UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

ANA BÁRBARA DE ARAÚJO LOIOLA

Influência do modo de emissão do pulso do laser de CO₂ e do flúor
fosfato acidulado no controle da desmineralização do esmalte – análise
in vitro e *in situ*

Ribeirão Preto
2012

ANA BÁRBARA DE ARAÚJO LOIOLA

Influência do modo de emissão do pulso do laser de CO₂ e do flúor
fosfato acidulado no controle da desmineralização do esmalte – análise
in vitro e *in situ*

Dissertação apresentada à Faculdade de
Odontologia de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo, para a
obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Odontologia
Restauradora - Dentística

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Silmara Aparecida
Miloni Corona

Ribeirão Preto
2012

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

Catálogo da Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto

Loiola, Ana Bárbara de Araújo.

Influência do modo de emissão do pulso do laser de CO₂ e do flúor fosfato acidulado no controle da desmineralização do esmalte - análise in vitro e in situ/ Ana Bárbara de Araújo Loiola; orientadora Prof.^a Dr.^a Silmara Aparecida Milori Corona. Ribeirão Preto, 2012.

75f. : il.; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto / USP. Área de concentração: Odontologia Restauradora - Opção: Dentística.

1. Cárie dentária. 2. Laser. 3. Flúor. 4. Esmalte. 5. Microbiologia.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: LOIOLA, Ana Bárbara de Araújo

Título: Influência do modo de emissão do pulso do laser de CO₂ e do flúor fosfato acidulado no controle da desmineralização do esmalte – análise *in vitro* e *in situ*

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovada em: _____ / _____ / _____

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

DEDICO ESTE TRABALHO

Aos meus pais, **Tomás e Inêz** que estiveram todo o tempo ao meu lado, me incentivando e dando forças para que eu alcançasse meu objetivo. Muito obrigada por tudo.

AMO VOCÊS!!

Agradecimentos Especiais

Agradeço a Deus, por me guiar na escolha de meus caminhos, me dar força e determinação para superar todas as dificuldades encontradas.

À minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Silmara Aparecida Milori Corona, pela confiança, dedicação e disposição em me auxiliar sempre que preciso. Obrigada pela oportunidade de trabalharmos juntas e por tudo que me ensinou nesse período.

À Prof.^a Dr.^a Carolina Patrícia Aires, obrigada pelos ensinamentos, pela colaboração em meu trabalho e pela paciência que sempre teve comigo.

Aos voluntários deste trabalho, Júlia, Renata, Carolina, Camila, Ana Laura, Mariana Trevisan, Mariana, Rodrigo, Danie, Lucas, Alexandre, Tamires e Marina, obrigada pela colaboração, pela paciência e boa vontade na realização deste estudo. Mais uma vez não tenho palavras pra agradecer!

Às amigas Renata Scatolin, Taísa Lepri e Ana Carolina Santos, obrigada pela colaboração e disponibilidade em me auxiliar sempre que preciso. Obrigada também pela companhia e pelos momentos agradáveis que passamos juntas.

À todos os meus colegas de mestrado, que de alguma forma contribuíram para meu enriquecimento como estudante e profissional.

Agradecimientos

À Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - USP, 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 - USP, na pessoa da Prof.^a Dr.^a Léa Assed Bezerra da Silva.

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

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

Aos Professores do Departamento de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - USP.

Aos Profs. Drs. César Bataglion, Luiz Carlos Pardini, Manoel Damião de Sousa Neto, Marcelo Mazzeto, Marco Antonio Moreira Rodrigues da Silva, Maria Cristina Borsatto, Mônica Campos Serra, Regina Guenka Palma-Dibb, Ricardo Gariba Silva, Silmara Aparecida Milori Corona, pela agradável convivência nas disciplinas e pelos conhecimentos transmitidos durante a pós-graduação.

Às Profas. Dras. Rita de Cássia Loiola Cordeiro e Lourdes Aparecida Martins dos Santos-Pinto, que me orientaram durante a graduação, transmitiram grandes ensinamentos e de alguma forma contribuíram para que eu conseguisse chegar até aqui.

Ao Antonio Luiz Rodrigues Junior, pela valiosa colaboração na análise estatística deste trabalho.

Aos colegas de mestrado e doutorado César Lepri, Daniel Galafassi, Antuanett Cornejos, Júlia Sanches, Juliana Derceli, Juliana Faraoni, Késsia Mesquita, Carolina

Rodrigues, Camila Scatena, Rodrigo Valério pelo convívio e disponibilidade em me ajudar sempre que precisei.

Ao Carlos, secretário do Curso de Pós-Graduação em Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo - USP, por ser sempre tão prestativo e paciente comigo.

À técnica Patrícia Marchi, do Laboratório de Pesquisa em Dentística da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - USP, pela amizade, paciência e disponibilidade em auxiliar com os aparelhos no laboratório e preparar as soluções sempre que precisei.

Aos funcionários do Departamento de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - USP, pela atenção e disposição.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - USP, pelo apoio constante e dedicação aos alunos.

À FAPESP pela concessão bolsa de estudo e auxílio financeiro que permitiu a realização deste trabalho, maior dedicação ao curso de pós-graduação e a possibilidade da realização de mais um dos meus objetivos.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, seja pela ajuda constante ou por uma palavra de amizade.

Επίγραφε

“De longe, o maior prêmio que a vida oferece é a chance de trabalhar muito e se dedicar a algo que valha a pena.”

Theodore Roosevelt

RESUMO

LOIOLA, A.B.A. Influência do modo de emissão do pulso do laser de CO₂ e do flúor fosfato acidulado no controle da desmineralização do esmalte – Análise *in vitro* e *in situ*. 2012. 75f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

Diante da importância e prevalência da cárie dentária, e da ausência de estudos na literatura sobre a influência do modo de emissão do pulso do laser de CO₂ no controle da desmineralização do esmalte, o objetivo do presente estudo foi avaliar *in vitro* e *in situ* os diferentes modos de emissão do pulso do laser de CO₂ associados ou não ao flúor fosfato acidulado 1,23%, no controle da desmineralização do esmalte. Os fatores em estudo foram o modo emissão do pulso do laser CO₂ ($\lambda = 10,6 \mu\text{m}$, 1 W, no modo não-contato, desfocado a uma distância de 4 mm) em 4 níveis (A. contínuo, B. pulso repetido, C. ultra pulso, D. ausência de irradiação – controle) e tratamento superficial em 2 níveis [A. gel de flúor fosfato acidulado a 1,23% (FFA), B. gel placebo – controle (PLA)]. Para o estudo *in vitro*, cento e vinte fragmentos de esmalte bovino foram submetidos a desafio cariogênico (solução desmineralizante pH 5,0 por 6 h e solução remineralizante pH 7,0 por 18 h a 37°C) e distribuídos aleatoriamente nos grupos de acordo com o tratamento realizado. A microdureza subsuperficial foi avaliada a 30 μm da superfície, realizando-se três medidas a 100 μm de distância uma da outra, em 4 momentos: 1 - inicial para seleção dos espécimes, 2 - após desafio cariogênico inicial, 3 - após tratamento superficial e 4 - após desafio cariogênico final. Microscopia eletrônica de varredura foi utilizada para obtenção de imagens representativas. Os dados de microdureza foram analisados pelo método de Análise de Variância (ANOVA) e encontrou que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos (0,3864). O estudo *in situ* caracterizou um delineamento *cross-over* 2x2, duplocego, com duas fases de 14 dias cada e um intervalo de 14 dias entre elas (*washout*). Para isso, 11 voluntários (n=11) utilizaram um dispositivo palatino contendo blocos de esmalte bovino que foram previamente submetidos a ciclagem de pH e a seguir receberam um dos tratamentos: flúor fosfato acidulado 1,23% (FFA) + laser de CO₂, flúor fosfato acidulado 1,23% (FFA), gel placebo (PLA) + laser de CO₂ e gel placebo (PLA). Biofilme foi acumulado sobre os blocos e 8 vezes ao dia os voluntários gotejaram solução de sacarose, simulando um desafio cariogênico. No 14º dia o biofilme formado sobre os blocos de esmalte foi coletado para análise microbiológica. Foi realizada análise de microdureza subsuperficial em dois momentos: 1 – Inicial e 2 - Final. Microscopia eletrônica de varredura foi utilizada para análise qualitativa das superfícies de esmalte. A análise de Variância (ANOVA) avaliou os dados de microdureza e mostrou que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos (p=0,3017). Para análise microbiológica foi utilizado o teste Kruskal-Wallis e o resultado não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos na contagem de *Streptococcus mutans* (p= 0,9521) e Lactobacilos (p=0,8552). Assim, podemos concluir que no presente estudo o laser de CO₂ e o FFA não controlaram a desmineralização do esmalte dentário e a formação do biofilme formado *in situ*, independente do modo de emissão do pulso do laser de CO₂ utilizado.

Palavras-chave: Cárie dentária, laser, flúor, esmalte, microbiologia.

ABSTRACT

LOIOLA, A. B. A. Influence of pulse emission mode of CO₂ laser and the acidulated phosphate fluoride in the control of enamel demineralization – Analysis *in vitro* and *in situ* 2012. 75f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

Due to the importance and prevalence of dental caries, and the absence of studies in the literature about the influence of pulse emission mode of CO₂ laser to control enamel demineralization, the purpose of this study was to evaluate *in vitro* and *in situ* different pulse emission mode of CO₂ laser with or without 1.23% acidulated phosphate fluoride, in the control of enamel demineralization. The factors studied were the CO₂ laser pulse mode (λ = 10.6 μ m, 1 W, in a non-contact, blurry at a distance of 4 mm) at 4 levels (A. continuous B. repeated pulse, C. ultra-pulse, D. absence of irradiation - control) and surface treatment at 2 levels (A. 1.23% acidulated phosphate fluoride gel, B. placebo gel - control). For the *in vitro* study, 120 bovine enamel slabs were subjected to cariogenic challenge (demineralizing solution pH 5.0 for 6 h and remineralizing solution pH 7.0 for 18 h at 37°C) and randomly assigned into groups according to the treatment. The subsurface microhardness was measured at 30 μ m from surface, performing three steps of 100 micrometers away from one another, in 4 moments: 1 - initial (to select the specimens), 2 - after initial cariogenic challenge, 3 - after surface treatment and 4 - after final cariogenic challenge. Scanning electron microscopy was employed to obtain representative images. Analysis of Variance (ANOVA) evaluated the microhardness data and found that there was no statistically significant difference between groups (0,3864). The *in situ* study design featured a 2x2 cross-over, double-blind, with two phases of 14 days and a 14 day washout. For this, 11 volunteers (n = 11) wore palatal appliances containing bovine enamel blocks that were previously subjected to pH cycling and then received one of the treatments: 1.23% acidulated phosphate fluoride (APF) + CO₂ laser, 1.23% acidulated phosphate fluoride, placebo gel (PLA) + CO₂ laser and placebo gel (PLA). Biofilm was accumulated on the blocks and 8 times a day the volunteers trickled sucrose solution, simulating a cariogenic challenge. In 14 days the biofilms formed on the enamel blocks were collected for microbiological analysis. The subsurface microhardness was measure at 2 moments: 1 – Initial and 2 – Final. Scanning electron microscopy was used for qualitative analysis of the enamel surfaces. Analysis of Variance (ANOVA) evaluated the microhardness data and showed no statistically significant difference between groups (p=0.3017). For microbiological analysis, Kruskal-Wallis test showed no statistically significant difference between the count of *Streptococcus mutans* (p=0.9521) and lactobacilli (p=0.8552). Thus, it can be concluded that in this study the CO₂ laser and the APF did not control tooth enamel demineralization and the formation of biofilm *in situ*, regardless of the pulse emission mode of CO₂ laser used

Keywords: dental caries, laser, fluoride, enamel, microbiology.

SUMÁRIO

1. Introdução.....	15
2. Proposição.....	21
3. Materiais e Métodos.....	25
4. Resultados.....	39
5. Discussão.....	53
6. Conclusão.....	59
Referências Bibliográficas.....	63
Anexo A – Aprovação do Comitê de Ética.....	73
Anexo B - Resultados da ANOVA de delienamento split-plot dos resultados de microdureza do estudo <i>in vitro</i>	74
Anexo C – Resultados da ANOVA de delienamento split-plot dos resultados de microdureza do estudo <i>in situ</i>	75

Introdução

1. INTRODUÇÃO

A cárie é uma doença infecto-contagiosa caracterizada pela desmineralização dos tecidos dentários. Existe uma associação de fatores que favorecem sua instalação e torna o indivíduo susceptível, como a interação da dieta rica em carboidratos (principalmente a sacarose) com a microbiota cariogênica, associada ao ambiente favorável oferecido pelo hospedeiro (Amore et al., 2000; Perito et al., 2009).

A diminuição na prevalência da doença cárie observada nas últimas décadas tem sido relacionada ao amplo uso de fluoretos, uma vez que o contato com estes produtos aumenta a presença de flúor na saliva e no biofilme dentário, interferindo no processo desmineralização (Paes Leme et al., 2007). No entanto, o flúor não consegue impedir completamente o desenvolvimento de lesões de cárie (Rodrigues et al., 2007) e por isso outros métodos de controle da desmineralização vêm sendo utilizados, como o laser de CO₂.

O laser de CO₂ possui comprimentos de onda ($\lambda = 9,3, 9,6, 10,3$ e $10,6 \mu\text{m}$) eficazes em esmalte dentário por produzirem radiação na região do espectro infravermelho muito próximo às bandas de absorção da hidroxiapatita, (Featherstone et al., 1998; Kantorowitz et al., 1998). A prevenção de lesões cariosas por este método é obtida pela modificação da estrutura do esmalte, tornando-o mais ácido-resistente (Fried et al., 2006; Apel et al., 2004; Goldberg et al., 2008; Steiner-Oliveira et al., 2006; Souza-Gabriel et al., 2010).

O efeito térmico do laser de CO₂ pode levar ao aumento de resistência do esmalte a ação dos ácidos (Fox et al., 1992; Phan et al., 1999), uma vez que, com o aquecimento da superfície dentária há redução no conteúdo de carbonato e desnaturação parcial da matriz do esmalte (Featherstone e Nelson, 1987), o que diminui a permeabilidade e dificulta a difusão dos ácidos, diminuindo a desmineralização da estrutura (Can et al., 2008; Esteves-Oliveira et al., 2009). Além disso, a redução da solubilidade do esmalte pode ser ocasionada pela fusão e derretimento da superfície e aumento dos cristais de hidroxiapatita (Hossain et al., 2001; Can et al., 2008).

A irradiação com laser de CO₂ combinada com fontes de fluoreto pode induzir uma maior resistência ácida dos tecidos dentários do que aquela proporcionada pelos tratamentos isolados (Rodrigues et al., 2006; Steiner-Oliveira et al., 2008), promovendo maior incorporação de flúor no esmalte e menor desenvolvimento de trincas (Tepper et al., 2004). A associação entre o laser de CO₂ e o fluoreto para redução da solubilidade do esmalte apresenta sinergismo que produz precipitados esféricos que morfologicamente lembram

fluoreto de cálcio, funcionando como reservatório de flúor (Hossain et. al., 2002; Esteves-Oliveira et al., 2011). Além disso, o laser de CO₂ aumenta a incorporação de flúor dentro da estrutura cristalizada de hidroxiapatita, formando a fluorapatita e por isso é necessário que o flúor esteja presente no momento da irradiação (Meurman et. al., 1997).

Para o controle da desmineralização do esmalte, o laser de CO₂ opera no modo não contato, podendo ser utilizado no modo contínuo (Hsu et al., 2000; Schmidlin et al., 2007; Souza-Gabriel et al., 2010; Sol et al., 2011) ou pulsado (Nelson et al., 1986; Nelson et al., 1987; Kantorowitz et al., 1998; Featherstone et al., 1998; Hsu et al., 2001; Nobre dos Santos et al., 2001; Klein et al., 2005; Rodrigues et al., 2006; Steiner-Oliveira et al., 2006; Tagliaferro et al., 2007; Rechmann et al., 2011a). Alguns parâmetros têm sido muito estudados, como comprimento de onda (Featherstone e Nelson, 1987; McCormack et al., 1995; Fried et al., 1998; Kantorowitz et al., 1998; Featherstone et al., 1998) e potência (Read et al., 1995; Hossain et al., 1999; Chin-Ying et al., 2004; Klein et al., 2005; Steiner-Oliveira et al., 2006), no entanto, os diferentes modos de emissão do pulso do laser de CO₂ ainda não foram estudados. No modo contínuo a energia é emitida continuamente, com potência definida sobre o laser. No modo pulsado a energia é emitida em pulsos curtos, de alta intensidade e um determinado número de pulsos por segundo. O feixe de laser permanece inativo entre os pulsos (Gonzalez et al., 1996). Outro modo de emissão de pulso que vem sendo muito utilizado é o ultra-pulso, que são pulsos de curta duração, com intervalo suficiente para permitir o resfriamento do tecido entre os pulsos (Ahrari et al., 2012). A interação do modo ultra-pulso com os tecidos produz pouco aquecimento e menores efeitos colaterais (Sakr, 2012).

A luz laser é bactericida e estudos têm mostrado sua efetividade contra os organismos causadores da cárie e inflamações dentárias (Turkun et al., 2006), uma vez que o laser destrói a bactéria através do resultado da vaporização instantânea da água intracelular (Sui et al., 2009). Por esse motivo, o laser tem sido testado como alternativa para reduzir infecções bacterianas em odontologia. No entanto, o efeito do laser de CO₂ sobre as bactérias do biofilme dentário é escasso na literatura e importante de ser estabelecida, pois algumas espécies de bactérias são resistentes aos agentes bacterianos normalmente utilizados (Sol et al., 2011).

Em se tratando da doença cárie, a frequência de exposição aos carboidratos fermentáveis (principalmente a sacarose) está diretamente relacionada a mudanças microbiológicas do biofilme, selecionando bactérias acidogênicas e acidúricas, como os *Streptococcus mutans* e os Lactobacilos (Tenuta et al., 2006). A fermentação de carboidratos

no metabolismo anaeróbio destas bactérias resulta em produção de ácidos, o que diminui o pH e causa subsaturação do cálcio e do fosfato na superfície dentária, levando a desmineralização (Leites et al., 2006).

Neste contexto, tendo em vista a ausência de informação sobre o modo de emissão do pulso do laser de CO₂ mais eficaz no controle da progressão de lesões de cárie e a possibilidade da associação ao flúor fosfato acidulado trazer maiores benefícios à estrutura dentária, o objetivo deste estudo foi avaliar *in vitro e in situ* os diferentes modos de emissão do pulso do laser de CO₂, associados ao flúor fosfato acidulado 1,23%, no controle da desmineralização do esmalte dentário e do biofilme formado *in situ*.

Proposição

2. PROPOSIÇÃO

O objetivo geral do presente estudo foi avaliar os diferentes modos de emissão do pulso do laser de CO₂ e do flúor fosfato acidulado a 1,23% no controle da desmineralização do esmalte dentário. Para tanto, foi dividido em dois experimentos:

1 – Avaliação *in vitro* da influência do modo de emissão do pulso do laser de CO₂ (contínuo, pulsado, ultra-pulso e ausência de irradiação) e do flúor fosfato acidulado 1,23% no controle da desmineralização do esmalte por meio de análise da microdureza do esmalte dentário.

2 – Avaliação *in situ* da influência do modo de emissão do pulso do laser de CO₂ (contínuo, pulsado, ultra-pulso e ausência de irradiação) e do flúor fosfato acidulado 1,23% no controle da desmineralização do esmalte por meio de análise da microdureza do esmalte dentário e análise microbiológica do biofilme formado.

Materiais e Métodos

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Estudo in vitro

Delineamento experimental

Os fatores em estudo foram o modo de emissão do pulso do laser CO₂ em 4 níveis (A. contínuo, B. pulso repetido, C. ultra pulso, D. ausência de irradiação – controle) e tratamento superficial em 2 níveis [A. gel de flúor fosfato acidulado a 1,23% (FFA), B. gel placebo – controle (PLA)]. O laser de CO₂ foi aplicado com comprimento de onda $\lambda = 10,6 \mu\text{m}$ e potência de 1W (Tagliaferro, 2007). A amostra do experimento foi composta por 120 fragmentos de esmalte bovino (n=15). O delineamento foi em blocos completos casualizados e a variável de resposta foi obtida por meio da análise da microdureza subsuperficial (30 μm da superfície), empregando o microdurômetro. Microscopia eletrônica de varredura superficial foi realizada para avaliação qualitativa da superfície de esmalte.

Seleção e preparo das amostras

Para a realização do estudo, foram selecionados incisivos bovinos recém extraídos que foram submetidos à limpeza com curetas periodontais e armazenados em solução de timol a 0,1% a 9°C (Kwon et al., 2005). A ausência de trincas, hipoplasia e hipomineralização foi comprovada através de inspeção em lupa estereoscópica com aumento de 20x (Leica, S6 D Stereozoom, Leica Microsystems AG, Suíça). Posteriormente, os dentes foram seccionados no sentido mesio-distal em cortadeira de precisão, refrigerada a água (Isomet 1000; Buehler, Lake Bluff, IL, EUA), obtendo-se fragmentos de esmalte (3x3x2 mm), totalizando 120 espécimes. Os fragmentos foram fixados em matrizes de Teflon utilizando cera fundida com as subsuperfícies voltadas para o meio externo. Em seguida, as subsuperfícies foram polidas em Politriz giratória (DP-9U2; Struers S/A, Copenhagen, Dinamarca) refrigerada à água com lixas d'água de granulação 1200 (Hermes Abrasives Ltd., VA, EUA) e pasta de alumina 0.3- μm (Arotec S/A Ind. Com., São Paulo, Brasil) em feltro polidor (ATM, Altenkirchen, Alemanha) (Hara et al., 2003). Para padronização da amostra, foram realizadas três leituras na lateral dos fragmentos (subsuperfícies) distantes 30 μm da superfície e a 100 μm uma da outra no microdurômetro HMV-2000 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão) (Hara et al., 2003) com penetrador de diamante para dureza Knoop (KHN) e célula de carga de 25 gramas durante 5 segundos (Klein et al., 2005; Rodrigues et al., 2006). A média das 3 medidas foi

utilizada como o valor de microdureza do fragmento, sendo que os fragmentos que apresentaram valor médio 10% superior ou inferior ao valor da média geral de todos os fragmentos foram descartados (Hara et al., 2006). Cento e vinte fragmentos dentários foram selecionados baseados nos valores de dureza Knoop da subsuperfície, uma vez que a superfície não recebeu polimento e foi, então, submetida ao desafio cariogênico.

Desafio cariogênico inicial

Com o objetivo de se obterem lesões iniciais microscópicas de mancha branca padronizadas, simulando pacientes com alta atividade da doença cárie, foi realizado desafio cariogênico artificial em todos os fragmentos de esmalte. Para tal propósito, os espécimes foram fixados em hastes metálicas com cera para fundição. Essas hastes foram, por sua vez, fixas à recipiente plástico, de modo que apenas as superfícies de esmalte ficaram expostas. Os espécimes foram ciclados durante 5 dias conforme o protocolo descrito por Featherstone et al. (1986) e modificado por Serra e Cury (1992). Neste modelo, lesões de cárie artificial são produzidas pela imersão dos fragmentos em solução desmineralizante (pH 5,0 por 6 h) e solução remineralizante (pH 7,0 por 18 h) a 37°C.

Análise de microdureza após desafio cariogênico inicial

Finalizado o desafio cariogênico inicial, novas leituras de microdureza foram realizadas, como descrito anteriormente.

Tratamento superficial

De acordo com o delineamento de blocos completos e casualizados (sequência de tratamento determinada através de sorteio aleatório), os espécimes preparados foram divididos em 2 grupos, de acordo com o tratamento superficial realizado em 2 níveis (A. gel de flúor fosfato acidulado a 1,23%, B. gel placebo – controle). Assim, metade dos espécimes foi submetida a uma aplicação de gel de flúor fosfato acidulado a 1,23% (DFL, Jacarepaguá, RJ, Brasil) por 1 minuto (Bonow et al., 2002). Foi aplicado 0,1 g produto com microbrush (Dentsply Ind. Com. Ltda, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) na superfície seca do esmalte. Após esse tempo, o gel foi removido da superfície com auxílio de papel absorvente. A outra metade dos fragmentos de dentes bovinos recebeu aplicação de gel placebo (Da Terra Farmácia de

Manipulação, Ribeirão Preto, SP, Brasil) com a mesma composição do gel experimental, exceto pela adição de fluoretos. Foi seguido o mesmo protocolo empregado para aplicação do FFA. Após a aplicação dos géis, os fragmentos foram subdivididos em 4 subgrupos, de acordo com o tipo de pulso do laser CO₂ em 4 níveis (A. contínuo, B. pulso repetido, C. ultra pulso, D. ausência de irradiação – controle). A irradiação foi realizada com laser de CO₂ com $\lambda = 10,6 \mu\text{m}$, com potência de com 1 W (Tagliaferro, 2007), no modo não-contato, desfocado a uma distancia de 4 mm do esmalte (Tepper et al., 2004), empregando-se um dispositivo que fixa a caneta do laser. Os espécimes foram posicionados num dispositivo de varredura automática (MPC, ElQuip, São Carlos, SP, Brasil), controlada por meio de um microcomputador, que se movimenta, segundo comandos previamente estabelecidos, para a direita e para a esquerda, para frente e para trás, permitindo que a irradiação alcance toda a área de maneira homogênea.

Análise de microdureza após tratamento superficial

Após o tratamento superficial as análises de microdureza foram novamente realizadas.

Desafio cariogênico pós-tratamento superficial

Os espécimes foram fixados novamente nas hastes metálicas presas ao dispositivo plástico e todas as faces, exceto a superfície tratada, foram cobertas com cera de fundição. A ciclagem de pH foi realizada do mesmo modo descrito anteriormente, porém, desta vez o tempo foi de 14 dias, com o objetivo de simular um alto desafio cariogênico (Featherstone e Nelson, 1987).

Análise da Microdureza Final

Após o período de desafio cariogênico, a análise da microdureza foi realizada como descrito anteriormente. A média dos 3 valores da microdureza de cada espécime foi empregada na análise estatística.

Microscopia eletrônica de varredura superficial

Para esta análise foram utilizados dois espécimes de cada um dos tratamentos realizado, totalizando 16 espécimes. Os fragmentos foram colocados nos frascos de

Eppendorff com água destilada e preparados de acordo com o seguinte protocolo: limpeza em ultra-som (Ultrasonic Cleaner T-1449-D, Odontobrás, Ribeirão Preto, SP, Brasil) por 10 minutos; secagem com papel absorvente; aplicação de gel de EDTA por 30 segundos; imersão em solução de glutaraldeído a 2,5% tamponado com solução de cacodilato de sódio AA 0,1M com pH 7,4 (Merck KGaA, Darmstadt, D-64293, Alemanha) em temperatura de 4°C por 12 horas; lavagem com água destilada por 3 minutos, seguida de imersão em água destilada por 1 hora, com trocas a cada 20 minutos; desidratação em graus ascendentes de etanol (Labsynth Ltda., Diadema, SP, Brasil): 25% (20 min), 50% (20 min), 75% (20 min), 95% (30 min), 100% (60 min). Após a desidratação, os espécimes foram imersos em solução de HMDS (Merck KGaA, Darmstadt, D-64293, Alemanha) por 10 minutos para secagem química. Todos esses procedimentos foram realizados no interior de uma capela. Após a secagem, os corpos-de-prova foram fixados em stubs com fita dupla-face de carbono e a cobertura com ouro foi realizada em aparelho de metalização a vácuo (Bal-Tec, SCD 050 Sputter Coater, Fürstentum, Liechtenstein). Os espécimes foram levados ao microscópio eletrônico de varredura (Zeiss, EVO 50, Cambridge, UK) pertencente ao Laboratório de Microscopia Eletrônica de Varredura do Departamento de Química/FFCLRP – USP. Foi realizada a varredura de toda a superfície do espécime e, em seguida, a área mais representativa de cada grupo foi fotografada com aumento de duas mil vezes (X2000). A análise de microscopia eletrônica de varredura foi utilizada como análise qualitativa.

Análise estatística

A análise estatística dos dados de microdureza foi realizada pelo método de Análise Variância (ANOVA) para delineamento de parcelas subdivididas (split-plot). Tal análise foi usada por terem sido feitas análises repetidas de microdureza no mesmo corpo de prova. Além disso, foi utilizado o teste de Bonferroni para estudar as diferenças entre as quatro análises de microdureza realizadas dentro de cada grupo experimental.

Fluxograma estudo *in vitro*

A – Incisivo bovino; **B** – Secção dos dentes e obtenção dos fragmentos; **C** – Análise de microdureza inicial; **D** – Desafio cariogênico inicial (solução desmineralizante e solução remineralizante); **E** – Análise de microdureza após desafio cariogênico inicial; **F** – Tratamento superficial com FFA ou PLA+ irradiação com laser de CO₂ nos modos contínuo, pulso repetido ou ultra-pulso, ou ausência de irradiação; **G** – Análise de microdureza após tratamento superficial; **H** – Desafio cariogênico final; **I** – Análise de microdureza final.

Estudo *in situ*

Delineamento experimental

O estudo *in situ* caracterizou um delineamento *cross-over* 2x2, duplo-cego, com duas fases de 14 dias cada e um intervalo de 14 dias entre elas (*wash-out*). Os fatores em estudo foram tratamento superficial a ser realizado em 2 níveis (A. gel de flúor fosfato acidulado a 1,23%, B. gel placebo – controle) e irradiação com laser de CO₂ [contínuo, pulso repetido, ultra-pulso e ausência de irradiação (controle)]. Foram utilizados 224 fragmentos de esmalte bovino aleatoriamente distribuídos entre 11 voluntários, que utilizaram fragmentos irradiados e não irradiados, tratados ou não com flúor fosfato acidulado a 1,23%, distribuídos de maneira alternada e independente em cada fase experimental, cuja sequência foi definida por sorteio. Cada grupo experimental foi composto por fragmentos de esmalte bovino aleatoriamente divididos entre os 11 voluntários, que foram considerados blocos estatísticos. No 14º dia o biofilme formado sobre os blocos de esmalte foi coletado para análise microbiológica (Cury et al., 2000). A microdureza subsuperficial foi realizada como variável de resposta. Microscopia eletrônica de varredura superficial foi utilizada para análise qualitativa das superfícies de esmalte.

Seleção dos voluntários

Aspectos éticos

Os voluntários foram 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.

Crítérios de seleção

Para o presente estudo, foram selecionados 11 voluntários de ambos os sexos, residentes na cidade de Ribeirão Preto, com idade entre 18 e 28 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.

Critérios de Inclusão	Critérios de Exclusão
Fluxo salivar estimulado entre 1,6 e 2,3mL/min	Doenças sistêmicas e distúrbios de ordem digestiva
Disponibilidade para seguir a programação estabelecida para o Experimento	Uso de medicamentos que interferem na secreção salivar
	Gravidez ou lactação
Ausência de lesão de cárie ativa	Fumantes
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

Confecção dos dispositivos intrabucais

Cada voluntário selecionado teve a arcada superior e inferior moldadas com hidrocolóide irreversível (Jeltrate Tipo II, Dentisply Indústria e Comércio Ltda., Petrópolis, RJ, Brasil). Os moldes foram vazados em gesso-pedra (Herodent, Vigodent S/A Ind. Com., Rio de Janeiro, RJ, Brasil), obtendo-se os respectivos modelos de trabalho. Foram confeccionados dispositivos em resina acrílica autopolimerizável (Jet, Artigos Odontológicos Clássico Ltda., São Paulo, SP, Brasil), constituídos de uma placa palatina. Foram preparados nichos na superfície externa dos dispositivos, sendo distribuídos dos lados esquerdo e direito, para a fixação dos fragmentos de esmalte. Os blocos foram fixados 2,0 mm abaixo da superfície da resina e foram cobertos por uma tela plástica, permitindo o acúmulo de placa bacteriana sobre os mesmos (Hara et al., 2003).

Preparo dos fragmentos de esmalte

Para a realização do estudo, foram selecionados incisivos bovinos recém-extraídos que foram submetidos à limpeza com curetas periodontais, seguida de profilaxia com pedra-pomes e água e taça de borracha em baixa rotação e armazenados em solução de timol a 0,1% a 9°C (Kwon et al., 2005). A ausência de trincas, hipoplasia e hipomineralização foi comprovada através de inspeção em lupa estereoscópica com aumento de 20x (Leica, S6 D Stereozoom, Leica Microsystems AG, Suíça). Posteriormente, os dentes foram seccionados no sentido méso-distal em cortadeira de precisão, refrigerada a água (Isomet 1000, Buehler, Lake Bluff, IL, EUA), obtendo-se fragmentos de esmalte (3x3x2 mm).

Planificação e polimento

Os fragmentos foram fixados em matrizes de Teflon utilizando cera fundida com as subsuperfícies voltadas para o meio externo. Em seguida, as subsuperfícies foram polidas em Politriz giratória (DP-9U2; Struers S/A, Copenhagen, Dinamarca) refrigerada à água com lixas d'água de granulação 1200 (Hermes Abrasives Ltd., VA, EUA) e pasta de alumina 0.3- μm (Arotec S/A Ind. Com., São Paulo, Brasil) em feltro polidor (ATM, Altenkirchen, Alemanha) (Hara et al., 2003).

Análise da microdureza inicial

A análise da microdureza foi realizada da mesma forma descrita no estudo *in vitro*.

Esterilização dos fragmentos

Antes de serem inseridos na cavidade bucal dos pacientes, os fragmentos de esmalte bovino foram esterilizados em microondas a 650 W por três minutos, como descrito por Viana (2009). Foram excluídos aqueles que apresentaram trincas após a esterilização.

Desafio cariogênico inicial

Assim como no estudo *in vitro*, os espécimes foram ciclados durante 5 dias conforme o protocolo descrito por Featherstone et al. (1986) e modificado por Serra e Cury (1992), onde as lesões de cárie artificial são produzidas pela imersão dos fragmentos em solução desmineralizante (pH 5,0, por 6 h) e solução remineralizante (pH 7,0, por 18 h) a 37°C.

Tratamento superficial

Os espécimes foram aleatoriamente divididos em 2 grupos de acordo com o tratamento superficial a ser realizado: I. Gel de flúor fosfato acidulado 1,23% (FFA), II. Gel placebo – controle (PLA). Assim, metade dos espécimes foi submetida a uma aplicação de um gel de flúor fosfato acidulado a 1,23% por 1 minuto (Bonow et al., 2002), como descrito no estudo *in vitro*. Após esse tempo, o gel foi removido da superfície com auxílio de papel absorvente. A aplicação do gel placebo foi realizada da mesma maneira. Finalizada a aplicação do gel, os fragmentos foram subdivididos em 4 grupos, de acordo com o tipo de pulso do laser CO₂ em 4 níveis (A. contínuo, B. pulso repetido, C. ultra pulso, D. ausência de irradiação – controle). A irradiação foi realizada de acordo com os mesmos parâmetros do estudo *in vitro*.

Fase intra-bucal

Foi realizado período de calibração (*lead in*) de 7 dias (Rodrigues et al., 2006), onde os voluntários foram instruídos a utilizar a escova dental (Oral-B Indicator 35, Gillette do Brasil Ltda., Manaus, Amazonas, Brasil) e o dentífrico (Gel Dental Colgate, Colgate-Palmolive, Divisão da Kolynos do Brasil Ltda., Osasco, São Paulo, Brasil) fornecidos pela pesquisadora. Após este período, foi verificada a adaptação intra-bucal dos dispositivos e os ajustes necessários foram realizados. As placas palatinas foram então instaladas nos participantes.

A sequência do tratamento utilizada por cada voluntário foi determinada em sorteio aleatório. Na primeira fase do experimento, metade dos voluntários utilizou os tratamentos com os diferentes modos de emissão do pulso do laser de CO₂ (contínuo, pulsado, pulso repetido e ausência de irradiação) associados ao FFA e a outra metade utilizou os tratamentos com os diferentes modos de emissão do pulso do laser de CO₂ (contínuo, pulsado, pulso repetido e ausência de irradiação) associados ao PLA. Ao final do experimento, todos os voluntários utilizaram dispositivos com todos os tratamentos.

O aparelho instalado foi utilizado por 14 dias e o desafio cariogênico iniciou no segundo dia de cada fase. Os voluntários foram instruídos a remover o dispositivo palatino e gotejar solução de sacarose 20% oito vezes ao dia, em cada um dos fragmentos (às 8:00; 9:30; 11:00; 14:00; 15:30; 17:00; 19:00 e 21:00 horas). Cinco minutos depois, o dispositivo era reinserido na cavidade bucal (Paes Leme et al., 2004). Durante o período experimental, os voluntários higienizaram a porção do dispositivo que permanecer em contato com o palato. Entre cada uma das fases do experimento houve um período de 14 dias de intervalo (*wash-out*), para evitar interferência de um tratamento no outro (efeito *carry over*) (Rodrigues et al., 2006).

Após o período de desafio cariogênico os fragmentos foram removidos para análise da microdureza.

Coleta do biofilme dental

Ao final dos 14 dias, 10 horas após a última exposição aos tratamentos, em jejum e sem escovar os dentes, as telas plásticas que cobrem as cavidades do dispositivo dos voluntários foram removidas. A placa dental formada sobre os blocos de esmalte foi coletada e as análises de microbiologia foram realizadas. Após a coleta do biofilme, os blocos dentários foram retirados dos dispositivos, limpos e fixados à uma peça de acrílico para determinação da microdureza após os tratamentos.

Análise microbiológica

O biofilme foi pesado ($\pm 0,01$ mg) em eppendorffs de 1,5 mL pré-pesados aos quais foi acrescentado 1 mL de solução de NaCl 0,9 %. As amostras foram sonicadas (Digital Sonifier® Unit, modelo S-150D, Branson Ultrasonics Corporation, Danbury, CT, USA) com potência de 7 Watts por 60s (Aires et al., 2008) e a suspensão resultante foi diluída em série (1:1, 1:10, 1:100 e 1:1000) com NaCl 0,9%. As amostras foram plaqueadas em Mitis Salivarius Ágar com bacitracina para determinar *Streptococcus mutans* (Gold et al., 1973) e em Rogosa para determinar Lactobacilos. As placas foram incubadas por 48 h à 37° C em estufa anaeróbica (IG 150, Jouan) com 10% de CO₂. As colônias foram contadas utilizando um contador de colônias. A contagem da população de microrganismos foi expressa em unidades formadoras de colônia (UFC) por mg de peso de placa.

Análise da Microdureza

A análise da microdureza foi realizada conforme descrito anteriormente. A média dos 3 valores de cada fragmento foi utilizada na análise estatística.

Microscopia Eletrônica de Varredura Superficial

Os espécimes foram submetidos à MEV para a obtenção de imagens representativas da mesma forma descrita para o estudo *in vitro*.

Análise estatística

A análise estatística dos dados de microdureza foi realizada pelo método de Análise Variância (ANOVA) com dois fatores. Como o resultado desta análise não mostrou resultados significativos, nenhum outro teste foi realizado. Os dados da análise microbiológica foram avaliados pelo teste de Kruskal-Wallis, teste não-paramétrico, uma vez que os números desta análise apresentaram grande variabilidade. O diagrama de Box-plot foi utilizado para ilustrar os resultados observados nas variáveis de microdureza e na contagem de *Streptococcus mutans* e Lactobacilos.

Fluxograma estudo *in situ*

A – Incisivo bovino; **B** – Secção dos dentes e obtenção dos fragmentos; **C** – Análise de microdureza inicial; **D** – Desafio cariogênico inicial (solução desmineralizante e solução remineralizante); **E** - Tratamento superficial com FFA ou PLA+ irradiação com laser de CO₂ nos modos contínuo, pulso repetido ou ultra-pulso, ou ausência de irradiação; **F** – Confecção dos dispositivos palatinos e fixação dos fragmentos; **G** – Instalação do dispositivo palatino; **H** – Fase intra-bucal; **I** – Análise de microdureza final.

Resultados

4. RESULTADOS

Estudo *in vitro*

Análise de Microdureza

A Análise de Variância (ANOVA) a dois critérios não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratados com os diferentes modos de emissão do pulso do laser de CO₂ (contínuo, pulso repetido, ultra-pulso e ausência de irradiação), associados ao FFA ou PLA, nas diferentes análises de microdureza (inicial, após desafio cariogênico inicial, após tratamento superficial e após desafio cariogênico final) realizadas (0,3864). Os valores de médias e desvios padrão de cada grupo estão representados na Tabela 1, juntamente com os resultados do teste de Bonferrone, que representa as diferenças entre as análises de microdureza realizadas em cada grupo.

Tabela 1 – Médias e desvios padrão da microdureza nas diferentes análises realizadas nos grupos tratados com os diferentes modos de emissão do pulso do laser de CO₂ (contínuo, pulso repetido, ultra-pulso e ausência de irradiação) associados ao FFA ou PLA.

Tratamentos	Análises de microdureza			
	Inicial	Após desafio cariogênico	Após tratamento superficial	Final
FFA + contínuo	270.40 (27.89) ^A	178.26 (60.30) ^{AB}	237.22 (89.96) ^{BC}	244.97 (47.31) ^C
FFA + pulso repetido	288.24 (18.51) ^A	167.64 (57.60) ^B	230.22 (53.27) ^C	201.75 (62.62) ^B
FFA + ultra-pulso	285.46 (29.16) ^A	190.22 (71.27) ^B	230.64 (72.40) ^B	186.95 (57.89) ^B
FFA	295.02 (26.13) ^A	192.66(49.35) ^B	228.55(49.35) ^B	198.51 (68.39) ^B
PLA + contínuo	283.04 (34.13) ^A	182.00 (70.47) ^B	224.71 (50.37) ^B	203.80 (61.79) ^B
PLA + pulso repetido	285.62 (29.49) ^A	183.91(56.34) ^B	218.17(42.83) ^B	215.24 (56.15) ^B
PLA + ultra-pulso	277.62(33.17) ^A	184.95(48.43) ^B	215.11 (59.43) ^B	220.86 (54.78) ^B
PLA	280.53(25.07) ^A	186.73(53.16) ^B	213.06(61.71) ^B	189.31(66.76) ^B

* em cada linha, letras iguais implicam igualdade de médias, e vice-versa.

Microscopia Eletrônica de Varredura

As imagens obtidas pela microscopia eletrônica de varredura não indicaram diferença qualitativa entre os tratamentos realizados com os diferentes modos de emissão do pulso do laser de CO₂ (contínuo, pulso repetido, ultra-pulso e ausência de irradiação) associado ao FFA ou PLA. No entanto, podemos observar que as imagens dos fragmentos tratados com PLA

apresentam maior exposição dos prismas de esmalte que os tratados com FFA (Fig. 1E, 1F, 1G, 1H).

Os espécimes irradiados com o modo contínuo apresentam superfície mais uniforme, com presença de poucos prismas de esmalte visíveis (1A e 1E). As imagens 1D e 1H representam os espécimes tratados com FFA e PLA, respectivamente, e mostram a superfície desmineralizada pelo desafio cariogênico. No entanto, as imagens 1B, 1E, 1F e 1G de espécimes tratadas com laser de CO₂ apresentam aspecto semelhante ao grupo controle (1H), mostrando que o modo de emissão do pulso do laser de CO₂ não influenciou a morfologia superficial do esmalte desmineralizado.

Figura 1- Imagens obtidas pela MEV após tratamento da superfície do esmalte. A) FFA e laser de CO₂ contínuo; B) FFA e laser de CO₂ pulso repetido; C) FFA e laser de CO₂ ultra-pulso; D) FFA; E) PLA e laser de CO₂ contínuo; F) PLA e laser de CO₂ pulso repetido; G) PLA e laser de CO₂ ultra-pulso e H) PLA – controle.

Estudo *in situ**Análise de Microdureza*

A Análise de Variância (ANOVA) a dois critérios não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratados com os diferentes modos de emissão do pulso do laser de CO₂ (contínuo, pulso repetido, ultra-pulso e ausência de irradiação), associados ao FFA ou PLA, nas análises de microdureza inicial e final (0,3017). As médias e desvios padrão de cada grupo estão representados na Tabela 2.

Tabela 2 - Médias e desvios padrão da microdureza nas análises realizadas nos grupos tratados com os diferentes modos de emissão do pulso do laser de CO₂ (contínuo, pulso repetido, ultra-pulso e ausência de irradiação), associados ao FFA ou PLA.

Tratamentos	Análises de microdureza	
	Inicial	Final
FFA + contínuo	271.09 (20.65)	204.18 (22.44)
FFA + pulso repetido	281.00 (15.80)	223.55 (39.63)
FFA + ultra-pulso	265.36 (20.75)	198.36 (39.80)
FFA	276.45 (19.55)	195.18 (31.23)
PLA + contínuo	274.00 (15.01)	199.36 (28.52)
PLA + pulso repetido	276.64 (16.43)	204.45 (34.59)
PLA + ultra-pulso	274.36 (13.73)	220.36 (40.98)
PLA	282.82 (11.81)	191.27 (22.38)

Gráfico 1: Box-plot dos valores de microdureza final dos grupos tratados com os diferentes modos de emissão do pulso do laser de CO₂ (contínuo, pulso repetido, ultra-pulso e ausência de irradiação), associados ao FFA ou PLA.

Gráfico 2: Box-plot dos valores de microdureza final dos grupos tratados com os diferentes modos de emissão do pulso do laser de CO₂ (contínuo, pulso repetido, ultra-pulso e ausência de irradiação), associados ao FFA ou PLA.

Análise Microbiológica

A análise microbiológica foi realizada através da contagem de *Streptococcus mutans* e Lactobacilos, sendo os números expressos em unidades formadoras de colônia (UFC) por miligrama de biofilme úmido. Foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis e o resultado não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratados com os diferentes modos de emissão do pulso do laser de CO₂ (contínuo, pulso repetido, ultra-pulso e ausência de irradiação), associados ao FFA ou PLA na contagem de *Streptococcus mutans* ($p=0,9521$) e Lactobacilos ($p=0,8552$). Os resultados estão representados na Tabela 3.

48 Resultados

Tabela 3 - Médias e desvios padrão da contagem de *Streptococcus mutans* e Lactobacilos nos grupos tratados com os diferentes modos de emissão do pulso do laser de CO₂ (contínuo, pulso repetido, ultra-pulso e ausência de irradiação), associados ao FFA ou PLA.

Tratamentos	<i>Streptococcus mutans</i>		Lactobacilos	
	Média	Desvio-padrão	Média	Desvio-padrão
FFA + contínuo	73.60	137.70	360000	590000
FFA + pulso repetido	159.49	474.91	250000	350000
FFA + ultra-pulso	39.39	68.10	310000	580000
FFA	168.74	422.88	130000	190000
PLA + contínuo	700.11	1419.70	82613.71	120000
PLA + pulso repetido	444.98	1273.63	130000	210000
PLA + ultra-pulso	140.45	290.78	48528.82	72366.47
PLA	352.34	1043.32	67289.22	78017.68

Gráfico 3: Box-plot dos valores da contagem de *Streptococcus mutans* dos grupos tratados com os diferentes modos de emissão do pulso do laser de CO₂ (contínuo, pulso repetido, ultra-pulso e ausência de irradiação), associados ao FFA ou PLA.

Gráfico 4: Box-plot dos valores da contagem de Lactobacilos dos grupos tratados com os diferentes modos de emissão do pulso do laser de CO₂ (contínuo, pulso repetido, ultra-pulso e ausência de irradiação), associados ao FFA ou PLA.

Microscopia Eletrônica de Varredura

As imagens obtidas pela microscopia eletrônica de varredura mostraram que os espécimes irradiados com laser de CO₂ possuem superfície irregular (2A, 2B, 2C, 2E, 2F, 2G), não sendo observadas áreas de fusão, derretimento e recristalização na superfície de esmalte. Os espécimes tratados com FFA e PLA apresentam superfície desmineralizada, com exposição dos prismas de esmalte (2D e 2H, respectivamente). O modo ultra-pulso causou maiores irregularidades, com projeções de esmalte na superfície (2C e 2G). Nas imagens 2C e 2F podemos observar a presença de fissuras.

Figura 2 - Imagens obtidas pela MEV após tratamento da superfície do esmalte. A) FFA e laser de CO₂ contínuo; B) FFA e laser de CO₂ pulso repetido; C) FFA e laser de CO₂ ultra-pulso; D) FFA; E) PLA e laser de CO₂ contínuo; F) PLA e laser de CO₂ pulso repetido; G) PLA e laser de CO₂ ultra-pulso e H) PLA – controle.

Discussão

5. DISCUSSÃO

A determinação da microdureza pode fornecer evidência indireta do ganho ou perda mineral no tecido dentário duro em estágios iniciais da lesão de cárie (Arends e Ten Bosh, 1992; Zero, 1995), por esse motivo é um dos métodos mais utilizados para avaliar a capacidade de inibição da progressão de lesões de cárie em esmalte. No estudo *in vitro*, foram realizadas quatro análises de microdureza em cada fragmento: inicial (seleção dos espécimes), após desafio cariogênico inicial, após tratamento superficial e após desafio cariogênico final. No estudo *in situ* foram realizadas apenas as análises de microdureza inicial e final.

Analizando os resultados obtidos podemos observar que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratados com os diferentes modos de emissão do pulso do laser de CO₂ (contínuo, pulso repetido, ultra-pulso e ausência de irradiação) associados ao FFA ou PLA, na análise de microdureza tanto no estudo *in vitro* ($p=0,3864$) como no estudo *in situ* ($p=0,3017$).

Embora a eficácia de compostos fluoretados no controle de lesões de cárie já tenha sido comprovada (Paes Leme et al., 2004; Rodrigues et al., 2006; Paes Leme et al., 2007; Souza-Gabriel et al., 2010; Calvo et al., 2012), no presente estudo a aplicação tópica de FFA não foi suficiente para controlar a demineralização do esmalte. Isso pode ser devido ao fato de ter sido realizada uma única aplicação tópica de flúor frente a alto desafio cariogênico. Em situações de alto risco a cárie, a combinação de aplicação tópica de flúor profissional e uso de dentifrícios fluoretados tem sido sugerido (Zimmer et al., 2001). Em seu estudo, Paes Leme et al. (2007) afirmam que o flúor do dentifrício fluoretado presente diariamente em baixas concentrações foi incorporado pelo esmalte dentário, formando fluorapatida e, assim, diminuindo a solubilidade do esmalte. Souza-Gabriel et al. (2010), encontraram que o tratamento com diferentes tipos de fluoreto inibiram a progressão de lesões de cárie, no entanto enfatizaram que o efeito do fluoreto na prevenção da desmineralização do esmalte é altamente dependente das condições experimentais, como técnica e frequência de aplicação, e que o efeito dos fluoretos pode ser potencializado aumentando o número de aplicações.

Estudos recentes mostram que a associação de fluoretos à irradiação com laser de CO₂ tem melhores resultados que ambos os tratamentos isoladamente (Rodrigues et al., 2006; Gonzáles-Rodríguez et al., 2011; Esteves-Oliveira et al., 2011), uma vez que, na ausência de flúor, o laser não consegue induzir a remineralização, apenas inibe a desmineralização (Rodrigues et al., 2006). Gonzáles-Rodríguez et al. (2011) encontraram que o laser de CO₂

reduziu a solubilidade ácida do esmalte e que, quando utilizado juntamente ao flúor, aumentou a taxa de absorção de fluoretos. No presente estudo, as análises *in vitro* e *in situ*, demonstraram que a associação do laser de CO₂ ao flúor fosfato acidulado 1,23% não apresentou efeito somatório dos tratamentos, quando comparada ao grupo controle. Nossos resultados concordam com os encontrados por Tagliaferro et al.(2007), que, ao avaliarem a associação do laser de CO₂ e flúor no controle da desmineralização do esmalte, não observaram efeito sinérgico entre os tratamentos.

Quanto ao modo de emissão do pulso do laser de CO₂, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratados com o laser de CO₂ nos modos contínuo, pulso repetido, ultra-pulso, e ausência de irradiação, associados ao FFA ou PLA, nas diferentes análises de microdureza *in vitro* (inicial, após desafio cariogênico inicial, após tratamento superficial e após desafio cariogênico final) e *in situ* (inicial e final). O modo pulsado é o mais utilizado (Nelson et al., 1986; Nelson et al., 1987; Kantorowitz et al., 1998; Featherstone et al., 1998; Hsu et al., 2001; Nobre dos Santos et al., 2001; Klein et al., 2005; Rodrigues et al., 2006; Steiner-Oliveira et al., 2006; Tagliaferro et al., 2007; Rechmann et al., 2011^a), uma vez que emite pulsos curtos, mas de alta intensidade, o que gera uma elevada densidade de energia, sem levar ao aquecimento pulpar (Baraba et al., 2012). O modo contínuo, embora tenha apresentado resultados semelhantes, é menos indicado para prevenção de cárie uma vez que com o maior tempo de aplicação, a energia é absorvida e conduzida da superfície do esmalte para o interior do dente, o que pode resultar em pouco aquecimento da superfície e possível dano pulpar (Pinheiro et al., 2010).

As mudanças de temperatura superiores a 5°C no interior da câmara pulpar podem resultar em dano permanente à polpa dentária (Steiner-Oliveira et al., 2006; Nguyen et al., 2010). Sendo assim, é preferível a utilização do laser de CO₂ no modo pulsado para criar altos picos de densidade de energia na superfície do substrato dentário, enquanto diminui a quantidade final de energia aplicada. Isto permite mudanças na superfície, como derretimento, fusão e recristalização, sem criar efeitos adversos nas camadas subjacentes (Featherston e Nelson, 1987). Outro fator determinante para a quantidade de energia aplicada ao tecido é o número de pulsos utilizados. Kantorowitz et al.(1998) encontraram que o tratamento com laser de CO₂ pulsado pode inibir em até 87% a progressão da cárie e sugeriram a utilização de até 25 pulsos. Acima deste valor não há aumento da porcentagem de inibição da cárie e pode acarretar em danos a estrutura dentária.

A utilização do laser de CO₂ no controle da desmineralização do esmalte é indicada por possuir efeito preventivo, sendo que o aumento da densidade de energia pode aumentar a

ácido-resistência do esmalte (Perito et al., 2009). Tem sido sugerido que a resistência ácida do esmalte é obtida pela desnaturação parcial da matriz orgânica, o que reduz a permeabilidade e dificulta a difusão dos ácidos, diminuindo a dissolução do esmalte (Souza-Gabriel et al., 2010). A redução no conteúdo de carbonato é outro fator positivo proporcionado pelo laser, visto que este componente torna a apatita mais instável e solúvel em ácido (Hossain et al., 2001; Can et al., 2008). A proposição de que o derretimento do esmalte pelo laser é desejável para o aumento da resistência ácida é controversa, uma vez que seu efeito parece não ser uniforme e há risco de fraturas, deixando áreas de esmalte expostas e susceptíveis ao desafio ácido (Gonzáles-Rodríguez et al., 2011).

No presente estudo o laser de CO₂ não controlou a desmineralização do esmalte dentário. Os achados corroboram com os estudos de Almeida (2010) e Rechaman et al., (2011b), que ao avaliarem o efeito do laser de CO₂ no controle da desmineralização de lesões de cárie, não observaram uma redução significativa da desmineralização do esmalte. No entanto estes estudos foram realizados na superfície oclusal, onde, devido a angulação das fóssulas e fissuras, a quantidade final de energia absorvida pelo esmalte pode ser reduzida.

Estudos que realizaram a microscopia eletrônica de varredura nos espécimes irradiados com laser de CO₂ relatam tanto derretimento e fusão dos cristais de hidroxiapatita (Steiner-Oliveira et al., 2006; Gonzáles-Rodríguez et al., 2011; Souza-Gabriel et al., 2010) como também o aparecimento de rugosidade e fendas na superfície (Rodrigues et al., 2006). Assim como em nosso estudo, Kantorowitz et al. (1998) e Tagliaferro et al. (2007) não encontraram alterações para o grupo irradiado com laser de CO₂ $\lambda = 10,6 \mu\text{m}$.

Embora as alterações morfológicas como fusão e derretimento estejam relacionadas a uma menor perda mineral, no trabalho de Almeida (2010) estas alterações não foram suficientes para controlar a desmineralização do esmalte. Por outro lado, Kantorowitz et al., (1998) verificaram que a fusão e derretimento não são modificações necessárias à redução da perda de mineral do esmalte, uma vez que em seu estudo o laser de CO₂ controlou a desmineralização sem a presença de tais alterações.

A análise microbiológica demonstrou que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratados com laser de CO₂ nos modos contínuo, pulso repetido, ultra-pulso, e ausência de irradiação, associados ao FFA ou PLA, tanto na contagem de *Streptococcus mutans* ($p=0,9521$), quanto na contagem de Lactobacilos ($p=0.8552$). Este fato está em desacordo com Geraldo (2009) que, ao avaliar tratamentos superficiais com flúor, laser de Er:YAG, laser de Er,Cr:USGG, laser de Nd:YAG e laser de CO₂ e sua influência na adesão bacteriana, encontrou que o flúor foi o tratamento de superfície a apresentar menor

formação de biofilme. Afirma ainda que o flúor diminui a colonização bacteriana, uma vez que não causa alterações na superfície dentária, ao contrário da luz laser, que modifica a superfície, deixando-a rugosa e com depressões que promovem sítios favoráveis à colonização.

Observando os dados obtidos também podemos verificar a maior presença de Lactobacilos que *Streptococcus mutans* no biofilme coletado, fato explicado por Tenuta et al., (2006), que afirmam que em estudos *in situ*, quando a exposição a carboidratos e o acúmulo de biofilme são experimentalmente controlados, não há relação direta entre exposição ao açúcar e aumento de *Streptococcus mutans* no biofilme e o crescimento de Lactobacilos pode ser de 4 a 10 vezes maior que o de *Streptococcus mutans*, quando comparados ao grupo controle.

No presente estudo, a aplicação do laser de CO₂ previamente aos desafios cariogênicos não foi capaz de controlar o crescimento dos microorganismos analisados. No entanto, a luz laser já se mostrou efetiva na redução de *Streptococcus mutans* quando aplicado diretamente sobre a superfície contaminada (Turkun et al., 2006; Sui et al., 2009). Segundo Sol et al. (2011), o efeito térmico da irradiação com laser de CO₂ altera a morfologia do biofilme e também a matriz extracelular de *Streptococcus mutans*. Além disso, afirma que o laser de CO₂ age nas camadas mais profundas do biofilme, o que é uma vantagem em relação aos tratamentos com substâncias químicas antimicrobianas, que geralmente agem nas camadas mais superficiais. Entretanto, estudos futuros são necessários para avaliar esta atividade.

Frente ao exposto, os resultados sugerem que a irradiação do esmalte desmineralizado com o laser de CO₂ não teve efeito sobre a colonização bacteriana no presente estudo. Além disso, a terapia com laser de CO₂ juntamente com o FFA busca controlar lesões de cárie, porém são necessários mais estudos que avaliem o modo de emissão do pulso mais eficaz e sua ação direta sobre o biofilme dentário.

Considerando a metodologia empregada, o laser de CO₂ independente do modo de emissão de pulso utilizado e da presença do FFA nas análises de microdureza *in vitro* e *in situ* não controlou a desmineralização do esmalte dentário bem como o crescimento de *Streptococcus mutans* e Lactobacilos na análise do biofilme formado.

Conclusão

6. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos e a metodologia utilizada neste estudo, pode-se concluir que:

1 – No estudo *in vitro* laser de CO₂ independente do modo de emissão do pulso utilizado (contínuo, pulso repetido ou ultra-pulso) e o flúor fosfato acidulado 1,23% não controlaram a desmineralização do esmalte dentário.

2 – No estudo *in situ* laser de CO₂ independente do modo de emissão do pulso utilizado (contínuo, pulso repetido ou ultra-pulso) e o flúor fosfato acidulado 1,23% não controlaram a desmineralização do esmalte dentário e o crescimento de *Streptococcus mutans* e *Lactobacilos* do biofilme formado.

Referências Bibliográficas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ahrari F, Heravi F, Fkrazad R, Farzanegan F, Nakhaei S. Does ultra-pulse CO₂ laser reduce the risk of enamel damage during debonding ceramic brackets? *Lasers Med Sci.* 2012;27:567-74.

Aires CP, Del Bel Cury AA, Tenuta LM, Klein MI, Koo H, Duarte S, Cury JA. Effect of starch and sucrose on dental biofilm formation and on root dentine demineralization. *Caries Res.* 2008;42(5):380-6.

Almeida MEC. Efeito do Laser de CO₂ associado ao dentifrício fluoretado na prevenção de cárie de superfície oclusal – um estudo in situ. Piracicaba: FOP – UNICAMP, 2011. 54 p.

Amore R, Anido AA, Moraes LC, Moraes MEL. Comparação entre diagnóstico clínico e radiográfico da cárie dental. *Pós-Grad Ver Fac Odontol São José dos Campos.* 2000;3:62-8.

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

Arends J, Ten Bosch JJ. Demineralization and remineralization evaluation techniques. *Journal of Dental Research* 1992;71:924-8.

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. *Photomedicine and Laser Surgery* 2012; 30(6):301-7.

Bonow MLM, Casalli JF. Avaliação de um programa de promoção de saúde bucal para crianças. *J Bras Odontopediatr Odontol Bebê, Curitiba* 2002;5:390-4.

Calvo AFB, Tabchoury COM, Del Bel Cury AA, Tenuta LMA, da Silva WJ, Cury JA. Effect of Acidulated Phosphate Fluoride Gel Application Time on Enamel Demineralization of Deciduous and Permanent Teeth. *Caries Research* 2012;46:31-7.

Can AM, Darling CL, Ho C, Fried D. Non-destructive assessment of inhibition of demineralization in dental enamel irradiated by CO₂ laser at ablative irradiation with PS-OCT. *Lasers in Surgery and Medicine* 2008;40:342-9.

Chin-Ying SH, Xiaoli G, Jisheng P, Wefel JS. Effects of CO₂ laser on fluoride uptake in enamel. *Journal of Dentistry* 2004;32:161-7.

Cury JA, Rebelo MAB, Del Bel Cury AA, Derbyshire MTV, Tabchoury CPM. Biochemical Composition and Cariogenicity of Dental Plaque Formed in the Presence of Sucrose or Glucose and Fructose. *Caries Research* 2000;34:491-7.

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

Esteves-Oliveira M, Zetzell DM, Ana PA, Yekta SS, Lampert F, Eduardo CP. Dentine caries inhibition through CO₂ laser (10.6µm) irradiation and fluoride application, *in vitro*. *Archives of Oral Biology* 2011;56:533-9.

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

Featherstone JD, Nelson DG. Laser effects on dental hard tissues. *Advances in Dental Research* 1987;1(1):21-6.

Featherstone JDB, O'really MM, Shariaty M. Enhancement of remineralization *in vitro* and *in vivo*. In: Leach As, editor. *Factors relating to demineralization and remineralization of teeth*. IRL: Oxford 1986;23-34.

Fox JL, Yu D, Otsuka M, Higuchi WI, Wong J, Powell GL. Initial dissolution rate studies on dental enamel after CO₂ laser irradiation. *Journal of Dental Research* 1992;71:1389-98.

Fried D, Featherstone JD, Le CQ, Fan K. Dissolution studies of bovine dental enamel surfaces modified by high-speed scanning ablation with a $\lambda = 9.3$ microm TEA CO₂ laser. *Lasers Surg. Med.* 2006;38:837-45.

Fried D, Zuerlein M, Featherstone JDB, Seka W, McCormack SM. IR laser ablation of dental enamel: mechanistic dependence on the primary absorber. *Appl. Surf. Sci.* 1998;127-129:852-56.

Geraldo DS. Aderência bacteriana à superfície de esmalte dental irradiado por lasers com parâmetros para prevenção de cárie. São Paulo: FOUSP – USP, 2009. 146p.

Gold OG, Jordan HV, Hout JV. A selective medium for *Streptococcus mutans*. *Archives of Oral Biology* 1973;11:1357-64.

Goldberg IS, Peleg O, Liberman R, Stabholtz A, Moshonov J. The Effect of CO₂ laser on the Microhardness of Human Dental Hard Tissues Compared with That of the High-Speed Drill. *Photomedicine and Laser Surgery* 2008;26(1):65-8.

Gonzales CD, Zakariasen KL, Dederich DN, Pruhs RJ. Potential preventive and therapeutic hard-tissue applications of CO₂, Nd:YAG and argon lasers in dentistry: a review. *ASDC J Dent Child* 1996;63(3):196-207.

González-Rodríguez A, López-González JD, Castillo JDL, Villalba-Moreno J. Comparison of effects of diode laser and CO₂ laser on human teeth and their usefulness in topical fluoridation. *Lasers Med Sci* 2011;26:317-24.

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

Hara AT, Turssi CP, Ando M, Gonzáles-Cabezas C, Zero DT, Rodrigues AL Jr, Serra MC, Cury JA. Influence of Fluoride-Releasing Restorative Material on Root Dentine Secondary Caries *in situ*. *Caries* 2006;40:435-39.

Hossain MM, Hossain M, Kimura Y, Konoshita J, Yamada Y, Matsumoto K. Acquired acid resistance of enamel and dentin by CO₂ laser irradiation with sodium fluoride solution. *Journal of Clinical Laser in Medical Surgery* 2002;20:77-82.

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

Hossain M, Nakamura Y, Kimura Y, Yamada Y, Kawanaka T, Matsumoto K. Effect of pulsed Nd:YAG laser irradiation on acid demineralization of enamel and dentin. *Journal of Clinical Laser in Medical Surgery* 2001;19:105-8.

Hsu Cy, Jordan Th, Dederich Dn, Wefel Js. Effects of low-energy CO₂ laser irradiation and the organic matrix on inhibition of enamel demineralization. *Journal of Dental Research* 2000;79:1725-30.

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

Kantorowitz Z, Featherstone JD, Fried D. Caries prevention by CO₂ laser treatment: dependency on the number of pulses used. *Journal of American Dental Association* 1998;129:585-91.

Klein AL, Rodrigues LK, Eduardo CP, Nobre Dos Santos M, Cury JA. Caries inhibition around composite restorations by pulsed carbono dioxide laser application. *European Journal of Oral Science* 2005;113:239:44.

Kwon YH, Lee JS, Choi YH, Lee JM, Song KB. Change of enamel after Er:YAG and CO₂ laser irradiation and fluoride treatment. *Photomedicine Laser Surgery* 2005;23:389-94.

Leites ACBR, Pinto MB, Sousa ERS. Aspectos microbiológicos da cárie dental. *Salusvita, Bauru* 2006;25(2):135-48.

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

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

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

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

Nguyen D, Staninec M, Lee C, Fried D. High-speed scanning ablation of dental hard tissues with a $\lambda = 10.6 \mu\text{m}$ CO₂ laser: Heat accumulation and peripheral thermal damage. *Laser in Dentistry XVI* 2010;7549 (cited 2010 mar 5). Available from: <http://www.proceedings.spiedigitallibrary.org>

Nobre Dos Santos M, Featherston JDB, Fried D. Effect of a new carbon dioxide laser and fluoride on sound and demineralizes enamel. *Lasers in Dent VII- SPIE*. 2001;4249:169-74.

Paes Leme AF, Dacico R, Tabchoury CPM, Del Bel Cury AA, Rosalen PL, Cury JA. *In situ* effect of frequent sucrose exposure on enamel demineralization and on plaque composition after APF application and F dentifrice use. *Journal of Dental Research* 2004;83:71-5.

Paes Leme AF, Tenuta LMA, Del Bel Cury AA, Tabchoury CPM, Cury JA. Efeito da associação da aplicação de fluoreto profissional e uso de dentifrício no esmalte dental. *RGO* 2007;55(1):35-40.

Perito MAM, Jorge ACT, Cassoni A, Rodrigues JA. Uso do laser na prevenção da cárie dental. *Rev Dentística on line* 2009;8(18).

Phan ND, Fried D, Featherston JDB. Laser-induced transformation of carbonated apatite to fluorapatite on bovine enamel. *Proceedings of SPIE* 1999;3593:322-40.

Pinheiro ALB, Jr. Brugnera A, Zanin FAA. *Aplicação do Laser na Odontologia*. 1ª ed. Ed. Santos, 2010.

Read RP, Baumgartner JC, Clark SM. Effects of a carbon dioxide laser on human root dentin. *Journal of Endodontics* 1995;21:4-8.

Rechmann P, Fried D, Le CQ, Nelson G, Rapozo-Hilo M, Rechmann BMT, Featherstone JDB. Caries inhibition in vital teeth using 9.6 μ m CO₂-laser irradiation. *Journal of Biomedical Optics* 2011a;16(7):212-9.

Rechmann P, Hsu T, Rechamann BMT, Le CQ, Featherstone JD. *In-vivo* Occlusal Caries Prevention by Pulsed CO₂-Laser Treatment. *IADR* 2011b.

Rodrigues LK, Nobre Dos Santos M, Featherstone JD. *In situ* mineral loss inhibition by CO₂ laser and fluoride. *Journal of Dental Research* 2006;85:617-21.

Rodrigues LKA, Steiner-Oliveira C, Nobre-dos-Santos M. O Emprego do Laser de CO₂ no Controle da Cárie Dentária. *Ver Odonto Ciênc.*, Porto Alegre 2007;22(58):346-51.

Sakr OM. Effect of Ultra Short Pulse Laser on dentin structural changes and surface roughness. *Life Sci J*. 2012;9(4):957-62.

Schmidlin PR, Dorig I, Lussi A, Roos M, Imfeld T. CO₂ Laser-irradiation through Topically Applied Fluoride Increases Acid Resistance of Demineralised Human Enamel *in vitro*. *Oral health Prev Dent*. 2007;5:201-8.

Serra MC, Cury JÁ. The *in vitro* effect of glass-ionomer cement restoration on enamel subjected to a demineralization and remineralization model. *Quintessence International* 1992;23:143-7.

Sol A, Feuerstein O, Featherston JDB, Steinberg D. Effect of Sublethal CO₂ Laser Irradiation on Gene Expression of *Streptococcus mutans* Immobilized in a Biofilm. Caries Res. 2011;45:361-9.

Souza-Gabriel AE, Colucci V, Turssi CP, Serra MC, Corona SAM. Microhardness and SEM After CO₂ Laser Irradiation or Fluoride Treatment in Human and Bovine Enamel. Microscopy Research and Technique 2010;73:1030-5.

Steiner-Oliveira C, Rodrigues LK, Soares LE, Martin AA, Zzell DM, Nobre-dos-Santos M. Chemical, morphological and thermal effects of 10.6-microm CO₂ laser on the inhibition of enamel demineralization. Dent Mater J. 2006;25(3):455-62.

Steiner-Oliveira C, Rodrigues LK, Lima EB, Nobre-dos-Santos M. Effect of the CO₂ laser combined with fluoridated products on the inhibition of enamel demineralization. J Contemp Dent Pract. 2008;9(2):113-21.

Sui L, Wang P, Li R, Li C. Antibacterial effect of photodynamic therapy on prepared tooth structure contaminated with *Streptococcus mutans*. Photonics and Optoelectronics. 2009 (cited 2009 sep 1).

Available from: [http://: www.ieeexplore.ieee.org](http://www.ieeexplore.ieee.org)

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

Tenuta LMA, Ricomini Filho AP, Del Bel Cury AA, Cury JA. Effect of Sucrose on the Selection of Mutans Streptococci and Lactobacilli in Dental Biofilm Formed *in situ*. Caries Res 2006;40:546-9.

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

Turkun M, Turkun LS, Celik EU, Ates M. Bactericidal Effect of Er,Cr:YSGG Laser on *Streptococcus mutans*. Dental Materials Journal 2006;25(1):81-86.

Viana PGS. Esterilização de esmalte bovino por meio de irradiação por microondas. Efeito sobre a microdureza superficial e resistência à desmineralização. Araraquara: FOAR – UNESP, 2009. 125 p.

Zero DT. *In situ* Caries Models. Adv Dent Res. 1995;9(3):214:30.

Zimmer S, Bizhang M, Seemann R, Witzke S, Roulet JF. The effect of a preventive program, including the application of low-concentration fluoride varnish, on caries control in high-risk children. Clinical Oral Investigation 2001;5(1):40-4.

ANEXO A - Aprovação do Comitê de Ética

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto

Comitê de Ética em Pesquisa

Of.ATAc.CEP/41511/FORP-USP/26.10.2011

Ref. processo n.º 2011.1.903.58.5

CAAE n.º 0044.0.138.000-11

Senhor(a) Pesquisador(a):

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 124.ª Sessão, realizada em 20 de outubro de 2011, aprovou o desenvolvimento do projeto de pesquisa envolvendo seres humanos, intitulado "*Influência do modo de emissão do pulso do laser de CO² e do flúor fosfato acidulado no controle da desmineralização do esmalte - Análise in vitro e in situ*".

Na oportunidade, lembramos da necessidade de ser entregue, na secretaria do CEP, o **Relatório Final** em 20 de outubro de 2012, com o respectivo formulário preenchido pelo pesquisador responsável.

Lembramos ainda que, quando da submissão do relatório a este Comitê, quaisquer inclusões ou modificações no projeto original deverão ser comunicadas e justificadas ao CEP, através do formulário supracitado.

GISELE ELLENE DE ANDRADE DA DALTI
Secretária do Comitê de Ética em Pesquisa

Ilmo(a). Sr(a).

PG. ANA BÁRBARA DE ARAÚJO LOIOLA (Profa. Dra. Silmara Aparecida Milori Corona)

Departamento de Odontologia Restauradora

desta Faculdade

ANEXO B - Resultados da ANOVA de delienamento split-plot dos resultados de microdureza do estudo *in vitro*.

Source	Partial SS	df	MS	F	Prob > F
GRUPOS	8728.09229	7	1246.87033	0.30	0.9529
BLOCOS	202623.566	14	14473.1118	3.47	0.0001
GRUPOS*BLOCOS	409293.467	98	4176.46395		
Etapa	651739.636	3	217246.545	99.54	0.0000
GRUPOS*Etapa	48746.7707	21	2321.2748	1.06	0.3864
Residual	733328.85	336	2182.52634		
Total	2054460.38	479	4289.06134		
R-squared = 0.6431					

ANEXO C – Resultados da ANOVA de delienamento split-plot dos resultados de microdureza do estudo *in situ*.

anova dureza_final Grupos fase Grupos*fase					
		Number of obs =		88	R-squared = 0.1842
		Root MSE =		33.4227	Adj R-squared = 0.0142
Source	Partial SS	df	MS	F	Prob > F
Grupos	9560.6303	7	1365.80433	1.22	0.3017
fase	7.63787879	1	7.63787879	0.01	0.9343
Grupos*fase	7805.57424	7	1115.08203	1.00	0.4398
Residual	80429.3333	72	1117.07407		
Total	98585.2727	87	1133.16405		