UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

**Influência da associação de fluoretos à irradiação com laser de CO₂
na permeabilidade do esmalte dental erodido.**

Avaliação in vitro e in situ.

Táisa Penazzo Lepri

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências – Programa: Odontologia Restauradora - Área de Concentração: Odontologia Restauradora (Opção: Dentística)

Orientadora: Profa. Dra. Silmara Aparecida Milori Corona

Ribeirão Preto

2010

Autorizo a reprodução e/ou divulgação total ou parcial da presente obra por qualquer meio convencional ou eletrônico, desde que seja citada a fonte.

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Tratamento da Informação do Serviço de Biblioteca

Lepri, Taísa Penazzo

Influência da associação de fluoretos à irradiação com laser de CO₂ na permeabilidade do esmalte dental erodido. Avaliação *in vitro* e *in situ*. Ribeirão Preto, 2010.
55p. : il. ; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Odontologia Restauradora – Opção: Dentística.
Orientadora: Profa. Dra. Silmara Aparecida Milori Corona.

1. Esmalte. 2. Laser de CO₂. 3. Erosão. 4. Fluoreto.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Lepri TP. Influência da associação de fluoretos à irradiação com laser de CO₂ na permeabilidade do esmalte dental erodido. Avaliação *in vitro* e *in situ*. [Dissertação de Mestrado]. Ribeirão Preto: Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo; 2010.

Banca Examinadora

Data da Defesa: __/__/____

Profa. Dra. Silmara Aparecida Milori Corona

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Emílio César Lepri (*in memoriam*) e Leila Maria Penazzo Lepri. Exemplos de honestidade, trabalho, respeito e caráter; nunca mediram esforços em proporcionar sempre o melhor a seus filhos.

“Dedique-se a conhecer seus pais.

É impossível prever quando eles terão ido embora, de vez.”

Traduzido de “Wear Sunscreen” – Mary Schmich

Aos meus irmãos, Lígia, Cesar e Edgar. Pelo companheirismo e amizade em todos os momentos da minha vida.

“Seja legal com seus irmãos.

*Eles são a melhor ponte com o seu passado
e possivelmente quem vai sempre te apoiar no futuro.”*

Traduzido de “Wear Sunscreen” – Mary Schmich

A todos meus familiares que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A Deus, pelo dom da vida, por iluminar meu caminho, dando-me paz e serenidade.

À minha orientadora, Profa. Dra. Silmara Aparecida Milori Corona, por ter depositado em mim a confiança para trabalharmos juntas, desde minha graduação. Pela paciência, disposição e bom humor com os quais você sempre conduz nossos trabalhos. Agradeço também pelas contribuições para o meu crescimento pessoal e profissional.

À Profa. Dra. Cecília Pedroso Turssi, pela seriedade e competência com que executa seu trabalho. Agradeço a preciosa ajuda no delineamento e correção dos artigos científicos e, em especial, ao tratamento dos dados estatísticos deste estudo.

À Vivian Colucci, pela amizade, pela ajuda em todos os momentos e pelos ensinamentos a mim transmitidos ao longo dos anos em que fizemos pesquisas juntas.

À amiga Maily Rehder Wimmers Ferreira, pela amizade criada e cultivada desde nossa graduação. Por ter estado ao meu lado nos momentos em que mais precisei, tanto pessoal como profissionalmente, e por podermos compartilhar vários momentos da pós-graduação.

À amiga e colega de mestrado, Sandra Chiga, pela paciência que sempre teve comigo, mesmo nos longos momentos de desabafo.

AGRADECIMENTOS

À Universidade de São Paulo, representada pelo Magnífico Reitor João Grandino Rodas.

À Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, representada pelo Digníssimo Diretor Prof. Dr. Osvaldo Luiz Bezzon e pelo Vice-Diretor Prof. Dr. Valdemar Mallet da Rocha Barros.

À Coordenação Geral da Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa da Profa. Dra. Léa Assed Bezerra da Silva.

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa do Prof. Dr. Manoel Damião de Sousa Neto.

Ao Chefe do Departamento de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa do Prof. Dr. Ricardo Gariba Silva.

À FAPESP pela concessão do auxílio financeiro sob a forma de bolsa de estudo.

Às Profas. Dras. Mônica Campos Serra, Telma Nunes do Nascimento e Regina Guenka Palma-Dibb, docentes da Área de Dentística do Programa da Pós-Graduação em Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pela expressiva contribuição para o meu desenvolvimento científico-acadêmico.

A Todos Professores do Departamento de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

À Profa. Dra. Yara Terezinha Correa Silva Sousa, Coordenadora da Graduação e Pós Graduação do Curso de Odontologia da UNAERP, pela

disponibilização do laser de CO₂ empregado no estudo *in vitro*, e à Profa.Dra. Aline Evangelista de Souza Gabriel, pelo auxílio durante a utilização do equipamento.

Ao setor de esterilização com óxido de etileno do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP.

Aos amigos e orientados da Profa. Silmara, Vivian, Daniel, Cristiane, Sandra, Renata e Rodrigo pela amizade e pelas trocas de conhecimentos indispensáveis para o crescimento de uma equipe

Às colegas da turma de Mestrado em Dentística: Sandra, Juliana, Carmen e Dinah.

Aos colegas da turma de Doutorado em Dentística: Cesar, Daniel e Francisco e também da turma anterior: Vívian, Aline, Danielle e Alessandra.

Às colegas de pós-graduação em Odontopediatria: Danielle, Camila, Marília, Paula e Cristiane.

Aos colegas da 79ª Turma FORP-USP que, assim como eu, ingressaram na pós-graduação na FORP.

A todos os colegas do Laboratório de Dentística: Vinícius, Juliana, Walter, Renata, Bruna, Adrielly,

Aos voluntários, sem os quais a realização deste trabalho *in situ* não teria sido possível: Adrielly, Ana Paula, Bruna, Cesar, Daniel, Marília, Sandra, Vinícius e Vivian.

Ao Carlos, secretário do Curso de Pós-Graduação em Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

À técnica Patrícia Marchi, do Laboratório de Pesquisa em Dentística da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

À Isabel e Regiane, secretárias da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

À Amália e Maria Isabel, secretárias do Departamento de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

À Luiza e Rosângela, funcionárias do Departamento de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	10
1. INTRODUÇÃO	12
2. PROPOSIÇÃO	16
3. MATERIAIS E MÉTODOS	18
3.1 Estudo in vitro	19
3.2 Estudo <i>in situ</i>	25
4. RESULTADOS	31
4.1 Estudo in vitro	32
4.2 Estudo <i>in situ</i>	33
5. DISCUSSÃO	34
6. CONCLUSÕES	40
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42
ANEXO	52

Lepri TP. Influência da associação de fluoretos à irradiação com laser de CO₂ na permeabilidade do esmalte dental erodido. Avaliação *in vitro* e *in situ*. [Dissertação de Mestrado]. Ribeirão Preto, Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo; 2010.

RESUMO

O aumento da prevalência de lesões erosivas tem levado a um crescente interesse por medidas preventivas e para controle de tais lesões. Este estudo avaliou *in vitro* e *in situ* o efeito da associação de fluoretos à irradiação com laser de CO₂ na permeabilidade do esmalte dental erodido. Para o experimento *in vitro*, foram selecionados oitenta fragmentos (n=10) de esmalte bovino (3x2x2 mm). Para formação de lesão de erosão, os espécimes foram submetidos a desafios ácidos iniciais duas vezes ao dia, durante dois dias, através de um regime alternado de erosão e remineralização. Para isso, os espécimes foram imersos individualmente em 20 ml de suco de laranja (pH 3,84) por 5 min sob agitação, enxaguados com água deionizada e armazenados em saliva artificial por 4 h. Os espécimes com as lesões de erosão pré-formadas foram divididos em 4 grupos para serem submetidos aos diferentes tratamentos: amina fluoretada (AmF), tetrafluoreto de titânio (TiF₄), fluoreto de sódio (NaF) e placebo. Metade dos espécimes foi irradiada no modo contínuo com laser de CO₂ ($\lambda = 10.6 \mu\text{m}$; 2.0 W). Após a realização dos tratamentos, foram simulados novos desafios erosivos durante 2 dias, utilizando o mesmo protocolo descrito anteriormente. Terminadas as ciclagens, os espécimes foram preparados para a avaliação da permeabilidade, sendo submetidos ao método de coloração histoquímica. Uma vez obtidos os resultados do estudo *in vitro*, foi conduzido um experimento *in situ* constituído por um delineamento *crossover*, com duas fases de 5 dias cada. No estudo *in situ*, os fatores em estudo foram os tratamentos (TiF₄ e placebo) e a aplicação do laser de CO₂ (presente ou ausente.) Os fragmentos de esmalte bovino foram montados em dispositivo palatino para serem instalados nos participantes para a realização dos desafios erosivos, através da ingestão de 10 alíquotas de 25 ml cada, (9, 11, 13 e 15h). A avaliação da permeabilidade foi realizada conforme descrita para o estudo *in vitro*. Os dados foram analisados através da ANOVA e Tukey. No estudo *in vitro*, houve interação significativa entre fluoreto e laser (p=0,0152). Quando os géis fluoretados foram aplicados sozinhos, TiF₄ promoveu menor permeabilidade do esmalte do que aquela observada após a aplicação do placebo, enquanto resultados intermediários foram

encontrados para os géis de NaF e AmF. Redução na permeabilidade do esmalte foi observada quando a aplicação dos fluoretos foi associada à irradiação com laser de CO₂. No estudo *in situ*, houve efeito significativo da interação entre os fatores fluoreto e laser de CO₂ ($p = 0,0002$). Em relação ao placebo, a aplicação do TiF₄ reduziu significativamente a permeabilidade do esmalte, para substratos irradiados ou não. Mediante a aplicação do placebo, o laser foi capaz de reduzir significativamente a permeabilidade do esmalte, porém, quando se utilizou o TiF₄, a aplicação do laser não implicou em redução da permeabilidade. Combinada à aplicação de gel fluoretado, a irradiação com laser de CO₂ pode representar uma medida adjuvante no controle da permeabilidade do esmalte erodido.

Palavras-chave: esmalte, laser de CO₂, erosão, fluoreto.

Lepri TP. Influence of association of fluoride to CO₂ laser irradiation on permeability of eroded dental enamel. *In vitro* and *in situ* evaluation. [Dissertação de Mestrado]. Ribeirão Preto, Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo; 2010.

ABSTRACT

The increased prevalence of erosive lesion has led to a growing interest of preventive means and to control such lesions. This study evaluated *in vitro* and *in situ* the effect of fluoride compounds combined with a CO₂ laser on permeability of eroded dental enamel. To *in vitro* experiment, 80 bovine enamel slabs (n=10) were selected. To create erosion-like lesions, specimens were submitted to initial erosive challenges, twice a day, during two days, through an alternating erosive and remineralizing regimen. For that, specimens were immersed in 20 ml of orange juice (pH 3.84) for 5 min under agitation, rinsed with deionized water and stored in artificial saliva for 4 h. Specimens with pre-formed lesions were divided into four groups to be treated with different fluoride gels: amine fluoride (AmF), titanium tetrafluoride (TiF₄), sodium fluoride (NaF) and placebo. Half of the specimens were irradiated with CO₂ laser (λ = 10.6 μ m; 2.0 W). Then, specimens were further cycled twice through the previously described erosive-remineralizing regimen. After cycled, specimens were subjected to permeability assessment. Once the results of *in vitro* study were obtained, an *in situ* experiment, consisting of a crossover design, with 2 phases of 5 days each, was performed. To *in situ* study, factors involved were treatments (TiF₄ and placebo) and CO₂ laser irradiation (present or absent). Bovine enamel slabs (n=10) were placed in palatal device to perform erosive challenges. Volunteers ingested orange juice as 250 mL volumes 4 times *per day* (9,11,13,15h). Permeability assessment was performed as described to *in vitro* study. Data were analyzed by ANOVA and Tukey. *In vitro* study demonstrated significant interaction between fluoride and laser (p = 0,0152). When fluoride gels were applied alone, TiF₄ provided to enamel lower permeability than that observed following placebo application, while intermediate results were found to NaF and AmF gels. Reduction of enamel permeability was observed when fluorides were combined to CO₂ laser irradiation. To *in situ* study, there was significant interaction between fluoride and laser (p=0,0002). When compared to placebo, TiF₄ application reduced significantly enamel permeability, regardless of irradiation. Through application of placebo, laser was able to reduce significantly enamel permeability; however, when TiF₄ was

applied, laser irradiation did not decreased permeability. Combined to fluoride gel application, CO₂ laser irradiation can represent an adjunctive way in controlling eroded enamel permeability.

Keywords: enamel, CO₂ laser, erosion, fluoride.

1. Introdução

1. Introdução

O aumento da longevidade dos dentes, resultante do declínio da perda dental (ZERO et al., 2005), e as mudanças nos hábitos dietéticos (MOAZZEZ et al., 2000; WATERHOUSE et al., 2008) por meio do consumo acentuado e frequente de bebidas ácidas, estão relacionados a uma maior prevalência e severidade de lesões não cariosas, tais como a erosão dental. (VAN'T SPIJKER et al., 2009; KREULEN et al., 2010).

Na erosão dental, o contato da superfície do dente com ácidos de origem não bacteriana resulta em uma perda irreversível de tecido dental (IMFELD, 1996) devido a um processo químico. Tal patologia pode ser causada por ácidos intrínsecos, como vômitos recorrentes ou regurgitação do conteúdo gástrico (JARVINEN et al., 1991; SCHEUTZEL, 1996; CORRÊA et al., 2008; SCHLUETER et al., 2010) ou por fatores extrínsecos, que incluem a ingestão de alimentos, medicamentos ou bebidas ácidas (ZERO et al., 1996; DUGMORE e ROCK 2004; EHLEN et al., 2008), sendo a ingestão frequente de bebidas apontada como uma das maiores causas da erosão dental (BARBOUR e REES 2004; HONÓRIO et al., 2010).

A primeira conduta para que se possa viabilizar o controle do desenvolvimento de lesões de erosão é a realização de um diagnóstico preciso a fim de eliminar o fator causal. Quando se trata de erosão causada por ácidos extrínsecos, o ideal seria modificar alguns hábitos dietéticos do paciente, reduzindo a exposição aos ácidos através da diminuição da frequência de ingestão de bebidas e alimentos potencialmente danosos, assim como minimizar o tempo de contato das soluções com as superfícies dentais (LUSSI et al., 2004). Entretanto, devido à restrita contribuição por parte dos pacientes em modificar seus hábitos dietéticos, a busca e instituição de medidas que sejam realmente capazes de prevenir e controlar a erosão dental se faz necessária.

Dentre os recursos terapêuticos estudados, que buscam minimizar os danos causados por desafios erosivos, observa-se o uso de produtos fluoretados (FOWLER et al., 2009; MURAKAMI et al., 2009; HJORTSJÖ et al., 2010; WIEGAND

et al., 2010, LAGERWEIJ et al., 2006; SCHLUETER et al., 2007; VAN RIJKOM et al., 2003; HOVE et al., 2007; GANNS et al., 2008; MAGALHÃES et al., 2007) como aplicações profissionais de géis ou vernizes, o emprego de laser de CO₂ (TSAI et al., 2002) ou mesmo a associação dessas terapias. (WIEGAND et al., 2010a; STEINER-OLIVEIRA et al., 2010).

Alguns estudos relataram que a aplicação de compostos fluoretados como amina fluoretada (AmF) e fluoreto de sódio (NaF) é responsável pela formação de um depósito de fluoreto de cálcio (CaF₂) na superfície de esmalte, tornando-a menos propensa à dissolução (DIJKMAN et al., 1983; GANNS et al., 2008). Fosfato e proteínas podem ser incorporadas ao depósito de CaF₂ e a formação destes composto apresenta uma relação direta com a concentração do fluoreto, o tempo de exposição e o pH do agente tópico. (SAXEGAARD e RØLLA, 1988).

Sabe-se que mais compostos do tipo CaF₂ são formados no esmalte erodido do que no esmalte sadio ou cariado e onde a erosão ocorre o fluoreto é aplicado prioritariamente visando parar a progressão da erosão através da redução da solubilidade ácida da superfície dental.

Além da amina fluoretada e do fluoreto de sódio, o tetrafluoreto de titânio (TiF₄) tem se mostrado promissor para proteger a superfície de esmalte contra desafios erosivos (SCHLUETER et al., 2007; HOVE et al., 2008; VAN RIJKOM et al., 2003).

Após a aplicação do TiF₄ na superfície de esmalte pode ser observada, além da formação de CaF₂, deposição de outros precipitados descritos como duros e hidrofóbicos e muito estáveis em termos químicos e mecânicos (BÜYÜKYILMAZ et al., 1997; SKARTVEIT et al., 1989). Dois mecanismos tem sido propostos para explicar a proteção da superfície pelo TiF₄: um deles seria a ocorrência de uma interação do titânio com proteínas da superfície dental que influenciaria na incorporação de fluoreto (GU et al., 1996); e outra hipótese é que o titânio reage com átomos de oxigênio do grupo fosfato da superfície dental formando óxido de titânio (TVEIT et al., 1988).

Embora a aplicação de fluoretos esteja sendo sugerida como uma opção para controlar a progressão da erosão dental, sua efetividade em reduzir a perda mineral

da superfície de esmalte tem sido questionada (VAN RIJKOM et al., 2003). Uma das maiores desvantagens mencionadas é que a eficácia do flúor em evitar perdas minerais resultantes da erosão é limitada (GANSS et al., 2001), uma vez que a camada de CaF_2 formada quando da aplicação tópica de flúor é supostamente dissolvida ao longo do tempo pela maioria das bebidas ácidas (LARSEN et al., 2001; LARSEN et al., 2002).

Desta forma, devido à instabilidade da proteção aos tecidos dentais proporcionada pelos fluoretos, seria interessante encontrar uma maneira de tornar esta superfície mais estável, e conseqüentemente, mais resistente a desafios ácidos.

Recentemente, observou-se que a irradiação com laser de CO_2 associada a fontes de fluoreto pode induzir uma maior resistência à erosão dos tecidos dentais do que aquela proporcionada pelos tratamentos isolados (STEINER-OLIVEIRA et al., 2010; WIEGAND et al., 2010, TSAI et al., 2002). Observa-se que o emprego do laser de CO_2 não apenas aumenta a deposição de flúor na superfície dental na forma de CaF_2 como também facilita a incorporação do flúor pela rede cristalina do esmalte na forma de apatita fluoretada (CHIN-YING et al., 2004), o que poderia proteger a superfície dos ataques ácidos, inibindo a desmineralização e facilitando a remineralização.

A literatura é escassa de estudos de estudos *in vitro* (STEINER-OLIVEIRA et al., 2010; WIEGAND et al., 2010) e ausente de modelos experimentais *in situ* avaliando o efeito da associação de compostos fluoretados ao laser de CO_2 no controle da progressão das lesões de erosão.

Dessa forma, torna-se necessária a realização de estudos *in vitro* buscando verificar o efeito sinérgico de diferentes tipos de fluoretos com o laser de CO_2 no controle da erosão do esmalte e avalia o comportamento dos fluoretos que apresentarem melhor resultado *in situ*, uma vez que estes representam um estágio intermediário entre estudos *in vitro* e estudos clínicos (SONJU CLASEN e ØGAARD, 1999).

2. Proposição

2. PROPOSIÇÃO

O presente estudo, composto por dois experimentos, teve como objetivo geral avaliar a influência da associação de fluoretos à irradiação com laser de CO₂ na permeabilidade do esmalte dental erodido. Os objetivos específicos foram:

- 1) Avaliar *in vitro* o efeito da associação de diferentes tipos de fluoretos (amina fluoretada, fluoreto de sódio, tetrafluoreto de titânio e placebo) à irradiação com laser de CO₂.
- 2) Avaliar, através de um modelo *in situ*, o efeito da associação do gel de tetrafluoreto de titânio à irradiação com laser de CO₂.

3. Materiais e Métodos

3. MATERIAIS E MÉTODO

3.1 Estudo *in vitro*

Delineamento experimental

Os fatores em estudo foram Fluoretos em 4 níveis [amina fluoretada (AmF); tetrafluoreto de titânio (TiF₄); fluoreto de sódio (NaF) e placebo (P)] e Aplicação do laser de CO₂ em 2 níveis (presente e ausente). A associação entre os dois fatores em estudo formou 8 grupos (n=10), de acordo com um delineamento em blocos completos e casualizados. A variável de resposta foi obtida através da análise de permeabilidade.

Seleção dos dentes

Para a realização do estudo, foram selecionados incisivos bovinos recém-extraídos armazenados em solução timol 0,1% a 4°C (DOMICINI et al., 2001), que foram limpos com o auxílio de pasta de pedra pomes e água com escovas de Robinson e examinados através de estéreo-microscópio (Leica S6 D Stereozoom, Leica Microsystems AG, Switzerland) com aumento de 40X, descartando-se aqueles com trincas ou anomalias de estrutura.

Preparo dos espécimes

Os dentes tiveram suas raízes removidas 2mm abaixo da junção amelo-cementária com um disco diamantado (15HC, Buehler, Alemanha) montado em cortadeira elétrica de precisão (Isomet 1000, Buehler, Alemanha).

As coroas dos dentes bovinos foram seccionadas no sentido mésio-distal de modo a se obter uma secção por dente. Cada secção foi novamente submetida à máquina de corte, no sentido cérvico-incisial, para se obter um fragmento com

dimensões de 3x2x2mm, as quais foram checadas com auxílio de um paquímetro digital (Mitutoyo Sul-americana, Suzano, Brasil), totalizando 80 amostras (n=10).

Os espécimes foram isolados com esmalte para unha ácido-resistente (Colorama, Procosa Produtos de Beleza Ltda, São Paulo, SP, Brasil) em 3 camadas, exceto na superfície vestibular. Após a aplicação do esmalte para unha, os espécimes foram incluídos em resina de poliéster (Milflex Indústria Química, São Bernardo do Campo, SP, Brasil) usando cilindros de policloreto de vinil (PVC) de 2 cm de diâmetro e 1 cm de altura com a superfície de esmalte voltada para cima

Formação das lesões de erosão

Para a criação de lesões de erosão os espécimes foram submetidos a dois desafios erosivos por dia, (às 9h e às 13h) durante um período de dois dias. Cada desafio consistia na imersão individual em 20 mL de suco de laranja puro (pH 3,84; Fazenda Bela Vista, Tapiratiba, SP), sem açúcar ou conservantes em um frasco erlenmeyer, o qual era posicionado em uma máquina agitadora (CT155, Cientec, Piracicaba, SP, Brazil), com velocidade de agitação de 100 rpm durante 5 minutos (AMAECHI et al., 1999; REHDER-NETO et al., 2010). Após cada desafio erosivo, os espécimes foram enxaguados por 10 s com água deionizada e armazenados em 10 mL de saliva artificial a 37°C entre os desafios erosivos e durante a noite.

A saliva utilizada foi a descrita por MCKNIGHT-HANES e WHITFORD (1992) e modificada por AMAECHI et al. (1999). A saliva apresentava em sua composição metilhidroxibenzoato (2,0 g), carboximetilcelulose (10,0 g), KCl (0,625 g); $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ (0,059 g); $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (0,166 g); K_2HPO_4 (0,804 g); e KH_2PO_4 (0,326 g) em 1000 mL de solução aquosa. Antes do primeiro desafio de cada dia a saliva era trocada.

Tratamento superficial

Após a formação das lesões de erosão, os espécimes foram distribuídos em 4 grupos, de acordo com o tipo de fluoreto a ser empregado: amina fluoretada (AmF) (1,25% AmF Elmex Gelée, Gaba, GmBH-Elmex Forschung 79515 Lörrach, Baden-

Württemberg, Alemanha), tetrafluoreto de titânio (TiF_4) (1% TiF_4 , Bioquanti manipulação, Ribeirão Preto, SP, Brasil), fluoreto de sódio (NaF) (1,23% NaF , Bioquanti manipulação, Ribeirão Preto, SP, Brasil) e placebo (P) (mesma composição do gel experimental, exceto pela ausência de fluoreto, Bioquanti manipulação, Ribeirão Preto, SP, Brasil) e subdivididos em 2 grupos, de acordo com a irradiação com laser de CO_2 : I – presente e II- ausente.

Todos os espécimes foram tratados com quantidade padronizada de seu gel de fluoreto em uma aplicação tópica por meio de um microbrush (Microbrush® Regular 2,0mm, Vigodent SA Indústria e Comércio, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) durante 1 minuto. Após esse tempo, o excesso de fluoreto foi removido da superfície com um papel absorvente e metade dos espécimes que receberam aplicação de fluoretos foi submetida à irradiação com laser de CO_2 . A outra metade, não irradiada, foi mantida em umidade relativa durante a irradiação.

O laser de CO_2 utilizado para a irradiação dos espécimes foi o Opus 20 (Opus 20; Opus Dent, Tel Aviv, Israel), que é um sistema que incorpora dois lasers de alta potência em um único aparelho: Er:YAG e CO_2 . Segundo as especificações do fabricante, o laser de CO_2 possui comprimento de onda de 10,6 μm , o modo de emissão pode ser contínuo com potência média de 1 a 10W, ou pulsado com potência entre 1 e 6W e a duração de pulso pode variar de 50 a 500 ms. O diâmetro de saída do feixe de energia do equipamento é de 0,8mm.

A seleção dos parâmetros de irradiação baseou-se em estudos preliminares bem como na tentativa de utilizar menores densidades de energia e, assim, diminuir a possibilidade de ocorrência de danos teciduais e não ablacionar a superfície do esmalte. O laser de CO_2 foi irradiado com a ponta curva metálica, no modo contínuo (CW) de emissão de energia com 2 W de potência, 50ms de duração de pulso por 10 segundos. O laser foi empregado no modo não-contato, desfocado a uma distância de 4mm do substrato (TEPPER et al., 2004), empregando-se um dispositivo que promove a fixação da caneta do laser e mantém a ponta do laser perpendicular ao substrato. Os espécimes foram posicionados em uma base que se movimenta nos eixos x e y.

Desafios erosivos

Após o tratamento da superfície, novos desafios erosivos foram realizados como descrito previamente: dois desafios erosivos por dia (às 9h e 13h), durante um período de 2 dias. Cada desafio consistia na imersão individual em 20 mL de suco de laranja por 5 minutos sob agitação. Após cada desafio erosivo, os espécimes eram enxaguados durante 10 s e armazenados em saliva artificial a 37°C entre os desafios erosivos e durante a noite.

Método de coloração histoquímica

Completados os desafios erosivos, a superfície de esmalte dos espécimes foi delimitada com cera 7 (Cera Rosa 7 Wilson, Polidental Ltda, Cotia, SP, Brasil), ficando exposta apenas uma região circular com 2 mm de diâmetro. Os espécimes foram individualmente imersos em 1 mL de solução aquosa de sulfato de cobre a 1% durante 10 dias, armazenados a 37°C. Após os 10 dias, os espécimes foram retirados da solução de sulfato de cobre, secos com papel absorvente e imersos em 1 mL de solução aquosa de ácido rubiânico a 1% durante 10 dias, armazenados a 37°C. Os íons cobre foram revelados pelo ácido rubiânico, resultando em uma coloração específica, que variou do azul escuro ao preto, dependendo da quantidade de penetração do íon cobre. Após a coloração, os espécimes foram lavados com água destilada por 15 segundos, secos e mantidos individualmente em um recipiente fechado contendo algodão umedecido em amônia durante 7 dias. Protocolo similar de coloração histoquímica foi descrito por CARRASCO et al., 2003 e validado para lesões de erosão por TURSSI et al., 2005.

Avaliação da permeabilidade

Os espécimes foram seccionados com um disco diamantado (15HC, Buehler, Alemanha) montado em cortadeira elétrica de precisão (Isomet 1000, Buehler, Alemanha). Da região circular delimitada, três secções foram obtidas com espessura média de 400µm. Estas espessuras foram reduzidas com lixas d'água em ordem decrescente de granulação (#600 e #1200) para obter espessura aproximada de 200 µm.

As imagens para análise da permeabilidade foram obtidas com o auxílio de uma câmera fotográfica digital (Axiocam MRc, Carl Zeiss, Alemanha) acoplada ao microscópio óptico (Axiolab Plus, Carl Zeiss-Jena- FAPESP -01/05422-3). A avaliação da permeabilidade foi realizada utilizando-se um software (Axiovision 4.6, Carl Zeiss, Alemanha) para a captura e análise da imagem, permitindo a mensuração da extensão da penetração dos íons cobre.

Em cada uma das três secções obtidas para cada unidade experimental, foram realizadas três avaliações da penetração da solução traçadora. A média desses três valores representou a permeabilidade em cada secção. Para cada espécime, foram obtidos, portanto, nove valores de permeabilidade relativa, calculada pela extensão da penetração da solução dividida pela espessura do esmalte.

A Figura 1 apresenta o desenho esquemático da metodologia empregada para o estudo *in vitro*.

Análise estatística

Após checar se as hipóteses de normalidade e homocedasticidade haviam sido cumpridas, os dados de permeabilidade foram analisados pela ANOVA a dois critérios a qual mostrou diferença estatisticamente significativa ($p = 0,0152$). O teste Tukey com nível de significância de 5% foi feito para detectar diferenças. O software Statgraphics Centurion XV (StatPoint Technologies Inc., USA) foi empregado para realizar a análise estatística.

Figura 1. A. Seção dos dentes para obtenção dos fragmentos de esmalte; B. Aferição das dimensões dos espécimes; C. Espécime isolado com esmalte para unha; D. Inclusão do espécime; E. Espécimes sendo submetidos aos desafios erosivos e armazenamento em saliva artificial; F. Espécimes recebendo a aplicação de fluoretos; G. Laser de CO₂; H. Espécimes sendo submetidos aos desafios erosivos e armazenamento em saliva artificial; I. Área circular delimitada; J. Imersão em solução aquosa de sulfato de cobre 1%; K. Imersão em solução alcoólica de ácido rubiânico 1%; L. Seção dos espécimes; M. Obtenção das imagens da permeabilidade.

3.2 Estudo *in situ*

Delineamento experimental

O estudo *in situ* foi realizado através de um delineamento *cross-over* 2x2, duplo-cego, com duas fases de cinco dias cada e um intervalo de dois dias entre elas (*wash-out*). Os fatores em estudo foram Fluoretos em 2 níveis [tetrafluoreto de titânio (TiF_4) e placebo (P)] e Aplicação do laser de CO_2 em 2 níveis (presente e ausente). As unidades experimentais foram 40 fragmentos de esmalte bovino, aleatoriamente distribuídos entre dez voluntários, que utilizaram fragmentos tratados com TiF_4 e TiF_4+CO_2 ou com P e $\text{P}+\text{CO}_2$, de maneira alternada e independente em cada fase experimental, cuja seqüência foi definida por sorteio. Cada grupo experimental foi composto por 10 fragmentos de esmalte bovino, ou dez unidades experimentais ($n = 10$), aleatoriamente divididos entre os dez voluntários, que foram considerados blocos estatísticos. A variável de resposta foi obtida através da análise de permeabilidade.

Seleção dos voluntários

Aspectos éticos

O presente estudo foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da FORP-USP que deliberou aprová-lo (CAAE 0029.0.138.000-09) (Anexo).

Os voluntários foram convidados a participar da pesquisa e esclarecidos quanto à metodologia do experimento, seus riscos e benefícios, sendo também informados sobre seus direitos de desistirem da pesquisa em qualquer fase da execução da mesma. Após as informações recebidas, assinaram um “Termo de Consentimento Livre e Esclarecido”, concordando em participar e colaborar com a realização do experimento.

Critérios de seleção

Para o presente estudo, foram selecionados 10 voluntários de ambos os sexos, residentes na cidade de Ribeirão Preto, com idade entre 18 e 38 anos, que

se enquadraram nos critérios de inclusão e não apresentaram os de exclusão. Previamente à execução do experimento, os voluntários foram submetidos à anamnese e exame clínico criterioso, e à avaliação do fluxo salivar estimulado.

Crítérios de Inclusão	Crítérios de Exclusão
Fluxo salivar estimulado > 0,7mL/min	Uso de medicamentos que interferem na secreção salivar
Disponibilidade para seguir a programação do experimento	Gravidez ou lactação
	Fumantes
Ausência de lesão de cárie ativa	Doenças sistêmicas ou distúrbios de ordem digestiva
Inexistência de lesões não-cariosas e superfícies radiculares expostas	Próteses removíveis, aparelho ortodôntico ou placas oclusais
pH tampão salivar entre 6,5 e 7,0	Radioterapia ou quimioterapia

Obtenção dos modelos de trabalho

Cada voluntário selecionado teve suas arcadas (superior e inferior) moldadas com hidrocolóide irreversível de presa rápida (Tropicalgin; Zhermack, Badia Polesine, Rovigo, Itália). Os moldes foram vazados em gesso-pedra (Velmix; Sybron Kerr, São Paulo, SP, Brasil), obtendo-se os respectivos modelos de trabalho.

Confecção dos dispositivos palatinos

Sobre os modelos de trabalho obtidos, foram confeccionados dispositivos palatinos em resina acrílica autopolimerizável transparente (Ortoclass; Belo Horizonte, MG, Brasil), contendo duas canaletas (20 x 5mm), sendo uma de cada lado da superfície externa do aparelho. Após a confecção e polimento dos dispositivos, foram realizados os ajustes necessários para promover maior conforto aos voluntários.

Seleção dos dentes

A seleção dos dentes foi realizada conforme descrita para o experimento *in vitro*.

Preparo dos espécimes

Os espécimes foram preparados da mesma forma como descrito para o experimento *in vitro*.

Esterilização dos fragmentos

Antes de serem submetidos à formação de lesões de erosão, os fragmentos de esmalte bovino foram esterilizados com óxido de etileno. (TORO et al., 2000) no Departamento de Esterilização em Óxido de Etileno do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP.

Formação das lesões de erosão

As lesões iniciais de erosão foram formadas conforme descrito para o estudo *in vitro*.

Tratamento Superficial

Após a formação de lesões de erosão, os espécimes foram distribuídos em 2 grupos, de acordo com o gel a ser aplicado (TiF_4 ou placebo) e subdivididos em 2 subgrupos, de acordo com a irradiação com laser de CO_2 : presente e ausente.

Os espécimes receberam uma aplicação tópica de gel de tetrafluoreto de titânio ou placebo. Passado o tempo da aplicação, o excesso de TiF_4 /placebo foi removido da superfície com auxílio de um papel absorvente. Metade do total de espécimes que receberam aplicação de cada um dos tipos de gel foi submetida à

irradiação com laser de CO₂ e a outra metade não foi irradiada, tendo permanecido em umidade relativa durante a irradiação.

No experimento *in situ* a irradiação foi realizada com laser de CO₂ modelo PC015-A (Shanghai Jue Hua Laser Tech. Development Co.,Ltd.). Os parâmetros empregados foram: $\lambda = 10,6 \mu\text{m}$, potência de 0,5 W, no modo não -contato, desfocado a uma distância de 4 mm (TEPPER et al., 2004), ultra-pulso por 10 segundos, com duração do pulso de 100 μs , empregando-se um dispositivo que fixa a caneta do laser.

Montagem dos fragmentos nos dispositivos intra-bucais

Os voluntários utilizaram fragmentos tratados com TiF₄ e TiF₄ + laser de CO₂ ou com placebo e placebo + laser de CO₂, de maneira alternada e independente em cada fase experimental, cuja sequência foi definida por sorteio.

Foram posicionadas 2 secções de esmalte em cada dispositivo. A fixação dos fragmentos foi realizada com cera como proposto por TURSSI et al., 2004.

Desafios erosivos – Fase intrabucal

Antes de iniciar os desafios erosivos *in situ* os voluntários receberam dentífrício (Gel Dental Colgate, Colgate-Palmolive, Divisão da Kolynos do Brasil Ltda., Osasco, São Paulo, Brasil) e escova dental (Oral-B Indicator 35, Gillette do Brasil Ltda., Manaus, Amazonas, Brasil) padronizados e foram instruídos a utilizá-lo 2 dias antes do início do experimento (*lead-in*). Os desafios erosivos foram iniciados no primeiro dia de uso do aparelho. Para tal, os voluntários da pesquisa ingeriram 250 mL suco de laranja, em 10 alíquotas de 25mL, 4 vezes ao dia (9h, 11h, 13h e 15h), com o dispositivo palatino posicionado, por um período de 10 dias (2 fases de 5 dias). Os voluntários foram instruídos a gotejar solução de clorexidina 0,2% nos fragmentos duas vezes ao dia, pela manhã (8h) e no fim da tarde (17h) para evitar a formação de biofilme (WEST et al., 1998).

Durante o período experimental, os voluntários puderam higienizar a porção do dispositivo que permanecia em contato com o palato. Entre cada uma das fases

do experimento, foi estabelecido um período de 2 dias de intervalo (*wash-out*), para evitar interferência de um tratamento no outro (efeito *carry over*).

De acordo com sorteio aleatório, metade dos voluntários utilizou, na primeira fase do experimento, os fragmentos que foram expostos ao TiF_4 e a outra metade dos voluntários utilizou o aparelho com os espécimes que foram submetidos ao placebo para evitar que houvesse contaminação entre os tratamentos. Na segunda fase do experimento, os voluntários foram cruzados quanto ao tratamento superficial, de modo que todos fizeram uso de fragmentos de esmalte submetidos a todos os tratamentos superficiais.

Método de Coloração Histoquímica

Finalizada a realização dos desafios erosivos, os espécimes de esmalte foram submetidos aos mesmos métodos de coloração histoquímica descritos para o estudo *in vitro*.

Avaliação da permeabilidade

As análises da permeabilidade foram realizadas conforme descrito para o estudo *in vitro*.

A Figura 2 apresenta o desenho esquemático da metodologia empregada para o estudo *in situ*.

Análise estatística

Após checar se as hipóteses de normalidade e homocedasticidade haviam sido cumpridas, os dados de permeabilidade foram analisados pelo ANOVA dois critérios o qual mostrou diferença estatisticamente significativa ($p = 0,0002$). O teste Tukey com nível de significância de 5% foi feito para detectar diferenças. O software Statgraphics Centurion XV (StatPoint Technologies Inc., USA) foi empregado para realizar a análise estatística.

Figura 2. A. Seção dos dentes para obtenção dos fragmentos de esmalte; B. Aferição das dimensões dos espécimes; C. Espécime isolado com esmalte para unha; D. Espécimes sendo submetidos aos desafios erosivos e armazenamento em saliva artificial; e. Espécimes recebendo a aplicação de fluoretos; F. Laser de CO₂; G. Desafios erosivos *in situ* H. Área circular delimitada; I. Imersão em solução aquosa de sulfato de cobre 1%; J. Imersão em solução alcoólica de ácido rubiânico 1%; K. Seção dos espécimes; L. Obtenção das imagens da permeabilidade.

4. Resultados

4. RESULTADOS

4.1 Estudo *in vitro*

A Anova a dois critérios revelou que houve uma interação significativa entre fluoreto e laser ($p = 0,0152$). O teste Tukey mostrou que quando os géis fluoretados foram aplicados sozinhos, o TiF_4 promoveu menor permeabilidade do esmalte do que a observada após a aplicação do placebo, enquanto resultados intermediários foram encontrados para os géis de NaF e AmF. Foi observada redução da permeabilidade do esmalte quando a aplicação dos fluoretos foi associada à irradiação com laser de CO_2 (Tabela 1).

Tabela 1 - Médias (dp) da permeabilidade do esmalte para os diferentes grupos experimentais (n=10).

Fluoretos \ Laser	LASER de CO_2	
	Ausente	Presente
TiF_4	8,6 Ba (1,7)	6,1 Aa (0,8)
NaF	9,4 Bab (0,9)	5,9 Aa (1,1)
AmF	10,2 Bab (1,2)	7,5 Aa (0,8)
P	10,4 Ab (1,5)	9,3 Ab (1,3)

Letras maiúsculas implicam diferença estatística entre colunas.

Letras minúsculas implicam diferença estatística entre linhas.

4.2 Estudo *in situ*

A Anova a dois critérios demonstrou que houve efeito significativo da interação entre os fatores fluoreto e laser de CO_2 ($p = 0,0002$). Desmembrando-se a interação, o teste Tukey revelou que, em relação ao placebo, a aplicação do TiF_4 reduziu significativamente a permeabilidade do esmalte, para os substratos irradiados ou não. Mediante a aplicação do placebo, o laser do CO_2 foi capaz de

reduzir significativamente a permeabilidade do esmalte, porém, quando se utilizou o TiF_4 , a aplicação do laser não implicou em redução da permeabilidade (Tabela 2).

Tabela 2 - Médias (dp) da permeabilidade do esmalte para os diferentes grupos experimentais (n=10).

Fluoretos	Laser	LASER de CO_2	
		Ausente	Presente
TiF_4		9,6 Aa (0,6)	7,7 Aa (0,4)
Placebo		15,6 Bb (2,3)	10,1 Ab (0,8)

Letras maiúsculas distintas dentro da mesma linha implicam diferença entre CO_2 presente e ausente.
 Letras minúsculas distintas dentro da mesma coluna implicam diferença entre placebo e TiF_4 .

5. Discussão

5. Discussão

Uma vez que o desgaste dental patológico tem sido reconhecido com um problema crescente de saúde bucal, tentativas contínuas tem sido feitas para avaliar as alterações erosivas na superfície de esmalte (NEKRASHEVYCH et al., 2004) e controlá-las por meio de mudanças nos hábitos dietéticos (HOPPER et al., 2007), aplicação tópica de fluoretos (SCHLUETER et al., 2007; HOVE et al., 2007; HOVE et al., 2008) e irradiação com laser de CO₂ (TSAI et al., 2002).

Neste estudo *in vitro* foi encontrada uma redução na permeabilidade do esmalte quando os diferentes tipos de fluoretos foram associados à irradiação com laser de CO₂. Este resultado pode ser justificado com base no fato de que o tratamento com laser de CO₂ pode permitir a formação de micro espaços no tecido duro dos dentes (FOWLER e KURODA 1986), possivelmente aprisionando fluoreto de cálcio na forma de depósito, aumentando a capacidade do reservatório e liberação do fluoreto para o meio bucal (CHIN-YING et al., 2004).

Outro aspecto a ser considerado é que o laser de CO₂ promove alterações ligadas à reatividade ácida do esmalte relacionados às mudanças morfológicas, tais como fusão da superfície (HOSSAIN et al., 1999). Entretanto, tem sido demonstrado que a morfologia superficial do esmalte não precisa ser alterada para reduzir a solubilidade deste tecido (KANTOROWITZ et al., 1998) e que fluências mais baixas do laser podem não promover tais mudanças na superfície do esmalte (ESTEVES-OLIVEIRA et al., 2009).

Recentemente, os resultados obtidos por WIEGAND et al. (2010) mostraram que a irradiação com laser de CO₂ ($\lambda = 10,6 \mu\text{m}$, 2,0 W, 13 seg) associada à amina fluoretada foi incapaz de promover diminuição da erosão do esmalte, divergindo dos resultados encontrados no presente estudo; por outro lado, os resultados obtidos para a superfície de esmalte após a irradiação com laser de CO₂ e tetrafluoreto de titânio foram similares.

STEINER-OLIVEIRA et al. (2010) concluíram que o laser de CO₂ ($\lambda = 10,6 \mu\text{m}$; 3,0 W, 20 seg) sozinho não foi capaz de prevenir a perda da superfície de esmalte devido à erosão, assim como no presente estudo, e que o tratamento com

laser associado ao gel de flúor fosfato acidulado (1,23%) mostrou pequena proteção, e esta ocorreu principalmente devido ao efeito do fluoreto, diferindo dos resultados obtidos no presente estudo, para diferentes fluoretos.

Embora TEPPER et al. (2004) e SCHMIDLIN et al. (2007) relataram que a irradiação com laser de CO₂ ($\lambda = 10,6 \mu\text{m}$; 2,0 W, 15seg) poderia aumentar o efeito protetor da amina fluoretada (1%) na desmineralização do esmalte, no presente estudo a aplicação da amina fluoretada ou do fluoreto de sódio associados à irradiação com laser de CO₂ não reduziu a erosão.

Na ausência de irradiação, o grupo tratado com tetrafluoreto de titânio mostrou permeabilidade significativamente menor do que o placebo, enquanto os valores de permeabilidade para os grupos tratados com fluoreto de sódio e amina fluoretada foram intermediários. Os resultados encontrados para o TiF₄ estão de acordo com estudos *in vitro* que mostraram seu efeito inibitório na erosão, (BÜYÜKYILMAZ et al., 1997; VAN RIJKOM et al., 2003), o qual tem sido atribuído não somente ao efeito do fluoreto, mas também à ação do titânio através de precipitados como óxido de titânio (SHRESTHA et al., 1972) ou complexos organometálicos (SHRESTHA et al., 1972).

Estes precipitados se apresentam como uma camada vítrea, são descritos como duros e hidrofóbicos (MUNDORFF et al., 1972) e parecem ser estáveis frente a influências químicas e mecânicas. Uma hipótese é que a interação entre o TiF₄ e as proteínas da superfície dos dentes influenciam a absorção de fluoreto do TiF₄ (GU et al., 1996) e modificam a formação da camada vítrea (MUNDORFF et al., 1972). Alternativamente, é especulado que compostos de fosfato de titânio são formados (RIBEIRO et al., 2006) ou que o titânio pode substituir o cálcio na estrutura da apatita levando a uma maior resistência ácida. Vários estudos encontraram que o TiF₄ foi igual ou mais efetivo em reduzir lesões de erosão em esmalte do que NaF, AmF ou SnF₂ (YU et al., 2010; VAN RIJKOM et al., 2003; HOVE et al., 2007; HOVE et al., 2008).

O efeito protetor da amina e do fluoreto de sódio em prevenir a erosão está relacionado à formação de uma camada de fluoreto de cálcio (CaF₂) (PETZOLD 2001), a qual atua como uma cobertura protetora que tem que ser dissolvida durante o desafio erosivo antes que o tecido duro dental que está abaixo seja afetado

(GANSS et al., 2007). A mesma tendência foi encontrada por VLACIC et al., 2007, mostrando que a associação de fluoreto de sódio e terapia ativada por laser (comprimentos de onda de 488, 514.5, 532, 633, 670, 830 ou 1064nm) conferiu proteção à superfície de esmalte dental contra a erosão.

Esta camada de fluoreto de cálcio é capaz de proteger a superfície até certo ponto contra a desmineralização, uma vez que ela atua como um reservatório de fluoreto, o qual facilita a reprecipitação de minerais através da formação da fluorapatita ou fluoridroxiapatita, assim prevenindo perdas minerais futuras (RØLLA et al., 1993). Visto que os géis de fluoreto foram aplicados apenas uma vez no presente estudo, pode-se supor que a repetida aplicação dos géis poderia aumentar sua eficácia (LAGERWEIJ et al., 2006).

O protocolo experimental do estudo *in vitro* foi baseado em estudos de MAGALHÃES et al. (2008) e WIEGAND et al. (2009), nos quais as soluções de fluoreto foram aplicadas somente uma vez durante 60 segundos para simular o tempo real de aplicação nas condições clínicas. Como substrato, optou-se por esmalte bovino, uma vez que este é amplamente utilizado em pesquisas para erosão (SOBRAL et al., 2009), já tendo sido validado também para estudos *in situ* (TURSSI et al., 2010). No entanto, amostras bovinas podem ser mais suscetíveis à erosão do que espécimes de esmalte humano (ATTIN et al., 2007) e esta diferença deve ser levada em conta para extrapolação de dados *in vitro* e *in situ* para a situação clínica. A análise de permeabilidade tem sido usada como um método de avaliação para estudos de erosão (ATTIN 2006), uma vez que quanto mais permeável o substrato, mais sujeito ele estará a sofrer dissolução causada por bebidas ácidas.

Após a obtenção dos resultados do estudo *in vitro*, optou-se por empregar um delineamento *in situ*, pois este modelo possibilita a interação do espécime com o ambiente bucal (saliva e biofilme) e o controle das variáveis experimentais, de modo não alcançado com estudos clínicos (ZERO 1995).

Dessa forma, o estudo *in situ* foi projetado para reproduzir a situação clínica na qual a aplicação de fluoreto é associada ao tratamento com laser de CO₂, avaliada através de análise da permeabilidade.

No estudo *in situ* constatou-se que houve efeito significativo da interação entre os fatores fluoreto e laser de CO₂. A aplicação do tetrafluoreto de titânio reduziu significativamente a permeabilidade do esmalte, para substratos irradiados ou não, em relação ao placebo.

Quando a aplicação do placebo foi seguida pela irradiação com laser de CO₂, houve redução significativa da permeabilidade do esmalte. Tal fato pode estar relacionado à redução do conteúdo de carbonato do esmalte, a qual pode tornar este substrato mais resistente aos ácidos (TAGLIAFERRO et al., 2009). Somado a isto, outra hipótese aceita refere-se à inibição da desmineralização, através do derretimento e fusão dos cristais de hidroxiapatita pela irradiação com laser de CO₂ (FERREIRA et al., 1989).

O efeito inibitório do TiF₄ frente a desafios erosivos tem sido demonstrado em estudos *in situ* (HOVE et al., 2008; VAN RIJKOM et al., 2003) e atribuído não somente ao efeito do fluoreto, mas também à ação do titânio através de precipitados como óxido de titânio ou complexos organometálicos (SHRESTHA et al., 1972).

Além disso, os resultados obtidos no estudo *in situ* podem estar relacionados a outros fatores, como por exemplo, a saliva e a película adquirida. Em situações clínicas e *in situ*, a saliva humana é responsável pela formação da película adquirida, a qual, além de modificar o transporte de íons inorgânicos, também reduz consideravelmente os efeitos dos ácidos (HANNING et al., 2004), com sua espessura determinando suas propriedades protetoras (HARA et al., 2006). Esta barreira previne o contato direto entre os ácidos e a superfície dos dentes, reduzindo, portanto, a dissolução da hidroxiapatita. A proteção de superfícies dentais pela película adquirida está bem fundamentada na literatura e tem sido demonstrada por vários estudos. (HANNING e BALZ 2001; HANNING et al., 2004, GANSS et al., 2007).

O protocolo experimental do estudo *in situ* foi baseado em estudos de WEST et al. (1998) e TURSSI et al. (2010), nos quais os voluntários ingeriam 10 alíquotas de 25ml de suco de laranja, 4 vezes ao dia. Os espécimes não foram escovados em nenhum momento do experimento, para que não houvesse associação de dois tipos de desgaste, erosivo e abrasivo. No entanto, para evitar a formação de biofilme nos

espécimes, solução de clorexidina 0,2% era aplicada nos espécimes por 3 minutos no começo e ao final de cada dia do experimento.

Os resultados da presente pesquisa abrem perspectivas para que estudos futuros sejam conduzidos com o objetivo de investigar o mecanismo de ação da associação de fluoretos ao laser de CO₂ no controle da progressão de lesões de erosão nos tecidos dentais. Cumpre ressaltar que comparações mais apropriadas dos resultados dessa pesquisa com aqueles relatados na literatura não puderam ser realizados em virtude da falta de trabalhos *in situ* utilizando o laser de CO₂ no controle da erosão. Ademais, os achados da literatura são conflitantes sob muitos aspectos, especialmente no que se refere ao comprimento de onda dos equipamentos e parâmetros de irradiação do laser de CO₂.

6. Conclusões

6. CONCLUSÕES

Considerando os resultados obtidos e as condições empregadas neste estudo, pode-se concluir que:

- 1- De acordo com o estudo *in vitro*, a irradiação com laser de CO₂ associada à aplicação de géis fluoretados pode representar uma medida adjuvante no controle da permeabilidade do esmalte dental erodido.
- 2- Baseado no estudo *in situ*, conclui-se que o tetrafluoreto de titânio (1%) proporcionou menor permeabilidade ao esmalte, independente da aplicação do laser de CO₂.

7. Referências Bibliográficas

7. Referências Bibliográficas*

1. AMAECHI, B.T.; HIGHAM, S.M.; EDGAR, W.M. Factors influencing the development of dental erosion in vitro: enamel type, temperature and exposure time. **Journal of Oral Rehabilitation**, v.26, n.8, p.624-630, 1999.
2. ATTIN, T. Methods for assessment of dental erosion. **Monogr Oral Science**, v.20, p.152-172, 2006.
3. ATTIN, T.; WEGEHAUPT, F.; GRIES, G.; WIEGAND, A. The potential of deciduous and permanent bovine enamel as substitute for deciduous and permanent human enamel: erosion-abrasion experiments. **Journal of Dentistry**, v.35, n.10, p.773-777, 2007.
4. BARBOUR, M.E.; REES, J.S. The laboratory assessment of enamel erosion: a review. **Journal of Dentistry**, v.32, n.8, p.591-602, 2004.
5. BÜYÜKYILMAZ, T.; OGAARD, B.; RØLLA, G. The resistance of titanium tetrafluoride-treated human enamel to strong hydrochloric acid. **European Journal of Oral Science**, v.105, n.5, p.473-477, 1997.
6. CARRASCO, L.D.; FRONER, I.C.; CORONA, S.A.; PÉCORA, J.D. Effect of internal bleaching agents on dentinal permeability of non-vital teeth: quantitative assessment. **Dental Traumatology**, v.19, n.2, p.85-89, 2003.
7. CHIN-YING, S.H.; XIAOLI, G.; JISHENG, P.; WEFEL, J.S. Effects of CO₂ laser on fluoride uptake in enamel. **Journal of Dentistry**, v.32, n.2, p.161-167, 2004.
8. CORRÊA, M.C.; LERCO, M.M.; HENRY, M.A. Study in oral cavity alterations in patients with gastroesophageal reflux disease. **Arquivos de Gastroenterologia**, v.45, n.2, p.132-136, 2008.

* De acordo com as normas da ABNT

9. DIJKMAN, A.G.; DE BOER, P.; ARENDS, J. *In vivo* investigation on the fluoride content in human enamel after topical applications. **Caries Research**, v.17, n.5, p.392-402, 1983.
10. DOMICINI, J.T.; ELEAZER, P.D.; CLARK, S.J.; STAAT, R.H.; SCHEETZ, J.P. Disinfection/sterilization of extracted teeth for dental student use. **Journal of Dental Education**, v.65, n.11, p.1278-80, 2001.
11. DUGMORE, C.R.; ROCK, W.P. A multifactorial analysis of factors associated with dental erosion. **Brazilian Dental Journal**, v.196, n.5, p.283-286, 2004.
12. EHLEN, L.A.; MARSHALL, T.A.; QIAN, F.; WEFEL, J.S.; WARREN, J.J. Acidic beverages increase the risk of in vitro tooth erosion. **Nutrition Research**, v.28, n.5, p.299-303, 2008.
13. ESTEVES-OLIVEIRA, M.; ZECELL, D.M.; MEISTER, J.; FRANZEN, R.; STANZEL, S.; LAMPERT, F.; EDUARDO, C.P.; APEL, C. CO₂ Laser (10.6 microm) parameters for caries prevention in dental enamel. **Caries Research**, v.43, n.4, p.261-268, 2009.
14. FERREIRA, J.M.; PALAMARA, J.; PHAKEY, P.P.; RACHINGER, W.A.; ORAMS, H.J. Effects of continuous-wave CO₂ laser on the ultrastructure of human dental enamel. **Archives of Oral Biology**, v.34, n.7, 551-562, 1989.
15. FOWLER, B.O.; KURODA, S. Changes in heated and in laser-irradiated human tooth enamel and their probable effects on solubility. **Calcified Tissue International**, v.38, n.4, p.197-208, 1986.
16. FOWLER, C.E.; GRACIA, L.; EDWARDS, M.I.; WILSON, R.; BROWN, A.; REES, G.D. Inhibition of dental erosion and promotion of lesion rehardening by fluoride a white light interferometry and microindentation study. **Journal of Clinical Dentistry**, v.20, n.6, p.178-185, 2009.
17. GANSS, C.; KLIMEK, J.; SCHÄFFER, U.; SPALL, T. Effectiveness of two fluoridation measures on erosion progression in human enamel and dentine in vitro. **Caries Research**, v.35, n.5, p.325-330, 2001.

18. GANSS, C.; SCHLUETER, N.; KLIMEK, J. Retention of KOH-soluble fluoride on enamel and dentine under erosive conditions: a comparison of in vitro and in situ results. **Archives of Oral Biology**, v.52, n.1, p.9-14, 2007.
19. GANSS, C.; SCHLUETER, N.; HARDT, M.; SCHATTENBERG, P.; KLIMEK, J. Effect of fluoride compounds on enamel erosion in vitro: A comparison of amine, sodium and stannous fluoride. **Caries Research**, v. 42, n.1, p.2-7, 2008.
20. GU, Z.; LI, J.; SÖREMARK, R. Influence of tooth surface conditions on enamel fluoride uptake after topical application of TiF_4 in vitro. **Acta Odontologica Scandinavica**, v.54, n.5, p.279-281, 1996.
21. HANNIG, M.; BALZ, M. Protective properties of salivary pellicles from two different intraoral sites on enamel erosion. **Caries Research**, v.35, n.2, p.142-148, mar./abr.2001.
22. HANNIG, M.; FIEBIGER, M.; GÜNTZER, M.; DÖBERT, A.; ZIMEHL, R.; NEKRASHEVYCH, Y. Protective effect of the in situ formed short-term salivary pellicle. **Archives of Oral Biology**, v.49, n.11, p.903-910, 2004.
23. HARA, A.T., ANDO, M., GONZÁLEZ-CABEZAS, C., CURY, J.A., SERRA, M.C., ZERO, D.T. The protective effect of the enamel pellicle against erosive challenges in situ. **Journal of Dental Research**, v.85, n.7, p.612-616, 2006
24. HJÖRTSJÖ, C.; JONSKI, G.; YOUNG, A.; SAXEGAARD, E. Effect of acidic fluoride treatments on early enamel erosion lesions – A comparison of calcium and profilometric analyses. **Archives of Oral Biology**, 2010. No prelo.
25. HONÓRIO, HM.; RIOS, D.; JÚNIOR, E.S.; DE OLIVEIRA, D.S.; FIOR, F.A.; BUZALAF, M.A. Effect of acidic challenge preceded by food consumption on enamel erosion. **European Journal of Dentistry**, v.4, n.4, p.412-417, 2010.
26. HOOPER, S.; HUGHES, J.; PARKER, D.; FINKE, M.; NEWCOMBE, R.G.; ADDY, M.; WEST, N. A clinical study in situ to assess the effect of a food approved polymer on the erosion potential of drinks. **Journal of Dentistry**, v.35, n.6, p.541-546, 2007.

27. HOSSAIN, M.; NAKAMURA, Y.; KIMURA, Y.; MITSUHIRO, I.; YAMADA, Y.; MATSUMOTO, K. Acquired acid resistance of dental hard tissues by CO₂ laser irradiation. **Journal of Clinical Laser Medicine and Surgery**, v.17, n.5, p.223–226, 1999.
28. HOVE, L.H.; HOLME, B.; YOUNG, A.; TVEIT, A.B. The erosion-inhibiting effect of TiF₄, SnF₂, and NaF solutions on pellicle-covered enamel in vitro. **Acta Odontologica Scandinavica**, v.65, n.5, p.259-64, 2007.
29. HOVE, L.H.; HOLME, B.; YOUNG, A.; TVEIT, A.B. The protective effect of TiF₄, SnF₂ and NaF against erosion-like lesions in situ. **Caries Research**, v.42, n.1, p.68-72, 2008.
30. IMFELD, T. Dental erosion. Definition, classification and links. *European Journal of Oral Science*, v.104, n.2, p.151-155, 1996.
31. JARVINEN, V.; RYTOMAA, I.; HEINONEN, O.P. Risk factors in dental erosion. **Journal of Dental Research**, v.70, n.6, p.942-947, 1991.
32. KANTOROWITZ, Z.; FEATHERSTONE, J.D.B.; FRIED, D. Caries prevention by CO₂ laser treatment: dependency on the number of pulses used. **Journal of American Dental Association**, v.129, n.5, p.585-591, 1998.
33. KREULEN, C.M.; VAN'T SPIJKER, A.; RODRIGUEZ, J.M.; BRONKHORST, E.M.; CREUGERS, N.H.; BARTLETT, D.W. Systematic review of prevalence of tooth wear in children and adolescents. **Caries Research**, v.44, n.2, p. 151-159, 2010.
34. LAGERWEIJ, M.D.; BUCHALLA, W.; KOHNKE, S.; BECKER, K.; LENNON, A.M.; ATTIN, T. Prevention of erosion and abrasion by a high fluoride concentration gel applied at high frequencies. **Caries Research**, v.40, n.2, p.148-153, 2006.
35. LARSEN, M.J. Prevention by means of fluoride of enamel erosion as caused by soft drinks and orange juice. **Caries Research**, v.35, n.3, p. 229-234, 2001.

36. LARSEN, M.J.; RICHARDS, A. Fluoride is unable to reduce dental erosion from soft drinks. **Caries Research**, v.36, n.1, p.75-80, 2002.
37. LUSSI, A.; JAEGGI, T.; ZERO, D. The role of diet in the aetiology of dental erosion. **Caries Research**, v.38, p.34-44, 2004. Supplement 1.
38. MAGALHÃES, A.C.; STANCARI, F.H.; RIOS, D.; BUZALAF, M.A. Effect of an experimental 4% titanium tetrafluoride varnish on dental erosion by a soft drink. **Journal of Dentistry**, v.35, n.11, p.858-861, 2007.
39. MAGALHÃES, A.C.; RIOS, D.; HONÓRIO, H.M.; JORGE JR, A.M.; DELBEM, A.C.; BUZALAF, M.A. Effect of 4% titanium tetrafluoride solution on dental erosion by a soft drink: an in situ/ex vivo study. **Archives of Oral Biology**, v.53, n.5, p.399-404, mai.2008.
40. MCKNIGHT-HANES, C.; WHITFORD, G.M. . Fluoride release from three glass ionomer materials and the effect of varnishing with or without finishing. **Caries Research**, v.26, n.5, p.345-50, 1992.
41. MOAZZEZ, R.; SMITH, B.G.N.; BARTLETT, D.W. Oral pH and drinking habit during ingestion of a carbonated drink in group of adolescents with dental erosion. **Journal of Dentistry**, v. 28, n.6, p.395–397, 2000.
42. MUNDORFF, S.A.; LITTLE, M.F.; BIBBY, B.G. Enamel dissolution. II. Action of titanium tetrafluoride. **Journal of Dental Research**, v.51, n.6, p.1567–1571, 1972.
43. MURAKAMI, C.; BÖNECKER, M.; CORRÊA, M.S.; MENDES, F.M.; RODRIGUES, C.R. Effect of fluoride varnish and gel on dental erosion in primary and permanent teeth. **Archives of Oral Biology**, v.54, n.11, p.997-1001, 2009.
44. NEKRASHEVYCH, Y.; HANNIG, M.; STÖSSER, L. Assessment of enamel erosion and protective effect of salivary pellicle by surface roughness analysis

- and scanning electron microscopy. **Oral Health and Preventive Dentistry**, v.2, n.1, p.5-11, 2004
45. PETZOLD, M. The influence of different fluoride compounds and treatment conditions on dental enamel: a descriptive in vitro study of the CaF₂ precipitation and microstructure. **Caries Research**, v.35, p.45–51, 2001. Supplement 1.
 46. REHDER-NETO, F.C.; TURSSI, C.P.; SERRA, M.C. Erosion-like lesions progression in human and bovine enamel. **International Journal of Dentistry**, v.9, n.1, p.16-20, 2010.
 47. RIBEIRO, C.C.; GIBSON, I.; BARBOSA, M.A. The uptake of titanium ions by hydroxyapatite particles: structural changes and possible mechanisms. **Biomaterials**, v.27, n.9, p.1749-1761, 2006.
 48. RØLLA, G.; ØGAARD, B.; CRUZ, R.A. Topical application of fluorides on teeth: new concepts of mechanisms of interaction. **Journal of Clinical Periodontology**, v.20, n.2, p.105-108, fev.1993.
 49. SAXEGAARD, E.; RØLLA, G. Fluoride acquisition on and in human enamel during topical application in vitro. **Scandinavian Journal of Dental Research**, v.96, n.6, p.523-535, 1988.
 50. SCHEUTZEL, P. Etiology of dental erosion—intrinsic factors. **European Journal of Oral Science**, v.104, n.2, p.178-190, 1996.
 51. SCHLUETER, N.; GANSS, C.; MUELLER, U.; KLIMEK, J. Effect of titanium tetrafluoride and sodium fluoride on erosion progression in enamel and dentine in vitro. **Caries Research**, v.41, n.2, p.141-145, 2007.
 52. SCHLUETER, N.; HARDT, M.; KLIMEK, J.; GANSS, C. Influence of the digestive enzymes trypsin and pepsin in vitro on the progression of erosion in dentine. **Archives of Oral Biology**, v.55, n.4, p.294-299, 2010.
 53. SCHMIDLIN, P.R., 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 and Preventive Dentistry**, v.5, n.3, p.201-208, 2007.

54. SHRESTHA, B.M.; MUNDORFF, S.A.; BIBBY, B.G. Enamel Dissolution: I. Effects of various agents and titanium tetrafluoride. **Journal of Dental Research**, v.51, n.6, p.1561, 1972.
55. SKARTVEIT, L.; TVEIT, A.B.; KLINGE, B.; TOTDAL, B.; SELVIG, K.A. In vivo uptake and retention of fluoride after a brief application of TiF_4 to dentin. **Acta Odontologica Scandinavica**, v.47, n.2, p.65-68, 1989.
56. SOBRAL, M.A.; LACHOWSKI, K.M.; DE ROSSI, W.; BRAGA, S.R.; RAMALHO, K.M. Effect of Nd:YAG laser and acidulated phosphate fluoride on bovine and human enamel submitted to erosion/abrasion or erosion only: an in vitro preliminary study. **Photomedicine Lasers and Surgery**, v.27, n.5, p.709-713, 2009.
57. SONJU CLASEN, A.B.; ØGAARD, B. Experimental intraoral caries models in fluoride research. **Acta Odontologica Scandinavica**, v.57, 334-341, 1999.
58. STEINER-OLIVEIRA, C.; NOBRE DOS SANTOS, M.; ZERO, D.T.; ECKERT, G.; HARA, A.T. Effect of pulsed CO_2 laser and fluoride on the prevention of enamel and dentine erosion. **Archives of Oral Biology**, v.55, n.2, p.127-133, 2010.
59. TAGLIAFERRO, E.P.S.; RODRIGUES, L.A.; SOARES, L.E.; MARTIN, A.A.; NOBRE-DOS-SANTOS, M. Physical and compositional changes on demineralized primary enamel induced by CO_2 laser. **Photomedicine and Laser Surgery**, v.27, n.4, p.858-890, 2009.
60. TEPPER, S.A.; ZEHNDER, M.; PAJAROLA, G.F.; AND SCHMIDLIN, P.R. Increased fluoride uptake and acid resistance by CO_2 laser-irradiation through topically applied fluoride on human enamel in vitro. **Journal of Dentistry**, v.32, n.8, p.635-641, 2004.
61. TORO, M.J.; LUKANTSOVA, L.L.; WILLIAMSON, M.; ECKERT, G.J.; DUNIPACE, A.J. In vitro fluoride dose-response study of sterilized enamel lesions. **Caries Research**, v.34, n.3, p.246-53, 2000.

62. TSAI, C.L.; LIN, Y.T.; HUANG, S.T.; CHANG, H.W. In vitro acid resistance of CO₂ and Nd-YAG laser-treated human. **Caries Research**, v.36, n.6, p.423-429, 2002.

63. TURSSI, C.P.; FARAONI, J.J.; RODRIGUES JR, A.L.; SERRA, M.C. An in situ investigation into the abrasion of eroded dental hard tissues by a whitening dentifrice. **Caries Research**, v.38, n.5, p.473-477, 2004.

64. TURSSI, C.P.; ALVES, V.D.; SERRA, M.C. Suitability of bovine root dentin for studies on permeability of erosion lesions. **Caries Research**, v.39, 287-340, 2005. Abstract 132.

65. TURSSI, C.P.; MESSIAS, D.F. CORONA, S.M.; SERRA, M.C. Viability of using enamel and dentin from bovine origin as a substitute for human counterparts in an intraoral erosion model. *Brazilian Dental Journal*, 2010. No prelo.

66. TVEIT, A.B.; KLINGE, B.; TOTDAL, B.; SELVIG, K.A. Long-term retention of TiF₄ and SnF₂ after topical application to dentin in dogs. **Scandinavian Journal of Dental Research**, v.96, n.6, p.536-540, 1988.

67. VAN RIJKOM, H.; RUBEN, A.J.V.; HUYSMANS, M.C.; TRUIN, G.J.; MULDER, J. Erosion-inhibiting effect of sodium fluoride and titanium tetrafluoride treatment in vitro. **European Journal of Oral Science**, v.111, n.3, p.253-257, 2003.

68. VAN'T SPIJKER, A.; RODRIGUEZ, J.M.; KREULEN, C.M.; BRONKHORST, E.M.; BARTLETT, D.W.; CREUGERS, N.H. Prevalence of tooth wear in adults. **International Journal of Prosthodontics**, v.22, n.1, p.35-42, 2009.

69. VLACIC, J.; MEYERS, I.A.; WALSH, L.J. Laser-activated fluoride treatment of enamel as prevention against erosion. **Australian Dental Journal**, v.52, n.3, p.175-180, 2007.

70. ZERO, D. T. In situ caries models. **Advance in dental research**, v.9, n.3, p. p.214-230, 1995.

71. ZERO, D.T. Etiology of dental erosion—extrinsic factors. **European Journal of Oral Science**, v.104, n.2, p.162-177, 1996.
72. ZERO, D.T.; LUSI, A. Erosion – chemical and biological factors of importance to the dental practitioner. **International Dental Journal**, v.55, n.4, p.285-290, 2005. Supplement 1.
73. WATERHOUSE, P.J.; AUAD, S.M.; NUNN, J.H.; STEEN, I.N.; MOYNIAH, P.J. Diet and dental erosion in young people in south-east Brazil. **International Journal of Paediatric Dentistry**, v.18, n.5, p.353-360, 2008.
74. WEST, N.X.; MAXWELL, A.; HUGHES, J.A. PARKER, D.M.; NEWCOMBE, R.G.; ADDY, M. A method to measure clinical erosion: the effect of orange juice consumption on erosion of enamel. **Journal of Dentistry**, v.26, n.4, p.329-335, 1998.
75. WIEGAND, A.; WALDHEIM, E.; SENER, B.; MAGALHÃES, A.C.; ATTIN, T. Comparison of the effects of TiF_4 and NaF solutions at pH 1.2 and 3.5 on enamel erosion in vitro. **Caries Research**, v.43, n.4, p.269–277, 2009.
76. WIEGAND, A.; HIESTAND, B.; SENER, B.; MAGALHÃES, A.C.; ROOS, M.; ATTIN, T. Effect of TiF_4 , ZrF_4 , HfF_4 and AmF on erosion and erosion/abrasion of enamel and dentin in situ. **Archives of Oral Biology**, 2010. No prelo.
77. WIEGAND, A.; MAGALHÃES, A.C.; NAVARRO, R.S.; SCHMIDLIN, P.R.; RIOS, D.; BUZALAF, M.A.; ATTIN, T. Effect of titanium tetrafluoride and amine fluoride treatment combined with carbon dioxide laser irradiation on enamel and dentin erosion. **Photomedicine Lasers and Surgery** v.28, n.2, p.219-226, abr.2010a.
78. YU, H.; ATTIN, T.; WIEGAND, A.; BUCHALLA, W. Effects of various fluoride solutions on enamel erosion in vitro. **Caries Research**, v.44, n.4, p.390-401, 2010.

ANEXO – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
Avenida do Café, s/nº - Telefone: (016) 3602-3963
14040-904 - Ribeirão Preto - SP - Brasil
Fax: (016) 3633-0999

OF.CEP/177/FORP

Ribeirão Preto, 16 de abril de 2009.

Senhora Professora,

Ref.: Processo nº 2009.1.385.58.1
CAAE nº 0029.0.138.000-09

A pedido da Profa. Dra. Cláudia Helena Lovato da Silva, Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa, desta Faculdade, informamos que o referido Comitê em sua 97ª Sessão, realizada em 16 de abril de 2009, **aprovou** o projeto de pesquisa intitulado: **"Influência da associação de diferentes tipos de fluoretos à irradiação com laser de CO₂ no controle da progressão de lesões de erosão. Avaliação in vitro e in situ"**.

Na oportunidade, lembramos da necessidade de entregar na Secretaria do Comitê, com o formulário preenchido pelo pesquisador responsável, o **Relatório Parcial** no dia **30 de abril de 2010** e o **Relatório Final** no dia **30 de abril de 2011**.

Atenciosamente,

Glaucia Della Rosa
 Secretária do Comitê de Ética em Pesquisa

Ilma Sra
Profa. Dra. SILMARA APARECIDA MILORI CORONA
 Professora Associada do Departamento de Odontologia Preventiva - FOP/UNP
Assinatura do Comitê de Ética em Pesquisa - Universidade de São Paulo - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto