UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

DANIELLE TORRES AZEVEDO

**ASSOCIAÇÃO DO LASER DIODO COM CPP-ACP/ VERNIZ FLUORETADO NA
RESISTÊNCIA A DESMINERALIZAÇÃO DO ESMALTE DENTAL**

RIBEIRÃO PRETO
2014

DANIELLE TORRES AZEVEDO

**ASSOCIAÇÃO DO LASER DIODO COM CPP-ACP/ VERNIZ FLUORETADO NA
RESISTÊNCIA A DESMINERALIZAÇÃO DO ESMALTE DENTAL**

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

Programa: Odontopediatria

Área de Concentração: Odontopediatria

Orientadora: Profa. Dra. Regina Guenka Palma Dobb

(“Versão corrigida”)

RIBEIRÃO PRETO

2014

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

Catálogo na Publicação

Serviço de Documentação Odontológica

Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Azevedo, Danielle Torres

Associação do laser diodo com CPP-ACP/ verniz fluoretado na resistência a desmineralização do esmalte dental. Ribeirão preto, 2014.

123 p: il.; 30 cm

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Odontopediatria.

“Versão corrigida da tese. A versão original se encontra disponível na Biblioteca da Unidade sede do Programa”

Orientador: Palma-Dibb, Regina Guenka.

1. Cárie dentária. 2. CPP-ACP. 3. Flúor. 4. Lasers.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Azevedo DT. **Associação do laser diodo com CPP-ACP/ verniz fluoretado na resistência a desmineralização do esmalte dental.**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências.
Área de concentração: Odontopediatria.

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DANIELLE TORRES AZEVEDO

DADOS CURRICULARES

Nascimento	14 de outubro de 1981, Maceió-AL
Filiação	Antonio Azevedo Filho Ivone Torres Azevedo
2002-2006	Curso de Graduação em Odontologia Centro de Estudos Superiores de Maceió - CESMAC
2007-2009	Curso de Pós-Graduação <i>Lato Sensu</i> em Odontopediatria, especialização, Associação Odontológica de Ribeirão Preto - AORP
2009-2011	Curso de Pós-Graduação <i>Strictu Sensu</i> em Odontopediatria, nível Mestrado, Programa de Odontopediatria, Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – FORP/USP
2011-2014	Curso de Pós-Graduação <i>Strictu Sensu</i> em Odontopediatria, nível Doutorado, Programa de Odontopediatria, Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – FORP/USP

Trabalho desenvolvido no Laboratório de Pesquisa em Laser e Laboratório de Dentística do Departamento de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP; Laboratório de Química do Departamento de Química da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto – FFCL- USP; Laboratório de Optoeletrônica e Fotônica do Departamento de Física da Universidade Federal de Pernambuco-UFPE.

DEDICO ESTE TRABALHO

À minha filha, **Ana Beatriz Azevedo Lyra**, luz da minha vida que deu um sentido especial à minha existência. Amor infinito!

*There's no greater love
There's no greater joy
Then when I felt your life growing inside of me
God has given a gift so precious he
Must have made you from a cloud and angel's wings
Now that you've come into my life
Without you I know I can't survive
No... 'Cause you're the reason that I live each day
(Thank you – Sarah Connor, 2005)*

*Ao meu marido **João Marcelo Lyra**, grande amor da minha vida. Meu companheiro de todas as horas. Agradeço pelo apoio incondicional durante esta e outras caminhadas. Almas que se encontram jamais se sentirão sozinhas, pois entendem, por si só, a infinita necessidade que têm uma da outra para toda a eternidade. Te amo infinitamente!*

O amor é quando a gente mora um no outro." (Mário Quintana)

*It had to be you, it had to be you
I wandered around, and finally found - the somebody who could
make me be true,
and could make me be blue
And even be glad, just to be sad - thinking of you
It had to be you, wonderful you
It had to be you...
(It had to be you - Rod Stewart, 2002)*

*Aos meus pais, **Antonio Azevedo Filho** e **Ivone Torres Azevedo**, pelo amor e apoio em todos os momentos. Dedico-lhes este e todos os outros momentos da minha vida em que pude aplicar os valores e educação que sempre me deram. Seus ensinamentos e exemplos foram fundamentais para mais esta conquista. Amo vocês!*

*Às minhas irmãs, **Gracielle Torres Azevedo**, **Izabelle Torres Azevedo**, ao meu cunhado **Claudio Talá de Souza** e minha linda sobrinha e afilhada **Maria Eduarda Azevedo Talá**. Por todo o amor.*

*When you're down and troubled
And you need a helping hand
And nothing, whoa nothing is going right. Close your
eyes and think of me
And soon I will be there
To brighten up even your darkest nights You just call out
my name
And you know wherever I am
I'll come running, oh yeah baby
To see you again
Winter, spring, summer or fall
All you have to do is call
And I'll be there, yeah, yeah, yeah
You've got a friend*

(You've got a friend – James Taylor, 2008)

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À Deus e aos Espíritos de Luz, que me guiam e protegem, sustentando-me nas provas desta vida e me fazendo seguir sempre no caminho do bem. Por me ampararem nos momentos difíceis e me suprirem em todas as minhas necessidades.

Por todas as bênçãos e dádivas recebidas, eu vos agradeço!

*À minha orientadora **Profa. Dra. Regina Guenka Palma Dibb**, a quem muito admiro. Meu agradecimento especial pela oportunidade de crescimento e aprendizado durante todos esses anos e por me permitir concluir mais esta etapa.*

“Gratidão é a memória do coração”.

Antístenes

*Ao **Prof. Dr. Paulo Nelson Filho**, por me mostrar o caminho da ciência. Pelas palavras de carinho e incentivo que me fizeram persistir.*

*À **Micheli Cristina Leite Rovanholo**, pela amizade, paciência e compreensão, fundamentais para a conclusão desta etapa.*

Muito obrigada!

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, representada pelo Diretor **Prof. Dr. Valdemar Mallet da Rocha Barros** e pela Vice-Diretora **Profa. Dra. Léa Assed Bezerra da Silva**.

À Coordenação Geral da Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa do **Prof. Dr. Arthur Belém Novaes Junior**.

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 também aos Profs. (as): **Dr. Paulo Nelson Filho, Dra. Maria Cristina Borsatto, Dra. Alexandra Mussolino de Queiroz, Dra. Andiará De Rossi, Dra. Kranya Victoria Díaz Serrano, Dra. Mírian Aiko Nakane Matsumoto, Dr. José Tarcísio Lima Ferreira, Dr. Adílson Thomazinho, Dra. Maria Bernadete Sasso Stuani, Dra. Maria da Conceição Pereira Saraiva e Dr. Fábio Lourenço Romano**. Agradeço por todos os ensinamentos e troca de experiências.

Ao Chefe do Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa do **Prof. Dr. Paulo Nelson Filho**.

À Comissão de Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa da **Profa. Dra. Maria Cristina Borsatto**.

À **CAPES**, pela concessão do auxílio financeiro sob a forma de bolsa de estudo.

Aos amigos do curso de Pós-Graduação em Odontopediatria: **Marina Fernandes de Sena, Fernanda Regina Ribeiro, Walter Raucci Neto, Camila Scatena, Cíntia Guimarães de Almeida, Késsia Suênia Fidelis de Mesquita, Iliana Ferraz Sabbatini, Rodrigo Alexandre Valério**, pela amizade e apoio para o cumprimento desta etapa.

À **Dra Juliana Jendiroba Faraoni Romano**, pela amizade, disponibilidade e auxílio fundamentais para o desenvolvimento desta pesquisa.

À **Profa. Dra. Márcia Andreia Mesquita Silva da Veiga** e **Dr. Claudio Roberto Neri** do Departamento de Química da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto – FFCL-USP; pelo auxílio no desenvolvimento da análise de espectrometria de absorção atômica

Ao **Prof. Dr. Anderson Stevens Leônidas Gomes**, e **Dra Claudia Cristina Brainer de Oliveira Mota** do Laboratório de Optoeletrônica e Fotônica do Departamento de Física da Universidade Federal de Pernambuco-UFPE, por ter cedido o equipamento de OCT e pelo fundamental auxílio nas análises.

Ao **Prof. Dr. Aydano Pamponet Machado** e ao aluno de pós-graduação **David Jones Ferreira de Lucena** do Instituto de Computação da Universidade Federal de Alagoas-UFAL pelo importante auxílio nas análises das imagens de OCT.

À **Isabel Cristina Galino Sola** e **Regiane Cristina Moi Sacilotto**, secretárias da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

À **Micheli Cristina Leite Rovanholo**, **Filomena Lelli Placciti** e aos demais funcionários do Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Aos Professores envolvidos no desenvolvimento das disciplinas do Programa de Pós-Graduação em Odontopediatria, pelo empenho e dedicação em transmitir os conhecimentos para o amadurecimento dos alunos.

Aos Professores e funcionários da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

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

"A vida de uma pessoa consiste num conjunto de acontecimentos, dos quais o último também poderia mudar o sentido de todo o conjunto".

Italo Calvino

Escritor

1923-1985 - Itália

RESUMO

AZEVEDO, DT. **Associação do laser diodo com CPP-ACP/ Verniz fluoretado na resistência a desmineralização do esmalte dental**. 2014. 123p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da associação do laser de diodo ao CPP-ACP ou verniz fluoretado na resistência a desmineralização do esmalte dentário. Foram utilizados 90 fragmentos de terceiros molares humanos irrompidos, selecionados por microdureza superficial e isolados com resina composta deixando apenas uma área de 4x4mm exposta. Em seguida foram desmineralizados por 32 h e 60 espécimes tiveram metade da área (2x4mm) isolada. Os espécimes foram divididos aleatoriamente em seis grupos/subgrupos, de acordo com os tratamentos propostos: G1-Controle (sem tratamento); G2- CPP-ACP, G3-verniz fluoretado Duraphat®; A - sem laser, B- tratamento com laser de diodo (0,7W, 70mJ, 10Hz). Na sequência foi realizado ciclo de pH para indução de desmineralização por oito dias. A solução desmineralizante de cada espécime foi armazenada para análise do cálcio por espectrometria de absorção atômica (n=10). Os espécimes foram seccionados ao meio, uma das metades foi analisada por microdureza longitudinal (n=10) e a outra por rugosidade (n=10) e morfologia superficial (n=10). Para a análise por Tomografia de Coerência Óptica (OCT) foi empregado n=5 por grupo/subgrupo e realizou-se a OCT em 2 fases, sendo a primeira após a desmineralização por 32h e a segunda após os tratamento/ciclagem de pH. Para a microdureza empregou-se a variação percentual da dureza, para a espectrometria de absorção atômica empregou-se a quantidade total de cálcio perdido, para a rugosidade superficial e OCT empregou-se a diferença entre os valores da desmineralização inicial e os valores obtidos após a ciclagem. Os dados foram analisados pelo método não paramétrico de Kruskal-Wallis e o teste de Dunn para diferenciação das médias ($\alpha=5\%$). Pode-se observar que ocorreu maior perda de dureza, de cálcio e maior profundidade de desmineralização nos grupos controle quando comparados com os grupos que receberam os tratamentos (G1A≈G1B e ≠ G2A≈G2B≈G3A≈G3B) sendo estatisticamente diferente ($p<0,05$). Maior rugosidade foi encontrada nos grupos G1A, G1B e G3A e foi estatisticamente significativa ($p<0,05$). O fator laser não

influenciou nas propriedades analisadas. Na microscopia confocal a laser não foram observadas áreas de fusão ou qualquer alteração na estrutura do esmalte irradiado. Pode-se concluir que o laser associado à CPP-ACP ou verniz fluoretado não foi capaz de aumentar a resistência ácida do esmalte submetido a ciclos de pH. Os tratamentos, MI Paste e verniz fluoretado foram eficazes independente da utilização do laser.

Palavras-chave: Cárie dentária; CPP-ACP; Flúor; lasers

ABSTRACT

AZEVEDO, DT. Effect of diode laser associated with **CPP-ACP**/ fluoride varnish on demineralization of dental enamel. 2014. 123p. Thesis (Doctoral) – Ribeirão Preto School of Dentistry, University of São Paulo.

The aim of this study was to assess the effect of diode laser in combination with CPP-ACP/ fluoride varnish on enamel resistance to demineralization. Ninety fragments of unerupted human 3rd molar teeth were selected according to superficial microhardness and covered with compound resin, with only a 4x4mm area left exposed. They were then demineralized for 32 hours and 60 specimens had their exposed area halved. The specimens were randomly divided into 6 groups/subgroups, in line with the proposed treatments: G1-Control (no treatment); G2- MI Paste[®], G3- fluoride varnish Duraphat[®] 5%; A – no laser, B- treatment with diode laser (0.7W, 70mJ, 10Hz). Afterwards, an 8-day pH cycle was carried out to induce demineralization. The demineralizing solution for each specimen was stored for the purpose of atomic absorption spectrometry for the determination of calcium (n=10). The specimens were cut in half. The first half was analyzed using the criterium of longitudinal microhardness (n=10), the second the criterium of roughness (n=10) and superficial morphology (n=10). Optical coherence tomography (OCT) was used to assess group/subgroup for n=5. OCT was carried out at 2 moments, after a 32-hour demineralization period and post pH treatment/cycling. For microhardness we used percent change in hardness, for atomic absorption spectrometry the total amount of calcium lost, for superficial hardness and OCT the difference between the figures seen after initial demineralization and those obtained post cycling. The data were analyzed using the nonparametric Kruskal-Wallis Multiple-Comparison Z-Value Test and the Dunn test for distinguishing mean values ($\alpha = 5\%$). Greater loss of hardness, greater loss of calcium, and deeper demineralization were seen in the control groups, when compared to those groups that underwent treatment (G1A $\approx$ G1B and $\neq$ G2A $\approx$ G2B $\approx$ G3A $\approx$ G3B). Greater roughness was found in groups G1A, G1B, and G3A, and it was statistically significant ($p < 0.05$). Overall, laser use did not exert influence upon the analyzed

properties. Confocal laser scanning microscopy did not reveal areas of fusion or any alteration in the structure of irradiated enamel. One can conclude that associating laser to CPP-ACP or fluoride varnish did not increase enamel resistance to acid when it underwent pH cycles. The treatments, MI Paste, and fluoride varnish were effective, regardless of the use of laser.

Key words: Dental caries; CPP-ACP; fluoride; lasers

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Representação esquemática da metodologia utilizada no preparo e seleção das amostras por microdureza superficial.....	54
Figura 2.	Representação esquemática dos tratamentos propostos.....	57
Figura 3.	Representação esquemática do tratamento experimental dos espécimes e ciclagem de pH.....	59
Figura 4.	Representação esquemática das análises realizadas.....	64
Figura 5.	Representação esquemática do preparo e análise dos espécimes por Tomografia de Coerência Óptica.....	67
Figura 6.	Gráfico representativo da microdureza longitudinal (%) em relação aos tratamentos realizados. Fator tratamento - G1- Controle; G2-MI Paste; G3-Duraphat; Fator laser - A- sem laser; B-com laser. Mesma letra indica similaridade estatística (letra maiúscula = comparação dos grupos; letra minúscula = comparação dos subgrupos).....	71
Figura 7.	Gráfico representativo da espectrometria de absorção atômica. Perda de cálcio (ppm) no 4º e 8º dias de ciclagem. Fator tratamento - G1- Controle; G2-MI Paste; G3-Duraphat; Fator laser – A - sem laser; B-com laser.....	73
Figura 8.	Gráfico representativo da espectrometria de absorção atômica. Perda de cálcio (ppm). Fator tratamento - G1- Controle; G2-MI Paste; G3-Duraphat; Fator laser - A- sem laser; B-com laser. Mesma letra indica similaridade estatística (letra maiúscula = comparação dos grupos; letra minúscula = comparação dos subgrupos).....	73

- Figura 9.** Gráfico representativo da rugosidade superficial (μm) dos diferentes fatores estudados. Fator tratamento - G1- Controle; G2-MI Paste; G3-Duraphat; Fator laser – Asem laser; B-com laser. Mesma letra indica similaridade estatística (letra maiúscula = comparação dos grupos; letra minúscula = comparação dos subgrupos)..... **75**
- Figura 10.** Imagens mostrando superfície quase homogênea, apresentando pequenas porosidades na área experimental (E) dos grupos irradiados com laser de diodo (G1B). 2160X..... **77**
- Figura 11.** Imagens mostrando superfície quase homogênea, apresentando pequenas porosidades na área experimental (E) do grupo MI Paste + laser de diodo (G2B). 2160x..... **79**
- Figura 12.** Imagens mostrando superfície quase homogênea, apresentando pequenas porosidades na área experimental (E) do grupo Duraphat + laser de diodo (G3B). 2160X..... **81**
- Figura 13.** Gráfico representativo da profundidade de desmineralização (em μm) observado na OCT. Mesma letra indica similaridade estatística (letra maiúscula = comparação dos grupos; letra minúscula = comparação dos subgrupos)..... **83**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Distribuição dos grupos experimentais.....	55
Tabela 2.	Média, Desvio-padrão e Mediana, em percentual (%) da variação de dureza dos diferentes grupos e subgrupos.....	72
Tabela 3.	Média, Desvio-padrão e Mediana (mg/L) da interação dos fatores dos grupos e subgrupos para perda de cálcio.....	74
Tabela 4.	Média, Desvio-padrão e Mediana (μm) dos valores da rugosidade superficial dos grupos e subgrupos.....	75
Tabela 5.	Média, Desvio-padrão e Mediana da profundidade da desmineralização (em μm) dos grupos e subgrupos.....	84

SUMÁRIO**RESUMO****ABSTRACT****LISTA DE FIGURAS****LISTA DE TABELAS**

1. INTRODUÇÃO.....	31
2. PROPOSIÇÃO.....	45
3. MATERIAL E MÉTODO.....	49
Aspectos éticos.....	51
Delineamento experimental.....	51
Seleção da amostra.....	51
Preparo dos espécimes.....	52
Microdureza superficial inicial para seleção dos espécimes.....	52
Desmineralização inicial.....	53
Grupos experimentais.....	55
Ciclagem de pH.....	58
Microdureza Longitudinal.....	60
Análise de Espectrometria de Absorção Atômica.....	61
Análise da Rugosidade.....	62
Análise Morfológica.....	63
Análise por Tomografia de Coerência Óptica.....	65
Análise dos dados.....	67
4. RESULTADOS.....	69
Microdureza Longitudinal.....	71

Espectrometria de Absorção Atômica.....	72
Rugosidade.....	74
Microscopia confocal a laser.....	75
Tomografia de coerência óptica (OCT).....	83
5. DISCUSSÃO.....	85
6. CONCLUSÕES.....	101
7. REFERÊNCIAS.....	105
ANEXO	121

Introdução

1. INTRODUÇÃO

A Odontologia vem apresentando grandes avanços no último século, dentre estes avanços está o entendimento da cárie dentária como doença e o desenvolvimento de formas mais eficazes e conservativas para seu tratamento e prevenção (Anusavice, 2005; Kutsch et al., 2013).

A cárie dentária é uma doença multifatorial que promove um desequilíbrio no processo des-remineralização e seu desenvolvimento é decorrente da interação entre a estrutura dentária, os microrganismos cariogênicos, o tempo de permanência e a presença de carboidratos fermentáveis (Loesche, 1982; Thylstrup & Fejerskov, 2001). Ela envolve processos bioquímicos relacionados com o transporte e a metabolização de açúcares de baixo peso molecular e álcool derivado de açúcar, pelas bactérias do biofilme dental, sendo convertidos em ácidos orgânicos os quais se dissociam em íons H^+ (Thylstrup & Fejerskov, 2001). O excesso desses íons promove uma queda instantânea do pH do meio (Robinson et al., 2009) que quando diminui para valores inferiores a 5,5 há a liberação de íons cálcio e fósforo para o meio bucal (Gu et al., 2011). O aumento do pH é propiciado pela ação da saliva, porém fenômenos frequentes de desmineralização e remineralização vão promovendo perdas minerais progressivas, de tal forma que o fenômeno passe a atingir um estágio clínico visível evidenciado pela formação de lesões de manchas brancas até a formação de cavidades (Steiner-Oliveira et al., 2006).

Para intervenção e tratamento do esmalte desmineralizado, diferentes formas de fluoretos vem sendo empregadas (ten Cate & Duijsters, 1983). O flúor é bem reconhecido por favorecer a remineralização e reduzir a desmineralização do esmalte em meio ácido, especialmente, em condições cariogênicas (Duckworth,

1993; Lagerweij; ten Cate, 2002). O efeito preventivo do flúor se dá pelo aumento da resistência ácida do esmalte devido a formação de fluoreto de cálcio que serve como reservatório de flúor e cálcio, mantendo o meio saturado em relação a esses minerais. Em condições nas quais há diminuição do pH (abaixo de 5,5) tendo a presença de flúor, apesar da hidroxiapatita ser subsaturada 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 (Thystrup & Fejerskov, 2001).

A presença contínua de flúor no meio bucal é, ao longo de toda a vida do indivíduo, indispensável para que ocorra o efeito preventivo e a formação de fluoreto de cálcio na etapa de remineralização (Cury, 1992). Além disso, o flúor disponível topicamente é absorvido pelo microrganismo e, no seu interior, em altas concentrações, interfere na atividade enzimática e no controle do pH intracelular, reduzindo a produção de ácidos (Shellis & Duckworth, 1994).

Dentre os métodos amplamente empregados têm-se os vernizes fluoretados que são métodos preventivos utilizados para reduzir a desmineralização e promover a remineralização dos tecidos duros, podendo ser utilizados em diversas situações (Petersson, 1993; Beltrán-Aguilar et al., 2000, Cury et al., 2010). Estes vernizes são capazes de prover liberação de flúor e formam uma película endurecida sobre o dente, o que ajuda na sua retenção, conferindo proteção ao esmalte dental durante as situações de desafio cariogênico (Ellwood & Fejerskov, 2005). Eles apresentam algumas vantagens em relação a outros tipos de fluoretos, como por exemplo, não serem afetados pela umidade, permanecerem aderidos ao esmalte durante um período significativo de tempo e sua utilização não requerer diretamente a

cooperação do paciente (Gontijo et al., 2007), o que é especialmente importante na Odontopediatria.

Embora a utilização do flúor de forma isolada em suas mais diversas formas de aplicação reduza a progressão da lesão de cárie, os seus maiores benefícios são observados nas superfícies lisas de esmalte não sendo seu efeito muito evidente na superfície oclusal. Além disso, a presença de flúor na cavidade bucal não é suficiente para evitar a formação da lesão pois embora ele reduza a perda mineral, não impede a instalação da doença (Bohannon, 1983). Somado a estes fatores, deve existir a preocupação com o problema da fluorose dentária que vem crescendo. Relatórios de várias partes do mundo indicam um visível aumento na prevalência e na gravidade, tanto em países desenvolvidos como naqueles em desenvolvimento, em comunidades com água fluoretada ou não, sendo necessária uma administração rigorosamente controlada e exigindo maior atenção profissional quando da utilização de fluoretos (Buzalaf et al., 2011). Desta forma, novos métodos preventivos estão sendo implementados a fim de que se evite o desenvolvimento e a consequente progressão da lesão. Para tal, diferentes terapias preventivas têm sido estudada com potencial de aumentar o grau de remineralização, reduzir o processo de desmineralização e, portanto, promover a redução da incidência de lesões ativas de cárie (Rodrigues et al., 2004).

Assim, atualmente, substâncias não-fluoretadas estão disponíveis para a terapia de prevenção da cárie dentária. Estas substâncias são à base de Ca e P e formam um complexo de fosfopeptídeo de caseína (CPP) associado ao fosfato de cálcio amorfo (ACP), que se propõe a ter uma ação adjuvante à dos compostos fluoretados no tratamento não invasivo de lesões iniciais de cárie, formando uma

camada protetora e inibindo a desmineralização (Cochrane et al., 2010; Wang et al., 2012)

Produtos lácteos como leite e queijo são conhecidos como alimentos protetores contra a desmineralização dentária devido à presença da proteína caseína (Schupbach et al., 1996; Sreebny, 2000). Esta proteína é o nome coletivo para os caseinatos que compreendem de 70 a 80% do conteúdo total de proteínas do leite (Swaisgood, 2006). A principal função fisiológica das caseínas é estabilizar o fosfato de cálcio formando micelas (Barbour et al., 2008). Esta substância apresenta efeito remineralizador do esmalte tornando a estrutura mineral do dente mais resistente e menos solúvel ao ataque ácido (Lijima et al., 2004). Esse efeito ocorre devido a enzimas presentes na cavidade bucal que produzem peptídeos a partir da caseína, formando fosfopeptídeos de caseína (CPP) com capacidade de estabilizar o cálcio e o fosfato, mantendo-o numa condição amorfa ou solúvel, conhecida como fosfato de cálcio amorfo (ACP), fornecendo um reservatório de íons durante o ataque cariogênico (Fitzgerald, 1998; Reynolds, 1998; Shen, 2001; Reynolds et al., 2003).

Desta forma, o mecanismo anti-cariogênico proposto para o CPP-ACP é o acúmulo do ACP sobre a estrutura dentária, mantendo os íons livres de cálcio e fosfato em um estado de supersaturação em relação ao esmalte, diminuindo a desmineralização e aumentando a remineralização resultando em um esmalte mais resistente aos desafios ácidos (Iltthagarun et al., 2005; Yamaguchi et al., 2007). Esse efeito tem sido comprovado em diversos estudos (Reynolds, 1997; Shen et al., 2001, Iijima et al., 2004; Cochrane et al., 2008; Morgan et al., 2008; Rao et al., 2009; Reynolds, 2009; Cochrane et al., 2012).

Atualmente esse composto tem sido incluído em vários produtos para higiene bucal, uma vez que a atuação desse complexo como um veículo de transporte de cálcio e fosfato para a superfície dentária e a sua deposição no biofilme e película salivar são bem compreendidos (Reynolds, 2009).

Foi observado *in vivo* que as lesões de mancha branca regrediram significativamente em pacientes tratados com CPP-ACP após remoção do aparelho ortodôntico fixo (Bailey et al., 2009). O mesmo foi observado em gomas de mascar contendo CPP-ACP que promoveu regressão da lesão e retardou significativamente sua progressão em um período de 24 meses (Morgan et al., 2008). Dentre os diversos produtos lançados no mercado contendo um complexo de fosfopeptídeo de caseína, a MI Paste[®] tem demonstrado em estudos *in situ*, *in vitro* e *in vivo*, ser um potencial agente remineralizador (Ballard et al., 2013; Shen et al., 2011; Robertson et al., 2011; Li et al., 2014).

Novas abordagens na prevenção lesões de cárie têm sido desenvolvidas ou aprimoradas (Cochrane et al. 2010; James et al. 2010). Entre os métodos aplicados atualmente, a utilização da irradiação dos tecidos dentais com laser tem despertado um grande interesse por parte da comunidade científica (Antunes et al., 2006; Parker, 2007; Zezell et al., 2009; Bedini et al., 2010). Este método representa uma alternativa para o aumento da resistência ácida do esmalte reduzindo a perda mineral em situações de alto desafio cariogênico (Raucci-Neto et al., 2013).

A possibilidade de aumentar a resistência do esmalte dental à desmineralização após a irradiação por um laser foi demonstrada pela primeira vez em 1965 com um laser de rubi (Stern & Sognnaes, 1965; Sognnaes & Stern, 1965). O laser pode ser utilizado para o aumento da resistência à desmineralização do esmalte dental de duas formas distintas: utilizando parâmetros ablativos ou não

ablativos (Pinheiro et al. 2010). Quando se utiliza uma energia ablativa no esmalte dental, com o aumento da temperatura, o laser promove a fusão e ressolidificação dessa superfície, sendo, portanto relacionada a uma alteração morfológica da estrutura irradiada (Bedini et al., 2010; Correa-Afonso et al., 2014). Por outro lado, quando se utiliza potências mais baixas, o efeito do laser não é ablativo mas sim modificador da composição microestrutural e química do esmalte (Azevedo et al., 2012; Raucci-Neto et al., 2013).

A irradiação pode promover o aquecimento do esmalte na faixa entre 100-650°C e este provoca diminuição do conteúdo de água, perda parcial de carbonato e formação de pirofosfatos, ou seja, as fases menos solúveis não são formadas e assim ocorre uma diminuição da solubilidade do esmalte. Entre 650-1000°C são observados crescimento dos cristais, formação de α -TCP e β -TCP, redução de OH^- , e eliminação do carbonato. Entre 1100-1600°C, as fases α -TCP e β -TCP podem ser observadas juntamente com uma maior redução de OH^- . Nas duas faixas mais altas de temperatura, as fases de hidroxiapatita formadas apresentam produto de solubilidade maior do que o esmalte natural, ou seja, o substrato se torna mais solúvel (Fowler e Kuroda, 1986). Existe ainda outra teoria que descreve a possível influência da decomposição da matriz orgânica na redução da solubilidade (Oho & Morioka, 1990). Considerando-se 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 (Bachmann et al., 2004; Liu & Hsu 2007). Porém, até hoje a maneira exata da atuação do laser na diminuição da solubilidade do esmalte não foi completamente esclarecida (Azevedo, 2011).

Dentre os diversos tipos de lasers utilizados na Odontologia, tem-se o laser de diodo que além de sua capacidade de redução microbiana, seu custo e tamanho reduzidos facilitaram sua aplicação nas diversas áreas de pesquisa (Romanos; Karman; Nentwig, 1998; Romanos, Nentwig, 1999). Este tipo de laser apresenta como meio ativo um sólido semicondutor associado ao Alumínio, Gálio e Arseneto e a sua energia gerada é transformada em feixe de luz laser. O comprimento de onda do laser de diodo de alta intensidade pode variar de 805 a 980nm (espectro infravermelho), podendo ser emitido no modo pulsado ou contínuo, na forma de contato ou não contato, dependendo da sua indicação clínica. O seu comprimento de onda apresenta baixo coeficiente de absorção na água e na hidroxiapatita, portanto, não promovem a ablação de tecidos duros devido à fraca interação com as estruturas mineralizadas além de não produzir danos térmicos aos tecidos e apresentar um alto coeficiente de absorção por tecidos pigmentados (Chanthaboury, Irinakis, 2005).

Recentemente, tem sido demonstrado que a irradiação com laser associada à aplicação tópica de flúor poderia aumentar a resistência ácida pela maior incorporação de fluoretos (Nammour et al., 2003) e/ou maior transformação da hidroxiapatita em fluorapatita (Phan et al., 1999). Alguns autores especularam que a irradiação com o laser poderia promover a formação de microespaços no esmalte, o que facilitaria a incorporação dos íons flúor (Oho & Morioka, 1990), ou que a irradiação induziria a formação da fluorapatita pela incorporação do flúor nas camadas da superfície do esmalte fundidas pelo aumento da temperatura (Phan et al., 1999). Em um estudo *in vivo* com laser Nd:YAG em fossas e fissuras verificou-se que o esmalte ficou mais resistente com laser associado ao flúor fosfato acidulado (Zezell et al; 2009). Contudo, outro estudo observou, que para a dentição decídua

não ocorreu sinergismo, mas uma ação preventiva com o laser sozinho (Raucci-Neto, 2013). Apesar da literatura demonstrar que a luz laser diminui a solubilidade do esmalte, os mecanismos pelos quais estas alterações ocorrem, assim como sua profundidade (Delbem et al., 2003) e longevidade (Raucci-Neto et al., 2013) precisam ser esclarecidas, bem como se há realmente o sinergismo do laser com flúor ou com outras substâncias preventivas.

Para analisar lesões artificiais de cárie em esmalte muitos métodos podem ser empregados porém alguns deles são indiretos e baseiam-se na textura e aparência da superfície, não fornecendo informações sobre alterações ocorridas nas camadas mais profundas, outros ainda necessitam de destruição da amostra dificultando o acompanhamento da progressão e/ou reversão das mesmas (Jones, Fried, 2006). O estudo de novos métodos para a prevenção da cárie dentária exige que as lesões desenvolvidas e pequenas alterações no conteúdo mineral da estrutura possam ser identificadas. Entre os métodos desenvolvidos para mensuração das alterações minerais em estudos *in vitro*, a utilização das técnicas de microdureza em corte transversal (Castellan et al., 2007; Delbem et al., 2009; Azevedo et al., 2012), Tomografia de coerência óptica (Mandurah et al., 20013), Rugosidade (Honório et al., 2006) e espectroscopia de absorção atômica (Arends, Ten Bosch, 1992; Ten Bosch, Angmar-Mansson, 1991) têm sido utilizados.

A análise mais utilizada para a avaliação da perda do conteúdo mineral é a microdureza que é a 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. Esta metodologia necessita da planificação e polimento prévio dos espécimes podendo ocasionar a perda da camada aprismática do esmalte (Marsillac et al., 2008). A microdureza representa 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 microscópicas e incorporadas a uma fórmula específica da dureza.

Outro método empregado para análise de substâncias empregadas no processo de des-remineralização *in vitro* é a técnica da Espectrometria de Absorção Atômica (EAA), desenvolvido por L'vov em 1959. Por meio do efeito Joule, um tubo de grafite é aquecido por resistência à passagem de uma alta corrente elétrica aplicada através do tubo. Um fluxo de gás inerte externo, geralmente argônio, percorre o tubo através de suas extremidades para evitar o contato das partes quentes do mesmo com oxigênio atmosférico pois acarretaria na oxidação e consequente desgaste da grafite; e um fluxo interno de gás é inserido. Este processo ocorre por atomização, ou seja, pela transformação de uma suspensão aquosa em partículas secas (6 a 7% de umidade) a partir da pulverização da suspensão no interior de uma câmara aquecida (atomizador). A técnica de EAA permite a análise de microamostras e microvolumes sob a forma de suspensões com alta quantidade de solventes orgânicos (Welz, Sperling, 1999), bem como as soluções empregadas para o processo de des-remineralização.

A rugosidade ainda é um dos parâmetros mais utilizados para quantificar alterações das superfícies dentárias em estudos *in vitro*. Uma limitação do uso desta propriedade é que o seu valor não contempla as características de textura da superfície em estudo, apresentando apenas informações sobre altura (picos) e profundidade (vales) da superfície em intervalos regulares (Field et al., 2010), que é

amenizada com o emprego de microscopia confocal a laser (Derceli et al., 2013) que realiza a leitura com um feixe de laser e permite a avaliação tridimensional da superfície.

A Tomografia de Coerência Óptica (OCT) é uma técnica de diagnóstico por imagem que utiliza a coerência temporal da luz na produção de imagens em seção transversal com alta resolução espacial (Huang et al., 1991; Chan et al., 2014). Este método apresenta a vantagem de permitir a análise não-invasiva de microestruturas internas de tecidos tanto *in vitro* (Freitas et al., 2006; Colston et al., 1998), como *in vivo* (Brandenburg, 2003) produzindo imagens em tempo real. A profundidade de análise depende da interação entre a luz e o tecido analisado. Em geral, utilizam-se comprimentos de onda na região do infravermelho próximo e desta forma, a região avaliada pode variar 2 cm em tecidos transparentes (Hee et al., 1995), a poucos milímetros em tecidos altamente espalhadores, como as estruturas dentais (Colston et al., 1998).

No sistema de OCT, a luz proveniente da fonte óptica é dividida em dois feixes: um é conduzido até o espelho de referência e o outro, até a amostra. A combinação da radiação retro-refletida oriunda do braço de referência com a radiação retro-espalhada pelo objeto em estudo forma padrões de interferência no detector e geram os sinais do OCT. Os sinais provenientes de diferentes profundidades na amostra são gerados pela movimentação do espelho de referência no sentido longitudinal. Com base na posição onde se observa a interferência e no comprimento do braço de referência, determina-se o caminho óptico do braço da amostra. Desta forma, a luz detectada contém informações sobre a localização das estruturas dentro do material analisado (Freitas et al., 2006). Para se determinar a

real profundidade do tecido analisado é necessário dividir o valor de profundidade óptica medido pelo índice de refração da estrutura (Colston et al., 1998).

Nos primeiros relatos do uso do método de OCT na Odontologia, em 1998, foi demonstrado que esta técnica permite a diferenciação entre as diferentes estruturas dentais e entre estas e o tecido mole adjacente. Por meio de medidas realizadas na região amelo-cementária observou-se a identificação das interfaces entre a gengiva e o dente e entre o esmalte e a dentina (Colston et al., 1998). Desde então, diversos estudos (Popescu et al., 2008; Ko et al., 2005; Jones e Fried, 2006) foram realizados para viabilizar a aplicação deste método no diagnóstico de alterações minerais dos tecidos dentais. A OCT vem sendo empregada para o diagnóstico precoce da lesão de cárie (Freitas et al., 2006) e a caracterização de esmalte e dentina em dentes decíduos (Maia, 2009), imagens de polpa (Kauffman et al., 2006) e medidas *in vitro* da espessura do remanescente dentinário (Fonseca et al., 2009). As principais vantagens do sistema de OCT são o fato de ser uma técnica de geração de imagens não invasiva, não destrutiva, livre da emissão de radiação ionizante e quase em tempo real (Baumgartner et al., 2000).

Desta forma, diante da possibilidade de se analisar a resistência ácida do esmalte dental por diferentes métodos e devido a escassez de estudos utilizando o laser de diodo com 980 nm de comprimento de onda na prevenção da lesão de cárie e sua associação a compostos não fluoretados como CPP-ACP, tornam-se necessários mais estudos sobre o assunto.

Proposição

2. PROPOSIÇÃO

O objetivo do presente estudo foi avaliar *in vitro* o efeito da associação do laser diodo (980nm) com CPP-ACP e/ ou verniz fluoretado na prevenção da desmineralização do esmalte de dentes permanentes por meio de microdureza longitudinal, espectrometria de absorção atômica, rugosidade superficial e tomografia de coerência óptica.

Material e Método

3. MATERIAL E MÉTODO

Aspectos éticos

O presente estudo foi inicialmente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – FORP-USP, sob o protocolo de nº 2011.1.1273.58.5 (Anexo).

Delineamento Experimental

O experimento consiste em um estudo *in vitro*, fatorial 3 x 2. Os fatores de estudo foram: Tratamento em três níveis (ausência de tratamento – controle, MI Paste[®], Verniz Duraphat[®]) e Laser em dois níveis (com laser ou sem laser). As unidades experimentais foram 90 fragmentos de esmalte de terceiros molares humanos hígidos, divididos aleatoriamente em 6 grupos/subgrupos (n=15). As variáveis de resposta quantitativa para o estudo foram a análise da perda mineral por meio da variação da porcentagem de dureza longitudinal (n=10), análise do cálcio presente na solução desmineralizante por espectrometria de absorção atômica (n=10), rugosidade da superfície (n=10) e profundidade da lesão por tomografia de coerência óptica (n=5). As imagens da superfície do esmalte foram analisadas qualitativamente para verificar as possíveis alterações desse substrato após os tratamentos propostos.

Seleção da amostra

Foram selecionados 90 terceiros molares permanentes humanos irrompidos hígidos 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, pedra-pomes e água aplicada com escovas de Robinson. A desinfecção dos dentes foi realizada com solução de timol 0,1%, na qual ficaram imersos durante uma semana. Na sequência, os dentes foram lavados vigorosamente e mantidos em água destilada/deionizada durante o período de preparação dos espécimes.

Preparo dos espécimes

As raízes dentais foram seccionadas com disco diamantado sob refrigeração à água, acoplado em uma máquina de corte (Minitom, Struers A/S, Copenhagen, DK-2610, Denmark), 1mm abaixo da junção amelo-cementária. A seguir os dentes foram fixados com cera em suporte de acrílico e as coroas divididas em 2 partes no sentido méso-distal, obtendo-se assim 180 secções (vestibular e lingual/palatina).

Microdureza Superficial Inicial para seleção dos espécimes

Os espécimes foram selecionados por meio de microdureza inicial. Foram fixados com cera pegajosa (Cera Rosa 7, Polidental Indústria e Comércio Ltda., São Paulo – SP, Brasil) a uma base de acrílico, com o auxílio de um paralelômetro (ElQuip, São Carlos-SP, Brasil). Foi utilizado o microdurômetro Shimadzu Micro Hardness Tester HMT-2.000 (Shimadzu Corporation – Kyoto-Japan) com penetrador diamantado piramidal tipo Knoop, com carga estática de 25 gf, aplicada por dez segundos. Foram realizadas em cada amostra três endentações, sendo a primeira no centro do espécime, e então mais duas endentações equidistantes da primeira com espaço de 500 µm entre elas. Após finalizadas as medições, foi calculada a

média de dureza de cada espécime, sendo desprezados aqueles que apresentaram valor 20% acima ou abaixo da média de todos os espécimes e também aqueles com desvio-padrão interno (entre as marcações) acima de 20% do valor de sua própria média, obtendo-se assim 90 espécimes.

Antes de iniciar a desmineralização, os espécimes selecionados foram impermeabilizados com resina composta, com exceção de uma janela criada no esmalte externo na região mais plana da superfície, em todos os fragmentos com dimensão de 4x4mm (16mm²). Foram empregados 60 fragmentos para a análise de microdureza longitudinal e rugosidade e 30 fragmentos para a análise de OCT.

Desmineralização Inicial

Cada espécime foi exposto a uma solução desmineralizante (pH 5,0) contendo 1,28 mM cálcio, 0,74 mM fosfato, 0,03 µg Flúor/mL (ten Cate & Duijsters, 1982) por 32 horas (2ml/mm²) (Queiroz et al., 2008). Após este período metade da área exposta foi isolada com resina composta e a outra metade foi submetida aos diferentes tratamentos propostos.

A representação esquemática do preparo, seleção dos espécimes por microdureza superficial e desmineralização inicial está disposta na figura 1.

Figura 1. Representação esquemática da metodologia utilizada no preparo e seleção das amostras por microdureza superficial.

Grupos experimentais

Os espécimes foram divididos aleatoriamente em 3 grupos (G1, G2 e G3) e 2 subgrupos experimentais (A: sem laser e B: com laser) (n=15), de acordo com os tratamentos propostos.

Tabela 1. Distribuição dos grupos experimentais

Grupo	Tratamento	Composição
G1	Sem tratamento	—
G2	MI Paste®	Água, glicerol, CPP-ACP, D-sorbitol, CMC-Na, propileno glicol , dióxido de sílica e de titânio, , xilitol, ácido fosfórico, flavorizante, óxido de Zn, sacarina, etil p-hidroxibenzoato, óxido de magnésio, propyl p- hidroxibenzoato , butil p- hidroxibenzoato , pH 6,94
G3	Duraphat®	Colofônia, álcool etílico, goma-laca, mástica, sacarina, aroma, cera branca de abelha e 22.600 ppm de Fluoreto de Sódio (fluoreto de sódio a 5%)

Para o tratamento experimental dos espécimes foram empregados:

- Grupo 1A – controle/sem tratamento
- Grupo 1B – Controle/laser: O laser Diodo utilizado (Sirolaser, Sirona Dental Systems GmbH, Bensheim, Alemanha) apresenta comprimento de onda de 970

nm+/- 10 nm, potência máxima de 7W CW, feixe guia de 1mW e fibra óptica de 200 um. Foi utilizado carvão mineral diluído em água destilada como foto absorvedor, em seguida a área exposta do espécime foi irradiada com potência de 0,7 W (energia de 70mJ) e frequência de 10 Hz durante 25 segundos, tendo uma densidade de energia de 222,82 J/cm². O medidor de potência FieldMax II-TOP (Coherence, INC., USA) foi utilizado previamente às aplicações e após finalizá-las para conferência da potência empregada.

- Grupo 2A - MI Paste[®] (GC Corporation, Tokyo, Japão): o agente foi aplicado com auxílio de um microbrush, deixado com ligeiro excesso em contato com a superfície durante três minutos e após esse tempo, o excesso foi removido com gaze umedecida em água destilada/ deionizada.
- Grupo 2B - Foi aplicada a pasta MI Paste[®] associada ao laser diodo. A pasta foi aplicada por três minutos junto com o carvão e em seguida foi realizada a irradiação como descrita no grupo 1B. Após a irradiação a pasta foi removida com gaze umedecida em água destilada/ deionizada.
- Grupo 3A - O verniz fluoretado Duraphat[®] (Colgate-Palmolive Company, Germany) a 5% foi aplicado com microbrush na superfície do esmalte e permaneceu por quatro horas. Após esse período, o verniz foi removido da superfície com gaze umedecida em água destilada/ deionizada.
- Grupo 3B - Foi associado o verniz ao laser diodo. O verniz foi aplicado e em seguida foi realizada a irradiação como descrita no grupo 1B, somente quatro horas depois, o verniz foi removido.

Ao final dos tratamentos os espécimes foram armazenados em água destilada e deionizada e na estufa a 37° C e após 24 horas foram iniciados os ciclos de pH. A representação esquemática dos tratamentos propostos está disposta na figura 2.

Grupos		Tratamento
G1	A	<p>Controle</p>
	B	<p>Laser Diodo</p> <p>970nm/ 0,7 W (70mJ) / 10HZ/25s</p>
G2	A	<p>MI Paste</p> <p>3min</p>
	B	<p>MI Paste + Laser Diodo</p> <p>970nm/ 0,7 W (70mJ) / 10HZ/25s</p>
G3	A	<p>Duraphat</p> <p>4horas</p>
	B	<p>Duraphat + Laser Diodo</p> <p>970nm/ 0,7 W (70mJ) / 10HZ/25s</p>

Figura 2. Representação esquemática dos tratamentos propostos

Ciclagem de pH

Foram utilizadas solução DES de mesma composição da solução inicial de 32 horas e solução RE, de pH 7,0 constituída de 1.5 mM Cálcio, 0.9 mM Fósforo, 150 mM Cloreto de Potássio, 0,05 µg Flúor/mL, 0.1 M Tris buffer (ten Cate & Duijsters, 1982).

As amostras foram submetidas à ciclagem de pH de acordo com estudo piloto preliminar. Foram oito dias de ciclagem. Os espécimes foram mantidos por 8 h em solução desmineralizante e 16 h em solução remineralizante. Entre as mudanças do espécime de uma solução a outra, estes foram lavados com água destilada/deionizada e secos com papel absorvente. A proporção e volume de solução des e remineralizante por área de blocos foi de 6,25 (50ml) e 3,12 ml/mm² (24ml), respectivamente. As soluções foram substituídas após quatro dias de ciclagem e a solução desmineralizante foi armazenada para a análise de espectrometria de absorção atômica.

Durante todo o experimento, os espécimes foram mantidos em estufa, a uma temperatura constante de 37°C. Ao final das ciclagens as amostras foram lavadas com água destilada/ deionizada, secas com papel absorvente e armazenadas em umidade relativa a 4°C para as análises posteriores.

Logo após a remoção dos espécimes da solução desmineralizante, ao fim do 4° e 8° dia do ciclo, uma alíquota de 3 ml foi retirada de cada pote de solução desmineralizante, misturadas a 3 ml de ácido nítrico a 10% armazenados sob refrigeração a 4°C até a realização da análise quantitativa pela espectrometria de emissão atômica do conteúdo de cálcio perdido do esmalte (Mendes et al., 2006).

A representação esquemática do tratamento experimental dos espécimes, ciclagem de pH e análise de microdureza longitudinal, espectrometria de absorção atômica e rugosidade superficial está disposta na figura 3.

Grupos		Tratamento	N
G1	A	Controle - Desmineralização por 32 horas	15
	B	Laser Diodo	15
G2	A	MI Paste	15
	B	MI Paste + Laser Diodo	15
G3	A	Duraphat	15
	B	Duraphat + Laser Diodo	15

Figura 3. Representação esquemática do tratamento experimental dos espécimes e ciclagem de pH.

Microdureza Longitudinal

Foram utilizados 60 espécimes submetidos aos tratamentos e ciclagem, os quais foram lavados com água destilada/deionizada, incluídos em resina de poliéster Milflex® (Milflex General Tintas e Vernizes Ltda., São Paulo/SP, Brasil) e seccionados ao meio, tomando o cuidado para que o lado tratado e protegido fosse englobado na mesma secção, utilizando um disco diamantado montado em máquina de corte sob refrigeração a água (Minitrom®, Struers A/S, Copenhagen, DK-2610, Dinamarca).

As secções foram preparadas através dos procedimentos de planificação e polimento com lixa d'água de granulação #600 e #1200 e, disco de feltro (Arotec S/A Ind. e Comércio, São Paulo/SP, Brasil) e suspensão de alumina 0,3 e 0,05 µm (Arotec S/A Ind. e Comércio, São Paulo/SP, Brasil), todo o processo de planificação e polimento foi realizado em politriz Arotec APL-4 (Arotec S/A Ind. e Comércio, São Paulo/SP, Brasil), sendo em seguida limpos em ultrassom e água deionizada por dez minutos antes da análise da microdureza.

Para a realização da microdureza os blocos de resina contendo os espécimes foram fixados com cera pegajosa (Cera Rosa 7, Polidental Industria e Comércio Ltda., São Paulo – SP, Brasil) a uma base de acrílico com o auxílio de um paralelômetro (EIQuip, São Carlos-SP, Brasil), deixando a superfície a ser analisada paralela à placa, o que é essencial para a realização das medidas de dureza.

Foi utilizado o microdurômetro Shimadzu Micro Hardness Tester HMV-2.000® (Shimadzu Corporation – Kyoto-Japan) com penetrador diamantado piramidal tipo Knoop (KHN), com carga estática de 25gf com duração de dez segundos, de

maneira que a ponta do penetrador se mantivesse perpendicular à superfície do esmalte.

As áreas analisadas foram a área Controle desmineralizada por 32 h (C), e área Exposta (E), onde foram realizados os tratamentos e a ciclagem de pH. As penetrações foram realizadas na região de subsuperfície da lesão formada e da região protegida. As marcações foram realizadas a 20, 60 e 100 μm fazendo uma varredura em cada região. Para cada região foram feitas nove medidas.

Nove indentações foram obtidas para cada área, e assim uma média de cada região foi usada para o cálculo do percentual de alteração da dureza ($\% \text{VD} = \text{DE} \times 100 / \text{DC}$).

Análise de Espectrometria de Absorção Atômica

A solução armazenada foi diluída 20x para análise em triplicata. Foi avaliada a concentração de íons cálcio nas amostras após 4 dias iniciais e nos 4 dias finais de ciclagem. Os valores foram expressos em mg/L (ppm).

O espectrômetro de absorção atômica é um equipamento utilizado para avaliação qualitativa e quantitativa de elementos químicos, onde a radiação eletromagnética (luz) é absorvida e/ou transmitida por átomos da amostra experimental. Na maioria dos casos há emissão e absorção de radiação eletromagnética por átomos ou íons (Navarro, 2008).

No mecanismo de funcionamento do equipamento, a amostra é decomposta por meio de intenso calor (2500° C) em uma nuvem de gases contendo átomos livres e íons do elemento a ser analisado, ocorrendo grande excitação por colisão dos átomos da amostra. A energia absorvida pelos átomos é muito alta, suficiente

para que o elétron se separe do átomo, deixando um íon com carga positiva no processo chamado de ionização. A energia necessária para que ocorra este processo é o potencial de ionização, sendo variável para cada elemento químico (Cecchini, 2001; Navarro, 2008).

Cada elemento tem seu nível de energia característico e seu próprio comprimento de onda de absorção e de emissão. Esta propriedade é que torna útil a espectrometria atômica de análise de determinação de elementos químicos (Navarro, 2008).

O equipamento utilizado (ContrAA 700[®], Analytik jena, Alemanha) pertence ao Laboratório de Análises Químicas da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP. Foi realizada a leitura de uma solução padrão de cálcio com concentração pré-determinada. Os valores foram armazenados em um software específico (ASpect CS1.5.6.0 Tech:Graphite Furnace), para obtenção de uma curva de calibração. Com o intuito de minimizar estatisticamente os erros presentes em quaisquer medidas realizadas, todas foram feitas em triplicata, e a partir de uma curva de calibração foi obtida a concentração de íons cálcio (em ppm).

Foi obtido a média das leituras da solução após quatro e oito dias de ciclagem e então foi realizado a somatória das duas medidas para análise dos dados, tendo assim a perda de cálcio total dos oito dias de ciclagem na solução desmineralizante.

Análise da Rugosidade

Após as ciclagens de pH e análise da microdureza longitudinal, a outra secção do fragmento foi utilizada para avaliação da rugosidade. Inicialmente, foi

removida a resina composta da área controle desmineralizada. A rugosidade da superfície do esmalte foi avaliada a partir de um microscópio confocal a laser (LEXT OLS 4000[®], OLYMPUS), conectado a um computador com um software específico. A análise da rugosidade foi realizada com a objetiva de 10X, com um aumento final de 216X (1280 x 1280um). Foram analisadas duas áreas distintas, área controle-desmineralizada por 32 h (C) e área Exposta (E). Foram realizadas 10 leituras lineares de cada imagem, as quais foram capturadas por um software específico capaz de fornecer as médias da rugosidade linear para cada região (µm). Foram feitas as médias das rugosidades da área C e E e então para análise dos dados foi realizada a subtração da C-E e assim obteve-se a diferença em µm da rugosidade inicial com a final.

Análise Morfológica

As imagens da superfície do esmalte foram obtidas a partir de um microscópio confocal a laser (LEXT OLS 4000[®], OLYMPUS), conectado a um computador com um software específico, com a objetiva de 100x, tendo um aumento de 2160x. Foram realizadas 3 imagens de cada amostra, ou seja, da área Protegida (P), área Exposta (E) e área Controle desmineralizada por 32 h (C), as quais foram analisadas qualitativamente.

O resumo das análises de microdureza, espectrometria de absorção atômica, rugosidade superficial e análise morfológica está representado na figura 4.

ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA

MICRODUREZA LONGITUDINAL

RUGOSIDADE SUPERFICIAL E ANÁLISE MORFOLÓGICA

Figura 4. Representação esquemática das análises realizadas.

Análise por Tomografia de Coerência Óptica

Para a análise da profundidade da desmineralização por OCT foi utilizado um aparelho 3D (OCS1300SS® - Optical Coherence System/Thorlabs, New Jersey, EUA), que opera com um Diodo Super Luminescente de comprimento de onda de 1300 nm, velocidade da imagem de 25 fps e potência de saída de 10mW.

As amostras foram posicionadas individualmente no aparelho e o feixe de luz incidiu sobre elas, de modo que a luz proveniente da fonte atravessasse um divisor de feixes e emita dois feixes coerentes de luz (ondas altas e baixas ocorrendo ao mesmo tempo). Um feixe é chamado de feixe da amostra e o outro, feixe de referência. O feixe da amostra penetra no dente e espalha-se de acordo com a natureza do tecido (sabe-se que tecido cariado espalha luz em maior extensão do que tecido sadio). Alguns feixes da amostra se espalham e depois retornam na direção da qual foram emitidos (retroespalhamento), rumo ao divisor de feixes. O feixe de referência viaja até um espelho móvel, e é totalmente refletido, voltando em direção ao mesmo divisor de feixes. Os feixes são recombinaos e focalizados para um fotodetector, onde qualquer grau de interferência entre eles pode ser observado (Baumgartner et al., 2000), por exemplo, esmalte/dentina, região sadia/cariada – devido aos índices de refração diferentes de cada uma dessas estruturas.

Foram realizadas varreduras transversais de 5 mm (cada imagem 5x5mm), as quais foram compostas por 2000 colunas e 512 linhas, sendo a distância de uma imagem para outra de 10 μ m (1 imagem a cada 10 μ m), produzindo uma sequência de A-scans. A-scans são a variação na medida de espalhamento em relação à profundidade de um único ponto na superfície do dente. Quando obtidos ao longo de uma linha, gera o B-scan, uma coleção de informações de uma “secção” da amostra,

responsável pela formação do tomograma (Baumgartner et al., 2000). Todo o processo foi controlado pelo programa “Hilbert”, desenvolvido no Laboratório de Optoeletrônica e Fotônica do Departamento de Física da Universidade Federal de Pernambuco, na linguagem de programação LabView (National Instruments Brasil Ltda, São Paulo, Brasil). Nesta abordagem, as imagens do esmalte foram capturadas em formato JPG (Grupo Joint Photographic) com esquema de cores RGB (Red, Green, Blue), foram então convertidos em imagens em tons de cinza com 256 níveis. Assim, o esmalte é evidenciado e é possível, selecionar os pontos de escolha através de cliques sobre a imagem que corresponde aos bordos da região para calcular a distância entre os pontos selecionados. As imagens tomográficas foram obtidas em dois tempos (fases), logo após a desmineralização inicial de 32 h (i) e após os tratamentos e ciclagem de pH (f). Para cada espécime foram obtidas 512 imagens por tempo (fase) e dessas, apenas as cinco centrais foram avaliadas, ou seja, a imagem 150, 200, 250, 300 e 350, de modo que foi possível observar a profundidade da desmineralização (PD). Foi analisada a profundidade o software DL-Vision em 10 pontos de cada região para se obter a média de cada espécime por tempo. Para a análise dos dados foi realizada a subtração entre os valores finais e iniciais ($PD = f - i$), em μm .

A representação esquemática do preparo e análise dos espécimes por Tomografia de Coerência Óptica está disposta na figura 5.

Figura 5. Representação esquemática do preparo e análise dos espécimes por Tomografia de Coerência Óptica.

Análise dos dados

Os dados foram analisados quanto a sua distribuição e homogeneidade para a escolha do teste estatístico mais adequado. Pode-se observar que para todas as análises realizadas os dados não se apresentaram normais, desta forma optou-se a utilizar o método não paramétrico de Kruskal-Wallis Multiple-Comparison Z-Value Test e o teste de Dunn para diferenciação das médias ($\alpha = 5\%$). As imagens obtidas por microscopia confocal a laser foram analisadas qualitativamente.

Resultados

4. RESULTADOS

Microdureza Longitudinal

Na análise dos dados observou-se diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle e os demais grupos ($p < 0,05$), tendo os grupos G1 maior perda mineral em relação aos demais grupos, ou seja, G1 foi diferente de G2 e G3 ($G1 \neq G2 \approx G3$). O subgrupo A foi semelhante ao B ($p > 0,05$), assim foi possível observar que este não influenciou na propriedade mecânica avaliada (Figura 6). Quando analisada a interação dos fatores os grupos controle apresentaram menor dureza quando comparado com os grupos que receberam os tratamentos ($G1A \approx G1B$ e $\neq$ dos demais grupos e $G2A \approx G2B \approx G3A \approx G3B$). Os tratamentos, MI Paste® e Duraphat® foram capazes de inibir a perda mineral da subsuperfície do esmalte independente da utilização do laser. (Tabela 2).

Figura 6. Gráfico representativo da microdureza longitudinal (%) em relação aos tratamentos realizados. Fator tratamento - G1- Controle; G2-MI Paste; G3-Duraphat; Fator laser - A- sem laser; B-com laser. Mesma letra indica similaridade estatística (letra maiúscula = comparação dos grupos; letra minúscula = comparação dos subgrupos).

Tabela 2. Média, Desvio-padrão e Mediana, em percentual (%) da variação de dureza dos diferentes grupos e subgrupos.

	A	B
G1	43,92 ± 4,32 / 44,47 b	31,86 ± 5,00 / 29,22 b
G2	100,81 ± 3,00 / 100,45 a	101,34 ± 2,00 / 100,78 a
G3	100,77 ± 3,00 / 99,30 a	100,00 ± 6,00 / 100,03 a

*mesma letra indica similaridade estatística

Espectrometria de Absorção Atômica

Foi realizada a análise geral da perda de cálcio. A figura 7 representa a perda de cálcio para as soluções após 4^o dia e 8^o dia de ciclagem. Observou-se que para o Fator tratamento houve diferença estatística significativa entre os grupos ($p < 0,05$), tendo o G1 apresentado maior perda de cálcio que o G2 e G3, que foram semelhantes entre si. Para o fator laser observou-se que não ocorreu diferença significativa entre associar ou não com o laser ($A \approx B$) (figura 8).

Na interação dos fatores verificou-se diferença estatística significativa entre os subgrupos ($p < 0,05$) e que os G1A e G1B foram semelhantes entre si e apresentaram maior perda de cálcio que os demais subgrupos. Os G2A, G2B, G3A e G3B foram semelhantes entre si e apresentaram menor perda de cálcio (Tabela 3).

Figura 7. Gráfico representativo da espectrometria de absorção atômica. Perda de cálcio (ppm) no 4º e 8º dias de ciclagem. Fator tratamento - G1- Controle; G2-MI Paste; G3-Duraphat; Fator laser – A - sem laser; B-com laser.

Figura 8. Gráfico representativo da espectrometria de absorção atômica. Perda de cálcio (ppm). Fator tratamento - G1- Controle; G2-MI Paste; G3-Duraphat; Fator laser - A- sem laser; B-com laser. Mesma letra indica similaridade estatística (letra maiúscula = comparação dos grupos; letra minúscula = comparação dos subgrupos).

Tabela 3. Média, Desvio-padrão e Mediana (mg/L) da interação dos fatores dos grupos e subgrupos para perda de cálcio.

	A	B
G1	20,97 ± 6,73 / 21,50 a	16,71 ± 5,35 / 16,00 a
G2	8,50 ± 2,42 / 9,27 b	9,25 ± 1,83 / 9,51 b
G3	9,14 ± 1,51 / 9,18 b	7,39 ± 1,90 / 6,58 b

*mesma letra indica similaridade estatística

Rugosidade

Na análise dos dados observou-se que a rugosidade superficial foi maior no Grupo G1 ($G1 \neq G2$ e $G3$) e estatisticamente significativa ($p < 0,05$) dos demais. Indicou ainda, na análise dos subgrupos, que o laser influenciou na rugosidade do esmalte dental, assim, $A \neq B$, o que significa que o uso do laser promoveu uma superfície menos rugosa (Figura 9) com diferença estatística ($p < 0,05$). Na interação dos grupos foi possível observar que $G1A \approx G1B \approx G3A$ e diferente estatisticamente significativa ($p < 0,05$) dos demais e $G2A \approx G2B \approx G3B$ (Tabela 4).

Figura 9. Gráfico representativo da rugosidade superficial (μm) dos diferentes fatores estudados. Fator tratamento - G1- Controle; G2-MI Paste; G3-Duraphat; Fator laser - A- sem laser; B-com laser. Mesma letra indica similaridade estatística (letra maiúscula = comparação dos grupos; letra minúscula = comparação dos subgrupos).

Tabela 4. Média, Desvio-padrão e Mediana (μm) dos valores da rugosidade superficial dos grupos e subgrupos.

	A	B
G1	-0,23 $\pm$ 0,23 / -0,18 a	-0,37 $\pm$ 0,42 / -0,41 a
G2	0,08 $\pm$ 0,23 / 0,10 b	0,38 $\pm$ 0,24 / 0,33 b
G3	-0,20 $\pm$ 0,52 / -0,14 a	0,26 $\pm$ 0,27 / 0,21 b

*valores negativos indicam superfície mais rugosa e valores positivos indicam superfície menos rugosa/ mesma letra indica similaridade estatística

Microscopia confocal a laser

A análise de microscopia confocal a laser mostrou uma superfície homogênea, apresentando pequenas porosidades na área experimental dos grupos irradiados G1B, G2B e G3B, o que sugere uma possível desorganização do conteúdo orgânico do esmalte devido a irradiação com laser de diodo. Não foram

observadas áreas de fusão e ressolidificação ou qualquer alteração que modificasse a estrutura do esmalte. As imagens de microscopia confocal a laser podem ser observadas nas figuras 10,11 e 12.

Figura 10. Imagens mostrando superfície quase homogênea, apresentando pequenas porosidades na área experimental (E) dos grupos irradiados com laser de diodo (G1B). 2160X.

Figura 11. Imagens mostrando superfície quase homogênea, apresentando pequenas porosidades na área experimental (E) do grupo MI Paste + laser de diodo (G2B). 2160x.

Figura 12. Imagens mostrando superfície quase homogênea, apresentando pequenas porosidades na área experimental (E) do grupo Duraphat + laser de diodo (G3B). 2160X.

Tomografia de coerência óptica (OCT)

Para a profundidade da desmineralização foi possível observar que para o fator tratamento houve diferença estatística significativa entre os grupos ($p < 0,05$), tendo o G1 apresentado maior profundidade de desmineralização do que o G2 e G3, que foram semelhantes entre si. Para o fator laser observou-se que não ocorreu diferença significativa entre associar ou não com o laser ($A=B$) (Figura 12).

Na interação dos fatores verificou-se diferença estatística entre os subgrupos ($p < 0,05$) e que os G1A e G1B foram semelhantes entre si e apresentaram maior profundidade da desmineralização do que os demais subgrupos. Os G2A, G2B, G3A e G3B foram semelhantes entre si e apresentaram menor desmineralização (Tabela 5).

Figura 13. Gráfico representativo da profundidade de desmineralização (em μm) observado na OCT. Mesma letra indica similaridade estatística (letra maiúscula = comparação dos grupos; letra minúscula = comparação dos subgrupos).

Tabela 5. Média, Desvio-padrão e Mediana da profundidade da desmineralização (em μm) dos grupos e subgrupos.

	A	B
G1	197,98 $\pm$ 27,42/ 198,74 a	145,60 $\pm$ 21,66/ 136,46 a
G2	55,99 $\pm$ 9,77/ 56,98 b	59,84 $\pm$ 16,63/ 50,56 b
G3	77,03 $\pm$ 19,44/ 56,68 b	54,4 $\pm$ 10,15/ 82,78 b

*mesma letra indica similaridade estatística.

Discussão

5. DISCUSSÃO

Os mais eficientes métodos de prevenção de lesões cariosas estão relacionados ao uso racional do flúor em dentifrícios (Cury et al., 2004), na água de abastecimento público (Levy, 2003; Parnell et al., 2009), em 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; Azevedo et al., 2012), os quais apresentam eficiência comprovada (Raucci-Neto et al., 2013).

A aplicação do verniz fluoretado sob a superfície do esmalte promove a formação de glóbulos de fluoreto de cálcio e quando aplicado no esmalte desmineralizado observa-se maior formação de fluoreto do que no esmalte hígido, demonstrando sua maior capacidade de retenção de íons flúor (Attin et al; 2005). Isso provavelmente ocorre devido à maior porosidade do esmalte que permite uma melhor penetração do agente fluoretado e maior número de sítios para retenção de CaF_2 (Azevedo, 2011). Ainda, com o passar do tempo, essa camada de CaF_2 formada após aplicação dos vernizes é capaz de permitir maior penetração dos íons no esmalte subjacente, constatando o efeito remineralizador do flúor (Attin et al., 2005). Portanto, os vernizes podem reduzir a desmineralização do esmalte dental submetido a desafio ácido (Beltrán-Aguilar et al., 2000; Azevedo et al., 2012), e devido a estas características, o presente estudo optou por utilizar o verniz fluoretado visto que foi simulado em substrato desmineralizado em situação de alto risco de cárie.

A prevalência e a gravidade da fluorose dentária vem aumentando em todos os países, em comunidades com água fluoretada ou não (Buzalaf et al., 2011).

Assim, produtos não fluoretados tem sido estudados com o objetivo de reduzir a solubilidade do esmalte e aumentar seu potencial de remineralização (Yamaguchi et al 2007; Reynolds, 2009; Azevedo et al., 2012). Dentre estas novas substâncias tem-se o fosfopeptídeo de caseína com fosfato de cálcio amorfo (CPP-ACP). Esta substância apresenta um potencial anticariogênico e remineralizador alcançado por meio de seu mecanismo de ação que proporciona uma supersaturação dos íons cálcio e fosfato em sua forma amorfa (biodisponível) na superfície do dente, promovendo um crescimento dos cristais de hidroxiapatita no interior da lesão (Shen et al., 2001; Reynolds et al., 2008). Desta forma, em virtude de suas características e propriedades, este complexo foi utilizado no presente estudo na pasta MI Paste[®], sem a presença do flúor.

Outros métodos vêm sendo estudados, dentre eles, a irradiação do esmalte dental com laser que é uma técnica não invasiva e conservativa indicada para a prevenção de lesões de cárie, uma vez que pode promover o aumento da resistência ácida do esmalte frente a desafios cariogênicos (Yamamoto & Ooya, 1974; Tagomori & Iwase 1995; Castellan et al., 2007; Bedini et al., 2010; Azevedo et al., 2012; Raucci-Neto et a., 2013). A hipótese do esmalte irradiado com laser promover a prevenção da cárie dentária é atribuída a diferentes fatores, como a redução da permeabilidade do substrato irradiado e modificações na composição química e/ou na morfologia superficial desta estrutura (Featherstone e Fried, 2001; Tepper et al., 2004). No presente estudo, optou-se pela utilização do laser de diodo baseado nas evidências de que a luz laser pode interagir com os componentes orgânicos do esmalte e influenciar o processo de des-remineralização, além disso, o laser de diodo é formado por circuitos semicondutores, o que possibilita a compactação do equipamento, tornando-o portátil, além do menor custo quando

comparado a outros equipamentos lasers com diferentes comprimentos de onda (De Micheli, 2006).

A diminuição da permeabilidade do esmalte pela fusão e recristalização obtida pela irradiação com alta energia foi considerada durante muito tempo como um fator essencial necessário para prevenir a formação de lesões de cárie (Stern et al., 1972). Entretanto, na literatura, foi observado que o esmalte dental irradiado com altas energias, na realidade promove um aumento da permeabilidade do esmalte (Borggreven et al., 1980). Posteriormente, diferentes estudos observaram que potências acima de 1W podem provocar alterações indesejáveis na superfície do esmalte, como rachaduras e áreas de fusão irregulares separadas por fendas (Tagomori e Iwase, 1995; Chen e Huang, 2009; Bedini et al., 2010). Como as alterações morfológicas do esmalte (derretimento e recristalização) estão relacionadas com sua irradiação utilizando altas potências do laser (maiores do que 1W), no presente trabalho foi utilizado 0,7W para promover somente alterações químicas e/ou ultraestruturais no esmalte dental. Protocolo semelhante ao do presente estudo foi utilizado por Bedini et al. (2010); Azevedo et al. (2012) e Raucci-Neto et al. (2013) com laser Nd:YAG (0,6 e 0,5 W) e de Sant' Anna et al. (2009) com laser de diodo (0,01W).

No intuito de aumentar a absorção do laser pelo esmalte e minimizar a possibilidade de injúrias ao tecido pulpar, o presente estudo associou o pó de carvão mineral à irradiação, corroborando com estudos anteriores que também utilizaram carvão mineral (Zezell et al., 2009) ou outras substâncias pigmentadas como tinta nanquim (Tagomori & Morioka, 1989; Jennett et al., 1994; Gelskey et al., 1998). Com o carvão mineral, a energia absorvida pelo laser de diodo é transformada em calor podendo aumentar a temperatura da superfície do esmalte. Por este motivo,

preconizou-se a potência de 0,7W e o tempo de 25 seg, corroborando com o estudo de Sanches (2013) que comprovou ausência de efeitos danosos à superfície radicular como fusão, carbonização e trincas quando da utilização de parâmetros subablativos, mesmo na presença de substância fotoabsorvedora.

Para determinar a variação da densidade mineral do esmalte dentário desmineralizado tem sido empregada a microdureza superficial e longitudinal. Esta metodologia é bastante utilizada para avaliar o efeito do laser sob o substrato dentário (Shimizu, 1989; Majori et al., 2005; Bedini et al., 2010; Azevedo et al., 2012; Raucci-Neto et al., 2013). Assim, o presente estudo empregou-a para avaliar os efeitos da associação do laser de diodo com CPP-ACP e verniz fluoretado.

Estudos que avaliaram o efeito do laser sobre o esmalte dentário demonstraram não haver alteração da dureza na superfície irradiada (Shimizu, 1989; Majori et al., 2005; Bedini et al., 2010) ou mesmo uma redução na microdureza das amostras irradiadas (Tagomori & Iwase, 1995). Empregando o laser de diodo ($\lambda=810\text{ nm}$, 100mW) associado à fotoabsorvedor pode ainda verificar que a combinação de corante e luz laser promove uma desnaturação das proteínas da matriz orgânica do esmalte, a qual possivelmente, reduz a perda de dureza (Silva Barbosa et al., 2013). Estes resultados diferem do presente estudo, onde se observou que as amostras que receberam a irradiação laser de forma isolada apresentaram maior perda mineral do que os grupos que receberam verniz fluoretado e CPP-ACP associado ou não ao laser. O grupo laser foi semelhante ao controle em que nenhum tratamento foi realizado, indicando que estas superfícies foram mais acometidas pelo processo de desmineralização e ficaram mais susceptíveis a formação de cavidades.

Na literatura, resultados favoráveis na microdureza de dentes decíduos e

permanentes são encontrados tanto na associação do laser Nd:YAG aos fluoretos (Chen e Huang, 2009) quanto na aplicação isolada do laser (Correa-Afonso et al., 2013). Os diferentes comprimentos de onda e os diferentes parâmetros utilizados interferem diretamente no efeito do laser. Desta forma, no presente estudo, o esmalte apresentou maior resistência ácida e sofreu uma menor perda mineral para o meio bucal, quando o flúor e a pasta de caseína foram utilizados, corroborando com os estudos de Heravi et al. (2013) que estudaram a eficácia do laser Er:YAG, e de outros lasers de baixa potência em associação com a CPP-ACPF (com flúor), na remineralização de lesões de mancha branca e observaram que houve menor perda mineral no grupo em que CPP-ACPF foi aplicado isoladamente.

Contudo, os resultados do presente estudo divergem dos resultados observados por Chen e Huang (2009) em que a irradiação laser apresentou melhores resultados do que o flúor no aumento da resistência ácida do esmalte dental submetido a desafio ácido. Isto provavelmente deve-se a diferença de parâmetros e comprimentos de onda utilizadas nas diferentes pesquisas, bem como a potência de 0,7W empregada, a qual pode não ter sido suficiente para promover modificações mais intensas no esmalte, sugerindo que podem existir parâmetros limiares para que a irradiação cause algum efeito na superfície do esmalte.

Os resultados insatisfatórios da irradiação com laser de diodo, associada ou não ao verniz fluoretado e a pasta de caseína, obtidos no presente estudo podem estar relacionados ao protocolo utilizado, que foi diferente de estudos anteriores (Santaella et al., 2004; Kato et al; 2006). Neste trabalho, a irradiação do esmalte foi realizada durante a aplicação do verniz fluoretado e da pasta de caseína, pode ter ocorrido uma interferência na absorção da luz laser pelo tecido dental, resultando em uma interação mais superficial do laser com o esmalte. Além disso, a baixa

potência e baixa densidade de energia utilizada, pode não ter sido capaz de alterar a morfologia da superfície do esmalte, sem afetar, no entanto, o efeito protetor do flúor e da CPP-ACP. Outro fator que deve ser considerado é que o tratamento foi realizado em esmalte previamente desmineralizado, o que pode ter interferido na ação do laser, uma vez que grande parte da matéria orgânica do esmalte foi removida pelo processo de desmineralização.

A espectrometria de absorção atômica tem sido utilizada para avaliar a perda mineral das lesões artificiais. Métodos químicos podem ser utilizados para a medição de fósforo e cálcio. Esses métodos podem ser feitos por biópsia do esmalte através de um ácido ou desgaste mecânico, ou medindo os componentes da solução na qual as amostras foram colocadas, como realizado neste estudo. O método de medição do cálcio perdido num experimento de cárie artificial pode ser uma alternativa adequada para avaliação da perda mineral (Arends; Ten Bosch, 1992; Ten Bosch; Angmar-Mansson, 1991). Chen e Huang (2009) avaliaram a quantidade de cálcio na solução desmineralizante por espectrometria de absorção atômica e observaram maior perda de cálcio no grupo controle desmineralizado e no grupo em que foi realizada aplicação tópica de flúor em comparação com os grupos em que foi realizada irradiação laser associada ou não ao flúor. Segundo estes autores, o laser sozinho ou associado ao flúor foi capaz de aumentar a resistência ácida do esmalte submetido à lesão de cárie artificial. Semelhantes achados foram observados na literatura (Tagliaferro et al., 2005; Steiner-Oliveira et al., 2006). Contudo, estes achados não corroboram com o presente estudo onde foi observada maior perda de cálcio nos grupos controle e laser de diodo sozinho. Esse resultado provavelmente se deve ao fato de que os estudos anteriores utilizaram outros comprimentos de onda, além de parâmetros ablativos os quais resultaram em

“melting” e efeitos térmicos (Hossain et al., 2001; Chen e Huang, 2009). Pode-se observar também que houve maior perda de cálcio após o 4º dia, ou seja, é possível que o tratamento com laser tenha sido muito superficial e numa situação de grande perda mineral seu efeito foi comprometido.

Neste trabalho, para a mensuração do desgaste foi utilizada a perfilometria por meio de um rugosímetro, equipamento que por meio de uma pequena ponta apalpadora/laser percorre toda a superfície a ser testada, traçando seu perfil (Honório, 2003; Honório et al., 2006). A rugosidade superficial é um método importante para analisar perdas significantes de estrutura no esmalte dental após desafio cariogênico (Field et al., 2010) já que a intenção da irradiação laser com parâmetros subablativos seria aumentar a resistência ácida do esmalte dental minimizando ou evitando tais perdas. Desta forma, neste estudo, foi possível observar que a irradiação laser, quando aplicada isoladamente, promoveu uma superfície mais rugosa. Maior rugosidade também foi encontrada no grupo controle e no verniz fluoretado sozinho. Outros estudos observaram superfície rugosa no esmalte após a irradiação com diversos comprimentos de onda (Ho:YAG, CO₂, CO₂+Nd:YAG e Ar:F) (Lipas et al., 1992) e quando o laser Nd:YAG (2,2.W) foi utilizado em fissuras oclusais com foto-absorvedor, os autores relataram fissuras, fusão e recristalização do esmalte. A superfície do esmalte irradiada aparentava numerosas rugosidades e diferentes tipos de trabéculas (Miaki et al; 1998). Os autores questionaram se o benefício do aumento da resistência do esmalte compensaria o possível aumento de acúmulo de biofilme dental, uma vez que a superfície do esmalte se tornaria mais áspera. No presente estudo observou-se a ocorrência de um aumento da rugosidade nos grupos G1A, G1B e G3A, o que pode acarretar em uma maior área de superfície, podendo aumentar o acúmulo de placa

(Smales et al., 1981). Este fato deve ser considerado principalmente no grupo em que foi utilizado o laser isoladamente (G1B), em que observou-se um aumento considerável da rugosidade que foi amenizado quando foi associado a CPP-ACP ou flúor, o que pode ser explicado pela menor interação do laser com o substrato dental ocasionado pela presença desses agentes preventivos.

Vários estudos investigaram as modificações que os diferentes comprimentos de onda promovem nos esmaltes decíduo e permanente por meio de microscopia óptica (Tavares et al. 2012; Azevedo et al., 2012; Correa-Afonso et al., 2013). De Sant'Anna et al., (2007) observou por meio de microscopia eletrônica de varredura que as superfícies irradiadas com laser de diodo associado a foto absorvedor tornaram-se ásperas e moderadamente irregulares com escassas cavidades no esmalte e sem exposição dos prismas com presença de fissuras e pequenas porosidades. Quando se associou ao flúor foi observada uma superfície mais homogênea, com glóbulos bem definidos, sugerindo a formação de reservatórios de flúor. As imagens obtidas no presente estudo, por microscopia confocal a laser, mostraram uma superfície quase homogênea, apresentando pequenas porosidades na área experimental dos grupos irradiados G1B, G2B e G3B, o que sugere uma possível desorganização do conteúdo orgânico do esmalte devido a irradiação com laser de diodo. Observou-se ainda, que o laser não acrescentou nenhum efeito adicional ao flúor, porém, a presença dessas pequenas porosidades na superfície do esmalte pode indicar um possível aumento da incorporação dessas substâncias formando um reservatório capaz de prevenir a formação da lesão em situações de desafio cariogênico mais intenso do que o realizado neste estudo. Desta forma, mais estudos devem ser realizados, utilizando diferentes protocolos e parâmetros de irradiação e ainda observando o efeitos da

irradiação a longo prazo, como demonstrado por Raucci-Neto (2013).

Outros autores também avaliaram o efeito da associação do laser aos fluoretos (Bahar e Tagomori, 1994; Huang et al., 2001; Zezell et al., 2009), e diferente dos resultados obtidos neste estudo, que comprovou uma maior incorporação de íons flúor no esmalte irradiado, e dessa forma aumentou a resistência ácida frente a desafios cariogênicos. Além disso, foi descrita a possibilidade do esmalte irradiado apresentar a capacidade de reter os íons flúor por maior período de tempo em comparação ao esmalte sem tratamento (Nammour et al., 2003).

Na literatura, Raucci-Neto (2013) observou clinicamente uma longevidade de nove meses para o efeito preventivo da irradiação com laser Nd:YAG aplicado isoladamente ou associado ao flúor. Outro estudo (Azevedo et al; 2012) comparou os efeitos do laser Nd:YAG associado ou não ao flúor e observaram que o flúor sozinho bem como o laser associado ou não ao flúor apresentaram menores áreas de desmineralização do que o controle sem tratamento. Não foram observadas alterações morfológicas na superfície do esmalte como fissuras, fendas ou fusão corroborando com o presente estudo. Entretanto, outros estudos (Chen e Huang, 2009; Bedini et al., 2010), relatam que as superfícies de esmalte irradiado com laser Nd:YAG apresentaram áreas fusionadas, fissuras e fendas em todos os espécimes analisados

Ao microscópio de luz polarizada, Santaella et al. (2004), utilizando um diodo com energia de 140 mJ, observou que após aplicação de laser o esmalte apresentou áreas de desmineralização acima de 30µm de profundidade e 15 das 20 amostras apresentavam lesão. O estudo concluiu que o laser sozinho não foi capaz de impedir a formação da lesão cariosa, já com o verniz fluoretado associado ou não

ao laser, não houve formação de lesão, estando de acordo com os resultados do presente estudo que também constatou o efeito preventivo do flúor independente da associação com laser.

Diversos estudos avaliaram o efeito da associação do flúor a CPP-ACP (Reynolds et al., 2003; Lenonn et al., 2006; Cochrane et al., 2008) e do flúor ao laser (Bahar e Tagomori, 1994; Huang et al., 2001; Zezell et al., 2009), porém, a associação da CPP-ACP ao laser, como no presente trabalho, foi pouco descrita na literatura (Heravi et al., 2013). No presente estudo, observou-se que não houve um efeito adicional do laser quando este foi associado à CPP-ACP ou ao flúor. É possível que os parâmetros utilizados não tenham provocado uma interação da luz laser com a superfície do esmalte, o que não resultou na redução da desmineralização.

Os dados obtidos pelo sistema de OCT permitem tanto a análise qualitativa como quantitativa das alterações da estrutura dental. Em imagens produzidas no esmalte com perda mineral notou-se o aumento da intensidade do sinal nas áreas desmineralizadas por meio do contraste entre as cores do tecido sadio e alterado (Brandenburg et al., 2003). Uma das formas de análise quantitativa descrita na literatura é a obtenção do valor integrado do sinal de OCT na área de interesse. Os dados de intensidade do sinal são plotados em função da profundidade analisada e, neste perfil é calculada a área abaixo da curva. Esta metodologia foi descrita na avaliação de mudanças minerais ocasionadas tanto pelo processo de desmineralização (Fried et al., 2002) quanto de remineralização (Jones e Fried, 2006) por meio da comparação com os valores obtidos no tecido sadio e no tecido com alteração no conteúdo inorgânico. Foi observado que o processo de perda mineral promove o aumento do valor integrado do sinal de OCT em relação ao

hígido, ao passo que após a deposição mineral observa-se a diminuição deste valor, quando comparado ao obtido no esmalte com lesão antes da remineralização.

Recentemente foi proposta a utilização da atenuação do sinal de OCT para o diagnóstico de lesões de cárie inicial (Popescu et al., 2008; Mandurah et al., 2013; Nakajima et al., 2013), bem como para avaliar o processo de des-remineralização em dentes bovinos submetidos a desafio cariogênico e concluíram que OCT pode fornecer imagens nítidas da extensão da lesão além da capacidade de monitorar as mudanças no processo de des-remineralização (Mandurah et al., 2013). Assim, optou-se por utilizar este método no presente estudo, onde foi possível mensurar a profundidade da desmineralização na superfície do esmalte bem como avaliar o desempenho dos tratamentos preventivos utilizados.

Neste estudo foi desenvolvida uma abordagem para a quantificação da profundidade da desmineralização. O uso de técnicas de segmentação de imagens para extrair informações ocorre com muita frequência em vários ramos do conhecimento e tem se difundido ainda mais (Huang et al., 1991; Colston et al., 1998; Sattler et al., 2013). Esta evolução deve-se a grande capacidade que estas técnicas têm de fornecer dados que não são rotineiramente capturados. Assim, o uso de segmentação de imagem obteve sucesso quando usado a fim de aumentar a precisão dos resultados (Gonzales, 2001). O aplicativo desenvolvido para este estudo teve a finalidade de avaliar as imagens obtidas após os tratamentos preventivos.

No presente estudo foi possível observar que a profundidade da desmineralização dos grupos controle e laser isoladamente foi maior quando comparado com os outros tratamentos, o que mostra que o laser não foi capaz de aumentar a resistência ácida do esmalte dental submetido a desafio ácido. O flúor e

a pasta a base de caseína mantiveram seu efeito protetor. E o laser não teve efeito adicional quando associado. Os resultados de OCT são semelhantes aos resultados encontrados nas análises de espectrometria de absorção atômica e na microdureza, o que sugere que o laser de diodo, nos parâmetros utilizados neste estudo não foi capaz de inibir o processo de desmineralização, enquanto que o verniz fluoretado e a pasta CPP-ACP confirmaram seu efeito protetor já relatado na literatura (Beltrán-Aguilar et al., 2000, Reynolds et al., 2003, Rao et al., 2009, Azevedo et al., 2012, Heravi et al., 2013).

No presente estudo, os métodos utilizados para avaliar a resistência ácida do esmalte submetido à desafio cariogênico apresentaram resultados semelhantes e congruentes.

Apesar do resultado da associação do laser aos agentes preventivos não ter sido favorável, pode-se observar no presente estudo que o método de OCT foi capaz de analisar pequenos graus de desmineralização, mostrando ser uma tecnologia promissora (Chan et al., 2014) capaz de monitorar clinicamente lesões de cárie por meio da mensuração da profundidade da desmineralização na superfície do esmalte, e provavelmente poderá substituir ensaios clínicos odontológicos rotineiramente utilizados, já que é um método de diagnóstico não destrutivo e adequado para utilização em estudos *in vivo*.

Na literatura científica relacionada a irradiação do esmalte dental para prevenção de lesões de cárie, os resultados encontrados são conflitantes, o que dificulta a sua comparação com os resultados obtidos no presente estudo. A dificuldade de se encontrar padrões nestes resultados pode estar relacionada aos diferentes tipos de equipamentos utilizados, as variações nos parâmetros e metodologias de cada estudo, assim como o uso de diferentes substratos (dentes

decíduos e permanentes). O laser de diodo, nos parâmetros utilizados neste estudo não representou um método capaz de melhorar as propriedades químicas do esmalte dental submetido a desafio cariogênico. Outra divergência deste estudo em relação a resultados encontrados na literatura está relacionada à associação do laser de diodo com a aplicação tópica de flúor, uma vez que este tratamento não apresentou efeito preventivo para a formação de lesões de cárie, com o protocolo utilizado. A associação do laser à CPP-ACP sugere que esta junção não apresenta nenhum benefício adicional ao já conhecido efeito preventivo da CPP-ACP.

Desta forma, ainda são necessários mais estudos padronizados para definir parâmetros ideais para a irradiação com laser de diodo, uma vez que este comprimento de onda apresenta vantagens sobre os outros lasers, principalmente pela portabilidade e seu menor custo. Os estudos devem avaliar ainda um possível efeito sinérgico do laser ao complexo CPP-ACP em longo prazo, já que é possível que a irradiação laser, em parâmetros adequados, aumente a incorporação de íons Ca e P além da formar um reservatório desses íons liberados em situações de alto desafio cariogênico,

Por fim, apesar de o laser de diodo não ter demonstrado efeito positivo na prevenção do desenvolvimento de lesões de cárie, deve-se considerar que a doença cárie necessita de uma abordagem mais ampla e conservativa, novos métodos preventivos devem ser pesquisados e a associação de técnicas deve ser considerada.

Conclusões

6. CONCLUSÃO

Com base nos resultados do presente estudo foi possível concluir que:

- A associação do laser de diodo (980nm/ 0,7 W/ 10Hz) ao verniz fluoretado ou CPP-ACP não teve efeito adicional no aumento da resistência ácida do esmalte de dentes permanentes submetidos a desafio cariogênico.
- A irradiação com laser de diodo isoladamente não representou um método efetivo na prevenção da desmineralização.
- O verniz fluoretado e CPP-ACP representaram métodos efetivos no aumento da resistência ácida do esmalte.
- Nenhum dos tratamentos promoveu alterações morfológicas significantes na superfície do esmalte irradiado.

Referências

7. REFERÊNCIAS

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

Antunes A, de Rossi W, Zezell DM. Spectroscopic alterations on enamel and dentin after nanosecond Nd:YAG laser irradiation. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 2006 Aug;64(5):1142-6.

Anusavice KJ. Treatment regimens in preventive and restorative dentistry. *J Am Dent Assoc*. 1995 Jun;126(6):727-43.

Arends J, Tem Bosch JJ. Demineralization and remineralization evaluation techniques. *J Dent Res* 1992; 71 (Spec no.):924-8

Attin T, Grieme R, Paqué F, Hannig C, Buchalla W, Attin R. Enamel fluoride uptake of a novel water-based fluoride varnish. *Arch Oral Biol*. 2005 Mar;50(3):317-22.

Azevedo DT, Faraoni-Romano JJ, Derceli Jdos R, Palma-Dibb RG. Effect of Nd:YAG laser combined with fluoride on the prevention of primary tooth enamel demineralization. *Braz Dent J* 2012; 23(2):104-9.

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: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto; 2011.

Bachmann L, Baffa O, Gomes ASL, Zezell DM. Chemical origin of the native ESR signals in thermally treated enamel and dentin. *Physica B* 2004; 349(1-4):119-23.

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.

Bailey DL, Adams GG, Tsao CE, Hyslop A, Escobar K, Manton DJ, Reynolds EC, Morgan MV. Regression of post-orthodontic lesions by a remineralizing cream. *J Dent Res*. 2009 Dec;88(12):1148-53.

Ballard RW, Hagan JL, Phaup AN, Sarkar N, Townsend JA, Armbruster PC. Evaluation of 3 commercially available materials for resolution of white spot lesions. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2013 Apr;143(4 Suppl):S78-84.

Barbour ME, Shellis RP, Parker DM, Allen GC, Addy M. Inhibition of hydroxyapatite dissolution by whole casein: the effects of pH, protein concentration, calcium, and ionic strength. *Eur J Oral Sci*. 2008 Oct;116(5):473-8.

Baumgartner A, Dichtl S, Hitzenberger CK, Sattmann H, Robl B, Moritz A, Fercher AF, Sperr W. Polarization-sensitive optical coherence tomography of dental structures. *Caries Res*. 2000 Jan-Feb;34(1):59-69.

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.

Beltrán-Aguilar E, Goldstein J, Lockwood S. Fluoride varnishes. A review of their clinical use, cariostatic mechanism, efficacy and safety. *J Am Dent Assoc*. 2000 May;131(5):589-96.

Beltrán-Aguilar E, Goldstein J, Lockwood S. Fluoride varnishes. A review of their clinical use, cariostatic mechanism, efficacy and safety. *J Am Dent Assoc*. 2000 May;131(5):589-96.

Bohannon H. Caries distribution and the case for sealants. *J Public Health Dentistry* 1983;33:200-4.

Borggreven JM, van Dijk JW, Driessens FC. Effect of laser irradiation on the permeability of bovine dental enamel. *Arch Oral Biol* 1980;25(11-12):831-2.

Brandenburg R, Haller B, Hauger C. Real-time in vivo imaging of dental tissue imaging of dental tissue by means of optical coherence tomography (OCT). Opt.Commun 2003. 227(4): 203-11.

Buzalaf MA, Pessan JP, Honório HM, ten Cate JM. Mechanisms of action of fluoride for caries control. Monogr Oral Sci. 2011;22:97-114

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 RCM. Estudo *in vitro* do efeito da radiação do laser de Er:YAG em esmalte dental: análise de espectrometria de emissão atômica e microscopia eletrônica de varredura [Tese Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2001.

Chan KH, Tom Hhan KH, Tom H, Fried D. Monitoring the inhibition of erosion by a CO(2) laser with OCT. Proc Soc Photo Opt Instrum Eng. 2014 Feb 18;8929:89290F.

Chanthaboury R, Irinakis T. The use of lasers for periodontal debridement: marketing tool or proven therapy? J Can Dent Assoc 2005;71(9):653-8.

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.

Cochrane NJ, Cai F, Huq NL, Burrow MF, Reynolds EC. New approaches to enhanced remineralization of tooth enamel. J Dent Res 2010 Nov;89(11):1187-97.

Cochrane NJ, Saranathan S, Cai F, Cross KJ, Reynolds EC. Enamel subsurface lesion remineralisation with casein phosphopeptide stabilised solutions of calcium, phosphate and fluoride. Caries Res. 2008;42(2):88-97.

Cochrane NJ, Shen P, Byrne SJ, Walker GD, Adams GG, Yuan Y, Reynolds C, Hoffmann B, Dashper SG, Reynolds EC. Remineralisation by chewing sugarfree

gums in a randomized, controlled in situ trial including dietary intake and gauze to promote plaque formation. *Caries Res.* 2012;46(2):147-55.

Colston B, Sathyam U, Dasilva L, Everett M, Stroeve P, Otis L. Dental OCT. *Opt Express.* 1998 Sep 14;3(6):230-8.

Corrêa-Afonso AM, Bachmann L, de Almeida CG, Dibb RG, Borsatto MC. Loss of structural water and carbonate of Nd:YAG laser-irradiated human enamel. *Lasers Med Sci.* 2014 Feb 15.

Corrêa-Afonso AM, Pécora JD, Palma-Dibb RG. Influence of laser irradiation on pits and fissures: an in situ study. *Photomed Laser Surg* 2013 Feb;31(2):82-9.

Cury J, do Amaral R, Tenuta L, Del Bel Cury A, Tabchoury C. Low-fluoride toothpaste and deciduous enamel demineralization under biofilm accumulation and sucrose exposure. *Eur J Oral Sci.* 2010 Aug;118(4):370-5.

Cury JA 1992. Flúor: dos 8 aos 80?, pp. 375-82. In Bottino MA, Feller C (org.). *Atualização na clínica odontológica*. Artes Médicas, São Paulo.

Cury JA. Uso do flúor e controle da cárie como doença. *In*: Baratieri LN, Monteiro S, Andrada MAC, Vieira LCC, Ritter AV, Cardoso AC. *Odontologia Restauradora: fundamentos e possibilidades*. São Paulo: Santos, 2004.

Da Silva Barbosa P, da Ana PA, Poiate IA, Zezell DM, de Sant' Anna GR. Dental enamel irradiated with a low-intensity infrared laser and photoabsorbing cream: a study of microhardness, surface, and pulp temperature. *Photomed Laser Surg.* 2013 Sep;31(9):439-46.

De Micheli G. Laser de Diodo de alta intensidade (808 + 5nm) em Periodontia. Estudo "in vivo" da redução bacteriana em bolsas periodontais, como coadjuvante ao tratamento radicular convencional [Tese de Livre-Docência]. São Paulo: Faculdade de odontologia da USP; 2006.

Derceli et al., 2013. Dental erosion Analysis Using Confocal Microscopes. Quality Digest; 2013 [acesso em 12 maio 2014]. Disponível em <http://www.qualitydigest.com/inside/metrology-article/dental-erosion-analysis-using-confocal-microscopes.html>

De Sant'Anna GR, dos Santos EA, Soares LE, do Espírito Santo AM, Martin AA, Duarte DA, Pacheco-Soares C, Brugnera A Jr. Dental enamel irradiated with infrared diode laser and photo-absorbing cream: part 2--EDX study. Photomed Laser Surg. 2009 Oct;27(5):771-82.

De Sant'Anna GR, Paleari GS, Duarte DA, Brugnera A Jr, Soares CP. Surface morphology of sound deciduous tooth enamel after application of a photo-absorbing cream and infrared low-level laser irradiation: an in vitro scanning electron microscopy study. Photomed Laser Surg. 2007 Dec;25(6):500-7.

Delbem AC, Sassaki KT, Vieira AE, Rodrigues E, Bergamaschi M, Stock SR, Cannon ML, Xiao X, De Carlo F, Delbem AC. Comparison of methods for evaluating mineral loss: hardness versus synchrotron microcomputed tomography. Caries Res 2009;43(5):359-65.

Duckworth RM. The science behind caries prevention. Int Dent J. 1993;43(6 Suppl 1):529-39

Ellwood R, Fejerskov O. Uso clínico do flúor. In: Fejerskov O, Kidd E. Cárie dentária. A doença e seu tratamento clínico. São Paulo: Santos; 2005. P 189-219.

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

Fejerskov O, 1994. Fluorose Dentária – Um Manual para Profissionais da Saúde. São Paulo: Editora Santos.

Field J, Waterhouse P, German M. Quantifying and qualifying surface changes on dental hard tissues in vitro. J Dent. 2010 Mar;38(3):182-90.

Field J, Waterhouse P, German M: Quantifying an qualifying surface changes on dental hard tissues in vitro. J Dent 2010; 38:182-90

Fitzgerald RJ. Potencial use of caseinophosphopeptides. Int Dairy J 1998;8:(5-6)451-7.

Fonseca DD, Kyotoku BB, Maia AM, Gomes AS. In vitro imaging of remaining dentin and pulp chamber by optical coherence tomography: comparison between 850 and 1280 nm. J Biomed Opt. 2009 Mar-Apr;14(2):024009.

Fowler BO, Kuroda S. Changes in heated and in laser-irradiated human tooth enamel and their probable effects on solubility. Calcif Tissue Int 1986; 38(4):197- 208.

Freitas AZ, Zezell D, Vieira ND, Ribeiro AC, Gomes ASL. Imaging carious human dental tissue with optical coherence tomography. J. of Appl. Phys. 2006

Fried D, Xie J, Shafi S, Featherstone JD, Breunig TM, Le C. Imaging caries lesions and lesion progression with polarization sensitive optical coherence tomography. J Biomed Opt. 2002 Oct;7(4):618-27.

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.

Gontijo L, Cruz Rde A, Brandão PR. Dental enamel around fixed orthodontic appliances after fluoride varnish application. Braz Dent J. 2007;18(1):49-53.

Gonzalez RC, Woods RE. Processamento de Imagens Digitais. Edgard Blücher Ltda, 2000. p.45-7

Gu H, Ling J, LeGeros JP, LeGeros RZ. Calcium phosphate-based solutions promote dentin tubule occlus

Hee MR, Izatt JA, Swanson EA, Huang D, Schuman JS, Lin CP, Puliafito CA, Fujimoto JG. Optical coherence tomography of the human retina. *Arch Ophthalmol*. 1995 Mar;113(3):325-32.

Heravi F, Ahrari F, Mahdavi M, Basafa S. Comparative evaluation of the effect of Er:YAG laser and low level laser irradiation combined with CPP-ACPF cream on treatment of enamel caries. *J Clin Exp Dent*. 2014 Apr 1;6(2):e121-6.

Honório HM, Rios D, Abdo RC, Machado MA. Effect of different prophylaxis methods on sound and demineralized enamel. *J Appl Oral Sci*. 2006 Apr;14(2):117-23.

Honório HM. Avaliação do desgaste de diferentes métodos de profilaxia sobre o esmalte bovino hígido e desmineralizado. 2003. Dissertação (Mestrado em Odontopediatria) - Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, 2003.

Hossain M, Nakamura Y, Kimura Y, Yamada Y, Kawanaka T, Matsumoto K. Effect of pulsed Nd: YAG laser irradiation on acid demineralization of enamel and dentin. *Journal of Clinical Laser in Medical Surgery* 2001; 19 : 105–108.

Huang D, Swanson EA, Lin CP, Schuman JS, Stinson WG, Chang W, Hee MR, Flotte T, Gregory K, Puliafito CA, et al. Optical coherence tomography. *Science*. 1991. Nov 22;254(5035):1178-81.

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.

Iijima Y, Cai F, Shen P, Walker G, Reynolds C, Reynolds EC. Acid resistance of enamel subsurface lesions remineralized by a sugar-free chewing gum containing casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate. *Caries Res*. 2004 Nov-Dec;38(6):551-6.

Itthagarun A, King NM, Yiu C, Dawes C. The effect of chewing gums containing calcium phosphates on the remineralization of artificial caries-like lesions in situ. *Caries Res*. 2005;39(3):251-4.

James P, Parnell C, Whelton H. The caries-preventive effect of chlorhexidine varnish in children and adolescents: a systematic review. *Caries Res* 2010;44(4):333-40.

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.

Jones RS, Fried D. Remineralization of enamel caries can decrease optical reflectivity. *J Dent Res*. 2006 Sep;85(9):804-8.

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.

Kauffman CMF, Carvalho MT, Araújo RE, Freitas AZ, Zezell DM, Gomes ASL. Characterization of the dental pulp using optical coherence tomography. *Proceedings of the SPIE*. v. 6137, p. 51-58, 2006.

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.

Ko AC, Choo-Smith LP, Hewko M, Leonardi L, Sowa MG, Dong CC, Williams P, Cleghorn B. Ex vivo detection and characterization of early dental caries by optical coherence tomography and Raman spectroscopy. *J Biomed Opt*. 2005 May-Jun;10(3):031118.

Kutsch VK, Chaiyabutr Y, Milicich G. Reconsidering remineralization strategies to include nanoparticle hydroxyapatite. *Compend Contin Educ Dent*. 2013 Mar;34(3):170-6.

Lagerweij MD, ten Cate JM. Remineralisation of enamel lesions with daily applications of a high-concentration fluoride gel and a fluoridated toothpaste: An in

Lennon AM, Pfeffer M, Buchalla W, Becker K, Lennon S, Attin T. Effect of a casein/calcium phosphate-containing tooth cream and fluoride on enamel erosion in vitro. *Caries Res.* 2006;40(2):154-7.

Li J, Xie X, Wang Y, Yin W, Antoun JS, Farella M, Mei L. Long-term remineralizing effect of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate (CPP-ACP) on early caries lesions in vivo: a systematic review. *J Dent.* 2014 Jul;42(7):769-77.

Lippas MG, Arcoria CJ, Khademi JA. Surface analyses of Ho:YAG, CO₂, CO₂/Nd:YAG & Ar:F lasers. 3th International Congress on laser in Dentistry. Salt Lake City, USA, Aug 6-8, 1992.

Liu Y, Hsu CY. Laser-induced compositional changes on enamel: a FT-Raman study. *J Dent* 2007 Mar; 35(3):226-30.

Loesche WJ. Produção de ácidos na placa. In: Loesche, WJ. A doença cárie: Uma infecção tratável. Springfield: Thomas, 1982:128-150.

Maia AMA. Avaliação de técnicas diagnósticas de lesão de cárie proximal: raio X, transiluminação com radiação infravermelho próximo e tomografia por coerência óptica. 2009. 91f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Curso de Odontologia da Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco.

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.

Mandurah MM, Sadr A, Shimada Y, Kitasako Y, Nakashima S, Bakhsh TA, Tagami J, Sumi Y. Monitoring remineralization of enamel subsurface lesions by optical coherence tomography. *J Biomed Opt.* 2013 Apr;18(4):046006.

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.

Mendes FM, de Oliveira E, de Faria DL, Nicolau J. Ability of laser fluorescence device associated with fluorescent dyes in detecting and quantifying early smooth surface caries lesions. *J Biomed Opt.* 2006 Mar-Apr;11(2):024007.

Morgan MV, Adams GG, Bailey DL, Tsao CE, Fischman SL, Reynolds EC. The anticariogenic effect of sugar-free gum containing CPP-ACP nanocomplexes on approximal caries determined using digital bitewing radiography. *Caries Res.* 2008;42(3):171-84.

Myaki SI, Watanabe IS, Eduardo Cde P, Issáo M. Nd:YAG laser effects on the occlusal surface of premolars. *Am J Dent.* 1998 Jun;11(3):103-5.

Nammour S, Demortier G, Florio P, Delhaye Y, Pireaux JJ, Morciaux Y et al. Increase of enamel fluoride retention by low fluence argon laser in vivo. *Lasers Surg Med* 2003; 33(4):260–263.

Navarro RS. Avaliação da perda mineral do esmalte adjacente a cavidades preparadas com laser de Er, Cr: YSGG e restauradas com diferentes materiais após desafio ácido [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2008.

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

Parker S. Surgical lasers and hard dental tissue. *Br Dent J* 2007 Apr; 202(8):445-54.
Petersson LG. Fluoride mouthrinses and fluoride varnishes. *Caries Res.* 1993; 27 Suppl 1:35-42.

Phan ND, Fried D, Feathestone JDB. Laser-induced transformation of carbonated apatite to fluorapatite on bovine enamel. *SPIE* 1999;3593:233–239.

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

Popescu DP, Sowa MG, Hewko MD, Choo-Smith LP. Assessment of early demineralization in teeth using the signal attenuation in optical coherence tomography images. *J Biomed Opt.* 2008 Sep-Oct;13(5):054053.

Queiroz CS, Hara AT, Paes Leme AF, Cury JA. pH-cycling models to evaluate the effect of low fluoride dentifrice on enamel de- and remineralization. *Braz Dent J.* 2008;19(1):21-7.

Rao SK, Bhat GS, Aradhya S, Devi A, Bhat M. Study of the efficacy of toothpaste containing casein phosphopeptide in the prevention of dental caries: a randomized controlled trial in 12- to 15-year-old high caries risk children in Bangalore, India. *Caries Res.* 2009;43(6):430-5.

Raucci-Neto W, de Castro-Raucci LM, Lepri CP, Faraoni-Romano JJ, da Silva JM, Palma-Dibb RG. Nd:YAG laser in occlusal caries prevention of primary teeth: A randomized clinical trial. *Lasers Med Sci.* 2013 Aug 17.

Reynolds EC, Cai F, Cochrane NJ, Shen P, Walker GD, Morgan MV, Reynolds C. Fluoride and casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate. *J Dent Res.* 2008 Apr;87(4):344-8.

Reynolds EC, Cai F, Shen P, Walker GD. Retention in plaque and remineralization of enamel lesions by various forms of calcium in a mouthrinse or sugar-free chewing gum. *J Dent Res.* 2003;82(3):206-11.

Reynolds EC. Anticariogenic complexes of amorphous calcium phosphate stabilized by casein phosphopeptides: A review. *Spec Care Dentist.* 1998;18(1):8-16.

Reynolds EC. Casein phosphopeptide- Amorphous calcium phosphate: the scientific evidence. *Adv Dent Res.* 2009;21(1):25-9.

Reynolds EC. Remineralization of enamel subsurface lesions by casein phosphopeptide-stabilized calcium phosphate solutions. *J Dent Res.* 1997; 76(9):1587-95.

Robertson MA, Kau CH, English JD, Lee RP, Powers J, Nguyen JT. MI Paste Plus to prevent demineralization in orthodontic patients: a prospective randomized controlled trial. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2011 Nov;140(5):660-8.

Robinson C. Fluoride and the caries lesion: interactions and mechanism of action. *Eur Arch Paediatr Dent.* 2009 Sep;10(3):136-40.

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

Sanches JO. Influência dos tratamentos dessensibilizantes associados ao laser de diodo na permeabilidade dentinária. [Dissertação de Mestrado]. Ribeirão Preto: Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo; 2012.

Santaella MR, Braun A, Matson E, Frentzen M. Effect of diode laser and fluoride varnish on initial surface demineralization of primary dentition enamel: an in vitro study. *Int J Paediatr Dent.* 2004 May;14(3):199-203.

Sattler E, Kästle R, Welzel J. Optical coherence tomography in dermatology. *J Biomed Opt.* 2013 Jun;18(6):061224.

Schupbach P, Neeser JR, Golliard M, Rouvet M, Guggenheim B. Incorporation of caseinoglycomacropeptide and caseinophosphopeptide into the salivary pellicle inhibits adherence of mutans streptococci. *J Dent Res.* 1996;75(10):1779-88.

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

Shellis RP & Duckworth RM 1994. Studies on the cariostatic mechanisms of fluoride. *International Dental Journal*, 44(3 suppl. 1):263-273.

- Shen P, Cai F, Nowicki A, Vincent J, Reynolds EC. Remineralization of enamel subsurface lesions by sugar-free chewing gum containing casein phosphopeptideamorphous calcium phosphate. *J Dent Res*. 2001;80(12):2066-70
- Shimizu Y. [Study of histostructure of fused human enamel by laser irradiation]. *Nihon Hotetsu Shika Gakkai Zasshi*. 1989 Oct;33(5):1212-25.
- Smales RJ. Plaque growth on dental restorative materials. *J Dent*. 1981 Jun;9(2):133-40.
- Sognnaes RF, Stern RH . Laser effect on resistance of human dental enamel to demineralization in vitro. *J South Calif Dent Assoc*. 1965 Aug; 33(8):328-9.
- Sreebny LM. Saliva in health and disease: an appraisal and update. *Int Dent J*. 2000;50(3):140-61.
- Steiner-Oliveira C, Rodrigues LK, Soares LE, Martin AA, Zezell DM, Nobre-dos-Santos M. Chemical, morphological and thermal effects of 10.6-microm CO2 laser on the inhibition of enamel demineralization. *Dent Mater J*. 2006 Sep;25(3):455-62.
- Stern RH, Sognnaes RF. Laser effect on dental hard tissues. A preliminary Report. *J South Calif Dent Assoc*. 1965 Jan; 33(1):17-9.
- Stern RH, Sognnaes RF. Laser inhibition of dental caries suggested by first tests in vivo. *J Am Dent Assoc* 1972;85(5):1087-90.
- Swaisgood HE: Characteristics of milk; in Fennema OR (ed): *Food Chemistry*. New York, Marcel Dekker, 1996.
- Tagliaferro EP, Rodrigues LK, Nobre Dos Santos M, Soares LE, Martin AA. Combined effects of carbon dioxide laser and fluoride on demineralized primary enamel: an in vitro study. *Caries Res*. 2007;41(1):74-6.
- Tagomori S, Iwase T. Ultrastructural change of enamel exposed to a normal pulsed Nd:YAG laser. *Caries Res* 1995; 29:513-20.

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

Tavares JG, Eduardo Cde P, Burnett LH Jr, Boff TR, de Freitas PM. Argon and Nd:YAG lasers for caries prevention in enamel. *Photomed Laser Surg*. 2012 Aug;30(8):433-7.

Ten Bosch JJ, Angmar-Mansson B. A review of quantitative methods for studies of mineral content of intra-oral incipient caries lesions. *J Dent Res* 1991; 70(1):2-14
ten Cate JM, Duijsters PP. Alternating demineralization and remineralization of artificial enamel lesions. *Caries Res*. 1982;16(3):201-10.

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

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; 32(8):635-641.

Thylstrup A, Fejerskov O. *Cariologia Clínica*. 3. ed. São Paulo: Editora Santos, 2001.

Wang JX, Yan Y, Wang XJ. Clinical evaluation of remineralization potential of casein phosphopeptide amorphous calcium phosphate nanocomplexes for enamel decalcification in orthodontics. *Chin Med J (Engl)*. 2012 Nov;125(22):4018-21.

Welz B, Sperling M, *Atomic Absorption Spectrometry*, 3rd Ed., Wiley-VHC, Weinheim, Nova York, EUA, 1999.

Yamaguchi K, Miyazaki M, Takamizawa T, Inage H, Kurokawa H. Ultrasonic determination of the effect of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate paste on the demineralization of bovine dentin. *Caries Res*. 2007;41(3):204-7.

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

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

Anexo

ANEXO

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto

Comitê de Ética em Pesquisa

Of.ATAc.CEP/51511/FORP-USP/19.12.2011

Ref. processo n.º 2011.1.1273.58.5

CAAE n.º 0063.0.138.000-11

Senhor(a) Pesquisador(a):

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 126ª Sessão, realizada em 15 de dezembro de 2011, aprovou o desenvolvimento do projeto de pesquisa envolvendo seres humanos, intitulado "Avaliação *in vitro* do efeito do agente químico CPP-ACP associado ao laser de diodo na inibição da desmineralização em superfície oclusal de dentes permanentes".

Na oportunidade, lembramos da necessidade de serem entregues, na secretaria do CEP, os **Relatórios Parciais** em 15 de dezembro de 2012 e 15 de dezembro de 2013 e o **Relatório Final** em 15 de dezembro de 2014, com os respectivos formulários preenchidos pelo pesquisador responsável.

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

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

Ilmo(a). Sr(a).

PG. DANIELLE TORRES AZEVEDO (Profa. Dra. Regina Guenka Palma Dibb)

Departamento de Odontologia Restauradora

desta Faculdade