Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA RESISTÊNCIA ÁCIDA E DA
PERMEABILIDADE DO ESMALTE DENTAL DECÍDUO
IRRADIADO COM LASER ND: YAG
ASSOCIADO OU NÃO AO FLÚOR**

Danielle Torres Azevedo

Ribeirão Preto

2011

Danielle Torres Azevedo

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA RESISTÊNCIA ÁCIDA E DA
PERMEABILIDADE DO ESMALTE DENTAL DECÍDUO
IRRADIADO COM LASER ND: YAG
ASSOCIADO OU NÃO AO FLÚOR**

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

Programa: Odontopediatria

Área de Concentração: Odontopediatria

Orientadora: Prof^a Dr^a Regina Guenka Palma Dibb

Ribeirão Preto

2011

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Azevedo, Danielle Torres

Avaliação *in vitro* da resistência ácida e da permeabilidade do esmalte dental decíduo irradiado com laser Nd:Yag associado ou não ao flúor. Ribeirão Preto, 2010.

78 p. : il. ; 30cm

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP – Área de Concentração: Odontopediatria.

Orientador: Palma-Dibb, Regina Guenka

1. Esmalte dental 2. Dentes decíduos 3. laser Nd:YAG 4. Flúor

Danielle Torres Azevedo

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA RESISTÊNCIA ÁCIDA E DA PERMEABILIDADE DO
ESMALTE DENTAL DECÍDUO IRRADIADO COM LASER ND: YAG
ASSOCIADO OU NÃO AO FLÚOR**

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:*
Odontopediatria

Data da defesa: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura _____

Dados curriculares

Danielle Torres Azevedo

Nascimento	14 de outubro de 1981 – Maceió/AL
Filiação	Antonio Azevedo Filho Ivone Torres Azevedo
2002-2006	Graduação em Odontologia Centro de Estudos Superiores de Maceió- CESMAC
2007-2009	Especialização em Odontopediatria Associação Odontológica de Ribeirão Preto- AORP
2009-2011	Mestrado em Ciências Área de concentração: Odontopediatria Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP Orientadora: Prof ^a . Dr ^a . Regina Guenka Palma Dibb Bolsa: FAPESP

DEDICO ESTE TRABALHO,

A **Deus**, obrigada por ter me fortalecido quando pensei em desistir. Por ter me acompanhado quando eu me sentia só. Por ter me protegido quando eu estive longe de casa e das pessoas que mais amo. Em todos os momentos eu senti a tua simples e sutil presença, e assim fui encorajada a seguir em frente. Obrigada por direcionar meus passos e por tornar tudo possível!

À minha mãe, **Ivone Torres Azevedo**, minha grande incentivadora e minha fonte inesgotável de amor. Obrigada mãe, por me apoiar em todas as minhas escolhas, tendo muitas vezes que abrir mão dos seus sonhos para realizar os meus. As minhas conquistas são suas! O meu amor é seu!

Ao meu pai **Antonio Azevedo Filho**, meu porto seguro. Obrigada pai, pela compreensão, apoio e confiança. Por estar sempre ao meu lado, me enriquecendo com seus conselhos sábios e me ensinando a "fazer poesia" mesmo quando os obstáculos parecem intransponíveis.

À vocês, pais amados, pelo exemplo de dedicação e amor à família, pela educação e diretrizes de vida que subsidiam meus princípios e faz com que eu abraçe com determinação tudo aquilo em que acredito. Sem vocês nada disso teria sido possível. Amo-os incondicionalmente!!

"Tudo o que um sonho precisa para ser realizado é alguém que acredite que ele possa ser realizado." Roberto Shinyashiki

Às minhas irmãs, **Izabelle Torres Azevedo**
e **Gracielle Torres Azevedo**, pelo amor verdadeiro
e cumplicidade, sem os quais nada teria sentido.
Amo vocês!

Ao meu cunhado, **Cláudio Talá de Souza**,
pela amizade, incentivo e por não medir esforços
para ajudar sempre que precisei.

À **Maria Eduarda**, minha linda sobrinha,
um anjo de luz que chegou para alegrar as
nossas vidas.

Ao meu tio, **Antonio Talvane Torres de Oliveira**, tio
Neto, pelo incentivo, pelo apoio e pelo exemplo de
profissional e ser humano.

Aos meu avós, **Antonio Azevedo Santos** e
Beatriz Soares Azevedo (in memoriam),
por construírem uma família alicerçada nos
princípios de amor e fé. Aprendi com vocês
que o maior amor é aquele que não se exige
retorno ou reconhecimento.

Ao meu avô, **José Torres de Oliveira**, e à minha avó
Profª Drª Izabel Torres de Oliveira (in memoriam),
pelo exemplo de superação e pela vida dedicada à
educação. Vô, sinto sua presença, especialmente
neste momento.

“...Que a família comece e termine sabendo aonde vai
E que o homem carregue nos ombros a graça de um pai.
Que a mulher seja um céu de ternura, aconchego e calor.
E que os filhos conheçam a força de onde brota o amor.”
Pe. Zezinho

AGRADECIMENTO ESPECIAL,

À minha orientadora **Profª Drª Regina Guenka Palma Dibb**, a quem admiro muito. Obrigada pela orientação e disponibilidade dedicadas, pelas oportunidades e conquistas a mim proporcionadas. Sinto-me honrada por ter convivido com uma pessoa amiga, de inteligência incomparável. À você professora, minha especial gratidão e carinho.

*"Mestre,
É aquele que caminha com o tempo,
propondo paz, fazendo comunhão,
despertando sabedoria.*

*Mestre é aquele que estende a mão,
inicia o diálogo e encaminha
para a aventura da vida.*

*Não é o que ensina fórmulas, regras,
raciocínios, mas o que questiona
e desperta para a realidade.*

*Não é aquele que doa seu saber,
mas aquele que faz germinar
o saber do discípulo."*

N. Maccari

AGRADECIMENTOS

À Dr^a. Juliana Jendiroba Faraoni Romano, pela amizade e carinho com que sempre me acolheu. Pelas importantes sugestões e considerações, as quais foram fundamentais para a realização deste estudo. Obrigada pela presença constante durante todo esse período. Você é muito especial!

"O valor das coisas não está no tempo que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso, existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis." Fernando Pessoa

Ao Prof. Dr. Paulo Nelson Filho, pelo exemplo de competência e dedicação. Pelas oportunidades e pelo entusiasmo sempre demonstrado em prol da vida acadêmica. Haverá de seguir seus ensinamentos por toda a minha jornada profissional.

"O que transforma qualquer ato em algo extraordinário é o fato de fazermos aquilo com o coração e o que transforma qualquer vida numa existência extraordinária é o fato de ser vivida com amor"
Mark Sanborn

À minhas amigas Fernanda Ribeiro (Nandinha Xu), Iliana Sabbatini (Lili) e Marina Sena (Marinete), pelo companheirismo e pela presença constante nos momentos de alegria e nos momentos de superação. Verdadeiras amigas que sempre me incentivaram com palavras de carinho e alegria. Minha vida com certeza ficou mais iluminada desde que vocês passaram a fazer parte dela!

"A gente não faz amigos, reconhece-os." Vinícius de Moraes

Aos meus amigos e companheiros desde a infância, Juliana Lyra, Carolina Cavalieri, Juliana Pino, Mayra Cândia, Razuco Pacheco, muito obrigada pela presença constante em minha vida, independente da distância.

"Eu poderia suportar, embora não sem dor, que tivessem morrido todos os meus amores, mas enlouqueceria se morressem todos os meus amigos! A alguns deles não procuro, basta saber que eles existem. Esta mera condição me encoraja a seguir em frente pela vida... mas é delicioso que eu saiba e sinta que eu os adoro, embora não declare e os procure sempre..." Vinícius de Moraes

À Universidade de São Paulo/USP

À Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa do atual diretor **Prof. Dr. Osvaldo Luiz Bezzon**, e do vice-diretor **Prof. Dr. Valdemar Mallet da Rocha Barros**.

À coordenação do curso de Pós-Graduação em Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa da **Profª Drª Léa Assed Bezerra da Silva** e do vice-coordenado, **Prof. Dr. Paulo Nelson Filho**.

À **FAPESP**, pelo apoio financeiro, possibilitando a realização deste estudo.

Aos docentes do Departamento de Clínica Infantil, Odontologia Preventiva e Social da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, **Profª Drª Sada Assed**, **Profª Drª Aldevina Campos Freitas**, **Profª Drª Léa Assed Bezerra da Silva**, **Prof. Dr. Paulo Nelson Filho**, **Profª Drª Alexandrá Mussolino de Queiróz**, **Prof. Dr. Mário Roberto Leonardo**, **Profª Drª Maria Cristina Borsatto**, **Profª Drª Raquel Assed Bezerra da Silva**, **Profª Drª Kranya Victória Díaz Serrano**, **Profª Drª Mirian Aiko Nakane Matsumoto**, **Profª Drª Andriara De Rossi**, **Profª Drª Maria da Conceição Pereira Saraiva**, **Profª Drª Maria Bernadete Sasso Stuaní**, **Prof. Dr. José Tarcísio Lima Ferreira**, **Prof. Dr. Fábio Lourenço Romano** e **Prof. Dr. Adilson Thomazinho**, e a todos os professores da Pós-Graduação.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, **Isabel Cristina Galino Sola** e **Regiane Cristina Moi Sacilotto**, pelo atendimento e prestação de seus serviços.

Aos funcionários do Departamento de Clínica Infantil, Odontologia Preventiva e Social da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, **Fátima Jacinto Daniel**, **Michele Cristina Leite Rovanholo**, **Filomena Lelli Placciti**, **Nilza Letícia Magalhães**, **Marco Antônio dos Santos**, **Carmo Eurípedes Terra Barreto**, **José Aparecido Neves do Nascimento**, **Matheus Morelli**, **Vera Ribeiro do Nascimento** e **Dr. Francisco Wanderley Garcia de Paula e Silva**, **Carolina Paes Torres Mantovani**, **Fátima Rizóli** e **Renata Aparecida Fernandes**.

Aos **Pós-Graduandos** do curso de Mestrado e Doutorado em Odontopediatria do Departamento de Clínica Infantil, Odontologia Preventiva e Social da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pela agradável convivência.

À **Profª Drª Gisele Faria**, a quem eu tenho um carinho especial por ter me acompanhado nesta jornada desde a época da especialização.

À **Patrícia Marchi**, técnica do laboratório de Dentística do Departamento de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, por ter feito parte da execução deste projeto em todas as suas fases experimentais, pela amizade e pelo ótimo convívio, tornando meus dias mais alegres e mais produtivos.

Aos amigos **Juliana Derceli dos Reis, Taísa Lepri, César Lepri, Walter Raucci Neto, Vinicius Rangel, Geraldo Martins e Daniel Galafassi**, muito obrigada pelo carinho com que me receberam no laboratório de Odontologia Restauradora, e pela convivência maravilhosa proporcionada.

À amiga **Talitha de Siqueira Mellara**, pelo fundamental apoio nos meus primeiros anos em Ribeirão Preto.

À **Michele Cristina Leite Rovanholo**, secretária do programa de Pós-Graduação em Odontopediatria, e ao **Carlos Feitosa dos Santos**, secretário do programa de Pós-Graduação em Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pelo carinho e disponibilidade. À vocês meu carinho especial e meus sinceros agradecimentos!

Aos funcionários do Departamento de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, **Maria Amália Viesti de Oliveira, Maria Izabel C. Francisco Miguel e Rosângela Angelini**.

Ao técnico do Departamento de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP, **Reginaldo Santana da Silva**, pelo auxílio na execução dos procedimentos de permeabilidade.

Aos técnicos do Laboratório Multi-Usuários do Departamento de Engenharia de Materiais da Universidade Federal de São Carlos, **Diego Davi Coimbra e Vitor Anibal do Sacramento** pela colaboração nas análises de Microscopia Eletrônica de Varredura e DRX.

Às **crianças**, pela doação dos dentes, tornando possível a realização desta pesquisa, e por me encantarem todos os dias com sua pureza e verdade.

*"Eu fico com a pureza da resposta das crianças,
é a vida, é bonita e é bonita." Gonzaguinha*

Deixo expresso meus sinceros agradecimentos às instituições e pessoas, que contribuíram direta ou indiretamente para a execução deste trabalho.

*"A essência de toda arte bela, de toda grande arte, é a gratidão."
Friedrich Nietzsche*

RESUMO

Azevedo, DT. **Avaliação *in vitro* da resistência ácida e da permeabilidade do esmalte dental decíduo irradiado com laser nd:Yag associado ou não ao flúor** [dissertação].
Ribeirão Preto: FORP-USP, 2011

A eficiência dos lasers associado ou não a fluoretos no aumento da resistência ácida e na redução da solubilidade do esmalte dentário tem sido confirmada em diversos estudos. Diversos comprimentos de onda têm sido utilizados com esta finalidade, apresentando bons resultados e representando uma abordagem preventiva simples e não invasiva. Apesar do emprego do laser Nd:YAG ter sua ação preventiva bem conhecida, são escassos os estudos em dentes decíduos, principalmente estudos que estabeleçam parâmetros seguros e eficientes, seja associado ao flúor ou isoladamente. Desta forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar a resistência ácida e a permeabilidade do esmalte decíduo. Para tanto, foram selecionados 69 molares decíduos humanos, resultando em 132 corpos-de-prova. As variáveis de resposta quantitativa foram a microdureza longitudinal, profundidade da desmineralização e permeabilidade do esmalte, e as variáveis de resposta qualitativa foram morfologia da superfície, presença de íons flúor e análise dos componentes químicos do esmalte. Foram utilizados 60 fragmentos vestibular/lingual para a análise de resistência ácida e microdureza (n=10), e após preparados e tratados, estes espécimes foram submetidos ao ciclo de remineralização para formação de lesão de cárie artificial. Para análise da permeabilidade (48 fragmentos n=8), para a análise de MEV e EDX (18 fragmentos n=3) e para DRX (6 dentes n=1) foi realizado apenas o tratamento da superfície em 6 níveis: C- Controle: sem tratamento; FA: aplicação de gel flúor fosfato acidulado 1,23%; FAL: aplicação de gel flúor fosfato acidulado + Laser Nd:YAG 0,5W/10Hz no modo contato; VF: aplicação de verniz fluoretado 5%; VFL: aplicação de verniz fluoretado 5% + Laser Nd:YAG; L: aplicação do Laser Nd:YAG. Os dados de microdureza (%VM) foram avaliados pelo teste de Kruskal-Wallis e os dados de profundidade da desmineralização (PD) e Permeabilidade (P) foram avaliados pelos testes ANOVA e Fisher's LSD ($\alpha=5\%$ para todos os testes). Observou-se que os grupos FAL e FA apresentaram a menor variação de dureza em relação aos outros grupos; menor extensão de desmineralização foi observada nos grupos FA, FAL, VF, VFL e L e menor permeabilidade foi verificada nos grupos FA, FAL, VF, VFL e L em relação ao grupo controle (C). Na MEV observou-se ausência de fissuras, crateras ou qualquer alteração indesejável na superfície. Na EDX observou-se incorporação de flúor em todos os grupos experimentais (FA, FAL, VF, VFL), exceto no grupo laser (L). Nenhum composto novo foi encontrado na análise de DRX após a associação do flúor com o laser. O laser utilizado isoladamente ou associado ao flúor levou a alterações ultra-estruturais na superfície do esmalte, o que pode ter sido responsável pelo aumento da resistência ácida e redução da permeabilidade, indicando que o laser isoladamente ou associado ao flúor, nas condições desta pesquisa, foi capaz de inibir a desmineralização do esmalte dental decíduo.

Palavras-chave: Esmalte dental, Dentes decíduos, laser Nd:YAG, Flúor

ABSTRACT

Azevedo, DT. **Analysis *in vitro* of acid resistance and permeability of primary tooth enamel after Nd:YAG laser irradiation, associated or not with fluoride** [dissertação].

Ribeirão Preto: FORP-USP, 2011

The efficiency of lasers associated or not with fluorides, in increasing the acid resistance and decrease of enamel solubility of dental enamel has been confirmed by several studies. Several wavelengths have been used for such purpose, providing good results and representing a simple and non-invasive preventive approach. Although the preventive action of Nd:YAG laser is well known, studies on primary teeth are scarce, especially those that establish safe and efficient parameters, when the laser is either associated with fluoride or used alone. Therefore, the aim of this study was to evaluate the acid resistance and permeability of primary tooth enamel. Sixty-nine human primary molars were used, providing 132 specimens. The quantitative response variables were enamel longitudinal microhardness, demineralization depth and permeability, while the qualitative response variables were surface morphology, presence of fluoride ions and analysis of the chemical components of enamel. Sixty buccal/lingual fragments were used for analysis of acid resistance and microhardness (n=10). After being prepared and treated, these specimens were subjected to a des-remineralization cycle for artificial caries lesion formation. For analysis of permeability (48 fragments, n=8), SEM and EDX (18 fragments, n=3) and DRX (6 teeth, n=1), only surface treatment was performed in 6 levels: C- Control: no treatment; APF: application of 1.23% acidulated phosphate fluoride gel; APFL: application of 1.23% acidulated phosphate fluoride gel + Nd:YAG laser 0.5W/10Hz in mode contact; FV: application of 5% fluoride varnish; FVL: application of 5% fluoride varnish + Nd:YAG laser; L: application of Nd:YAG laser. Microhardness data (%VM) were analyzed by the Kruskal-Wallis test and demineralization depth (DD) and permeability (P) were analyzed by ANOVA and Fisher's LSD test ($\alpha=5\%$ for all tests). APFL and APF presented the lowest microhardness variation of all groups; lower extension of demineralization was observed in groups APF, APFL, FV, FVL and L, and lower permeability was observed in groups APF, APFL, FV, FVL and L compared to group C. The SEM analysis revealed absence of fissures, craters or any other undesirable surface alteration. The EDX analysis revealed fluoride incorporation in all experimental groups (APF, APFL, FV, FVL), except for the group L. No new compound was found in the DRX analysis when fluoride was associated with the laser. Laser alone or associated with fluoride produced ultrastructural alterations on enamel surface, which might have caused the increase of acid resistance and decrease of permeability, thus indicating that, under the conditions of this study, the Nd:YAG laser used alone or associated with fluoride was capable of inhibiting the demineralization of primary tooth enamel.

Key Words: Enamel dental, Primary teeth, Nd:YAG laser, Fluoride

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
2. PROPOSIÇÃO.....	25
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3.1. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	28
3.2. SELEÇÃO DOS DENTES.....	29
3.3. PREPARO DOS ESPÉCIMES.....	29
3.4. GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	30
3.5. TRATAMENTO DOS ESPÉCIMES.....	30
3.6. CICLOS DE PH.....	31
3.7 SECCIONAMENTO DOS ESPÉCIMES PARA ANÁLISE DE MICRODUREZA LONGITUDINAL E PROFUNDIDADE DA DESMINERALIZAÇÃO.....	33
3.8. MICRODUREZA LONGITUDINAL.....	33
3.9. PROFUNDIDADE DA DESMINERALIZAÇÃO.....	34
3.10.PERMEABILIDADE.....	35
3.11. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) E ESPECTROSCOPIA DE ENERGIA DISPERSIVA DE RAO X (EDX).....	37
3.12. DIFRAÇÃO DE RAO X (DRX).....	38
3.13. ANÁLISE DOS DADOS.....	43
4.RESULTADOS.....	44
4.1. MICRODUREZA LONGITUDINAL.....	45
4.2. PROFUNDIDADE DA DESMINERALIZAÇÃO.....	46
4.3. PERMEABILIDADE.....	48
4.4.MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV).....	50
4.5.ESPECTROSCOPIA DE ENERGIA DISPERSIVA DE RAO X (EDX).....	52
4.6.DIFRAÇÃO DE RAO X (DRX).....	53
5.DISSCUSSÃO.....	54
6.CONCLUSÕES.....	63
REFERÊNCIAS.....	65
ANEXO.....	77

Introdução

1 INTRODUÇÃO

A formação da lesão de cárie ocorre por meio da interação de ácidos orgânicos oriundos da degradação de bactérias aderidas na superfície dentária, e a partir da ocorrência de um desequilíbrio no processo de desmineralização-remineralização, surgem os primeiros sinais da doença (Zero, 1999).

Apesar de estudos epidemiológicos revelarem expressiva redução nos índices da cárie dentária, a doença ainda pode ser considerada um dos principais problemas da população brasileira, principalmente em idades precoces, proporcionando negativas repercussões fisiológicas e comportamentais à criança (Oliveira, 2006).

Nos últimos anos tem ocorrido um declínio da prevalência da doença cárie em nível mundial em função da aplicação dos vários métodos preventivos, principalmente pela utilização dos fluoretos (Newbrun, 1992; Levy, 2003).

No Brasil, este fato foi confirmado no último estudo epidemiológico realizado pelo Ministério da Saúde (2010), que demonstrou um declínio de 13 pontos percentuais, entre 2003 e 2010, em crianças de 12 anos, correspondendo a uma diminuição de 19% na prevalência da enfermidade. O número médio de dentes acometidos por lesão de cárie também diminuiu em torno de 25%. Entretanto, ainda há um grande grupo onde o número de crianças afetadas pela doença ainda é expressivo (Poulsen e Scheutz, 1999).

Os mais eficientes métodos de prevenção de lesões cariosas estão relacionados ao uso racional do flúor em dentifrícios (Cury et al., 2004), água de abastecimento público (Levy, 2003; Parnell et al., 2009), soluções para bochecho e agentes fluoretados de uso profissional, como géis e vernizes (Seppä, 2004). Em odontopediatria, ressalta-se a aplicação profissional de fluoretos tópicos, como o flúor fosfato acidulado e o verniz fluoretado (Adair, 2006), os quais apresentam eficiência clínica comprovada (Marinho et al., 2003).

O mecanismo de ação tópica do flúor se dá pela formação, na superfície do esmalte, de fluoreto de cálcio, que serve como reservatório de íons flúor e cálcio, mantendo o meio saturado em relação a esses minerais. Em condições nas quais há diminuição do pH (abaixo de 5,5), com a presença de flúor, apesar da hidroxiapatita ser supersaturada em relação aos íons ao redor do dente, e, portanto, ocorrer perda de cálcio e fósforo do dente para o meio, a fluorapatita permanece supersaturada,

cedendo, ao mesmo tempo, íons cálcio, fósforo e flúor para o dente. Dessa forma, na presença do flúor, há diminuição do grau de desmineralização (Thylstrup e Fejerskov, 2001).

No entanto, o efeito do flúor parece ser parcial, já que sua eficiência é maior quanto menor a quantidade de mineral a ser reposta (Cury, 2002), além disso, apresenta efeito limitado em superfícies de cicatrículas e fissuras (Bahar e Tagomori, 1994). Neste sentido, se faz necessário o desenvolvimento de novas tecnologias para prevenção das lesões cariosas, principalmente em superfície oclusal, e o aperfeiçoamento de métodos preventivos já existentes.

A associação dos lasers a compostos fluoretados (Nobre dos Santos et al., 2001; Hossain et al., 2002; Rodrigues et al., 2006; Tagliaferro et al., 2007) vem sendo estudada na tentativa de encontrar uma maneira eficaz de aumentar a resistência do esmalte dental aos ácidos, considerando a necessidade de um recurso preventivo de longa duração para crianças de alto risco/atividade de cárie, que atue também em áreas de difícil higienização e que seja de fácil aceitação pela criança.

LASER é um acrônimo de "Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation" (Amplificação da Luz por Emissão Estimulada de Radiação). É uma radiação eletromagnética não-ionizante, uma fonte luminosa com características bastante distintas se comparado à luz fluorescente ou àquela gerada por uma lâmpada comum. O sistema laser é coerente (ondas na mesma fase), colimado (feixe bem compacto) e monocromático (cor pura) (Pinheiro et al., 2010).

A luz laser ao atingir o tecido poderá sofrer absorção, reflexão, transmissão e espalhamento. Entretanto, para que ocorra algum efeito sobre o tecido é necessário que haja absorção da energia luminosa. Desse modo, podem ocorrer efeitos fotoquímicos, fotoelétricos, fototérmicos e fotomecânicos (Pinheiro et al., 2010).

Os mecanismos de interação laser-tecido com os tecidos duros dentais dependem de todos os parâmetros do laser, tais como comprimento de onda, potência, densidade de energia e de potência, tempo de exposição da luz laser, modo de emissão (contínuo ou pulsado), duração do pulso, energia por pulso, taxa de repetição, diâmetro do feixe e características do feixe (Zezell et al., 2005), assim como das propriedades ópticas dos tecidos (índice de refração, coeficiente de reflexão, absorção e espalhamento), propriedades térmicas e energia aplicados (Featherstone, 2000). De fato, para qualquer procedimento que utilize a irradiação laser, as interações

ópticas entre a luz laser e o tecido alvo devem ser perfeitamente compreendidas para a garantia de procedimentos efetivos e seguros.

O primeiro estudo envolvendo o uso do laser em Odontologia foi realizado por Stern e Sognnaes, (1964). Eles aplicaram laser de rubi em tecidos dentais e observaram aumento da temperatura com formação de crateras e fusão do esmalte e da dentina. Nesta época, os lasers existentes não proporcionavam bons resultados, pela possibilidade de aumentar excessivamente a temperatura do tecido irradiado, podendo comprometer o tratamento (Parker, 2007).

Em função do aperfeiçoamento dos equipamentos de laser, o número de estudos sobre o efeito protetor da irradiação laser na desmineralização do esmalte e da dentina tem aumentado nos últimos anos (Magalhães et al., 2008). Vários tipos de lasers, como o rubi, Er:YAG, CO₂, Nd:YAG, e argônio, com diferentes modos de operação e diferentes parâmetros têm sido investigados (Stern et al., 1966, 1972; Yamamoto e Ooya, 1974; Yamamoto e Sato, 1980; Nelson et al., 1986, 1987; Tagomori e Morioka, 1989; Oho e Morioka, 1990; Fox et al., 1992b; Hicks et al., 1993; Kumazaki, 1993; Westerman et al., 1994, 1996; Delbem et al., 2003), demonstrando que o uso de lasers de alta potência com baixas densidades de energia, pode aumentar a resistência ácida do esmalte dental (Nelson et al., 1986; Bedine et al., 2010). Entretanto, este aspecto ainda tem sido discutido por pesquisadores, a fim de se chegar ao real mecanismo de interação laser-matéria responsável por esta característica.

Em Odontologia, o laser Nd:YAG é aprovado pela FDA (Food and Drug Administration) para uso em cirurgias de tecidos moles (Myers e McDaniel, 1991; Pick, 1993). Entretanto, muitos estudos *in vitro* estão sendo realizados para avaliar os efeitos do Nd:YAG nos tecidos mineralizados. As pesquisas enfocam o uso deste laser em endodontia, para desinfecção de canais radiculares e abertura dos canalículos para facilitar a limpeza (Mello e Mello, 2001), em periodontia, na superfície radicular para modificação do cimento dental (Morlock et al., 1992; Tewfik et al., 1994), para remoção de lesões cariosas (White et al., 1991), condicionamento do esmalte, hipersensibilidade dentinária e analgesia (Myers e McDaniel, 1991), na prevenção de microinfiltração (Navarro et al., 2000) e em prevenção de lesões cariosas (Yamamoto e Sato, 1980; Pelino et al., 1999; Hossain et al., 2001; Tsai et al., 2002).

O laser Nd:YAG possui um cristal dopado com neodímio como meio ativo (Geusic, 1964). Apresenta comprimento de onda de 1,06 µm, situando-se na faixa do infravermelho. Um grande benefício deste laser é o fato de ser transmitido através de

fibra óptica, facilitando sua aplicação na cavidade bucal (Tsai et al., 2002). O comprimento de onda do laser Nd:YAG é compatível com os picos de absorção da hemoglobina, melanina e outros pigmentos. Porém, apesar desse laser apresentar comprimento de onda pouco absorvido pelas estruturas dentais (Tsai et al., 2002), demonstra resultados promissores na prevenção de lesões cariosas, principalmente quando associado à aplicação tópica de flúor (Tagomori e Morioka, 1989; Castellan et al., 2007; Zezell et al., 2009).

Os primeiros estudos que descreveram os efeitos do laser pulsado de Nd:YAG (10 J/cm^2) relataram uma superfície de esmalte mais resistente à descalcificação (Yamamoto e Ooya, 1974). Em 1989, foi relatado aumento da resistência ácida no esmalte dental humano a partir da combinação do laser Nd:YAG ao flúor (Tagomori e Morioka, 1989). Mais recentemente, em um estudo *in situ*, após irradiação do esmalte dental com este laser, foi observado aumento da microdureza do esmalte, sugerindo a efetividade deste tratamento (Korytnicki et al., 2006).

A utilização dos lasers em tecidos mineralizados cria uma complexa interação com o substrato dental. A energia laser, quando em contato com os tecidos é convertida em calor, o que induz ao aumento de temperatura resultando em alterações morfológicas e estruturais (Kwon et al., 2005). A extensão dessas alterações depende das características do tecido e dos parâmetros utilizados na irradiação. Quanto maior o tempo de exposição, maior será a condução de calor aos tecidos. Desta forma, a grande quantidade de parâmetros possíveis para irradiação laser pode resultar em diferentes efeitos aos tecidos (Zakariasen e Dederich, 1991).

O uso do laser para terapia preventiva de cárie é baseado na redução de microrganismos (Gouw-Soares et al., 2000), na alteração química (Fowler e Kuroda, 1986; Bahar e Tagomori, 1994; Delbem et al., 2003) e morfológica (Hossain et al., 2000) da estrutura do esmalte, não devendo causar ablação ou fusão do mesmo (Apel et al., 2005). Para isso, a energia deve ser fortemente absorvida e eficientemente convertida em calor, sem danificar os tecidos subjacentes e adjacentes (Featherstone e Nelson, 1987).

Algumas teorias tentam elucidar o mecanismo de ação do laser através de seus efeitos térmicos, os quais podem promover alterações morfológicas e/ou químicas na estrutura dental irradiada (Fowler e Kuroda, 1986; Bachmann et al., 2005).

A primeira teoria sugerida relaciona a diminuição da solubilidade do esmalte dental com o derretimento e a fusão da sua camada superficial. As altas temperaturas

que atingem a superfície irradiada causam o derretimento do esmalte que em seguida recristaliza formando cristais de hidroxiapatita maiores do que os iniciais (Rohanizadeh et al., 1999). Este fenômeno reduz a permeabilidade, e torna o esmalte mais resistente a desmineralização pela perda total do carbonato (Featherstone, 2000; Huang, 2001). Porém, atualmente, já se sabe que não é obrigatoriamente necessário que ocorra a fusão do esmalte para se obter o efeito preventivo (Apel et al., 2005).

A segunda teoria proposta para a redução da desmineralização do esmalte se refere a alterações cristalográficas, que tornam o mineral menos solúvel e a terceira teoria sugere um possível bloqueio na difusão de íons em decorrência da decomposição da matriz orgânica (Oho e Morioka, 1990).

As alterações cristalográficas, que ocorrem com o aquecimento do esmalte, provocam alterações estruturais e de composição, além de mudanças de fase da hidroxiapatita. A superfície de esmalte irradiada é submetida à perda de água entre 80 e 120°C, a decomposição de proteínas ocorre acima de 350°C, acima de 600°C ocorre a formação de β -pirofosfato de cálcio (β -Ca₂P₂O₇), formação de β -tricálcio fosfato (β -Ca₃(PO₄)₂ (β -TCP) e perda de carbonato (CO₃). O derretimento da superfície do esmalte ocorre em temperatura acima de 1000°C. Acima de 1100°C ocorre a conversão de β -TCP em α -TCP e acima de 1300°C ocorre a formação de tetracálcio fosfato (TetCP) (Ca₄(PO₄)₂O (Rohanizadeh et al., 1999).

Nesta última faixa de temperatura (acima de 1100°C), as mudanças na fase de hidroxiapatita (α -TCP e TetCP) resultam em aumento da solubilidade (Fowler e Kuroda, 1986; Nelson et al., 1986). Portanto, a faixa de temperatura inferior a 1000°C torna-se interessante para se estudar as modificações induzidas pela irradiação laser, justamente pela formação de compostos semelhantes à hidroxiapatita (β -TCP) e pela perda do teor de carbonato, que representa a perda de impurezas da hidroxiapatita, resultando numa estrutura mais pura e menos solúvel (Fowler e Kuroda, 1986; LeGeros, 1991; Bachmann et al., 2005).

A terceira teoria descreve a possível influência da decomposição da matriz orgânica na redução da solubilidade. Considerando que a decomposição das proteínas do esmalte acontece ao redor de 350°C, existe a possibilidade de que os produtos da decomposição da matéria orgânica obstruam os poros do esmalte e impeçam a penetração dos íons ácidos (Fowler e Kuroda, 1986; Hsu et al., 2000). Em estudos com laser, esse efeito foi demonstrado através da irradiação do laser de CO₂ em amostras de esmalte contendo matriz orgânica e amostras em que essa matriz orgânica foi removida. Os pesquisadores observaram que houve uma maior inibição da progressão

de lesões cariosas nas amostras irradiadas e que continham a matriz orgânica. Neste estudo não foi mensurada a temperatura, mas as alterações histológicas indicaram que a temperatura foi inferior a 400°C (Hsu et al., 2000). Outros estudos, com laser Er:YAG, sustentam a teoria da decomposição da matriz orgânica, onde a redução dos poros da superfície do esmalte foi demonstrada após a irradiação em amostras que continham matriz orgânica, não sendo observada a redução desses poros nas amostras em que a matriz orgânica havia sido removida (Ying et al., 2004).

O mecanismo de ação dos lasers em função da temperatura ainda não foi completamente elucidado. É provável que mais de uma destas alterações aconteça ao mesmo tempo e/ou que a redução da solubilidade seja resultado do somatório dos efeitos destas teorias.

A associação da aplicação tópica de flúor e da irradiação laser tem sido relatada como procedimentos complementares tanto na prevenção de lesões cariosas (Tagliaferro et al., 2007), como de lesões erosivas (Rios et al., 2009). Acredita-se que a irradiação laser causa alterações químicas e morfológicas no substrato dental (Tagliaferro et al., 2007; Rios et al., 2009), gerando microespaços que funcionam como reservatório de fluoreto de cálcio (Gao et al., 2006). Porém estes estudos ainda são escassos em dentes decíduos, os quais apresentam diferenças micro-estruturais em relação aos dentes permanentes, as quais devem ser consideradas nos diferentes estudos (Menezes-Oliveira, 2009).

Apesar das analogias entre o esmalte de dentes decíduos e permanentes em sua forma, estrutura e função, estas dentições apresentam algumas particularidades. Os dentes decíduos apresentam maior quantidade de matéria orgânica e menor mineralização do que os dentes permanentes, além de apresentarem arranjos prismáticos e translucidez diferente (Menezes-Oliveira, 2009). Estudos comparativos entre as duas dentições mostram que a progressão de lesões de cárie é mais rápida na dentição decídua do que na permanente (Peyron *et al.*, 1992; Sønju Clasen e Ruyter, 1997), e que a quantidade de flúor incorporada no esmalte decíduo é maior (Percinoto et al., 1990).

Há poucos estudos sobre a interação do laser Nd:YAG associado ou não a fluoretos tópicos com o esmalte de dentes decíduos (Lizarelli et al., 2002; Birardi et al., 2004; Lizarelli et al., 2006; Castellan et al., 2007). Embora seja provável que este laser possa reduzir a desmineralização do esmalte, ainda não foi esclarecido quais as

condições ideais de irradiação para a utilização desse laser em prevenção, especialmente em dentes decíduos.

Os estudos *in vitro* relacionados ao estudo da doença cárie continuam sendo amplamente utilizados na Odontologia e baseiam-se em ciclos de pH (Featherstone et al., 1986; Serra e Cury, 1992; Featherstone et al., 1998; Chen e Huang, 2009). Os sistemas químicos de indução de cárie artificial também são utilizados para verificar a resistência à desmineralização dos tecidos dentais irradiados com diversos tipos de lasers (Yamamoto & Sato, 1980; Tagomori & Morioka, 1989; Westerman et al., 1994; Hsu et al., 1998; Pelino et al., 1999; Hossain et al., 2001; Tsai et al., 2002). Este tipo de metodologia simula as condições de desmineralização e remineralização existentes na cavidade bucal, através da imersão das amostras em soluções ácidas e básicas, alternadamente, em tempo variado, de acordo com a intensidade de desmineralização pretendida.

A avaliação *in vitro* da perda mineral em esmalte, após ciclos de pH, pode ser realizada através do teste de microdureza (Arends et al., 1980). A dureza é a medida da resistência à deformação plástica que os materiais ou os diferentes substratos apresentam (Mecholsky, 1995). Neste teste, um penetrador de diamante produz uma deformação permanente, que varia de acordo com o tipo de ponta, cuja medida do comprimento define a profundidade da penetração (Kielbassa et al., 1999). As dimensões (área, profundidade ou largura) são medidas a nível microscópico, e incorporadas a uma fórmula específica da dureza. O comprimento das impressões na amostra é determinado microscopicamente em micrometros, caso seu valor aumente, significa que o tecido perdeu mineral, contrariamente, se diminui em magnitude, muito provavelmente o tecido ganhou mineral (Arends e ten Bosch, 1992). Os valores de dureza são uma medida da resistência mecânica do esmalte, dentina ou cemento e podem ser usados para medir a perda ou ganho de conteúdo mineral nos processo de desmineralização e de remineralização (Marsillac et al., 2008).

Além da microdureza outras análises são de fundamental importância para revelar as possíveis alterações estruturais causadas pelos tratamentos na superfície e subsuperfície do esmalte de dentes decíduos, como a microscopia eletrônica de varredura (MEV), a análise da permeabilidade e Difração de Raios-X (DRX).

O Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) é um instrumento muito versátil e usado rotineiramente para a análise microestrutural de materiais sólidos. Apesar da

complexidade dos mecanismos para a obtenção da imagem, o resultado é uma imagem de fácil interpretação, onde se pode avaliar a morfologia da superfície e subsuperfície do tecido submetido a tratamento (Van Meerbeek et al., 2000). A Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raios- X (EDX), permite determinar, no ponto de incidência do feixe, quais elementos químicos estão presentes naquele local e assim identificar em instantes o mineral observado (Júnior e Filho, 2005).

A permeabilidade se refere à facilidade com que uma substância pode se mover dentro ou através de uma barreira de difusão (substrato) (Nakabayashi e Pashley, 2000). A metodologia histoquímica empregada na análise da permeabilidade, embora originalmente descrita para o tecido dentinário (Pécora et al., 1985), após ajustes, já se mostrou eficiente para avaliação em esmalte de dentes permanentes (Turssi et al., 2006) e esmalte de dentes decíduos (Azevedo et al., 2011).

A DRX corresponde a uma das principais técnicas de caracterização microestrutural de materiais cristalinos, sobretudo da hidroxiapatita (Costa et al., 2009). Esta análise permite o estabelecimento da estrutura tridimensional das moléculas auxiliando no entendimento das funções biológicas da molécula analisada (Bish e Reynolds, 1989).

As pesquisas *in vitro* têm por finalidade proporcionar a viabilidade clínica do procedimento. Assim, considerando que certas estratégias preventivas podem ser menos eficazes na dentição decídua, a possibilidade de utilização de uma luz associada a métodos rotineiramente utilizados na clínica odontológica, objetivando alterar a estrutura do esmalte decíduo de forma a torná-lo mais resistente, representa uma alternativa na prevenção da doença cárie, podendo compor assim mais uma ferramenta em busca da qualidade de vida. Diante do exposto, torna-se fundamental a realização de estudos em esmalte de dentes decíduos, para que parâmetros preventivos seguros e efetivos sejam estabelecidos.

Proposição

2 PROPOSIÇÃO

O objetivo do presente estudo *in vitro* foi avaliar a efetividade da irradiação com laser Nd:YAG associado ou não ao flúor, na prevenção do desenvolvimento de lesão de cárie e na permeabilidade do esmalte decíduo através da(s):

- 1) Profundidade da lesão de desmineralização, formada após desafio cariogênico, através da Microscopia Óptica de luz transmitida;
- 2) Microdureza longitudinal do esmalte dental decíduo, após tratamentos propostos e desafio cariogênico;
- 3) Morfologia das superfícies irradiadas, através da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV);
- 4) Incorporação de íons flúor, após a irradiação, através de Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raios-X (EDX);
- 5) Permeabilidade do esmalte decíduo, após tratamentos da superfície, através do método histoquímico.
- 6) Alterações dos componentes químicos do esmalte decíduo, após os tratamentos, através de Difração de Raios-X (DRX).

Material e Métodos

3 MATERIAL E MÉTODOS

O projeto de pesquisa foi previamente submetido à apreciação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (Protocolo nº 2009.1.643.58.0), recebendo parecer favorável (Anexo A).

3.1 Delineamento Experimental

O fator em estudo neste trabalho foi o tratamento da superfície em 6 níveis:

- Controle:
 - Sem tratamento.
- Experimentais:
 - Aplicação de gel flúor fosfato acidulado (1,23%)
 - Aplicação de gel flúor fosfato acidulado (1,23%) + Laser Nd:YAG 0,5W/10Hz no modo contato
 - Aplicação de verniz fluoretado (5%)
 - Aplicação de verniz fluoretado + Laser Nd:YAG 0,5W/10Hz no modo contato
 - Aplicação de Laser Nd:YAG 0,5W/10Hz no modo contato

A amostra do experimento foi de 132 corpos-de-prova. As variáveis de resposta quantitativa foram a microdureza longitudinal, profundidade da desmineralização e permeabilidade do esmalte, e as variáveis de resposta qualitativa foram morfologia da superfície por meio da Microcopia Eletrônica de Varredura (MEV), presença de íons flúor com Espectrometria por Energia Dispersiva de Raio X (EDX) e análise dos componentes químicos do esmalte por Difractometria de Raio X (DRX). Foram utilizados 60 fragmentos vestibular/lingual para a análise de resistência ácida e microdureza (n=10), 48 fragmentos para análise da permeabilidade (n=8), 18 fragmentos para a análise de MEV e EDX (n=3) e 6 dentes para DRX (n=1).

3.2 Seleção dos dentes

Foram selecionados 69 molares decíduos humanos irrompidos, extraídos por razões não relacionadas a esta pesquisa e provenientes do Banco de Dentes da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP. Os dentes foram limpos com curetas periodontais, foi realizada profilaxia com pasta de pedra pomes e água aplicada com escovas de Robinson, montada em micromotor, em baixa rotação. A desinfecção dos dentes foi realizada com solução de formol 1% (pH 7,0) preparada com tampão fosfato, na qual ficaram imersos durante uma semana, foram lavados abundantemente, e então armazenados em água destilada e deionizada a $\pm 4^{\circ}\text{C}$ durante todo o período de preparação dos espécimes.

3.3 Preparo dos espécimes

Os dentes tiveram as raízes (quando presentes) seccionadas, com disco diamantado adaptado em máquina de corte (IsoMet[®] 1000, Buehler, USA) sob refrigeração, 1mm abaixo da junção amelo-dentinária. A seguir os dentes foram fixados com cera em suporte de acrílico e as coroas divididas em 2 partes no sentido méso-distal. Para os tratamentos, foram criadas janelas no esmalte externo em todos os fragmentos, com o tamanho de 9 mm² de área. Para a padronização destas janelas, foram recortados pedaços de fita isolante (Scotch, 3M do Brasil Ltda, Sumaré, SP), afixados na porção mais plana das superfícies vestibular e palatina. Todo o fragmento foi impermeabilizado com duas camadas de esmalte cosmético (Colorama Maybelline – Ultra duração, Cosbra Cosméticos Ltda, São Paulo, SP) e cera fundida. Após a completa secagem, as fitas adesivas foram removidas, limpou-se a superfície cuidadosamente e deixou-se exposta somente as áreas em esmalte, previamente delimitadas (Figura 1).

Figura 1. Esquema representativo da obtenção dos espécimes, impermeabilização e padronização da área delimitada

3.4 Grupos experimentais

De acordo com o tratamento da superfície, os espécimes foram divididos aleatoriamente em 6 grupos experimentais (Tabela 1).

Tabela 1. Descrição dos grupos experimentais

Grupos	Tratamento
C	Controle (Sem tratamento)
FA	Flúor Acidulado
FAL	Flúor Acidulado + laser Nd:YAG
VF	Verniz Fluoretado
VFL	Verniz Fluoretado + laser Nd:YAG
L	Laser Nd:YAG

3.5 Tratamento dos espécimes

Para o tratamento dos espécimes foram utilizados:

- Flúor fosfato acidulado 1,23% (DFL[®]), aplicado com microbrush por 4 minutos na superfície do esmalte.
- Verniz fluoretado Duraphat[®] (Colgate-Palmolive Company, Germany) a 5%, aplicado com microbrush na superfície do esmalte. O verniz só foi removido antes do início da ciclagem (após 24 horas).

- Laser Nd:YAG Stuart File (DEKA®), no modo contato através de uma fibra de quartzo com diâmetro de 0,3 mm que foi posicionada perpendicularmente a amostra e a ponta movimentada em varredura por toda a superfície delimitada durante 15 segundos. Este laser apresenta comprimento onda de 1,064 μm , pulso curto. A energia utilizada foi de 50 mJ, com frequência de 10Hz e potência de 0,5W, obtendo-se uma densidade de energia de 70,73 J /cm².

Para os grupos em que foi associado flúor fosfato acidulado e verniz fluoretado ao laser (FAL e VFL), a irradiação foi realizada concomitantemente, utilizando-se os mesmos parâmetros do grupo laser (L), e só depois da irradiação os excessos foram removidos. Os fragmentos foram armazenados em estufa a 37°C durante 24 horas, e então foram iniciados os ciclos de pH.

O desenho representativo dos tratamentos realizados na superfície exposta encontra-se ilustrados na figura 2.

Figura 2. A) Aplicação do flúor fosfato acidulado. B) Aplicação do verniz fluoretado. C) Aplicação do laser Nd:YAG.

3.6 Ciclos de pH

Após os tratamentos, 60 espécimes foram expostos a um modelo *in vitro* de ciclagem de pH. Cada amostra foi fixada com cera pegajosa à ponta de um fio ortodôntico que ficou suspenso em recipientes individuais, os quais continham as soluções desmineralizante (DES) ou remineralizante (RE).

As ciclagens de pH foram feitas de acordo com o modelo proposto por Featherstone et al. (1986) e modificado por Serra e Cury (1992). As amostras foram individualmente imersas em 7ml de solução DES (2mmol/l de cálcio, 2mmol/l de fosfato e 75mmol/l de acetato em pH 4,6) permanecendo imersas por 6 horas. Depois disso, foram removidas e lavadas com água destilada e deionizada por 10 segundos e levemente secas com papel absorvente. Em seguida, as amostras foram imersas na mesma quantidade de solução RE (1,5mmol/l de cálcio, 0,9mmol/l de fosfato, 150mmol de cloreto de potássio e 20mmol/l de tampão cacodilato de pH 7,0) que apresenta um grau de saturação dos minerais semelhante a saliva, e semelhante ao proposto por ten Cate e Duijsters (1982), e ficaram imersas nesta solução por 18 horas. Todo o procedimento foi realizado em estufa a 37°C (Figura 3).

As soluções de DES e RE foram substituídas diariamente, e as ciclagens ocorreram durante 10 dias. A cada 5 dias as amostras ficaram individualmente imersas em solução remineralizante por 2 dias, totalizando um período experimental de 14 dias.

Figura 3. Esquema representativo da ciclagem de pH. Amostras armazenadas em recipientes individuais contendo as soluções DES e RE.

3.7 Seccionamento dos espécimes para análise de microdureza e profundidade da desmineralização

Após o desafio cariogênico, os espécimes foram lavados com água deionizada, e incluídos em resina acrílica transparente, de modo que a superfície tratada ficou livre. Em seguida, foram levados à máquina de corte e seccionados, dividindo-se a área exposta ao meio, onde uma metade foi destinada à análise de microdureza e a outra metade foi utilizada para a remoção de três finas secções para análise da profundidade da desmineralização por microscopia óptica de luz transmitida. Posteriormente, as frações foram removidas das placas, lavadas abundantemente e secas com papel absorvente.

O esquema representativo do seccionamento dos espécimes para análise de microdureza e profundidade da desmineralização encontra-se ilustrada na Figura 4.

Figura 4. Seccionamento do espécime ao meio. A) Metade destinada à análise de microdureza. B) Metade subdividida em três secções para análise da profundidade da desmineralização.

3.8 Microdureza Longitudinal

A metade destinada à análise de microdureza foi levada em politriz (Arotec[®] APL-4, Brasil), sob refrigeração, utilizando-se lixas d'água 600 e 1200 e disco de feltro

com pasta de alumina para polimento, até a obtenção de uma superfície lisa e brilhante. Posteriormente, os espécimes foram limpos por 10 minutos em ultra-som.

O teste de microdureza longitudinal foi realizado em um microdurômetro (Shimadzu Micro Hardness Tester HMT-2000, Japan), com auxílio de um penetrador de diamante para dureza Knoop (KHN) aplicando uma carga de 25gf com duração de 10 segundos, de maneira que a ponta do penetrador permanecesse paralela à superfície do esmalte. As áreas analisadas foram no centro da área Tratada (T) e a 500µm da margem, região que não sofreu desmineralização, área Protegida (P). As penetrações foram realizadas na região de subsuperfície da lesão formada e da região protegida após o polimento. A primeira marcação estará localizada 20µm abaixo da superfície e as marcações seguintes foram a 40, 60, 100 e 150 µm na mesma direção. Para cada região foram feitas três medidas. Após a obtenção das medidas foi realizado o cálculo da porcentagem de variação da dureza na subsuperfície comparando-se as áreas protegida e tratada (Figura 5).

Figura 5. Esquema representativo da análise de microdureza. A) Politriz. B) Microdurômetro C) Indentações realizadas nas áreas protegida (P) e tratada (T).

3.9 Profundidade da desmineralização

As três secções obtidas para a análise da profundidade da desmineralização foram planificadas e polidas manualmente utilizando lixas d'água de granulação 600 e 1200, até chegar a uma espessura de aproximadamente 150µm, medidas através de um micrômetro (Mitotoyo, Tokyo, Japan), e então examinadas em microscópio óptico

(Carl Zeiss, Germany) conectado a uma câmera digital (Cyber-shot, DSC-575, Sony Corporation) (Figura 6A), utilizando água como meio de embebição. As imagens foram capturadas e digitalizadas para análise da área exposta, e com auxílio de um software AxioVision LE (Zeiss), foram realizadas cinco mensurações, expressas em mm, da área desmineralizada (Figura 6B). A média desses cinco valores representou a profundidade da desmineralização. A análise foi realizada com a objetiva de 10X, tendo um aumento final, após a captura da imagem, de 100X.

Figura 6. Esquema representativo da análise de profundidade da desmineralização.
A) Imagens capturadas e digitalizadas com auxílio de um software.
B) Mensurações expressas em mm, representando a profundidade da desmineralização.

3.10 Permeabilidade

Os espécimes foram preparados de acordo com o item 3.3 e tratados conforme Tabela 1. Após os tratamentos, foram submetidas ao método de coloração histoquímica, preconizado por Pécora (1985) e modificado para o emprego em esmalte de dentes decíduos por Azevedo et al. (2011).

Os 48 espécimes, já impermeabilizados com cera pegajosa e esmalte de unha devidamente separados por grupos, foram imersos, grupo a grupo, em um recipiente contendo 10 ml de sulfato de cobre aquoso 10% (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) e submetidos à aplicação de vácuo por 5 minutos. A seguir os espécimes ficaram armazenados em 10 ml desta solução por 7 dias. Após este período, os espécimes foram secos com papel absorvente e imersos em solução alcoólica de ácido rubeânico

a 1% (Merck KGaA, Darmstadt, Germany). Adotando-se os mesmos volumes, tempos de vácuo e armazenamento utilizados anteriormente. Após a coloração os espécimes foram lavados com água destilada por 15 segundos, secos e mantidos individualmente em um recipiente vedado, com algodão embebido em amônia por 7 dias.

O esquema representativo do método de coloração histoquímica para análise da permeabilidade encontra-se ilustrado na figura 7.

Figura 7. Método de coloração histoquímica

Após o período de exposição com amônia os espécimes foram incluídos em resina acrílica de polimerização rápida e cortados transversalmente em uma máquina de corte, com disco diamantado, e refrigerado à água, para obtenção de três secções com espessura média de 400µm. As secções foram planificadas e polidas manualmente utilizando lixas d'água de granulação 600 e 1200, até chegar a uma espessura de aproximadamente 150µm. As secções foram então observadas em microscópio óptico (Carl Zeiss, Germany) conectado a câmera digital (Cyber-shot, DSC-575, Sony Corporation), utilizando um software AxioVision (Zeiss). Em cada um dos três cortes obtidos, foram realizadas cinco mensurações da extensão da penetração dos íons cobre ao longo do esmalte e da respectiva espessura do esmalte (Figura 8). A permeabilidade relativa foi calculada segundo a fórmula: $\text{Permeabilidade} = (\text{penetração do íons} / \text{espessura do esmalte}) \times 100$.

Figura 8. Esquema representativo do seccionamento do espécime e análise da permeabilidade.

3.11 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raio X (EDX)

Para esta análise, 18 espécimes ($n = 3$) foram tratados de acordo com a Tabela 1, e então preparados de acordo com o seguinte protocolo: limpeza em ultra-som (Ultrasonic Cleaner T-1449-D, Odontobrás, Ribeirão Preto, SP, Brasil) por 5 minutos; remoção e lavagem com água destilada; novamente limpeza em ultra-som por 5 minutos; secagem com papel absorvente; 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). Todos esses procedimentos foram realizados no interior de uma capela. Depois da secagem, os corpos-de-prova foram fixados em um "stub" e, em seguida, receberam cobertura de ouro em aparelho de metalização a vácuo (SDC 050, Bal-Tec AG, FL9496, Balzers, Liechtenstein). Após a metalização, os espécimes foram avaliados em Microscópio Eletrônico de Varredura (Philips XL30 TMP D6615), pertencente ao Laboratório Multi-Usuários do Departamento de Engenharia de Materiais da Universidade Federal de São Carlos. Foi realizada a varredura de toda a superfície e subsuperfície do espécime e, em seguida, foi fotografada a área mais central de cada grupo.

Durante a análise de MEV, foram selecionadas áreas centralizadas, com aumento de 500X, sobre as amostras para realizar a análise elementar por EDX, onde foi realizada a varredura dos espécimes na área controle e na área tratada de cada espécime.

O esquema representativo do preparo dos espécimes para MEV e EDX encontra-se ilustrado na Figura 9.

Figura 9. Preparo dos espécimes para MEV e EDX.

3.12 Difração de Raio X (DRX)

Para a análise de DRX, foram utilizadas seis coroas de dentes decíduos hígidos, sendo removida toda a dentina por meio do uso de alta rotação e pontas diamantadas. Na sequência, foi realizado o tratamento de toda a superfície do esmalte, conforme Tabela 1, diferindo das outras análises, no qual o tratamento foi realizado apenas na área delimitada de 9mm². Após a remoção do flúor fosfato acidulado (4 minutos) e do verniz fluoretado (24 horas), através de gaze umedecida com água destilada, e após a secagem com papel absorvente, cada espécime foi triturado utilizando-se grau e pistilo (Figura 10). O pó foi armazenado em recipientes individualizados, os quais foram especificados e levados ao Laboratório Multi-Usuários do Departamento de Engenharia de Materiais da Universidade Federal de São Carlos para a análise de DRX.

Figura 10. Esquema representativo do preparo dos espécimes para DRX.

Os resumos esquemáticos da metodologia empregada encontram-se nos fluxogramas 1, 2, 3 e 4.

Fluxograma 1. Resumo da metodologia empregada para análise de microdureza longitudinal e profundidade da desmineralização.

Fluxograma 2. Resumo da metodologia empregada para análise da permeabilidade.

Fluxograma 3. Resumo da metodologia empregada para análise de MEV e EDX

Fluxograma 4. Resumo da metodologia empregada para análise de DRX.

3.13 Análise dos dados

Após a obtenção dos valores de microdureza longitudinal foi feita a média geral por espécime, tanto na área tratada como na área protegida e então se comparou a área tratada (AT) com a protegida (AP) e se calculou a variação do percentual da dureza pela seguinte fórmula: $\%VM = [(AP-AT)*100]/AP$.

Para a análise da profundidade da desmineralização (PD) avaliou-se em mm a extensão da região desmineralizada em 5 regiões e utilizou-se a média para cada espécime.

Em relação à permeabilidade, em cada um dos três cortes obtidos para cada unidade experimental foram realizadas 5 mensurações para a profundidade de penetração do corante e 5 mensurações para a espessura do esmalte. Analisou-se o percentual de penetração do agente traçador no esmalte pela seguinte fórmula: $P = (\text{penetração do íons} / \text{espessura do esmalte}) * 100$, sendo realizada a média por espécime.

Dessa forma os dados foram analisados previamente e para PD e P apresentaram distribuição normal e homogênea. Assim foram realizados os testes de ANOVA e Fisher's LSD ($\alpha = 5\%$ para todos os testes). Para %VM os dados não se apresentaram homogêneos e assim realizou-se o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis.

Os dados da observação da MEV não foram analisados estatisticamente, uma vez que o objetivo da análise foi comparar qualitativamente as diferentes condições experimentais propostas no estudo, da mesma forma, foi realizada uma análise apenas descritiva para os dados de EDX e DRX.

Resultados

4 RESULTADOS

4.1. Microdureza Longitudinal

Na análise dos dados observou-se diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos superficiais ($p < 0,05$), tendo os grupos FA e FAL apresentado a menor variação de dureza em relação aos demais grupos, que por sua vez o VF e VFL apresentaram valores intermediários da variação da dureza. O grupo C foi semelhante ao L ($p > 0,05$) e apresentou a maior variabilidade dos valores de dureza. (Figura 13 e Tabela 2).

Figura 11. Box plot dos dados amostrais dos diferentes grupos estudados

Tabela 2. Mediana, média e desvio-padrão em percentual (%) da variação de dureza dos diferentes tratamentos superficiais.

Grupo	Mediana	Média	Desvio-Padrão
C	40,24 c	34,86	25,39
FA	6,21 a	8,42	8,82
FAL	8,77 a	11,57	12,65
VF	18,26 b	21,27	19,29
VFL	21,22 b	21,18	13,36
L	33,28 c	35,27	21,07

* mesma letra indica similaridade estatística.

4.2. Profundidade da desmineralização

Na análise dos dados observou-se que a profundidade da desmineralização foi estatisticamente superior para o grupo controle e diferente dos demais grupos ($p < 0,05$), os quais foram estatisticamente semelhantes entre si ($p > 0,05$) (Tabela 3).

Tabela 3. Média (mm) e desvio-padrão da extensão da desmineralização dos diferentes tratamentos estudados.

Grupo	Extensão da desmineralização (mm)
FAL	0,09 ± 0,04 (a)
FA	0,12 ± 0,03 (a)
VF	0,13 ± 0,03 (a)
VFL	0,12 ± 0,03 (a)
L	0,16 ± 0,07 (a)
C	0,24 ± 0,15 (b)

*mesma letra indica similaridade estatística

A figura 12 mostra imagens da profundidade da desmineralização nos diferentes grupos. O grupo C (Figura 12A) apresentou lesão de desmineralização extensa e bem definida, o grupo L (Figura 12F) também apresentou lesão definida, porém, menor. Os outros grupos, FA, FAL, VF, VFL (Figuras 12B a 12E) também apresentaram lesões de desmineralização, porém, menos extensas e menos definidas.

Figura 12. Imagens digitais representativas da análise em Microscopia Óptica, representando as diferentes profundidades da desmineralização. A) Grupo C. B) Grupo FA. C) Grupo FAL. D) Grupo VF. E) Grupo VFL. F) Grupo L.

4.3. Permeabilidade

Na análise dos dados observou-se que o grupo C apresentou maior profundidade de penetração de íons cobre, sendo diferente estatisticamente ($p < 0,05$) dos demais grupos, os quais foram estatisticamente semelhantes entre si (Tabela 4).

Tabela 4. Média (mm) e desvio-padrão da permeabilidade nos diferentes tratamentos estudados.

Grupo	Permeabilidade (%)
FAL	23,24 ± 17,83(a)
FA	27,71 ± 20,88 (a)
VF	37,81 ± 21,87 (a)
VFL	39,88 ± 13,34 (a)
L	36,80 ± 14,23 (a)
C	67,48 ± 12,82(b)

*mesma letra indica similaridade estatística

A figura 13 mostra a penetração de íons cobre em todos os grupos. No grupo C (Figura 13A) a penetração foi maior e mais profunda, diferente dos grupos FA (Figura 13B), FAL (Figura 13C), VF (Figura 13D), VFL (Figura 13E) e L (Figura 13F), que apresentaram menor penetração de íons cobre.

Figura 13. Imagens digitais obtidas por Microscopia Óptica, representando as diferentes profundidades de penetração dos íons cobre em relação à espessura do esmalte. A) Grupo C. B) Grupo FA. C) Grupo FAL. D) Grupo VF. E) Grupo VFL. F) Grupo L.

4.4. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A figura 14 mostra a morfologia da superfície por microscopia eletrônica de varredura. É possível observar que o grupo controle apresentou superfície homogênea com algumas ranhuras. Os grupos FA e VF apresentaram superfície lisa e homogênea com diminuição das ranhuras. O grupo FAL apresentou uma superfície discretamente modificada com presença de microporosidades e depressões localizadas. O grupo VFL apresentou áreas de superfície intacta e uma grande área semelhante a um aglomerado, possivelmente resquícios de verniz fluoretado aderido à superfície. O grupo L apresentou áreas de superfície lisa, microporosidades e regiões localizadas de perda de estrutura.

Figura 14. Fotomicrografias representativas da análise em MEV, em aumento de 500X. A) Grupo C apresentando superfície homogênea. B) Grupo FA apresentando superfície lisa e homogênea. C) Grupo FAL apresentando superfície discretamente modificada com microporosidades (seta) e área com ranhura (ponta de seta). D) Grupo VF apresentando superfície lisa e homogênea. E) Grupo VFL apresentando áreas intactas (ponta de seta) e aglomerados semelhantes a resquícios de verniz fluoretado aderido (seta). F) Grupo L apresentando microporosidades (seta) e áreas localizadas de perda de estrutura (ponta de seta).

4.5 Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raio X (EDX)

Para a análise de EDX foi realizada a varredura na área controle e na área tratada de cada espécime. Foram analisados os elementos químicos da área controle e tratada de cada espécime e observou-se que o cálcio foi o elemento presente em maior quantidade, seguido pelo oxigênio e pelo fósforo. Após as médias percentuais foi verificado que não houve variação na quantidade desses íons nas diferentes amostras (Tabela 5). No entanto, foram encontradas pequenas quantidades de flúor em alguns grupos e comparou-se estas pequenas quantidades com o lado controle de cada amostra onde não havia sido realizado nenhum tratamento e observou-se que houve uma maior incorporação de flúor no grupo FAL em que foi associado o flúor com o laser em relação aos demais grupos. Houve maior aumento do conteúdo de flúor no grupo FAL, seguido pelos grupos VF, FA e VFL, os quais também tiveram aumento na incorporação do flúor. O grupo L apresentou diminuição do conteúdo de flúor (Tabela 6).

Tabela 5. Média do percentual de elementos químicos (%) presentes na superfície do esmalte para os diferentes tratamentos.

Elementos Químicos			
Grupos	Ca	O	P
C	44,79	30,37	20,52
FA	39,82	29,68	20,25
FAL	45,77	28,68	19,64
VF	38,71	28,37	18,09
VFL	38,39	29,35	19,48
L	43,24	28,04	21,63

Tabela 6. Média do percentual de incorporação de flúor (%), após os diferentes tratamentos.

GRUPOS	Área controle* (AC)	Área tratada (AT)	% íons F a mais (AT-AC)
FA	1,69	5,72	4,03
FAL	1,40	14,30	12,90
VF	0,00	7,83	7,83
VFL	0,50	4,45	3,94
L	1,63	0,47	-1,17

4.6. Difração de Raio X (DRX)

Observando-se os achados encontrados verificou-se a presença de fluorapatita em todas as amostras analisadas (Figuras 15A a 15F).

Figura 15. Gráficos da análise de DRX mostrando a presença de fluorapatita em todas as amostras analisadas.

Discussão

5 DISCUSSÃO

Devido ao considerável aumento do risco de lesões cárias em crianças, enfatiza-se a necessidade de se otimizar as técnicas de prevenção. O papel do flúor tópico no declínio da doença cárie é bem conhecido, e a utilização da irradiação laser tem sido estudada como coadjuvante nas terapias preventivas melhorando as características do tecido irradiado e tornando-o menos susceptível à desmineralização (Cecchini et al., 2005; Korytnicki et al., 2006).

A irradiação laser poderia beneficiar pacientes de alto risco/atividade de cárie, nos quais as estratégias de prevenção podem ser menos eficazes, principalmente em crianças que fazem uso irrestrito de sacarose associado a uma higiene bucal inadequada, o que reduz o pH do biofilme dental, favorecendo o desenvolvimento dos estreptococos do grupo mutans (Marsh, 1992). Este possível benefício da irradiação laser é importante sobretudo pela perspectiva de prolongar a manutenção do flúor na cavidade bucal e aumentar sua incorporação.

A ação preventiva do flúor, após o uso de produtos fluoretados, é determinada pelo armazenamento deste mineral em depósitos de fluoreto de cálcio (CaF_2) na superfície dental, aumentando a disponibilidade dos íons flúor no fluido salivar. Porém, se o uso é descontinuado seu efeito pode não ser mantido, uma vez que os reservatórios são esgotados dentro de alguns dias e não estarão mais disponíveis no meio bucal para interferir no processo de desmineralização-rem mineralização (Toumba, 2001). Com a associação do laser a fluoretos, é possível que ocorra um aumento da retenção e da incorporação do flúor pelo esmalte dental, o que favorece seu efeito cariostático a longo prazo (Flaitz et al., 1995; Hsu et al., 1998; Tepper et al., 2004).

Dentre os diversos tipos de lasers, o laser Nd:YAG apresenta efeito preventivo comprovado (Hossain et al., 2001; Castellan et al., 2007; Zezell et al., 2009), relacionado com alterações físico-químicas provocadas pelos efeitos fototérmicos e fotoquímicos inerentes aos lasers de alta potência (Kato et al., 2006).

Não há, na literatura, um consenso sobre o limiar de ablação do laser Nd:YAG, mas sabe-se que o efeito de foto-ablação dos lasers ocorre somente com um processo de interação relativamente longo, juntamente com altas doses de energia acumulada (maior do que 100 J/cm^2) (Nelson et al., 1986). Energia inferior a 60 mJ não promove ablação do

tecido e vem sendo observado aumento da resistência ácida do esmalte em dentes permanentes (Majori et al., 2005; Bedini et al., 2010). Com este propósito, os parâmetros empregados no presente estudo, foram determinados para promover alterações químicas e morfológicas na superfície do esmalte, capazes de aumentar a resistência à desmineralização, sem promover ablação do tecido dental. Assim, além do emprego de parâmetros subablativos, a duração do pulso foi curta, pois, de acordo com Featherstone et al. (1998), pulsos curtos distribuem melhor o calor, enquanto pulsos de maior duração, podem desnecessariamente distribuir energia mais profundamente nos tecidos.

Na literatura, dentre as alterações observadas na superfície irradiada com doses mais elevadas, está a presença de rugosidades, que com o aumento da intensidade da irradiação pode levar à formação de trincas, fissuras e espaços vazios entre os cristais de hidroxiapatita, resultantes da fusão e posterior recristalização do esmalte após resfriamento (Tagomori e Iwase, 1995), ou mesmo formação de crateras na superfície do esmalte (Pelino et al., 1999; Hossain et al., 2001; Tsai et al., 2002; Chen e Huang, 2009). Somado a isso, em função dos parâmetros utilizados, a luz laser pode penetrar através dos tecidos e afetar o tecido pulpar por seu efeito térmico (Castellan et al., 2007).

Estudo prévio (Pelino et al., 1999) avaliou os efeitos do laser de Nd:YAG sobre o esmalte dental através de microscopia óptica e MEV, utilizando, frequência de 10 a 80 Hz e potência não superior a 5W. Os resultados mostraram que o esmalte irradiado apresentou fusão e recristalização e maior resistência às lesões cariosas. Esta fusão e recristalização também foi relatada por Hossain et al. (2001), que utilizaram potência de 1, 2 e 3 W e frequência de 20 Hz, acreditando que estas alterações estruturais são conseqüências do aumento da temperatura. Foi relatado que existe uma relação direta entre o aumento da temperatura com laser Nd:YAG pulsado, com a potência e a frequência utilizada durante a irradiação, sugerindo que a temperatura aumenta em função da potência e da frequência (White et al., 1994). Já é conhecido que o aumento da resistência ácida pode ocorrer a partir de alterações químicas induzidas pela irradiação laser, sem ser necessário que ocorra ablação ou fusão, e principalmente, que as alterações do esmalte fusionado não são as mais interessantes para reduzir a solubilidade (Apel et al., 2005), justificando assim, o emprego dos parâmetros subablativos utilizados no presente estudo.

Sabe-se que a progressão da lesão de cárie é um processo dinâmico que envolve duas etapas principais: (1) a dissolução da cristais de hidroxiapatita do esmalte, e (2) a difusão de íons como cálcio, fósforo e hidrogênio, dentro e fora da superfície do esmalte (Higuchi et al., 1969). Os primeiros locais de ataque ácido são microestruturas como os

espaços inter-prismáticos, espaços ou defeitos de desenvolvimento do esmalte (Zero, 1999). Com a irradiação podem ocorrer mudanças estruturais na superfície do esmalte, que fazem com que esta estrutura se torne mais resistente após a fusão e recristalização do esmalte. Isso foi demonstrado numa avaliação qualitativa por microscopia de luz do esmalte irradiado com alta fluência ($170\text{J}/\text{cm}^2$), observando que pouca ou nenhuma lesão ocorreu (Oho e Morioka, 1990). Porém, essa resistência ácida à custa de altas densidades de energia, possivelmente poderá levar a ocorrência de danos estruturais, devido ao aumento de temperatura. Com densidade de energia menor, a associação dessa irradiação com fluoretos tópicos pode permitir uma maior incorporação desse flúor, melhorando o processo de remineralização, sem que seja necessário atingir altas temperaturas no substrato. Isso foi constatado no presente estudo, pela menor profundidade da desmineralização nos grupos em que foi associado fluoretos com irradiação laser (FAL e VFL) em relação ao grupo controle (C).

Para a prevenção da cárie dental, a fim de alterar a composição ou a solubilidade dos tecidos dentários duros, a luz laser deve ser fortemente absorvida e transformada em calor de forma eficiente sem danificar os tecidos ao redor ou subjacente (Featherstone e Nelson, 1987). Quanto mais a radiação é absorvida por um determinado tecido, menor é a profundidade de penetração nele. Assim, é importante ressaltar que a absorção máxima para a hidroxiapatita está em 10.000 nm e para a água em 3.000 nm . O laser de Nd:YAG está longe dos picos de absorção desses componentes, sendo sua radiação pouco absorvida pelos tecidos mineralizados (Miserendino et al., 1995; Gaspirc e Skaleric, 2001).

A pouca absorção do laser Nd:YAG é compensada pela adição de um fotoiniciador, que deve ser um material com pigmento cromóforo capaz de aumentar a absorção da energia laser no tecido, possibilitando a utilização de baixas densidades de potência, favorecendo a preservação do tecido pulpar (McNally et al., 1999). Assim, para potencializar os efeitos do laser Nd:YAG sobre a superfície do esmalte e diminuir a possibilidade de transmissão para o interior do tecido pulpar, são utilizadas substâncias fotoabsorvedoras, comumente a tinta nanquim (Tagomori e Morioka, 1989; Jennet et al., 1994; Huang et al., 2001) ou a pasta de pó de carvão (Zezell et al., 2009). Como estes pigmentos derivam da química do carbono, podem ocorrer reações químicas indesejáveis resultando em compostos tóxicos para a mucosa oral (Gelskey et al., 1998). No presente estudo, optou-se pelo não uso de substâncias fotoiniciadoras, presumindo então, uma maior penetração da luz no esmalte dental (Gaspirc e Skaleric, 2001), porém, com pouco risco aos tecidos pelo aumento de temperatura devido à baixa densidade de energia empregada.

O mecanismo pelo qual o Nd:YAG aumenta a resistência do esmalte não é esclarecido. Tem sido demonstrado que os lasers podem aumentar significativamente a resistência ácida do esmalte pela alteração da cristalinidade, da solubilidade aos ácidos e da permeabilidade do esmalte (Fowler, Kuroda, 1986). Levando-se em consideração umas das hipóteses para os benefícios do laser em prevenção, a qual propõe que a irradiação forma microporosidades em função da redução do teor de água e carbonato, e que estas microporosidades funcionariam como um reservatório (Fowler e Kuroda, 1986; Oho e Morioka, 1990), pode-se presumir que se o fluoreto de cálcio (CaF_2) estiver disponível em quantidades suficientes no momento da queda do pH na superfície do esmalte, possa haver mineralização destes espaços.

Foi demonstrado que o pH crítico para a dissolução do esmalte (pH 5,5) é reduzido consideravelmente pela irradiação laser chegando a pH 4,8 (Fox et al., 1992a). Segundo estes autores, na presença de apenas 0,1 ppm de flúor, o esmalte irradiado não sofrerá dissolução até que o pH crítico de 4,3 seja atingido. Partindo deste princípio pode-se acreditar que uma maior disponibilidade de flúor no meio bucal aumentaria a retenção e a incorporação do flúor no tecido irradiado, além de estabelecer ligações mais efetivas do flúor com o esmalte. Esta hipótese ajuda a explicar a inibição na formação de lesão de cárie artificial neste estudo, quando flúor e o laser foram associados.

Observou-se semelhança na literatura (Tagliaferro et al., 2007; Chen e Huang, 2009) em relação aos resultados positivos quando da associação do laser com o flúor, entretanto, no presente trabalho não se pode afirmar que houve um sinergismo nesta associação, pois a combinação do laser com flúor fosfato acidulado ou com verniz fluoretado (grupos FAL e VFL), proporcionou redução semelhante na profundidade da desmineralização, à aplicação de flúor isoladamente (grupos FA e VF), bem como o laser isoladamente que também foi capaz de reduzir a profundidade da desmineralização.

Em discordância com o presente estudo, Hicks et al. (1995) observaram um possível sinergismo entre flúor/laser quando o laser de argônio combinado ao flúor promoveu redução mais intensa na profundidade das lesões cariosas.

Estudos relativos aos efeitos dos lasers na microdureza do esmalte são divergentes. Muitos autores sugerem que a irradiação promove o aumento da microdureza (Florin et al., 1990), enquanto outros dizem não haver alteração da dureza na superfície irradiada (Shimizu, 1989; Majori et al., 2005), e outros observaram redução da microdureza nas amostras irradiadas (Jennett et al., 1994; Tagomori e Iwase, 1995). Estes resultados conflitantes são devido à utilização de diferentes tipos de lasers, em diferentes parâmetros e metodologias distintas, não estabelecendo resultados conclusivos. Nesta pesquisa foi

realizada a análise da microdureza longitudinal e não superficial, além disso, foi realizado a dureza após o desafio cariogênico, o que proporciona uma redução da dureza em função deste processo, permitindo avaliar apenas a variação da microdureza. Assim, foi possível observar menor variação da microdureza nos grupos FA e FAL, ou seja, o valor da dureza nestes grupos aproximou-se dos valores da área protegida, o que pode ter ocorrido devido ao baixo pH do flúor gel acidulado, proporcionando um aumento da porosidade do esmalte, facilitando sua difusão na superfície, e quando foi realizada a irradiação, provavelmente ocorreu aumento da incorporação desse flúor, tornando a superfície mais resistente. Estes achados estão de acordo com o estudo de Majori et al. (2005), que demonstraram que após o tratamento do esmalte dental com laser Nd:YAG em níveis de baixa energia (<60 mJ) não foi possível observar variação significativa de dureza entre as superfícies irradiadas e não irradiadas.

Alguns autores associaram a diminuição da microdureza do esmalte à presença de fissuras profundas que tornam frágeis a estrutura do esmalte irradiado (Tagomori e Iwasa, 1995). Essas fissuras também foram descritas por outros autores. (Tagomori e Morioka, 1989; Ariyaratnan et al., 1997; Corpas-Pastor et al., 1997). Entretanto estes achados diferem do presente estudo, visto que a na análise de MEV não foi observada presença de fissuras profundas em nenhum dos grupos irradiados.

Um importante fator a ser considerado é que o emprego do laser associado ou não ao flúor promoveu uma redução da permeabilidade na superfície do esmalte, comparando-se com o grupo controle, sem tratamento algum. Este fato pode estar relacionado com a temperatura atingida pelo substrato após a irradiação que pode ter sido em torno de 350-400°C, e nesta faixa de temperatura ocorre a decomposição das proteínas no esmalte. Os produtos dessa decomposição podem possivelmente promover um vedamento das microporosidades do esmalte reduzindo a penetração dos íons (Fowler e Kuroda, 1986; Hsu et al., 2000). Esta redução da permeabilidade pode estar também relacionada às mudanças químicas na matriz do esmalte pela perda de água e carbonato (Bachmann et al., 2004), já que quando a temperatura da superfície aumenta entre 100-650°C, ocorre redução do conteúdo de água, decomposição de proteínas, perda parcial de carbonato e formação de pirofosfato, o que diminui a solubilidade do esmalte (Fowler, Kuroda, 1986; Castellan et al., 2007). Essa faixa de temperatura pode ser interessante para as modificações induzidas pelo laser na permeabilidade do esmalte, já que não proporcionaria áreas de fusão na superfície. No presente estudo observou-se irregularidades na superfície na análise da MEV quando o laser foi empregado isoladamente. Os parâmetros utilizados neste estudo não provocaram fusão, mas foram suficientes para diminuir a difusão de íons na superfície do esmalte

irradiado. Isto pode ter ocorrido devido à desorganização da matriz orgânica levando a um efeito de vedamento (Hsu et al., 2000), e conseqüentemente limitando a penetração dos íons cobre.

As modificações observadas na análise de permeabilidade mostram que a irradiação laser isoladamente foi capaz de alterar as propriedades eletroquímicas da membrana do esmalte, levando à redução da permeabilidade, corroborando com os estudos de Márquez et al. (1993). Quando associado a fluoretos, os resultados foram semelhantes aos trabalhos de Zezell et al. (2009) e Moslemi et al. (2009). Nos grupos FA e VF também houve redução da permeabilidade, o que já era previsto, já que o flúor é capaz de reduzir as vias de permeabilidade e difusão do esmalte dental (Chersoni et al., 2010).

Na análise de MEV, foi observado alteração discreta da superfície do esmalte nos grupos irradiados, ausência de fissuras profundas, crateras ou qualquer alteração indesejável na superfície e presença de pequenas porosidades, que podem ter sido resultado da eliminação do material orgânico do interior do esmalte, condizendo com os achados da literatura que verificaram que o laser Nd:YAG em parâmetros subablativos, morfologicamente não ocasiona rachaduras na superfície do esmalte, apenas áreas de rugosidades (Majori et al. 2005; Bedini et al., 2010).

No presente estudo, os grupos tratados somente com flúor fosfato acidulados ou verniz fluoretado, apresentaram uma superfície mais lisa e mais homogênea. No caso do flúor fosfato acidulado, acredita-se que sua acidez causou uma leve desmineralização do esmalte superficial, alterando levemente a superfície e diminuindo algumas irregularidades superficiais (Sobral et al., 2000), inerentes ao próprio esmalte ou causadas pela limpeza realizada com pedra pomes. Por sua vez, no grupo em que a irradiação foi realizada sobre o verniz fluoretado, observou-se a formação de grumos sob a superfície do esmalte, o que pode ter ocorrido devido à interação da luz laser com os pigmentos do corante presentes no verniz. Estes pigmentos podem ter aumentado a aderência do verniz na superfície, e mesmo com a limpeza simples que foi realizada não foi possível a remoção completa do verniz. No grupo em que foi aplicado somente o verniz fluoretado, a superfície apresentou-se lisa, com ausência de material na superfície, demonstrando que foi possível a remoção completa do verniz.

Na análise elementar de EDX, observou-se que o cálcio foi o elemento presente mais comum, seguido pelo oxigênio e fósforo, e que a quantidade destes elementos não variou entre as amostras irradiadas ou não irradiadas, corroborando com Müller et al. (2007). No entanto, foram encontradas pequenas quantidades de flúor em alguns grupos e comparando-se esta pequena quantidade com o lado controle de cada amostra onde não

havia sido realizado nenhum tratamento, observou-se que houve uma discreta incorporação no grupo em que foi associado o flúor com o laser (FAL) em relação aos demais grupos, sugerindo que a irradiação laser pode favorecer a uma maior formação de fluoreto de cálcio. Nesta análise, foi possível verificar que pode ter ocorrido um possível sinergismo do flúor acidulado com o laser, pois observou-se uma maior incorporação destes íons nas amostras irradiadas subsequentemente. Estes achados foram semelhantes ao encontrados por Bevilacqua et al.(2008), que utilizou o laser Er:YAG em esmalte bovino, com baixa fluência e baixa taxa de repetição, e observou que houve aumento na incorporação do flúor ao esmalte previamente tratado com flúor fosfato acidulado, demonstrando que possivelmente a irradiação laser promoveu uma maior retenção do íons no tecido irradiado, estabelecendo ligações mais efetivas do flúor com o esmalte.

Nos estudos prévios em que a irradiação foi realizada antes da aplicação de flúor, esta superfície irradiada pode ter favorecido a formação de microporos em função da perda de água e carbonato, os quais funcionariam como um reservatório mineral (Tagomori e Morioka, 1989; Rios et al., 2009). Nos estudos em que o flúor foi aplicado previamente ao laser os resultados também foram positivos uma vez que demonstraram aumentar a resistência do esmalte à desafio ácido (Steiner-Oliveira et al., 2010). Em relação ao momento da aplicação tópica de flúor, foi demonstrado que não houve diferença entre o uso do flúor antes ou depois da irradiação laser na resistência ácida do esmalte dental (Moslemi et al., 2009), entretanto a aplicação do flúor simultaneamente a aplicação de laser, como no presente estudo, apresentou bons resultados em estudo prévio (Derceli, 2010) uma vez que pode haver um somatório dos seus efeitos.

Na DRX observou-se a ocorrência de fluorapatita em todas as amostras, mesmo nos grupos que não se empregou o laser e não teve tratamento. Este fato provavelmente ocorreu pela dificuldade de verificar a procedência dos dentes decíduos utilizados na pesquisa, como estavam expostos ao meio bucal, a frequência de aplicações tópicas de flúor, a ingestão de água fluoretada pela criança, etc. Como atualmente grande parte dos dentifrícios do mercado apresenta flúor e a água de abastecimento pública do estado de São Paulo é fluoretada, provavelmente os dentes empregados neste estudo foram previamente expostos ao flúor, o que explicaria a presença de fluorapatita em todas as amostras avaliadas. Por sua vez, para a análise de EDX é necessário que exista uma quantidade maior de íons flúor nas amostras para detectar a sua presença no teste, justificando os achados do presente estudo.

Os resultados desta pesquisa são extremamente positivos pois demonstram que de fato é possível se obter o efeito de aumento da resistência do esmalte à desmineralização utilizando-se baixas densidades de energia associadas ao uso de fluoretos tópicos, e assim reduzir também os efeitos colaterais, como danos térmicos de superfície e danos pulpares irreversíveis resultantes de altas energias. É importante ressaltar também a importância dos fluoretos tópicos que mantiveram sua função protetora durante o desafio cariogênico, limitando a formação de lesões cariosas na superfície de esmalte dos dentes decíduos.

Comparar os inúmeros artigos sobre os efeitos da irradiação laser sobre o esmalte dental implica em algumas dificuldades. Inicialmente porque poucos estudos analisaram os efeitos preventivos da irradiação laser Nd:YAG no esmalte de dentes decíduos (Lizarelli et al., 2002; Birardi et al., 2004; Lizarelli et al., 2006; Castellan et al., 2007), e além disso o uso de diferentes comprimentos de onda, parâmetros, variações no tempo de pulso e de aplicação dos lasers, enfim, as poucas semelhanças entre as condições de irradiação e as variadas metodologias dificultam comparar diretamente os resultados dos diferentes estudos.

Assim, os presentes resultados sugerem que a irradiação com laser Nd:YAG nos parâmetros utilizados, apresentou-se como um método efetivo e capaz de melhorar as propriedades do esmalte decíduo, preservando suas características. Quando este método foi combinado com métodos preventivos convencionais, como a aplicação tópica de flúor, os benefícios foram intensificados. Ainda assim, estudos adicionais *in situ* e *in vivo* se fazem necessários para avaliar se este benefício pode ter um efeito em longo prazo, avaliando o comportamento do esmalte decíduo sob a influência do ambiente salivar, e ainda determinar a periodicidade que as irradiações devem ser realizadas para se obter o efeito preventivo.

Conclusão

6 CONCLUSÃO

Nas condições do presente estudo foi possível concluir que:

- 1) A irradiação com laser Nd:YAG e os fluoretos tópicos, utilizados em combinação ou isoladamente, foram capazes de reduzir a profundidade da desmineralização do esmalte dental decíduo submetido a desafio ácido.
- 2) O laser Nd:YAG em associação com flúor fosfato acidulado foi capaz de melhorar as propriedades mecânicas do esmalte decíduo submetido a desafio ácido.
- 3) Os parâmetros utilizados promoveram mínimas alterações morfológicas no esmalte decíduo, sendo que os grupos L e VFL apresentaram as alterações mais perceptíveis.
- 4) A irradiação laser associado ao flúor fosfato acidulado proporcionou maior retenção de fluoreto no esmalte, entretanto, o laser empregado isoladamente proporcionou uma ligeira diminuição do conteúdo de ions fúor.
- 5) A irradiação com laser Nd:YAG e os fluoretos tópicos, utilizados em combinação ou isoladamente, promoveram redução da permeabilidade na superfície do esmalte dental decíduo.
- 6) Não foi possível identificar nenhum composto novo após a associação do flúor com o laser.

Referências

REFERÊNCIAS

Adair SM. Evidence-based use of fluoride in contemporary pediatric dental practice. *Pediatr Dent*. 2006 Mar-Apr;28(2):133-42.

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

Arends J, Schuthof J, Jongebloed WG. Lesion depth and microhardness indentations on artificial white spot lesions. *Caries Res*. 1980;14(4):190-5.

Arends J, ten Bosch JJ. Demineralization and remineralization evaluation techniques. *J Dent Res*. 1992 Apr;71 Spec No:924-8.

Ariyaratnam MT, Wilson MA, Mackie IC, Blinkhorn AS. A comparison of surface roughness and composite/enamel bond strength of human enamel following the application of the Nd:YAG laser and etching with phosphoric acid. *Dent Mater*. 1997 Jan;13(1):51-5.

Azevedo DT; Derceli JR; Faraoni-Romano JJ; Marchi P; Palma-Dibb RG. Effect of Nd:YAG/Fluoride on permeability of Primary Teeth Enamel. Proceedings of the 89TH General Session & Exhibition of the IADR; 2011 mar 16-19; San Diego, Califórnia, USA. Proceedings of IADR, n.1887.

Bachmann L, Craievich AF, Zezell DM. Crystalline structure of dental enamel after Ho:YLF laser irradiation. *Arch Oral Biol*. 2004 Nov;49(11):923-9.

Bachmann L, Diebold R, Hibst R, Zezell DM. Changes in chemical composition and collagen structure of dentine tissue after erbium laser irradiation. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*. 2005 Sep;61(11-12):2634-9.

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

Bedini R, Manzon L, Fratto G, Pecci R. Microhardness and morphological changes induced by Nd:Yag laser on dental enamel: an in vitro study. *Ann Ist Super Sanita*. 2010;46(2):168-72.

- Bevilacqua FM, Zezell DM, Magnani R, da Ana PA, Eduardo Cde P. Fluoride uptake and acid resistance of enamel irradiated with Er:YAG laser. *Lasers Med Sci*. 2008 Apr;23(2):141-7. Epub 2007 Sep 26.
- Birardi V, Bossi L, Dinoi C. Use of the Nd:YAG laser in the treatment of Early Childhood Caries. *Eur J Paediatr Dent*. 2004 Jun;5(2):98-101.
- Bish DL; Reynolds RC. Sample preparation for X-ray diffraction. In: *Modern Powder Diffraction*. Mineralogical Society of America, Washington; 1989 cap.4 p.73-97.
- Castellan CS, Luiz AC, Bezinelli LM, Lopes RM, Mendes FM, De P Eduardo C, De Freitas PM. In vitro evaluation of enamel demineralization after Er:YAG and Nd:YAG laser irradiation on primary teeth. *Photomed Laser Surg*. 2007 Apr;25(2):85-90.
- Cecchini RC, Zezell DM, de Oliveira E, de Freitas PM, Eduardo Cde P. Effect of Er:YAG laser on enamel acid resistance: morphological and atomic spectrometry analysis. *Lasers Surg Med*. 2005 Dec;37(5):366-72.
- Chen CC, Huang ST. The effects of lasers and fluoride on the acid resistance of decalcified human enamel. *Photomed Laser Surg*. 2009 Jun;27(3):447-52.
- Corpas-Pastor L, Villalba Moreno J, de Dios Lopez-Gonzalez Garrido J, Pedraza Muriel V, Moore K, Elias A. Comparing the tensile strength of brackets adhered to laser-etched enamel vs. acid-etched enamel. *J Am Dent Assoc*. 1997 Jun;128(6):732-7.
- Chersoni S, Bertacci A, Pashley DH, Tay FR, Montebugnoli L, Prati C. In vivo effects of fluoride on enamel permeability. *Clin Oral Investig*. 2010.
- Costa ACFM, Lima MG, Lima LHMA, Cordeiro VV, Viana KMS, Souza AC, Lira HL. Hidroxiapatita: Obtenção, caracterização e aplicações. *Revista Eletrônica de Materiais e Processos*. 2009; 4(3): 29-3.
- Cury JA. Dentifrícios: como escolher e como indicar. In: Cardoso RJ, Gonçalves EAN. *Odontologia- Odontopediatria e Prevenção*. São Paulo: Artes Médicas; 2002.
- Cury, JA, Tenuta, LM, Ribeiro, CC, Paes Leme, AF. The importance of fluoride dentrifices to the current dental caries prevalence in Brazil. *Braz Dent J*. 2004. 15(3): 167-74.

- Delbem AC, Cury JA, Nakassima CK, Gouveia VG, Theodoro LH. Effect of Er:YAG laser on CaF_2 formation and its anti-cariogenic action on human enamel: an in vitro study. *J Clin Laser Med Surg*. 2003 Aug;21(4):197-201.
- Derceli, JR. Avaliação do efeito da associação da irradiação laser Er:YAG com flúor no esmalte dental submetido à erosão. [Dissertação]. Ribeirão Preto:Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, 2010.
- Featherstone JDB, O'Really MM, Shariati M, Brugler S. Enhancement of remineralization in vitro and in vivo. In: Factors relating to demineralization and remineralization of the teeth. Leach SA (ed). Oxford, IRL, 1986, p.23-34.
- Featherstone JD, Nelson DG. Laser effects on dental hard tissues. *Adv Dent Res*. 1987 Oct;1(1):21-6.
- Featherstone JD, Barrett-Vespone NA, Fried D, Kantorowitz Z, Seka W. CO₂ laser inhibitor of artificial caries-like lesion progression in dental enamel. *J Dent Res*. 1998 Jun;77(6):1397-403.
- Featherstone JD. Caries detection and prevention with laser energy. *Dent Clin North Am*. 2000 Oct;44(4):955-69
- Flaitz CM, Hicks MJ, Westerman GH, Berg JH, Blankenau RJ, Powell GL. Argon laser irradiation and acidulated phosphate fluoride treatment in caries-like lesion formation in enamel: an in vitro study. *Pediatr Dent*. 1995 Jan-Feb;17(1):31-5.
- Florin R, Herrmann C, Bernhardt W. [Measuring microhardness of laser exposed tooth surface]. *Stomatol DDR*. 1990 Feb;40(2):49-51.
- Fox JL, Yu D, Otsuka M, Higuchi WI, Wong J, Powell G. Combined effects of laser irradiation and chemical inhibitors on the dissolution of dental enamel. *Caries Res*. 1992a;26:333-9.
- Fox JL, Yu D, Otsuka M, Higuchi WI, Wong J, Powell GL. Initial dissolution rate studies on dental enamel after CO₂ laser irradiation. *J Dent Res*. 1992b; 71(7):1389-98
- Fowler BO, Kuroda S. Changes in heated and in laser-irradiated human tooth enamel and their probable effects on solubility. *Calcif Tissue Int*. 1986 Apr;38(4):197-208.
- Gao XL, Pan JS, Hsu CY. Laser-fluoride effect on root demineralization. *J Dent Res*. 2006 Oct;85(10):919-23.

Gaspirc B, Skaleric U. Morphology, chemical structure and diffusion processes of root surface after Er:YAG and Nd:YAG laser irradiation. *J Clin Periodontol*. 2001 Jun;28(6):508-16.

Gelskey SC, White JM, Gelskey DE, Kremers W. Vapor emissions resulting from Nd:YAG laser interaction with tooth structure. *Dent Mater*. 1998 Nov;14(6):453-7.

Geusic JE., Marcos HM, Van Uitert LG.: Laser oscillations in Nd-doped yttrium aluminum, yttrium gallium and gadolinium garnets". *Applied Physics Letters*. 1964; 4 (10): 182-84.

Gouw-Soares S, Gutknecht N, Conrads G, Lampert F, Matson Eduardo CP. The bactericidal effect of Ho:YAG laser irradiation within contaminated root dentinal samples. *J Clin Laser Med Surg*. 2000 Apr;18(2):81-7.

Hicks MJ, Flaitz CM, Westerman GH, Berg JH, Blankenau R L, Powell GL: Caries-like lesion initiation and progression in sound enamel following argon laser irradiation: An in vitro study. *J Dent Child* 1993;60:201–206.

Hicks JM, Westerman GH, Flaitz CM, Blankenau RJ, Powell L, Berg JH. Effects of argon laser irradiation and acidulated phosphate fluoride on root caries. *Am J Dent*. 1995; 8(1):10-4

Higuchi WI, Mir NA, Patel PR, Becker JW, Hefferen JJ. Quantitation of enamel demineralization mechanisms. 3. A critical examination of the hydroxyapatite model. *J Dent Res*. 1969 May-Jun;48(3):396-409.

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

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. *J Clin Laser Med Surg*. 2001 Apr;19(2):105-8.

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

Hsu J, Fox JL, Wang Z, Powell GL, Otsuka M, Higuchi WI. Combined effects of laser irradiation/solution fluoride ion on enamel demineralization. *J Clin Laser Med Surg*. 1998 Apr;16(2):93-105. Erratum in: *J Clin Laser Med Surg* 1998 Oct;16(5):294-5.

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

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

Jennett E, Motamedi M, Rastegar S, Frederickson C, Arcoria C, Powers JM. Dye-enhanced ablation of enamel by pulsed lasers. *J Dent Res*. 1994 Dec;73(12):1841-7.

Júnior AMJ, Filho WJB. Introdução a Microscopia Eletrônica de Varredura e Microanálise. Apostila. São Carlos-SP: DEMA-UFSCar; 2005.

Kato IT, Kohara EK, Sarkis JE, Wetter NU. Effects of 960-nm diode laser irradiation on calcium solubility of dental enamel: an in vitro study. *Photomed Laser Surg*. 2006 Dec;24(6):689-93.

Kielbassa AM, Wrbas KT, Schulte-Mönting J, Hellwig E. Correlation of transversal microradiography and microhardness on in situ-induced demineralization in irradiated and nonirradiated human dental enamel. *Arch Oral Biol*. 1999 Mar;44(3):243-51.

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

Kumazaki M, Morimoto T, Tsuchihashi Y, Morikawa M, Arai T, Ueda Y: Studies on enamel solubility and acid resistance by laser. *J Jpn Soc Laser Dent* 1993;4:85-93.

Kwon YH, Lee JS, Choi YH, Lee JM, Song KB. Change of enamel after Er:YAG and CO₂ laser irradiation and fluoride treatment. *Photomed Laser Surg*. 2005 Aug;23(4):389-94.

LeGeros RZ. Calcium phosphates in oral biology and medicine. *Monogr Oral Sci*. 1991;15:1-201.

Levy SM. An update on fluorides and fluorosis. *J Can Dent Assoc*. 2003 May;69(5):286-91.

Lizarelli R, Moriyama LT, Bagnato VS. Ablation rate and micromorphological aspects with Nd:YAG picosecond pulsed laser on primary teeth. *Lasers Surg Med*. 2002;31(3):177-85.

Lizarelli RF, Moriyama LT, Bagnato VS. Temperature response in the pulpal chamber of primary human teeth exposed to Nd:YAG laser using a picosecond pulsed regime. *Photomed Laser Surg.* 2006 Oct;24(5):610-5.

McNally KM, Gillings BR, Dawes JM. Dye-assisted diode laser ablation of carious enamel and dentine. *Aust Dent J.* 1999 Sep;44(3):169-75.

Magalhães AC, Rios D, Machado MA, Da Silva SM, Lizarelli Rde F, Bagnato VS, Buzalaf MA. Effect of Nd:YAG irradiation and fluoride application on dentine resistance to erosion in vitro. *Photomed Laser Surg.* 2008 Dec;26(6):559-63.

Majori M, Manzon L, Pane S, Bedini R. Effects of Nd:YAG laser on dental enamel. *J Appl Biomater Biomech.* 2005 May-Aug;3(2):128-33.

Marinho VC, Higgins JP, Logan S, Sheiham A. Topical fluoride (toothpastes, mouthrinses, gels or varnishes) for preventing dental caries in children and adolescents. *Cochrane Database Syst Rev.* 2003;(4):CD002782.

Márquez F, Quintana E, Roca I, Salgado J. Physical-mechanical effects of Nd:YAG laser on the surface of sound dental enamel. *Biomaterials.* 1993;14(4):313-6.

Marsh PD. Microbiological aspects of the chemical control of plaque and gingivitis. *J Dent Res.* 1992 Jul;71(7):1431-8.

Marsillac, MWS; Delbem, ACB; Vieira RS. Effect of time in hardness test on artificially demineralized human dental enamel. *Braz J Oral Sci.* 2008 jan-mar;7(24):1507-11.

Mecholsky Jr. JJ. Fracture mechanics principles. *Dent Mater.* 1995;11(3):111-2.

Menezes-Oliveira, MAH. Comparação dos aspectos morfológicos e químicos de esmalte e dentina de dentes decíduos e permanentes. [Tese de Doutorado]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia de Ribeirão, 2009.

Mello JB, Mello GPS. *Laser em Odontologia.* São Paulo-SP:Editora Santos; 2001. 174p.

Ministério da saúde. Pesquisa Nacional de Saúde Bucal [Internet]. Brasília, DF; 2010 [acessado 12 jan. 2011]. Disponível em: http://www.mrchip.com.br/mrchip/angelo/SBBrasil2010_Nota_Imprensa.pdf

Miserendino LJ, Levy GC, Rizioiu IM. Effects of Nd:YAG laser on the permeability of root canal wall dentin. J Endod. 1995 Feb;21(2):83-7.

Morlock BJ, Pippin DJ, Cobb CM, Killoy WJ, Rapley JW. The effect of Nd:YAG laser exposure on root surfaces when used as an adjunct to root planing: an in vitro study. J Periodontol. 1992 Jul;63(7):637-41.

Moslemi M, Fekrazad R, Tadayon N, Ghorbani M, Torabzadeh H, Shadkar MM. Effects of ER,Cr:YSGG laser irradiation and fluoride treatment on acid resistance of the enamel. Pediatr Dent. 2009 Sep-Oct;31(5):409-13.

Müller KP, Rodrigues CR, Núñez SC, Rocha R, Jorge AO, Ribeiro MS. Effects of low power red laser on induced-dental caries in rats. Arch Oral Biol. 2007 Jul;52(7):648-54. Epub 2007 Feb 12.

Myers TD, McDaniel JD. The pulsed Nd:YAG dental laser: review of clinical applications. J Calif Dent Assoc. 1991 Nov;19(11):25-30.

Navarro RS, Esteves GV, Oliveira WT Jr, Matos AB, Eduardo CP, Youssef MN, Matson E. Nd:YAG laser effects on the microleakage of composite resin restorations. J Clin Laser Med Surg. 2000 Apr;18(2):75-9.

Nakabayashi N, Pashley, DH. Hibridização dos tecidos dentais duros. São Paulo-SP: Quintessence Editora; 2000. 129p.

Nelson DGA, Shariati M, Glena R, Shields CP, Featherstone JDB: Effect of pulsed low-energy infrared laser irradiation on artificial carieslike lesion formation. Caries Res 1986;20:289– 299.

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

Newbrun E. Dental caries in the future: a global view. Proc Finn Dent Soc. 1992;88(3-4):155-61.

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

Oliveira LB. Experiência de cárie dentária em crianças de 5 a 59 meses de idade e sua associação a fatores socioeconômicos e ao estado nutricional [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2006.

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

Parnell C, Whelton H, O'Mullane D. Water fluoridation. *Eur Arch Paediatr Dent*. 2009 Sep;10(3):141-8.

Parker S. Low-level laser use in dentistry. *Br Dent J*. 2007 Feb 10;202(3):131-8.

Pécora JD. Contribuição ao estudo da permeabilidade dentinária radicular. Apresentação de um método histoquímico e análise morfométrica. Ribeirão Preto, 1985. 110p. [Dissertação de Mestrado] Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

Pelino JE, Mello JB, Eduardo CP, Jorge AO. In vitro study of the Nd:YAG laser effect on human dental enamel: optical and scanning electron microscope analysis. *J Clin Laser Med Surg*. 1999;17(4):171-7.

Percinoto C; Sosígenes V; Andrioni JN; Benfatti MBO. Solubility and fluoride concentration in the enamel of both deciduous and newly erupted permanent teeth following topical application of fluoride solutions. *Rev. Odont. UNESP*. 1990, São Paulo; 19(1): 155-64.

Peyron M, Matsson L, Birkhed D. Progression of approximal caries in primary molars and the effect of Duraphat treatment. *Scand J Dent Res*. 1992 Dec;100(6):314-8.

Pinheiro ALB. Aplicação do laser na Odontologia. Ed. Santos. São Paulo:Santos, 2010.

Pick RM. Using lasers in clinical dental practice. *J Am Dent Assoc*. 1993 Feb;124(2):37-4.

Poulsen S, Scheutz F. Dental caries in Danish children and adolescents 1988-1997. *Community Dent Health*. 1999 Sep;16(3):166-70.

Rios D, Magalhães AC, Machado MA, da Silva SM, Lizarelli Rde F, Bagnato VS, Buzalaf MA. In vitro evaluation of enamel erosion after Nd:YAG laser irradiation and fluoride application. *Photomed Laser Surg*. 2009 Oct;27(5):743-7.

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

Rohanizadeh R, LeGeros RZ, Fan D, Jean A, Daculsi G. Ultrastructural properties of laser-irradiated and heat-treated dentin. *J Dent Res*. 1999 Dec;78(12):1829-35.

Serra MC, Cury JA. The in vitro effect of glass-ionomer cement restoration on enamel subjected to a demineralization and remineralization model. *Quintessence Int*. 1992 Feb;23(2):143-7.

Seppä L. Fluoride varnishes in caries prevention. *Med Princ Pract*. 2004 Nov-Dec;13(6):307-11.

Shimizu Y. Study of histostructure of fused human enamel by laser irradiation. *Nihon Hotetsu Shika Gakkai Zasshi*. 1989 Oct;33(5):1212-25.

Sobral MAP, Luz MAAC, Gama-Teixeira A; Garone Netto N. Influence of the liquid acid diet on the development of dental erosion. *Pesqui Odontol Bras*. 2000;14 (4):406-10.

Sønju Clasen AB, Ruyter IE. Quantitative determination of type A and type B carbonate in human deciduous and permanent enamel by means of Fourier transform infrared spectrometry. *Adv Dent Res*. 1997 Nov;11(4):523-7.

Steiner-Oliveira C, Nobre-dos-Santos M, Zero DT, Eckert G, Hara AT. Effect of a pulsed CO2 laser and fluoride on the prevention of enamel and dentine erosion. *Arch Oral Biol*. 2010 Feb;55(2):127-33.

Stern RH, Sognnaes RF. Laser beam effect on dental hard tissues. *J Dent Res*. 1964; 43(5):973

Stern RH, Sognnaes RF, Goodman F: Laser effect on in vitro enamel permeability and solubility. *J Am Dent Assoc* 1966;73:838–843.

Stern RH, Vahl J, Sognnaes RF. Lased enamel: ultrastructural observations of pulsed carbon dioxide laser effects. *J Dent Res*. 1972 Mar-Apr;51(2):455-60.

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

Tagomori S, Morioka T: Combined effects of laser and fluoride on acid resistance of human dental enamel. *Caries Res* 1989;23:225–231.

- Tagomori S, Iwase T. Ultrastructural change of enamel exposed to a normal pulsed Nd-YAG laser. *Caries Res.* 1995;29(6):513-20.
- ten Cate JM, Duijsters PP. Alternating demineralization and remineralization of artificial enamel lesions. *Caries Res.* 1982;16(3):201-10.
- Tepper SA, Zehnder M, Pajarola GF, Schmidlin PR. Increased fluoride uptake and acid resistance by CO₂ laser-irradiation through topically applied fluoride on human enamel in vitro. *J Dent.* 2004 Nov;32(8):635-41.
- Tewfik HM, Garnick JJ, Schuster GS, Sharawy MM. Structural and functional changes of cementum surface following exposure to a modified Nd:YAG laser. *J Periodontol.* 1994 Apr;65(4):297-302.
- Thylstrup A. e Fejerskov O. *Cariologia Clínica*. 2. ed. São Paulo: Santos, 2001.
- Toumba KJ. Slow-release devices for fluoride delivery to high-risk individuals. *Caries Res.* 2001;35 Suppl 1:10-3.
- Tsai CL, Lin YT, Huang ST, Chang HW. In vitro acid resistance of CO₂ and Nd-YAG laser-treated human tooth enamel. *Caries Res.* 2002 Nov-Dec;36(6):423-9.
- Turssi CP, Schiavoni RJ, Serra MC, Fröner IC. Permeability of enamel following light-activated power bleaching. *Gen Dent.* 2006; 54:323-6.
- Van Meerbeek B, Vargas M, Inoue S, Yoshida Y, Perdigão J, Lambrechts P, Vanherle G. Microscopy investigations. Techniques, results, limitations. *Am J Dent.* 2000 Nov;13(Spec No):3D-18D.
- Zakariasen KL, Dederich DN. Dental lasers and science. *J Can Dent Assoc.* 1991 Jul;57(7):570-3.
- Zero DT. Dental caries process. *Dent Clin North Am.* 1999 Oct;43(4):635-64.
- Zezell, DM, Ribeiro, MS, Maldonado, EP. Interação da luz laser com tecidos biológicos: Aplicações. Apostila do Mestrado Profissionalizante Lasers em Odontologia, 2005. p.103-7.

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

Westerman GH, Hicks MJ, Flaitz CM, Blankenau RJ, Powell GL, Berg JH: Argon laser irradiation in root surface caries: In vitro study examines laser effects. *JADA* 1994;125:401–407.

White JM, Goodies HE, Rose CL. Use of the pulsed Nd: YAG laser for intraoral soft tissue surgery. *Lasers Surg Med* 1991; 11:455–461.

White JM, Fagan MC, Goodis HE. Intrapulpal temperatures during pulsed Nd:YAG laser treatment of dentin, in vitro. *J Periodontol*. 1994 Mar;65(3):255-9.

Yamamoto H, Ooya K. Potential of yttrium-aluminum-garnet laser in caries prevention. *J Oral Pathol*. 1974;3(1):7-15.

Yamamoto H, Sato K: Prevention of dental caries by Nd:YAG laser irradiation. *J Dent Res* 1980; 59:2171–2177.

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

Anexo

ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
Comitê de Ética em Pesquisa

OF.CEP/259/FORP

Ribeirão Preto, 25 de junho de 2009.

Senhora Professora,

Ref.: Processo nº 2009.1.643.58.0
CAAE nº 0058.0.138.000-09

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 100ª Sessão, realizada em 18 de junho de 2009, **aprovou o Projeto de Pesquisa:** "Avaliação da permeabilidade e da resistência acida do esmalte de dentes deciduos após aplicação do laser Nd: YAG associado ou não ao fluor".

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 junho de 2010** e o **Relatório Final** no dia **30 de junho de 2011**.

Atenciosamente,

Glaucê Della Rosa
Secretária do Comitê de Ética em Pesquisa

Ilma. Sra.
Pós-Graduanda DANIELLE TORRES AZEVEDO
Departamento de Odontologia Restauradora – FORP/USP