uma decomposição parcial desta, que seria capaz de bloquear espaços inter e intra-prismáticos, conseqüentemente comprometendo a difusão iônica pelo esmalte, o que resultaria no retardamento da desmineralização. No entanto, um aquecimento da superfície acima de 400ºC (FOWLER; KURODA, 1986; HOLCOMB; YOUNG, 1980), como o que ocorre no caso do substrato irradiado com laser de Nd:YAG, acarretaria na decomposição protéica da matriz orgânica e o efeito benéfico produzido por esta não seria alcançado, justificando a utilização de lasers e parâmetros que trabalhem abaixo desta temperatura crítica. Uma porcentagem de inibição da desmineralização do substrato dental entre 25-57% alcançada por esta teoria justificaria sua utilização (HSU et al., 2000).

Levando este fato em consideração, chega-se a outra conclusão a respeito da fragilidade do substrato irradiado pelo laser de Nd:YAG; esta também pode ser atribuída à interação do laser com compostos orgânicos. Considerando-se que a temperatura necessária para indução da decomposição protéica é de aproximadamente 350-400ºC (FOWLER; KURODA, 1986), e que a temperatura necessária para promover fusão e ressolidificação do esmalte é superior a 1100ºC, pode-se concluir que quando ocorre a alteração morfológica desejada, as proteínas do substrato já foram decompostas. Este fato leva à conclusão de que a superfície de esmalte tratada pelo laser de Nd:YAG pode ser mais susceptível à desmineralização. No entanto, a superfície fundida e posteriormente ressolidificada também apresenta aumento dos cristais de hidroxiapatita, fato que reduz os espaços interprismáticos e conseqüentemente, a difusão de ácidos durante o desafio ácido.

De modo que o fato ainda a ser analisado é se o crescimento dos cristais de hidroxiapatita, redução de carbonato, fusão e recristalização do substrato compensam a fragilidade da superfície mais susceptível devido à maior quantidade de compostos ácido-solúveis, e também mais sensível devido à decomposição protéica.

Com relação ao teste de rugosidade, a observação dos resultados obtidos nos permitiu notar que, de modo geral, os lasers alteraram a rugosidade do esmalte, fato que a literatura já havia reportado, a exemplo de Nelson, Jongebloed e Featherstone (1986) que em estudo testando diversos comprimentos de onda do laser de CO_2 (9,32, 9,57, 10,27 e 10,59 μm), observou aumento da rugosidade do esmalte irradiado variando com o comprimento de onda utilizado, sendo maior com densidade de energia mais alta (50 mJ/cm^2). Estes resultados corroboram com os

obtidos no presente estudo, no qual a irradiação com o laser de CO_2 mostrou rugosidade média Ra baixa, no entanto se aproximou aos resultados dos lasers de Érbio quando o fator analisado foi a rugosidade média Rz. Esta última análise de rugosidade, leva em conta os maiores valores de picos/vales contidos na amostra. Tal alteração superficial pode ser justificada pelo comprimento de onda utilizado aliado a densidade de energia (16 J/cm^2) e intensidade de pulso utilizados (largura de pulso de 0,05 s), conforme descrito pela literatura para prevenção de lesões de carie com esse comprimento de onda (KLEIN et al., 2005).

Observou-se que o laser de Er:YAG provocou alterações na rugosidade média (Ra) do substrato ligeiramente maiores do que as promovidas pelo laser de Er,Cr:YSGG. Isto se deve ao fato do maior potencial de ablação deste laser, por não possuir uma grande afinidade com a hidroxiapatita. A grande afinidade deste laser é com o radical hidroxila livre, e não aquele presente na estrutura da hidroxipatita, como é o caso do laser de Er,Cr:YSGG (FEATHERSTONE; FRIED, 2001; FRIED et al., 1996; HADLEY et al., 2000).

Além da afinidade ou não pela hidroxiapatita, podemos citar a diferença no modo de irradiação destes dois lasers, sendo o laser de Er:YAG utilizado com sistema de refrigeração ar/água (5 mL/min), enquanto o laser de Er,Cr:YSGG foi utilizado com sistema de refrigeração jato de ar 20%. Meister et al. (2006) demonstraram que somente em dentina, e com a irradiação com o laser de Er:YAG, é que o conteúdo de água do tecido influencia significativamente na ablação tecidual. Em esmalte, a quantidade de água do tecido não influencia na ablação, mas sim a quantidade de água fornecida pelo sistema laser durante a irradiação. No presente estudo, durante a irradiação com o laser de Er:YAG, foi dispensado no tecido 0,08 mL/s, numa irradiação com duração de 20 segundos totalizando 1,66

mL, o que pode ser considerado um volume baixo de água, mas suficiente para a refrigeração do conjunto no momento da irradiação. Mesmo sendo um volume baixo de água, esta água presente sobre o tecido no momento da irradiação pode ser o fator que justificaria os valores de rugosidade alcançados por este grupo, pois em maior ou menor grau, algum nível de ablação ocorreu no substrato irradiado.

Com relação aos grupos controle positivo (FFA) e controle negativo (sem tratamento de superfície) foi observada semelhança no tocante à rugosidade de ambos os grupos. Apesar de o flúor (FFA) possuir um componente ácido, este não foi capaz de promover alterações consideráveis na superfície do substrato.

Ainda relativo à rugosidade, o sistema OCT foi utilizado neste trabalho, para produzir imagens tomográficas da microestrutura dental *in vitro*, medindo a rugosidade superficial em modo não contato, não invasivo (preservando a amostra)(FREITAS et al., 2006; FREITAS, 2007). Este fato é muito importante, principalmente durante a mensuração da superfície de espécimes delicados como alguns tipos de cerâmica, produtos têxteis, papéis ou tecidos biológicos, nestes casos poderiam existir erros nos parâmetros de rugosidade, causados pela deformação do espécime devido ao contato físico da ponta ativa de rugosímetros tradicionais. Tais equipamentos poderiam também causar danos à superfície avaliada (AMARAL et al., 2009). Contrária a esta realidade, a técnica OCT prova-se um poderoso método diagnóstico e de aferição, tornando-se uma excelente alternativa aos métodos tradicionais, tornando possível a obtenção de resultados fidedignos (mantendo a mesma proporção que os dados obtidos por mensurações convencionais) e possibilitando além da aferição dos dados, a visualização da medição realizada através da observação da profundidade das irregularidades e sua distribuição pela superfície do substrato.

Através das medições realizadas pelo sistema OCT obtivemos parâmetros de Ra e Rz, e optamos pela utilização e análise de ambos os resultados, isto se deve ao fato de que o valor de Ra em um comprimento amostral indica a média da rugosidade, por isso se um pico ou vale atípico aparecem na superfície, o valor da média não sofrerá grande alteração, ocultando ou diluindo os defeitos. Já o parâmetro Rz informa a distribuição média da superfície vertical, este é de fácil obtenção em equipamentos que fornecem gráficos e neste caso, riscos isolados são considerados. Fato importante quando levamos em conta a análise de substrato irradiado por laser, no qual a existência de pontos isolados de maior rugosidade (pontos de ablação) tem uma chance considerável de ocorrer. No entanto, o parâmetro Rz quando utilizado isoladamente não possibilita nenhuma informação sobre a forma do perfil e distância das ranhuras, justificando a utilização de ambos os parâmetros.

O presente estudo teve como objetivo principal avaliar a aderência bacteriana nos estágios iniciais da formação do biofilme, quando a rugosidade do esmalte desempenha um papel crítico (QUIRYNEN; BOLLEN, 1995), consistindo na atração inicial das células à superfície e então das bactérias entre si. Após avaliação dos resultados, foi constatado que o laser de Er:YAG e o grupo controle negativo obtiveram os maiores valores de aderência bacteriana entre os grupos testados, enquanto o menor valor registrado foi o do grupo controle positivo (FFA).

A literatura reporta o fato dos lasers de Er:YAG (APEL et al., 2005) e CO_2 (KANTOROWITZ; FEATHERSTONE; FRIED, 1998) produzirem trincas, rachaduras na superfície de esmalte, mesmo utilizando parâmetros sub-ablativos. Estas trincas agiriam como pontos de fragilidade não só referente ao desafio ácido (fator secundário), favorecendo a desmineralização em profundidade, como também no

caso da adesão bacteriana (fator primário), estas seriam focos de adesão, fatores favoráveis ao início da colonização. Este fato poderia explicar os valores de taxa de biofilme alcançadas por estes dois grupos, mais notavelmente o grupo Er:YAG, que, atrelado a este fato, apresentou uma das maiores taxas de rugosidade superficial, com a existência de pontos de ablação pela superfície irradiada.

O flúor foi o tratamento de superfície a apresentar a menor taxa de formação de biofilme. Este é reconhecido por sua ação anti-enzimática, sendo capaz de afetar os vários processos envolvidos na formação de biofilme, incluindo a produção de polímeros de glucano, glicólise, colonização inicial, e a atividade de enzimas associadas com a membrana citoplasmática (DANESHMEHR et al., 2008). Este fato acrescido ao fato de não alterar morfologicamente a superfície, explicaria o fato de o flúor ter sido o tratamento mais efetivo do ponto de vista da prevenção de cárie, e ainda propiciar uma das superfícies com os menores valores de Ra e a menor aderência bacteriana dentre todos os grupos de tratamento testados.

Já o grupo de amostras irradiadas com o laser de Nd:YAG apresentou valores intermediários de taxa de formação de biofilme. Este laser tem a capacidade de fundir e ressolidificar a estrutura de esmalte, tornando-a vitrificada. Acredita-se que esta nova configuração superficial seja a causa da reduzida adesão bacteriana encontrada neste grupo, tornando o substrato irradiado um ambiente desfavorável à adesão, fato que pode ser causado devido a fusão e recristalização do substrato modificarem a morfologia do esmalte reduzindo sua permeabilidade (KORYTNICKI et al., 2006; MORIOKA; TAGOMORI; NARA, 1988; TAGOMORI; MORIOKA, 1989) e possivelmente, por conseqüência, reduzindo sua energia livre de superfície e a afinidade de microorganismos à esta superfície. Outro fator que pode ser levado

em conta em relação ao laser de Nd:YAG, é o fato de não ter afinidade com a hidroxiapatita do substrato, o resultado é que esta não absorve o comprimento de onda de 1.064μm, de modo que este laser possui uma capacidade menor de causar alterações morfológicas e influir na rugosidade substrato, quando comparado aos demais lasers testados que possuem afinidade pela hidroxiapatita.

Taylor et al.(1998) demonstraram que uma superfície rugosa possui uma maior área de superfície e as depressões nestas faces promovem sítios favoráveis à colonização; entretanto, o aumento demasiado na rugosidade pode desfavorecer a aderência bacteriana. Neste mesmo estudo, o autor relatou que um pequeno aumento na rugosidade de superfície promovido com lixas de carbono de granulação 1200# tem um aumento significativo na aderência bacteriana, enquanto uma rugosidade mais espessa produzida pelas granulações 400# e 120# não tiveram efeito significativo quando comparados à superfície lisa. Boyd et al.(2002) demonstraram que um aumento na rugosidade de superfície de um aço inoxidável de 0,04 (superfície polida) para 0,30 (superfície abrasionada), promoveu um aumento na aderência bacteriana maior do que o obtido quando a rugosidade foi aumentada de 0,04 (superfície polida) para 0,96 (superfície não polida). Os autores demonstraram que mais células permanecem em uma superfície modificada, abrasionada e rugosa, do que em uma superfície não polida e/ou polida. Levando à indicação de inexistência da dependência linear da aderência bacteriana com o aumento rugosidade de superfície.

Outro fator que deve ser levado em consideração para o correto entendimento do processo de aderência bacteriana a determinado substrato, é o fato de que as bactérias e o biofilme bacteriano normalmente se aderem às irregularidades que se conformam com o seu tamanho, porque isto maximiza a área

de superfície bacteriana (KATSIKOGIANNI; MISSIRLIS, 2004). Sulcos e fissuras que estão em consonância com as dimensões bacterianas aumentam a área de contato aprimorando o potencial de união; enquanto sulcos e fissuras de dimensões muito maiores se aproximam ao potencial de união de superfícies lisas. Já sulcos e fissuras com dimensões muito reduzidas tornam a adesão mais dificultada, reduzindo a área de contato bacteriana e, por conseqüência, seu potencial de união (EDWARDS; RUTENBERG, 2001).

Os resultados obtidos do teste de correlação entre a taxa de formação de biofilme e rugosidade do substrato dental não revelam relação linear entre o aumento da rugosidade superficial e o aumento da aderência bacteriana.

Apesar de termos observado entre os resultados alcançados que, numericamente, o grupo de maior rugosidade superficial coincidiu com o grupo de maior aderência bacteriana, em contrapartida, presenciamos também o fato da ausência de tratamento de superfície (grupo controle negativo) com baixos valores de rugosidade média (Ra e Rz), associada ao segundo maior valor de aderência bacteriana. Ou seja, mesmo não sendo a superfície mais rugosa encontrada durante o estudo, foi a segunda mais favorável à aderência bacteriana.

Este fato presenciado no estudo demonstra que a superfície hígida de esmalte é um substrato favorável a adesão bacteriana. A literatura demonstra que superfícies mais lisas acumulam menos biofilme na fase inicial, no entanto, com o passar do tempo, toda superfície acumula biofilme, portanto apenas a lisura superficial não pode ser considerada isoladamente como o fator preponderante na formação do biofilme (ANDRADE JR. et al., 2006). Isto demonstra que mais fatores além da rugosidade do substrato, têm um peso importante, e talvez até maior nesta questão, a exemplo de efeitos ou forças físicas tais quais os movimentos

Brownianos, forças de van der Waals, forças gravitacionais, efeito da força eletrostática superficial e interações hidrofóbicas, quimiotaxia, haptotaxia além da composição química do substrato e energia livre de superfície (ELS) (DANESHMEHR et al., 2008; QUIRYNEN; BOLLEN, 1995).

Com relação a esta última variável, estudos *in vitro* e *in vivo* (JENDRESEN; GLANTZ, 1980; QUIRYNEN et al., 1989) demonstraram que a aderência de microorganismos ao substrato dental, mesmo que este esteja coberto por película adquirida, que tem o potencial de tornar as características superficiais semelhantes, ainda assim é influenciada pela ELS do substrato, sendo que uma ELS elevada aumenta o número de ligações disponíveis na superfície e atrai mais microorganismos, facilitando o acúmulo de biofilme (QUIRYNEN et al., 1990). Tal afinidade de microorganismos orais com superfícies de elevada ELS, sugere que estes também possuam elevada ELS. Sendo esta variável um ponto interessante para próximos estudos, para esclarecer de que forma cada tratamento testado no presente experimento é capaz de alterar a ELS do substrato e por conseqüência a aderência de microorganismos a este.

De acordo com a literatura, a solubilidade ou resistência à desintegração na cavidade oral, rugosidade superficial e energia livre de superfície são características de superfície do material e diretamente relacionadas à aderência bacteriana, estas são variáveis importantes e agentes facilitadores da formação e acúmulo de biofilme, sendo assim, a influência destas, justifica demanda por superfícies lisas e uniformes, na tentativa de minimizar os efeitos deletérios que possam causar (BOLLEN; LAMBRECHTS; QUIRYNEN, 1997; QUIRYNEN; BOLLEN, 1995). Todos estes esforços na tentativa de afetar as interações físico-químicas (ligações inespecíficas) e interações moleculares (ligações específicas), entre a

bactéria e as superfícies, reduzindo a aderência bacteriana ao substrato em questão.

Os tratamentos testados no presente estudo foram efetivos, no entanto, as mudanças causadas após os tratamentos, como alterações que influenciaram no aumento significativo da aderência bacteriana, podem ter resultados não tão positivos, ou até mesmo anular os efeitos positivos obtidos pelo tratamento. Mas um fato importante a se considerar, é o fato de que as mudanças morfológicas do esmalte dental com os tratamentos de superfície testados no presente estudo não seriam tão severas *in vivo* como o foram *in vitro*, visto que naquele caso a superfície receberia o benefício da remineralização no próprio ambiente bucal, o que talvez levasse a uma recuperação de possíveis danos causados à estrutura de esmalte em decorrência dos tratamentos escolhidos.

Este foi o primeiro trabalho a correlacionar os principais lasers com potencial preventivo e aderência bacteriana ao substrato irradiado, sendo o passo inicial de uma série de estudos laboratoriais, *in situ* e *in vivo* que serão necessários para obtermos a confirmação da inexistência desta correlação, e para maior conhecimento deste processo.

7 CONCLUSÕES

- Com base em nossos resultados e dentro das limitações deste estudo *in vitro*, concluímos que: Todos os tratamentos de superfície mostraram-se efetivos na redução da desmineralização do esmalte dental humano, sendo os tratamentos com Flúor Fosfato Acidulado e laser de CO_2 os mais efetivos na prevenção de cárie e redução da perda de volume mineral.
- O tratamento da superfície com flúor apresentou menor taxa de formação de biofilme, enquanto Controle e Er:YAG as maiores.
- As superfícies de esmalte tratadas com flúor ou laser de CO_2 apresentaram os menores valores de rugosidade média (RA), assim como a superfície sem tratamento (controle), enquanto o laser de Er:YAG os maiores valores.
- Não houve correlação entre aderência bacteriana e rugosidade superficial.

REFERÊNCIAS[1]

Amaral MM, Raele MP, Caly JP, Samad RE, Vieira Jr. ND, FREITAS AZ, et al. (2009). Roughness measurement methodology according to DIN 4768 using optical coherence tomography (OCT). . In: SPIE Europe: Optical Metrology. Modeling Aspects in Optical Metrology II, Munich.

An YH, Friedman RJ. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterial surfaces. J Biomed Mater Res 1998;43(3):338-48.

Ana PA. Estudo in vitro da resistência à desmineralização e da retenção de flúor em esmalte dental irradiado com laser de Er,Cr:YSGG [Tese de Doutorado]. São Paulo: Instituto de Pesquisas Energéticas e nucleares; 2007.

Anderson JR, Ellis RW, Blankenau RJ, Beiraghi SM, Westerman GH. Caries resistance in enamel by laser irradiation and topical fluoride treatment. J Clin Laser Med Surg 2000;18(1):33-6.

Andrade Jr. ACC, Namen FM, Galan Jr. J, Machado WAS (2006) "Análise "in situ" da formação de placa bacteriana em diferentes materiais restauradores " Medcenter.com TM Odontologia. Disponível em: URL: http://www.odontologia.com.br/artigos.asp?id=191 [2009 ago. 11].

Apel C, Meister J, Schmitt N, Graber HG, Gutknecht N. Calcium solubility of dental enamel following sub-ablative Er:YAG and Er:YSGG laser irradiation in vitro. Lasers Surg Med 2002;30(5):337-41.

Apel C, Birker L, Meister J, Weiss C, Gutknecht N. The caries-preventive potential of subablative Er:YAG and Er:YSGG laser radiation in an intraoral model: a pilot study. Photomed Laser Surg 2004;22(4):312-7.

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

Arcoria CJ, Lippas MG, Vitasek BA. Enamel surface roughness analysis after laser ablation and acid-etching. J Oral Rehabil 1993;20(2):213-24.

---

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

Bahar A, Tagomori S. The effect of normal pulsed Nd-YAG laser irradiation on pits and fissures in human teeth. Caries Res 1994;28(6):460-7.

Belikov AV, Moroz BT, Skripnik AV. Bacterial activity in the products of laser destruction of human dental enamel and dentin]. Stomatologiia 1995;74(6):32-4.

Bevilacqua FM, Zezell DM, Magnani R, da Ana PA, Eduardo Cde P. Fluoride uptake and acid resistance of enamel irradiated with Er:YAG laser. Lasers Med Sci 2008;23(2):141-7.

Boari HGD, Zezell DM, Eduardo CP. Dye-enhancing Nd:YAG irradiation of enamel aiming caries prevention. J Dent Res 1999;79(5):107-9.

Bollen CM, Lambrechts P, Quirynen M. Comparison of surface roughness of oral hard materials to the threshold surface roughness for bacterial plaque retention: a review of the literature. Dent Mater 1997;13(4):258-69.

Botazzo C. A cárie dentária como fetiche. Primeiras notas. In: Gráfica PLEe. Atenção Básica no Sistema Único de Saúde: abordagem interdisciplinar para os serviços de saúde bucal. 1ª São Paulo: 2008. 18, p. 239-90.

Boyd RD, Verran J, Jones MV, Bhakoo M. Use of Atomic Force Microscope to determine the effect of substratum surface topography on bacterial adhesion. Langmuir 2002;18:2343-6.

Castellan CS, Luiz AC, Bezinelli LM, Lopes RM, Mendes FM, De PEC, et al. In vitro evaluation of enamel demineralization after Er:YAG and Nd:YAG laser irradiation on primary teeth. Photomed Laser Surg 2007;25(2):85-90.

Cecchini RC, Zezell DM, de Oliveira E, de Freitas PM, Eduardo Cde P. Effect of Er:YAG laser on enamel acid resistance: morphological and atomic spectrometry analysis. Lasers Surg Med 2005;37(5):366-72.

Chimello DT, Serra MC, Rodrigues-Junior AL, Pecora JD, Corona SA. Influence of Er:YAG laser on microhardness of enamel adjacent to restorations submitted to cariogenic challenge in situ. Photomed Laser Surg 2008;26(4):379-85.

Clarkson BH, Rafter ME. Emerging methods used in the prevention and repair of carious tissues. J Dent Educ 2001;65(10):1114-20.

Coluzzi DJ. An overview of laser wavelengths used in dentistry. Dent Clin North Am 2000;44(4):753-65.

Cury JA, Francisco SB, Simoes GS, Del Bel Cury AA, Tabchoury CP. Effect of a calcium carbonate-based dentifrice on enamel demineralization in situ. Caries Res 2003;37(3):194-9.

Daneshmehr L, Matin K, Nikaido T, Tagami J. Effects of root dentin surface coating with all-in-one adhesive materials on biofilm adherence. J Dent 2008;36(1):33-41.

de Freitas PM, Rapozo-Hilo M, Eduardo CD, Featherstone JD. In vitro evaluation of erbium, chromium:yttrium-scandium-gallium-garnet laser-treated enamel demineralization. Lasers Med Sci 2008.Sep.12.

de Melo LS, de Araujo RE, Freitas AZ, Zezell D, Vieira ND, Girkin J, et al. Evaluation of enamel dental restoration interface by optical coherence tomography. J Biomed Opt 2005;10(6):064027.

Delbem AC, Cury JA, Nakassima CK, Gouveia VG, Theodoro LH. Effect of Er:YAG laser on CaF2 formation and its anti-cariogenic action on human enamel: an in vitro study. J Clin Laser Med Surg 2003;21(4):197-201.

Edwards KJ, Rutenberg AD. Microbial response to surface microtopography: the role of metabolism in localized mineral dissolution. . Chem Geol 2001;180:19-32.

Ellies LG, Nelson DG, Featherstone JD. Crystallographic structure and surface morphology of sintered carbonated apatites. J Biomed Mater Res 1988;22(6):541-53.

Esteves-Oliveira M, Zezell DM, Meister J, Franzen R, Stanzel S, Lampert F, et al. CO(2) Laser (10.6 mum) Parameters for Caries Prevention in Dental Enamel. Caries Res 2009;43(4):261-8.

Eversole LR, Rizoiu I, Kimmel AI. Pulpal response to cavity preparation by an erbium, chromium:YSGG laser-powered hydrokinetic system. J Am Dent Assoc 1997;128(8):1099-106.

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

Featherstone JD. The science and practice of caries prevention. J Am Dent Assoc 2000b;131(7):887-99.

Featherstone JD, Nelson DG. Laser effects on dental hard tissues. Adv Dent Res 1987;1(1):21-6.

Featherstone JD, Duncan JF, Cutress TW. A mechanism for dental caries based on chemical processes and diffusion phenomena during in-vitro caries simulation on human tooth enamel. Arch Oral Biol 1979;24(2):101-12.

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

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

Featherstone JD, Fried, D., Bitten, E.R. Mechanism of laser-induced solubility reduction of dental enamel. In: Bellingham. 5. 1997. 29, p. 112-6.

Featherstone JDB, Fried D. Fundamental interactions of lasers with dental hard tissues. Med Laser Appl. 2001;16:181-94.

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

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 1992;71(7):1389-98.

Freitas AZ, Vieira Jr ND, Ribeiro AC, Gomes ASL. Imaging carious human dental tissue with optical coherence tomography. Journal of Applied Physics 2006;99(2):024906.

Freitas AZ, Zezell DM, Mayer MPA, Ribeiro AC, Gomes ASL, Vieira ND. Determination of dental decay rates with optical coherence tomography. Laser Physics Letters (Print) 2009; 6:896-900.

Freitas AZd. Caracterização de tecidos biológicos através da tomografia por coerência óptica. [Doutorado]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2007.

Freitas PM, Soares-Geraldo D, Biella-Silva A, Silva AV, Silveira BL, Eduardo CP. Intrapulpal temperature variation during Er,Cr:YSGG enamel irradiation on caries prevention. J Appl Oral Sci. 2008;16(1):1-6.

Fried D, Featherstone JDB, Visuri SR, Seka W, Walsh JT (1996). The caries inhibition potential of Er:YAG and Er:YSGG laser radiation. Lasers in dentistry. Proceedings of the SPIE Meeting, San Jose, Washington, Bellingham.

Gurgan S, Bolay S, Alacam R. In vitro adherence of bacteria to bleached or unbleached enamel surfaces. J Oral Rehabil 1997;24(8):624-7.

Hadley J, Young DA, Eversole LR, Gornbein JA. A laser-powered hydrokinetic system for caries removal and cavity preparation. J Am Dent Assoc 2000;131(6):777-85.

Hara AT, Magalhaes CS, Serra MC, Rodrigues AL, Jr. Cariostatic effect of fluoride-containing restorative systems associated with dentifrices on root dentin. J Dent 2002;30(5-6):205-12.

Hargreaves JA, Pisko-Dubiensky RP. Changes in surface enamel using three differents methods of laser application [abstract 151]. J Dent Res 1984;63(4):507.

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

Hosoya N, Honda K, Iino F, Arai T. Changes in enamel surface roughness and adhesion of Streptococcus mutans to enamel after vital bleaching. J Dent 2003;31(8):543-8.

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

Hossain M, Nakamura Y, Yamada Y, Kimura Y, Matsumoto N, Matsumoto K. Effects of Er,Cr:YSGG laser irradiation in human enamel and dentin: ablation and morphological studies. J Clin Laser Med Surg 1999b;17(4):155-9.

Hossain M, Nakamura Y, Kimura Y, Yamada Y, Ito M, Matsumoto K. Caries-preventive effect of Er:YAG laser irradiation with or without water mist. J Clin Laser Med Surg 2000;18(2):61-5.

Hossain M, Kimura Y, Nakamura Y, Yamada Y, Kinoshita JI, Matsumoto K. A study on acquired acid resistance of enamel and dentin irradiated by Er,Cr:YSGG laser. J Clin Laser Med Surg 2001;19(3):159-63.

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

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

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

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

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.

Huang GF, Lan WH, Guo MK, Chiang CP. Synergistic effect of Nd:YAG laser combined with fluoride varnish on inhibition of caries formation in dental pits and fissures in vitro. J Formos Med Assoc 2001;100(3):181-5.

Jendresen MD, Glantz PO. Clinical adhesiveness of the tooth surface. Acta Odontol Scand 1980;38(6):379-83.

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

Katsikogianni M, Missirlis YF. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteria-material interactions. Eur Cell Mater 2004;8:37-57.

Kidd EA, Fejerskov O. What constitutes dental caries? Histopathology of carious enamel and dentin related to the action of cariogenic biofilms. J Dent Res 2004;83 Spec No C:C35-8.

Klein AL, Rodrigues LK, Eduardo CP, Nobre dos Santos M, Cury JA. Caries inhibition around composite restorations by pulsed carbon dioxide laser application. Eur J Oral Sci 2005;113(3):239-44.

Korytnicki D, Mayer MP, Daronch M, Singer Jda M, Grande RH. Effects of Nd:YAG laser on enamel microhardness and dental plaque composition: an in situ study. Photomed Laser Surg 2006;24(1):59-63.

Kuramitsu HK, Smorawinska M, Yamashita Y. Molecular Biology of Streptococcus mutans Virulence. In: Bowen WH, Tabak LA. Cariology for the Nineties. Rochester: University of Rochester; 1994. p. 301-8.

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

Larsen MJ, Brun C. A química da cárie dentária e o flúor- mecanismo de ação. In: Santos LE. Cariologia clínica. 1995. p.

Lembo FL, Longo PL, Ota-Tsuzuki C, Rodrigues CR, Mayer MP. Genotypic and phenotypic analysis of Streptococcus mutans from different oral cavity sites of caries-free and caries-active children. Oral Microbiol Immunol 2007;22(5):313-9.

Liu JF, Liu Y, Stephen HC. Optimal Er:YAG laser energy for preventing enamel demineralization. J Dent 2006;34(1):62-6.

Mattos-Graner RO, Napimoga MH, Fukushima K, Duncan MJ, Smith DJ. Comparative analysis of Gtf isozyme production and diversity in isolates of Streptococcus mutans with different biofilm growth phenotypes. J Clin Microbiol 2004;42(10):4586-92.

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

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

Meister J, Franzen R, Forner K, Grebe H, Stanzel S, Lampert F, et al. Influence of the water content in dental enamel and dentin on ablation with erbium YAG and erbium YSGG lasers. J Biomed Opt 2006;11(3):34030.

Meurman JH, Hemmerle J, Voegel JC, Rauhamaa-Makinen R, Luomanen M. Transformation of hydroxyapatite to fluorapatite by irradiation with high-energy CO2 laser. Caries Res 1997;31(5):397-400.

Millar BJ, Abiden F, Nicholson JW. In vitro caries inhibition by polyacid-modified composite resins ('compomers'). J Dent 1998;26(2):133-6.

Morioka T, Morita E, Suzuki K. Temperature increments and sensory response of healthy teeth of volunteers with irradiation of a Q-switched Nd-YAG laser. Koku Eisei Gakkai Zasshi 1982;31(5):44-50.

Morioka T, Tagomori S, Tsutsumi H. Increase in acid resistance of hamster enamel by using a normal pulse Nd-YAG laser. Fukuoka Igaku Zasshi 1985;76(2):49-53.

Morioka T, Tagomori S, Tsutsuni H. Effect of laser irradiation on fluoride uptake in enamel - by EPM surface scanning. J. Jap. Soc. Laser Dent, Abstract of paper; 1986.

Morioka T, Tagomori S, Nara Y (1988). Application of Nd:YAG laser and fluoride in the prevention of dental caries. Procedings of the International Congress of laser in Dentistry, Tokyo-Japan.

Morioka T, Tagomori S, Oho T. Acid resistance of laser in human enamel with Er: YAG laser. J Clin Med Surg 1991;9:215-7.

Morioka T, Tagomori S, Inai, Yuko. An incremental effect of acid resistance and remineralization on incipient caries of enamel with laser irradiation. J. Jpn. Soc. Laser Dent. 1991;1:9.

Mosha HJ, Fejerskov O, Langebaek J, Thylstrup A, Baelum V, Manji F. Caries experience in urban Tanzanian children 1973-84. Scand J Dent Res 1988;96(5):385-9.

Negri HM, Cury JA. [Dose-response effect of a dentifrice formulation with low fluoride concentration - an in vitro study]. Pesqui Odontol Bras 2002;16(4):361-5.

Nelson DG, Featherstone JD. Preparation, analysis, and characterization of carbonated apatites. Calcif Tissue Int 1982;34 Suppl 2:S69-81.

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

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

Oho T, Morioka T. A possible mechanism of acquired acid resistance of human dental enamel by laser irradiation. Caries Res 1990;24(2):86-92.

Pereira PN, Inokoshi S, Tagami J. In vitro secondary caries inhibition around fluoride releasing materials. J Dent 1998;26(5-6):505-10.

Quirynen M, Bollen CM. The influence of surface roughness and surface-free energy on supra- and subgingival plaque formation in man. A review of the literature. J Clin Periodontol 1995;22(1):1-14.

Quirynen M, Marechal M, Busscher HJ, Weerkamp AH, Darius PL, van Steenberghe D. The influence of surface free energy and surface roughness on early plaque formation. An in vivo study in man. J Clin Periodontol 1990;17(3):138-44.

Quirynen M, Marechal M, Busscher HJ, Weerkamp AH, Arends J, Darius PL, et al. The influence of surface free-energy on planimetric plaque growth in man. J Dent Res 1989;68(5):796-9.

Raggio DP, Imparato JCP, Politano GT, Echeverria SR, Uemura ST, Ferreira EMS. Tratamento Restaurador Atraumático. Revista Gaúcha de Odontologia 2004; 52(5):355-8.

Rodrigues LK, Cury JA, Nobre dos Santos M. The effect of gamma radiation on enamel hardness and its resistance to demineralization in vitro. J Oral Sci 2004;46(4):215-20.

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

Rodrigues LK, Nobre dos Santos M, Pereira D, Assaf AV, Pardi V. Carbon dioxide laser in dental caries prevention. J Dent 2004;32(7):531-40.

Rolla G. On the role of calcium fluoride in the cariostatic mechanism of fluoride. Acta Odontol Scand 1988;46(6):341-5.

Schmidlin PR, Dorig I, Lussi A, Roos M, Imfeld T. CO2 laser-irradiation through topically applied fluoride increases acid resistance of demineralised human enamel in vitro. Oral Health Prev Dent 2007;5(3):201-8.

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

Stern RH, Sognnaes RF, Goodman F. Laser effect on in vitro enamel permeability and solubility. J Am Dent Assoc 1966;73(4):838-43.

Tagomori S, Morioka T. Combined effects of laser and fluoride on acid resistance of human dental enamel. Caries Res 1989;23(4):225-31.

Takeuti ML, Marquezan M, Rodrigues CR, Rodrigues Filho LE, Rocha Rde O. Inhibition of demineralization adjacent to tooth-colored restorations in primary teeth after 2 in vitro challenges. J Dent Child (Chic) 2007;74(3):209-14.

Taylor RL, Verran J, Lees GC, Ward AJ. The influence of substratum topography on bacterial adhesion to polymethyl methacrylate. J Mater Sci Mater Med 1998;9(1):17-22.

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

Ten Cate JM, Duijsters PP. Influence of fluoride in solution on tooth demineralization. I. Chemical data. Caries Res 1983;17(3):193-9.

Thylstrup A. [Caries: summary observations of applied knowledge in view of new knowledge]. Tandlaegebladet 1988;92(2):47-59.

Thylstrup A, Fejerskov. O. Cariologia clínica. São Paulo: Editora Santos; 1995

Westerman GH, Hicks MJ, Flaitz CM, Blankenau RJ, Powell GL. Combined effects of acidulated phosphate fluoride and argon laser on sound root surface morphology: an in vitro scanning electron microscopy study. J Clin Laser Med Surg 1999;17(2):63-8.

Yamamoto H, Sato K. Prevention of dental caries by acousto-optically Q-switched Nd: YAG laser irradiation. J Dent Res 1980;59(2):137.

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

Yu DG, Kimura Y, Kinoshita J, Matsumoto K. Morphological and atomic analytical studies on enamel and dentin irradiated by an erbium, chromium:YSGG laser. J Clin Laser Med Surg 2000;18(3):139-43.

Zezell DM, Boari HG, Ana PA, Eduardo Cde P, Powell GL. Nd:YAG laser in caries prevention: a clinical trial. Lasers Surg Med 2009;41(1):31-5.

Zhang C, Kimura Y, Matsumoto K. The effects of pulsed Nd:YAG laser irradiation with fluoride on root surface. J Clin Laser Med Surg 1996;14(6):399-403.

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

APÊNDICE A- Valores originais de microdureza

Tabela A1- Valores de microdureza correspondentes ao grupo controle

1º coluna	Controle 10µm	Controle 20µm	Controle 40µm	Controle 60µm	Controle 80µm	Controle 100µm	Controle 140µm	Controle 220µm
1	57	59	223	284	243	327	264	326
2	67	62	113	201	108	149	185	322
3	82	110	199	248	219	257	264	327
4	76	75	88	174	168	210	194	243
5	82	110	246	237	203	256	269	326
6	129	163	187	248	219	257	358	305
7	56	129	237	309	249	273	363	441
8	92	92	201	213	201	208	223	292
9	53	187	300	288	273	309	273	342
10	125	111	199	280	309	322	249	337
Media	81.9	109.8	199.3	248.2	219.2	256.8	264.2	326.1
desv pad	26.99979	41.57136	61.72889	43.03952	55.77096	56.13436	59.43213	49.55906

2º coluna	Controle 10µm	Controle 20µm	Controle 40µm	Controle 60µm	Controle 80µm	Controle 100µm	Controle 140µm	Controle 220µm
1	81	74	231	327	269	393	393	269
2	109	127	220	108	218	243	305	322
3	96	65	232	232	269	286	280	269
4	183	170	252	266	288	218	174	167
5	143	185	232	252	240	288	162	220
6	127	192	240	259	296	286	280	252
7	228	123	313	232	363	342	342	252
8	135	96	133	158	142	240	228	243
9	42	123	228	259	300	288	369	352
10	127	76	243	231	305	277	266	342
Media	127.1	123.1	232.4	232.4	269	286.1	279.9	268.8
desv pad	51.94324	46.58672	43.59715	60.45237	59.39884	50.8406	76.89741	56.84834

Tabela A2- Valores de microdureza correspondentes ao grupo flúor

1º coluna	Fluor 10µm	Fluor 20µm	Fluor 40µm	Fluor 60µm	Fluor 80µm	Fluor 100µm	Fluor 140µm	Fluor 220µm
1	280	198	347	300	381	337	336	313
2	208	198	252	284	313	337	342	358
3	139	198	301	309	347	309	342	318
4	318	220	332	352	393	369	332	309
5	207	273	327	294	322	426	280	305
6	165	252	301	266	332	334	342	387
7	207	119	246	294	363	342	363	259
8	116	162	337	296	296	237	363	313
9	266	203	342	266	277	313	336	387
10	165	160	223	280	358	334	322	337
Media	207.1	198.3	300.8	294.1	338.2	333.8	335.8	328.6
desv pad	64.60556	44.75874	45.01802	24.7047	37.09088	47.42901	23.36569	39.6378

2º coluna	Fluor 10µm	Fluor 20µm	Fluor 40µm	Fluor 60µm	Fluor 80µm	Fluor 100µm	Fluor 140µm	Fluor 220µm
1	318	419	342	313	375	336	375	305
2	239	194	313	369	375	347	332	330
3	167	263	218	273	337	406	288	309
4	179	246	281	426	354	318	327	352
5	292	198	256	327	347	318	296	375
6	239	187	218	288	375	358	332	300
7	327	327	281	336	406	309	381	296
8	174	292	313	393	284	336	292	330
9	262	263	313	300	354	292	318	369
10	196	240	273	336	332	337	381	332
Media	239.3	262.9	280.8	336.1	353.9	335.7	332.2	329.8
desv pad	59.79604	70.59501	41.39189	47.86195	32.91217	31.30158	36.06106	28.19693

Tabela A3 - Valores de microdureza correspondentes ao grupo Neodímio YAG

1º coluna	Neodímio 10µm	Neodímio 20µm	Neodímio 40µm	Neodímio 60µm	Neodímio 80µm	Neodímio 100µm	Neodímio 140µm	Neodímio 220µm
1	145	108	205	300	300	273	327	346
2	187	133	210	252	273	296	273	318
3	116	142	268	309	292	334	309	269
4	82	90	259	296	342	381	277	352
5	135	145	313	309	300	334	305	369
6	198	220	309	296	322	342	269	369
7	155	198	252	318	358	337	332	347
8	145	142	342	296	313	347	393	413
9	94	113	252	327	322	347	296	332
10	194	130	268	300	399	347	309	346
média	145.1	142.1	267.8	300.3	322.1	333.8	309	346.1
desv pad	40.25599	39.65812	43.59867	19.90561	36.47663	29.72765	36.53613	37.25721

2º coluna	Neodímio 10µm	Neodímio 20µm	Neodímio 40µm	Neodímio 60µm	Neodímio 80µm	Neodímio 100µm	Neodímio 140µm	Neodímio 220µm
1	125	174	228	319	322	332	313	347
2	119	122	305	318	369	313	327	347
3	70	75	263	266	345	300	332	342
4	73	71	296	352	369	322	393	347
5	59	234	296	347	318	332	347	337
6	108	120	139	337	358	332	358	327
7	162	174	263	375	322	305	340	342
8	125	259	322	280	375	327	300	342
9	59	179	201	273	327	363	352	313
10	347	332	313	319	345	393	340	375
média	124.7	174	262.6	318.6	345	331.9	340.2	341.9
desv pad	85.25654	82.89485	58.08653	36.17611	21.93931	27.73065	25.5769	15.8286

Tabela A4 - Valores de microdureza correspondentes ao grupo Érbio YAG

1º coluna	Érbio YAG 10µm	Érbio YAG 20µm	Érbio YAG 40µm	Érbio YAG 60µm	Érbio YAG 80µm	Érbio YAG 100µm	Érbio YAG 140µm	Érbio YAG 220µm
1	130	127	249	300	307	300	419	337
2	189	300	305	352	347	352	277	358
3	189	205	215	277	256	318	280	335
4	77	125	267	252	296	375	393	292
5	170	240	284	277	307	313	387	387
6	337	205	267	305	332	329	363	335
7	240	192	240	305	288	292	360	332
8	104	168	223	305	269	329	360	313
9	132	148	273	347	337	327	381	352
10	318	342	347	327	332	352	381	309
média	188.6	205.2	267	304.7	307.1	328.7	360.1	335
desv pad	86.92551	71.71673	39.24567	31.37249	30.32582	25.30722	46.52228	26.965

2º coluna	Érbio YAG 10µm	Érbio YAG 20µm	Érbio YAG 40µm	Érbio YAG 60µm	Érbio YAG 80µm	Érbio YAG 100µm	Érbio YAG 140µm	Érbio YAG 220µm
1	203	107	256	318	256	292	284	352
2	273	208	277	300	296	369	259	347
3	277	170	305	266	327	305	226	375
4	97	223	272	375	295	218	315	343
5	125	252	154	240	292	375	363	322
6	292	223	300	316	295	338	399	352
7	237	183	305	322	269	337	406	363
8	160	172	240	316	194	338	300	292
9	163	342	337	318	342	406	280	343
10	203	352	272	387	381	399	315	342
Media	203	223.2	271.8	315.8	294.7	337.7	314.7	343.1
desv pad	66.85141	76.25513	49.90613	43.58593	50.59216	56.05563	58.79163	22.71783

Tabela A5 - Valores de microdureza correspondentes ao grupo Érbio Cromo YSGG

1º coluna	Erbio Cromo 10µm	Erbio Cromo 20µm	Erbio Cromo 40µm	Erbio Cromo 60µm	Erbio Cromo 80µm	Erbio Cromo 100µm	Erbio Cromo 140µm	Erbio Cromo 220µm
1	155	139	280	363	273	247	322	300
2	210	277	198	196	218	215	249	328
3	184	214	252	259	213	277	284	318
4	181	358	300	296	243	305	375	305
5	243	237	273	157	213	203	273	358
6	152	70	255	260	246	247	304	332
7	68	165	142	203	277	192	296	288
8	184	214	255	260	246	300	304	352
9	363	375	358	266	332	332	322	328
10	99	92	237	342	196	151	309	369
média	183.9	214.1	255	260.2	245.7	246.9	303.8	327.8
desv pad	80.79666	102.6325	57.67148	63.78749	40.21622	57.25081	33.60489	26.2162

2º coluna	Erbio Cromo 10µm	Erbio Cromo 20µm	Erbio Cromo 40µm	Erbio Cromo 60µm	Erbio Cromo 80µm	Erbio Cromo 100µm	Erbio Cromo 140µm	Erbio Cromo 220µm
1	152	194	259	252	280	288	246	387
2	183	170	201	252	262	266	256	226
3	215	212	142	237	246	287	288	237
4	269	240	337	284	208	284	292	342
5	277	192	309	205	231	288	198	249
6	215	305	313	292	266	287	279	192
7	127	139	250	299	249	262	203	223
8	220	358	250	299	296	256	352	381
9	369	212	318	473	352	387	399	280
10	121	98	118	393	266	266	279	280
média	214.8	212	249.7	298.6	265.6	287.1	279.2	279.7
desv pad	76.06547	75.69089	75.43364	79.22009	39.13566	37.23633	61.40358	68.48528

Tabela A6 - Valores de microdureza correspondentes ao grupo CO_2

1º coluna	CO_2 10µm	CO_2 20µm	CO_2 40µm	CO_2 60µm	CO_2 80µm	CO_2 100µm	CO_2 140µm	CO_2 220µm
1	186	208	300	237	292	269	352	296
2	121	170	256	358	352	347	322	342
3	223	259	262	296	413	335	464	347
4	203	202	277	318	269	347	350	313
5	176	202	269	243	277	292	296	332
6	186	135	259	223	338	335	350	318
7	185	157	264	279	434	322	363	296
8	190	234	174	284	322	387	309	318
9	262	313	313	273	338	363	363	300
10	125	139	264	279	342	352	332	318
Media	185.7	201.9	263.8	279	337.7	334.9	350.1	318
desv pad	41.49444	55.91352	36.64181	39.87202	53.65124	34.05698	45.99867	18.04316

2º coluna	CO_2 10µm	CO_2 20µm	CO_2 40µm	CO_2 60µm	CO_2 80µm	CO_2 100µm	CO_2 140µm	CO_2 220µm
1	259	181	269	178	292	327	300	305
2	179	170	262	327	307	363	256	413
3	162	158	246	277	342	327	332	342
4	300	269	249	327	259	288	259	296
5	226	213	260	301	234	277	318	259
6	237	240	296	327	337	363	342	393
7	249	141	218	292	307	318	318	323
8	210	228	240	301	375	309	358	323
9	208	318	300	347	318	369	358	249
10	226	213	260	332	300	327	342	327
Media	225.6	213.1	260	300.9	307.1	326.8	318.3	323
desv pad	39.57889	53.95152	24.63511	48.17895	40.52009	31.23673	36.81198	51.64193

APÊNDICE B - Valores originais da área de perda de volume mineral (∆Z), baseados nos valores originais de microdureza em cada um dos espécimes, em cada uma das profundidades abaixo especificadas

Tabela B1 - Área de perda de volume mineral – ΔZ do grupo controle

ESPÉCIME/PROF	10	20	40	60	80	100	140	220	delta Z
1	47.0	46.4	76.1	86.5	80.1	92.9	89.2	85.5	**1032.2**
2	51.6	53.1	66.8	64.7	66.2	71.5	78.6	88.5	**2141.9**
3	51.9	51.5	74.4	77.9	78.5	82.2	82.2	85.5	**1163.2**
4	60.2	58.9	67.4	75.1	76.2	74.2	69.6	72.9	**378.4**
5	56.9	63.5	77.8	78.5	75.3	82.2	74.4	82.3	**495.5**
6	59.9	68.6	74.1	79.8	80.3	82.2	88.1	83.1	**850.9**
7	62.5	59.6	82.6	82.0	86.5	86.7	92.0	91.3	**1176.9**
8	57.1	53.0	66.9	69.9	67.6	75.7	75.9	81.6	**1297.7**
9	40.9	64.8	81.2	82.4	84.1	85.6	88.3	91.4	**1327.5**
10	59.6	52.9	75.2	80.0	86.6	85.7	80.3	90.5	**908.5**

Tabela B2 - Área de perda de volume mineral – ΔZ do grupo flúor

ESPÉCIME/PROF	10	20	40	60	80	100	140	220	delta Z
1	85.7	86.8	91.1	86.6	94.9	90.2	92.4	86.9	**114.5**
2	75.6	71.5	83.6	89.0	91.1	90.8	90.2	91.1	**520.0**
3	64.5	76.6	80.6	84.7	90.8	92.6	87.6	87.4	**640.4**
4	79.1	76.9	86.6	96.1	94.4	91.0	89.4	89.5	**312.7**
5	79.2	77.3	84.7	87.1	89.9	94.2	84.3	90.6	**296.3**
6	72.4	75.0	80.6	82.9	92.1	91.3	90.2	91.0	**707.7**
7	81.6	75.5	81.1	87.6	95.6	88.9	94.2	82.9	**388.4**
8	63.1	76.1	88.8	91.1	84.5	84.1	89.1	88.4	**259.5**
9	81.2	76.9	89.1	83.6	87.7	86.1	89.1	94.9	**810.8**
10	69.1	72.1	79.0	86.8	91.2	90.1	91.9	89.9	**711.4**

Tabela B3 - Área de perda de volume mineral – ΔZ do grupo Neodímio YAG

ESPÉCIME/PROF	10	20	40	60	80	100	140	220	delta Z
1	61.3	62.4	74.6	86.9	87.1	86.1	88.2	91.3	**1111.8**
2	64.5	59.9	80.3	83.9	88.3	86.3	85.8	89.7	**710.4**
3	52.8	56.1	81.4	84.2	88.0	87.9	88.3	86.5	**852.1**
4	49.2	49.9	82.9	88.7	92.4	91.9	90.0	91.7	**1049.6**
5	53.7	70.5	86.3	89.2	86.9	89.8	88.9	92.1	**742.9**
6	64.5	67.4	75.7	87.8	90.6	90.2	87.4	91.5	**797.3**
7	65.4	69.9	80.3	91.3	90.6	88.3	90.1	91.1	**631.8**
8	61.3	72.2	89.6	84.3	91.1	90.2	91.3	94.8	**717.1**
9	48.9	63.3	76.0	85.8	88.8	92.3	88.7	88.5	**1034.5**
10	82.0	76.7	84.6	86.9	94.2	94.0	88.8	92.9	**499.2**

Tabela B4 - Área de perda de volume mineral – ΔZ do grupo Érbio YAG

ESPÉCIME/PROF	10	20	40	60	80	100	140	220	delta Z
1	66.8	57.8	79.6	86.9	83.4	85.3	91.9	91.1	**1184.7**
2	76.7	79.8	84.7	88.9	88.4	92.9	81.7	92.0	**297.5**
3	76.9	70.2	80.6	82.2	84.7	87.2	79.7	92.3	**493.0**
4	51.4	68.0	81.9	87.4	85.2	85.3	92.2	87.9	**932.6**
5	63.5	78.7	74.9	80.4	85.7	91.1	94.6	92.3	**1231.1**
6	87.6	74.2	83.7	87.1	87.4	89.8	95.2	91.0	**652.2**
7	77.7	70.2	82.3	87.4	83.1	87.6	95.5	91.5	**983.5**
8	60.7	67.4	76.7	87.1	76.7	89.8	89.4	86.1	**958.5**
9	63.5	78.6	86.4	89.7	90.5	93.6	89.5	91.5	**527.1**
10	80.7	91.4	86.9	92.5	92.5	94.6	91.5	88.9	**211.0**

Tabela B5 - Área de perda de volume mineral – ΔZ do grupo Érbio Cromo YSGG

ESPÉCIME/PROF	10	20	40	60	80	100	140	220	delta Z
1	64.6	66.8	81.9	86.7	82.8	81.6	83.8	91.0	**920.5**
2	71.6	75.6	72.0	75.7	77.9	78.0	79.6	82.9	**648.7**
3	72.0	74.1	71.7	79.0	76.4	83.5	84.0	82.9	**675.5**
4	75.8	85.7	88.0	84.5	75.9	85.1	89.8	88.6	**614.8**
5	80.6	74.3	84.7	69.2	75.4	78.7	77.3	86.2	**377.5**
6	69.5	70.2	83.8	82.7	80.1	81.6	84.7	80.9	**247.6**
7	53.8	64.3	71.5	79.4	81.0	76.1	79.2	80.0	**509.6**
8	72.4	84.0	79.6	83.2	82.1	83.0	89.2	93.6	**1110.7**
9	93.6	85.0	90.4	94.0	90.8	92.8	92.9	86.3	**13.2**
10	56.4	53.2	68.6	93.7	76.7	73.4	85.0	88.8	**1423.9**

Tabela B6 - Área de perda de volume mineral – ΔZ do grupo CO_2

ESPÉCIME/PROF	10	20	40	60	80	100	140	220	delta Z
1	75.4	71.3	83.8	73.2	84.8	85.5	88.9	85.8	**664.5**
2	64.0	67.4	80.5	90.9	89.4	92.3	84.4	94.8	**690.3**
3	71.0	73.4	79.8	84.1	94.8	89.5	97.1	91.1	**837.1**
4	79.5	77.3	81.0	88.5	81.2	87.9	86.3	86.3	**207.1**
5	72.3	73.2	81.2	82.2	80.0	83.8	86.6	85.2	**563.7**
6	73.8	70.2	82.9	82.6	90.3	91.6	91.3	92.4	**787.0**
7	74.6	63.8	78.1	84.0	94.1	88.2	90.6	86.9	**695.5**
8	72.1	76.7	73.2	84.8	91.6	91.5	89.8	88.3	**745.6**
9	77.2	87.7	86.6	87.0	89.2	93.6	92.9	82.5	**209.1**
10	68.3	68.3	80.9	86.5	88.3	90.5	90.2	88.5	**686.1**

APÊNDICE C - Valores originais de rugosidade superficial

Tabela C1 - Resultados da leitura de rugosidade (Ra)

Grupo	Ra	Ra	Ra	Ra	Ra
Controle 1	3,753	2,843	3,355	3,464	3,797
Controle 2	3,739	5,112	4,063	4,099	4,891
Controle 3	2,149	1,85	2,084	1,851	2,838
Controle 4	4,504	3,541	3,35	4,492	3,448
Controle 5	7,833	8,081	8,229	11,126	10,586
Controle 6	2,803	2,582	2,369	1,868	1,54
Controle 7	1,455	1,077	1,122	1,036	1,159
Controle 8	2,081	2,56	2,125	2,944	3,533
Controle 9	12,027	13,287	12,204	12,007	16,255
Controle 10	12,874	14,622	15,01	13,896	13,909

Grupo	Ra	Ra	Ra	Ra	Ra
Fluor 1	2,98	1,811	1,573	1,574	1,373
Fluor 2	27,179	18,39	18,356	16,898	14,309
Fluor 3	5,586	5,618	6,147	5,815	6,104
Fluor 4	1,902	1,991	2,212	2,535	1,977
Fluor 5	1,334	1,35	1,117	1,237	1,392
Fluor 6	2,081	2,318	2,031	1,954	2,196
Fluor 7	18,763	18,442	16,261	10,639	8,577
Fluor 8	2,807	3,183	2,689	2,693	2,436
Fluor 9	7,846	8,416	5,63	8,837	5,293
Fluor 10	11,126	8,263	8,753	8,304	8,181

Grupo	Ra	Ra	Ra	Ra	Ra
Neodímio 1	7,16	7,276	8,523	8,412	8,395
Neodímio 2	14,969	13,82	13,594	13,471	13,164
Neodímio 3	12,409	12,867	14,664	12,74	11,915
Neodímio 4	2,307	2,147	2,398	1,42	2,069
Neodímio 5	11,761	9,786	9,319	11,265	11,153
Neodímio 6	7,87	7,214	8,187	8,501	7,515
Neodímio 7	5,294	4,827	5,007	3,879	3,931
Neodímio 8	8,411	6,615	6,638	7,409	7,576
Neodímio 9	24,565	25,338	19,779	17,284	23,474
Neodímio 10	3,631	7,065	2,988	3,268	2,922

Grupo	Ra	Ra	Ra	Ra	Ra	Ra
Érbio YAG 1	11,064	10,012	13,096	12,116	7,026	-
Érbio YAG 2	13,463	12,306	9,21	12,93	11,015	-
Érbio YAG 3	14,354	9,009	11,722	12,031	8,48	-
Érbio YAG 4	6,361	7,923	7,907	8,38	9,37	-
Érbio YAG 5	7,888	7,306	9,314	9,993	9,924	-
Érbio YAG 6	3,909	8,101	9,529	7,902	9,312	-
Érbio YAG 7	22,424	20,141	22,194	12,17	11,183	-
Érbio YAG 8	29,088	22,017	31,278	25,613	34,743	-
Érbio YAG 9	7,983	5,068	6,006	8,204	9,597	-
Érbio YAG 10	15,229	6,718	14,723	17,322	12,569	20,54

Grupo	Ra	Ra	Ra	Ra	Ra
Érbio Cromo 1	6,858	2,232	4,884	3,385	3,907
Érbio Cromo 2	10,877	12,333	13,581	15,012	11,961
Érbio Cromo 3	10,781	8,071	7,367	6,886	7,308
Érbio Cromo 4	5,894	5,93	5,127	6,588	2,36
Érbio Cromo 5	6,021	6,423	6,614	7,924	9,141
Érbio Cromo 6	18,051	25,25	21,324	21,527	18,84
Érbio Cromo 7	13,698	13,584	19,041	24,241	6,714
Érbio Cromo 8	5,348	3,717	6,95	6,513	6,134
Érbio Cromo 9	15,57	14,945	11,97	14,78	5,444
Érbio Cromo 10	2,703	2,558	2,454	2,38	2,114

Grupo	Ra	Ra	Ra	Ra	Ra
CO_2 1	5,812	3,278	2,504	2,238	4,687
CO_2 2	3,37	3,502	2,984	3,724	3,621
CO_2 3	6,444	4,347	2,794	2,098	6,099
CO_2 4	4,794	3,1	3,039	2,722	4,616
CO_2 5	4,187	3,793	6,53	4,97	4,129
CO_2 6	3,331	3,627	3,699	5,281	10,6
CO_2 7	4,567	5,803	5,937	6,859	5,728
CO_2 8	3,397	4,896	6,948	5,105	2,934
CO_2 9	2,017	3,346	3,816	1,759	6,221
CO_2 10	3,553	3,124	2,981	2,309	2,862

Tabela C2 - Resultados da leitura de rugosidade (Rz)

Grupo	Rz	Rz	Rz	Rz	Rz
Controle 1	9,82	6,725	9,052	8,536	13,055
Controle 2	9,441	21,174	9,865	11,735	14,069
Controle 3	18,672	5,111	6,005	5,726	7,095
Controle 4	9,962	8,562	8,775	9,931	8,381
Controle 5	15,854	15,075	14,628	18,084	17,305
Controle 6	6,446	6,438	11,217	6,107	5,713
Controle 7	4,449	3,17	3,218	3,177	3,55
Controle 8	5,316	7,231	5,928	22,08	34,106
Controle 9	32,921	34,023	23,158	21,142	28,388
Controle 10	24,437	31,687	25,556	25,959	23,927

Grupo	Rz	Rz	Rz	Rz	Rz
Fluor 1	5,741	3,049	4,055	6,114	4,598
Fluor 2	46,355	29,287	28,338	26,085	25,01
Fluor 3	10,762	11,156	11,634	12,283	13,626
Fluor 4	5,599	6,64	26,811	19,728	5,422
Fluor 5	6,017	11,056	3,519	3,897	10,479
Fluor 6	5,243	19,124	11,851	6,485	17,436
Fluor 7	28,007	26,736	23,922	16,734	14,513
Fluor 8	6,215	6,714	6,234	7,482	6,818
Fluor 9	17,841	25,336	16,896	19,169	12,245
Fluor 10	19,607	21,932	15,694	14,24	13,085

Grupo	Rz	Rz	Rz	Rz	Rz
Neodímio 1	11,967	13,45	14,575	14,256	15,68
Neodímio 2	40,748	25,079	23,022	23,294	23,805
Neodímio 3	18,534	19,784	21,416	20,233	18,074
Neodímio 4	6,329	6,682	6,597	4,238	6,041
Neodímio 5	26,699	17,373	15,601	21,054	21,136
Neodímio 6	12,728	14,256	14,225	16,374	13,791
Neodímio 7	11,199	11,15	11,962	9,173	9,248
Neodímio 8	23,758	12,664	11,903	13,984	13,029
Neodímio 9	39,062	42,299	36,22	33,723	36,419
Neodímio 10	11,624	19,611	8,372	10,598	7,548

Grupo	Rz	Rz	Rz	Rz	Rz	Rz
Érbio YAG 1	29,568	23,854	26,043	28,534	18,401	-
Érbio YAG 2	28,506	30,76	23,213	36,439	19,868	-
Érbio YAG 3	29,008	23,999	27,432	27,557	25,86	-
Érbio YAG 4	19,11	19,615	23,193	24,183	31,201	-
Érbio YAG 5	24,448	18,163	27,798	35,314	23,43	-
Érbio YAG 6	23,011	25,722	31,593	20,341	23,735	-
Érbio YAG 7	43,126	39,074	45,011	31,025	37,4	-
Érbio YAG 8	39,835	62,762	47,352	65,072	63,157	-
Érbio YAG 9	26,233	14,946	18,315	29,529	32,177	-
Érbio YAG 10	37,715	21,193	31,495	42,702	33,384	46,87

Grupo	Rz	Rz	Rz	Rz	Rz
Érbio Cromo 1	24,614	12,576	18,275	19,752	14,607
Érbio Cromo 2	37,814	41,054	52,41	52,15	35,087
Érbio Cromo 3	27,908	23,908	20,845	18,983	22,35
Érbio Cromo 4	24,815	16,562	15,68	19,87	9,353
Érbio Cromo 5	30,306	20,056	24,993	27,433	31,942
Érbio Cromo 6	38,182	67,182	38,049	57,956	45,362
Érbio Cromo 7	34,074	26,265	40,616	37,913	23,031
Érbio Cromo 8	22,273	23,514	22,859	27,51	20,088
Érbio Cromo 9	29,626	26,849	18,954	42,623	13,188
Érbio Cromo 10	12,064	12,399	10,644	11,531	11,435

Grupo	Rz	Rz	Rz	Rz	Rz
CO_2 1	21,807	11,521	10,841	9,159	22,002
CO_2 2	12,369	10,213	10,354	12,313	15,008
CO_2 3	23,033	18,981	14,311	10,2	24,53
CO_2 4	22,975	17,057	12,9	16,064	19,329
CO_2 5	15,529	16,424	24,79	20,508	14,039
CO_2 6	15,44	12,77	19,382	23,646	57,195
CO_2 7	23,087	17,594	17,764	17,48	21,524
CO_2 8	10,608	16,965	23,614	17,97	14,006
CO_2 9	9,692	17,701	16,598	10,037	21,328
CO_2 10	14,673	11,811	16,982	9,562	12,341

APÊNDICE D - Valores originais de aderência bacteriana

Tabela D1 - Valores de absorbância em cristal violeta das bactérias aderidas à superfície do esmalte

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Media	d.p.
Controle	1.524	1.309	1.534	0.948	0.515	1.278	0.852	1.35	1,27	2.08	1.265555556	0.45367282
Fluor	0.812	0.364	0.493	0.161	0.416	0.362	0.241	0.444	0.726	0.623	0.4642	0.205619822
Neodímio	0.858	0.368	0.663	0.331	0.668	1.025	1.131	1.942	0.628	0.907	0.8521	0.462406855
Érbio YAG	0.058	0.556	1.12	1.706	1.7	1.601	2.278	1.445	1.355	1.426	1.3245	0.626661746
Érbio Cromo	0.591	0.649	1.225	0,983	0.856	0.791	0.524	0.834	1.288	2.093	0.983444444	0.491780213
CO_2	0.778	1.179	0.946	2.38	0.653	0.421	1.843	0.708	0.589	0.755	1.0252	0.620286636

Tabela D2 - Valores da taxa de formação de biofilme por grupo

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	média	d.p.
Controle	2.771	2.38	2.789	1.724	0.936	2.324	1.549	2.455	2.309	3.782	2.301818182	0.737780903
Fluor	1.476	0.662	0.896	0.293	0.756	0.658	0.438	0.807	1.32	1.133	0.844	0.354669256
Neodímio	1.56	0.669	1.205	0.602	1.215	1.864	2.056	3.531	1.142	1.649	1.549272727	0.797595747
Érbio YAG	0.105	1.011	2.036	3.102	3.091	2.911	4.142	2.627	2.464	2.593	2.408181818	1.080915513
Érbio Cromo	1.075	1.18	2.227	1.787	1.556	1.438	0.953	1.516	2.342	3.805	1.788	0.79974839
CO_2	1.415	2.144	1.72	4.327	1.187	0.765	3.351	1.287	1.071	1.373	1.864	1.069919221

APÊNDICE E - Para melhor ilustração dos resultados obtidos, para cada parâmetro estudado, foram construídos gráficos de boxplot. Estes representam algumas medidas resumo de um conjunto de dados, tais como: média, mediana, valor mínimo, valor máximo, bem como eventuais valores extremos (*outliers)*, e representados por um asterisco (*)

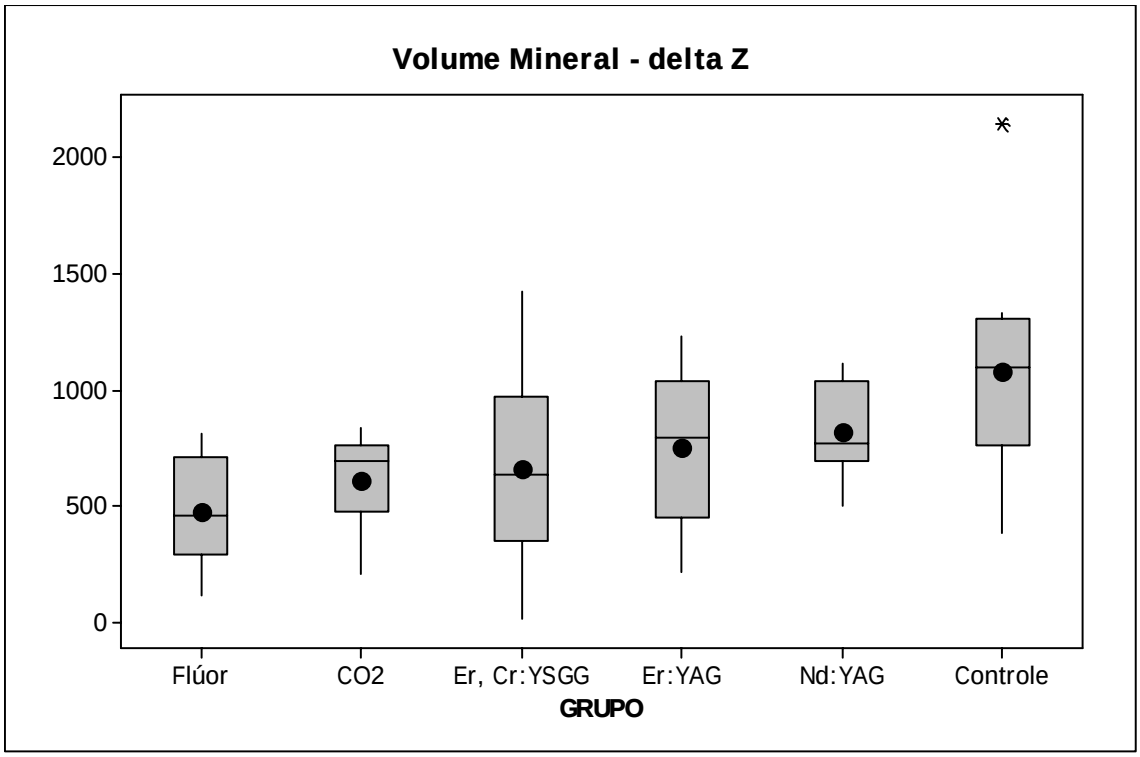


Figura E1 - Gráfico de Boxplot: Área de perda mineral – ΔZ

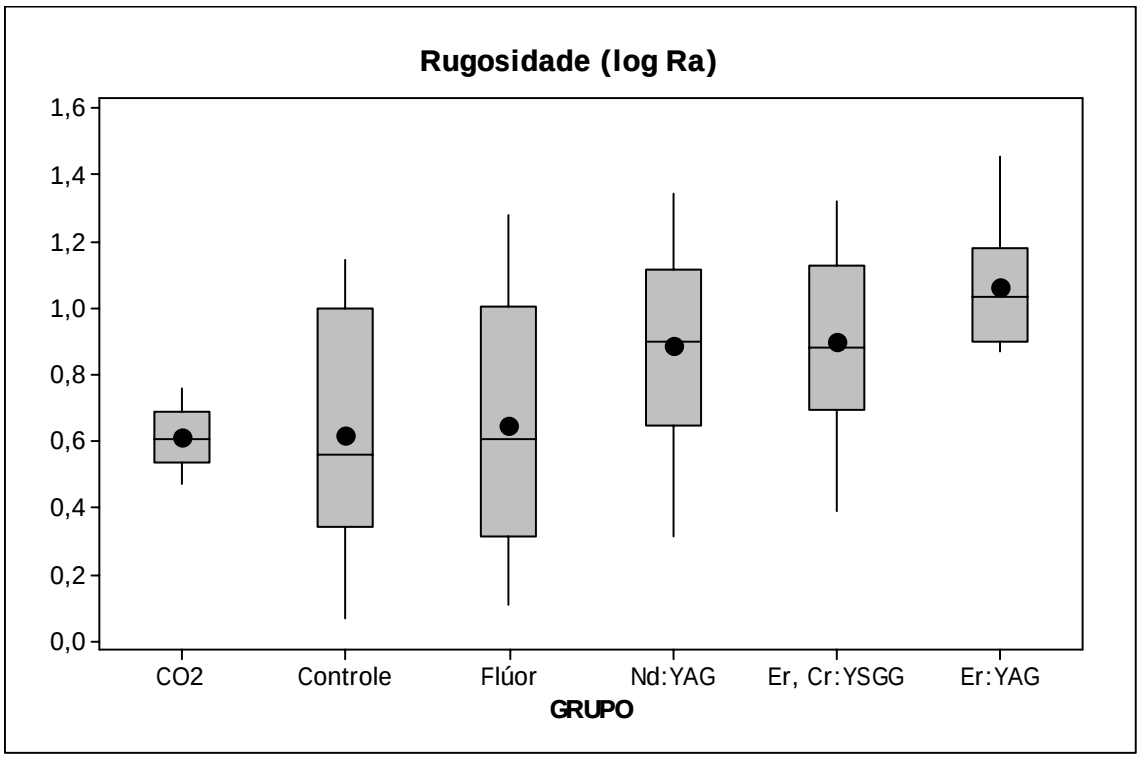


Figura E2 - Gráfico de Boxplot: Rugosidade média Ra

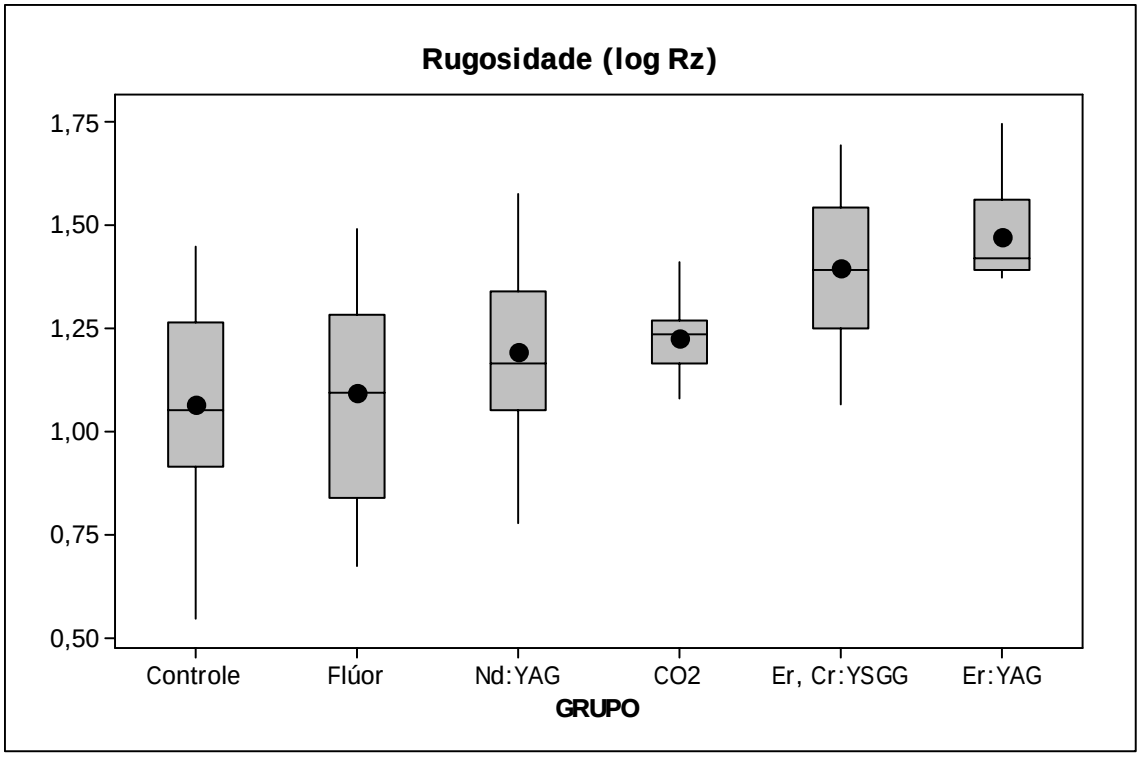


Figura E3 - Gráfico de Boxplot: Rugosidade média Rz

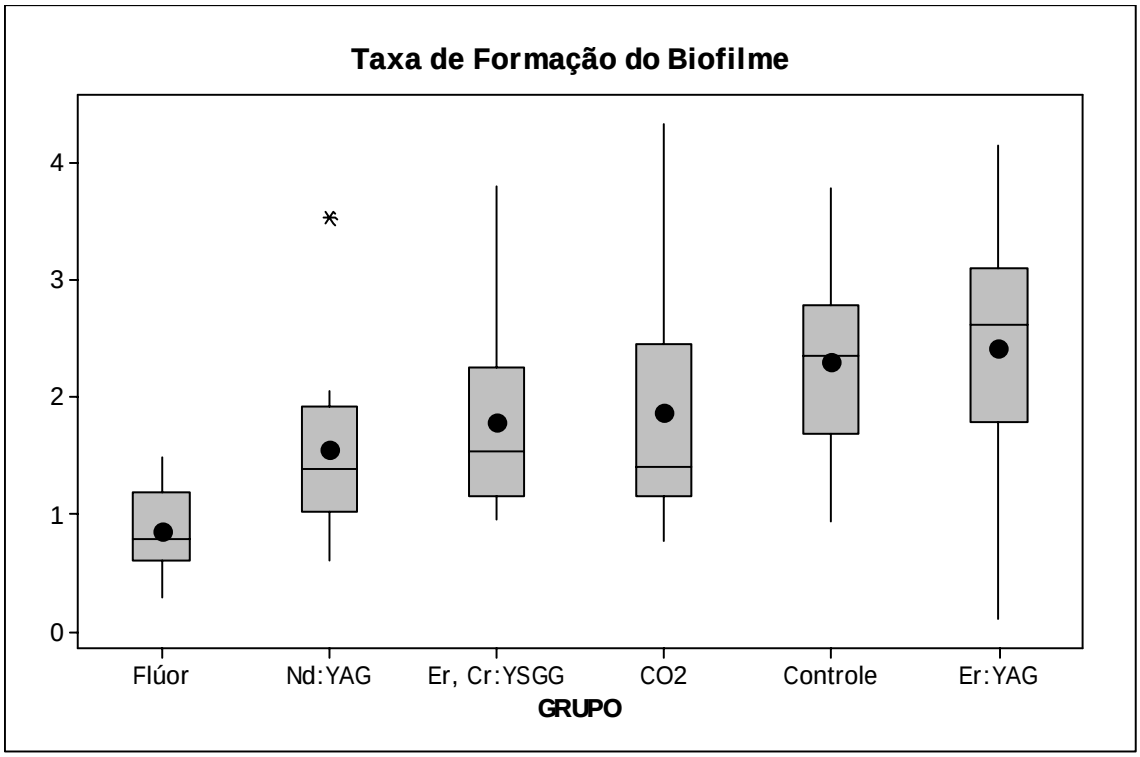


Figura E4 - Gráfico de Boxplot: taxa de formação do biofilme

APÊNDICE F - Correlação entre Taxa de formação de biofilme e Rugosidade: Gráficos de dispersão apresentados para melhor visualização dos resultados encontrados

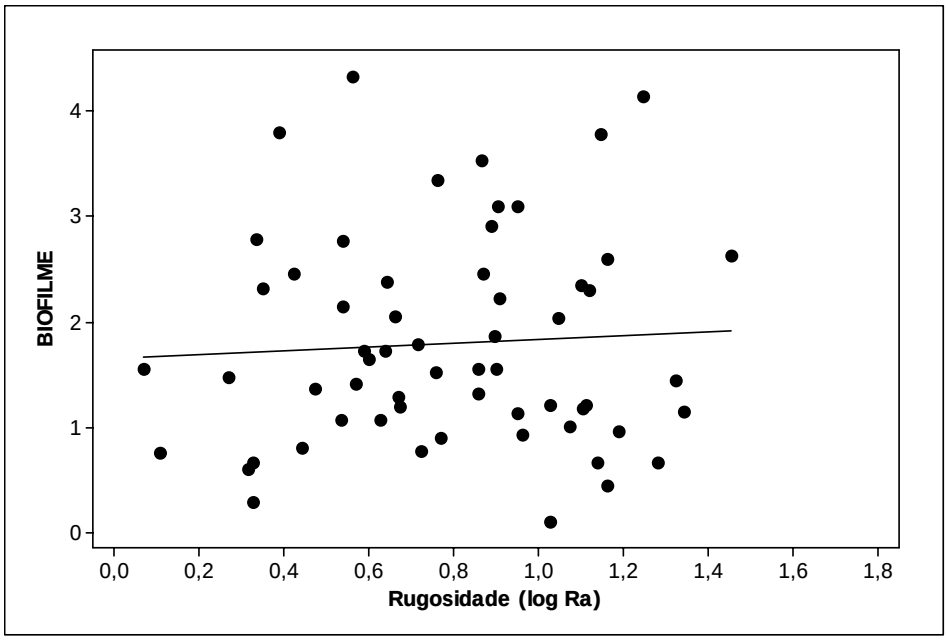


Figura F1 - Gráfico de dispersão: taxa de formação de biofilme versus rugosidade (log Ra), considerando toda a amostra de 60 corpos de prova

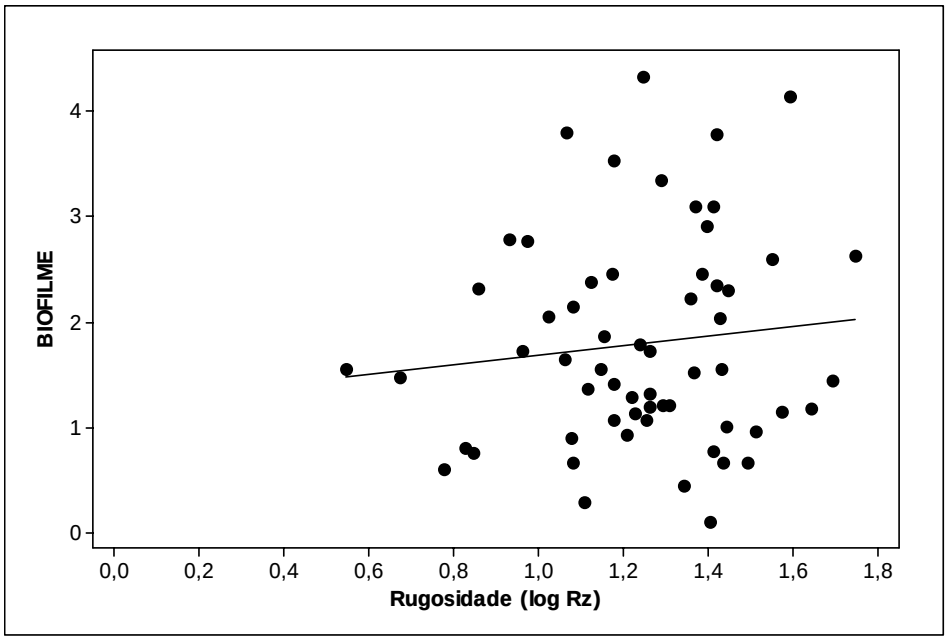


Figura F2 - Gráfico de dispersão: taxa de formação de biofilme versus rugosidade (log Rz), considerando toda a amostra de 60 corpos de prova

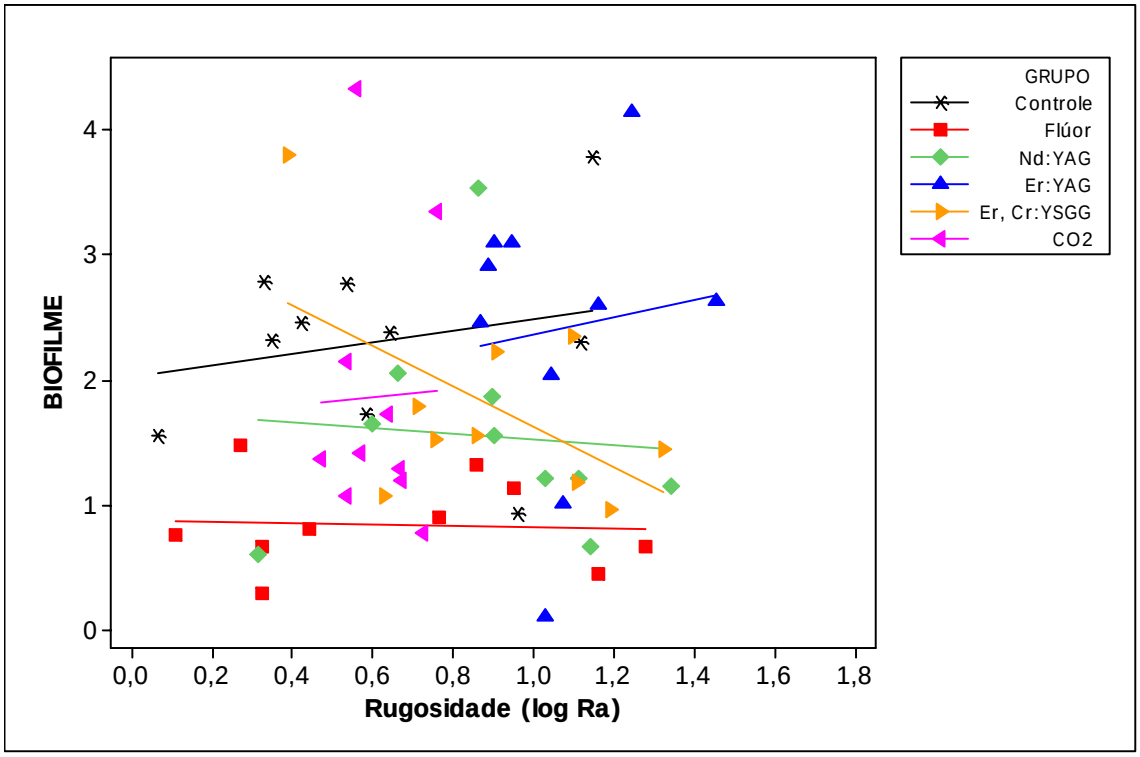


Figura F3 - Gráfico de dispersão: taxa de formação de biofilme versus rugosidade (log Ra) por grupos.

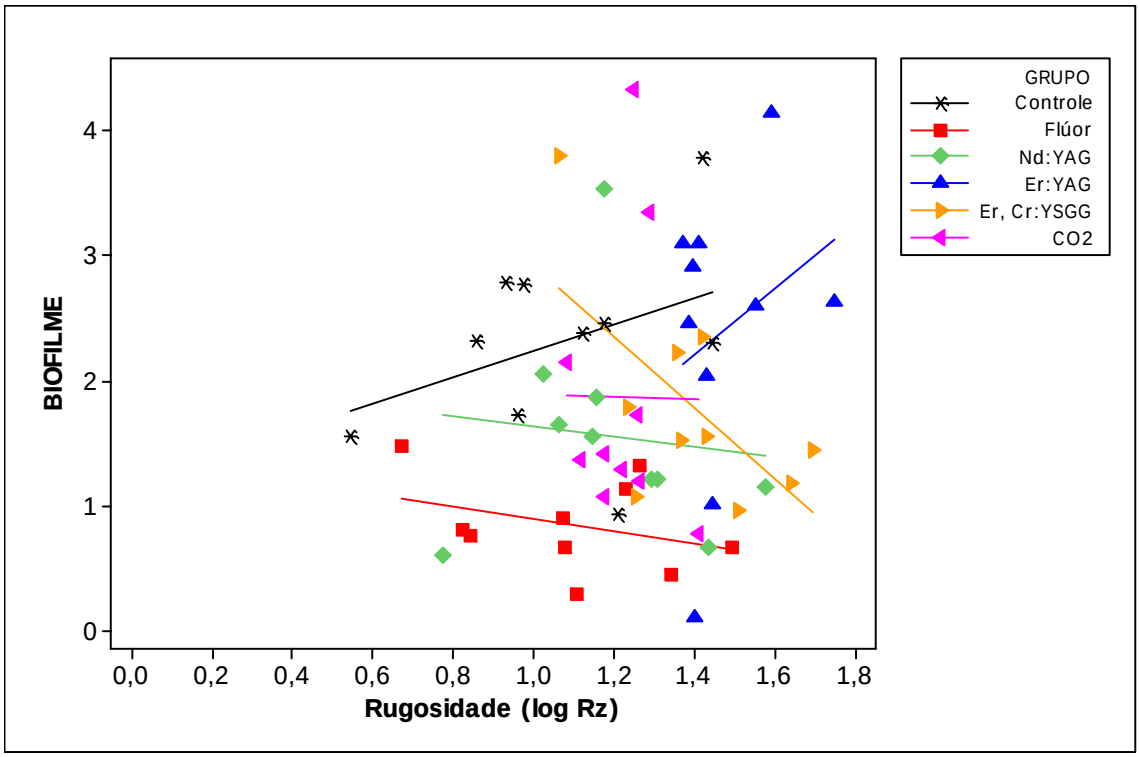
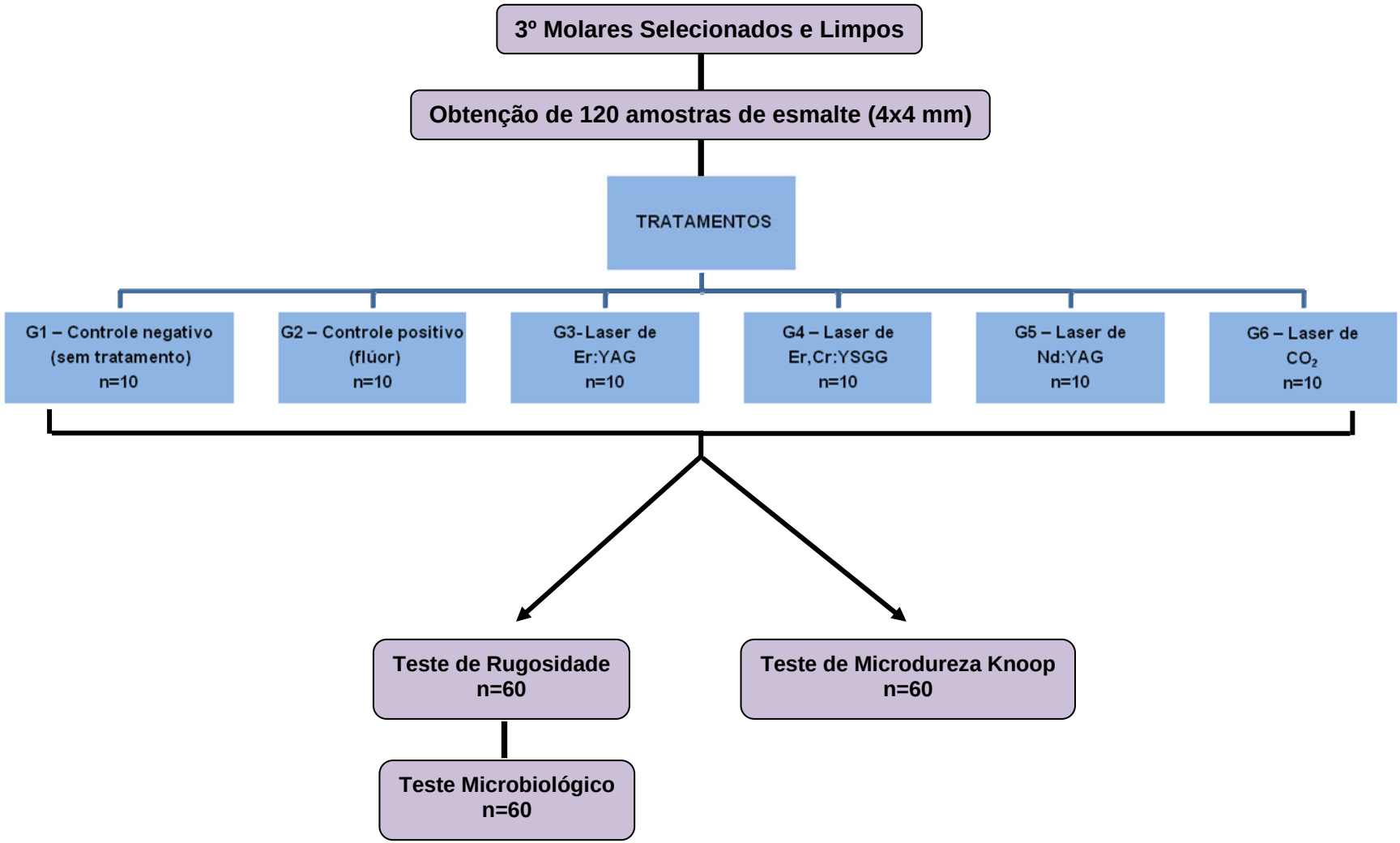


Figura F4 - Gráfico de dispersão: taxa de formação de biofilme versus rugosidade (log Rz) por grupos.

APÊNDICE G - DELINEAMENTO EXPERIMENTAL



ANEXO A - Parecer do Comitê de ética em Pesquisa

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

PARECER DE APROVAÇÃO
Protocolo 02/08

O grupo de trabalho indicado pelo Comitê de Ética em Pesquisa APROVOU Ad referendum o protocolo de pesquisa: **"ADERÊNCIA BACTERIANA À SUPERFÍCIE DE ESMALTE DENTAL IRRADIADO POR LASERS COM PARÂMETROS PARA PREVENÇÃO DE CÁRIE"**, de responsabilidade da Pesquisadora: **DEBORA SOARES GERALDO,** sob orientação da Professora Doutora **PATRICIA MOREIRA DE FREITAS.**

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, 25 de fevereiro de 2008

Prof. Dr. João Gualberto de Cerqueira Luz
Coordenador do CEP-FOUSP

Av. Prof Lineu Prestes, 2227 – Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira" CEP 05508-000
São Paulo – SP - Diretoria Telefax: (011)3091-0062/3091-7817/3091-7860 - Compras (011) 3091-7825