MARIA CECÍLIA PEREIRA CERSOSIMO

**Análise *in vitro* da morfologia e da resistência de união da resina
composta à dentina erodida e irradiada com laser de Er:YAG com
largura de pulso super curta**

São Paulo

2015

MARIA CECÍLIA PEREIRA CERSOSIMO

Análise *in vitro* da morfologia e da resistência de união da resina composta à dentina erodida e irradiada com laser de Er:YAG com largura de pulso super curta

Versão Original

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

Área de Concentração: Dentística

Orientador: Professora Dra. Patrícia
Moreira de Freitas Costa e Silva

São Paulo

2015

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

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

Cersosimo, Maria Cecília Pereira.

Análise *in vitro* da morfologia e da resistência de união da resina composta à dentina erodida e irradiada com laser de Er:YAG com largura de pulso super curta / Maria Cecília Pereira Cersosimo ; orientador Patrícia Moreira de Freitas Costa e Silva. -- São Paulo, 2015.

74 p. : fig., tab., graf.; 30 cm.

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

Versão original

1. Laser. 2. Dentina. 3. Erosão de dente. 4. Resistência de União (Odontologia).
I. Silva, Patrícia Moreira de Freitas Costa e. II. Título.

Cersosimo MCP. Análise *in vitro* da morfologia e da resistência de união da resina composta à dentina erodida e irradiada com laser de Er:YAG com largura de pulso super curta. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em: / / 2016

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição _____ Julgamento _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição _____ Julgamento _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição _____ Julgamento _____

Aos meus pais, Peppino e Maria da Conceição, que me deram a melhor das heranças, o estudo. Vocês são meus exemplos de trabalho, dedicação e amor, pela família e pela profissão. Não há amor maior nesse mundo do o que eu sinto por vocês e do que eu tenho recebido de vocês todos os dias. Vocês são meu porto seguro e a estrela guia de meus caminhos. Nossa união ultrapassa vidas e ao lado de vocês estarei sempre.

Ao meu irmão Pietro, companheiro de todas as horas e amigo de toda a vida. Sem seu apoio, seu carinho e sua ajuda, esta conquista teria sido muito penosa. Obrigada por ser esse grande irmão e amigo.

Aos meus avós, Giovanni, Tereza, José e Esperança, que tiveram a árdua e sábia decisão de migrarem para um outro continente, para que seus filhos e netos tivessem mais oportunidades na vida e não passassem pelas dificuldades que vocês passaram. Que Deus os proteja e ilumine, onde quer que estejam.

Aos meus primos, Ricardo e Ana Lúcia, por serem os maiores e melhores amigos e parceiros em todas as horas e momentos. Vocês fazem a diferença na minha vida.

A Deus e ao meu Anjo da Guarda, que sempre me guiam e protegem nos caminhos da vida. Obrigada por ela e que eu faça jus a esse presente divino.

A vocês, meus amados, dedico este humilde trabalho.

AGRADECIMENTOS

À Professora Patrícia Moreira de Freitas, pela imensa paciência e confiança que teve em mim. Não tenho palavras para expressar a gratidão que tenho. A FO-USP precisa de mais professores competentes e amorosos como você. São profissionais assim que fazem a diferença na vida de milhares estudantes, futuros profissionais. Que Deus te retribua toda essa dedicação e esforço que você tem em tudo o que faz.

Às Professoras Dras. Luciana Francisconi-dos-Rios e Taís Scaramucci, sempre tão atenciosas e amorosas, nunca negaram ajuda todas as vezes que necessitei e sempre se demonstraram muito dispostas. Foi Deus quem colocou vocês duas no Departamento de Dentística. Muito obrigada!

À Professora Dra Adriana Bona Matos, por toda assistência e preocupação que dedicou a este trabalho. Sem sua ajuda este feito nunca existiria.

À Professora Dra. Maria Ângela P. Sobral, agradeço por toda a atenção e auxílio nestes dois anos de mestrado.

À Roberta Couto, parceira indispensável para a finalização deste trabalho.

À Professora Dra. Karen M. Ramalho, muito obrigada pela atenção e auxílio neste projeto.

À Professora Dra. Márcia M. Marques, pois os bons professores são aqueles que não nos deixam esquecer nossas responsabilidades e alunos como eu precisam ser lembrados disso, algumas horas.

Às minha amigas, Camila Vieira, Gabriela Abe, Ana Clara Pedroni, Daniele Ferreira, Taís Mantilla, Beatriz Togoro, Bruna Hadad e Thayanne Ramos-Oliveira e ao meu colega Christian Bernal. Somos mais que amigos, somos uma equipe de sucesso que se ajuda mutuamente. Vocês são pessoas que guardarei a sete chaves em meu coração e que levarei na memória para o resto da minha vida. Tenho uma gratidão sem tamanho por cada uma de vocês. Dizem que a pior dívida é a gratidão, pois nunca conseguimos pagá-la. Então, eu estou eternamente em dívida com vocês. No que eu puder estarei sempre à disposição para ajudá-los.

Aos técnicos e secretários do Departamento de Dentística. Obrigada por toda a colaboração.

À Universidade de São Paulo, em nome do magnífico reitor Marco Antonio Zago.

À Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP), em nome do diretor Waldyr Antonio Jorge.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior (CAPES), pelo auxílio de bolsa e recursos necessários para a viabilização deste estudo.

A todos meus amigos da “Maurolândia” pelos momentos divertidos que passamos e pelo acolhimento que me deram.

A todos os meus colegas da pós-graduação e os de graduação que continuaram na pós. Vocês tornaram essa caminhada mais leve e prazerosa.

A minhas mais que colegas, minhas parceiras, Karla Comar, Camila Santana, Erica Gonçalves, Renata Boro, Arianne Fantin e a Jô Fantin, sem o apoio a colaboração e acima de tudo a compreensão que vocês tiveram comigo desde o início eu JAMAIS teria chegado aqui. Obrigada, obrigada e obrigada!

Ao meu sempre Professor Dr. Hélio Tsukamoto, por ter me ensinado mais que ortodontia, ter me ensinado humildade e paciência, ao aprender e ao ensinar. Gratidão!

Aos alunos da graduação, pelo carinho, descontrações e colaborações que me proporcionaram nestes dois anos. Espero ter retribuído a altura com o pouco que podia ajudá-los.

Ao Brenno, meu amigo quase irmão, por sempre me ajudar mesmo com um simples abraço, e por ter consertado o computador da mesa transladora. Sem essa ajuda nem o meu trabalho e nem o de outras colegas teria se realizado. Te amo!

“Cem vezes todos os dias lembro a mim mesmo que minha vida interior e exterior, depende dos trabalhos de outros homens, vivos ou mortos, e que devo esforçar-me a fim de devolver na mesma medida que recebi.”

Albert Einstein

RESUMO

Cersosimo MCP. Análise *in vitro* da morfologia e da resistência de união da resina composta à dentina erodida e irradiada com laser de Er:YAG com largura de pulso super curta [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2016. Versão Original.

Lesões dentais por erosão têm sido cada vez mais presentes na prática clínica. A restauração direta com resina composta é uma das opções de tratamento para lesões severas, em que há comprometimento estético/funcional. Com o aprimoramento da tecnologia, a utilização do laser para pré-tratamento da superfície dentinária, antes do condicionamento ácido, tem sido considerada como método alternativo para melhorar a adesão das resinas compostas às superfícies erodidas. Assim, o objetivo deste estudo *in vitro* foi avaliar a influência da irradiação com laser de Er:YAG (2,94 μm), de pulso super-curto, na adesão da resina composta à superfície dentinária erodida. Quarenta e seis discos de dentina foram obtidos a partir de 46 dentes terceiros molares humanos. A dentina oclusal planificada de 40 molares humanos teve metade de sua face protegida com fita UPVC (dentina hígida), enquanto na outra metade foi produzida uma lesão de erosão através da ciclagem em ácido cítrico (0,05 M, pH 2,3, 10 minutos, 6x/dia) e solução supersaturada (pH 7,0, 60 minutos entre os ataques ácidos). Metade das amostras foi irradiada com o laser de Er:YAG (50 μs , 2 Hz, 80 mJ, 12,6 J/cm²) e a outra não (grupo controle). Em cada grupo de tratamento (laser ou controle) (n=10), um sistema adesivo autocondicionante foi utilizado e, então, confeccionados 2 cilindros de resina composta, tanto do lado erodido como no hígido (total de 4 cilindros), os quais foram submetidos à avaliação da Resistência de União através do ensaio de microcisalhamento (1 mm/min), após armazenamento em saliva artificial por 24 h. A análise do padrão de fratura foi realizada em microscópio óptico (40x). Por meio da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), a morfologia das superfícies dentinárias hígida e submetida ao desafio erosivo, antes e após o tratamento com laser de Er:YAG (n=3), foi avaliada. Os valores obtidos de resistência de união (MPa) foram submetidos ao teste ANOVA e de comparações múltiplas de Tukey (p<0,05) e as análises das eletromicrografias foram feitas de forma descritiva. A análise

morfológica da superfície mostrou alterações significativas na dentina hígida irradiada e na submetida à ciclagem erosiva, irradiada ou não. Quanto à resistência de união, houve diferença entre os 4 substratos analisados, sendo: dentina hígida irradiada ($12,77 \pm 5,09$ A), dentina hígida não irradiada ($9,76 \pm 3,39$ B), dentina erodida irradiada ($7,62 \pm 3,39$ C) e dentina erodida não irradiada ($5,12 \pm 1,72$ D). Houve predominância de padrão de fratura do tipo adesiva. Com base nos resultados e nos parâmetros de irradiação utilizados neste estudo, pode-se concluir que a erosão reduz a adesão em dentina e que o tratamento da superfície dentinária com laser de Er:YAG de largura de pulso super curta aumenta a adesão no substrato erodido ou hígido.

Palavras chave: Laser de Pulso Super Curto. Dentina Humana. Erosão. Resistência de União .

ABSTRACT

Cersosimo MCP. In vitro analysis of morphology and bond strength of composite resin to dentin eroded and irradiated with a super short pulse Er:YAG laser [dissertation]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2016. Versão Original.

Dental erosion injuries have been increasingly present in clinical practice. Direct restoration with composite resin is one of the treatment options for severe injuries, where there is aesthetic/functional impairment. With the improvement of technology, laser-irradiation for pre-treatment of dentin before surface etching has been considered as an alternative method to improve the adhesion of composite resins to eroded surfaces. The objective of this *in vitro* study was to evaluate the influence of the irradiation with a super-short pulse Er:YAG (2.94 μm) laser to the adhesion of composite resin to eroded dentin surface. Forty six dentin discs were obtained from 46 third molars. Forty samples of planned occlusal dentine, obtained from human molars, had half of their surface protected with plastic tape (sound dentin), while the other half was submitted to erosive cycles, consisted on immersion on citric acid (0.05 M, pH 2.3, 10 minutes, 6x/day) and supersaturated solution (pH 7.0, 60 minutes of acid attacks). Half of the samples was irradiated with the Er:YAG laser (50 μs , 2 Hz, 80 mJ, 12.6 J/cm²) and the other was kept as control. In each treatment group (n = 10), a self-etching adhesive system was used and then two cylinders of composite resin were prepared, on both eroded and sound dentin (total of 4 cylinders). Microshear bond strength test was performed (1 mm/min), after 24 hours storage in artificial saliva. The analysis of the fracture pattern was determined by optical microscopy (40x). The morphology of sound and eroded dentin, before and after treatment with the Er:YAG laser (n = 3) was evaluated under Scanning Electron Microscopy (SEM). Bond strength values (MPa) were subjected to ANOVA and Tukey multiple comparisons test (p<0.05). The analyses of electron micrographs were made descriptively. Morphological analysis of the surface showed significant changes in irradiated and sound dentin subjected to erosive cycling. As for the bond strength, there were differences among the groups, as follows: sound dentin submitted to irradiation (12.77 $\pm$ 5.09 A), non-irradiated sound dentin (9.76 $\pm$ 3.39 B),

eroded dentin submitted to irradiation (7.62 ± 3.39 C) and non-irradiated eroded dentin (5.12 ± 1.72 D). There was a predominance for the adhesive mode of failure. It was concluded that the erosion reduces the adhesion to dentin and that treating the dentin surface with a super-short-pulse Er:YAG laser increases adhesion to both eroded or sound dentin.

Keywords: Super Short Pulse Laser. Human Dentin. Erosion. Bond Strength.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CaCl ₂	cloreto de cálcio
NaCl	cloreto de sódio
KH ₂ PO ₄	dihidrogenofosfato de potássio
Er:YAG	Érbio: Ítrio, Alumina, Granada
Er,Cr:YSGG	Érbio-Cromo: Ítrio-Escândio-Gálio-Granada
FOUSP	Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo
Hz	hertz
J/cm ²	joule(s) por centímetro quadrado
Laser	Acrônimo de <i>Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation</i> (Amplificação de Luz por Emissão Estimulada de Radiação)
LELO	Laboratório Especial de Laser em Odontologia
MPa	megapascal
MEV	Microscópio Eletrônico de Varredura
µm	micrometro(s)
µs	microsegundo(s)
mA	miliampere(s)
mJ	milijoule(s)
mL	mililitro(s)
mL/min	mililitro(s) por minuto
mL/s	mililitro(s) por segundo
mm	milímetro(s)
mm/min	milímetro(s) por minuto
mm ²	milímetro(s) quadrado
mmol/L	milimol por litro
mW/cm ²	miliwatt(s) por centímetro quadrado
M	molar
nm	nanometro(s)
N	newton(s)
PVC	policloreto de vinilo
pH	potencial hidrogeniônico

rpm	rotação por minuto
SSP	<i>super short pulse</i> (pulso super curto)
UPVC	<i>unplasticised poli vinyl chloride</i> (policloreto de vinil não plastificado)
W	watt(s)

LISTA DE SÍMBOLOS

$\approx$	aproximadamente
$^{\circ}\text{C}$	grau(s) Celsius
λ	lambda (comprimento de onda)
%	porcentagem

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	22
2.1 Considerações sobre erosão dental.....	23
2.2 Influência do substrato dentinário desmineralizado na qualidade adesiva.....	24
2.3 Efeitos do laser de Er:YAG sobre o substrato dentinário.....	26
3 PROPOSIÇÃO.....	31
4 HIPÓTESE NULA.....	32
5 MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
5.1 Testes Preliminares.....	34
5.2 Aspectos Éticos.....	35
5.3 Delineamento Experimental.....	35
5.4 Obtenção dos discos de dentina.....	36
5.5 Obtenção do Substrato Erodido.....	38
5.6 Tratamento de superfície com laser.....	39
5.7 Análise em Microscopia Eletrônica de Varredura.....	40
5.8 Análise da Resistência de União.....	41
5.9 Análise dos Resultados.....	46
6 RESULTADOS.....	47
6.1 Análise da morfologia de superfície da dentina em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	48
6.1.1 Dentina Hígida.....	48
6.1.1.1 não irradiada.....	48
6.1.1.2 irradiada.....	48
6.1.2 Dentina Erodida.....	49
6.1.2.1 não irradiada.....	49
6.1.2.2 irradiada.....	49
6.2 Análise da resistência de união por meio de ensaio de microcissalhamento.....	51
6.3 Análise do padrão de fratura.....	52
7 DISCUSSÃO.....	54
8 CONCLUSÃO.....	59

REFERÊNCIAS.....	62
APÊNDICE.....	72
ANEXOS.....	74

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

A erosão dental é um processo químico, caracterizado pela dissolução dos tecidos duros dentais, decorrente da exposição a uma variedade de ácidos de origem não-bacteriana (Lussi et al., 2011). É uma patologia comumente associada a fatores intrínsecos, como vômitos recorrentes ou regurgitações decorrentes de desordens alimentares (anorexia e/ou bulimia) ou de doença do refluxo gastroesofágico, respectivamente. Também pode estar associada a fatores extrínsecos, os quais estão diretamente relacionados a uma dieta ácida ou a condições inerentes à profissão (Zero, 1996; ten Cate; Imfeld, 1996). Sua etiologia é complexa e multifatorial, envolvendo fatores químicos, biológicos e comportamentais (Lussi et al., 2006)

Essa desordem da estrutura dentária tem sido uma das grandes preocupações dos cirurgiões dentistas na atualidade, pois sua prevalência tem aumentado significativamente na população, mesmo entre crianças e jovens, juntamente com o crescimento dos índices de indivíduos com distúrbios alimentares, refluxo gastroesofágicos, e do consumo de alimentos industrializados (Zero, 1996; Cavalcanti et al., 2010; Salas et al., 2015).

Os fatores que geram a erosão dentária podem ser múltiplos e, após o seu diagnóstico, medidas devem ser tomadas para evitar sua progressão ou mesmo para tentar restabelecer função/estética e reduzir a hipersensibilidade dos dentes comprometidos (Carvalho et al., 2015). Nesse intuito, muitas vezes lança-se mão de técnica restauradora direta sobre as superfícies afetadas, que podem ser realizadas sobre esmalte ou, em casos mais avançados, sobre dentina, seguindo o conceito da Odontologia Minimamente Invasiva por ser um procedimento mais conservador (Carvalho et al., 2015; Attin; Wegehaupt, 2014).

Todavia, a dentina erodida é um substrato que apresenta pouca resistência adesiva. A dissolução dos cristais de hidroxiapatita pelo processo erosivo causa a exposição de longas fibrilas colágenas e aumento do diâmetro interno dos túbulos dentinários (Lussi et al., 2011). Essa rede de fibrilas é bem resistente a impactos mecânicos, como a escovação (Ganss et al., 2007), e dificulta a permeabilidade dos sistemas adesivos e formação da camada híbrida. Consequentemente, para promover uma melhor resistência adesiva faz-se necessário um preparo dessa

superfície antes da utilização dos sistemas adesivos (Zimmerli et al., 2012; Attin; Wegehaupt, 2014) de forma a remover seletivamente a porção desmineralizada da dentina.

Dentro do mesmo conceito, os lasers de alta potência se demonstram vantajosos quanto ao preparo conservador dentário (Aoki et al., 1998; Ramos et al., 2014; Ramos et al., 2015). A interação entre o laser e o tecido depende das características da radiação incidente, das propriedades ópticas do laser, e do coeficiente de absorção e composição do tecido irradiado (Hibst et al., 1989; Ramos et al., 2015).

Como o comprimento de onda do laser de Er:YAG ($\lambda = 2.94 \mu\text{m}$) coincide com a banda de absorção da água e da hidroxiapatita, parâmetros específicos podem remover tecido duro dental (processo de ablação) de forma conservadora e promover a remoção seletiva de dentina cariada, redução microbiana e pré-tratamento da superfície dentária (Esteves-Oliveira et al., 2007; Ramos et al., 2014; Ramos et al., 2015).

Estudos avaliando a ação dos lasers na dentina por meio de análises em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) mostram uma dentina irregular, sem a presença de *smear layer*, com túbulos dentinários abertos, dentina peritubular proeminente, com um padrão morfológico microrretentivo favorável aos procedimentos adesivos (Aranha et al., 2007; Esteve-Oliveira et al., 2007; Trevelin et al., 2015). No entanto, outros relatam que, dependendo da densidade de energia utilizada, os efeitos termomecânicos do laser podem ocasionar o aquecimento da dentina subsuperficial, levando à formação de uma superfície ácido-resistente com estruturas granulares que prejudicariam a infiltração do sistema adesivo, a formação da camada híbrida e, conseqüentemente, a resistência adesiva (Moretto et al., 2011; Aranha et al., 2007).

A maioria das pesquisas com lasers de Er:YAG utilizam equipamentos com largura de pulso fixa na faixa entre 100 μs e 350 μs . Porém, já existem equipamentos de uso odontológico com tecnologia que permite variar a largura de pulso e com isso utilizar pulsos de menor duração que causam menor, ou nenhum, dano térmico à superfície dentária (Baraba et al., 2012). Além disso, pulsos mais curtos apresentam um potencial ablativo e uma precisão de área maior, pois toda a energia do pulso é utilizada para a ablação, enquanto em pulsos longos parte dela é

perdida na forma de calor que se dissipa sobre a superfície, atingindo pequenas áreas ao redor do ponto de interesse (Lukac et al., 2012).

Apesar de já existirem estudos com a utilização do laser de Er:YAG em dentina, previamente ao procedimento restaurador (Ceballo et al., 2002; Manhães et al., 2005; Esteves-Oliveira et al., 2008; Moretto et al., 2011; Ramos et al., 2015; Baraba et al., 2013), até então pouco se sabe sobre sua ação em dentina erodida (Ramos et al., 2015). Até o momento, ainda não há nenhum estudo que avalie os efeitos do laser de Er:YAG emitido em pulsos super curtos sobre a adesão em dentina erodida.

Diante do exposto, é de grande relevância clínica e científica avaliar os efeitos da irradiação com laser de Er:YAG com pulso super curto na morfologia da dentina hígida ou erodida, e na resistência de união à resina composta quando utilizado um sistema adesivo autocondicionante.

2 Revisão da Literatura

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Considerações sobre erosão dental

A erosão dental é uma patologia multifatorial em que ocorre a perda do tecido dentário por dissolução da sua porção mineral por ácidos de origem não bacteriana (Lussi et al., 2011). Estudos indicam que a prevalência dessa doença tem aumentado significativamente nas ultimas décadas, impulsionada pelo crescimento no consumo de bebidas industrializadas e de distúrbios como refluxo gastroesofágico e bulimia (Needleman et al., 2013; Carvalho et al., 2015).

O processo de erosão inicia-se com um amolecimento superficial do esmalte, seguindo uma contínua dissolução camada-a-camada dos cristais de hidroxiapatita (Lussi et al., 2011). O aumento da desmineralização leva ao aumento da rugosidade de superfície (Nekrashevych; Stösser, 2003) e à diminuição da microdureza do substrato dental, deixando-o mais susceptível à ação de forças. Se o desafio erosivo persistir, pode ocorrer a exposição da camada de dentina, como mostra a figura 2.1(Schlueter et al., 2012).

Fonte: Schlueter (2012, p. 69)

Figura 2.1- Diferentes estágios no processo erosivo. (esq.) Amolecimento do esmalte (não há perda visível de substrato). (meio) Perda de Substrato e amolecimento da superfície subsequente. (dir.) Perda de estrutura atingindo a dentina

Ao atingir o nível dentinário, a perda mineral inicia-se pela dentina peritubular, ocasionando o aumento da luz dos túbulos dentinários; em seguida, acomete a região intertubular, expondo uma densa e fibrosa camada de fibras colágenas que tende a aumentar conforme o aumento do tempo de exposição aos ácidos. Logo abaixo encontra-se uma camada de dentina parcialmente desmineralizada e, abaixo desta, uma camada de dentina hígida (Lussi et al., 2011). Quando a camada de matriz orgânica desmineralizada atinge uma determinada espessura, a perda mineral cai. Isso se dá, em parte, devido à propriedade tampão do colágeno que fica exposto (Ganss et al., 2009).

Essa camada de matriz orgânica é bem resistente a forças mecânicas, mantendo não apenas a cobertura, mas também sua estrutura frente a cargas de até 4 N durante a escovação, além de limitar as trocas iônicas entre a camada mineralizada e o meio externo (Ganss et al., 2007; Ganss et al., 2009). No entanto, essa camada pode ser degradada por enzimas proteolíticas como as metaloproteinases da matriz (MMPs) presentes na dentina e na saliva (Buzalaf et al., 2012). Caso essa camada de fibras colágenas seja removida, o processo erosivo terá continuidade na camada mineralizada presente imediatamente abaixo dessa (Ganss et al., 2007).

Pacientes que chegam a esse estágio de perda de estrutura dental, em dentina, podem apresentar sensibilidade dentária, prejuízos estéticos, perda da dimensão vertical e dificuldade em mastigar os alimentos (Johansson et al., 2008). Em vista de reabilitá-los esteticamente e funcionalmente, seguindo o conceito da odontologia minimamente invasiva, muitos profissionais utilizam restaurações diretas em resina composta nas áreas comprometidas.

2.2 Influência do substrato dentinário desmineralizado na qualidade adesiva

A adesão sobre a superfície dentinária é tema de muitos estudos devido à complexidade morfológica desse tecido e por serem críticos os passos clínicos que geram uma boa resistência adesiva ao seu substrato (Pashley; Carvalho, 1997). O mecanismo fundamental de adesão à dentina baseia-se na retenção micromecânica do agente adesivo através da infiltração de seus monômeros resinosos pelos túbulos

e canalículos dentinários que, polimerizados, ficam micromecanicamente retidos nas porosidades e na trama colágena, formando a camada híbrida (Pashley, 1991; Perdigão, 2010).

Para que ocorra essa infiltração é necessário, antes de tudo, que se remova a camada de esfregaço (*smear layer*), formada pelos instrumentos rotatórios no preparo cavitário, de modo a desobstruir os túbulos dentinários que ficam obliterados por essa camada amorfa, constituída de debris orgânicos e inorgânicos (Pashley; Carvalho, 1997). Tradicionalmente, essa remoção é feita com o condicionamento ácido da superfície, mas também existem métodos alternativos a esse, como o preparo cavitário cinético com partículas de óxido de alumínio ou irradiação com lasers de alta potência (Tagami et al., 1991; Van Meerbeek et al., 2006; Lopes et al., 2015).

Dos sistemas adesivos presentes no mercado os mais utilizados são o de condicionamento prévio (também chamado de *total-etching* ou *etch-and-rise*) e os adesivos autocondicionantes (ou *self-etching*). O primeiro sistema consiste na aplicação do ácido fosfórico a 37% sobre esmalte e dentina. Na dentina, ocorre a remoção do *smear layer*, aumentando a permeabilidade dentinária e expondo as fibras colágenas, tornando-a mais receptiva à retenção micromecânica. Antes da aplicação do primer hidrofílico e do adesivo hidrofóbico, é necessário a lavagem da superfície para remoção do ácido e secagem criteriosa com jato de ar, de forma a evitar o ressecamento excessivo da dentina e, conseqüentemente, levar ao colabamento das fibras colágenas (Pashley; Carvalho, 1997; Perdigão, 2010).

Nos sistemas adesivos do tipo autocondicionantes, o primer possui ácidos fracos com capacidade para dissolver o *smear layer* e desmineralizar a camada subjacente da dentina, permitindo a infiltração do mesmo. Nesse caso, o *smear layer* não é removido, mas fica incorporado à interface adesiva, pois esse sistema dispensa a lavagem dos ácidos e a secagem da superfície, o que reduz a sensibilidade da técnica por prevenir o possível colabamento das fibras de colágeno durante a secagem da superfície e as conseqüentes falhas na adesão da restauração (Cardoso et al., 2011; Giannini et al., 2015).

Van Meerbeek et al. (2003) concluíram que o modo de preparo da superfície dental antes dos procedimentos adesivos influenciam significativamente na efetividade dos sistemas de condicionamento prévio e autocondicionantes. Em seu trabalho, o laser de Er:YAG (80 mJ, 10 Hz, 250 μ s), por exemplo, foi o tratamento

que mostrou os menores valores de resistência adesiva à microtração com o adesivo Clearfil SE Bond.

Zimmerli et al. (2012) estudaram a influência de diferentes tratamentos de superfície (pedra-pomes, abrasão a ar, polimento com ponta de silicone e com Proxoshape e ponta diamantada em alta rotação) na longevidade da união de um adesivo de condicionamento prévio de três passos (OptiBond FL) e de um autocondicionante de dois passos (Clearfil SE) em dentina erodida. Nesse estudo foi observado que o tratamento da superfície dentinária erodida influencia na efetividade de união dos dois sistemas adesivos. A erosão reduziu a resistência de união em todos os grupos, sendo maior em dentina preparada com ponta diamantada. O adesivo autocondicionante (Clearfil SE) apresentou desempenho melhor que o de condicionamento prévio (OptiBond FL) sobre a superfície erodida. Da mesma forma, Attin e Wegehaupt (2014) concluíram em sua revisão bibliográfica que a superfície dentinária erodida necessita de tratamento mecânico prévio ao tratamento restaurador para promover melhora da adesividade a esse substrato, e que ainda são necessários mais estudos nessa área.

A dentina erodida apresenta uma menor resistência adesiva comparada à dentina hígida. Isso pode ser atribuído ao colapso das fibras colágenas desmineralizadas e ao alto conteúdo de água dessa camada, que inibem o adesivo não só de se infiltrar adequadamente na dentina, como talvez também de ser polimerizado por completo (Lussi et al., 2011; Zimmerli et al., 2012). A formação ineficiente da camada híbrida aumenta a infiltração marginal das restaurações e acelera a degradação da interface adesiva (Sano et al., 1995) reduzindo a longevidade e a qualidade o tratamento restaurador.

2.3 Efeitos do laser de Er:YAG sobre o substrato dentinário

A eficiência da ação do laser sobre um substrato depende, basicamente, da absorção do comprimento de onda do laser pelo substrato (Eduardo et al., 2010). A interação entre o laser e o tecido está relacionada com as características da irradiação incidente, com as propriedades ópticas do laser, e com o coeficiente de absorção das substâncias e estruturas que compõem o tecido irradiado. A

quantidade de energia absorvida pelo tecido depende do coeficiente de absorção de cada molécula que compõe aquele tecido (Ramos, 2012).

Em 1989, Hibst e Keller demonstraram que a energia radiante do laser de Er:YAG é altamente absorvida pela água intrínseca (2,94 μm) e pelo grupo hidroxila (2,79 μm) da apatita dental. O comprimento de onda do laser de Er:YAG coincide exatamente com o pico de absorção da água (3 μm). No processo desta interação do comprimento de onda sobre o tecido duro, a energia é convertida em calor, levando à formação de vapor de água, que se expande e produz alta pressão no interior do tecido alvo e induz microexplosões com ejeção de partículas de tecidos em um processo chamado ablação termomecânica (Hibst: Keller, 1989; Keller: Hibst, 1989; Freitas et al., 2007).

Desta forma, os lasers de érbio são bastante indicados para a remoção seletiva de tecido duro dentário (esmalte e dentina), além de promover redução microbiana e pré-tratamento da superfície dental (Esteves-Oliveira et al., 2007; Esteves-Oliveira et al., 2008). Como o intuito final do preparo dessas superfícies é a restauração com resina composta, os estudos sobre a adesão em substratos irradiados são de suma importância. No entanto, devido às diferentes metodologias empregadas, os resultados das pesquisas são ainda bastante controversos.

Alguns estudos sugerem que a adesão da resina sobre a dentina tratada com laser de érbio é menor do que a não tratada (Corona; De Souza, 2007; Moretto et al., 2011). Isso porque a superfície dentinária modificada pelo laser de Er:YAG, em determinados parâmetros, pode apresentar microtrincas (o que torna a superfície mais frágil), assim como a presença de uma camada modificada termicamente, na qual fibrilas colágenas são parcial ou totalmente denaturadas com aspecto de “derretimento” (ou melting), comprometendo a penetração do adesivo. Segundo Ceballos et al. (2002), esta camada é constituída por:

- Uma parte superficial, que consiste em "uma superfície escamosa no interior do qual as fibrilas colágenas são completamente derretidas, e estas placas paralelas de materiais friáveis poderiam representar camadas porosas de minerais fundidos formados pelas microexplosões, o que formaria microfissuras que poderiam ser parcialmente infiltradas pelo adesivo".
- Uma parte basal, que contém o resto das fibrilas colágenas desnaturadas, fundidas e fracamente ligadas à dentina adjacente, com espaços interfibrilares reduzidos. De acordo com os autores, a presença desta camada

interfere com a profundidade de infiltração do adesivo, o que leva a uma fraca força de aderência.

Acredita-se que essas observações estão relacionadas aos danos térmicos residuais advindos da irradiação, pois o uso de lasers para preparo de tecidos duros gera calor sobre essas superfícies (Majaron et al., 1998). Vários fatores contribuem para o aumento da temperatura durante o tratamento com laser, incluindo a densidade de energia, duração do pulso, taxa de repetição, distância focal, tempo de irradiação e resfriamento com sistema ar-água. Porém, em determinados parâmetros, o laser de Er:YAG mostra ser efetivo na ablação da dentina, formando uma superfície com padrão morfológico microrretentivo, sem danos térmicos ou sinais de aquecimento ou derretimento (Freitas et al., 2007; Firat et al., 2012; Bahrami et al., 2011).

A literatura mostra que o tratamento da superfície dentinária com baixa densidade de energia permite uma diminuição nas microtrincas e rugosidades, tornando a superfície mais homogênea, além de apresentar um padrão morfológico favorável à adesão, com ausência de *smear layer*, túbulos dentinários abertos e dentina peritubular proeminente (Aranha et al., 2007; Delmé et al., 2006).

Ramos et al. (2015) estudaram a resistência de união de um sistema adesivo autocondicionante (Clearfil SE Bond) e um de condicionamento prévio (Single Bond) sobre as superfícies dentinárias previamente tratadas com ponta diamantada, laser de Er:YAG (2.94 μm , 60 mJ, 2 Hz, 0.12 W, 19.3 J/cm², 150–250 μs) e laser de Er,Cr:YSGG (2.78 μm , 50 mJ, 30 Hz, 1.5 W, 4.5 J/cm², 140 μs). O grupo controle, sem tratamento prévio, mostrou melhores resultados de resistência adesiva, sendo que o controle com Clearfil SE Bond obteve resultado superior a todos os demais grupos. Todos os grupos em que foi aplicado o adesivo Clearfil SE Bond obtiveram resistências superiores aos grupos com o adesivo Single Bond, exceto nos grupos irradiados com laser de Er,Cr:YSGG, em que não houve diferença entre os sistemas adesivos aplicados. Os autores concluíram que, apesar da resistência adesiva dos grupos tratados com laser ter sido menor que a dos grupos controle, a associação com sistema adesivo autocondicionante não reduziu significativamente a adesão em dentina.

Em outro trabalho, Ramos et al. (2014) também mostraram que o uso de laser Er:YAG para a ablação de dentina humana erodida não alterou os principais parâmetros de adesão quando em comparação com os obtidos por métodos

convencionais, reforçando, assim, o seu uso em tratamentos restauradores. Além disso, em 2012, Akin et al. concluíram, dentro das limitações do seu estudo, que a adesão à dentina irradiada com laser de Er:YAG é semelhante à tratada com ponta diamantada. Já na revisão bibliográfica de Lopes et al. (2015), os autores concluíram que a técnica de condicionamento ácido permanece obrigatória, mesmo após o pré-tratamento da superfície dental com laser de alta potência. Além disso, a microinfiltração, em geral, parece ser maior quando do preparo do substrato com o laser de Er:YAG, em comparação com substratos preparados convencionalmente. Os autores afirmam que não há padrão ouro para o preparo em esmalte e dentina, e para condicionar estas superfícies usando lasers Er:YAG e Er,Cr:YSGG. Apesar das desvantagens do uso dos lasers de érbio, os estudos clínicos devem ser realizados para observar o comportamento clínico de restaurações adesivas feitas com esses comprimentos de onda.

A largura do pulso da maioria dos equipamentos de laser de Er:YAG disponíveis no mercado são fixos no intervalo de 150 a 250 μ s (Nishimoto et al., 2008). Esse parâmetro é um fator muito importante a ser considerado durante a irradiação e está diretamente relacionado com a profundidade de ablação, os efeitos térmicos (Lukac et al., 2012; Staninec et al., 2006), e a morfologia do tecido ablacionado (Apel et al., 2002; Lukac et al., 2012). Na verdade, os estudos mostram que quanto maior for a largura de pulso (duração do pulso), maior será o calor residual durante a irradiação (Fried et al., 2001). Portanto, é possível que a utilização de pulsos super curtos (super short pulses – SSP), no qual o tempo de irradiação é reduzido, poderia gerar menos danos térmicos à superfície dentinária (Trevelin et al., 2015).

Outra vantagem do pulso super curto, levantada por Lukac et al. (2012), seria a total utilização da energia do pulso para o processo de ablação do tecido, pois em pulsos de duração mais longa parte da energia emitida seria perdida na forma de calor sobre a superfície. Em contrapartida, autores como Carmelingo et al. (2004) dizem que, apesar de tempos de pulso menores aumentarem a eficiência de ablação do laser, isso também induziria a modificações nos componentes do colágeno dentinário (em particular, nas suas cadeias alifáticas). Essas modificações nos componentes orgânicos do substrato dentinário foram evidenciadas, nesse estudo, nas amostras tratadas com pulsos muito curtos (VSP) por meio de espectroscopia micro-Raman.

Para Eduardo et al. (2010), os lasers de alta e baixa potência podem ser empregados em associação aos procedimentos odontológicos convencionais para oferecer benefícios ao tratamento, desde que utilizados por profissionais com amplo conhecimento dessa nova tecnologia, com parâmetros seguros e protocolos específicos que não causem danos térmicos e consequências indesejáveis.

Dessa forma, é de fundamental importância a condução de estudos que desenvolvam parâmetros que sejam efetivos no aumento retenção adesiva, de modo a não causar danos à superfície dental.

3 PROPOSIÇÃO

Avaliar *in vitro* o efeito do tratamento de superfície dentinária (hígida e erodida) com laser de Er:YAG (2,94 μm) - com largura de pulso super curta (*super short pulse* – SSP) - previamente ao tratamento restaurador.

4 HIPÓTESE NULA

O laser de Er:YAG com largura de pulso super curta, quando utilizado previamente ao tratamento restaurador, não promove alterações na superfície da dentina (hígida e erodida) favoráveis à adesão da resina composta.

5 Materiais e Métodos

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Testes Preliminares

Testes preliminares foram realizados com o objetivo de verificar o melhor parâmetro de irradiação da dentina submetida ao desafio erosivo. Para isso, foram utilizados 02 dentes humanos hígidos. De cada dente foram obtidas duas amostras, de aproximadamente 3 mm x 3mm, de dentina coronária do terço médio, obtendo-se um total de 4 amostras de dentina, sendo 2 amostras para cada parâmetro testado.

Essas amostras foram incluídas em resina acrílica autopolimerizável (JET Clássico, São Paulo, SP, Brasil) e polidas manualmente em máquina Politriz (Ecomet 3 - Buehler Ltd, Lake Buff, IL, EUA) em baixa rotação (100 rpm) com discos de lixa de carbeto de silício (Buehler Ltd, Lake Buff, IL, EUA) de granulação decrescente #240, #400 e #600, #1200 e #4000, sob irrigação constante, até obtenção de uma superfície plana.

Todas as amostras passaram pela análise inicial de curvatura, em perfilômetro óptico 3D (PROSCAN 2100 3D, Scantron, Taunton, Reino Unido), a fim de eliminar discrepâncias entre as amostras e selecionar apenas aquelas que apresentassem superfície de curvatura igual ou inferior a 0,3 μm (Eisenburger et al., 2003).

O sensor do equipamento foi programado para escanear uma área central da amostra de 2 mm de comprimento (eixo x) por 2 mm de largura (eixo Y), de forma a ler a amostra na área tratada e na área de referência. O equipamento foi ajustado de forma a percorrer 200 passos, com um tamanho de 0,01 mm, no eixo X, e 20 passos de 0,1 mm no eixo Y. A profundidade da lesão (*2-pt step height*) foi calculada por um software específico (Proscan Application software version 2,0,17), com base na subtração da altura da área teste em relação à altura da área de referência. Para preservação da área de referência, correspondente à metade da amostra, essa foi coberta por fita UPVC antes do desafio erosivo e durante a irradiação com laser.

Foram testados dois parâmetros distintos do laser de Er:YAG, variando as taxas de repetição (Hz) e energia (J). O primeiro parâmetro foi de 50 μs , 2 Hz, 80 mJ, 12,6 J/cm²; o segundo parâmetro foi de 50 μs , 10 Hz, 60 mJ e 12,6 J/cm².

A partir dos resultados obtidos com a perfilometria, optou-se por utilizar o primeiro parâmetro, com menor taxa de repetição, pois esse foi capaz de modificar o tecido dentinário superficialmente, sem formar cavidade. A Figura 5.1 ilustra as imagens obtidas com amostras hígidas e erodidas, antes e após a irradiação.

Figura 5.1. Amostra Hígida (A); Amostra Hígida e Irradiada (B); Amostra Erodida (C); Amostra Erodida e Irradiada (D)

5.2 Aspectos Éticos

Previamente ao início do estudo, o projeto de pesquisa foi submetido à apreciação pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP), sendo considerado aprovado (Parecer 944.762 de 03/02/2015 - Anexo A). Foram utilizados 56 terceiros molares humanos recém extraídos, cedidos pelo Banco de Dentes Humanos da Faculdade de Odontologia (Anexo B) da Universidade de São Paulo (FOUSP), os quais foram utilizados para a realização dos testes preliminares, piloto e principal.

5.3 Delineamento Experimental

O estudo foi dividido em 2 avaliações experimentais. Uma delas consistiu na análise da morfologia das superfícies da dentina hígida e da submetida ao desafio erosivo, através da Microscopia Eletrônica de Varredura (n=3). A outra consistiu na

análise da resistência de união entre as superfícies tratadas e a resina composta, por meio do ensaio de microcisalhamento (n=10), após 24 h de armazenamento. A análise do padrão de fratura também foi realizada. O delineamento experimental foi organizado como descrito no Quadro 5.1.

Unidades experimentais	Avaliação da morfologia de superfície: 12 hemi-discos de dentina humana, obtidas de 6 dentes terceiros molares humanos (n=3) Avaliação da resistência de união: 40 amostras de dentina humana, obtidas de 40 dentes terceiros molares humanos (n=10)		
Variável de resposta	Quantitativa: Resistência de união (ensaio de microcisalhamento) Qualitativa: Análise de morfologia superficial (Microscopia Eletrônica de Varredura)		
Fatores de variação	Tipo de substrato	02 níveis	<ul style="list-style-type: none"> • Dentina Hígida • Dentina Erodida
	Tratamento da superfície dentinária	02 níveis	<ul style="list-style-type: none"> • sem tratamento • irradiação com laser de Er:YAG

Quadro 5.1 – Delineamento experimental

5.4 Obtenção dos discos de dentina

Foram utilizados 56 (cinquenta e seis) terceiros molares humanos recém extraídos, cedidos pelo Banco de Dentes Humanos da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP). Quarenta e seis dentes foram utilizados no estudo propriamente dito e 10 destinados ao estudo piloto.

Os dentes permaneceram armazenados em solução de cloramina T a 0,5%, sob refrigeração (4°C), por um período máximo de três meses após a data de extração (Manhães et al., 2005). Foi realizada a limpeza dos dentes com a utilização de curetas periodontais (Duflex, SS White, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e o polimento com pedra pomes (SS White, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e água, com o auxílio de

escovas tipo Robinson (KG Sorensen, Barueri, SP, Brasil) em baixa rotação, seguidas de lavagem com água destilada (Manhães et al., 2005).

Após a limpeza, os dentes foram fixados com cera pegajosa (Asfer Indústria Química Ltda, São Paulo, Brasil) em uma placa de acrílico, com a junção amelo-dentinária perpendicular à placa, para a remoção (sentido méso-distal) do esmalte da região coronária e da porção radicular. Foram obtidos, então, 56 discos de dentina (terço médio da porção coronária) de aproximadamente 2 mm de espessura, utilizando um disco diamantado dupla face (Buehler, UK Ltd, Lake Bluff, IL, EUA), em baixa rotação, acoplado a uma máquina de corte de alta precisão (Isomet 1000, Buehler Ltd, Lake Buff, IL, EUA), sob refrigeração à água (Figura 5.2A). Quarenta deles foram embutidos em tubo PVC para o teste de microcisalhamento seguindo a sequência descrita no item 5.8 (Figura 5,2C). Os outros 16 discos foram polidos manualmente em máquina Politriz (Ecomet 3 - Buehler Ltd, Lake Buff, IL, EUA) em baixa rotação (100 rpm), com discos de lixa de carbeto de silício (Buehler Ltd, Lake Buff, IL, EUA) de granulação decrescente #120, #240, #400 e #600 (1 minuto em cada lixa), sob irrigação constante, com o objetivo de padronizar a camada de *smear layer* formada (Figura 5.2B). Entre as trocas dos discos de lixa de polimento, os espécimes foram lavados em ultrassom contendo água deionizada, por 5 minutos, para remoção de quaisquer debris que pudessem interferir nas etapas seguintes de preparo das amostras.

Figura 5.2- Obtenção dos discos de dentina. (A) Corte da coroa em discos de 2 mm de espessura e aspecto final do disco (B) não incluído e (C) incluído em resina acrílica no tubo de PVC

5.5 Obtenção do Substrato Erodido

As amostras submetidas ao desafio erosivo *in vitro* (ciclagem de desmineralização e remineralização) foram fixadas com cera pegajosa nas tampas de placas de cultura de 6 poços (TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Suíça), de forma que todas fossem imersas simultânea e individualmente. Na face oclusal, foi posicionado um fragmento de fita adesiva (Scotch 3M) de 3 x 3 mm cobrindo metade da face exposta de dentina, de forma a proteger o lado que não seria erodido (Figura 5.3). Após a ciclagem erosiva, a fita adesiva foi removida com o auxílio de uma pinça não metálica, evitando o contato com a superfície dentinária.

A desmineralização foi realizada através da imersão dos espécimes em 10 mL de solução de ácido cítrico a 0,05 M (Merck, Darmstadt, Alemanha), pH 2,3. Foram realizadas 6 imersões de 10 minutos cada, durante 5 dias (Ganss et al., 2001). Entre cada imersão em solução ácida, com um intervalo de 1 hora cada, e durante o tempo remanescente (outros períodos do dia em que as amostras não estavam imersas na solução ácida), os espécimes ficaram armazenados em 10 mL de solução remineralizadora, constituída de H_3PO_4 4.08 mM, KCl 20.10 mM, Na_2CO_3 11.90 mM e CaCl_2 1.98 mM, com pH de 6,7 (Zero et al., 1990). As soluções foram renovadas no início de cada dia do experimento e o valor do pH de todas as soluções foi controlado no início e no final de cada dia experimental.

Figura 5.3 – (A) Superfície planificada de dentina (vista oclusal) com fita adesiva protegendo o lado que não foi erodido. (B) Tampa da placa de poços com os espécimes fixados com cera pegajosa; cada poço continha um espécime. (C) Disco de dentina dividido em metades: lado esquerdo erodido e lado direito hígido

5.6 Tratamento de superfície com laser

A irradiação dos espécimes foi realizada após o desafio erosivo, com o laser de Er:YAG de pulsos super curtos – *super short pulses (SSP)* - (Fidelis III, Fotona, Slovenia)¹, que possui comprimento de onda de 2,94 μm , largura do pulso regulável entre 50 e 1000 μs , taxa de repetição de 2 a 50 Hz, com potência média de 20 W, distância focal de 7 mm e diâmetro do feixe de 0.9 mm. A irradiação foi realizada com o auxílio de um translador motorizado de alta precisão (ESP301, Newport Corporation, Irvine, CA, EUA) com os seguintes parâmetros: 50 μs , 2 Hz, 80 mJ e 12,6 J/cm^2 . O feixe de laser foi fixado sobre a amostra, com auxílio de uma morsa, distanciando-se dela a medida relativa à distância focal (7 mm). A energia emitida pelo laser foi aferida por um medidor de potência (Coherent Field Master GS = Deletor LM45; Coherent CA, EUA) a cada três amostras irradiadas, e a área a ser irradiada foi padronizada com dimensão de 8 x 8 mm, de forma a abranger os dois lados da amostra (erodido e controle) (Figura 5.4).

Figura 5.4- Laser de Er:YAG de pulso super curto. Irradiação da amostra e aspecto final por vista oclusal

¹ Equipamento sob responsabilidade da Profa. Dra. Adriana Bona Matos (Departamento de Dentística – FOU SP), obtido com recursos da FAPESP (Projeto de Auxílio a Pesquisa – Processo n. 2012/15141-6).

5.7 Análise em Microscopia Eletrônica de Varredura

Após a obtenção dos discos de dentina, 06 amostras foram seccionadas ao meio, obtendo-se 12 hemi-discos de dentina (06 hígidas e 06 erodidas). Esses hemi-discos foram distribuídos aleatoriamente entre os grupos de tratamento descritos no Quadro 5.2. Após seus respectivos tratamentos de superfície essas amostras foram preparadas para análise em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV).

Grupos	Dentina Hígida (n)	Dentina Erodida (n)
Controle (sem tratamento)	03	03
Er:YAG (50µs, 2 Hz, 80 mJ, 12,6 J/cm ²)	03	03
Total de amostras	12 hemi-discos de dentina	

Quadro 5.2. Distribuição das amostras na avaliação da morfologia de superfície.

Preparo das amostras para análise da Morfologia de Superfície

Após a realização dos tratamentos das superfícies dentinárias, as 03 amostras de cada grupo experimental foram preparadas para análise morfológica superficial. Inicialmente foi feita a imersão da amostra em solução de glutaraldeído a 2,5% com tampão fosfato 0,1 M por 24 horas, à temperatura ambiente, para preservação das estruturas. Após a lavagem com 03 banhos consecutivos (5 minutos cada) com solução tampão fosfato 0,1 M para remoção do fixador, foi realizada a sequência para desidratação química através da imersão em soluções crescentes de etanol 30%, 50%, 70%, 90%, 95% (2 banhos de 5 min cada) e álcool absoluto (4 banhos de 5 min). Em seguida, foi feita a secagem química em solução de HMDS a 100% por 30 min e depois as amostras foram colocadas sobre um papel absorvente e mantidas na capela por mais 2 horas. Após a evaporação total do HMDS, foi realizada a fixação das amostras em *stubs* de alumínio e o recobrimento com ouro (MED 010, Balzers, BAL-TEC, Furstentum, Liechtenstein) a 29 mA, por 90

segundos. A análise da superfície foi realizada através de eletromicrografias obtidas em MEV (Philipis XL30, Holanda) com aumentos de 1000x, 3000x e 5000x.

5.8 Análise da Resistência de União

Nessa etapa, foram utilizados 40 (quarenta) terceiros molares humanos. Todos os procedimentos de armazenamento, limpeza, corte, acabamento e polimento para a obtenção das amostras foram semelhantes aos descritos no item 5.4.

Todos os 40 espécimes de dentina foram incluídos em tubos de PVC e resina acrílica autopolimerizável (JET Clássico, São Paulo, SP, Brasil) para viabilizar a fixação das amostras na máquina de ensaio de microcisalhamento (Figura 5.4 C). Após a polimerização da resina, todos os corpos-de-prova foram limpos em cuba ultrassônica (Kondortech, São Paulo, SP, Brasil) contendo água deionizada, por 5 minutos. As amostras foram, então, planificadas e polidas com lixas de carvão de silício de granulação #180, acopladas à máquina politriz (Politriz Ecomet 3 machine, Buehler Ltd., Lake Bluff, EUA), até a exposição da superfície da dentina. Em seguida, foi utilizada a lixa de granulação # 600 por 30 segundos, para o aumento da área de exposição da dentina e padronização da *smear layer*.

Após o desgaste e polimento da superfície, as amostras foram avaliadas em microscópio estereoscópico (Olympus, Tóquio, Japão) com aumento de 25x, com o objetivo de verificar possíveis trincas ou alterações que poderiam comprometer a metodologia selecionada para este estudo. Os espécimes selecionados foram submetidos ao desafio erosivo, conforme o item 5.5 e, em seguida, distribuídos aleatoriamente em dois grupos: grupo controle (não irradiado) e grupo irradiado (Er:YAG, 50 μ s, 80 mJ e 2 Hz) (n=20).

Preparo das amostras para análise da Resistência de União

Após os diferentes tratamentos das superfícies de dentina hígida e erodida, foram colocados, nas superfícies das 40 amostras de dentina, fragmentos de fita adesiva dupla face ácido-resistente (Tectape, Manaus, AM, Brasil) de 0,05 mm de espessura e dimensões suficientes para recobrir toda a superfície da dentina exposta. Cada fragmento de fita apresentava 4 perfurações circulares com 1,0 mm de diâmetro, realizadas com auxílio de um perfurador de lençol de borracha (Modelo Ainsworth, Wilcos do Brasil Indústria e Com. Ltda., Petrópolis, RJ, Brasil), delimitando a área de aplicação do adesivo e da resina. Esses procedimentos foram realizados conforme descrito por Shimaoka et al. (2011).

Em seguida, as fitas perfuradas foram sobrepostas ao disco de dentina e nas perfurações foi aplicado um sistema adesivo autocondicionante (Clearfil SE Bond, Kuraray Medical Inc., Osaka, Japão. Lote: 051550), utilizado de acordo com as instruções do fabricante. Esse sistema autocondicionante foi escolhido em vista de um estudo prévio do grupo de pesquisa ter mostrado resultados positivos de resistência de união desse sistema adesivo à dentina irradiada com laser de Er:YAG (Ramos et al., 2014). Um microtubo de silicone (Tygon, Norton Performance Plastic Co, Cleveland, OH, EUA) com diâmetro interno de 1,0 mm e 0,5 mm de altura, foi utilizado como matriz para a construção dos corpos-de-prova e posicionados de forma que seu diâmetro interno coincidisse com a perfuração presente na fita. Após o posicionamento dos 4 tubos em cada amostra, estas foram preenchidas com resina composta fotopolimerizável, na cor A3 (Filtek Z350 XT, 3M ESPE, Dental Products, St. Paul, MN, USA. Lote: 14339020560 HB004134092) com o auxílio de uma sonda *ballpoint*, também conhecida como sonda CPI (Trinity® Periodontia, São Paulo, SP, BR). Após o preenchimento dos tubos plásticos, os excessos de resina foram removidos com o auxílio de uma espátula, com subsequente fotoativação por 20 s, utilizando-se um aparelho fotopolimerizador de LED (Radi-cal, SDI Limited, Bayswater, Victoria, Austrália), com intensidade de potência de 1200 mW/cm², mensurada com uso de radiômetro (Demetron Research Co., Danbury, CT, EUA).

Após a fotoativação, os tubos de silicone foram removidos com o auxílio de uma lâmina de bisturi (Embramed, Jurubatuba, SP, Brasil) e todos os espécimes foram observados em lupa estereoscópica com aumento de 40x para a certificação

da ausência de defeitos na interface de união. Os corpos de prova foram, então, armazenados em saliva artificial (Pashley et al., 2004) à temperatura de 37°C, em estufa, por 24 h, antes de serem submetidos ao ensaio mecânico de microcisalhamento (Figura 5.5). A saliva artificial utilizada para o armazenamento das amostras foi manipulada em laboratório, com a seguinte composição: CaCl_2 (0,7mmol/L), $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,2mmol/L), KH_2PO_4 (4,0 mmol/L), KCl (30 mmol/L), NaN_3 (0,3 mmol/L), HEPES buffer (20 mmol/L).

Os detalhes técnicos do adesivo e da resina composta estão descritos em detalhes no quadro 5.3.

Figura 5.5. Distribuição dos tubos e cilindros de resina sobre a amostra (A). Máquina de ensaio universal- Instron (B). A amostra fixada no dispositivo da máquina de ensaio universal (C e D)

Nome do Produto	Fabricante	Composição	Lote	Aplicação
Clearfil SE Bond	Kuraray Medical Inc., Oaka, Japão	Primer – MDP, HEMA, dimetacrilato hidrofílico, canforoquinona, N,N-dietanol-p-toluidina, água. Adesivo – MDP, HEMA, bis-GMA, dimetacrilato hidrofóbico, fotoiniciador, N-dietanol-p-toluidina, micropartículas de sílica coloidal silanizada.	051550	Aplicar o primer, esperar 20 s; não lavar; secar com suave jato de ar; aplicar o Bond; remover excessos e fotopolimerizar por 10 s.
Filtek™ Z350	3M ESPE, St. Paul, MN, EUA	Bis-GMA, UDMA, bis-EMA e partículas de zircônia sílica com tamanho médio de 0,6 µm.	14339020560 HB004134092	Aplicar incrementos de resina de no máximo 2,5 mm de espessura e fotopolimerizar 20 s cada.
<p><i>Composição fornecida pelo fabricante: bis-GMA, bisfenol-glicidil metacrilato; HEMA, hidroxietilmetacrilato; MDP, 10-fosfato-diidrogênio-metacrilóxidecil; UDMA: uretano dimetacrilato; bis-EMA, bisfenol-A-polietileno-glicol-dieter-dimetacrilato.</i></p> <p><i>*Cond AC 37® (FGM, Joinvile, SC, Brasil)</i></p>				

Quadro 5.3- Composição química e modo de aplicação dos materiais adesivos utilizados

Ensaio da Microcissalhamento

Os espécimes foram adaptados ao dispositivo para execução do teste de microcissalhamento em máquina de ensaio universal (Instron 5942, Canton, MA, EUA). Um fio metálico de 0,2 mm de diâmetro, em contato com o semicírculo inferior dos cilindros, foi posicionado de forma a laçar simultaneamente este cilindro e o prolongamento da célula de carga, sendo realizado o ensaio de microcissalhamento com velocidade de 1 mm/min e carga de 50 N. Os valores de carga máxima suportada pela interface dentina/material restaurador foram obtidos em Newton e posteriormente convertidos a Mega Pascal (MPa), dividindo-se a força máxima atingida no momento da fratura (N) pela área da interface adesiva (1 mm²).

Análise do padrão de fratura

Após a realização do teste de microcissalhamento, todos os corpos-de-prova foram montados em lâminas de vidro, de maneira que as superfícies a serem analisadas ficassem posicionadas paralelamente à lente da Lupa Estereoscópica (Citoval 2- Carl Zeiss-Jena, Alemanha), com aumento de 20x. A interface de comunicação entre o espécime e o computador foi constituída pela lupa estereoscópica acoplada a uma câmara de vídeo (Digital Hyper HAD – Sony, Tóquio). A imagem foi capturada através da placa de aquisição de imagem Captvator e pelo *software* de captação de imagem VidCap32 (Windows-Microsoft, Washington, EUA). Para o processamento das imagens foi utilizado o programa ImageLab 2000 (Canborough, Ontário, Canadá), o qual tem a capacidade de calcular a área das imagens pelo número de pixels que estas apresentam, sendo possível, então, calcular a área (em porcentagem) de cada tipo de falha ocorrido em cada extremidade fraturada, tanto do lado da resina composta quanto do lado da dentina. O tipo de fratura foi classificado como: Tipo I: adesiva; Tipo II: coesiva em dentina; Tipo III: coesiva em resina composta; Tipo IV: mista.

5.9 Análise dos Resultados

A análise da morfologia de superfície da dentina foi realizada através de eletromicrografias, de forma descrita.

Os resultados do teste de resistência de união foram analisados por meio do *software* estatístico Biostat (AnalystSoft Inc, Walnut, Canada), considerando o nível de significância de 5%. O teste de normalidade aplicado foi o de Lilliefors, como a distribuição das médias dos resultados foi normal e homogênea, foi realizada a Análise de Variância (ANOVA), seguida do teste de Tukey.

6 Resultados

6. RESULTADOS

6.1 Análise da Morfologia de superfície da dentina em microscopia eletrônica de varredura (MEV)

6.1.1 Dentina Hígida

6.1.1.1 não irradiada

A dentina hígida não irradiada não recebeu tratamentos de superfície, tendo sido submetida apenas ao acabamento e polimento com formação e padronização da camada de esfregaço com lixa de carbeto de silício de granulação #600 sob refrigeração a água. Pela análise em MEV a sua superfície apresentou-se homogênea, com ranhuras provocadas pela abrasão das lixas de acabamento e uma camada de esfregaço recobrindo toda a superfície, com a presença obliteração da abertura dos túbulos dentinários (Figuras 6.1 A e B).

6.1.1.2 irradiada

A análise morfológica revelou um padrão microrretentivo, característico de ablação, com uma superfície irregular, sem desmineralização, ausência de *smear layer*, túbulos dentinários abertos e dentina peritubular proeminente (Figuras 6.1 C e D).

6.1.2 Dentina Erodida

6.1.2.1 não irradiada

As amostras de dentina submetidas apenas à ciclagem erosiva apresentaram superfície homogênea porosa, com túbulos dentinários amplos e abertos, dentina peritubular desmineralizada e dentina intertubular de aspecto rugoso, com exposição da trama de fibras colágenas (Figuras 6.1 E e F).

6.1.2.2 irradiada

As amostras de dentina que foram submetidas à ciclagem erosiva, seguido do tratamento da superfície com laser de Er:YAG apresentaram uma superfície regular e plana, com túbulos obliterados, ressaltando um aspecto de colapamento das fibras colágenas (Figuras 6.1 G e H).

Figura 6.1- Eletromicrograviais obtidas em MEV: características morfológicas das superfícies da dentina após os diferentes tratamentos de superfície: Hígido sem tratamento (A e B), Hígido Irradiado (C e D), Erodido sem tratamento (E e F) e Erodido Irradiado (G e H)

6.2 Análise da resistência de união por meio de ensaio de microcisalhamento

Inicialmente foi realizada a avaliação da normalidade e homogeneidade dos dados. Através dessa avaliação obteve-se que a distribuição das amostras foi normal e homogênea ($p < 0,05$).

Os valores obtidos em cada tipo de substrato (dentina hígida e dentina erodida) foram analisados por teste de ANOVA, seguido por teste de comparações múltiplas de Tukey (Apêndice A). Verificou-se diferença estatística significativa entre os quatro grupos experimentais (Gráfico 6.1). As dentinas híginas (irradiadas ou não) tiveram desempenho superior às dentinas erodidas, sendo que as superfícies submetidas ao tratamento com laser resultaram em valores de resistência de união superiores aos seus respectivos controles sem tratamento (não irradiados), como descrito na tabela 6.1.

Tabela 6.1- Média dos valores de resistência de união (MPa) com os respectivos desvios padrão.

	Não Irradiada	Irradiada
Dentina Hígida	$9,76 \pm 3,39^B$	$12,77 \pm 5,09^A$
Dentina Erodida	$5,12 \pm 1,72^D$	$7,62 \pm 3,39^C$

Gráfico 6.1- Valores de resistência de união (MPa) com os desvios padrão

6.3 Análise do padrão de fratura

Na dentina hígida, o padrão de fratura predominante foi a falha adesiva, sendo que falhas mistas ocorreram nos grupos irradiado e não irradiado, e apenas no grupo não irradiado foram verificadas, também, fraturas do tipo coesiva em resina (Figura 6.2)

Na dentina submetida à ciclagem erosiva, também houve uma predominância de fraturas adesivas e uma pequena quantidade de fraturas mistas para os dois grupos. Assim como para a dentina hígida, o grupo não irradiado foi o único a apresentar fraturas do tipo coesiva em resina; porém, nesse caso, em menor porcentagem (Figura 6.3.).

Em nenhum dos grupos foram observadas fraturas coesivas em dentina.

Figura 6.2- Representação gráfica da predominância, em porcentagem, dos tipos de fratura em cada grupo experimental da dentina hígida

Figura 6.3- Representação gráfica da predominância, em porcentagem, dos tipos de fratura em cada grupo experimental da dentina erodida

7 Discussão

7 DISCUSSÃO

Em virtude de estudos epidemiológicos que demonstram um aumento na prevalência de indivíduos com desgastes erosivos nos dentes, devido ao grande consumo de bebidas industrializadas ácidas e maior longevidade da população mundial, o interesse em estudar essa patologia vem se expandindo (Lussi et al., 2011). Sem o controle dos fatores etiológicos, a perda de estrutura mineralizada dental por erosão pode resultar em exposição da dentina (Jaeggi et al., 2006). Nesses casos, tratamentos restauradores são indicados para diminuir a sensibilidade térmica, prevenir injúrias à polpa e reabilitar contorno, função e estética dos elementos afetados (Wang; Lussi, 2010).

Com o objetivo de entender o comportamento dos materiais restauradores em diferentes substratos dentinários, alguns autores buscam simular a erosão dental em protocolos *in vitro*, ainda que estes apresentem limitações para reproduzir com exatidão as condições *in vivo* (Young; Tenuta, 2011). Nos estudos *in vitro*, porém, é possível observar de forma isolada as mudanças geradas nos diferentes substratos que são expostos à desmineralização/dissolução por erosão. No caso do substrato dentinário, os ácidos podem remover os *plugs* que vedam seus túbulos e desmineralizar a dentina inter e peritubular, expondo sua matriz orgânica e aumentando o diâmetro dos túbulos (Prati et al., 2003; Wongkhantee et al., 2006). Nesse aspecto, o desafio erosivo do presente trabalho teve êxito em reproduzir características de uma dentina erodida, como verificado nas imagens de microscopia eletrônica de varredura, em que os túbulos se apresentam alargados, sem dentina peritubular e as áreas intertubulares de aparência descalcificada e fibrosa (Marshall et al., 1998; Lussi et al., 2011).

Como os materiais adesivos devem aderir a superfícies diferentes daquelas para as quais foram originalmente criados e testados, os estudos na adesão à dentina erodida são imperativos, mas a adesão a esse substrato é pouco investigada. As pesquisas até então encontradas demonstram uma menor resistência de união a esse substrato, comparativamente à dentina hígida (Cruz et al., 2012; Zimmerli et al., 2012; Ramos et al., 2014; Cruz et al., 2015; Franciscone-dos-Rios et al., 2015), corroborando com os achados deste estudo.

O alto nível de desmineralização na dentina erodida resulta em uma camada superficial desmineralizada que, após a penetração do adesivo, permite a formação de uma camada híbrida mais fina, comparativamente à formada em uma dentina hígida. Essas camadas são estruturalmente imperfeitas e contêm porosidades que geram áreas de predominância hidrofílica e zonas desmineralizadas desprovidas de reforço de resina (Wang; Spencer, 2004). Esses fatores podem contribuir para os baixos valores de resistência de união obtidos em substratos dentinários erodidos, pois os monômeros resinosos não penetram em todo o substrato desmineralizado (Wang; Spencer, 2004; Tay; Pashley, 2004; Cruz et al., 2015).

A dentina erodida irradiada apresentou valores de resistência de união maiores que a dentina erodida não irradiada, porém ainda foi inferior aos valores encontrados para a dentina hígida sem tratamento. Esses dados estão de acordo com os achados verificados na análise morfológica da superfície, na qual na dentina erodida irradiada foi observada uma superfície homogênea e desmineralizada com túbulos ocluídos por fibrilas colágenas que parecem ter colabado, possivelmente devido ao calor residual gerado durante o processo de ablação, fator que poderia ter desfavorecido a penetração dos adesivos e a formação da camada híbrida (Ceballos et al., 2001), mas que não foi avaliado no presente estudo. Isso demonstra que o tratamento da superfície erodida com laser, nos parâmetros testados neste trabalho, não foi efetivo na remoção da camada superficial desmineralizada do substrato e abertura dos túbulos dentinários.

No trabalho de Ramos et al. (2014), o tratamento da superfície com laser de Er:YAG nos parâmetros utilizados (60 mJ, 2 Hz, 0,12 W, 19,3 J/cm² e 150-250 µs) não foi capaz de elevar os valores de resistência de união do substrato erodido ou do substrato hígido, divergindo dos resultados encontrados neste estudo, no qual os grupos irradiados apresentaram valores de resistência de união superiores aos de seus homólogos não irradiados.

Entre os grupos testados, o substrato hígido irradiado foi aquele que desempenhou-se melhor em relação aos demais grupos. Em microscopia eletrônica de varredura é possível verificar a modificação morfológica criada na superfície hígida de dentina quando irradiada. Diferentemente do seu controle não irradiado, que apresentou uma camada uniforme e coberta por *smear layer*, obliterando a entrada dos túbulos, a dentina hígida irradiada mostrou túbulos bem abertos, superfície irregular e dentina peritubular proeminente, configurando a superfície

microrretentiva que fora sugerida por alguns autores (Visuri et al., 1996; Trevelin et al., 2015).

Para Moretto et al. (2011) o aspecto microrretentivo resultante da irradiação desse substrato, apesar de sugerir favorecimento da resistência adesiva, não demonstrou aumentá-la. Em sua análise do padrão de fratura foram encontradas muitas fraturas mistas para os grupos irradiados, com áreas de fratura adesiva entrelaçadas a áreas de fratura coesiva em dentina, como provável resultado das microtrincas que foram formadas na subsuperfície da dentina, comumente encontradas em determinados parâmetros de irradiação, como no estudo de Aranha et al. (2007). Neste último estudo, além das microtrincas, também observou-se a formação de uma falha na interface dentina/resina composta das cavidades tratadas com laser de Er:YAG, apesar dos *tags* de resina terem sido mais pronunciados nos grupos irradiados, independentemente do adesivo utilizado. Segundo Esteves-Oliveira et al. (2007), a degradação térmica do colágeno pode ser um dos fatores que contribuem para a redução dos valores de resistência de união.

Nesse sentido, a duração do pulso dos equipamentos utilizados por esse autores pode ter afetado negativamente as propriedades do tecido irradiado, devido à difusão de calor na camada subablativa da dentina, que seria a camada subjacente à camada ablacionada, durante o pulso emitido pelo feixe laser (Majaron et al., 1998). Segundo Fried et al. (2001), quanto maior a duração do pulso, maior o calor residual no tecido irradiado.

Staninec et al. (2006) sugeriu que larguras de pulso mais curtas, como as utilizadas no presente estudo, podem potencializar a redução dos danos térmicos à superfície dentinária. Seus resultados mostraram que a dentina hígida irradiada com laser de Er:YAG de pulso super curto (35 μ s) teve uma resistência adesiva semelhante ao grupo controle não irradiado. Já Bahrami et al. (2011), usando também um laser de Er:YAG de pulso super curto (80 mJ, 10 Hz, 50 μ s, 12,58 J/cm²) obtiveram um aumento significativo da resistência de união dos compósitos à dentina irradiada.

Bodrumlu et al. (2012) compararam o aumento de temperatura na apicectomia de raízes utilizando laser de Er:YAG em três larguras de pulso (50 μ s, 100 μ s e 300 μ s) e obteve que a menor temperatura atingida foi com o pulso de 50 μ s, o qual variou em média 1°C a temperatura sobre a dentina radicular com o *spot* do laser a apenas 3 mm de distância da raiz. No estudo de Raucci-Neto et al. (2015)

demonstrou-se que não há diferença no aumento de temperatura entre a dentina hígida e a dentina erodida, quando irradiadas com laser de Er:YAG.

Neste trabalho não foram observadas microtrincas na superfície das dentinas hígida e erodida tratadas com laser de pulso super curto, já que nessa largura de pulso (50 μ s), com baixas densidades de energia, não é esperada uma alteração térmica capaz de induzir tais modificações (Majaron et al., 1998). Por isso, esse tratamento não modificou a dentina remanescente de forma desfavorável à adesão.

Diante do exposto, a hipótese nula testada foi rejeitada. Pode-se afirmar que, independente do substrato dentinário avaliado, o laser de Er:YAG de pulsos super curtos favoreceu a adesão. Estudos futuros, no entanto, devem ser realizados com o objetivo de avaliar, a longo prazo, a qualidade da interface de união entre os substratos erodido e hígido tratados com o laser de Er:YAG de pulsos super curtos e a resina composta.

8 Conclusão

8 CONCLUSÃO

O laser de Er:YAG com largura de pulso super curta, quando utilizado previamente ao tratamento restaurador, promove alterações na superfície dentinária favoráveis à adesão da resina composta, independente do substrato.

Referências

REFERÊNCIAS²

- Aoki A, Ishikawa T, Yamada M, Otsuki M, Watanabe H, Tagami J, et al. Comparison between Er:YAG laser and conventional technique for root caries treatment in vitro. *J Dent Res*. 1998;77(6):1404-14.
- Apel C, Franzen R, Meister J, Sarrafzadegan H, Thelen S, Gutknecht N. Influence of the pulse duration of an Er:YAG laser system on the ablation threshold of dental enamel. *Lasers Med Sci*. 2002;17(4):253– 57.
- Aranha AC, Eduardo CP, Gutknecht N, Marques MM, Ramalho KM, Apel C. Analysis of the interfacial micromorphology of adhesive systems in cavities prepared with Er,Cr:YSGG, Er:YAG laser and bur. *Microsc Res Tech*. 2007 Aug;70(8):745-51.
- Attin T, Wegehaupt FJ. Impact of erosive conditions on tooth-colored restorative materials. *Dent Mater*. 2014 Jan;30(1):43-9.
- Bahrami B, Askari N, Tieleman M, Heysselaer D, Lamard L, Peremans A, et al. Effect of low fluency dentin conditioning on tensile bond strength of composite bonded to Er:YAG laser-prepared dentin: a preliminary study. *Lasers Med Sci*. 2011 Mar;26(2):187–91.
- Baraba A, Dukić W, Chieffi N, Ferrari M, Anić I, Miletic I. Influence of different pulse durations of Er:YAG laser based on variable square pulse technology on microtensile bond strength of a self-etch adhesive to dentin. *Photomed Laser Surg*. 2013 Mar;31(3):116-24.
- Baraba A, Perhavec T, Chieffi N, Ferrari M, Anic I, Miletic I. Ablative Potential of Four Different Pulses of Er:YAG Lasers and Low-Speed Hand Piece. *Photomed Laser Surg*. 2012 Jun;30(6):301-7.
- Bodrumlu E, Keskiner I, Sumer M, Sumer AP, Telcioglu NT. Temperature Variation During Apicectomy with Er:YAG Laser. *Photomed and Laser Surg*. 2012 Aug;30(8):425-28.
- Buzalaf MAR, Kato MT, Hannas AR. The role of matrix metalloproteinases in dental erosion. *Adv Dent Res*. 2012 Sep;24(2):72-6.

² De acordo com o Estilo Vancouver

Cardoso MV, de Almeida Neves A, Mine A, Coutinho E, Van Landuyt K, De Munck J, et al. Current aspects on bonding effectiveness and stability in adhesive dentistry. *Aust Dent J*. 2011 Jun;56 Suppl 1:31-44.

Carmelingo C, Lepore, M, Gaeta G.M. Er:YAG laser treatments on dentine surface: micro-Raman spectroscopy and SEM analysis. *J. Dent*. 2004 Jul;32(5): 399–405.

Carvalho TS, Colon P, Ganss C, Huysmans MC, Lussi A, Schlueter N, Schmalz G, Shellis RP, Tveit AB, Wiegand A. Consensus report of the European Federation of Conservative Dentistry: erosive tooth wear-diagnosis and management. *Clin Oral Investig*. 2015 Sep;19(7):1557-61.

Cavalcanti AL, Xavier AF, Souto RQ, Oliveira MC, Santos JÁ, Vieira FF. Avaliação In vitro do Potencial Erosivo de Bebidas Isotônicas. *Rev Bras Med Esporte*. 2010 Nov-Dec;16(6):455-8.

Ceballos L, Toledano M, Osorio R, Tay FR, Marshall GW. Bonding to Er:YAG laser treated dentin. *J Dent Res*. 2002 Feb;81(2):119-122.

Ceballos L, Osorio R, Toledano M, Marshall GW. Microleakege of composite restorations after acid Er:YAG laser cavity treatments. *Dent Mater*. 2001 Jul;17(4):340-6.

Corona SA, De Souza AE. Effect of energy and pulse repetition rate of Er:YAG laser on dentin ablation ability and morphological analysis of the laser-irradiated substrate. *Photomed Laser Surg*. 2007;25(1):26–33.

Cruz JB, Bonini G, Lenzi TL, Imparato JC, Raggio DP. Bonding stability of adhesive systems to eroded dentin. *Braz Oral Res*. 2015;29. Dóí:10.1590/1807-3107BOR-2015.vol29.0088.

Cruz JB, Lenzi TL, Tedesco TK, Guglielmi CA, Raggio DP. Eroded dentin does not jeopardize the bond strength of adhesive restorative materials. *Braz Oral Res*. 2012 Jul-Aug;26(4):306-12.

Delmé KI, De Brayne MAA, De Moor RJGDeman PJ. Influence of different Er:YAG laser energies and frequencies on the surface morphology of dentin and enamel. *J Oral Laser. Appl* 2006 Spring;6(1):43–52.

Eduardo CP, Tangi EY, Bello-Silva MS, Aranha ACC, Silveira BL, Freitas PM. Laser em Dentística. In: Crivello Junior O, coordenador. Fundamentos de Odontologia – Lasers em Odontologia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2010, p.1-15.

Eisenburger M, Shellis RP, Addy M. Comparative study of wear of enamel induced by alternating and simultaneous combinations of abrasion and erosion in vitro. *Caries Res.* 2003, Nov-Dec;37(6):450-5

Esteves-Oliveira M, Carvalho WL, Eduardo C de P, Zezell DM. Influence of the additional Er:YAG laser conditioning step on the microleakage of class V restorations. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2008 Nov;87(2):538-43.

Esteves-Oliveira M, Zezell DM, Apel C, Turbino ML, Aranha AC, Eduardo C de P, et al. Bond strength of self-etching primer to bur cut, Er,Cr:YSGG, and Er:YAG laser dental surfaces. *Photomed Laser Surg.* 2007 Oct;25(5):373-80.

Firat E, Gurgan S, Gutknecht N. Microtensile bond strength of an etch-and-rinse adhesive to enamel and dentin after Er:YAG laser pretreatment with different pulse durations. *Lasers Med Sci.* 2012 Aug;27(3):15-21.

Francisconi-dos-Rios LF, Casas-Apayco LC, Calabria MP, Francisconi PA, Borges AF, Wang L. Role of chlorhexidine in bond strength to artificially eroded dentin over time. *J Adhes Dent.* 2015 Apr;17(2):133-9.

Freitas PM, Navarro RS, Barros JA, de Paula Eduardo C. The use of Er:YAG laser for cavity preparation: an SEM evaluation. *Microsc Res Tech.* 2007 Sep;70(9):803-8.

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

Ganss C, Klimek J, Schäffer U, Spall T. Effectiveness of two fluoridation measures on erosion progression in human enamel and dentine in vitro. *Caries Res.* 2001 Sep-Oct;35(5):325-30.

Ganss C, Schlueter N, Hardt M, von Hinckeldey J, Klimek J. Effects of toothbrushing on eroded dentine. *Eur J Oral Sci.* 2007 Oct;115(5):390-6.

Ganss C, Lussi A, Scharmann I, Weigelt T, Hardt M, Klimek J, et al. Comparison of calcium analysis, longitudinal microradiography and profilometry for the quantitative assessment of erosion in dentine. *Caries Res* 2009;43(6): 422-9.

Giannini M, Makishi P, Ayres AP, Vermelho PM, Fronza BM, Nikaido T, et al. Self-etch adhesive systems: a literature review. *Braz Dent J*. 2015 Jan-Feb;26(1):3-10.

Hibst R, Keller U. Experimental studies of the application of Er:YAG laser on dental hard substances: I. Measurement of the ablation rate. *Lasers Surg Med*. 1989;9(4):338-44.

Jaeggi T, Gruninger A, Lussi A. Restorative therapy of erosion. *Monogr Oral Sci*. 2006;20:200-14.

Johansson A, Johansson AK, Omar R, Carlsson GE. Rehabilitation of the worn dentition. *J Oral Rehab*. 2008 Jul;35(7):548–66.

Keller U, Hibst R. Experimental studies of the application of the Er:YAG laser on dental hard substances: II. Light microscopic and SEM investigations. *Lasers Surg Med*. 1989;9(4):345-51.

Lopes RM, Trevelin LT, da Cunha SR, de Oliveira RF, de Andrade Salgado DM, de Freitas PM, et al. Dental adhesion to Erbium-lased tooth structure: A Review of the Literature. *Photomed Laser Surg*. 2015 Aug;33(8):393-403.

Lukac M, Nina Malej Primc, Samo Pirnat. Quantum Square Pulse Er:YAG Lasers for Fast and Precise Hard Dental Tissue Preparation. *J Laser Healt Acad*. 2012 May;(1):14-21.

Lussi A, Hellwig E, Zero D, Jaeggi T. Erosive tooth wear: diagnosis, risk factors and prevention. *Am J Dent*. 2006 Dec;19(6):319-25.

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

Majaron B., Sustercic D, Lukac M., Skaleric U., and Fun-duk, N. Heat diffusion and debris screening in Er:YAG laser ablation of hard biological tissues. *Appl. Phys. B* 1998;66:479–87.

Manhães L, Oliveira DC, Marques MM, Matos AB. Influence of Er:YAG laser surface treatment and primer application methods on microtensile bond strength self-etching systems. *Photomed Laser Surg.* 2005 Jun;23(3):304-12.

Marshall GW Jr, Wu-Magidi IC, Watanabe LG, Inai N, Balooch M, et al. Effect of citric acid concentration on dentin demineralization, dehydration, and rehydration: atomic force microscopy study. *J Biomed Mater Res.* 1998 Dec 15;42(4):500-7.

Moretto SG, Azambuja N Jr, Arana-Chavez VE, Reis AF, Giannini M, Eduardo CP, et al. Effects of ultramorphological changes on adhesion to lased dentin-Scanning electron microscopy and transmission electron microscopy analysis. *Microsc Res Tech.* 2011 Aug;74(8):720-6.

Needleman I, Ashley P, Petrie A, Fortune A, Turner W, Jones J, et al. Engebretsen L, Budgett R, Donos N, Clough T, Porter S. Oral health and impact on performance of athletes participating in the London 2012 Olympic Games: a cross-sectional study. *Br J Sports Med.* 2013 Nov;47(6):1054–58.

Nekrashevych Y, Stösser L. Protective influence of experimentally formed salivary pellicle on enamel erosion. An in vitro study. *Caries Res.* 2003 May-Jun;37(3):225-31.

Nishimoto Y, Otsuki M, Yamauti M, Testuya E, Sato Y, Foxton RM, Tagami J. Effect of pulse duration of Er:YAG laser on dentin ablation. *Dent. Mat. J.* 2008;27(3):433-39.

Pashley DH. Clinical correlations of dentin structure and function. *J Prosthet Dent.* 1991 Dec;66(6):777-81.

Pashley DH, Carvalho RM. Dentine permeability and dentine adhesion. *J Dent.* 1997 Sep;25(5):355-72.

Pashley DH, Tay FR, Yiu C, Hashimoto M, Breschi L, Carvalho RM, et al. Collagen degradation by host-derived enzymes during aging. *J Dent Res.* 2004;83(3):216-21.

Perdigão J. Dentin bonding-variables related to the clinical situation and the substrate treatment. *Dent Mater.* 2010 Feb;26(2):24-37.

Prati C, Montebugnoli L, Suppa P, Valdre G, Mongiorgi R. Permeability and morphology of dentin after erosion induced by acidic drinks. J Periodontol. 2003 Apr;74(4):428-36.

Ramos TM. Avaliação *in vitro* da morfologia e da resistência de união de adesivos à dentina humana hígida ou submetida à ciclagem erosiva e irradiada com os lasers de Er:YAG e Er,Cr:YSGG [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2012.

Ramos TM, Ramos-Oliveira TM, de Freitas PM, Azambuja N Jr, Esteves-Oliveira M, Gutknecht N, de Paula Eduardo C. Effects of Er:YAG and Er,Cr:YSGG laser irradiation on the adhesion to eroded dentin. Lasers Med Sci. 2015 Jan;30(1):17-26.

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

Raucci-Neto W, dos Santos CR, de Lima FA, Pécora JD, Bachmann L, Palma-Dibb RG. Thermal effects and morphological aspects of varying Er:YAG laser energy on demineralized dentin removal: an in vitro study. Lasers Med Sci . 2015 May;30(4):1231–36.

Salas MM, Nascimento GG, Vargas-Ferreira F, Tarquinio SB, Huysmans MC, et al. Diet influenced tooth erosion prevalence in children and adolescents: Results of a meta-analysis and meta-regression. J Dent. 2015 Aug;43(8):865-75.

Schlueter N, Jaeggi T, Lussi A. Is dental erosion really a problem? . Adv Dent Res. 2012 Sep;24(2): 68-71.

Shimaoka AM, de Andrade AP, Cardoso MV, de Carvalho RC. The importance of adhesive area delimitation in a microshear bond strength experimental design. J Adhes Dent. 2011 Aug;13(4):307-14.

Staninec M, Gardner AK, Le CQ, Sarma A, Fried D. Adhesion of composite to enamel and dentin surfaces irradiated by IR laser pulses of 0.5–35 μ s Duration. Journ. Biomed. Mater Res: Appl Biomater. 2006 Apr;(B):199-201.

Tagami J, Tao L, Pashley DH, Hosoda H, Sano H. Effects of high-speed cutting on dentin permeability and bonding. Dent Mater. 1991 Oct;7(4):234-9.

Tay FR, Pashley DH. Resin bonding to cervical sclerotic dentin: a review. *J Dent*. 2004 Mar;32(3):173-96.

Ten Cate JM, Imfeld T. Dental erosion, summary. *Eur J Oral Sci*. 1996 Apr;104(2):241-4.

Trevelin LT, Marques MM, Aranha AC, Arana-Chavez VE, Matos AB. Effect of super short pulse Er:YAG laser on human dentin--Scanning electron microscopy analysis. *Microsc Res Tech*. 2015 Jun;78(6):472-8.

Van Meerbeek B, De Munck J, Mattar D, Van Landuyt K, Lambrechts P. Microtensile bond strengths of an etch&rinse and self-etch adhesive to enamel and dentin as a function of surface treatment. *Oper Dent*. 2003 Sep-Oct;28(5):647-60.

Van Meerbeek B, Van Landuyt K, De Munck J, Inoue S, Yoshida Y, Perdigão J, et al. Bonding to enamel and dentin In: Summitt BJ, Robbins JW, Hilton TJ, Schwartz RS, editors. *Fundamentals of operative dentistry*, Chicago: A Contemporary Approach Quintessence; 2006. 220p.

Visuri SR, Wright DD, Wigdor HA, Walsh TJ. Shear strength of composite bonded to Er:YAG laser prepared dentine. *J Dent Res*. 1996 Jan;75(1):599-655.

Wang X, Lussi A. Assessment and management of dental erosion. *Dent Clin North Am*. 2010 Jul;54(3):565-78.

Wang Y, Spencer P. Effect of acid etching time and technique on interfacial characteristics of the adhesive-dentin bond using differential staining. *Eur J Oral Sci*. 2004 Jun;112(3):293-9.

Wongkhantee S, Patanapiradej V, Maneenut C, Tantbirojn D. Effect of acidic food and drinks on surface hardness of enamel, dentine, and tooth-coloured filling materials. *J Dent*. 2006 Mar;34(3):214-20.

Young A, Tenuta LM. Initial erosion models. *Caries Res*. 2011;45 Suppl 1:33-42.

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

Zero DT. Etiology of dental erosion – extrinsic factors. Eur J Oral Sci. 1996 Apr;104(2):162- 77.

Zimmerli B, De Munck J, Lussi A, Lambrechts P, Van Meerbeek B. Long-term bonding to eroded dentin requires superficial bur preparation. Clin Oral Investig. 2012 Oct;16(5):1451-61.

Apêndice

APÊNDICE A- Tabela estatística descritiva dos valores de resistência de união (MPa) aos quatro diferentes substratos

Estatística descritiva				
	Erodido	Hígido	Erodido + Laser	Hígido + Laser
Tamanho da amostra =	44	46	44	48
Mínimo	2,9147	2,6442	2,9949	4,1147
Máximo	10,759	19,2153	15,8598	21,1291
Amplitude Total	7,8443	16,5711	12,8648	17,0144
Mediana	4,827	9,1938	6,9515	13,0174
Primeiro Quartil (25%)	4,0081	7,2941	4,948	9,1133
Terceiro Quartil (75%)	5,9564	11,9044	9,1835	17,8043
Desvio Interquartilico	1,9484	4,6103	4,2355	8,691
Média Aritmética	5,1262	9,76	7,6232	12,7788
Variância	2,9718	11,524	11,4999	25,9494
Desvio Padrão	1,7239	3,3947	3,3912	5,0941
Erro Padrão	0,2599	0,5005	0,5112	0,7353
Coeficiente de Variação	33,63%	34,78%	44,48%	39,86%
Assimetria (g1)	1,5305	0,6779	0,8653	-0,2341
Curtose (g2)	3,1053	0,5449	0,1715	-1,0945
Média Harmônica	4,6825	8,5413	6,3094	10,1757
N (média harmônica)	44	46	44	48
Média Geométrica	4,8879	9,177	6,9372	11,5618
N (média geométrica)	44	46	44	48
Variância (geom.)	1,041	1,06	1,0886	1,1076
Desvio Padrão (geom.)	1,3555	1,4424	1,5561	1,6245

Anexos

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE SÃO
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP														
DADOS DO PROJETO DE PESQUISA														
Título da Pesquisa: ANÁLISE IN VITRO DA MORFOLOGIA E DA RESISTÊNCIA DE UNIÃO DA RESINA COMPOSTA À DENTINA ERODIDA E IRRADIADA COM LASER DE Er:YAG COM LARGURA DE PULSO SUPER CURTA 2 ESTUDO LONGITUDINAL														
Pesquisador: Maria Cecília Pereira Cerosimo														
Área Temática:														
Versão: 1														
CAAE: 41087414.0.0000.0075														
Instituição Proponente: Universidade de São Paulo - Faculdade de Odontologia														
Patrocinador Principal: Financiamento Próprio														
DADOS DO PARECER														
Número do Parecer: 944.762														
Data da Relatoria: 03/02/2015														
Apresentação do Projeto:														
Com o aprimoramento da tecnologia, a utilização do laser para pré-tratamento da superfície dentinária antes do condicionamento ácido tem sido considerada como método alternativo.														
Objetivo da Pesquisa:														
O objetivo deste estudo in vitro é avaliar a influência da irradiação com laser de Er:YAG (2,94 m), de pulso super-curto, na adesão da resina composta à superfície dentinária erodida.														
Avaliação dos Riscos e Benefícios:														
Não há riscos pois se trata de trabalho in vitro com discos de estrutura dentária de dentes extraídos que serão fornecidos pelo Banco de Dentes da FOU SP conforme carta anexada.														
Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:														
Adequada no que diz respeito à aplicação do Laser para tentar melhorar as condições de adesividade à estrutura dentária erodida.														
Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:														
Foi apresentada carta do Banco de Dentes da FOU SP.														
<table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td colspan="2">Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227</td> <td>CEP: 05.508-900</td> </tr> <tr> <td>Bairro: Cidade Universitária</td> <td>Município: SÃO PAULO</td> <td></td> </tr> <tr> <td>UF: SP</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Telefone: (11) 3091-7960</td> <td>Fax: (11) 3091-7814</td> <td>E-mail: cepfo@usp.br</td> </tr> </table>			Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227		CEP: 05.508-900	Bairro: Cidade Universitária	Município: SÃO PAULO		UF: SP			Telefone: (11) 3091-7960	Fax: (11) 3091-7814	E-mail: cepfo@usp.br
Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227		CEP: 05.508-900												
Bairro: Cidade Universitária	Município: SÃO PAULO													
UF: SP														
Telefone: (11) 3091-7960	Fax: (11) 3091-7814	E-mail: cepfo@usp.br												
Página 01 de 02														

ANEXO B – Declaração do Banco de Dentes Humanos da FOUSP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Odontologia
Banco de Dentes Humanos

DECLARAÇÃO AO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Para fins de avaliação pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) dessa instituição, o Banco de Dentes Humanos da FOUSP (DIVISÃO DENTES PERMANENTES) compromete-se, mais uma vez, em auxiliar pesquisadores na realização de seus projetos.

Sendo assim, após a aprovação do CEP, nossa contribuição consistirá no oferecimento de 56 terceiros molares para a execução do trabalho de pesquisa intitulado: "Análise in vitro da morfologia e da resistência de união da resina composta à dentina erodida e irradiada com laser de Er:YAG com largura de pulso super curta – estudo longitudinal", a ser realizado pela pesquisadora Maria Cecília Pereira Cersosimo orientadas pela Profa. Dra. Patrícia Moreira de Freitas.

São Paulo, 29 de outubro de 2014.

José Carlos Pettorossi Imparato

Coordenador Geral BDH.

Av. Prof. Lineu Prestes, 2227 – Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira" – CEP 05508-900-
São Paulo – SP – Contato: (0xx11) 3091-7905 – e-mail: bdh@usp.br