INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia Associada à Universidade de São Paulo

**ESTUDO *IN VITRO* DA RESISTÊNCIA À DESMINERALIZAÇÃO E DA
RETENÇÃO DE FLÚOR EM ESMALTE DENTAL IRRADIADO COM *LASER* DE
Er,Cr: YSGG**

PATRICIA APARECIDA DA ANA

**Tese apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
Doutor em Ciências na Área de Tecnologia
Nuclear – Materiais.**

Orientadora: Profa. Dra. Denise Maria Zezell

SÃO PAULO
2007

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia Associada à Universidade de São Paulo

**ESTUDO *IN VITRO* DA RESISTÊNCIA À DESMINERALIZAÇÃO E DA
RETENÇÃO DE FLÚOR EM ESMALTE DENTAL IRRADIADO COM *LASER* DE
Er,Cr: YSGG**

PATRICIA APARECIDA DA ANA

**Tese apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
Doutor em Ciências na Área de Tecnologia
Nuclear – Materiais.**

Orientadora: Profa. Dra. Denise Maria Zezell

SÃO PAULO
2007

Dedicatória

A **Deus**, por tornar possível o impossível.

À minha família querida, meus pais **Mário e Marta**, e minha irmã **Vanessa**, pela base sólida que me deram, por todo incentivo, paciência, carinho e compreensão nestes anos todos, sem os quais não seria possível a concretização de mais este passo.

Ao **Sérgio**, namorado, amigo, companheiro, colega, filósofo, poeta... A pessoa que esteve sempre presente em todos os momentos, fáceis ou difíceis, apoiando e ajudando, sem reclamar... Enfim, a grande razão para que este trabalho fosse finalizado. Muito obrigada, de coração!

Agradecimentos especiais

À **Profa. Dra. Denise Maria Zezell**, a grande amiga com a qual tenho muito orgulho e muita honra de trabalhar, pessoa dedicada, honesta, competente e sempre presente, em todos os momentos. Seu exemplo nos motiva e nos engrandece muito!

Ao **Prof. Dr. Jaime Aparecido Cury**, por ensinar a todos os verdadeiros princípios científicos, pelo auxílio, rigor, ética, paciência, apoio, discussões, dicas compreensão e pontualidade em todos os momentos em que precisei.

À **Profa. Dra. Cíntia P. M. Tabchoury**, comigo em todas as etapas do laboratório da FOP, sempre muito bem disposta, carinhosa, prestativa e muito amiga, me deixando muito confortável em todos os dias em que estive em Piracicaba.

Agradecimentos

Aos professores **Alberto** e **Cláudia Blay**, pelo carinho, compreensão, e por permitir o uso do equipamento *laser* de seu consultório sempre que precisei, mesmo aos domingos.

À **Profa. Dra. Célia Regina M.D. Rodrigues**, por todas as suas contribuições em meu exame de qualificação, e por todo o carinho com que me recebeu em todos os momentos em que a procurei.

Ao **Prof. Dr. Carlos de Paula Eduardo**, por sua competência inigualável, por ter me aberto as portas do L.E.L.O. e do Departamento de Dentística, e por todo seu apoio indispensável.

Ao **Prof. Dr. Moacyr Novelli**, grande amigo e tutor, por ter me aberto as portas no início da graduação e por todos os ensinamentos de vida.

À **Profa. Dra. Adriana Bona Matos**, por ter me aceitado e ensinado desde a iniciação científica, por todo seu companheirismo e suas dicas maravilhosas.

Ao **Prof. Dr. Fausto M. Mendes**, por seu auxílio na discussão deste trabalho.

Ao **Prof. Anderson Z. de Freitas**, por todas as discussões na parte de física.

Ao **Prof. Dr. Luciano Bachmann**, sempre amigo, sempre cheio de ânimo para trabalhar, sempre me ajudando nos piores momentos.

Ao **Prof. Dr. Walter Miyakawa**, por seu apoio intelectual e psicológico, mesmo de longe.

À **Profa. Dra. Martha Simões Ribeiro**, pelo excelente convívio e bom humor incomparável.

À **Profa. Dra. Sonia L. Baldochi**, pelas agradáveis contribuições tanto no exame de qualificação quanto no seminário de área, e por permitir a utilização de seu laboratório para a realização das ciclagens de pH e microscopia.

À **Profa. Dra. Vera Lúcia Ribeiro Salvador**, pelo auxílio e incentivo nas análises de EDXRF realizadas em algumas amostras deste projeto, o que permitiu a melhor compreensão dos fenômenos químicos envolvidos.

Aos meus queridos amigos do peito **Sandra, Gabriel e Fabio**, por todos os bons momentos e pelo companheirismo a toda hora.

Às minhas amigas **Claudinha, Marcella e Renata**, pelo apoio psicológico, pelas piadas, dicas e apoio, e pelas inesquecíveis descontrações nestes quatro anos.

Ao meu amigo **Cassius**, pelo seu otimismo que me motiva muito, e por todas as amostras as quais me ajudou, mesmo após sua saída do CLA.

Ao amigo da PG-Dentística **Washington** pela impagável ajuda com as inúmeras análises estatísticas, pela paciência, dedicação e amizade.

Ao **Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN)** e ao **Centro de Lasers e Aplicações (CLA)**, especialmente na pessoa do **Prof. Dr. Nilson Dias Vieira Jr.**, por permitir a utilização de suas dependências e equipamentos.

À **Faculdade de Odontologia da UNICAMP**, em especial ao **Laboratório de Bioquímica Oral**, por permitir meu ingresso como aluna especial, e por permitir a minha livre utilização de seus equipamentos.

Ao **Laboratório Especial de Laser em Odontologia (L.E.L.O.)**, pela excelente possibilidade de aprendizado em trabalhar clinicamente com o *laser*, e aos amigos **Lili, Joelma e Haroldo** pelo carinho.

Ao **Laboratório de Dentística da FO-USP** e à **Soninha**, por permitir a utilização de seus equipamentos no início deste trabalho.

Ao **Banco de Dentes Humanos da FO-USP**, especialmente nas pessoas do **Prof. José Carlos P. Imparato** e do estagiário **Igor**, pela cessão dos dentes humanos que utilizei no presente trabalho e pela assistência sempre imediata.

Ao **Laboratório de Espectroscopia Vibracional Biomédica da UNIVAP**, especialmente na pessoa do **Prof. Dr. Ailton Abrahão Martin**, pelo auxílio nas análises de FT-Raman realizadas em amostras deste projeto.

À **Shimadzu do Brasil**, especialmente ao **Rui**, por permitir a utilização do equipamento de EDXRF, pelo auxílio técnico e disponibilidade.

Aos técnicos **Valdir, Paulão e Marcão**, do CLA-IPEN, por todas as amostras, suportes e peças que fizeram, sempre com bom humor em todas as ocasiões.

Aos técnicos **Celso, Nildemar e René**, do CCTM-IPEN, pelos valiosos auxílios nas análises de microscopia eletrônica de varredura e CILAS.

Aos técnicos **Waldomiro e José Alfredo**, pela preciosa dedicação, amizade, bom humor e incondicional auxílio em tudo o que realizei no laboratório de Bioquímica Oral da FOP, e aos estagiários **Greice, Toninho e Neto** pela ajuda.

Aos colegas da pós-graduação em Cariologia **Ana Maria, Carol Aires, Carol Nóbrega, Cláudia, Glauber, Max, Gisele, Renzo, Rodrigo**, e à **Profa. Livia Tenuta**, por todas as explicações que me deram e pela receptividade maravilhosa em Piracicaba.

Aos colegas da pós-graduação do CLA **Adriana, Aécio, Aguinaldo, Alessandro, Dani, Ilka, Luiz Claudio, Renato, Silvia, Stella**, e aos alunos de iniciação científica **Carol, Felipe e Thiago**, pelo constante apoio e carinho.

À **Ilze, Verinha, Rose, Ana e Fernando** pela ajuda fundamental principalmente para a conclusão deste trabalho.

À **Elsa, Andréa e Sr. Tito**, por toda a orientação e simpatia nestes anos.

Ao estatístico **Paulo Tadeu de Oliveira**, pelo auxílio prestado.

À **FAPESP**, pela bolsa de Doutorado Direto concedida (Proc. 04/02229-6).

Ao **CEPOF-FAPESP (Centro de Óptica e Fotônica)**, processos CEPID 98/14270-8 e 05/51689-2, por permitir a aquisição de equipamentos indispensáveis para a realização deste trabalho, tais como a câmera termográfica e o laser de Er,Cr:YSGG.

À **CAPES**, processos **PROCAD** 0156/01-9 e 0349054 pelo auxílio financeiro em todos os momentos da realização deste trabalho.

Ao **CNPq**, pelo financiamento parcial deste trabalho com o programa **Institutos do Milênio** (Processo 420177/2005-1).

Ao **CNPq**, pela bolsa de mestrado inicialmente concedida.

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

*"A coisa mais bela que o homem pode experimentar é o mistério.
É essa emoção fundamental que está na raiz de toda ciência e
toda arte."*

Albert Einstein

ESTUDO *IN VITRO* DA RESISTÊNCIA À DESMINERALIZAÇÃO E DA RETENÇÃO DE FLÚOR EM ESMALTE DENTAL IRRADIADO COM *LASER* DE Er,Cr: YSGG

Patricia Aparecida da Ana

RESUMO

Este estudo objetivou estabelecer condições de irradiação com o *laser* de Er,Cr:YSGG ($\lambda = 2.79 \mu\text{m}$) que propiciassem modificações no esmalte dental e aumentassem sua resistência à desmineralização, associadas ou não à aplicação tópica de flúor fosfato acidulado (FFA). Fluências *laser* de $2,8 \text{ J/cm}^2$, $5,6 \text{ J/cm}^2$ e $8,5 \text{ J/cm}^2$ foram selecionadas, as quais foram associadas com a aplicação prévia de substância fotoabsorvedora (pasta de pó de carvão) e então com aplicação de FFA posteriormente às irradiações. Inicialmente, foram avaliadas as alterações morfológicas, as modificações na temperatura superficial e os aumentos na temperatura intrapulpar decorrentes das irradiações. Posteriormente, as amostras tratadas foram submetidas a uma ciclagem de pH com duração de 10 dias. Após a produção das lesões de mancha-branca, foi avaliada a perda mineral e as quantidades de flúor fracamente ligado e fortemente ligado. Todas as soluções desmineralizantes e remineralizantes foram avaliadas com relação ao seu conteúdo de cálcio, fósforo inorgânico e flúor. Os dados foram avaliados quanto à normalidade e homogeneidade de sua distribuição para que pudesse ser escolhido o teste estatístico mais adequado, considerando o nível de significância de 5%. As fluências selecionadas promoveram superfícies ablacionadas; as fluências de $5,6 \text{ J/cm}^2$ e $8,5 \text{ J/cm}^2$ promoveram aumentos de temperatura superficial superiores a 110°C . A análise da temperatura intrapulpar revelou que as fluências escolhidas não aumentaram as temperaturas pulparem acima do limite estabelecido para pulpite. A pasta de pó de carvão não promoveu modificações morfológicas ou alterações significativas nas temperaturas pulparem; entretanto, aumentou as temperaturas superficiais durante as irradiações. Apenas a irradiação *laser* sob fluência de $8,5 \text{ J/cm}^2$ diminuiu significativamente a perda mineral quando comparado ao grupo sem tratamento; embora a associação da pasta de carvão + irradiação *laser* a $2,8 \text{ J/cm}^2$ + aplicação de FFA tenha

apresentado o menor valor de perda mineral de todos os grupos de tratamento deste estudo, tal valor não diferiu estatisticamente daquele obtido quando apenas o FFA foi aplicado (grupo controle positivo). A análise de flúor fracamente ligado revelou que a irradiação *laser* proporcionou maior formação e retenção do fluoreto de cálcio formado após aplicação de FFA, provavelmente devido à ablação do esmalte, enquanto que a análise de flúor total mostrou não haver diferenças na quantidade de fluorapatita formada após a irradiação *laser* quando comparado às amostras não-irradiadas. A avaliação das soluções desmineralizantes e remineralizantes evidenciou não haver diferenças significativas nas concentrações de cálcio e fósforo inorgânico entre as amostras irradiadas ou não irradiadas; contudo, a determinação de flúor nestas soluções mostrou diferenças expressivas no conteúdo de flúor, sugerindo que a irradiação *laser* pode favorecer a uma maior formação de fluoreto de cálcio. De acordo com os resultados deste estudo, pode-se concluir que a irradiação *laser* proporciona maior retenção de fluoreto fracamente ligado formado no esmalte decorrente da aplicação tópica de flúor; entretanto, a associação dos tratamentos não proporcionou maior efeito na redução da desmineralização do esmalte do que o efeito da aplicação tópica de FFA isoladamente.

IN VITRO STUDY OF DEMINERALIZATION RESISTANCE AND FLUORIDE RETENTION IN DENTAL ENAMEL IRRADIATED WITH Er,Cr: YSGG LASER

Patricia Aparecida da Ana

ABSTRACT

This study aimed to establish irradiation conditions of Er,Cr:YSGG laser ($\lambda = 2.79 \mu\text{m}$) which could propitiate changes on human dental enamel and increase its resistance to demineralization, when associated or not with topical application of acidulated phosphate fluoride (APF). Fluences of 2.8 J/cm^2 , 5.6 J/cm^2 e 8.5 J/cm^2 were selected; they were associated or not with previous application of a photoabsorber (coal paste) and then APF was applied or not after laser irradiation. In a first step, the morphological findings, the surface temperatures, and the pulpal temperatures were evaluated during laser irradiation. After that, the treated samples were submitted to a a ten-day pH-cycling model. After producing the incipient white-spots lesions, the following aspects were evaluated: the mineral loss, the loosely bound fluoride and the firmly bound fluoride. All the demineralizing and remineralizing pH-cycling solutions were evaluated with respect to their calcium (Ca), inorganic phosphorous (Pi) and fluoride (F^-) concentrations. The data had their normality and homogeneity distribution statistically evaluated, and it was chosen an appropriated statistical test for each performed analysis according to the obtained results, considering 5% significant level. The fluences selected for this study created ablated surfaces; the fluences of 5.6 J/cm^2 and 8.5 J/cm^2 promoted increments in surface temperature above 110°C . The intrapulpal temperature changes revealed that *laser* irradiation did not increase the pulpal temperatures above the critical threshold for induction of pulpitis. The coal paste did not promote any changes on surface morphology or in the intrapulpal temperature changes; however, this paste increased the surface temperatures during *laser* irradiation. Only *laser* irradiation at 8.5 J/cm^2 was able to decrease the mineral loss when compared to the no-treatment group; although the association of coal paste + *laser* at 2.8 J/cm^2 + APF application presented the

lesser mineral loss of all treatment groups of this study, this value was not statistically different than those revealed in the FFA group (positive control). The analysis of loosely bound fluoride revealed that *laser* irradiation was able to retain the calcium fluoride formed after APF application due to the ablation process, while the analysis of firmly bound fluoride showed no differences in fluorapatite quantities formed after *laser* irradiation when compared to the non-irradiated samples. The evaluation of demineralizing and remineralizing pH-cycling solutions evidenced no significant differences in calcium or inorganic phosphorous concentrations between lased or unlased samples; however, the fluoride determination exposed important differences on fluoride contents, which suggested that *laser* irradiation could induce a higher calcium fluoride formation. According to the results of this study, it was possible to conclude that the laser irradiation can propitiate, on enamel, higher loosely bound fluoride retention formed by topical application of fluoride; however, the association of treatments did not increased the effect obtained by APF application alone on enamel demineralization.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS.....	19
3. REVISÃO DA LITERATURA	20
3.1. Considerações sobre o esmalte dental humano	20
3.2. Etiologia e mecanismo da doença cárie	23
3.3. O flúor atuante na prevenção da cárie	27
3.4. A irradiação <i>laser</i> para prevenção da cárie	31
3.5. A sinergia da irradiação <i>laser</i> com o flúor	40
3.7. O fator temperatura para a determinação de parâmetros clínicos.....	49
4. MATERIAL E MÉTODOS	55
4.1. Delineamento experimental	55
4.2. Amostras	58
4.3. Parâmetros do <i>laser</i> de Er,Cr:YSGG	58
4.4. Características do fotoabsorvedor (carvão)	60
4.5. Características do flúor (FFA)	61
4.6. Parte 1 - Verificação dos possíveis parâmetros <i>laser</i> para prevenção da cárie	62
4.6.1. Análise morfológica	62
4.6.2. Análise de temperatura superficial.....	63
4.6.3. Análise de temperatura pulpar	66
4.7. Parte 2 - Determinação dos efeitos da irradiação <i>laser</i> para prevenção da cárie	68
4.7.1. Simulação do desafio cariogênico <i>in vitro</i>	70
4.7.2. Análise da perda mineral.....	74
4.7.3. Análise da dissolução iônica durante o processo de cárie	77
4.7.3.1. Análise da concentração de cálcio	78
4.7.3.2. Análise da concentração de fósforo inorgânico.....	79
4.7.3.3. Análise da concentração de íon flúor	80
4.7.4. Análise de flúor fracamente ligado.....	80
4.7.5. Análise de flúor fortemente ligado	81
4.7.6. Análise estatística	83
5. RESULTADOS	85
5.1. Parte 1 – Verificação dos possíveis parâmetros <i>laser</i> para prevenção da cárie	85

5.1.1. Análise morfológica.....	85
5.1.2. Análise da temperatura superficial.....	89
5.1.3. Análise da temperatura pulpar.....	92
5.2. Parte 2 - Determinação dos efeitos da irradiação <i>laser</i> para prevenção da cárie	98
5.2.1. Análise da perda mineral.....	98
5.2.2. Análise da dissolução iônica durante o processo de cárie	115
5.2.2.1. Análise de cálcio.....	115
5.2.2.2. Análise de fósforo inorgânico.....	134
5.2.2.3. Análise de íon flúor	156
5.2.3. Análise de flúor fracamente ligado.....	177
5.2.4. Análise de flúor fortemente ligado	184
6. DISCUSSÃO.....	208
7. CONCLUSÕES.....	233
8. APÊNDICES	234
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	236

1. INTRODUÇÃO

A cárie dental é uma doença que tem sido associada ao homem desde o período da pré-história, ganhando características de pandemia principalmente após o século XIX, com a popularização da cana de açúcar, gerando dor, infecções sistêmicas e mutilações na maioria das pessoas¹. Os avanços obtidos quanto ao conhecimento de sua etiologia, seu diagnóstico e suas formas de tratamento e prevenção promoveram um declínio mundial na prevalência desta enfermidade, a qual representa um importante indicador da saúde de uma população.

Levando-se em consideração os fatores determinantes para o desenvolvimento da doença cárie, a prevenção da mesma se faz de modo eficaz através do controle da dieta, diminuindo ou eventualmente eliminando a ingestão de carboidratos fermentáveis, da orientação de higiene oral², e da utilização ampla de compostos fluoretados, medida que permite a redução da perda mineral do esmalte dentário íntegro³, ou ativa a reposição mineral do dente com lesão de cárie, aumentando a capacidade da saliva de repor mineral no esmalte desmineralizado⁴.

A adoção de intensas medidas preventivas, como a introdução de flúor nas águas de abastecimento, a realização de programas de saúde buscando-se a conscientização sobre as causas da doença e suas formas de prevenção, e a associação de terapias com flúor, com a utilização de dentifrícios e compostos fluoretados, tem resultado em um declínio acentuado na prevalência da doença cárie em âmbito mundial^{5,6,7,8}. Em consequência deste declínio, a doença cárie tornou-se altamente polarizada, de forma que 20% da população infantil concentra 60% do total de cárie^{9,10}. Ainda assim, a existência de grupos específicos de pessoas desprivilegiadas, com acesso restrito à água e produtos fluoretados, pessoas institucionalizadas, doentes e com dificuldades de higienização, enfatiza a necessidade de se aperfeiçoar os métodos preventivos já existentes¹¹. Assim, a estratégia de associação de métodos preventivos, de forma

que possibilitassem a manutenção de níveis constantes de flúor no meio bucal, o que poderia resultar numa potencialização do seu efeito, tem sido considerada extremamente importante e necessária nos dias atuais.

Dentro deste contexto, a terapia *laser* tem se tornado uma alternativa com boa perspectiva. Desde sua invenção na década de 1960¹², e posteriormente em suas primeiras aplicações em Odontologia^{13,14,15}, confirmou-se que esta tecnologia poderia atuar como um excelente coadjuvante para o tratamento de muitas patologias que afetam a cavidade oral, assim como poderia também possibilitar a prevenção do aparecimento das lesões de cárie^{16,17}. Para isto, a irradiação *laser* deverá atuar diretamente no hospedeiro, promovendo alterações na microestrutura do esmalte e dentina de forma que estes tecidos se tornem mais resistentes às quedas de pH proporcionadas pelo desafio cariogênico¹⁸, ou mesmo a irradiação *laser* poderia atuar potencializando a ação das terapias convencionais^{17,19,20}, representadas principalmente pela ação do íon fluoreto.

Deste modo, os *lasers* de Nd:YAG¹⁶, Ho:YAG²¹, Ho:YLF²², Argônio¹⁹, CO₂^{17,20}, Er:YAG²³ e Er,Cr:YSGG²⁴ foram avaliados quanto à possibilidade de proporcionar um aumento da resistência do esmalte à desmineralização, quando resultados satisfatórios foram obtidos. De fato, os efeitos promovidos pela irradiação *laser* dependem de sua interação com os tecidos dentais duros, o que está relacionado principalmente com seu comprimento de onda. Assim, os *lasers* de érbio (Er:YAG e Er,Cr:YSGG) e de CO₂ pulsados são os mais promissores, tendo em vista a forte interação destes *lasers* com a água e a hidroxiapatita constituintes do esmalte e da dentina.

O *laser* de Er,Cr:YSGG (óxido de gálio, escândio e ítrio dopado com cromo e érbio), com comprimento de onda de emissão de 2,79 µm, mostra-se conveniente para prevenção da cárie por ter maior absorção pelo íon hidroxila constituinte da hidroxiapatita²⁵ (OH⁻ mineral) quando comparado ao *laser* de Er:YAG (comprimento de onda 2,94 µm), assim como possui forte absorção pela água constituinte da subsuperfície do esmalte. Desta forma, a irradiação com este *laser* pode provocar maior aquecimento superficial, favorável à indução de mudanças na microestrutura do esmalte, além de promover uma menor

transmissão do calor para o interior do elemento dental, o que faz com que os efeitos térmicos causados por ele sejam menores na polpa e nos tecidos periodontais quando comparados com os efeitos promovidos pelos *lasers* de Nd:YAG (de comprimento de onda de 1,064 μm) e CO_2 (de comprimento de onda de 9,6 e 10,6 μm). Ainda, trata-se de um comprimento de onda com equipamento comercial disponível para Odontologia, o que não ocorre com o *laser* de CO_2 com comprimento de onda de 9,6 μm , podendo também ser empregado para diversas aplicações clínicas, o que o torna mais vantajoso para o Odontólogo.

Considerando todos estes aspectos, alguns estudos *in vitro*^{23,24,26,27,28} e *in situ*²⁹ já têm evidenciado o potencial do *laser* de Er,Cr:YSGG para prevenção da cárie; entretanto, pouco consenso se observa quanto aos parâmetros para sua aplicação clínica. Embora tenha sido evidenciado aumentos de temperatura da ordem de 800° C no esmalte dental quando o *laser* de Er,Cr:YSGG irradia sob fluência no limiar de ablação²⁶, o que é extremamente satisfatório para a indução de mudanças químicas no esmalte, sabe-se que os efeitos ablativos de tal parâmetro não é desejável para fins preventivos. Ainda assim, na literatura, não há um consenso quanto aos valores de limiar de ablação para o *laser* de Er,Cr:YSGG, sendo reportado os valores de 4 J/cm^2 (Belikov *et al.*³⁰, 1993), 18 J/cm^2 (Fried *et al.*²⁶, 1996) e 10 a 14 J/cm^2 (Apel *et al.*³¹, 2002). Assim, ocorre a necessidade de se determinar com maior exatidão parâmetros ideais que possibilitem a alteração química do esmalte, de forma a obter mínimas alterações morfológicas.

Muito se tem estudado sobre os reais mecanismos para o aumento na resistência à desmineralização do esmalte irradiado a *laser*. Certamente, os efeitos decorrentes do aumento de temperatura superficial são os mais aceitos, quando em faixas de temperatura entre 100° C e 400° C revela-se a perda de água e carbonato do esmalte, tornando-o menos solúvel³². Ainda assim, a alteração na quantidade de alguns íons, como hidróxidos e pirofosfatos, apontam alterações químicas que contribuem para este processo³³. Aumentos de temperatura superiores a 800° C induzem a efeitos mais significativos, ocorrendo a completa remoção de carbonato e a formação de cristais mais estáveis quimicamente³⁴.

Maiores efeitos da irradiação *laser* na inibição da desmineralização, entretanto, são demonstrados quando o mesmo encontra-se associado à presença de fluoreto^{16,17,20}. De fato, parece que a irradiação *laser* poderia potencializar os efeitos do flúor por meio de sua ligação mais efetiva com o esmalte dental ou mesmo aumentar a incorporação ou retenção do flúor³⁵. Ainda assim, a irradiação *laser* poderia favorecer a formação e a retenção de flúor, o que poderia favorecer o efeito cariostático do flúor a longo prazo. Embora os mecanismos desta interação não estejam completamente elucidados, a utilização da tecnologia *laser* associada ao flúor poderia ser aplicada, sendo um recurso preventivo bem sucedido em indivíduos com alto risco de cárie e em sítios de difícil higienização, à medida que seria necessária apenas uma única sessão, de forma não invasiva e indolor, menos onerosa para paciente e profissional.

Embora haja estudos sobre o uso do *laser* de Er,Cr:YSGG para a prevenção da desmineralização do esmalte, pouco se conhece sobre os parâmetros que possam ser empregados para tal fim, assim como não há relatos quanto ao seu efeito sobre a ação e eventualmente a retenção de produtos relacionados com o mecanismo de ação do flúor sobre o esmalte dental, o que motivou a realização deste trabalho.

2. OBJETIVOS

Este estudo objetivou:

- 1 – determinar condições de irradiação com o *laser* de Er,Cr:YSGG que visem a prevenção da cárie;
- 2 – verificar se a aplicação prévia de um agente fotoabsorvedor poderia potencializar a ação preventiva do laser de Er,Cr:YSGG, assim como poderia minimizar os efeitos térmicos sobre o tecido pulpar;
- 3 – determinar os efeitos induzidos sobre a resistência à desmineralização e na retenção de flúor em esmalte humano irradiado com o laser de Er,Cr:YSGG, avaliando seu potencial uso como coadjuvante ao flúor na prevenção da cárie.

3. REVISÃO DA LITERATURA

Neste capítulo procurou-se revisar a literatura com relação aos efeitos do *laser* no esmalte dental e na prevenção da cárie, o estado da arte do *laser* de Er,Cr:YSGG, bem como ressaltar considerações a respeito da etiologia da doença cárie e de suas formas de prevenção.

3.1. Considerações sobre o esmalte dental humano

O esmalte, estrutura acelular mais superficial e visível do órgão dental, é o tecido mais mineralizado do corpo humano, composto de aproximadamente 95% de mineral, 2% material orgânico e 3% de água em peso.^{36,37}. Este conteúdo mineral constitui-se principalmente de cristais de apatita firmemente unidos, separados de seus vizinhos por finos espaços intercristalinos, os quais, assim, são preenchidos com água e material orgânico, basicamente composto por proteínas e lipídeos.³⁸. Estes finos espaços formam poros que permitem a passagem de pequenas moléculas tais como ácido láctico e íons como hidrogênio e cálcio.³⁹. Como propriedades físicas, observa-se que o esmalte tem densidade de 2,95 g/cm³ e índice de refração de 1,64 quando envolvido em água, propriedades muito semelhantes à água em si, o que confere a translucidez característica deste tecido.⁴⁰.

Os cristais de apatita encontrados no esmalte assemelham-se à hidroxiapatita mineral $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$; porém, inclusões de carbonato, sódio, flúor, magnésio, potássio, cobre, cloro, ferro, manganês, enxofre, chumbo e outros íons fazem da apatita biológica uma forma impura do mineral, sendo que 80% a 90% destes correspondem à hidroxiapatita carbonatada.⁴¹. Desta forma, a hidroxiapatita carbonatada poderia ser representada quimicamente pela fórmula: $(\text{Ca},\text{Mg},\text{Na},\text{X})_{10}(\text{PO}_4,\text{HPO}_4,\text{CO}_3)_6(\text{OH},\text{Cl})_2$ ³⁷, onde X representa inclusões de outros íons. Estes componentes menores correspondem a 3% da composição total do esmalte, dos quais o carbonato e o sódio correspondem a 9/10.⁴³. Como componentes principais, os cristais de apatita possuem cerca de 37% de cálcio, 52% de fosfato (sendo 18% de fósforo), 3% de hidroxila e razão molar de cálcio e

fósforo (Ca/P) de 1,64.⁴².

Os cristais de hidroxiapatita têm, em média, 50 nm de largura em corte transversal e mais de 100 nm de comprimento, sendo reunidos repetitivamente numa organização, de aproximadamente 1000 cristais, que origina os prismas (ou bastões) de esmalte.³⁷ Cada cristal é circundado por uma camada de água firmemente ligada, a qual pode ser removida apenas quando o esmalte é aquecido a 600° C.⁴¹ Isto porque a assimetria e a grande área superficial dos cristais de hidroxiapatita confere um campo elétrico forte que atrai íons e moléculas eletricamente carregados, dentre eles a água.⁴³

Morfolologicamente, observa-se que os prismas de esmalte possuem dimensões de 5 µm de largura, o que corresponde à “cabeça” do prisma, e 9 µm de comprimento.⁴⁴, região que se estende da “cabeça” até a “cauda” do prisma.³⁶ Estes prismas se estendem desde a dentina até a superfície do esmalte. Em corte transversal, observa-se que estas estruturas apresentam aspecto circular ou mesmo o classicamente denominado de “buraco de fechadura”. Os cristais de hidroxiapatita são alinhados com seu longo eixo (chamado de eixo C) paralelamente aos longos eixos dos prismas.⁴² Entretanto, na periferia dos prismas, os cristais não se encontram alinhados desta maneira, e sim promovem espaços intercristalinos maiores. Nas irregularidades entre os prismas, localizam-se as proteínas enamelinas, as quais representam uma pequena porcentagem do esmalte totalmente maduro.⁴¹

Nas regiões de fóssulas, fissuras e cervicais dos dentes permanentes, assim como recobrimdo toda a coroa dos dentes decíduos, ocorre a formação de uma camada aprismática, com espessura de 30 µm.^{43,44} Esta camada, embora destituída de prismas, é constituída por cristais de hidroxiapatita, e ocorre principalmente porque nem todos os cristais chegam a atingir a superfície do esmalte. Os prismas tendem, em geral, a seguir uma trajetória perpendicular tanto à superfície do dente quanto ao limite amelo-dentinário.⁴⁴

As diversas substituições de íons na hidroxiapatita conferem um importante efeito em sua solubilidade, dependente principalmente do pH.³⁷ Além disso, tais substituições alteram a cristalinidade e as dimensões dos cristais.^{41,42} A

principal substituição se dá no íon hidroxila (OH^-), o qual se encontra de 20% a 30% em menor quantidade no esmalte quando comparado à hidroxiapatita estequiométrica³⁷. Assim, o produto de solubilidade, isto é, o produto das concentrações dos íons constituintes na equação de equilíbrio, elevada cada concentração a uma potência igual ao do seu coeficiente estequiométrico⁴⁵, varia grandemente do esmalte para a hidroxiapatita estequiométrica, sendo reportado maiores valores para o esmalte (cerca de $7,2 \times 10^{-53}$ a $6,4 \times 10^{-58}$) quando comparado à hidroxiapatita ($3,04 \times 10^{-59}$)⁴². A substituição do radical fosfato pelo carbonato, com a quase simultânea substituição do cálcio pelo sódio, torna a hidroxiapatita mais solúvel, ao passo que a substituição das hidroxilas pelo flúor diminui o produto de solubilidade, deixando a hidroxiapatita menos solúvel^{37,38,40,41,42}.

O carbonato, impureza que confere maior solubilidade ao esmalte, representa 3% do peso seco do esmalte^{41,42}, e pode ser incorporado a ela sob duas formas distintas. A primeira delas, a substituição do tipo A, dá-se quando o carbonato substitui a hidroxila; porém, a substituição tipo B, isto é, quando o carbonato substitui o fosfato, é a mais evidente na hidroxiapatita biológica, conferindo uma redução no tamanho dos cristais, mudanças em sua morfologia e aumento de sua solubilidade³⁷. A incorporação de magnésio, embora em quantidades limitadas, também exerce os mesmos efeitos. Vale ressaltar que o carbonato é preferencialmente perdido durante o processo de desmineralização, sendo também excluído durante a remineralização³⁹.

Os íons flúor substituem os íons hidroxila durante o processo de remineralização, originando as fluorhidroxiapatitas ou hidroxiapatitas fluoretadas^{38,39}. A incorporação de flúor promove um aumento no tamanho e na espessura dos cristais de hidroxiapatita, além de conferir a ela uma diminuição da deficiência de cálcio, e uma diminuição de sua solubilidade^{37,41}. Vale ressaltar, entretanto, que as fluorapatitas originam-se quando há 100% de substituição de hidroxilas por flúor, o que não acontece na maior parte dos tecidos biológicos, com exceção feita ao esmalte do dente de tubarão⁴⁰.

3.2. Etiologia e mecanismo da doença cárie

A cárie dentária é, sem dúvida, a doença mais prevalente da cavidade oral. Trata-se de um processo invasivo, multifatorial e patológico que ocasiona a perda de mineral dos tecidos duros dentais (esmalte, dentina e cemento), dependente da presença de biofilme e carboidratos fermentáveis². A produção de ácidos pela microbiota cariogênica ocasiona a perda de cálcio e fosfato dos tecidos mineralizados, o que leva à destruição dos mesmos³.

De uma forma sucinta, sabe-se que são quatro⁴² os principais fatores responsáveis pelo desenvolvimento da doença cárie: 1) a existência de placa bacteriana (biofilme dental); 2) um substrato onde as bactérias encontram seus nutrientes; 3) um hospedeiro susceptível (esmalte-dentina); 4) o tempo de interação destes três fatores. Todos eles precisam coexistir para que o processo se desenvolva, pois a ausência de qualquer um destes comprometerá o desenvolvimento da doença.

Embora muito se saiba sobre a etiologia da doença cárie, há ainda grande discussão sobre o assunto. Após a sugestão de Keyes⁴⁶, em 1960, de um mecanismo simples para evidenciar a etiologia da doença baseado em três fatores principais (microbiota, dente e substrato), o fator tempo foi acrescentado por Newbrun⁴² em 1978, pois a perda mineral não se dá de forma instantânea, e sim após um período de desequilíbrio dos demais fatores. Na verdade, hoje se considera a doença cárie um resultado da interação dos fatores supracitados (determinantes) com fatores modificadores relacionados com as atitudes e comportamento do indivíduo, bem como sua resposta imunológica e influência do ambiente que o envolve⁴⁷. Assim, a educação, a renda e o stress do indivíduo são também fatores importantes que contribuem para a incidência e prevalência da doença.

A cárie dental é um processo dinâmico, alternante de perda e ganho de minerais, tratando-se de uma doença não auto-limitante, cujo sinal clínico é evidenciado pela destruição localizada dos tecidos duros, a lesão da cárie⁴⁰. Os estágios iniciais de uma lesão de cárie, cujo aspecto clínico é denominado de “lesão de mancha branca”, caracterizam-se por uma dissolução parcial do esmalte promovida pelos ácidos constantes no ambiente oral. A lesão de mancha

branca formada, assim denominada devido à mudança do índice de refração proporcionada pela perda mineral³⁹, é composta por uma camada sub-superficial altamente mineralizada, com espessura aproximada de 20 a 50 µm, e de uma camada com perda mineral de 30 a 50% em profundidade, o chamado corpo da lesão⁴⁰.

Assim, as lesões de mancha branca podem ser divididas em quatro zonas perfeitamente distinguíveis. A primeira delas e mais interior à lesão, a zona translúcida, de 40 µm de espessura³⁸, possui índice de refração similar ao do esmalte; assim, só pode ser examinada por cortes longitudinais ao corpo da lesão, sendo caracterizada por uma perda mineral de aproximadamente 1,2% e por um pequeno número de grandes porosidades⁴². A segunda delas é a zona escura, a qual varia muito em tamanho e apresenta perda mineral em torno de 6%⁴². É composta de poros de tamanho menor, porém em maior porcentagem (5% a 10%). Já o corpo da lesão apresenta uma perda mineral ao redor de 24%, sendo a maior zona da lesão de mancha branca³⁸. Esta zona é caracterizada por 25% a 50% de porosidades, com grande destruição do tecido e, eventualmente, cavitações. Por último, a camada mais superficial da lesão de mancha branca (zona superficial) apresenta-se com espessura média de 20 a 100 µm, sendo mais espessa nas lesões inativas e mais fina nas lesões ativas. A porosidade nesta zona é de aproximadamente 1 % a 2%, muito semelhante ao tecido hígido, e esta camada persiste até o momento da cavitação⁴².

A presença de biofilme bacteriano, embora não seja o único fator desencadeante do processo, é essencial para que a lesão de cárie se desenvolva. O biofilme é formado por microorganismos organizados em uma estrutura tridimensional inclusa em uma matriz de material extracelular derivado das próprias células e do ambiente⁴⁰. Sua formação inicia-se com a adsorção de proteínas da saliva (glicoproteínas salivares, fosfoproteínas), lipídeos e alguns componentes do fluido gengival sobre o esmalte, formando-se uma película proteinácea de 1 a 10 µm de espessura⁴⁷. Esta película facilita a colonização inicial pelos cocos *S. sanguinis*, *S. oralis*, *S. mitis* biovar 1, *Actinomyces* sp. e bactérias Gram-negativas. O ambiente formado pela colonização inicial, à medida que os depósitos bacterianos se tornam mais espessos e que a concentração de

oxigênio é diminuída, torna-se atrativo para a adesão de outras espécies e favorece a multiplicação das bactérias *S.mutans*, *S.sobrinus* e *Lactobacillus*, bactérias altamente capazes de sobreviver em meios ácidos. Os produtos do metabolismo bacteriano, a alta concentração de nutrientes, polissacarídeos, enzimas, lipídeos e minerais, assim como a organização espacial entre os microorganismos, facilitam a retenção e a diversidade microbiana; desta maneira, as bactérias do biofilme tornam-se menos sensíveis aos produtos antimicrobianos⁴⁰. Quanto à sua localização, o biofilme forma-se preferencialmente nas superfícies próximas à gengiva e nos sulcos e fissuras da superfície oclusal dos dentes, ou seja, em áreas que não são freqüentemente submetidas aos desgastes mecânicos. Assim, tais áreas tornam-se as mais susceptíveis à formação das lesões de cárie⁴⁸.

Considerando os processos bioquímicos envolvidos no desenvolvimento da lesão de cárie, tem-se, de forma resumida, que os açúcares de baixo peso molecular (sacarose, frutose, maltose, lactose) e os álcoois de açúcar, como sorbitol e manitol, são transportados e metabolizados pelas bactérias do biofilme, sendo convertidos em ácidos orgânicos^{40,42,46,47}. Estes produtos finais do metabolismo bacteriano variam de indivíduo para indivíduo, e também entre as várias regiões do ambiente oral⁴⁸. Assim, formam-se, de modo geral, os ácidos láctico, acético, fórmico, propiônico e butírico, além do etanol. Os ácidos formados difundem-se para o interior do esmalte adjacente, quando se dissociam em íons hidrogênio (H^+), os quais, por sua vez, podem interagir com bases presentes na saliva e bicarbonato. O excesso destes íons de hidrogênio promove uma queda instantânea do pH do meio. Alguns mecanismos tendem a neutralizar o pH do meio, sendo eles os sistemas tampão da saliva, por meio dos íons fosfato, carbonato e por proteínas, o material orgânico do biofilme e também do cálculo, se presente^{38,40}. Quando o pH diminui para valores inferiores a 5,5, tem-se que o ácido não dissociado solubiliza a hidroxiapatita, havendo, assim, a liberação de íons cálcio e fósforo da superfície do esmalte para o meio oral. A equação de equilíbrio de solubilidade da hidroxiapatita do esmalte é a seguinte³⁷:

O pH crítico é o pH no qual a saliva é exatamente saturada com

relação à apatita do esmalte. Assim, abaixo de 5,5 (para esmalte) ou de 6,5 (para dentina), a saliva torna-se subsaturada com relação à apatita do esmalte, considerando-se a presença dos íons fosfato e cálcio. Neste momento, os íons fosfato (PO_4^{3-}) juntam-se aos íons hidrogênio disponíveis, havendo a formação de HPO_4^{2-} e, posteriormente, de $\text{H}_2\text{PO}_4^{-2}$. Assim, à medida que diminui o pH, a solubilidade dos fosfatos de cálcio aumenta. Com isso, os íons fosfato continuam deixando a superfície do dente para manter o equilíbrio e a solubilidade da hidroxiapatita torna-se mais pronunciada³⁷ (FIG. 1). Entre pH 4 e 7, faixa relevante para o ataque cariioso, a solubilidade da apatita do esmalte aumenta aproximadamente 10 vezes cada vez que o pH é reduzido em uma unidade³⁸.

FIGURA 1: Conversão do fosfato e seu efeito na solubilidade da hidroxiapatita^{2,37}.

O pH do meio permanecerá crítico por um tempo de 20 minutos a horas e então retornará ao normal³. O retorno do pH a valores acima dos valores críticos propiciará a reposição dos minerais perdidos durante o processo de desmineralização pela ação da saliva, a qual, juntamente com o fluido do biofilme, se encontrará supersaturada com relação à apatita do esmalte. Assim, os tampões salivares metabolizam os ácidos produzidos e a difusão dos íons cálcio e fosfato é favorecido para o esmalte, ativando a remineralização². Vale ressaltar, entretanto, que a capacidade tampão salivar não é 100% eficiente, pois é provável que alguns íons distanciem-se da superfície do esmalte e, portanto, não fiquem disponíveis para redeposição³. Assim, fenômenos freqüentes de desmineralização e remineralização vão promovendo perdas progressivas de mineral, de tal forma que o fenômeno passe a atingir um estágio clínico visível, evidenciado pela formação de manchas brancas e cavitações.

Com relação às mudanças promovidas pelo desafio cariogênico na ultra-estrutura do esmalte, observa-se uma destruição dos cristais de apatita no interior dos prismas de esmalte pelos ácidos. Tal dissolução resulta no alargamento dos espaços intercristalinos, os quais são preenchidos por material amorfo que, por sua vez, facilita uma reação histoquímica com os carboidratos presentes^{38,40,42}. Embora isto ocorra, alguns cristais localizados nas junções dos prismas apresentam-se maiores, evidenciando um processo de recristalização durante o processo de cárie. A destruição dos cristais é mais pronunciada de dentro para fora, com a formação de um orifício centralizado que se estende por todo o cristal que facilita a difusão de íons para o interior. À medida que o número de cristais dissolvidos aumenta, o tecido se torna mais poroso, evidenciando um desarranjo dos cristais remanescentes. A penetração bacteriana ocorre com a destruição dos cristais, podendo formar colônias dentro da estrutura prismática ou mesmo entre os prismas de esmalte, potencializando, assim, o processo carioso⁴².

Sendo assim, é bastante clara a necessidade de conhecimento dos mecanismos da doença cárie para que possam desenvolver métodos preventivos eficazes, duradouros e com aceitabilidade clínica. Ainda assim, considerando seus agentes etiológicos e suas diversas interações, torna-se importante enfatizar que o controle da formação de biofilme, assim como a conscientização do indivíduo sobre a ingestão de alimentos cariogênicos, são medidas fundamentais que devem ser tomadas conjuntamente com qualquer método preventivo que venha a ser praticado.

3.3. O flúor atuante na prevenção da cárie

Apropriadamente, o flúor se tornou um dos meios mais consagrados e eficazes para a prevenção da cárie. A aplicação de géis, espumas, bochechos, dentifrícios e vernizes fluoretados culminou em incorporação e retenção de flúor sobre os tecidos duros, resultando em grande eficácia clínica^{4,5,6,7}. Ainda assim, a adição de flúor nas águas de abastecimento tornou-se a medida mais efetiva de controle da doença cárie^{1,3}, permitindo um declínio considerável na incidência da

doença em população carente de atendimento odontológico. Entretanto, deve-se atentar para o risco de fluorose em crianças, quando a administração de flúor deve ser rigorosamente controlada, exigindo maior atenção profissional, assim como a utilização de dentifrícos com baixo teor de flúor.

O flúor possui três principais mecanismos de atuação³⁹: 1) inibição do metabolismo bacteriano após sua difusão para o interior da bactéria, como moléculas de ácido fluorídrico; 2) inibição da desmineralização, por meio da formação de cristais tipo fluoreto de cálcio (CaF₂) que se depositam sobre a superfície, e disponibilizam o íon fluoreto durante o desafio cariogênico; 3) potencialização da remineralização, com a formação de apatita fluoretada ou fluorapatita sobre as superfícies remineralizadas.

O flúor pode estar adsorvido no esmalte sob duas formas: flúor fracamente ligado (sob a forma de cristais tipo fluoreto de cálcio – tipo CaF₂) e flúor permanentemente ou fortemente ligado (sob a forma de fluorapatita – Ca₁₀(PO₄)₆F₂)^{2,3,39,40,42,47}. O flúor fortemente ligado não pode ser extraído, a menos que haja a dissolução do cristal², o que é realizado em laboratório com a utilização de ácido clorídrico (HCl). O cristal tipo fluoreto de cálcio, ou flúor fracamente ligado, é o responsável pelo potencial cariostático dos produtos de aplicação tópica e, por meio de sua lenta dissolução e sua prolongada retenção, atua como um reservatório de flúor frente às quedas bruscas de pH na cavidade oral. A reação da precipitação do fluoreto de cálcio é a seguinte⁴⁰:

O cristal tipo fluoreto de cálcio é caracterizado por seu depósito globular sobre o esmalte e sua solubilidade em hidróxido de potássio (KOH)². O fluoreto de cálcio, assim, é formado quando há, pelo menos, 100 ppm de flúor na solução que está em contato com esmalte⁴⁰, o que facilmente ocorre após a aplicação tópica profissional de flúor ou mesmo após a escovação com dentifrício contendo fluoreto de sódio (NaF). O fluoreto de cálcio não está puro sobre o

esmalte, mas sim contaminado com fosfato ou proteínas salivares. A formação de fluoreto de cálcio é potencializada quanto maior for a concentração de fluoreto que estiver disponível, além de depender do pH do meio.³⁹ Assim, uma aplicação tópica de flúor fosfato acidulado torna-se bastante vantajosa por disponibilizar fluoreto a uma concentração de 12300 ppm, além de ser acidificada com ácido fosfórico, o qual dissolve levemente o esmalte superficial e disponibiliza maior quantidade de cálcio para formação de fluoreto de cálcio.⁴⁰

A precipitação de cristais tipo fluoreto de cálcio é maior nas lesões cariosas devido à sua porosidade, tratando-se do mecanismo chave para redução destas lesões. Entretanto, através da própria ação da saliva, o fluoreto de cálcio é dissolvido, tendo seu efeito perdido com o decorrer do tempo. Assim, as aplicações tópicas de flúor devem ser freqüentemente repetidas para se modificar as propriedades do esmalte e garantir a manutenção do efeito anti-cárie.³

Idealmente, maior efeito preventivo é obtido quando da incorporação do fluoreto na estrutura do esmalte, através da formação de fluorapatita [$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$], a qual é menos solúvel e apresenta-se como cristais maiores e mais estáveis quimicamente que a hidroxiapatita.³⁷ Assim, durante a remineralização, os íons flúor presentes em solução, em concentrações menores que 50 ppm, adsorvem-se aos cristais de hidroxiapatita carbonatada parcialmente dissolvidos, atraindo íons cálcio e propiciando a formação de um composto.³⁹ conforme a reação a seguir:

Assim, conforme visto anteriormente, a presença do fluoreto no ambiente oral promove a formação de apatitas menos solúveis e a inibição da formação de compostos fosfatados (fosfatos de cálcio) mais ácidos e mais solúveis, tais como fosfato de octacálcio e de fosfato tricálcico tipo beta.³⁷

Durante o desafio cariogênico, o flúor mesmo presente em baixos níveis fisiológicos (menores que 0,1 ppm) pode propiciar a formação de fluorapatita sobre a superfície das lesões. Isto ocorre em faixas de pH entre 5,5 e 4,5, quando a fase aquosa adjacente ao esmalte apresenta-se não saturada com relação à hidroxiapatita e supersaturada com relação à fluorapatita. Assim, a lesão de cárie resultante apresenta uma dissolução da hidroxiapatita proveniente da região subsuperficial e a formação de fluorapatita sobre sua superfície, o que diminui a perda de minerais durante o processo de cárie^{39,41}. O aumento do pH propicia o redépósito de minerais sobre a superfície (formação de apatita), enquanto que quedas maiores de pH levam à dissociação também da fluorapatita. O aumento das concentrações disponíveis de flúor propicia um crescente nível de flúor nas camadas superficiais das lesões cariosas, fenômeno que reduz substancialmente a perda mineral e paralisa a lesão³.

A incorporação de fluoreto nos cristais de esmalte durante seu processo de maturação, dependente exclusivamente da ingestão de flúor durante o desenvolvimento do dente, não é capaz de alterar a solubilidade do mineral formado³. Isto explica porque os indivíduos com fluorose não possuem menor susceptibilidade ao desenvolvimento de lesões cariosas. O importante, assim, é que os íons flúor estejam presentes em solução ao redor dos cristais de apatita carbonatada para inibir a desmineralização³⁹.

Além dos mecanismos de atuação descritos acima, o flúor presente em solução difunde para o interior da célula bacteriana, por meio da formação de HF^{39} (ácido fluorídrico). A dissociação desta substância em íons H^+ e F^- no interior da célula bacteriana interfere com a atividade de várias enzimas, dentre elas a enolase, necessária para o metabolismo de carboidratos. Desta forma, o flúor inibe a atividade de enzimas essenciais para as baterias.

Ressalta-se, contudo, que a presença constante de flúor na cavidade oral não é suficiente para evitar a formação da lesão de cárie pois, embora o flúor reduza significativamente a perda mineral e, com isto, a progressão da lesão, ele não impede a formação da mesma³. Portanto, deve-se considerar a etiologia multifatorial da doença cárie, de modo que o controle do seu surgimento possa ser efetivamente realizado associando-se a manutenção de

fluoreto, o controle da formação de biofilme, assim como o controle efetivo da dieta do indivíduo.

3.4. A irradiação *laser* para prevenção da cárie

Considerando-se o flúor deve ser constantemente mantido em ambiente oral.⁴⁹, torna-se necessária a atuação de maneira específica sobre o esmalte dental para prevenção da cárie, visando o aumento de sua resistência à ação dos ácidos de origem bacteriana ou mesmo à potencialização do efeito do flúor.

A utilização da irradiação *laser* em Odontologia tem sido intensamente pesquisada desde a década de 60, quando Stern e Sognnaes evidenciaram uma maior resistência do esmalte aos ácidos por meio da irradiação com *laser* de rubi, com comprimento de onda de 693 nm.^{13,14}. Desde então, a constante busca por parâmetros e comprimentos de onda adequados às diversas aplicações clínicas possibilitou o melhor entendimento da interação da irradiação *laser* com os tecidos duros dentais, e hoje o *laser* se tornou uma ferramenta coadjuvante poderosa para a maioria das intervenções odontológicas, promovendo tratamentos menos invasivos, menos dolorosos, menos cruentos e com maior assepsia.

De fato, para qualquer procedimento que utilize a irradiação *laser*, as interações ópticas entre a luz *laser* e o tecido alvo devem ser perfeitamente entendidas para a garantia de procedimentos seguros e efetivos. A interação da luz *laser* com os tecidos duros dentais depende de todos os parâmetros do *laser*, tais como comprimento de onda, modo de emissão (contínuo ou pulsado), duração do pulso, energia por pulso, taxa de repetição, fluência (ou densidade de energia), diâmetro do feixe e características do feixe.⁵⁰, assim como das propriedades ópticas e térmicas do tecido, as quais se destacam o índice de refração, o coeficiente de espalhamento (μ_s) e o coeficiente de absorção (μ_a).¹¹.

Assim, dependendo de todas as propriedades descritas acima, a irradiação *laser* poderá ser absorvida, espalhada, refletida ou mesmo transmitida

para o interior do tecido irradiado⁵⁰. Para a indução de mudanças químicas no esmalte, idealmente a irradiação *laser* deverá ser altamente absorvida, de forma que uma grande quantidade de calor possa ser gerada, porém restrita a pequena profundidade no tecido.¹⁸ para não induzir a injúrias aos tecidos moles adjacentes ou à polpa. Assim, a alta absorção pelos componentes essenciais do esmalte, isto é, água e hidroxiapatita, é o grande motivo de escolha dos *lasers* de alta intensidade para prevenção da cárie.

Na tabela a seguir, pode-se ter uma comparação numérica das propriedades do esmalte em relação ao comprimento de onda de diferentes *lasers*, o que justifica as diversas aplicações clínicas de cada um deles.

TABELA 1 – Coeficientes de absorção e espalhamento do esmalte nos diversos comprimentos de onda dos *lasers* utilizados em Odontologia¹¹.

<i>Lasers</i>	<i>Comprimento de onda</i>	<i>Coeficiente de absorção (cm⁻¹)</i>	<i>Coeficiente de espalhamento (cm⁻¹)</i>
Visíveis	450 – 700 nm	<1	40-100
Nd:YAG	1064 nm	<1	15
Ho:YAG	2,10 µm	<20	Não determinado
Er,Cr:YSGG	2,79 µm	450	Aproximadamente 0
Er:YAG	2,94 µm	770	Aproximadamente 0
CO ₂	9,3 µm	5500	Aproximadamente 0
CO ₂	9,6 µm	8000	Aproximadamente 0
CO ₂	10,3 µm	1125	Aproximadamente 0
CO ₂	10,6 µm	825	Aproximadamente 0

Desta maneira, ao observarmos a tabela acima e o gráfico abaixo, notamos que os *lasers* de érbio e CO₂ são os que melhor interagem com os componentes estruturais do esmalte. Ainda assim, o aumento de temperatura na superfície decorrente das irradiações aponta ser o principal fator responsável por ocasionar mudanças na microestrutura do esmalte.^{15,18,32,33,34}

FIGURA 2: Principais *lasers* utilizados em Odontologia e sua interação com os principais componentes dos tecidos biológicos, dentre eles a água e a hidroxiapatita.⁵¹

O primeiro *laser* a ser investigado para prevenção da cárie foi o *laser* de rubi (de comprimento de onda de 693 nm), em meados da década de 60. Os estudos apontaram uma menor perda mineral em esmalte irradiado com 12 J/pulso em desmineralização *in vitro* com pH 4,5.¹³ Mais tarde, os mesmos autores relataram um aumento da permeabilidade do esmalte,¹⁴ além de superaquecimento da superfície e do tecido pulpar, o que motivou a investigação de outros comprimentos de onda que interagissem de melhor forma com o

esmalte, provocando menores danos térmicos e morfológicos.

A grande interação dos *lasers* de dióxido de carbono (CO₂) pelos radicais fosfato da hidroxiapatita^{11,25} motivou a investigação dos comprimentos de onda de 9,3 µm.⁵², 9,6 µm.¹⁷, 10,3 µm.⁵² e 10,6 µm.^{20,53} para prevenção da cárie, quando resultados promissores foram obtidos. Devido à grande interação destes comprimentos de onda com o esmalte, as densidades de energia empregadas puderam ser bastante diminuídas para se obter um mesmo efeito, de forma que os primeiros estudos com *laser* de CO₂ utilizaram 1/10 das fluências utilizadas com o *laser* de rubi.⁵³ Assim, motivados pela promoção de efeitos de fusão e recristalização do esmalte (quando temperaturas da ordem de 1200° C são atingidas).^{17,52}, os primeiros estudos realizados utilizaram este *laser* sob modo contínuo, o que foi rapidamente descartado com a comprovação do superaquecimento pulpar decorrente das irradiações.^{11,18} A opção pelo uso de *lasers* que operam no modo pulsado tornou-se mais vantajosa por permitir o relaxamento térmico do tecido irradiado.⁵⁰, de tal forma que a propagação de calor para o interior do tecido pulpar pudesse ser diminuída. Além disso, variações nas taxas de repetição e na largura temporal dos pulsos ocasionam resultados conflitantes.^{17,20,53,54,55}, o que motiva ainda a busca de comprimentos de onda e de parâmetros que proporcionem uma aprimorada interação do *laser* de CO₂ com os tecidos duros dentais, buscando-se sempre melhorar a relação custo-benefício do procedimento.

Embora haja grande variação de parâmetros na literatura, os estudos clássicos com *lasers* de CO₂ evidenciaram inibições da perda mineral de esmalte submetido ao desafio cariogênico *in vitro* da ordem de 85%, 73%, 71% e 68% para os comprimentos de onda 10,6 µm, 10,3 µm, 9,6 µm e 9,3 µm, sem associação de fluoreto.⁵² A aplicação de flúor demonstrou uma importante sinergia com a irradiação *laser*, otimizando os resultados de perda mineral e inibindo a progressão das lesões de cárie com mais eficiência.^{17,20,54,55}, tópico a ser discutido posteriormente. Estudos *in situ* também puderam confirmar os efeitos promovidos por tal associação.²⁰; entretanto, mesmo com os numerosos estudos já realizados com os *lasers* de CO₂, ainda não existe uma definição clara sobre os prováveis parâmetros para uma aplicação clínica.

A utilização dos *lasers* de Nd:YAG para prevenção da cárie foi também motivada pela possibilidade de promover fusão do esmalte.^{15,16,56,57}, embora o comprimento de onda de 1064 nm seja pouco absorvido pelo mesmo. Para potencializar os efeitos do *laser* de Nd:YAG sobre a superfície do esmalte e diminuir a possibilidade de transmissão para o interior do tecido pulpar, optou-se pela aplicação prévia de substâncias fotoabsorvedoras, comumente a tinta nanquim.^{56,57} ou a pasta de pó de carvão.¹⁶. O primeiro estudo *in vitro* realizado com o *laser* de Nd:YAG para prevenção da desmineralização remonta de 1972.¹⁵, quando foi observado 90% de inibição da dissolução de cálcio com fluências em torno de 30 J/cm². Um estudo arrojado realizado em 1989 comparou nove tipos de *lasers* na busca de um que fosse mais apropriado para aumentar a resistência do esmalte à ação de ácidos, concluindo que o *laser* de Nd:YAG sob fluência de 50 J/cm² seria o mais eficaz e o mais viável de se aplicar clinicamente.⁵⁶. Novos estudos *in vitro* foram realizados, comprovando também os benefícios da sinergia com o flúor em suas diversas formas, inclusive o verniz fluoretado, quando o *laser* de Nd:YAG promoveu inibição da formação de 43% das lesões iniciais de fóssulas e fissuras e 80% das lesões de faces lisas.⁵⁷.

Estudos *in vivo* foram também realizados empregando-se o *laser* de Nd:YAG, os quais demonstraram redução de 39,2% da incidência de cáries incipientes no período de 1 ano após irradiação sob fluência de 84,9 J/cm² associado à aplicação de flúor fosfato acidulado.¹⁶. Outro estudo confirmou tais achados, quando a irradiação com *laser* de Nd:YAG sob fluência de 40 J/cm², também associado à aplicação de flúor fosfato acidulado, controlou o aparecimento de lesões de mancha branca ao redor de brackets ortodônticos.⁵⁸. Outrossim, embora a aplicação do *laser* de Nd:YAG tenha sido bem sucedida também *in vivo*, há ainda grande resistência na utilização deste *laser* por tratar-se de uma irradiação delicada, que exige cuidados principalmente no momento da aplicação do fotoabsorvedor, considerando a grande transmissão deste *laser* para o interior do dente, o que causaria riscos de superaquecimento pulpar. Ainda assim, há preocupação com os riscos estéticos do fotoabsorvedor (no caso da tinta nanquim) ou mesmo que a aplicação de carvão seria onerosa para o profissional.

Os *lasers* de érbio (Er:YAG – 2,94 μm e Er,Cr:YSGG – 2,79 μm) também têm sido investigados para fins preventivos^{11,22,23,24,26,29,35,51}, não obstante sejam potencialmente empregados para a realização de preparos cavitários devido ao mecanismo de ablação²⁵. Entretanto, as fluências tiveram que ser bastante diminuídas para que o fenômeno de ablação, resultado da forte interação destes comprimentos de onda com a água presente nos tecidos duros dentais²⁵, fosse evitado. Assim, um “limiar de ablação” foi definido por alguns autores^{26,30,31} para assegurar que danos morfológicos fossem evitados quando estes *lasers* irradiassem sob fluências que estivessem abaixo deste limiar.

O *laser* de Er:YAG, por ser mais popular e o pioneiro dos *lasers* de érbio a ser introduzido no mercado, foi o primeiro a ter aprovação pela F.D.A. americana (U.S. Food and Drug Administration) para ablação de tecidos duros dentais⁵⁹. Por estes motivos, os estudos para se verificar o potencial dos *lasers* de érbio para fins preventivos foram iniciados por este comprimento de onda. O trabalho inicial que verifica sua utilização no aumento da resistência do esmalte aos ácidos remonta de 1990, reportando resultados positivos apenas com emprego de fluências muito elevadas (cerca de 55 a 130 J/cm^2)⁶⁰; entretanto, estudos posteriores confirmam que o *laser* de Er:YAG pode inibir em cerca de 40% a desmineralização do esmalte *in vitro*²⁶, por meio de ciclagem de pH, quando empregadas fluências de 12 J/cm^2 e 9 J/cm^2 .

Fluências menores do que as reportadas para os *lasers* de Er:YAG foram testadas posteriormente, buscando-se evitar os potenciais danos morfológicos decorrentes de ablação, quando resultados contraditórios foram encontrados^{23,59,61,62,63}. Uma diferença não significativa quanto à dissolução de cálcio foi evidenciada em amostras de esmalte bovino irradiadas com *laser* de Er:YAG com fluência de 6,5 J/cm^2 em comparação com amostras não irradiadas²³. Tal achado foi corroborado posteriormente quando empregadas fluências de 1,8 J/cm^2 e 0,9 J/cm^2 , quando a irradiação *laser* não foi capaz de diminuir a dissolução de cálcio e de fósforo em solução de acetato⁵⁹; entretanto, a irradiação *laser* foi capaz de aumentar significativamente a incorporação de flúor. Fluências de 33,3 J/cm^2 , 44,4 J/cm^2 e 20 J/cm^2 também demonstraram induzir menor dissolução de cálcio e fósforo após desmineralização em ácido acético⁶¹.

Mais recentemente, observou-se que a irradiação *laser* com energia de 200 mJ/pulso foi capaz de promover redução de 32,8% da profundidade de lesões de cárie produzidas artificialmente⁶². A utilização do mesmo *laser* sob fluência de 33 J/cm² resultou em significativa diminuição da dissolução de cálcio quando comparado com amostras não-irradiadas, ambos submetidos a 4 dias de ciclagem de pH⁶³. É importante ressaltar que as fluências acima de 19 J/cm² comprovadamente promovem a ablação do esmalte; portanto, questiona-se a atividade preventiva quando o *laser* de Er:YAG é empregado sob as condições descritas nos estudos acima.

Conforme relatado, ainda há uma constante busca por comprimentos de onda e parâmetros ótimos dos *lasers* de alta intensidade para atuação sobre a resistência à desmineralização dos tecidos duros dentais. Com os diversos estudos prévios sobre este assunto, foi possível sugerir alguns mecanismos, ou mesmo conhecer melhor os efeitos dos *lasers* e suas interações com o esmalte e a dentina.

Um dos primeiros mecanismos propostos para explicar a interação da irradiação *laser* com o esmalte dental surgiu da evidência morfológica de fusão e ressolidificação decorrentes da irradiação *laser*, o que proporcionaria um decréscimo na permeabilidade do esmalte à água¹⁴; assim, temperaturas superiores a 1200° C, isto é, maiores que o ponto de fusão da hidroxiapatita⁶⁴, deveriam ser atingidas para se conseguir tal efeito. Mais tarde, os mesmos autores sugeriram que a fusão e recristalização do esmalte poderiam promover um selamento da superfície, o que reduziria também a solubilidade do mesmo¹⁵. Contudo, um estudo posterior realizado por Borggreven *et al.*⁶⁵ (1980) ressaltou que as alterações morfológicas no esmalte decorrentes das irradiações poderiam também aumentar a permeabilidade do mesmo para alguns íons e substâncias como sorbitol e glicerol, e que o aumento da resistência à ação dos ácidos poderia ser devido a algumas modificações químicas induzidas pela irradiação *laser*, tais como a evaporação do material orgânico e do carbonato.

Em estudos posteriores, a análise química da camada fundida e recristalizada do esmalte irradiado evidenciou a presença de monóxido de difosfato de tetracálcio, um composto menos solúvel, e reduzido conteúdo de

carbonato^{66, 67}. Posteriormente, ressaltou-se que o aumento da resistência à desmineralização do esmalte não poderia ser exclusivamente devido à sua fusão e recristalização, pois se tratava de uma camada não uniforme, e sim restrita a apenas algumas áreas de maior interação do esmalte com a irradiação *laser*^{68, 69, 70}.

A teoria de que o fenômeno de fusão e ressolidificação do esmalte era a única alternativa para aumentar sua resistência à ação dos ácidos foi descartada. Atualmente, acredita-se que a diminuição da solubilidade do esmalte se deva às modificações em sua ultra-estrutura, tais como a redução do conteúdo de água e de carbonato, o aumento da quantidade de íons hidroxila, a formação de pirofosfatos e a decomposição de proteínas^{18, 32, 34}. Outra hipótese mencionada seria a alteração e eventualmente a destruição da matriz orgânica localizada no espaço interprismático⁷¹. Assim, os produtos da decomposição desta matriz poderiam obstruir a passagem dos íons durante o processo de desmineralização, o que diminuiria, assim, os efeitos deste processo. Ainda assim, sugeriu-se que a irradiação *laser* poderia promover modificações na forma e no tamanho dos cristais de hidroxiapatita, além da perda de sua estrutura prismática^{15, 68, 72}.

Os efeitos da irradiação *laser* sobre o esmalte dental são, conseqüentemente, dependentes diretamente da temperatura atingida. Em temperaturas superiores a 100° C ocorre o início da remoção do carbonato, sendo sua completa remoção efetivada em temperaturas da ordem de 1100° C³⁴. Na faixa de temperatura entre 100° C e 650° C, devido à redução do carbonato presente na posição do fosfato (substituição tipo B), ocorre também a conversão do íon ácido de fosfato em pirofosfato¹⁸; novas fases cristalinas, tais como α -TCP (α fosfato tricálcico - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2\text{-}\alpha$) e β -TCP (β fosfato tricálcico - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2\text{-}\beta$) são formadas em temperaturas superiores a 1100° C⁷³. Entretanto, vale ressaltar que estas substâncias, isoladamente, são mais solúveis em meio ácido, em relação à hidroxiapatita^{37, 74}. A destruição da matriz orgânica do esmalte, responsável por comprometer a difusão iônica durante a desmineralização, ocorre em temperaturas em torno de 400° C⁷¹.

A primeira evidência da formação das novas fases cristalinas citadas anteriormente provém de estudos realizados com os *lasers* de CO₂, empregado

com densidade de energia variando entre 15 e 12000 J/cm², quando foram observados pequenos traços de α -TCP na camada fundida e recristalizada do esmalte⁷⁵; posteriormente tal evidência foi confirmada quando o mesmo *laser* foi empregado com densidades de energia que variaram entre 10⁴ e 10⁵ J/cm².⁷² Com a irradiação do esmalte com *laser* de Nd:YAG, houve a formação de α -TCP e β -TCP com energias bem inferiores, ao redor de 150 mJ/pulso⁷⁶. Neste estudo houve também a formação de pequena fração de TCP- α - β . Outras fases, tais como TetCP ($\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$) e $\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$ foram também observadas em esmalte fundido por meio da irradiação com os *lasers* de CO₂ (com comprimento de onda de 9,3 μm)⁷⁷ e Ho:YLF⁷³, respectivamente.

FIGURA 3 – Estabilidade térmica dos principais compostos do esmalte em função da faixa de temperatura⁶⁴.

Assim, observa-se que a atuação da irradiação *laser* sobre o esmalte é mais expressiva com a utilização de densidades de energia que promovam fusão e recristalização do esmalte. Entretanto, efeitos significativos para inibição da desmineralização são reportados mesmo com comprimentos de onda pouco absorvidos pelo esmalte, tais como o *laser* de Argônio (488-514nm)^{19, 78, 79}. Neste caso, sugere-se que a irradiação *laser* possa promover

efeitos fotoquímicos, induzindo uma mudança na polarização de alguns componentes do esmalte, a qual propicie maior retenção de flúor. Entretanto, tal teoria ainda não pôde ser confirmada na literatura.

Desta forma, apesar da dificuldade técnica em se determinar todos os mecanismos e modificações químicas induzidos pela irradiação *laser*, maiores estudos devem ser realizados para a perfeita compreensão destes fenômenos e, assim, para possibilitar a escolha de parâmetros e comprimentos de onda eficientes e padronizados para prevenção da desmineralização.

3.5. A sinergia da irradiação *laser* com o flúor

Embora tenha sido demonstrado que a irradiação *laser* seja capaz de induzir uma ácido-resistência ao esmalte irradiado^{13,15,18,22,24,26,33,53,60,61,62,63}, a associação com o fluoreto, sob suas diversas formas disponíveis, comprovou melhores resultados, seja na inibição da formação inicial da lesão de cárie^{16,23,29,35,56,57,58,59,78,79}, ou mesmo na inibição da progressão da lesão.^{17,20,54,55}

Os primeiros trabalhos que utilizaram a irradiação *laser* associada ao fluoreto remontam da década de 70, quando foram relatados os efeitos benéficos da associação da irradiação *laser* de argônio com o fluoreto de sódio no aumento da absorção de flúor e diminuição da dissolução de cálcio e de fósforo em solução de acetato de sódio (pH = 4,0).⁸⁰ Pouco mais tarde, já na década de 80, estudos com *laser* de Nd:YAG demonstraram um aumento da penetração de íons flúor em esmalte irradiado e imerso em solução de flúor fosfato acidulado por 24 horas.⁸¹ Com este mesmo *laser*, porém em estudo posterior realizado com mapeamento por microscopia de força atômica, provou-se que a distribuição de íons fluoreto é acentuadamente maior nas superfícies irradiadas quando comparadas às áreas não irradiadas.⁸²

Motivados por estas descobertas, os estudos posteriores enfatizaram o emprego dos diferentes *lasers*, em associação com diversas formas de fluoreto, para a redução da desmineralização.^{16,17,23,35,57} Os estudos com os *lasers* de CO₂ são os mais abundantes, tendo em vista os excelentes resultados

obtidos quando a irradiação é realizada isoladamente sobre o esmalte. Com o comprimento de onda de 9,6 μm , obteve-se porcentagem de inibição de 49% a 76% da progressão de lesões de cárie após irradiação associada à aplicação tópica de flúor, contra 35% a 42% de inibição após irradiação sem a presença de flúor.¹⁷ Outros estudos também corroboraram a sinergia entre a irradiação com o *laser* de Er:YAG e o flúor fosfato acidulado, evidenciando maior retenção de fluoreto de cálcio após desafio cariogênico *in vitro*.³⁵ Com o *laser* de Nd:YAG, foi observado que a interação *laser* + flúor exerceu 80% de inibição da formação de lesões de cárie *in vitro*.⁵⁷; também foi reportado 39% de redução na incidência de lesões de mancha branca em pacientes adolescentes.¹⁶ Estudos prévios com *laser* de Er,Cr:YSGG foram realizados visando demonstrar a ação deste *laser* na redução da dissolução do esmalte frente ao ataque com ácido láctico, quando os melhores resultados foram reportados na associação de solução fluoretada (redução de 20% na dissolução de íons cálcio com fluência de 8 J/cm²).²³.

Diante destes achados, alguns mecanismos foram propostos para explicar a interação *laser* e flúor e sua influência na desmineralização do esmalte. Sugeriu-se que irradiação *laser* seja capaz de aumentar a difusibilidade do flúor, fazendo com que ocorra maior absorção deste íon pelo esmalte.^{19,33}. Além disso, o mecanismo pelo qual o esmalte irradiado adquire resistência ácida poderia ser a formação de microespaços devido à remoção de componentes orgânicos, água e carbonato do esmalte pela irradiação *laser*, os quais agiriam como sítios para deposição de íons liberados pela desmineralização.⁸³. Estes últimos autores também sugeriram que tal interação parece ser mais efetiva com o emprego de flúor fosfato acidulado do que com a utilização de fluoreto de sódio, pois o flúor fosfato acidulado tornaria disponível uma maior quantidade de flúor, além de auxiliar na interação ao promover uma discreta dissolução do esmalte pela ação do ácido fosfórico. Em outro trabalho, sugeriu-se que o esmalte dental modificado pela irradiação *laser* incorpora melhor o flúor fosfato acidulado aplicado topicamente, e que tal incorporação é potencializada quando a irradiação *laser* é realizada antes da aplicação de flúor.⁸⁴. Estudos posteriores sugeriram também que a irradiação *laser* promove maior retenção do fluoreto, aumentando a adesão destes íons na superfície adjacente e favorecendo, assim, o efeito cariostático por um maior período de tempo.⁸⁵.

Estudos que utilizaram o *laser* de CO₂ em hidroxiapatita sintética reportam que a irradiação *laser* poderia propiciar a conversão de hidroxiapatita em fluorapatita, observada em picos de difração de raios-X; entretanto, fluências maiores que 38 J/cm² seriam necessárias.⁸⁶ Dois anos mais tarde, em estudo com amostras de esmalte bovino, sugeriu-se que a conversão de hidroxiapatita carbonatada em fluorapatita pela irradiação *laser* poderia ser observada com a utilização de fluências menores, cerca de 1 J/cm².⁸⁷ Tal fenômeno se daria pela fusão e solidificação das camadas de cristais de hidroxiapatita, combinadas com a camada de fluoreto difundido e incorporado pelo tratamento tópico prévio às irradiações. Esta nova camada daria origem a uma nova estrutura composta de fluorapatita mineral ou hidroxiapatita fluoretada que seria mais resistente aos ácidos de origem bacteriana.

Efeitos distintos são observados quando o *laser* é empregado antes ou após a aplicação de flúor. Com a utilização do *laser* de TEA-CO₂ (comprimento de onda de 9,6 µm), demonstrou-se que a ação do flúor fosfato acidulado poderia ser ampliada quando aplicado antes da irradiação *laser*.¹⁷, o que discorda de outros trabalhos realizados com *laser* de CO₂ de comprimento de onda de 10,6 µm.²⁰ Embora seja plausível o mecanismo sugerido de fusão da camada superficial do esmalte irradiada com a camada de fluoreto de cálcio formada previamente⁸⁵, tal mecanismo parece ser possível apenas com o derretimento do esmalte. Contudo, estudos anteriores empregando o *laser* de Er,Cr:YSGG, com fluência sub-ablativa de 2,8 J/cm², demonstraram significativa diminuição da perda mineral quando a irradiação é realizada após o tratamento tópico de flúor, em comparação com o grupo em que a irradiação é realizada previamente à aplicação de flúor.⁸⁸ Assim, como no estudo supracitado não houve fusão do esmalte, parece que o mecanismo de sinergia entre *laser* e flúor seja diferente do descrito acima.

Embora os mecanismos de interação entre *laser* e flúor estejam embasados em aumentos de temperatura (efeitos fototérmicos), os mesmos não são a única explicação para a interação entre os *lasers* de argônio e o flúor, considerando que este *laser* possui baixa absorção e alto espalhamento no esmalte.⁵⁰ Desta forma, os resultados obtidos quanto ao aumento significativo da

microdureza do esmalte irradiado⁷⁸, a promoção de prolongada retenção de flúor mesmo após seis meses da aplicação tópica de flúor fosfato acidulado⁷⁹ e a significativa inibição (cerca de 62%) da formação de cáries incipientes *in vivo* ao redor de *brackets* ortodônticos¹⁹ devem-se a outros tipos de efeitos, sugeridos pelos autores como efeitos fotoquímicos. Assim, os autores sugerem que uma mudança na polarização dos componentes do esmalte poderia ser ocasionada pela irradiação *laser*; além disso, a irradiação *laser* poderia promover alterações específicas no esmalte as quais poderiam originar reservatórios para deposição de fluoreto ou mesmo a difusão do fluoreto para o interior do esmalte poderia ser estimulada pela irradiação *laser*.

Conforme visto, os resultados ainda se apresentam controversos na literatura, de tal forma que ainda não foi possível determinar um comprimento de onda, um parâmetro ou mesmo um protocolo para maximizar com eficiência e durabilidade os efeitos do flúor na prevenção da desmineralização do esmalte. Além disso, maiores estudos de fazem necessários para se conhecer os reais mecanismos de interação da irradiação *laser* com o fluoreto.

3.6. O *laser* de Er,Cr:YSGG

Conforme relatado anteriormente, vários comprimentos de onda *laser* foram empregados na tentativa de tornar o esmalte dental mais resistente à desmineralização, quando resultados promissores foram obtidos principalmente na utilização dos *lasers* de Nd:YAG (1,064 μm) e CO₂ (9,6 e 10,6 μm). Entretanto, grande resistência ainda ocorre com a utilização do *laser* de Nd:YAG, pois sua pouca absorção e grande transmissão no esmalte dental ocasionam maiores riscos para o tecido pulpar; além disso, os *lasers* de CO₂ (9,6 μm), apesar de seus excelentes resultados na indução de resistência à desmineralização e na redução da progressão da lesão de cárie, ainda estão indisponíveis comercialmente para Odontologia.

O *laser* de Er,Cr:YSGG (óxido de gálio, escândio e ítrio dopado com cromo e érbio), com comprimento de onda de emissão de 2,79 μm , tem sido indicado principalmente para remoção tecidual por meio do mecanismo de

ablação (efeito fotoacústico)^{89,90,91,92}. Este mecanismo, de forma similar com o que acontece com o *laser* de Er:YAG, deve-se forte absorção deste comprimento de onda com a camada de água presente nos espaços intercristalinos do esmalte; o rápido aquecimento destas moléculas a temperaturas superiores a 100° C (com valores precisos que dependem das características do próprio *laser*) ocasiona o aumento da pressão a valores de centenas de atmosferas. Esta pressão excede a força de resistência do tecido duro (aproximadamente 40 MPa), ocasionando falhas neste material e a conseqüente ejeção do tecido duro adjacente²⁵. Este fenômeno possibilita a execução de preparos cavitários, procedimentos de condicionamento e corte da superfície dental com grande eficiência e rapidez.

Entretanto, uma discreta, porém importante característica difere estes dois comprimentos de onda de emissão *laser* localizados na faixa do infravermelho. Enquanto o *laser* de Er:YAG possui forte interação majoritariamente com a hidroxila (OH⁻) presente nas moléculas de água ($\mu_a = 13000\text{ cm}^{-1}$), a interação do *laser* de Er,Cr:YSGG se dá tanto pela água ($\mu_a = 7000\text{ cm}^{-1}$) como também pela hidroxila presente na molécula de hidroxiapatita (OH⁻ mineral)^{25,90}. Este é o principal motivo pelo qual o *laser* de Er,Cr:YSGG promove maior aquecimento superficial quando comparado com o *laser* de Er:YAG²⁶, podendo até mesmo promover a fusão do esmalte sob determinadas condições de irradiação²⁷. Considerando que o aquecimento da superfície é um dos requisitos para proporcionar modificações na micro-estrutura do esmalte, o *laser* de Er,Cr:YSGG torna-se um potencial candidato para uso na prevenção da cárie.

Devido ao aquecimento tecidual promovido pela irradiação com os *lasers* de érbio, os mesmos podem ser empregados para a prevenção da cárie sob condições de irradiação apropriadas^{24,26,29,51,88}. Para esta aplicação, contudo, o fenômeno de ablação deve ser evitado, pois alterações morfológicas em superfícies hígidas são indesejáveis tendo em vista o potencial para retenção de placa bacteriana, assim como o ônus estético deve ser considerado⁵⁹. Assim, as densidades de energia empregadas, ou fluências, devem estar abaixo do chamado “limiar de ablação”.

FIGURA 4: Espectro de absorção no infravermelho dos *lasers* de Er:YAG (2,94 μm) e Er,Cr:YSGG (2,79 μm) com relação à água e à hidroxiapatita⁶⁴.

FIGURA 5: Espectro de transmissão do esmalte dental entre 2 e 12 μm , mostrando as bandas de absorção da água, radical hidroxila, carbonato e fosfato.²⁶

Estudos prévios, utilizando-se metodologias de radiometria e microscopia eletrônica de varredura, indicaram que o fenômeno de ablação iniciava-se em temperaturas inferiores à temperatura de fusão e recristalização da hidroxiapatita, ou seja, inferiores a 1200° C.²⁶. Para o *laser* de Er:YAG, a temperatura atingida no limiar de ablação está ao redor de 400° C, enquanto que o *laser* de Er,Cr:YSGG promove temperaturas de até 800° C, na mesma condição. Observa-se, não obstante, uma discrepância na literatura sobre os valores mínimos das fluências para ocorrer ablação. Um estudo preliminar de Belikov *et al.*³⁰, em 1993, com medidas de absorção e transmissão de esmalte e dentina, assim como com observações realizadas em microscópio eletrônico de varredura, relatou a ocorrência de ablação do esmalte quando empregadas fluências a partir de 4 J/cm² com um *laser* de largura de pulso de 400 microssegundos. Posteriormente, Fried *et al.* (1996)²⁶ indicou a fluência de 18 J/cm² utilizando um *laser* com largura de pulso de 250 microssegundos, enquanto que Apel *et al.* (2002)³¹ determinou, por microscopia eletrônica de varredura, que a partir de 10 J/cm² ocorreriam ablações teciduais com um *laser* similar.

Embora ainda haja divergências sobre os valores para o limiar de ablação, a possibilidade de promover alterações nos tecidos duros dentais que reduzam sua solubilidade motivou a busca de parâmetros adequados para o emprego do *laser* de Er,Cr:YSGG na prevenção da cárie.^{23,24,26,27,29,88,93} O primeiro estudo a confirmar o potencial deste *laser* na redução da desmineralização foi realizado por Fried *et al.*²⁶ em 1996, por meio da simulação do desafio cariogênico *in vitro* durante 9 dias. Neste trabalho, foi evidenciada uma redução de 60% na perda mineral de esmalte irradiado com fluência de 12,7 J/cm²; com fluência de 7,8 J/cm², houve redução 25% na perda mineral.

Nos anos seguintes, procurou-se conhecer as alterações estruturais promovidas no esmalte pela irradiação com o *laser* de Er,Cr:YSGG. Em um estudo de Da-Guang *et al.* (2000)⁹⁴, observou-se que a irradiação *laser* com fluência de 67,9 J/cm² aumentou as quantidades de cálcio e fósforo do esmalte; entretanto, não houve mudança na relação cálcio/fósforo, o que sugeriu que a irradiação *laser* poderia promover um rearranjo dos cristais de apatita, e não a perda de elementos químicos. Utilizando-se da mesma fluência, determinou-se,

em estudo posterior, que a irradiação *laser* reduz significativamente a dissolução de cálcio de amostras submetidas à desmineralização por ácido láctico 0,1 M durante 24 horas²⁷.

As fluências testadas nos estudos supracitados, entretanto, são extremamente superiores ao limiar de ablação, ocasionando danos térmicos e morfológicos indesejáveis ao esmalte. Assim sendo, em estudo posterior realizado por Apel *et al.* (2002)²³, a dissolução de cálcio foi avaliada em amostras de esmalte bovino irradiadas com fluências de 4 J/cm², 6 J/cm² e 8 J/cm², associadas ou não à imersão prévia das amostras em solução de fluoreto de sódio 1% durante 15 minutos. Após submissão das amostras à desmineralização com solução tampão acetato 0,1 M por 24 horas, observou-se que a irradiação *laser* não exerceu efeitos sobre a dissolução de cálcio; os efeitos foram detectados quando a irradiação *laser* foi associada à imersão prévia em solução fluoretada, entretanto, os resultados não diferiram estatisticamente dos resultados obtidos quando as amostras foram apenas imersas nesta solução. Utilizando-se fluências de 67,9 J/cm² e 33,9 J/cm², Hossain *et al.* (2003)⁹⁵ avaliaram as mudanças na microdureza Knoop e nas quantidades de cálcio e fósforo de cavidades realizadas com *laser*, observando que a irradiação *laser* não ocasionou mudanças na relação Ca/P, assim como não promoveu mudanças significativas na microdureza Knoop quando comparado ao corte realizado com pontas diamantadas. No mesmo ano, outro estudo verificou o potencial do *laser* de Er,Cr:YSGG, na fluência de 104 J/cm², na inibição da desmineralização (realizada por ciclagem de pH durante 11 dias) de margens de preparos cavitários⁹³. Neste momento, ao contrário do que se esperava, foram obtidos maiores valores de perda mineral nos preparos realizados com o *laser*, quando se sugeriu que a refrigeração poderia ter ocasionado uma diminuição das temperaturas atingidas durante as irradiações, fato fundamental para promover alterações na microestrutura do esmalte; não obstante, a maior rugosidade promovida pelas ablações poderia ter favorecido o ataque ácido.

Um estudo *in situ* de 1 semana foi realizado posteriormente²⁹ buscando-se verificar as mudanças na microdureza (Knoop) superficial de blocos de esmalte humano irradiados com fluência de 8 J/cm²; neste estudo, observou-

se que a irradiação *laser* reduz a microdureza das amostras hígidas; após a desmineralização, houve uma tendência maior de redução da microdureza superficial das amostras irradiadas quando comparadas às amostras do grupo não-irradiado, entretanto, tais diferenças não foram estatisticamente evidenciadas. Com estes resultados, os autores questionam a eficiência de se utilizar parâmetros sub-ablativos e a dificuldade de se evitar a ablação clinicamente com o emprego dos equipamentos comercialmente disponíveis do *laser* de Er,Cr:YSGG. Em estudo recente, o mesmo grupo de autores observou amostras de esmalte humano irradiadas com fluência de 8 J/cm^2 e submetidas ao desafio cariogênico *in situ* por 1 semana em microscópio de luz confocal⁹⁶. Com a detecção de micro-trincas com profundidades ao redor de $100 \mu\text{m}$, provavelmente devido à desidratação do esmalte promovida pela irradiação *laser*, os autores sugeriram que a irradiação *laser* não deveria ser empregada para fins preventivos, pois estas trincas, além de indicarem pontos de enfraquecimento do esmalte, também serviriam como pontos iniciais para a invasão bacteriana e a desmineralização.

Apesar destes pontos levantados, foi demonstrado recentemente o potencial cariostático do *laser* de Er,Cr:YSGG²⁴, mesmo empregado em fluências sub-ablativas de $2,8 \text{ J/cm}^2$, $5,6 \text{ J/cm}^2$ e $8,5 \text{ J/cm}^2$. Após a desmineralização de amostras de esmalte humano *in vitro* por 10 dias, comprovou-se que a irradiação *laser* com fluência de $8,5 \text{ J/cm}^2$ reduz significativamente a perda mineral das amostras; entretanto, esta redução não é diferente daquela obtida com o emprego de dentifrício fluoretado. O potencial do *laser* de Er,Cr:YSGG na inibição da desmineralização ao redor de intermediários protéticos (“abutments”) de implantes foi também investigado⁹⁷. Após a desmineralização da dentina de dentes caninos por 16 dias, constatou-se que o *laser* em fluência de $2,8 \text{ J/cm}^2$, sob refrigeração constante, não foi suficiente para reduzir a desmineralização.

De acordo com revisto, nota-se que ainda não há um consenso na literatura sobre a eficácia da utilização do *laser* de Er,Cr:YSGG para prevenção da cárie, assim como não se observa uma definição precisa dos parâmetros a serem utilizados, fato que exige a realização de mais estudos para se determinar se realmente este *laser* pode ser empregado para tal fim.

3.7. O fator temperatura para a determinação de parâmetros clínicos

Na escolha de parâmetros da irradiação *laser* para qualquer aplicação clínica em Odontologia, um dado importante a ser considerado é a temperatura atingida na polpa e nos tecidos periodontais adjacentes no momento das irradiações, com o intuito de se evitar riscos e eventuais danos a estes tecidos quando os resultados permitirem que se passe para pesquisas clínicas.

Por tratar-se de um tecido conectivo altamente vascularizado e indiferenciado, a polpa é um tecido altamente susceptível às variações térmicas, as quais influenciam sua microvascularização, a ativação celular (para a formação de dentina reacional com a ativação dos odontoblastos), hidratação e defesa^{98,99}. Os tecidos duros dentais, por sua vez, são pobres condutores de calor e, assim, são considerados verdadeiros isolantes térmicos¹⁰⁰. O esmalte e a dentina absorvem fracamente fótons dos comprimentos de onda das regiões do visível e do infravermelho próximo, o que promove a distribuição da energia em um grande volume de tecido e, desta forma, a difusão para o interior do tecido pulpar torna-se facilitada¹⁰¹. As características térmicas do esmalte e da dentina¹⁰¹, de fundamental importância para o entendimento dos fenômenos de propagação de calor, são listadas na tabela a seguir.

TABELA 2: Parâmetros térmicos de esmalte e dentina¹⁰¹.

<i>Tecido</i>	<i>Densidade</i> (g/cm ³)	<i>Calor específico</i> (cal/g.°C)	<i>Condutividade</i> <i>térmica</i> (cal/s.cm.°C)	<i>Difusibilidade</i> <i>térmica</i> (cm ² /s)
Esmalte	2,8	0,17	2,23 x 10 ⁻³	4,69 x 10 ⁻³
Dentina (perpendicularmente aos túbulos)	1,96	0,38	1,39 x 10 ⁻³	1,87 x 10 ⁻³
Dentina (paralelamente aos túbulos)	1,96	0,38	1,36 x 10 ⁻³	1,83 x 10 ⁻³

Há muito se discute os efeitos deletérios do calor, decorrentes dos mais diversos procedimentos odontológicos, sobre a polpa e os tecidos periodontais. O respeito aos limites de temperatura determinados pelo clássico trabalho de Zach e Cohen (1965).¹⁰² com macacos *Rhesus* ainda é imperioso para a determinação dos parâmetros *laser*. Naquele estudo, foram descritas mudanças pulpare reversíveis em aumentos de temperatura ao redor de 3,3° C; aumentos de temperatura pulpar superiores a 5,6° C são considerados potencialmente perigosos para a vitalidade da mesma, quando se demonstrou haver danos irreversíveis em 15% dos casos, enquanto que aumentos da ordem de 16° C resultam em completa necrose pulpar. Portanto, aumentos de temperatura acima destes valores são considerados simplesmente inaceitáveis. Posteriormente, em 1997, um estudo histológico realizado em humanos.⁹⁹ revelou não haver evidências de necrose ou de reparação pulpar em dentes submetidos a temperaturas de até 50,4° C; um experimento complementar confirmou que tal elevação *in vivo* corresponde a uma elevação de 11,2° C *in vitro*, sendo este o limite aceitável para os próximos trabalhos.

Tendo em vista que os efeitos dos *lasers* de alta intensidade são em sua maioria fototérmicos e fotoacústicos, torna-se imprescindível o conhecimento da transmissibilidade deste calor gerado para o interior do dente. Os primeiros fatores a serem considerados são aqueles relacionados com o tecido a ser irradiado.⁵⁰, tais como a espessura do tecido.¹⁰³, a massa total do dente e os coeficientes de absorção para cada comprimento de onda.⁶⁴, conforme descrito em item anterior. Neste contexto, a dentina é o tecido de maior preocupação, por tratar-se de um tecido de baixa condutividade térmica.¹⁰¹ que oferece maiores riscos à polpa à medida que se trabalha em profundidade, pois a área dos túbulos dentinários aumenta com a profundidade deste tecido.¹⁰⁴. Exemplificando, para os *lasers* de CO₂, o coeficiente de absorção para dentina é menor do que para esmalte devido ao seu menor conteúdo mineral; a difusibilidade térmica é cerca de três vezes menor, levando a uma menor taxa de dissipação de calor e, portanto, a maiores aquecimentos pulpares.¹⁰⁵.

A região do elemento dental onde a irradiação *laser* vai ser aplicada também merece considerações. Estudos prévios demonstraram que locais onde

os túbulos dentinários se dispõem de forma paralela à superfície transmitem menor calor à polpa quando comparados àqueles locais em que os túbulos apresentam-se de forma perpendicular ao feixe *laser* (e também perpendicular à polpa), os quais aumentam a condutividade do calor.¹⁰⁴ Assim, os efeitos térmicos da irradiação *laser* são potencializados se o *laser* irradia o terço cervical, em detrimento do que ocorre na superfície oclusal.

Estudos anteriores realizados por White *et al.* (1994)¹⁰³ indicaram que a espessura da dentina é fator fundamental na propagação de calor para a polpa, tendo uma relação direta com o aumento de temperatura intrapulpar e a subsequente reação histológica. Neste estudo, utilizando o mesmo *laser* (Nd:YAG) e os mesmos parâmetros em diferentes espessuras de dentina, os autores obtiveram elevações de temperatura de 43,2° C em amostras com espessura de 0,2 mm, contrapondo elevações de 5,8° C em amostras de 2,0 de espessura. Estes resultados demonstram a importância de se considerar o remanescente tecidual no momento das irradiações. Vale ressaltar que os estudos *in vitro* utilizam-se de dentes hígidos e, portanto, os valores de temperatura atingidos podem variar se um dente estiver cariado, pois a quantidade de água em tecido cariado é maior e, assim, pode influenciar na transmissão do calor.

Parâmetros da irradiação *laser*, tais como comprimento de onda, modo de operação (contínuo ou pulsado), modo de irradiação (contato ou não contato), largura temporal dos pulsos e taxa de repetição são também essenciais para a determinação de um *laser* para uma aplicação clínica.^{50, 105, 106} Um estudo realizado em 1993 com *lasers* de diversos comprimentos de onda constatou que os efeitos na temperatura pulpar podem estar diretamente relacionados com a potência, tamanho do feixe, fluência e, principalmente, com o comprimento de onda.¹⁰⁶ Estudos posteriores confirmaram que a transmissão dos vários comprimentos de onda para o interior dos tecidos duros dentais é o fator de mais fundamental importância a ser considerado para a determinação das aplicações clínicas dos *lasers*. Desta forma, os *lasers* de érbio, por sua intensa interação com o tecido duro dental, aparentam ser os mais vantajosos em termos de efeitos térmicos para a polpa e tecidos periodontais. Entretanto, estudos recentes

mostram que especial cuidado deve ser tido mesmo com os *lasers* de érbio, quando o fator mais importante a ser considerado é a taxa de repetição para a determinação do calor acumulado.^{90,107} Quanto maior a taxa de repetição e a fluência, maiores serão os aumentos de temperatura na polpa. O tempo de exposição do tecido à irradiação também deve ser considerado, pois altas fluências aplicadas por pequenos períodos de tempo causam menores danos à polpa.¹⁰⁰

Fatores dependentes do ambiente também são modificadores, tais como a presença de refrigeração oriunda do próprio equipamento e de umidade (saliva). O emprego de sistemas de refrigeração, como spray ar-água e cânulas de aspiração, é importante para a redução da propagação de calor. O spray de água durante as irradiações permite a limpeza das áreas a serem irradiadas, promove o processo de ablação e aumenta a eficiência da ablação.¹⁰⁸ Burkes *et al.* (1992).¹⁰⁹ demonstraram que se os tecidos duros dentais são irradiados com *laser* de Er:YAG acompanhados por uma fina camada de água, não apenas a temperatura pulpar pode ser diminuída, como também a eficiência de corte é aumentada pois o processo de ablação é potencializado, fato que também foi demonstrado por outros autores.¹⁰⁸ A taxa de refrigeração, definida como razão entre a quantidade de água (em mL) pelo tempo (em minutos), deve ser estritamente controlada pois o excesso de água pode prejudicar a interação dos *lasers* com os tecidos.¹¹⁰ É importante enfatizar, entretanto, que a utilização dos *lasers* de érbio para prevenção da cárie requer ausência de refrigeração, pois se evita a ablação e o procedimento preventivo se torna mais eficiente.^{111,112}

Outro artifício que pode ser empregado durante a irradiação *laser* para a redução da transmissão de calor para o tecido pulpar é a aplicação de substâncias fotoabsorvedoras.^{84,113} Tais substâncias, preferencialmente de cor negra ou escura, tiveram bastante destaque com os *lasers* de Nd:YAG.^{16,84} e Ho:YLF.¹⁰⁰, *lasers* de pouca absorção e grande transmissão pelo esmalte. Tendo em vista que a cor preta absorve todos os comprimentos de onda, a aplicação destas substâncias visa aumentar a absorção do feixe *laser* a poucos micrometros da superfície, evitando a excessiva penetração do feixe para o interior dos tecidos dentais, minimizando a propagação do calor e os riscos de

injúrias pulpare¹¹³. Outros corantes também podem ser empregados, tais como evidenciadores químicos de cárie que utilizam o corante *acid red 52*, extremamente eficientes para os *lasers* de KTP (de comprimento de onda de 532 nm).¹¹⁴.

Os estudos com enfoque nos aumentos de temperatura decorrentes da irradiação *laser* iniciaram-se já na década de 60 com os *lasers* de rubi. Com a demonstração de que este *laser* poderia causar mudanças degenerativas severas nas polpas de dentes de hamsters, diversos comprimentos de onda foram testados, e sempre os estudos de temperatura, sejam eles *in vitro* ou *in vivo*, se fazem presentes. Com o *laser* de Er,Cr:YSGG, embora seja um *laser* de recentes pesquisas.^{115, 116}, isto não é diferente. Em um primeiro estudo *in vivo*, realizado com cães e coelhos, observou-se que preparos cavitários realizados com *laser* com fluências acima de 22,6 J/cm², mesmo com exposição pulpar, não levaram a reações inflamatórias ou necrose.¹¹⁵. Mais tarde, tais resultados foram confirmados por outro estudo.¹¹⁶, também com cães, quando se reportou ausência de inflamação pulpar e ausência de elevações de temperatura nas cúspides no momento das irradiações com *laser* com 68,2 J/cm². Estudos para verificar as temperaturas durante as irradiações intra-radiculares foram realizados posteriormente.¹¹⁷, quando se verificou que fluências acima de 56,6 J/cm² poderiam ser perigosos para osso e ligamento periodontal.

Vários métodos de quantificação das temperaturas pulpare^s *in vitro* têm sido descritos, incluindo radiometria, a termografia no infravermelho, as mensurações com termopares utilizando-se dentes seccionados e a utilização de termopares utilizando-se de dentes inteiros. A medida com termopares de resposta rápida oferece a possibilidade de mensurar temperaturas com resolução de 0,1° C ou melhor, além de possibilitar o uso de dentes inteiros, o que simula com muito mais propriedade a situação *in vivo* e possibilita o preenchimento da câmara pulpar com substâncias com propriedades similares à polpa, pois a condutividade e a capacidade térmica do dente com a câmara pulpar vazia é consideravelmente diferente daquele com câmara pulpar com preenchimento.¹¹⁸.

A técnica de monitoramento da temperatura por câmera termográfica (descrita na literatura como termografia no infravermelho) permite o

monitoramento de forma não invasiva das mudanças de temperatura de todos os tecidos envolvidos na irradiação *laser*, além de permitir a visualização da propagação do calor pelos tecidos e os registros de temperatura neles com o decorrer do tempo. Sua principal vantagem é a de possibilitar medidas de temperatura superficial em grandes áreas, permitindo, também, a investigação e a identificação dos pontos de temperatura extrema. A precisão deste sistema advém da emissividade do material que está sendo analisado (a medida da radiação emitida por um objeto comparativamente à emitida por um corpo negro), além de outros fatores que devem ser conhecidos, tais como a temperatura ambiente, a umidade relativa e a distância entre o objeto e a lente.¹¹⁹

Tendo em vista a carência de estudos que determinem a viabilidade dos parâmetros sub-ablativos do *laser* de Er,Cr:YSGG sem refrigeração, ambas as técnicas descritas acima foram empregadas no presente estudo com o intuito de se verificar a viabilidade da utilização clínica dos parâmetros selecionados. A partir de então, os parâmetros foram testados quanto ao potencial de redução da perda mineral e de maximizar a retenção de flúor, buscando-se respostas para as divergências encontradas na literatura.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Delineamento experimental

Este trabalho é composto de duas partes: na primeira, os parâmetros do *laser* de Er,Cr:YSGG foram determinados de forma a serem potencialmente seguros para uma futura aplicação clínica; na segunda parte, os efeitos dos parâmetros selecionados, associados ou não à aplicação de flúor fosfato acidulado, foram avaliados para sua aplicação para prevenção da cárie. As tabelas a seguir descrevem o delineamento experimental empregado nas duas partes que compõem este estudo.

Tabela 3: Delineamento experimental para a Parte 1.

Fatores em estudo	1. Tecido	<u>1 Nível</u> esmalte
	2. Condição de irradiação	<u>3 Níveis</u> a. 2,8 J/cm ² b. 5,6 J/cm ² c. 8,5 J/cm ²
	3. aplicação de carvão	<u>2 Níveis</u> Sem aplicação Com aplicação
Unidades	Dentes terceiros molares humanos	
Variável resposta	Morfologia superficial Temperatura superficial (° C) Temperatura pulpar (° C)	

Para a **Parte 1**, a qual visa a determinação de parâmetros laser para prevenção da cárie, os fatores sob avaliação foram tecido, fluência laser e aplicação de fotoabsorvedor (pasta de pó de carvão). Foram realizadas as análises de microscopia eletrônica de varredura (7 dentes; n = 4), análise de temperatura superficial (12 dentes; n = 4) e análise de temperatura pulpar (60 dentes, n = 10). Para esta parte, foram definidos seis grupos experimentais, quando as diferentes fluências laser foram associadas ou não à aplicação de fotoabsorvedor.

Para a **Parte 2**, a qual visa a determinação dos efeitos quando os parâmetros selecionados são empregados para prevenção da cárie, os fatores sob avaliação foram tecido, fluência laser, aplicação de fotoabsorvedor e aplicação tópica de flúor (FFA). Nesta parte, foram realizadas as análises da perda mineral (70 dentes, $n = 10$), análises de cálcio, fósforo inorgânico e flúor das soluções desmineralizantes e remineralizantes ($n = 10$) e análise de flúor fracamente e fortemente ligado (70 dentes, $n = 10$). Nesta fase, foram definidos 14 grupos experimentais, quando as diferentes fluências laser foram associadas ou não à aplicação de fotoabsorvedor e também associadas ou não à aplicação de FFA; estes grupos foram comparados aos grupos controle positivo (apenas a aplicação de FFA) e controle negativo (sem tratamento).

Tabela 4: Delineamento experimental para a Parte 2.

Fatores em estudo	1. Tecido	<u>1 Nível</u> esmalte
	2. Condição de irradiação	<u>3 Níveis</u> a. 2,8 J/cm ² b. 5,6 J/cm ² c. 8,5 J/cm ²
	3. aplicação de carvão	<u>2 Níveis</u> Sem aplicação Com aplicação
	4. aplicação de FFA	<u>2 Níveis</u> Sem aplicação Com aplicação
Unidades experimentais	Blocos de esmalte de 3 x 3 mm de dentes terceiros molares humanos	
Variável Resposta	Perda mineral (Delta Z) Dissolução de cálcio em solução (mM Ca) Dissolução de fósforo inorgânico em solução (mM Pi) Dissolução de flúor em solução (µg F ⁻ /mL) Formação de fluoreto fracamente ligado (µg F ⁻ /cm ²) Formação de fluoreto fortemente ligado (ppm)	

A figura a seguir ilustra o delineamento experimental deste trabalho.

FIGURA 6: Esquema do delineamento experimental do presente trabalho.

4.2. Amostras

Para este estudo, foram utilizados 219 dentes terceiros molares humanos hígidos, cedidos pelo Banco de Dentes Humanos da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (APÊNDICE A) após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa do IPEN/CNEN-SP (Protocolo 094 – APÊNDICE B). Após a cessão, os dentes foram mantidos individualmente em frascos de vidro limpos com tampa, com algodão estéril levemente umedecido com água destilada e deionizada, sob refrigeração a $+ 4^{\circ}\text{C}$, durante todos os experimentos.

Antes de sua utilização, os dentes foram examinados minuciosamente com auxílio de lupa estereoscópica com aumento de 10X (Nikon Inc. Instrument Group, NY, USA) com o intuito de verificar eventuais trincas ou lesões de mancha branca. Os que continham qualquer defeito estrutural foram excluídos. Os dentes foram, então, lavados com água destilada e deionizada e detergente, quando houve a remoção de eventuais restos orgânicos e cálculos. Após, os mesmos tiveram profilaxia realizada com pedra pomes livre de flúor (SS White, RJ, Brasil) e água destilada e deionizada, com escova Robinson® (KG Sorensen, SP, Brasil) em baixa rotação, durante 1 minuto, a qual foi substituída a cada 10 amostras.

Os dentes foram, então, separados aleatoriamente entre quatro grandes grupos, conforme as análises a serem realizadas: 7 dentes destinados à análise morfológica, 12 dentes destinados à análise de temperatura superficial, 60 dentes destinados à análise de temperatura pulpar e 140 dentes destinados às análises para determinação dos efeitos da irradiação *laser* para prevenção da cárie.

O preparo das amostras a serem utilizadas foi realizado de forma distinta para cada experimento deste estudo, conforme será descrito posteriormente.

4.3. Parâmetros do *laser* de Er,Cr:YSGG

As irradiações das amostras foram realizadas utilizando-se *laser* de Er,Cr:YSGG (Millenium, Biolase, San Clemente, USA), do Laboratório de Biofotônica do IPEN/CNEN-SP – processo CEPID-FAPESP 98/14270-8, de comprimento de onda de $2,79\text{ }\mu\text{m}$, largura de pulso entre 140 e $200\text{ }\mu\text{s}$, taxa de

repetição de 20 Hz, com potência média ajustável entre 0 a 6 W e energia por pulso de até 300 mJ. A irradiação *laser* é, neste trabalho, entregue por um sistema de fibra óptica com ponta de safira (tipo S 75), de diâmetro de 750 μm e comprimento de 6 mm. Em todos os experimentos, a ponta de safira foi posicionada a 1 mm de distância da superfície dental. Há uma luz guia vermelha, a qual indica a focalização do *laser*.

Considerando-se que o emprego do *laser* de Er,Cr:YSGG para prevenção da cárie dental não deva promover alterações morfológicas prejudiciais ao esmalte irradiado, foram selecionadas, para o presente estudo, fluências, ou densidades de energia, consideradas sub-ablativas, ajustáveis no equipamento utilizado, a saber:

- ❖ 2,8 J/cm², 12,5 mJ por pulso, potência média de 0,25 W;
- ❖ 5,6 J/cm², 25,0 mJ por pulso, potência média de 0,50 W;
- ❖ 8,5 J/cm², 32,5 mJ por pulso, potência média de 0,75 W.

Todas as irradiações foram realizadas com ausência de refrigeração (0% de ar e 0% de água). Os grupos de tratamento variaram de acordo com os experimentos do presente estudo, e serão descritos posteriormente. No momento das irradiações, a energia emitida foi verificada por um medidor de potência (Coherent FieldMaster GS + Detetor LM45; Coherent, CA, USA) a cada três amostras irradiadas, cujas médias se encontram descritas na tabela a seguir.

TABELA 5: Energias medidas previamente às irradiações para as diferentes análises do presente trabalho.

Fluência	Energia por pulso calculada	Energia por pulso medida			
		Análise morfológica	Análise de temperatura superficial	Análise de temperatura pulpar	Análise de perda mineral
2,8 J/cm ²	12,5 mJ	14,0 mJ	13,5 mJ	11,0 mJ	12,0 mJ
5,6 J/cm ²	25,0 mJ	26,0 mJ	25,0 mJ	24,5 mJ	24,5 mJ
8,5 J/cm ²	37,5 mJ	39,0 mJ	36,0 mJ	32,2 mJ	36,0 mJ

FIGURA 7: A - equipamento *laser* utilizado no presente trabalho; B – detalhe da ponta de safira empregada na irradiação das amostras.

4.4. Características do fotoabsorvedor (carvão)

Visando aumentar a absorção do *laser* na superfície do esmalte e evitar a penetração excessiva do mesmo para áreas mais profundas do dente, uma película de fotoabsorvedor foi aplicada previamente às irradiações em alguns grupos deste estudo. O fotoabsorvedor empregado consistiu de uma pasta de pó de carvão vegetal, o qual foi obtido com a trituração do carvão com grau e pistilo de cerâmica durante 20 minutos, resultando em partículas de tamanho médio de 16 μm . Estas partículas foram diluídas em etanol 50%¹⁶, de forma a formar uma pasta homogênea (FIG.8). Os dados inerentes à distribuição das partículas de carvão na pasta estão presentes na FIG. 9.

A aplicação do fotoabsorvedor foi realizada imediatamente antes das irradiações, com pincel #1 sobre toda a área a ser irradiada, consistindo em uma camada homogênea de aproximadamente 100 μm sobre a superfície, o que foi estimado por microscopia óptica, sem a formação de eventuais aglomerados que pudessem interferir na interação da irradiação *laser* com o esmalte dental.

FIGURA 8: Pasta de pó de carvão aplicada sobre as amostras previamente às irradiações: A – para amostras destinadas à análise de temperatura pulpar; B – para amostras destinadas à submissão do desafio cariogênico *in vitro*.

FIGURA 9: Distribuição do tamanho das partículas de carvão na pasta.

4.5. Características do flúor (FFA)

A interação da irradiação *laser* com fluoreto foi testada através de sua associação com a aplicação tópica de flúor fosfato acidulado (FFA), quando foi empregado o gel Flúor Gel (Dentsply, Petrópolis, Brasil), 1,23% de flúor, 0,1 M de ácido fosfórico e pH 3,6 a 3,9.

Nas amostras dos grupos com aplicação tópica de flúor fosfato acidulado, tal aplicação deu-se imediatamente após as irradiações das amostras. O gel foi aplicado excessivamente com auxílio de cotonete sobre a superfície do esmalte e mantido em repouso por 4 minutos¹²⁰. Decorrido este tempo, o gel foi removido através do enxágüe com água destilada e deionizada por 1 minuto, sendo as amostras secas com papel absorvente logo após e mantidas em

ambiente úmido até seu preparo para ciclagem de pH.

FIGURA 10: Gel de flúor fosfato acidulado utilizado no presente trabalho e sua aplicação sobre as amostras destinadas à submissão ao desafio cariogênico *in vitro*.

4.6. Parte 1 - Verificação dos possíveis parâmetros *laser* para prevenção da cárie

4.6.1. Análise morfológica

Para esta análise, foram selecionados 7 dentes humanos, quando, de cada elemento, foram obtidos 4 blocos de esmalte de dimensões de 3 x 3 x 3 mm, utilizando-se as superfícies mesial, distal, vestibular e lingual. Os blocos foram obtidos através de corte por disco diamantado sob refrigeração (Isomet, Buehler, IL, USA) e, após o preparo, as amostras foram mantidas em ambiente úmido sob refrigeração, conforme descrito anteriormente. As 28 amostras assim obtidas foram divididas aleatoriamente em 7 grupos (n = 4), a saber:

- ❖ **Grupo MEV 1:** amostras não irradiadas (controle);
- ❖ **Grupo MEV 2:** amostras irradiadas com fluência de 2,8 J/cm², sem fotoabsorvedor;
- ❖ **Grupo MEV 3:** amostras irradiadas com fluência de 2,8 J/cm², com fotoabsorvedor;
- ❖ **Grupo MEV 4:** amostras irradiadas com fluência de 5,6 J/cm², sem fotoabsorvedor;
- ❖ **Grupo MEV 5:** amostras irradiadas com fluência de 5,6 J/cm², com

fotoabsorvedor;

- ❖ **Grupo MEV 6:** amostras irradiadas com fluência de $8,5 \text{ J/cm}^2$, sem fotoabsorvedor;
- ❖ **Grupo MEV 7:** amostras irradiadas com fluência de $8,5 \text{ J/cm}^2$, com fotoabsorvedor.

Após as irradiações, as amostras foram submetidas à lavagem ultrassônica (Thornton T7, Unique, Indaiatuba, Brasil) por 10 minutos, visando a remoção de eventuais partículas de carvão remanescentes. Em seguida, as amostras foram fixadas em solução de Glutaraldeído 2% durante 2 horas e lavadas com solução Tampão Fosfato 0,1 M (3 lavagens de 5 minutos cada). Posteriormente, as amostras foram deixadas em Tampão Ósmio por 20 minutos, lavadas em seguida com Tampão Fosfato 0,1 M (3 lavagens de 5 minutos cada) e desidratadas em soluções de concentrações crescentes de álcool (30%, 50%, 70%, 90%, 96% e 100%), com duas lavagens de 5 minutos em cada solução.

Após a desidratação, as amostras foram fixadas em HMDS (Hexamethyldisilazane) por 20 minutos e secas em capela por 2 horas. Então, as amostras foram coladas em suportes metálicos apropriados (*stubs*) com auxílio de cola prata condutora, onde foi depositado um filme fino de ouro (de espessura aproximada de $10 \text{ }\mu\text{m}$) sobre as mesmas por 120 segundos com o equipamento Sputter Coater, TEC SCD050, Bal Tec, Zurich, Ge. Até o momento das análises, as amostras foram mantidas em dessecador. As amostras foram examinadas em Microscópio Eletrônico de Varredura Phillips XR 30, Eindhoven, Holland, do Centro de Ciência e Tecnologia de Materiais do IPEN/CNEN-SP.

4.6.2. Análise de temperatura superficial

Para a análise de temperatura de superfície do esmalte durante as irradiações, foram utilizados 12 dentes terceiros molares humanos. Após limpeza e profilaxia, conforme descrito anteriormente, os dentes foram seccionados longitudinalmente, no sentido ocluso-apical, com disco diamantado sob refrigeração (Isomet, Buehler, IL, USA), quando cada dente originou 2 amostras. As faces seccionadas foram planificadas com lixa de granulação #600 (Carbimed Paper Discs, 30-5108-320, Buehler, IL, USA), sendo as amostras mantidas em ambiente úmido sob refrigeração até o momento das análises.

As 24 amostras obtidas foram divididas em seis grupos propostos ($n = 4$), a saber:

- ❖ **Grupo TS 1:** amostras irradiadas com fluência de $2,8 \text{ J/cm}^2$, sem fotoabsorvedor;
- ❖ **Grupo TS 2:** amostras irradiadas com fluência de $2,8 \text{ J/cm}^2$, com fotoabsorvedor;
- ❖ **Grupo TS 3:** amostras irradiadas com fluência de $5,6 \text{ J/cm}^2$, sem fotoabsorvedor;
- ❖ **Grupo TS 4:** amostras irradiadas com fluência de $5,6 \text{ J/cm}^2$, com fotoabsorvedor;
- ❖ **Grupo TS 5:** amostras irradiadas com fluência de $8,5 \text{ J/cm}^2$, sem fotoabsorvedor;
- ❖ **Grupo TS 6:** amostras irradiadas com fluência de $8,5 \text{ J/cm}^2$, com fotoabsorvedor.

Tanto a fibra do *laser* de Er,Cr:YSGG quanto as amostras foram posicionadas em suportes ópticos, de forma que ambos permanecessem estáticos durante todo o experimento. A fibra do *laser* foi posicionada perpendicularmente à superfície oclusal das amostras a 1 mm de distância, tangenciando as faces seccionadas das mesmas, de forma que fosse possível a visualização da propagação do calor da superfície para o interior da amostra.

A

B

FIGURA 11: (a) Conjunto fibra-amostra posicionado para análise de temperatura superficial; (b) equipamento de câmera termográfica utilizado no presente estudo.

Após a aplicação ou não do fotoabsorvedor, as irradiações foram realizadas em um único ponto durante 5 segundos, e o monitoramento da temperatura deu-se por um tempo total de 20 segundos, visando a obtenção de uma curva característica para o declínio de temperatura em função do tempo.

As análises foram realizadas utilizando-se uma câmera termográfica (ThermaCam FLIR SC3000 Systems, Boston, USA), do Laboratório de Biofotônica do IPEN/CNEN-SP, processo CEPID-FAPESP 98/14270-8. A câmera termográfica capta imagens no infravermelho e gera diferentes tons de cinza ou cores correspondentes a diferentes valores de temperatura, em cada pixel da imagem, como as imagens de um filme contínuo. Estas imagens demonstram o padrão de dissipação de calor e variação de temperatura entre os tecidos dentais. Esta câmera é dotada de um detector do tipo *Quantum Well Infrared Photodetector* (QWIP) refrigerado a 70 K, capaz de registrar temperaturas na faixa de -20°C a 2000°C , com variação de $\pm 1^{\circ}\text{C}$.

Os experimentos foram realizados em temperatura controlada de 25°C , umidade relativa do ar de 47% e considerando a emissividade do dente igual a 0,91.¹¹⁹ A área de interesse foi isolada a uma distância focal de 10 cm, com o auxílio de lentes apropriadas. As imagens foram obtidas com resolução de $0,01^{\circ}\text{C}$, utilizando-se frequências de 60 Hz e 900 Hz, buscando uma melhor definição das imagens e melhor detecção das variações de temperatura.

Para a análise das amostras do presente estudo, foram selecionados dois pontos: o primeiro localizado na superfície do esmalte, imediatamente abaixo da fibra do *laser* (SPOT 1), o qual foi considerado para a determinação da temperatura da superfície do esmalte; um segundo ponto, cerca de 4 mm abaixo deste ponto, foi denominado (SPOT 2), e correspondeu ao limite dentina-câmara pulpar. Este ponto foi utilizado para estimar a temperatura no teto da câmara pulpar, a qual foi mais bem analisada posteriormente com a utilização de termopares de resposta rápida.

FIGURA 12: A – Identificação dos componentes da imagem em infravermelho obtida com o posicionamento amostra-fibra; B – identificação dos pontos de análise (SPOT 1 e SPOT 2) utilizados neste estudo.

4.6.3. Análise de temperatura pulpar

Para esta análise, foram separados 60 dentes terceiros molares humanos. Estes elementos tiveram seus ápices radiculares lixados por 10 segundos com lixa de granulação 600 (Carbimed Paper Discs, 30-5108-320, Buehler, IL, USA), de forma a expor um maior diâmetro de seus forames apicais. Estes, por sua vez, foram abertos com instrumento rotatório tipo Gates-Glidden, a remoção de restos pulpare e limpeza completa de seus condutos radiculares e da câmara pulpar foi realizada por meio de limas endodônticas tipo K #80 com auxílio de água destilada.

Pela abertura apical, foi introduzida a pasta térmica (Implastec, Votorantim, Brasil), de condutividade térmica equivalente a $0.4 \text{ cal s}^{-1} \text{ m}^{-1} \text{ K}^{-1}$, com auxílio de seringas descartáveis, o que permitiu o preenchimento completo da câmara pulpar e dos condutos radiculares dos elementos. Em seguida, foram introduzidos termopares tipo K (chromel-alumel – NiCr-NiAl, Omega Eng. Inc., Stamford, USA), com espessura de $127 \text{ }\mu\text{m}$ e resolução de $0,2^\circ \text{ C}$, de forma que sua extremidade coincidisse com o teto da câmara pulpar, o que foi monitorado radiograficamente. A porção apical das raízes foi selada com resina composta (Z100, 3M ESPE, SP, Brasil), a qual foi fotoativada por 40 segundos (Optilight Plus, Gnatus, SP, Brasil), visando evitar a entrada de água para o interior dos condutos.

FIGURA 13: Esquema de posicionamento da amostra, do termopar e pasta térmica no interior do banho térmico para medida de temperatura.

As 60 amostras assim obtidas foram divididas aleatoriamente em 6 grupos ($n = 10$):

- ❖ **Grupo TP 1:** amostras irradiadas com fluência de $2,8 \text{ J/cm}^2$, sem fotoabsorvedor;
- ❖ **Grupo TP 2:** amostras irradiadas com fluência de $2,8 \text{ J/cm}^2$, com fotoabsorvedor;
- ❖ **Grupo TP 3:** amostras irradiadas com fluência de $5,6 \text{ J/cm}^2$, sem fotoabsorvedor;
- ❖ **Grupo TP 4:** amostras irradiadas com fluência de $5,6 \text{ J/cm}^2$, com fotoabsorvedor;
- ❖ **Grupo TP 5:** amostras irradiadas com fluência de $8,5 \text{ J/cm}^2$, sem fotoabsorvedor;
- ❖ **Grupo TP 6:** amostras irradiadas com fluência de $8,5 \text{ J/cm}^2$, com fotoabsorvedor.

Durante a realização das análises, as amostras foram posicionadas em banho térmico com temperatura controlada a $37 \pm 1^\circ \text{ C}$ (Precision Scientific Co., Chicago, USA), de forma que somente as raízes estivessem submersas, fato que simularia a temperatura corporal. Os termopares foram, então, conectados a um sistema de monitoração de temperatura composto de um amplificador, um conversor de sinais, um registrador, com resolução temporal de 0,05 segundos

(Lock-in Amplifier SR510, Stamford Research Systems, CA, USA) e um computador pessoal (Notebook Key Note Force, Notebook Computer, Tawan).

FIGURA 14: Equipamento utilizado para realização de medidas de temperatura intrapulpar, composto de amplificador, conversor de sinais, banho térmico e computador para análise de dados.

As irradiações foram realizadas manualmente sob a forma de varredura durante 30 segundos, sobre toda a superfície oclusal das amostras, visando a aproximação de um procedimento clínico. Desta forma, foi possível avaliar os eventuais danos que poderiam ocorrer em uma exposição mais prolongada ao *laser*. A temperatura pulpar foi monitorada durante todo o período de irradiação.

4.7. Parte 2 - Determinação dos efeitos da irradiação *laser* para prevenção da cárie

A partir dos 140 dentes terceiros molares humanos restantes, foram obtidas 280 amostras de esmalte de 3 x 3 x 3 mm através do seccionamento das superfícies vestibular e lingual com disco diamantado sob refrigeração (Isomet, Buehler, IL, USA). Após o seccionamento, as amostras foram limpas com pasta de pedra-pomes livre de flúor (SS White, RJ, Brasil) e água destilada e deionizada e escova tipo *Robinson*[®] (KG Sorensen, SP, Brasil) em baixa rotação por 10 segundos.

As amostras foram, então, separadas aleatoriamente entre os grupos propostos para as próximas análises e mantidas individualizadas em frascos hermeticamente fechados, em ambiente úmido sob refrigeração a + 4° C,

com algodão estéril levemente umedecido com água destilada e deionizada, até o momento dos tratamentos.

As 280 amostras de esmalte foram aleatoriamente separadas em 14 grupos (n = 20):

- ❖ **Grupo PM 1:** amostras não irradiadas (controle);
- ❖ **Grupo PM 2:** as amostras receberam apenas a aplicação tópica de flúor fosfato acidulado;
- ❖ **Grupo PM 3:** amostras irradiadas com fluência de $2,8 \text{ J/cm}^2$;
- ❖ **Grupo PM 4:** amostras irradiadas com fluência de $2,8 \text{ J/cm}^2$, com fotoabsorvedor;
- ❖ **Grupo PM 5:** as amostras foram irradiadas com fluência de $2,8 \text{ J/cm}^2$ e, em seguida, houve a aplicação de flúor fosfato acidulado;
- ❖ **Grupo PM 6:** as amostras foram irradiadas com fluência de $2,8 \text{ J/cm}^2$, com a presença de fotoabsorvedor e, em seguida, houve a aplicação de flúor fosfato acidulado;
- ❖ **Grupo PM 7:** amostras irradiadas com fluência de $5,6 \text{ J/cm}^2$;
- ❖ **Grupo PM 8:** amostras irradiadas com fluência de $5,6 \text{ J/cm}^2$, com fotoabsorvedor;
- ❖ **Grupo PM 9:** as amostras foram irradiadas com fluência de $5,6 \text{ J/cm}^2$ e, em seguida, houve a aplicação de flúor fosfato acidulado;
- ❖ **Grupo PM 10:** as amostras foram irradiadas com fluência de $5,6 \text{ J/cm}^2$, com a presença de fotoabsorvedor e, em seguida, houve a aplicação de flúor fosfato acidulado;
- ❖ **Grupo PM 11:** amostras irradiadas com fluência de $8,5 \text{ J/cm}^2$;
- ❖ **Grupo PM 12:** amostras irradiadas com fluência de $8,5 \text{ J/cm}^2$, com fotoabsorvedor.
- ❖ **Grupo PM 13:** as amostras foram irradiadas com fluência de $8,5 \text{ J/cm}^2$ e, em seguida, houve a aplicação de flúor fosfato acidulado;
- ❖ **Grupo PM 14:** as amostras foram irradiadas com fluência de $8,5 \text{ J/cm}^2$, com a presença de fotoabsorvedor e, em seguida, houve a aplicação de flúor fosfato acidulado.

Durante as irradiações, a fibra óptica do *laser* foi posicionada e mantida estática em suportes ópticos, com a ponta de safira mantida a 1 mm de

distância da superfície da amostra a ser irradiada, perpendicularmente à mesma.

As amostras foram posicionadas individualmente em um deslocador micrométrico automático de passo X-Y-Z (Model ESP300, Newport Corporation, CA, USA), de forma que as amostras pudessem ser deslocadas durante as irradiações com velocidade e distâncias entre pulsos padronizadas (velocidade de 6,0 mm/s e distância entre linhas de 200 μm), evitando-se os eventuais “espaços” entre os pulsos da irradiação *laser*. Após as irradiações, as amostras foram lavadas com água destilada e deionizada durante dez segundos, e secas com papel absorvente.

FIGURA 15: A – Deslocador micrométrico automático de passo X-Y-Z utilizado no presente estudo; B – detalhe do posicionamento fibra/amostra durante as irradiações.

4.7.1. Simulação do desafio cariogênico *in vitro*

Para a simulação do desafio cariogênico *in vitro*, houve a necessidade de padronização da área das amostras a serem desmineralizadas. Assim, para a delimitação da área de lesão de cárie¹²¹, foram confeccionadas máscaras de etiquetas auto-adesivas (Pimaco, RJ, Brasil) com auxílio de vazador de aço com diâmetro de 2 mm. As máscaras de 3,14 mm²^{121,122} foram posicionadas sobre a superfície das amostras secas com auxílio de pinça clínica e explorador para, em seguida, as amostras serem recobertas com duas camadas de esmalte ácido-resistente (esmalte de unhas) de cores fortes, facilitando a visualização de eventuais bolhas na aplicação do mesmo. Após a secagem do esmalte, a etiqueta foi removida e a área exposta foi submetida à limpeza com cotonetes umedecidos em água destilada e deionizada para remoção de resíduos

do adesivo proveniente das etiquetas, e as amostras foram observadas em lupa estereoscópica com aumento de 10 X (Nikon Inc. Instrument Group, NY, USA) para verificar a total remoção dos resíduos.

Logo após, as amostras foram posicionadas individualmente em hastes confeccionadas de fios ortodônticos de 0,8 mm de diâmetro (Morelli, SP, Brasil), com cera tipo 7 (Technew, São Paulo, Brasil). Estas hastes com as amostras foram finalmente presas nas tampas de tubos plásticos estéreis tipo Falcon de 50 mL (CralPlast, SP, Brasil) com auxílio de cola quente, individualizadas e identificadas, para possibilitar a ciclagem de pH. Esta conformação permitiu que cada amostra fosse ciclada independentemente.

FIGURA 16: Isolamento das amostras e exposição de área padronizada de 3,14 mm².

Para as ciclagens de pH, foram utilizados 1120 tubos tipo Falcon (4 tubos por amostra). Os tubos tiveram suas tampas perfuradas com auxílio de pontas diamantadas odontológicas (n. 1090, KG Sorensen, SP, Brasil) para a passagem dos fios ortodônticos, possibilitando que os mesmos fossem presos nas hastes horizontais de aço posicionadas sobre os suportes de acrílico. As amostras posicionadas permitiram, assim, que todas fossem removidas das soluções ao mesmo tempo.

FIGURA 17: Ciclagem de pH: A – suporte de acrílico confeccionado para os tubos tipo Falcon; B – tubos posicionados para ciclagem de pH.

A ciclagem de pH empregada no presente estudo foi definida em estudo piloto, quando foram produzidas lesões de cárie de profundidade de 80 μm ($\pm 10 \mu\text{m}$). Assim, as amostras foram submetidas à ciclagem de pH, sendo submersas por 3 h em solução desmineralizante - DES (20 mL por bloco), seguido por 21 h em solução remineralizante - RE (10 mL por bloco), sendo as amostras mantidas em temperatura constante de 37° C durante todo o experimento, exceto no intervalo de troca das soluções¹²¹. Nos intervalos entre as imersões, todas as amostras foram lavadas com jatos de água destilada e deionizada durante 10 segundos e secas com papel absorvente, sem pressioná-las. Os ciclos foram repetidos durante 10 dias consecutivos, sendo as soluções trocadas no quinto dia de ciclagem.

FIGURA 18: Diagramação da ciclagem de pH utilizada no presente estudo.¹²¹.

Para a ciclagem de pH, considerando-se as 280 amostras do presente estudo, foram preparados 24 litros de solução desmineralizante (DES) e 12 litros de solução remineralizante (RE), de acordo com o modelo proposto por Featherstone *et al.* (1986)¹²³, modificado por Argenta *et al.* (2003)¹²¹, sendo a solução desmineralizante constituída de 2,0 mM de cálcio, 2,0 mM de fosfato e 0,030 ppm de flúor em solução tampão de acetato 0,075 M com pH 4,3, e a solução remineralizante constituída de 1,5 mM de cálcio, 0,9 mM de fosfato, 150 mM de KCl e 0,050 ppm de flúor em 20 mM de tampão cacodilato em pH 7,4. Tais soluções foram preparadas e testadas no Laboratório de Bioquímica Oral da FOP – UNICAMP, onde tiveram seu pH ajustado e foram quimicamente testadas quanto à quantidade de cálcio, fósforo e flúor (TAB.4). As soluções para ciclagem de pH foram preparadas utilizando-se os reagentes:

- ❖ Nitrato de cálcio tetrahidratado $[\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}]$ – cálcio para ambas as soluções DES e RE – Merck S.A., São Paulo, Brasil;
- ❖ Sódio fosfato diidrato $[\text{Na}_2(\text{PO}_4) \cdot 2\text{H}_2\text{O}]$ – fosfato para ambas as soluções DES e RE - Merck S.A., São Paulo, Brasil;
- ❖ Padrão de flúor de 100 ppm – flúor para ambas as soluções DES e RE - ThermoOrion Inc., MA, USA;
- ❖ Ácido acético glacial $[\text{CH}_3\text{COOH}]$ – tampão acetato para a solução DES - Merck S.A., São Paulo, Brasil;
- ❖ Cloreto de potássio $[\text{KCl}]$ – para a solução RE - Merck S.A., São Paulo, Brasil;
- ❖ Ácido dimetilarsínico $[(\text{CH}_3)_2\text{As}(=\text{O})\text{ONa}]$ – tampão cacodilato para a solução RE - Merck S.A., São Paulo, Brasil.

Após as ciclagens, as amostras foram lavadas com água destilada e deionizada, secas com papel absorvente, removidas das hastes e armazenadas em frascos individuais em ambiente úmido sob refrigeração até o preparo para as análises posteriores. As soluções DES e RE utilizadas foram estocadas hermeticamente fechadas individualmente em local seco para posterior análise de cálcio, fósforo inorgânico e flúor.

TABELA 6: Quantidade de cálcio, fósforo inorgânico e flúor iniciais das soluções utilizadas para ciclagem de pHⁱ, dosadas por espectrometria de absorção atômica (cálcio), espectrofotometria (fósforo) e eletrodo seletivo (flúor).

<i>Solução</i>	<i>Elemento</i>	<i>Quantidade esperada</i>	<i>Quantidade medida</i>
Desmineralizante	Cálcio	80,0 µg / mL	76,9 µg / mL
	Fósforo	62,0 µg / mL	61,6 µg / mL
	Flúor	0,03 µg / mL	0,044 µg / mL
Remineralizante	Cálcio	60,0 µg / mL	54,5 µg / mL
	Fósforo	27,9 µg / mL	27,8 µg / mL
	Flúor	0,05 µg / mL	0,061 µg / mL

4.7.2. Análise da perda mineral

De todas as 280 amostras submetidas à ciclagem de pH, 140 amostras (n = 10) foram separadas para análise da perda mineral. A determinação da perda mineral foi realizada de acordo com a técnica proposta por Featherstone *et al.* (2003)¹²⁴, pelo teste de microdureza seccional, tendo em vista a alta correlação (0,91) existente entre a porcentagem de mineral medida por microrradiografia e a dureza do esmalte com lesão de cárie.

Cada amostra destinada a esta análise foi fixada em placa de acrílico de 4 x 4 x 1 cm com cera pegajosa em bastões (Kerr Corporation, CA, USA) e seccionada longitudinalmente por disco diamantado sob refrigeração (Isomet, Buehler, IL, USA), com um corte localizado próximo a uma das bordas das lesões, buscando-se preservar a integridade das mesmas o máximo possível. Em seguida, as lesões seccionadas foram embutidas em um disco de resina acrílica incolor termicamente ativada (Vipi Cril, SP, Brasil), com a face seccionada voltada para baixo, com auxílio de embutidora metalográfica PRE-30 (Arotec S.A.

ⁱ Quantidade utilizada dos reagentes para preparo das soluções - desmineralizante: 11,3352 g de Ca(NO₃)₂ 4 H₂O, 8,5392 g de Na₂(PO₄).2H₂O, 7,2 mL de solução 100 ppm F⁻ e 102,94 g de CH₃COOH; remineralizante: 4,2507 g de Ca(NO₃)₂ 4 H₂O, 1,922 g de Na₂(PO₄).2H₂O, 134,19 g de KCl, 6,0 mL de solução 100 ppm F⁻ e 52,9608 g de (CH₃)₂As(=O)ONa.

Ind. Com., SP, Brasil), do Laboratório de Bioquímica Oral da FOP-UNICAMP. Para o embutimento, os ciclos foram padronizados em 6 minutos de aquecimento, com pressão mantida entre 100-150 Kgf/cm², seguido por 9 minutos de resfriamento.

As amostras assim embutidas foram planificadas e polidas em lixadeira-politriz APL-4 (Arotec S.A. Ind. Com., SP, Brasil), com um dispositivo para tratamento simultâneo de 6 corpos de prova. Em todas as etapas foi utilizada baixa rotação. Para a planificação, foram empregadas lixas de granulação 400, 600 e 1200 (Carbimed Paper Discs, 30-5108-320, Buehler, IL, USA), com quatro pesos padrão de 86 g sobre cada corpo de prova, até a completa exposição das superfícies dos blocos dentais embutidos. O polimento foi realizado com pasta de polimento de diamante com granulação de 1 µm (METADI Diamond suspension, Color Polishing Water-spray base 40-6530, Buehler, IL, USA) e disco de papel feltro auto-adesivo (Polishing Cloth, METADI, Buehler 40-7618, IL, USA), sendo considerado satisfatório quando não foram observados riscos nas superfícies dos corpos de prova. A limpeza dos corpos de prova foi realizada com solução detergente (Ultramet sonic cleaning solution 75-5000-032, Buehler, IL, USA) diluída em água destilada e deionizada na proporção 1:20, em aparelho de ultrassom (Thornton T7, Unique, Indaiatuba, Brasil), durante 3 minutos; em seguida, as amostras foram enxaguadas com água destilada e deionizada por 1 minuto. Este procedimento padronizado foi realizado entre todas as etapas de acabamento e polimento.

Após o polimento, as amostras foram submetidas à análise de microdureza seccional utilizando-se o microdurômetro FMARS FM 7386 (Future Tech, Kawasaki, Japão), do Laboratório de Bioquímica Oral da FOP-UNICAMP. Em cada amostra, foram realizadas três seqüências de 12 indentações no meio do bloco de esmalte¹²¹, sendo que a primeira indentação foi feita a partir de 10 µm da borda da lesão, seguindo-se as distâncias de 20 µm, 30 µm, 40 µm, 50 µm, 60 µm, 70 µm, 80 µm, 100 µm, 120 µm, 140 µm e 160 µm. Entre as linhas, a distância padronizada foi de 100 µm, sendo todas as indentações realizadas com carga estática de 25 gramas durante 5 segundos¹²¹.

FIGURA 19: Disposição das indentações realizadas nas amostras de esmalte durante a análise de microdureza.¹²¹.

Os dados obtidos foram transportados para planilhas, onde foram calculadas as médias dos valores obtidos para, a partir destes dados, calcular-se o valor de conteúdo mineral (% vol.) utilizando-se a relação.¹²⁴: [conteúdo mineral = $4,3 \sqrt{KHN} + 11,3$], onde KHN (*Knoop hardness number*) é o número de dureza Knoop médio em cada uma das profundidades analisadas.

A plotagem de todos os dados obtidos permite o traçado de uma curva característica da lesão de cárie de cada amostra. Desta forma, é possível o cálculo do perfil mineral de cada amostra, correspondente à área sob esta curva.

O parâmetro Delta Z (ΔZ), correspondente à área de lesão de cárie, é calculado individualmente para cada amostra, e é relacionado com a profundidade de lesão. Para o seu cálculo, faz-se a projeção do perfil mineral da amostra considerada hígida, e a área sob a curva também é calculada. Assim, a perda mineral (Delta Z) corresponderá à diferença entre a área do esmalte hígido e a área do esmalte cariado (FIG. 20).

FIGURA 20: Ilustração do parâmetro Delta Z (ΔZ), correspondente à diferença da área da projeção de cada amostra hígida e a área da amostra cariada.

4.7.3. Análise da dissolução iônica durante o processo de cárie

Com o objetivo de avaliar o ganho ou a perda de mineral dos espécimes, foram determinadas as concentrações de cálcio, fósforo inorgânico e de flúor em cada uma das soluções desmineralizante (neste trabalho, será denominada “DES”) e remineralizante (neste trabalho, será denominada “RE”) que participaram da ciclagem de pH. Assim, considerando-se a troca das soluções DES e RE que ocorreu no quinto dia de ciclagem, as dosagens foram realizadas em todas as soluções, buscando-se evidenciar mudanças na dinâmica do processo de cárie nos primeiros cinco dias e de cinco a dez dias de ciclagem.

Para a apresentação dos resultados obtidos, as soluções DES e RE de cada amostra foram didaticamente nomeadas, como segue:

- ❖ **DES 5 dias:** solução desmineralizante empregada no período de 0 a 5 dias de ciclagem de pH;
- ❖ **DES 10 dias:** solução desmineralizante empregada no período de 6 a 10 dias de ciclagem de pH;
- ❖ **RE 5 dias:** solução remineralizante empregada no período de 0 a 5 dias de ciclagem de pH;
- ❖ **RE 10 dias:** solução remineralizante empregada no período de 6 a 10 dias de ciclagem de pH.

4.7.3.1. Análise da concentração de cálcio

A determinação da concentração de cálcio nas soluções DES e RE foi realizada empregando-se espectrometria por absorção atômica por chama²³, método de análise que se baseia na quantidade de radiação absorvida pelos átomos neutros no estado fundamental do elemento de interesse. Essa absorção é proporcional à população de átomos no estado fundamental, os quais, por sua vez, são proporcionais à concentração da solução distribuída na chama. Estes átomos livres são produzidos pela aspiração e nebulização da amostra, a qual terá seu solvente eliminado pela chama de ar acetileno para produzir um vapor atômico. A energia necessária a este processo é conferida a uma lâmpada de cátodo oco de cálcio. A concentração da solução em análise pode ser obtida através da comparação da sua absorbância com uma solução padrão com concentração exatamente conhecida, e será determinada por um detector, associado a um amplificador de sinal e um filtro.¹²⁵

A concentração de cálcio nas amostras assim preparadas foi dosada utilizando-se espectrômetro de absorção atômica por chama Spectra A (Varian Inc., CA, USA), previamente calibrado com padrões de 0,2 a 2,0 ppm de cálcio. Para tal, foram utilizados 0,03 mL de cada solução, os quais foram diluídos em 1,57 mL de água destilada e deionizada e 0,4 mL de lantânio a 1%.ⁱⁱ

FIGURA 21: Espectrômetro de absorção atômica por chama utilizado no presente estudo.

ⁱⁱ Preparo: 3,117 g de nitrato de lantânio $[\text{La}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}]$ para 100 mL de água destilada e deionizada.

4.7.3.2. Análise da concentração de fósforo inorgânico

A determinação da concentração de fósforo nas soluções DES e RE foi conduzida utilizando-se o método colorimétrico de Fiske & Subbarow (1925)¹²⁸, cujo princípio é a transformação do fósforo em fosfomolibdato com a reação pelo ácido molíbdico. Este composto é, em seguida, reduzido pelo ácido alfa-amino-naftol sulfônico, presente no reativo redutor, a um produto de cor azul. A coloração das amostras é, assim, proporcional à concentração de fósforo constituinte, sendo detectada pelo espectrofotômetro.

Para tal, foram separados 0,2 mL de cada solução a ser analisada, que foram dissolvidos em 2,1 mL de água destilada e deionizada. Em seguida, foi adicionado 0,5 mL de ácido molíbdico em todas as amostras, deixando-se um tempo de repouso de 10 minutos. Então, foi adicionado 0,2 mL de reativo redutor e, após agitação, as amostras foram mantidas em repouso por 20 minutos até o início das dosagens.

Para obter-se a absorbância das soluções foi utilizado um espectrofotômetro modelo DU 800 (Beckman Coulter, CA, USA) ajustado a 660 nm, do Laboratório de Bioquímica Oral da FOP-UNICAMP, previamente calibrado com soluções padrões contendo 1,5 a 24 $\mu\text{g/mL}$ de fósforo. As leituras foram convertidas em $\mu\text{g/mL}$ de fósforo por meio da regressão linear da curva de calibração.

A

B

FIGURA 22: A – curva de calibração para determinação de fósforo inorgânico; B – espectrofotômetro utilizado.

4.7.3.3. Análise da concentração de íon flúor

A concentração de flúor nas soluções DES e RE utilizadas na ciclagem de pH foi determinada utilizando-se o eletrodo específico para íon flúor Orion 96-09, acoplado a um analisador de íons Orion 720 A+ (ThermoOrion Inc., MA, USA), do Laboratório de Bioquímica Oral da FOP-UNICAMP, previamente calibrado com padrões de 0,025 a 1,6 $\mu\text{g F}^-/\text{mL}$ de flúor preparados em TISAB III.ⁱⁱⁱ (ThermoOrion Inc., MA, USA), pH 5,0 na proporção de 1:10. A exatidão dos resultados foi avaliada utilizando-se testes com concentrações conhecidas de flúor. As leituras das amostras em miliVolt (mV) foram transformadas em $\mu\text{g F}^-/\text{mL}$ através de regressão linear da curva de calibração.

4.7.4. Análise de flúor fracamente ligado

A análise de flúor fracamente ligado foi realizada de acordo com o método proposto por Caslavská *et al.* (1975).¹²⁶ Para a análise de flúor fracamente ligado, as amostras foram recobertas com uma camada de cera 7 com auxílio de gotejadores e calcadores, exceto na área de 3,14 mm^2 onde a lesão de cárie já estava presente. O isolamento foi verificado em lupa estereoscópica com aumento de 10 X (Nikon Inc. Instrument Group, NY, USA). Em seguida, os blocos devidamente isolados e limpos foram colocados em tubos plásticos identificados, aos quais foram adicionados 0,25 mL de hidróxido de potássio (KOH) 1 M.^{iv} As amostras permaneceram nestas soluções, sob agitação constante de 40 rpm em mesa agitadora (TE 140, Tecnal, Piracicaba, Brasil), por 24 horas. Decorrido este tempo, as soluções foram rapidamente neutralizadas com 0,25 mL de TISAB II.^v acrescido de HCl 1 M.^{vi}, sendo as amostras removidas dos tubos e armazenadas individualmente para posterior extração de flúor fortemente ligado.

A dosagem de flúor foi realizada nas soluções neutralizadas, utilizando-se o eletrodo específico para íon flúor Orion 96-09 (ThermoOrion Inc.,

ⁱⁱⁱ Composição: cloreto de amônio, acetato de amônia, CDTA, Cresol Red Sodium Salt.

^{iv} Preparo: dissolver 13,202 g de KOH em água destilada e deionizada q.s.p. 200 mL.

^v TISAB II – composto de tampão de acetato 1,0 M, contendo NaCl 1,0 M e CDTA a 0,4% em pH 5,0. O CDTA corresponde ao ácido 1,2-ciclohexanodiaminotetracético.

^{vi} Preparo: diluir 8,29 mL de HCl 37% em solução em TISAB II, pH 5,0, q.s.p. 100 mL.

MA, USA), acoplado a um analisador de íons Orion 720 A+ (ThermoOrion Inc., MA, USA), do Laboratório de Bioquímica Oral da FOP-UNICAMP, previamente calibrado com padrões de 0,03125 a 4,0 $\mu\text{g F}^-/\text{mL}$ em TISAB II.

As análises foram realizadas empregando-se eletrodo combinado, o qual consiste de um tubo oco contendo cloreto de prata (o qual serve como um eletrodo de referência) envolto por solução de preenchimento composta de fluoreto de potássio (com concentração de flúor de 10 ppm e cloreto de potássio 0,1 M) e terminado por um cristal de terras raras (fluoreto de lantânio). O eletrodo é conectado a um potenciômetro, o qual verifica a diferença de potencial entre a solução que está em contato com o cristal (amostra) e a solução de preenchimento (solução interna) no momento das análises. Esta diferença de potencial medida é dada em escala logarítmica, mantendo-se uma relação linear inversamente proporcional à concentração de flúor da amostra.

FIGURA 23: Voltímetro e eletrodo íon específico para fluoreto utilizados no presente estudo.

A exatidão dos resultados foi avaliada utilizando-se testes com concentrações conhecidas de flúor. As leituras das amostras em miliVolt (mV) foram transformadas em $\mu\text{g F}^-/\text{mL}$ através de regressão linear da curva de calibração.

4.7.5. Análise de flúor fortemente ligado

As mesmas amostras já utilizadas para a extração de flúor fracamente ligado foram empregadas para esta análise.

Para a determinação do flúor fortemente ligado, cada amostra foi colocada em tubo plástico identificado, ao qual foi adicionado 0,25 mL de HCl 0,5

M.^{vii}. As amostras permaneceram em contato com esta solução por períodos padronizados de 15 s, 30 s e 60 s, sob agitação constante, para a remoção de 3 camadas de esmalte. Um volume igual de TISAB II pH 5,0, acrescido de 20 g NaOH/L.^{viii}, foi adicionado em cada solução contendo a camada de esmalte dissolvido, com a finalidade de neutralização rápida da reação.¹²⁷.

A concentração de flúor presente nas três camadas de esmalte removidas de cada amostra foi determinada utilizando-se o eletrodo específico para íon flúor Orion 96-09 (ThermoOrion Inc., MA, USA), acoplado a um analisador de íons Orion 720 A+ (ThermoOrion Inc., MA, USA), do Laboratório de Bioquímica Oral da FOP-UNICAMP, previamente calibrado com padrões de 0,025 a 1,6 $\mu\text{g F}^-/\text{mL}$ em TISAB II. A exatidão dos resultados foi avaliada utilizando-se testes com concentrações conhecidas de flúor. As leituras das amostras em miliVolt (mV) foram transformadas em $\mu\text{g F}^-/\text{mL}$ através de regressão linear da curva de calibração.

A quantidade (em gramas) de esmalte removido pelo ataque ácido com HCL 1M foi calculada a partir da dosagem colorimétrica de fósforo inorgânico na solução, para a qual utilizou-se o método de Fiske & Subbarow (1925).¹²⁸, assumindo-se haver no esmalte humano 17% de fósforo.^{37,41,43,44}. Este método será melhor descrito no item 4.7.4.2. Para o cálculo da espessura de esmalte removido, assumiu-se que a densidade do esmalte humano é de 2,92.^{37,41,43,44}.

Assim, foram separados 0,25 mL de cada solução e, nestes, acrescentou-se 2,05 mL de água destilada e deionizada. Em seguida, adicionou-se 0,5 mL de ácido molíbdico.^{ix} e, depois de 10 minutos, adicionou-se 0,2 mL de reativo redutor.^x, o qual, após agitação, foi mantido em repouso por 20 minutos até o início das análises. A dosagem de fósforo inorgânico foi realizada utilizando-se o espectrofotômetro DU 800 (Beckman Coulter, CA, USA), ajustado a 660 nm, do

^{vii} Preparo: diluir 4,14 mL de HCl 37% em solução em água destilada e deionizada q.s.p. 100 mL.

^{viii} Preparo: dissolver 2,0 g de NaOH em TISAB II q.s.p. 100 mL.

^{ix} Preparo: dissolver 2,5 g de molibdato de amônio tetrahidratado em 80 mL de água destilada e deionizada, acrescentar 10,8 mL de ácido sulfúrico concentrado e completar com água destilada e deionizada q.s.p. 100 mL.

^x Preparo: triturar em um grau 0,2 g de ácido amino-naftol-sulfônico, 1,2 g de sulfito de sódio e 1,2 g de bissulfito de sódio. Deve-se pesar 0,025 g desta mistura para cada 1 mL de água destilada e deionizada.

Laboratório de Bioquímica Oral da FOP-UNICAMP. As dosagens foram iniciadas após calibração com soluções padrão de 1,5 a 24 µg/mL de fósforo por meio da regressão linear da curva de calibração.

4.7.6. Análise estatística

As variáveis resposta analisadas foram a temperatura superficial, a temperatura pulpar, a perda mineral, representada pelo parâmetro ΔZ , a concentração de flúor fracamente ligado, a concentração de flúor total e as concentrações de cálcio, fósforo inorgânico e flúor presentes nas soluções desmineralizantes e remineralizantes utilizadas na ciclagem de pH, tendo os tratamentos do esmalte como fontes de variação. As análises foram realizadas utilizando-se os programas estatísticos SPSS 13.0 for Windows (SPSS Inc., Chicago, IL) e BioStat 4.0 (Ayres *et al.*, 2005).

Para cada variável resposta foi realizada uma análise estatística distinta. Nos dados obtidos dos experimentos da Parte 2 deste trabalho, as análises foram realizadas de forma segmentada, buscando-se aumentar a sensibilidade dos testes estatísticos realizados, quando os 14 grupos de tratamento do presente estudo foram separados em: 1) grupos que não receberam aplicação de FFA, comparativamente aos grupos controle positivo e negativo, e 2) grupos que receberam aplicação de FFA, também comparativamente aos grupos controle positivo e negativo.

Para se selecionar o teste estatístico mais adequado, foram testadas, em um primeiro momento, as três pressuposições principais para validar uma possível análise de variância: independência, normalidade e homogeneidade de variâncias dos dados experimentais. A independência foi garantida pela forma com que o experimento foi executado. A homogeneidade de variância foi avaliada pelo teste de Levene e a normalidade através do teste de Shapiro-Wilk, ambos ao nível de 5% de significância. A normalidade foi testada sobre os resíduos estimados pela diferença entre o valor experimental e a média do grupo ao qual ele pertence.¹²⁹

Os dados que se encontraram dentro destas pressuposições principais foram analisados estatisticamente por análise de variância, considerando-se o nível de significância de 5%. Os contrastes foram realizados

pelo teste Post-Hoc de Tukey, também se considerando o nível de significância de 5%. Complementando a análise de variância, foram construídos intervalos de 95% de confiança para a média populacional.

Os conjuntos que não se encontraram dentro das pressuposições de normalidade e homogeneidade foram observados quanto à existência de dados potencialmente discrepantes. Uma análise de valores extremos, com base nos desvios, foi realizada para a detecção e, se necessária, foi realizada a exclusão de valores extremos (“outliers”).

Ainda assim, avaliou-se a possibilidade de transformação de dados, empregando-se a transformação em logaritmos em base dez¹³⁰. Após tal transformação, os conjuntos de dados que se encontraram dentro das pressuposições necessárias para análise de variância foram submetidos a tal análise e ao posterior teste de Tukey, conforme descrito anteriormente. Os conjuntos de dados que, ainda assim, não se encontraram dentro das pressuposições descritas, foram submetidos à análise não paramétrica de Kruskal-Wallis. As comparações entre as médias foram realizadas empregando-se o teste de Student-Newman-Keuls, considerando-se também o nível de significância de 5%.

Para a comparação entre as concentrações de cálcio, fósforo inorgânico e flúor antes, após 5 dias e após 10 dias de ciclagem de pH, foi empregado o teste *t* de Student também com significância de 5%.

5. RESULTADOS

Os resultados serão apresentados individualmente para cada análise realizada no presente estudo.

5.1. Parte 1 – Verificação dos possíveis parâmetros *laser* para prevenção da cárie

5.1.1. Análise morfológica

A análise das amostras através de microscopia eletrônica de varredura revelou diferentes padrões morfológicos, os quais variaram principalmente de acordo com a fluência *laser* empregada. As características morfológicas podem ser visualizadas nas micrografias eletrônicas relacionadas nas FIG. 24 e 25.

Analizando-se as amostras do grupo controle (não irradiadas), foram observadas superfícies lisas e sem grandes irregularidades (FIG. 24), com as características inerentes ao tecido como pequenos poros (menores que 2 μm) e alguns riscos, que não são provenientes de força fisiológica, mas sim da escovação.

Em todas as irradiações do esmalte com *laser* Er,Cr:YSGG, a morfologia do esmalte apresentou discretas cavidades típicas de áreas ablacionadas, algumas fissuras e projeções do esmalte. Nas áreas de ablação, houve remoção do centro dos prismas de esmalte. Todas as amostras irradiadas apresentaram padrão de microablação, sendo que as amostras irradiadas com fluência de 8,5 J/cm² apresentaram aspecto de ablação tecidual visível também a olho nu, com a formação de pontos esbranquiçados decorrentes da desidratação ocasionada pela irradiação *laser* na superfície do esmalte.

Quando as amostras foram irradiadas com fluência de 2,8 J/cm² sem fotoabsorvedor, podem-se observar áreas lisas, com discretas depressões, correspondentes a micro-esfoliações do esmalte decorrentes da irradiação *laser*. Entretanto, quando aplicado o fotoabsorvedor, a utilização da mesma fluência *laser* promoveu áreas de ablação tecidual mais pronunciadas, caracterizadas por áreas de contínuas projeções e depressões do esmalte de forma simétrica,

entremeadas por áreas lisas, de esmalte íntegro, o que corresponderam às regiões “entre os pulsos” do *laser*. As ablações tiveram aspecto de malha, condizendo com o aspecto morfológico típico das irradiações realizadas com os demais *lasers* de érbio.

Uma maior quantidade de áreas ablacionadas, comparativamente quando foi empregada a fluência de $2,8 \text{ J/cm}^2$, foi evidenciada quando o esmalte foi irradiado com fluência de $5,6 \text{ J/cm}^2$, com e sem fotoabsorvedor. Com a utilização desta fluência, assim como com a fluência de $8,5 \text{ J/cm}^2$, observam-se projeções características da remoção do centro dos prismas de esmalte, de forma muito semelhante com o que ocorre quando se aplica ácido fosfórico para condicionamento do esmalte. Além disso, uma maior quantidade de crateras foi observada, assim como menor quantidade de áreas lisas entre os pulsos do *laser*. A presença de fotoabsorvedor não diferiu o aspecto morfológico observado com as fluências de $5,6 \text{ J/cm}^2$ e $8,5 \text{ J/cm}^2$, não proporcionando evidências morfológicas de maior aquecimento ou danos estruturais.

Nas amostras irradiadas com fluências de $8,5 \text{ J/cm}^2$, com e sem fotoabsorvedor, foram observadas áreas de ablação tecidual com maior irregularidade, sem evidências de danos térmicos, trincas ou fusão do esmalte. Maiores depressões foram também evidenciadas, e ausência de áreas de esmalte sadio entre os pulsos da irradiação *laser*. Em algumas áreas, houve inclusive a exposição de prismas de esmalte.

A

B

C

FIGURA 24: Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura de esmalte dental humano: A – sem irradiação (grupo controle); B – irradiado com *laser* de Er,Cr:YSGG com fluência de $2,8 \text{ J/cm}^2$ (0,25 W) sem carvão; C – irradiado com fluência de $2,8 \text{ J/cm}^2$ (0,25 W) com carvão. Aumento original = 1000 x.

FIGURA 25: Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura de esmalte dental humano: A – irradiado com fluência de 5,6 J/cm² (0,50 W) sem carvão; B – irradiado com fluência de 5,6 J/cm² (0,50 W) com carvão; C – irradiado com fluência de 8,5 J/cm² (0,75 W) sem carvão; D – irradiado com fluência de 8,5 J/cm² (0,75 W) com carvão. Aumento original = 1000 x.

5.1.2. Análise da temperatura superficial

A FIG. 26 ilustra as imagens em infravermelho obtidas antes, durante, imediatamente após e durante o resfriamento do dente quando a superfície oclusal do esmalte foi irradiada com *laser* de Er,Cr:YSGG. A Tabela 5 descreve os valores máximos de temperatura atingidos durante as irradiações.

FIGURA 26: Imagens representativas no infravermelho obtidas durante a irradiação de dente humano com *laser*: A – no início das irradiações; B – durante as irradiações; C – no término das irradiações; D – durante o resfriamento do dente, após as irradiações.

TABELA 7: Elevações na temperatura máxima da superfície do esmalte durante as irradiações com *laser* de Er,Cr:YSGG, associado ou não à aplicação de fotoabsorvedor. Dados originais.

<i>Potência média do laser</i>	<i>carvão</i>	<i>Média ± D.P.</i>	<i>Porcentagem de aumento do carvão</i>
0,25 W	Sim	79,6 ± 0,8° C	-
	Não	42,7 ± 1,9° C	86,4%
0,50 W	Sim	184,1 ± 29,3° C	-
	Não	136,1 ± 13,0° C	35,2%
0,75 W	Sim	247,6 ± 30,2° C	-
	Não	211,8 ± 22,6° C	16,9%

Pelas curvas de temperatura superficial, observa-se que a variação nas temperaturas superficiais atingidas foi diretamente proporcional com as

Resultados

fluências *laser* empregadas, havendo uma relação positiva. A aplicação prévia da pasta de pó de carvão proporcionou um aumento nas temperaturas superficiais atingidas em todos os grupos, sendo este aumento mais expressivo durante as irradiações com fluências de $2,8 \text{ J/cm}^2$ e $5,6 \text{ J/cm}^2$, com diferenças significativas entre os valores encontrados com e sem a aplicação de carvão.

A variação máxima de temperatura detectada foi de $79,6 \pm 0,8^\circ \text{C}$ e $42,7 \pm 1,9^\circ \text{C}$ nas amostras irradiadas com fluência de $2,8 \text{ J/cm}^2$ ($0,25 \text{ W}$) com e sem carvão, respectivamente. Quando irradiadas com $5,6 \text{ J/cm}^2$ ($0,50 \text{ W}$), os aumentos de temperatura superficial registrados foram de $184,1 \pm 29,3^\circ \text{C}$ e $136,1 \pm 13,0^\circ \text{C}$ nas amostras irradiadas com e sem carvão, respectivamente, e nas irradiações realizadas com $8,5 \text{ J/cm}^2$ ($0,75 \text{ W}$), os aumentos registrados foram de $247,6 \pm 30,2^\circ \text{C}$ e $211,8 \pm 22,6^\circ \text{C}$ nas amostras irradiadas com e sem carvão, respectivamente. Após o término das irradiações, as temperaturas tiveram um decréscimo exponencial, atingindo os valores iniciais em um período aproximado de 15 segundos. As variações na temperatura (ΔT), isto é, os valores de temperatura atingidos subtraindo-se os valores iniciais de temperatura (25°C), estão ilustradas na FIG. 27.

FIGURA 27: Média das variações na temperatura da superfície do esmalte durante as irradiações com *laser* de Er,Cr:YSGG. As barras correspondem ao erro padrão e os números correspondem aos valores de ΔT . Letras diferentes correspondem a médias distintas de acordo com o teste de Tukey.

A FIG. 28 contém os gráficos representativos das curvas de aumento de temperatura na superfície do esmalte (análise do ponto SPOT 1) durante as irradiações com as diferentes fluências, onde se pode observar o comportamento das temperaturas com o decorrer do tempo.

FIGURA 28: Curvas médias das elevações na temperatura da superfície do esmalte, detectadas por câmera termográfica, durante as irradiações com *laser* de Er,Cr:YSGG nos diferentes parâmetros empregados neste estudo, associados ou não à aplicação de fotoabsorvedor (carvão).

Pela análise do gráfico acima, observa-se que as curvas de aumento de temperatura, correspondentes às amostras irradiadas sem a aplicação de carvão, apresentam padrão tipicamente exponencial, de forma uniforme para todas as fluências empregadas. Entretanto, as curvas correspondentes às amostras irradiadas após aplicação do carvão evidenciam um padrão irregular de temperatura, com alguns picos e depressões em seus pontos mais elevados. Tais picos correspondem com a interação da irradiação *laser* com as partículas de carvão, as quais foram ejetadas no momento das irradiações. Nas imagens em infravermelho, as partículas de carvão ejetadas aparecem como microexplosões características.

5.1.3. Análise da temperatura pulpar

Os dados referentes ao aumento de temperatura pulpar decorrente das irradiações, detectados pela câmera termográfica e pelos termopares de resposta rápida, encontram-se descritos na Tabela 6.

TABELA 8: Elevações na temperatura pulpar do esmalte durante as irradiações com *laser* de Er,Cr:YSGG, associado ou não à aplicação de fotoabsorvedor, detectada por termopares ou por termografia. Dados originais.

Potência média do <i>laser</i>	<i>carvão</i>	Termopares	Termografia
		Média ± E.P.	Média ± E.P.
0,25 W	Sim	0,6 ± 0,1° C	0,5 ± 0,1° C
	Não	0,8 ± 0,2° C	1,0 ± 0,2° C
0,50 W	Sim	1,5 ± 0,3° C	1,5 ± 0,2° C
	Não	1,7 ± 0,3° C	1,2 ± 0,2° C
0,75 W	Sim	1,3 ± 0,1° C	2,1 ± 0,3° C
	Não	2,1 ± 0,3° C	1,9 ± 0,3° C

Assim, considerando-se os dados obtidos através da análise do SPOT 2 (das imagens em infravermelho fornecidas pela câmera termográfica), observou-se que os aumentos de temperatura registrados foram de $1,0 \pm 0,2^\circ \text{C}$ e $0,5 \pm 0,1^\circ \text{C}$ nas amostras irradiadas com $2,8 \text{ J/cm}^2$ (0,25 W) sem e com carvão, respectivamente; $1,2 \pm 0,2^\circ \text{C}$ e $1,5 \pm 0,2^\circ \text{C}$ nas amostras irradiadas com $5,6 \text{ J/cm}^2$ (0,50 W) sem e com carvão, respectivamente; e $1,95 \pm 0,3^\circ \text{C}$ e $2,1 \pm 0,3^\circ \text{C}$ nas amostras irradiadas com $8,5 \text{ J/cm}^2$ (0,75 W) sem e com carvão, respectivamente. A FIG. 29 ilustra as variações de temperatura detectadas nas imagens em infravermelho.

Por este gráfico e pela análise estatística realizada (ANOVA e Teste de Tukey), observa-se que as fluências empregadas durante a irradiação *laser* influenciaram significativamente as temperaturas atingidas, havendo uma relação positiva entre os valores das mesmas e os aumentos de temperatura detectados ($p < 0,05$). A aplicação prévia da pasta de pó de carvão possibilitou uma diminuição significativa nas temperaturas do teto das câmaras pulpares durante

as irradiações sob fluência de $2,8 \text{ J/cm}^2$ (0,25 W) – $p < 0,05$; entretanto, não foi detectada mudança significativa nas temperaturas do teto da câmara pulpar quando durante as irradiações sob as demais fluências.

FIGURA 29: Variação média de temperatura no teto da câmara pulpar (SPOT 2), detectada pela câmara termográfica, em amostras irradiadas com *laser* Er,Cr:YSGG (as barras correspondem ao erro padrão). Letras distintas evidenciam médias significativamente diferentes entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

O gráfico que ilustra as elevações de temperatura no interior da câmara pulpar durante as irradiações, detectadas pelos termopares de resposta rápida, encontra-se na FIG. 30. Observa-se que as elevações de temperatura variaram de acordo com a fluência empregada, sendo tais diferenças estatisticamente significantes à Análise de Variância e teste de Tukey, com nível de significância de 5%.

Os efeitos na polpa foram mínimos quando as amostras foram irradiadas com $2,8 \text{ J/cm}^2$ (0,25 W), quando foram detectados aumentos médios de $0,6 \pm 0,3^\circ \text{ C}$ e $0,8 \pm 0,6^\circ \text{ C}$ nas amostras irradiadas com e sem carvão, respectivamente. Nos demais tratamentos, as médias das elevações de temperatura registradas foram $1,5 \pm 0,8^\circ \text{ C}$ e $1,7 \pm 0,9^\circ \text{ C}$ nas amostras irradiadas com $5,6 \text{ J/cm}^2$ (0,50 W) com e sem carvão; e $1,3 \pm 0,5^\circ \text{ C}$ e $2,1 \pm 0,9^\circ \text{ C}$ nas amostras irradiadas com $8,5 \text{ J/cm}^2$ (0,75 W) com e sem carvão, respectivamente.

FIGURA 30: Aumentos na temperatura da câmara pulpar decorrentes da irradiação com *laser* Er,Cr:YSGG, sob as diferentes condições deste estudo, em função do tempo de irradiação.

A análise estatística dos dados obtidos no experimento realizado com os termopares foi realizada após a transformação dos dados em logaritmos, buscando-se homogeneidade e normalidade dos dados. Os resultados estão descritos na Tabela 7.

TABELA 9: Análise de variância da elevação da temperatura intrapulpar registrada pelos termopares. Dados transformados.

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	0.578581	5	0.115716	7.595993	1.84E-05	2.386066
Dentro dos grupos	0.822627	54	0.015234			
Total	1.401208	59				

De acordo com a análise estatística dos dados, observou-se que a fluência de $2,8 \text{ J/cm}^2$ ($0,25 \text{ W}$) promoveu os menores aumentos de temperatura pulpar, havendo diferença significativa quando comparada à fluência de $5,6 \text{ J/cm}^2$ ($0,50 \text{ W}$) e $8,5 \text{ J/cm}^2$ ($0,75 \text{ W}$). Entretanto, não foi constatada diferença estatisticamente significativa entre as temperaturas atingidas durante as irradiações com fluências de $5,6 \text{ J/cm}^2$ e $8,5 \text{ J/cm}^2$. Ainda assim, tais elevações de temperatura não superaram o limite de $2,1^\circ \text{ C}$, o qual é considerado seguro para a vitalidade pulpar.

FIGURA 31: Intervalos de confiança (95%) para comparação entre os diferentes grupos.

A aplicação da película de fotoabsorvedor previamente às irradiações não possibilitou a redução significativa das temperaturas pulpares atingidas durante as irradiações (Tabela 8). Desta forma, empregando-se as fluências deste estudo, observou-se que a aplicação deste tipo de substância fotoabsorvedora não reduziu a propagação de calor para o interior da câmara pulpar.

TABELA 10: Comparações múltiplas realizadas pelo Teste de Tukey. Dados transformados.

<i>Tukey</i>	<i>Diferença</i>	<i>Q</i>	<i>(p)</i>
Médias [laser 0,25 W] a [laser 0,25 W+ carvão]	0.0288	0.7375	ns
Médias [laser 0,25 W] a [laser 0,50 W]	0.1873	4.7980	< 0.05
Médias [laser 0,25 W] a [laser 0,50 W + carvão]	0.1403	3.5942	ns
Médias [laser 0,25 W] a [laser 0,75 W]	0.2498	6.4000	< 0.01
Médias [laser 0,25 W] a [laser 0,75 W + carvão]	0.1187	3.0400	ns
Médias [laser 0,25 W+ carvão] a [laser 0,50 W]	0.2161	5.5354	< 0.01
Médias [laser 0,25 W+ carvão] a [laser 0,50 W + carvão]	0.1691	4.3317	< 0.05
Médias [laser 0,25 W+ carvão] a [laser 0,75 W]	0.2786	7.1375	< 0.01
Médias [laser 0,25 W+ carvão] a [laser 0,75 W + carvão]	0.1474	3.7775	ns
Médias [laser 0,50 W] a [laser 0,50 W + carvão]	0.0470	1.2038	ns
Médias [laser 0,50 W] a [laser 0,75 W]	0.0625	1.6020	ns
Médias [laser 0,50 W] a [laser 0,75 W + carvão]	0.0686	1.7580	ns
Médias [laser 0,50 W + carvão] a [laser 0,75 W]	0.1095	2.8058	ns
Médias [laser 0,50 W + carvão] a [laser 0,75 W + carvão]	0.0216	0.5542	ns
Médias [laser 0,75 W] a [laser 0,75 W + carvão]	0.1311	3.3600	ns

FIGURA 32: Média das elevações na temperatura da câmara pulpar, detectadas por termopares, durante as irradiações com *laser* de Er,Cr:YSGG (as barras correspondem ao erro padrão). Letras distintas evidenciam médias significativamente diferentes entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

5.2. Parte 2 - Determinação dos efeitos da irradiação *laser* para prevenção da cárie

5.2.1. Análise da perda mineral

O valor de ΔZ (%vol x μm) obtido para cada grupo de tratamento, bem como o respectivo desvio padrão, estão descritos na tabela a seguir.

TABELA 11: Valores de perda mineral (%vol x μm) das amostras após a ciclagem de pH. Dados originais.

Grupos	Discriminação	ΔZ (%vol x μm) Média $\pm$ E.P.
PM 1	Controle	1678,6 $\pm$ 126,9
PM 2	FFA	766.3 $\pm$ 99,9
PM 3	0,25 W	1422.6 $\pm$ 183,2
PM 4	0,25 W + carvão	1369.7 $\pm$ 219,2
PM 5	0,25 W + FFA	774.1 $\pm$ 131,4
PM 6	0,25 W + carvão + FFA	456.1 $\pm$ 80,9
PM 7	0,50 W	1545.1 $\pm$ 117,2
PM 8	0,50 W + carvão	1312.1 $\pm$ 172,3
PM 9	0,50 W + FFA	536.4 $\pm$ 81,6
PM 10	0,50 W + carvão + FFA	444.0 $\pm$ 74,9
PM 11	0,75 W	968.5 $\pm$ 158,4
PM 12	0,75 W + carvão	964.1 $\pm$ 138,3
PM 13	0,75 W + FFA	550.5 $\pm$ 102,8
PM 14	0,75 W + carvão + FFA	554.0 $\pm$ 79,8

A FIG. 33 ilustra a perda mineral média dos diferentes grupos de tratamento do presente estudo.

FIGURA 33: Representação gráfica das médias dos valores de perda mineral (ΔZ) nos diferentes grupos de tratamento. As barras correspondem ao erro padrão.

Neste trabalho, por tratar-se de 14 grupos, optou-se por realizar a análise estatística dos dados de forma segmentada, buscando-se uma maior sensibilidade dos testes empregados na detecção das possíveis diferenças entre os grupos de tratamento. Assim, em um primeiro momento, buscou-se determinar a fluência *laser* que proporcionasse menor perda mineral das amostras, comparativamente aos grupos controle (sem tratamento) e FFA. Considerando a homogeneidade e normalidade destes dados, foi realizada Análise de Variância, seguida pelo teste Post Hoc de Tukey para comparações múltiplas entre os grupos, considerando-se o grau de significância de 5%. A Tabela 10 mostra os resultados obtidos pela análise de variância de um fator com cinco grupos testados (controle, FFA, *laser* 0,25 W, *laser* 0,50 W e *laser* 0,75 W), quando foi obtida diferença altamente significativa entre os grupos (0,0061%). A FIG.34 ilustra os intervalos de confiança em 95%, e a tabela 11 mostra as diferenças na comparação entre os grupos obtida pelo teste de Tukey, com nível de significância de 5%.

*Resultados***TABELA 12:** Resultados da análise de variância dos grupos controle, FFA, e *lasers* 0,25W, 0,50 W e 0,75 W. Dados originais.

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	6713628.097	4	1678407.024	7.74572	0.000061	2.557179
Resíduo	10834406.39	50	216688.1277			
Total	17548034.48	54				

TABELA 13: Comparações múltiplas realizadas pelo teste de Tukey. Dados originais.

<i>Tukey</i>	<i>Diferença</i>	<i>Q</i>	<i>(p)</i>
Médias [controle] a [FFA]	912.3636	6.5011	< 0.01
Médias [controle] a [<i>laser</i> 0,25 W]	256.0000	1.8241	> 0.05
Médias [controle] a [<i>laser</i> 0,50 W]	133.4545	0.9509	> 0.05
Médias [controle] a [<i>laser</i> 0,75 W]	710.0000	5.0591	< 0.01
Médias [FFA] a [<i>laser</i> 0,25 W]	656.3636	4.6770	< 0.05
Médias [FFA] a [<i>laser</i> 0,50 W]	778.9091	5.5502	< 0.01
Médias [FFA] a [<i>laser</i> 0,75 W]	202.3636	1.4420	> 0.05
Médias [<i>laser</i> 0,25 W] a [<i>laser</i> 0,50 W]	122.5455	0.8732	> 0.05
Médias [<i>laser</i> 0,25 W] a [<i>laser</i> 0,75 W]	454.0000	3.2350	> 0.05
Médias [<i>laser</i> 0,50 W] a [<i>laser</i> 0,75 W]	576.5455	4.1082	< 0.05

De acordo com os resultados obtidos, pode-se observar que a aplicação de FFA foi capaz de reduzir consideravelmente, em nível de 1%, a perda mineral das amostras quando comparado ao grupo controle ($p < 0,01$). Entretanto, a irradiação *laser* sob fluências de $2,8 \text{ J/cm}^2$ (0,25 W) e $5,6 \text{ J/cm}^2$ (0,50 W) não exerceu influência sobre a perda mineral das amostras, não havendo diferença significativa na comparação entre estes grupos e o grupo controle. O efeito da irradiação *laser* sobre a perda mineral foi evidenciado apenas quando irradiado sob a fluência de $8,5 \text{ J/cm}^2$ (0,75W), o qual promoveu valores de perda mineral significativamente menores que o grupo controle

Resultados

($p < 0,05$). Entretanto, este efeito foi similar ao promovido pela aplicação de FFA, evidência constatada pela comparação não significativa entre os grupos FFA e *laser* 0,75 W.

FIGURA 34: Intervalos de confiança (95%) para comparação entre os grupos controle, FFA, e *lasers* 0,25W, 0,50 W e 0,75 W. Dados originais.

O gráfico a seguir ilustra a ação dos diferentes tratamentos no conteúdo mineral com relação à profundidade do esmalte. Para cada profundidade, foram realizadas análises de variância e testes de Tukey buscando-se evidenciar as diferenças entre os tratamentos. Os resultados destas análises estão expressos por letras em cada ponto dos traçados, quando letras diferentes expressam médias estatisticamente diferentes. Pode-se ressaltar, por este gráfico, que ambos os grupos FFA e *laser* 0,75 W promoveram significativa redução na perda mineral das amostras, atuando em uma profundidade de até 50 μm . A partir de 60 μm de profundidade, não foram mais detectadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos. Os grupos irradiados com *laser* a 0,25 W e 0,50 W não tiveram redução significativa na perda mineral quando comparado ao grupo sem tratamento.

FIGURA 35: Curvas representativas do conteúdo mineral das médias das amostras dos grupos onde a irradiação *laser* foi realizada sem associação com carvão ou FFA, comparativamente aos grupos controle e FFA. As barras correspondem ao erro padrão. Letras distintas evidenciam médias significativamente diferentes entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Posteriormente a estas análises, buscou-se verificar a influência dos fatores de variação (pasta de pó de carvão e associação com flúor fosfato acidulado) sobre a performance das diferentes fluências *laser*, de forma individual. Inicialmente foi avaliada a fluência de $2,8 \text{ J/cm}^2$ (0,25 W) e suas diversas associações, sempre se comparando com os grupos controle e FFA. As tabelas 12 e 13 contêm os dados da análise de variância e teste de Tukey realizadas para comparação entre as diferentes associações válidas para a irradiação *laser* com fluência de $2,8 \text{ J/cm}^2$ (0,25 W).

Resultados

TABELA 14: Resultados da análise de variância para comparação entre os grupos [controle], [FFA], [laser 0,25 W], [laser 0,25 W + carvão], [laser 0,25 W + FFA] e [laser 0,25 W + carvão + FFA]. Dados originais.

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	12549410.37	5	2509882.07	10.41	3.20E-07	2.36
Resíduo	14468311.20	60	241138.52			
Total	27017721.58	65				

TABELA 15: Comparações múltiplas entre as médias realizadas pelo teste de Tukey. Dados originais.

<i>Tukey</i>	<i>Q</i>	<i>(p)</i>
Médias [Controle] a [FFA]	6.161	< 0.01
Médias [Controle] a [laser 0,25 W]	1.728	> 0.05
Médias [Controle] a [laser 0,25 W + carvão]	2.086	> 0.05
Médias [Controle] a [laser 0,25 W + FFA]	6.109	< 0.01
Médias [Controle] a [laser 0,25 W + carvão + FFA]	8.256	< 0.01
Médias [FFA] a [laser 0,25 W]	4.432	< 0.05
Médias [FFA] a [laser 0,25 W + carvão]	4.074	> 0.05
Médias [FFA] a [laser 0,25 W + FFA]	0.052	> 0.05
Médias [FFA] a [laser 0,25 W + carvão + FFA]	2.095	> 0.05
Médias [laser 0,25 W] a [laser 0,25 W + carvão]	0.358	> 0.05
Médias [laser 0,25 W] a [laser 0,25 W + FFA]	4.380	< 0.05
Médias [laser 0,25 W] a [laser 0,25 W + carvão + FFA]	6.528	< 0.01
Médias [laser 0,25 W + carvão] a [laser 0,25 W + FFA]	4.022	> 0.05
Médias [laser 0,25 W + carvão] a [laser 0,25 W + carvão + FFA]	6.170	< 0.01
Médias [laser 0,25 W + FFA] a [laser 0,25 W + carvão + FFA]	2.147	> 0.05

FIGURA 36: Intervalos de confiança (95%) para comparação entre os grupos [controle], [FFA], [*laser* 0,25 W], [*laser* 0,25 W + carvão], [*laser* 0,25 W + FFA] e [*laser* 0,25 W + carvão + FFA]. Dados originais.

De acordo com os resultados obtidos, observa-se que a aplicação da pasta de pó de carvão não evidenciou diminuição expressiva da perda mineral das amostras irradiadas, fato comprovado na ausência de significância estatística na comparação entre os grupos [*laser* 0,25 W] e [*laser* 0,25 W + carvão], assim como entre os grupos [*laser* 0,25 W + FFA] e [*laser* 0,25 W + carvão + FFA].

A aplicação tópica de flúor fosfato acidulado após a irradiação *laser* promoveu um decréscimo significativo na perda mineral das amostras irradiadas quando comparado ao grupo onde somente a irradiação foi realizada sobre a superfície (significância de 1% para os grupos [*laser* 0,25 W + FFA] e [*laser* 0,25 W + carvão + FFA] quando comparados ao grupo controle). Entretanto, a irradiação *laser* previamente à aplicação de FFA não foi capaz de reduzir significativamente a perda mineral das amostras quando comparado ao grupo onde somente o FFA foi aplicado.

A associação *laser* + carvão + flúor foi a que promoveu menor perda mineral nesta análise; entretanto, tal associação não foi estatisticamente diferente dos grupos FFA e *laser* + FFA.

A seguir, encontram-se os traçados representativos das médias do volume mineral com relação às profundidades do esmalte para os diferentes

Resultados

grupos, contendo as letras que evidenciam os resultados das análises de variância e testes de Tukey realizados individualmente para cada profundidade. Por estes traçados, observa-se que os grupos [FFA], [*laser* 0,25 W + FFA] e [*laser* 0,25 W + carvão + FFA] promoveram aumento significativo no volume mineral das amostras em profundidades de até 40 μm , enquanto que os grupos [*laser* 0,25 W] e [*laser* 0,25 W + carvão] não promoveram efeitos em profundidade. O grupo [*laser* 0,25 W + carvão + FFA] foi o que proporcionou maiores valores de conteúdo mineral comparativamente aos demais grupos; entretanto, estes valores não diferiram estatisticamente do grupo [FFA].

FIGURA 37: Curvas representativas do conteúdo mineral das médias das amostras dos grupos onde o *laser* irradiou com fluência de $2,8 \text{ J/cm}^2$ (0,25 W), comparativamente aos grupos controle e FFA. As barras correspondem ao erro padrão. Letras distintas evidenciam médias significativamente diferentes entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

A seguir, o mesmo processo de análise descrito acima, realizado para o *laser* a 0,25 W, foi repetido considerando-se a fluência *laser* a $5,6 \text{ J/cm}^2$ (0,50 W), conforme pode ser visualizado nas TAB. 14 e 15 e FIG. 38.

Resultados

TABELA 16: Resultado da análise de variância realizado para comparação entre os grupos [controle], [FFA], [*laser* 0,50 W], [*laser* 0,50 W + carvão], [*laser* 0,50 W + FFA] e [*laser* 0,50 W + carvão + FFA].

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	15624802	5	3124960	20.8481	5.18E-12	2.368267
Resíduo	8993512	60	149891.9			
Total	24618314	65				

TABELA 17: Comparações múltiplas realizadas pelo teste de Tukey. Dados originais.

<i>Tukey</i>	<i>Q</i>	<i>(p)</i>
Médias [Controle] a [FFA]	7.8150	< 0.01
Médias [Controle] a [<i>laser</i> 0,50W]	1.1430	> 0.05
Médias [Controle] a [<i>laser</i> 0,50W + carvão]	3.1397	> 0.05
Médias [Controle] a [<i>laser</i> 0,50W + FFA]	9.7845	< 0.01
Médias [Controle] a [<i>laser</i> 0,50W + carvão + FFA]	10.5763	< 0.01
Médias [FFA] a [<i>laser</i> 0,50W]	6.6720	< 0.01
Médias [FFA] a [<i>laser</i> 0,50W + carvão]	4.6753	< 0.05
Médias [FFA] a [<i>laser</i> 0,50W + FFA]	1.9695	> 0.05
Médias [FFA] a [<i>laser</i> 0,50W + carvão + FFA]	2.7613	> 0.05
Médias [<i>laser</i> 0,50W] a [<i>laser</i> 0,50W + carvão]	1.9966	> 0.05
Médias [<i>laser</i> 0,50W] a [<i>laser</i> 0,50W + FFA]	8.6415	< 0.01
Médias [<i>laser</i> 0,50W] a [<i>laser</i> 0,50W + carvão + FFA]	9.4333	< 0.01
Médias [<i>laser</i> 0,50W + carvão] a [<i>laser</i> 0,50W + FFA]	6.6448	< 0.01
Médias [<i>laser</i> 0,50W + carvão] a [<i>laser</i> 0,50W + carvão + FFA]	7.4367	< 0.01
Médias [<i>laser</i> 0,50W + FFA] a [<i>laser</i> 0,50W + carvão + FFA]	0.7919	> 0.05

FIGURA 38: Intervalos de confiança (95%) para comparação entre os grupos [controle], [FFA], [*laser* 0,50 W], [*laser* 0,50 W + carvão], [*laser* 0,50 W + FFA] e [*laser* 0,50 W + carvão + FFA]. Dados originais.

De acordo com as análises expostas, pode-se inferir, da mesma forma que ocorreu com o *laser* a 0,25 W, que a aplicação prévia da pasta de pó de carvão não resultou em decréscimo significativo da perda mineral das amostras irradiadas, não sendo demonstrada diferença significativa nas comparações entre os grupos [*laser* 0,50W] e [*laser* 0,50W + carvão], e entre os grupos [*laser* 0,50 W + FFA] e [*laser* 0,50 W + carvão + FFA].

A aplicação de FFA posteriormente às irradiações possibilitou a diminuição significativa da perda mineral nos grupos irradiados na comparação com o grupo controle ($p < 0,01$); entretanto, tal redução não foi estatisticamente evidenciada na comparação com o grupo onde apenas o FFA foi aplicado. O tratamento que possibilitou a menor perda mineral foi a irradiação *laser* 0,50 W associada à aplicação de carvão e de FFA; porém, a perda mineral promovida por tal grupo não foi estatisticamente diferente dos grupos FFA e *laser* 0,50W + FFA.

A figura a seguir contém os traçados do volume mineral médio das amostras destes grupos com relação às diferentes profundidades do esmalte. Após a análise estatística dos valores obtidos para cada profundidade (ANOVA + Tukey), pode-se inferir os grupo [*laser* 0,50W + carvão] não promoveu valores

Resultados

diferentes de volume mineral comparativamente ao grupo controle; contudo, o grupo [*laser* 0,50 W] promoveu valores de volume mineral diferentes do grupo controle apenas nas profundidades de 20 e 30 μm . A associação da irradiação *laser* a 0,50 W com o FFA promoveu valores de conteúdo mineral similares aos do grupo [*laser* 0,50 W + carvão + FFA] em todas as profundidades analisadas, sendo tais valores discretamente maiores do que os promovidos pelo grupo [FFA]; entretanto, entre estes três grupos, não foram evidenciadas diferenças estatisticamente significativas. Os grupos [FFA], [*laser* 0,50 W + FFA] e [*laser* 0,50 W + carvão + FFA] apresentaram volume mineral significativamente maior do que o grupo controle até a profundidade de 50 μm , não sendo detectada diferença estatística significativa nas regiões mais profundas.

FIGURA 39: Curvas representativas do conteúdo mineral das médias das amostras dos grupos onde o *laser* irradia com fluência de $5,6 \text{ J/cm}^2$ (0,50 W), comparativamente aos grupos controle e FFA. As barras correspondem ao erro padrão. Letras distintas evidenciam médias significativamente diferentes entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

O próximo passo seguido foi, então, analisar estatisticamente a influência dos fatores de variação (pasta de pó de carvão e associação com flúor fosfato acidulado) sobre a performance da fluência *laser* $8,5 \text{ J/cm}^2$ (0,75 W), comparativamente aos grupos controle e FFA. Os resultados obtidos pela análise

Resultados

de variância, teste de Tukey e análise dos intervalos de confiança estão descritos a seguir.

TABELA 18: Resultado da análise de variância realizado para comparação entre os grupos [controle], [FFA], [*laser* 0,75 W], [*laser* 0,75 W + carvão], [*laser* 0,75 W + FFA] e [*laser* 0,75 W + carvão + FFA]. Dados originais.

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	9608938	5	1921788	12.01518	4.45796E-08	2.36827
Resíduo	9596797	60	159946.6			
Total	19205736	65				

TABELA 19: Comparações múltiplas realizadas pelo teste de Tukey. Dados originais.

Tukey	Q	(p)
Médias [controle] a [FFA]	7.5653	< 0.01
Médias [controle] a [<i>laser</i> 0,75 W]	5.8881	< 0.01
Médias [controle] a [<i>laser</i> 0,75 W + carvão]	5.9255	< 0.01
Médias [controle] a [<i>laser</i> 0,75 W + FFA]	9.3545	< 0.01
Médias [controle] a [<i>laser</i> 0,75 W + carvão + FFA]	9.3255	< 0.01
Médias [FFA] a [<i>laser</i> 0,75 W]	1.6771	> 0.05
Médias [FFA] a [<i>laser</i> 0,75 W + carvão]	1.6398	> 0.05
Médias [FFA] a [<i>laser</i> 0,75 W + FFA]	1.7893	> 0.05
Médias [FFA] a [<i>laser</i> 0,75 W + carvão + FFA]	1.7603	> 0.05
Médias [<i>laser</i> 0,75 W] a [<i>laser</i> 0,75 W + carvão]	0.0373	> 0.05
Médias [<i>laser</i> 0,75 W] a [<i>laser</i> 0,75 W + FFA]	3.4664	> 0.05
Médias [<i>laser</i> 0,75 W] a [<i>laser</i> 0,75 W + carvão + FFA]	3.4374	> 0.05
Médias [<i>laser</i> 0,75 W + carvão] a [<i>laser</i> 0,75 W + FFA]	3.4291	> 0.05
Médias [<i>laser</i> 0,75 W + carvão] a [<i>laser</i> 0,75 W + carvão + FFA]	3.4001	> 0.05
Médias [<i>laser</i> 0,75 W + FFA] a [<i>laser</i> 0,75 W + carvão + FFA]	0.0290	> 0.05

FIGURA 40: Intervalos de confiança (95%) para comparação entre os grupos [controle], [FFA], [*laser* 0,75 W], [*laser* 0,75 W + carvão], [*laser* 0,75 W + FFA] e [*laser* 0,75 W + carvão + FFA]. Dados originais.

De acordo com os resultados obtidos, observa-se que o grupo de amostras irradiadas com fluência *laser* de $8,5 \text{ J/cm}^2$ (0,75 W) apresentou perda mineral significativamente menor, ao nível de 1%, quando comparado ao grupo controle. A associação da irradiação *laser* com a pasta de pó de carvão, com FFA e com ambos os tratamentos também possibilitou a redução significativa, ao nível de 1%, quando comparado ao grupo controle. Entretanto, nenhum dos grupos em que a irradiação *laser* foi aplicada demonstrou perda mineral significativamente menor quando comparado ao grupo onde somente o FFA foi aplicado topicamente.

Os grupos onde a irradiação *laser* foi associada ao FFA, isto é, os grupos [*laser* 0,75 W + FFA] e [*laser* 0,75 W + carvão + FFA], apresentaram os menores valores de perda mineral; contudo, não houve diferença significativa entre estes grupos e os grupos [*laser* 0,75 W] e [*laser* 0,75 W + carvão], fato que evidenciou que a associação de tratamentos não interferiu na ação da irradiação *laser* com fluência de $8,5 \text{ J/cm}^2$ sobre o esmalte.

De acordo com o gráfico a seguir, o qual evidencia a ação em profundidade dos diferentes tratamentos, nota-se que os grupos [*laser* 0,75 W + FFA] e [*laser* 0,75 W + carvão + FFA] foram os que apresentaram maiores valores de conteúdo mineral; entretanto, estes valores não diferiram significativamente do

Resultados

grupo [FFA]. Todos os grupos irradiados, independentemente de sua associação com carvão ou FFA, promoveram significativo aumento no volume mineral quando comparado ao grupo controle.

FIGURA 41: Curvas representativas do conteúdo mineral das médias das amostras dos grupos onde o *laser* irradiou com fluência de $8,5 \text{ J/cm}^2$ (0,75 W), comparativamente aos grupos controle e FFA. As barras correspondem ao erro padrão. Letras distintas evidenciam médias significativamente diferentes entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Com as análises expostas acima, observa-se que o grupo onde foi aplicado apenas o FFA, assim como os grupos irradiados em associação ao FFA e ao carvão, foram os que promoveram menores valores de perda mineral. O gráfico a seguir ilustra os valores médios da perda mineral dos diferentes grupos irradiados, quando se observa que a associação [*laser* + carvão + FFA] foi a que promoveu menor valor médio de perda mineral.

FIGURA 42: Gráfico comparativo dos valores médios de Delta Z para os diferentes grupos irradiados e suas associações com carvão e FFA. Dados originais.

Assim, surge a necessidade de comparação estatística entre os diferentes grupos [*laser* + carvão + FFA], buscando-se evidenciar a condição *laser* que promove a menor perda mineral. O resultado da nova análise de variância, seguida pelo teste de Tukey, está descrito nas tabelas que se seguem.

TABELA 20: Resultado da análise de variância realizado para comparação entre os grupos [controle], [FFA], [*laser* 0,25 W + carvão + FFA], [*laser* 0,50 W + carvão + FFA] e [*laser* 0,75 W + carvão + FFA]. Dados originais.

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	11841866	4	2960467	30.15655	8.79722E-13	2.557179
Resíduo	4908497	50	98169.93			
Total	16750363	54				

TABELA 21: Comparações múltiplas realizadas pelo teste de Tukey. Dados originais.

<i>Tukey</i>	<i>Q</i>	<i>(p)</i>
Médias [controle] a [FFA]	9.6567	< 0.01
Médias [controle] a [laser 0,25 W + carvão + FFA]	12.9406	< 0.01
Médias [controle] a [laser 0,50 W + carvão + FFA]	13.0687	< 0.01
Médias [controle] a [laser 0,75 W + carvão + FFA]	11.9035	< 0.01
Médias [FFA] a [laser 0,25 W + carvão + FFA]	3.2840	> 0.05
Médias [FFA] a [laser 0,50 W + carvão + FFA]	3.4121	> 0.05
Médias [FFA] a [laser 0,75 W + carvão + FFA]	2.2469	> 0.05
Médias [laser 0,25 W + carvão + FFA] a [laser 0,50 W + carvão + FFA]	0.1281	> 0.05
Médias [laser 0,25 W + carvão + FFA] a [laser 0,75 W + carvão + FFA]	1.0371	> 0.05
Médias [laser 0,50 W + carvão + FFA] a [laser 0,75 W + carvão + FFA]	1.1652	> 0.05

FIGURA 43: Intervalos de confiança (95%) para comparação entre os grupos [controle], [FFA], *laser* 0,25 W + carvão + FFA, [*laser* 0,50 W + carvão + FFA] e [*laser* 0,75 W + carvão + FFA]. Dados originais.

Resultados

Conforme evidenciado pela análise estatística dos dados, todos os grupos irradiados e associados com carvão e FFA promoveram significativa diminuição da perda mineral (ao nível de 1%) quando comparados ao grupo controle. Nenhum deles foi capaz de promover perda mineral significativamente menor do que o grupo FFA. Entre os grupos irradiados, também não houve diferença estatística entre eles.

Na comparação dos efeitos destes tratamentos no volume mineral com relação à profundidade do esmalte, pode-se evidenciar que todas as fluências *laser* associadas ao carvão e ao FFA promoveram maiores valores de conteúdo mineral quando comparado aos grupos [controle]; com relação ao grupo [FFA], apenas os grupos [*laser* 0,25W + carvão + FFA] e [*laser* 0,75W + carvão + FFA] promoveram maiores valores de conteúdo mineral nas profundidades de 20 e 30 μm . Não foram detectadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos irradiados em todas as profundidades de esmalte analisadas.

FIGURA 44: Curvas representativas do conteúdo mineral das médias das amostras dos grupos onde o *laser* irradiou nas diferentes fluências, sempre associado com a aplicação de carvão e FFA, comparativamente aos grupos controle e FFA. As barras correspondem ao erro padrão. Letras distintas evidenciam médias significativamente diferentes entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

5.2.2. Análise da dissolução iônica durante o processo de cárie

Os resultados das dosagens de cálcio, fósforo inorgânico e flúor estão descritos separadamente a seguir. Para a análise de eletrólitos nas soluções de ciclagem de pH, optou-se pela análise separada das soluções **DES 5 dias**, **DES 10 dias**, **RE 5 dias** e **RE 10 dias**.

5.2.2.1. Análise de cálcio

As quantidades de cálcio encontradas nas soluções DES e RE após a ciclagem de pH, expressas em mM, são descritas na Tabela 20.

TABELA 22: Média e desvio padrão da concentração de cálcio (mM) encontrada nas soluções DES e RE, em 5 e 10 dias de ciclagem de pH. Dados originais.

Grupo	Discriminação	Após 5 dias		Após 10 dias	
		DES	RE	DES	RE
PM 1	Controle	2.10 ± 0.04	1.45 ± 0.18	2.14 ± 0.03	1.29 ± 0.10
PM 2	FFA	2.12 ± 0.08	1.30 ± 0.07	2.18 ± 0.15	1.19 ± 0.14
PM 3	0,25 W	2.22 ± 0.09	1.18 ± 0.10	2.27 ± 0.10	0.99 ± 0.08
PM 4	0,25 W + carvão	2.12 ± 0.10	1.28 ± 0.16	2.07 ± 0.09	1.21 ± 0.12
PM 5	0,25 W + FFA	2.16 ± 0.12	1.56 ± 0.23	2.24 ± 0.09	1.27 ± 0.08
PM 6	0,25 W + carvão + FFA	2.04 ± 0.16	1.36 ± 0.12	2.17 ± 0.04	1.26 ± 0.10
PM 7	0,50 W	2.03 ± 0.11	1.31 ± 0.07	2.13 ± 0.07	1.47 ± 0.11
PM 8	0,50 W + carvão	2.19 ± 0.07	1.23 ± 0.08	2.12 ± 0.04	1.18 ± 0.06
PM 9	0,50 W + FFA	2.08 ± 0.10	1.48 ± 0.25	1,98 ± 0.13	1.29 ± 0.17
PM 10	0,50 W + carvão + FFA	2.14 ± 0.14	1.47 ± 0.14	2.18 ± 0.06	1.31 ± 0.09
PM 11	0,75 W	2.09 ± 0.09	1.29 ± 0.13	2.18 ± 0.12	1.39 ± 0.10
PM 12	0,75 W + carvão	2.24 ± 0.07	1.32 ± 0.12	2.25 ± 0.08	1.36 ± 0.12
PM 13	0,75 W + FFA	2.19 ± 0.14	1.47 ± 0.25	2.23 ± 0.07	1.32 ± 0.10
PM 14	0,75 W + carvão + FFA	2.09 ± 0.19	1.24 ± 0.19	2.16 ± 0.06	1.25 ± 0.11

Ao se comparar as soluções DES e RE antes e após a ciclagem de pH, observou-se aumento significativo ($p < 0,05$) da concentração de cálcio nas soluções DES para todos os grupos, nos tempos de 5 e 10 dias. O mesmo não ocorreu para as soluções RE.

A tabela a seguir reporta os resultados obtidos da análise de variância para as soluções DES 5 dias, considerando inicialmente, da mesma forma que as análises realizadas anteriormente neste estudo, os grupos que não tiveram aplicação tópica de FFA. De acordo com os testes de Levene e Shapiro-Wilk, os resultados de normalidade e homogeneidade possibilitaram a realização da análise de variância e do teste Post Hoc de Tukey.

TABELA 23: Resultados da análise de variância realizada para comparação entre as quantidades de cálcio encontradas nas soluções **DES 5 dias** dos grupos [controle], [FFA], [*laser* 0,25 W], [*laser* 0,25 W + carvão], [*laser* 0,50 W], [*laser* 0,50 W + carvão], [*laser* 0,75 W] e [*laser* 0,75 W + carvão]. Dados originais.

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0.352469	7	0.050353	6.995778	2.34E-06	2.139657
Dentro dos grupos	0.518225	72	0.007198			
Total	0.870694	79				

Pode-se inferir, de acordo com os resultados obtidos, que a significância estatística observada na análise de variância deve-se ao grupo [*laser* 0,75 W + carvão], o qual obteve média significativamente maior (2.24 ± 0.07 mM Ca) do que os grupos [controle], [FFA], [*laser* 0,50 W] e [*laser* 0,75 W], conforme evidenciado pelo teste de Tukey. A aplicação prévia da pasta de carvão possibilitou o aumento significativo ($p < 0,01$) da concentração de cálcio das amostras irradiadas com *laser* a 0,50 W e 0,75 W; porém, tal efeito não se repetiu com as amostras irradiadas com *laser* a 0,25 W.

TABELA 24: Comparações múltiplas realizadas pelo teste de Tukey. Dados originais.

<i>Tukey</i>	<i>Q</i>	<i>(p)</i>
Médias [controle] a [FFA]	0.6773	> 0.05
Médias [controle] a [laser 0,25 W]	4.1893	> 0.05
Médias [controle] a [laser 0,25 W + carvão]	0.6098	> 0.05
Médias [controle] a [laser 0,50 W]	2.9200	> 0.05
Médias [controle] a [laser 0,50 W + carvão]	3.0676	> 0.05
Médias [controle] a [laser 0,75 W]	0.5313	> 0.05
Médias [controle] a [laser 0,75 W + carvão]	5.0117	< 0.05
Médias [FFA] a [laser 0,25 W]	3.5120	> 0.05
Médias [FFA] a [laser 0,25 W + carvão]	0.0675	> 0.05
Médias [FFA] a [laser 0,50 W]	3.5973	> 0.05
Médias [FFA] a [laser 0,50 W + carvão]	2.3903	> 0.05
Médias [FFA] a [laser 0,75 W]	1.2086	> 0.05
Médias [FFA] a [laser 0,75 W + carvão]	4.3343	> 0.05
Médias [laser 0,25 W] a [laser 0,25 W + carvão]	3.5795	> 0.05
Médias [laser 0,25 W] a [laser 0,50 W]	7.1093	< 0.01
Médias [laser 0,25 W] a [laser 0,50 W + carvão]	1.1217	> 0.05
Médias [laser 0,25 W] a [laser 0,75 W]	4.7206	< 0.05
Médias [laser 0,25 W] a [laser 0,75 W + carvão]	0.8223	> 0.05
Médias [laser 0,25 W + carvão] a [laser 0,50 W]	3.5298	> 0.05
Médias [laser 0,25 W + carvão] a [laser 0,50 W + carvão]	2.4578	> 0.05
Médias [laser 0,25 W + carvão] a [laser 0,75 W]	1.1411	> 0.05
Médias [laser 0,25 W + carvão] a [laser 0,75 W + carvão]	4.4018	> 0.05
Médias [laser 0,50 W] a [laser 0,50 W + carvão]	5.9876	< 0.01
Médias [laser 0,50 W] a [laser 0,75 W]	2.3887	> 0.05
Médias [laser 0,50 W] a [laser 0,75 W + carvão]	7.9316	< 0.01
Médias [laser 0,50 W + carvão] a [laser 0,75 W]	3.5989	> 0.05
Médias [laser 0,50 W + carvão] a [laser 0,75 W + carvão]	1.9440	> 0.05
Médias [laser 0,75 W] a [laser 0,75 W + carvão]	5.5430	< 0.01

Os resultados estatísticos a seguir referem-se à comparação entre as quantidades de cálcio das soluções **DES 5 dias** para os grupos [controle], [FFA], [laser 0,25 W + FFA], [laser 0,25 W + carvão + FFA], [laser 0,50 W + FFA], [laser 0,50 W + carvão + FFA], [laser 0,75 W + FFA] e [laser 0,75 W + carvão + FFA].

FIGURA 45: Intervalos de confiança (95%) para comparação entre a concentração de cálcio nas soluções DES 5 dias dos grupos [controle], [FFA], [*laser* 0,25 W], [*laser* 0,25 W + carvão], [*laser* 0,50 W], [*laser* 0,50 W + carvão], [*laser* 0,75 W] e [*laser* 0,75 W + carvão]. Dados originais.

TABELA 25: Resultados da análise de variância realizada para comparação entre as quantidades de cálcio encontradas nas soluções **DES 5 dias** dos grupos [controle], [FFA], [*laser* 0,25 W + FFA], [*laser* 0,25 W + carvão + FFA], [*laser* 0,50 W + FFA], [*laser* 0,50 W + carvão + FFA], [*laser* 0,75 W + FFA] e [*laser* 0,75 W + carvão + FFA]. Dados originais.

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	0.197071	7	0.028153	1.171257	0.33	2.139657
Resíduo	1.730636	72	0.024036			
Total	1.927707	79

FIGURA 46: Intervalos de confiança (95%) para comparação entre a concentração de cálcio nas soluções **DES 5 dias** dos grupos [controle], [FFA], [*laser* 0,25 W + FFA], [*laser* 0,25 W + carvão + FFA], [*laser* 0,50 W + FFA], [*laser* 0,50 W + carvão + FFA], [*laser* 0,75 W + FFA] e [*laser* 0,75 W + carvão + FFA]. Dados originais.

Conforme observado, não houve diferenças estatisticamente significativas na quantidade de cálcio detectadas nas soluções DES 5 dias entre as amostras tratadas com FFA, independentemente do tratamento prévio com *laser*, e o grupo controle. Ainda assim, não foram observadas diferenças entre os grupos ($p > 0,05$). A aplicação de carvão também não influenciou nas quantidades de cálcio detectadas nas soluções DES 5 dias. A FIG. 47 ilustra as médias obtidas nas soluções DES 5 dias, considerando os 14 grupos de tratamento, quando se pode visualizar de forma mais ampla os resultados das análises descritas anteriormente.

FIGURA 47: Representação gráfica das médias de cálcio (em mM) encontradas nas soluções **DES 5 dias**, em todos os grupos de tratamento deste estudo. As barras referem-se ao erro padrão.

As tabelas a seguir descrevem os resultados obtidos na análise estatística da quantidade de cálcio nas soluções **DES 10 dias**, quando, primeiramente, foram comparados entre si e com os grupos controle positivo e negativo os grupos que não tiveram aplicação de FFA. Para esta primeira análise, o teste robusto de Welch indicou que a distribuição destas amostras é homogênea e, assim, pôde ser utilizada análise de variância.

TABELA 26: Resultados da análise de variância realizada para comparação entre as quantidades de cálcio encontradas nas soluções **DES 10 dias** dos grupos [controle], [FFA], [laser 0,25 W], [laser 0,25 W + carvão], [laser 0,50 W], [laser 0,50 W + carvão], [laser 0,75 W] e [laser 0,75 W + carvão]. Dados originais.

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	0.409094	7	0.058442	4.904853	0.000144	2.139657
Resíduo	0.85789	72	0.011915			
Total	1.266984	79				

TABELA 27: Comparações múltiplas realizadas pelo teste de Tukey. Dados originais.

<i>Tukey</i>	<i>Q</i>	<i>(p)</i>
Médias [controle] a [FFA]	1.3323	ns
Médias [controle] a [laser 0,25 W]	4.3760	ns
Médias [controle] a [laser 0,25 W + carvão]	2.4075	ns
Médias [controle] a [laser 0,50 W]	1.4152	ns
Médias [controle] a [laser 0,50 W + carvão]	0.6773	ns
Médias [controle] a [laser 0,75 W]	1.0536	ns
Médias [controle] a [laser 0,75 W + carvão]	3.5203	ns
Médias [FFA] a [laser 0,25 W]	3.0437	ns
Médias [FFA] a [laser 0,25 W + carvão]	3.7398	ns
Médias [FFA] a [laser 0,50 W]	2.7475	ns
Médias [FFA] a [laser 0,50 W + carvão]	2.0096	ns
Médias [FFA] a [laser 0,75 W]	0.2787	ns
Médias [FFA] a [laser 0,75 W + carvão]	2.1880	ns
Médias [laser 0,25 W] a [laser 0,25 W + carvão]	6.7835	< 0.01
Médias [laser 0,25 W] a [laser 0,50 W]	5.7912	< 0.01
Médias [laser 0,25 W] a [laser 0,50 W + carvão]	5.0533	< 0.05
Médias [laser 0,25 W] a [laser 0,75 W]	3.3224	ns
Médias [laser 0,25 W] a [laser 0,75 W + carvão]	0.8557	ns
Médias [laser 0,25 W + carvão] a [laser 0,50 W]	0.9923	ns
Médias [laser 0,25 W + carvão] a [laser 0,50 W + carvão]	1.7302	ns
Médias [laser 0,25 W + carvão] a [laser 0,75 W]	3.4611	ns
Médias [laser 0,25 W + carvão] a [laser 0,75 W + carvão]	5.9278	< 0.01
Médias [laser 0,50 W] a [laser 0,50 W + carvão]	0.7379	ns
Médias [laser 0,50 W] a [laser 0,75 W]	2.4688	ns
Médias [laser 0,50 W] a [laser 0,75 W + carvão]	4.9355	< 0.05
Médias [laser 0,50 W + carvão] a [laser 0,75 W]	1.7309	ns
Médias [laser 0,50 W + carvão] a [laser 0,75 W + carvão]	4.1976	ns
Médias [laser 0,75 W] a [laser 0,75 W + carvão]	2.4667	ns

De acordo com os dados obtidos, observa-se que o grupo [laser 0,25W] apresentou a maior média de cálcio nas soluções DES 10 dias (2.31 ± 0.13 mM Ca), sendo significativamente maior do que os grupos [laser 0,25 W + carvão], [laser 0,50 W] e [laser 0,50 W + carvão], de acordo com os contrastes de Tukey. Também foram evidenciadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos [laser 0,25 W + carvão] e [laser 0,75 W + carvão] ($p < 0,01$) e [laser 0,25 W + carvão] e [laser 0,75 W + carvão]. Seguem-se, neste momento, as análises das soluções DES 10 dias para os grupos que tiveram aplicação de FFA, comparativamente com os grupos controle positivo e negativo. Como a distribuição destas amostras não se apresentou normal e homogênea, mesmo

Resultados

com a transformação dos dados, foi necessária a análise estatística utilizando-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls para identificação das comparações estatisticamente significativas.

FIGURA 48: Intervalos de confiança (95%) para comparação entre a concentração de cálcio nas soluções DES 10 dias dos grupos [controle], [FFA], [laser 0,25 W], [laser 0,25 W + carvão], [laser 0,50 W], [laser 0,50 W + carvão], [laser 0,75 W] e [laser 0,75 W + carvão]. Dados originais.

TABELA 28: Resultados do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para comparação entre as quantidades de cálcio encontradas nas soluções **DES 10 dias** dos grupos [controle], [FFA] e grupos irradiados com aplicação tópica de FFA. Dados originais.

Resultados do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis		
	Grupos	Postos médios
H = 28.2947 Graus de liberdade = 7 (p) Kruskal-Wallis = 0.0002	R [controle]	34.0000
	R [FFA]	37.4000
	R [laser 0,25 W + FFA]	56.1000
	R [laser 0,25 W + carvão + FFA]	44.8000
	R [laser 0,50 W + FFA]	10.2500
	R [laser 0,50 W + carvão + FFA]	44.5000
	R [laser 0,75 W + FFA]	57.3000
	R [laser 0,75 W + carvão + FFA]	39.6500

FIGURA 49: Intervalos de confiança (95%) para comparação entre a concentração de cálcio nas soluções **DES 10 dias** dos grupos [controle], [FFA], [*laser* 0,25 W + FFA], [*laser* 0,25 W + carvão + FFA], [*laser* 0,50 W + FFA], [*laser* 0,50 W + carvão + FFA], [*laser* 0,75 W + FFA] e [*laser* 0,75 W + carvão + FFA]. Dados originais.

Os resultados da análise estatística revelaram haver diferença significativa entre os grupos ($p = 0.0002$); o teste posterior de Student-Newman-Keuls evidenciou que o grupo [*laser* 0,50 W + FFA] apresentou a menor média de cálcio das soluções DES 10 dias ($1,98 \pm 0.13$ mM Ca), sendo esta significativamente diferente de todos os outros grupos comparados. Os demais grupos não apresentaram diferenças significativas entre si. O histograma a seguir ilustra as médias de cálcio encontradas nas soluções DES 10 dias para todos os grupos.

TABELA 29: Comparações entre os grupos realizadas pelo teste de Student-Newman-Keuls. Dados originais.

<i>Comparações Student-Newman-Keuls</i>	<i>Dif. Postos</i>	<i>p-valor</i>
Médias [controle] a [FFA]	3.4000	0.7435
Médias [controle] a [laser 0,25 W + FFA]	22.1000	0.0335
Médias [controle] a [laser 0,25 W + carvão + FFA]	10.8000	0.2987
Médias [controle] a [laser 0,50 W + FFA]	23.7500	0.0223
Médias [controle] a [laser 0,50 W + carvão + FFA]	10.5000	0.3123
Médias [controle] a [laser 0,75 W + FFA]	23.3000	0.0250
Médias [controle] a [laser 0,75 W + carvão + FFA]	5.6500	0.5867
Médias [FFA] a [laser 0,25 W + FFA]	18.7000	0.0720
Médias [FFA] a [laser 0,25 W + carvão + FFA]	7.4000	0.4764
Médias [FFA] a [laser 0,50 W + FFA]	27.1500	0.0090
Médias [FFA] a [laser 0,50 W + carvão + FFA]	7.1000	0.4945
Médias [FFA] a [laser 0,75 W + FFA]	19.9000	0.0555
Médias [FFA] a [laser 0,75 W + carvão + FFA]	2.2500	0.8286
Médias [laser 0,25 W + FFA] a [laser 0,25 W + carvão + FFA]	11.3000	0.2769
Médias [laser 0,25 W + FFA] a [laser 0,50 W + FFA]	45.8500	< 0.0001
Médias [laser 0,25 W + FFA] a [laser 0,50 W + carvão + FFA]	11.6000	0.2643
Médias [laser 0,25 W + FFA] a [laser 0,75 W + FFA]	1.2000	0.9081
Médias [laser 0,25 W + FFA] a [laser 0,75 W + carvão + FFA]	16.4500	0.1134
Médias [laser 0,25 W + carvão + FFA] a [laser 0,50 W + FFA]	34.5500	0.0009
Médias [laser 0,25 W + carvão + FFA] a [laser 0,50 W + carvão + FFA]	0.3000	0.9770
Médias [laser 0,25 W + carvão + FFA] a [laser 0,75 W + FFA]	12.5000	0.2290
Médias [laser 0,25 W + carvão + FFA] a [laser 0,75 W + carvão + FFA]	5.1500	0.6202
Médias [laser 0,50 W + FFA] a [laser 0,50 W + carvão + FFA]	34.2500	0.0010
Médias [laser 0,50 W + FFA] a [laser 0,75 W + FFA]	47.0500	< 0.0001
Médias [laser 0,50 W + FFA] a [laser 0,75 W + carvão + FFA]	29.4000	0.0047
Médias [laser 0,50 W + carvão + FFA] a [laser 0,75 W + FFA]	12.8000	0.2181
Médias [laser 0,50 W + carvão + FFA] a [laser 0,75 W + carvão + FFA]	4.8500	0.6407
Médias [laser 0,75 W + FFA] a [laser 0,75 W + carvão + FFA]	17.6500	0.0894

Resultados

FIGURA 50: Representação gráfica das médias de cálcio (em mM) encontradas nas soluções **DES 10 dias**, em todos os grupos de tratamento deste estudo. As barras referem-se ao erro padrão.

A figura a seguir ilustra as médias de todas as soluções DES utilizadas neste estudo para os diferentes grupos. Pode-se evidenciar que, nos grupos controle, FFA e nos grupos irradiados com 0,25 W, houve um discreto aumento na quantidade de cálcio nas soluções DES 10 dias quando comparadas com as soluções DES 5 dias. Entretanto, não houve diferenças evidenciadas estatisticamente na comparação entre as soluções DES 5 e 10 dias para todos os grupos.

FIGURA 51: Comparações entre as quantidades de cálcio constantes nas soluções DES 5 dias e DES 10 dias para todos os grupos. As barras referem-se ao erro padrão.

Resultados

Os resultados que se seguem referem-se à análise estatística dos valores de cálcio obtidos das soluções **RE 5 dias**. Para a realização da análise de variância, foi necessária a transformação logarítmica dos dados, o que possibilitou a obtenção de dados com distribuição homogênea.

TABELA 30: Resultados da análise de variância realizada para comparação entre as quantidades de cálcio encontradas nas soluções **RE 5 dias** dos grupos [controle], [FFA], [laser 0,25 W], [laser 0,25 W + carvão], [laser 0,50 W], [laser 0,50 W + carvão], [laser 0,75 W] e [laser 0,75 W + carvão]. Dados transformados.

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	0.043905	7	0.006272	3.78066	0.001515	2.139656
Dentro dos grupos	0.119447	72	0.001659			
Total	0.163352	79

FIGURA 52: Intervalos de confiança (95%) para comparação entre a concentração de cálcio nas soluções **RE 5 dias** dos grupos [controle], [FFA], [laser 0,25 W], [laser 0,25 W + carvão], [laser 0,50 W], [laser 0,50 W + carvão], [laser 0,75 W] e [laser 0,75 W + carvão]. Dados transformados.

Resultados

De acordo com a análise de variância, observa-se significância na comparação entre os grupos; entretanto, as diferenças referem-se à comparação do grupo controle com os grupos [laser 0,25 W] e [laser 0,50 W + carvão], os quais tiveram médias de cálcio nas soluções RE 5 dias significativamente menores do que o grupo controle. O grupo [laser 0,25 W] foi o que obteve os menores valores de cálcio nestas soluções (1.18 ± 0.10 mM).

TABELA 31: Comparações múltiplas realizadas pelo teste de Tukey. Dados transformados.

Tukey	Q	(p)
Médias [controle] a [FFA]	3.5224	ns
Médias [controle] a [laser 0,25 W]	6.7841	< 0.01
Médias [controle] a [laser 0,25 W + carvão]	4.0447	ns
Médias [controle] a [laser 0,50 W]	3.1998	ns
Médias [controle] a [laser 0,50 W + carvão]	5.3285	< 0.01
Médias [controle] a [laser 0,75 W]	3.6812	ns
Médias [controle] a [laser 0,75 W + carvão]	3.2367	ns
Médias [FFA] a [laser 0,25 W]	3.2617	ns
Médias [FFA] a [laser 0,25 W + carvão]	0.5223	ns
Médias [FFA] a [laser 0,50 W]	0.3226	ns
Médias [FFA] a [laser 0,50 W + carvão]	1.8061	ns
Médias [FFA] a [laser 0,75 W]	0.1587	ns
Médias [FFA] a [laser 0,75 W + carvão]	0.2857	ns
Médias [laser 0,25 W] a [laser 0,25 W + carvão]	2.7394	ns
Médias [laser 0,25 W] a [laser 0,50 W]	3.5843	ns
Médias [laser 0,25 W] a [laser 0,50 W + carvão]	1.4556	ns
Médias [laser 0,25 W] a [laser 0,75 W]	3.1030	ns
Médias [laser 0,25 W] a [laser 0,75 W + carvão]	3.5474	ns
Médias [laser 0,25 W + carvão] a [laser 0,50 W]	0.8449	ns
Médias [laser 0,25 W + carvão] a [laser 0,50 W + carvão]	1.2838	ns
Médias [laser 0,25 W + carvão] a [laser 0,75 W]	0.3636	ns
Médias [laser 0,25 W + carvão] a [laser 0,75 W + carvão]	0.8080	ns
Médias [laser 0,50 W] a [laser 0,50 W + carvão]	2.1287	ns
Médias [laser 0,50 W] a [laser 0,75 W]	0.4813	ns
Médias [laser 0,50 W] a [laser 0,75 W + carvão]	0.0369	ns
Médias [laser 0,50 W + carvão] a [laser 0,75 W]	1.6473	ns
Médias [laser 0,50 W + carvão] a [laser 0,75 W + carvão]	2.0918	ns
Médias [laser 0,75 W] a [laser 0,75 W + carvão]	0.4445	ns

Os resultados na comparação entre os grupos que tiveram aplicação de FFA encontram-se a seguir. Para estas análises, também foi necessária a

Resultados

transformação dos dados para logaritmos para obtenção de normalidade e homogeneidade necessárias para realização da análise de variância.

TABELA 32: Resultados da análise de variância realizada para comparação entre as quantidades de cálcio encontradas nas soluções **RE 5 dias** dos grupos [controle], [FFA], [*laser* 0,25 W + FFA], [*laser* 0,25 W + carvão + FFA], [*laser* 0,50 W + FFA], [*laser* 0,50 W + carvão + FFA], [*laser* 0,75 W + FFA] e [*laser* 0,75 W + carvão + FFA]. Dados transformados.

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	0.089291	7	0.012756	3.50788	0.00271	2.139656
Dentro dos grupos	0.261816	72	0.003636			
Total	0.351106	79

FIGURA 53: Intervalos de confiança (95%) para comparação entre a concentração de cálcio nas soluções RE 5 dias dos grupos [controle], [FFA], [*laser* 0,25 W + FFA], [*laser* 0,25 W + carvão + FFA], [*laser* 0,50 W + FFA], [*laser* 0,50 W + carvão + FFA], [*laser* 0,75 W + FFA] e [*laser* 0,75 W + carvão + FFA]. Dados transformados.

TABELA 33: Comparações múltiplas realizadas pelo teste de Tukey. Dados transformados.

Tukey	Q	(p)
Médias [controle] a [FFA]	3.7212	ns
Médias [controle] a [laser 0,25 W + FFA]	0.5435	ns
Médias [controle] a [laser 0,25 W + carvão + FFA]	2.3770	ns
Médias [controle] a [laser 0,50 W + FFA]	0.7154	ns
Médias [controle] a [laser 0,50 W + carvão + FFA]	0.5907	ns
Médias [controle] a [laser 0,75 W + FFA]	0.8013	ns
Médias [controle] a [laser 0,75 W + carvão + FFA]	4.7432	< 0.05
Médias [FFA] a [laser 0,25 W + FFA]	4.2647	ns
Médias [FFA] a [laser 0,25 W + carvão + FFA]	1.3442	ns
Médias [FFA] a [laser 0,50 W + FFA]	3.0058	ns
Médias [FFA] a [laser 0,50 W + carvão + FFA]	3.1305	ns
Médias [FFA] a [laser 0,75 W + FFA]	2.9199	ns
Médias [FFA] a [laser 0,75 W + carvão + FFA]	1.0220	ns
Médias [laser 0,25 W + FFA] a [laser 0,25 W + carvão + FFA]	2.9204	ns
Médias [laser 0,25 W + FFA] a [laser 0,50 W + FFA]	1.2589	ns
Médias [laser 0,25 W + FFA] a [laser 0,50 W + carvão + FFA]	1.1341	ns
Médias [laser 0,25 W + FFA] a [laser 0,75 W + FFA]	1.3448	ns
Médias [laser 0,25 W + FFA] a [laser 0,75 W + carvão + FFA]	5.2867	< 0.01
Médias [laser 0,25 W + carvão + FFA] a [laser 0,50 W + FFA]	1.6616	ns
Médias [laser 0,25 W + carvão + FFA] a [laser 0,50 W + carvão + FFA]	1.7863	ns
Médias [laser 0,25 W + carvão + FFA] a [laser 0,75 W + FFA]	1.5757	ns
Médias [laser 0,25 W + carvão + FFA] a [laser 0,75 W + carvão + FFA]	2.3663	ns
Médias [laser 0,50 W + FFA] a [laser 0,50 W + carvão + FFA]	0.1247	ns
Médias [laser 0,50 W + FFA] a [laser 0,75 W + FFA]	0.0859	ns
Médias [laser 0,50 W + FFA] a [laser 0,75 W + carvão + FFA]	4.0278	ns
Médias [laser 0,50 W + carvão + FFA] a [laser 0,75 W + FFA]	0.2106	ns
Médias [laser 0,50 W + carvão + FFA] a [laser 0,75 W + carvão + FFA]	4.1526	ns
Médias [laser 0,75 W + FFA] a [laser 0,75 W + carvão + FFA]	3.9420	ns

Nas soluções RE 5 dias, observa-se que o grupo [laser 0,75 W + carvão + FFA] apresentou médias significativamente inferiores aos grupos controle e [laser 0,25 W + FFA]. Não houve diferenças estatisticamente significativas na comparação entre os demais grupos. O grupo [laser 0,25 W + FFA] foi o que apresentou maiores quantidades de cálcio (1.56 ± 0.23 mM) nestas soluções.

FIGURA 54: Representação gráfica das médias de cálcio (em mM) encontradas nas soluções **RE 5 dias**, em todos os grupos de tratamento deste estudo. As barras referem-se ao erro padrão.

Os resultados a seguir referem-se à análise das quantidades de cálcio nas soluções **RE 10 dias**. Para a análise destes dados, os testes de homogeneidade e normalidade prévios indicaram que a distribuição destas amostras apresentava-se de acordo para a realização da análise de variância.

TABELA 34: Resultados da análise de variância realizada para comparação entre as quantidades de cálcio encontradas nas soluções **RE 10 dias** dos grupos [controle], [FFA], [*laser* 0,25 W], [*laser* 0,25 W + carvão], [*laser* 0,50 W], [*laser* 0,50 W + carvão], [*laser* 0,75 W] e [*laser* 0,75 W + carvão]. Dados originais.

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	1.649582	7	0.235655	19.2956	2.85E-14	2.139655
Dentro dos grupos	0.879324	72	0.012213			
Total	2.528906	79

FIGURA 55: Intervalos de confiança (95%) para comparação entre a concentração de cálcio nas soluções RE 10 dias dos grupos [controle], [FFA], [laser 0,25 W], [laser 0,25 W + carvão], [laser 0,50 W], [laser 0,50 W + carvão], [laser 0,75 W] e [laser 0,75 W + carvão]. Dados originais.

O grupo [laser 0,25 W] foi o que apresentou a menor média de cálcio nestas soluções (0.98 ± 0.07 mM Ca), sendo esta média significativamente inferior a todos grupos de tratamento do presente conjunto de amostras, conforme descrito na Tabela 33. O grupo [laser 0,50 W] apresentou a maior média deste conjunto de amostras ($1,47 \pm 0.11$ mM Ca), sendo significativamente superior aos grupos [controle], [FFA], [laser 0,25 W], [laser 0,25 W + carvão] e [laser 0,50 W + carvão]. Não houve diferenças detectadas estatisticamente na comparação entre as quantidades de cálcio nas soluções RE 10 dias de todos os grupos e os respectivos valores de cálcio iniciais, com exceção para o grupo [laser 0,25 W]. Também não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas nas comparações entre os demais grupos.

TABELA 35: Comparações múltiplas realizadas pelo teste de Tukey. Dados originais.

<i>Tukey</i>	<i>Q</i>	<i>(p)</i>
Médias [controle] a [FFA]	2.8404	> 0.05
Médias [controle] a [laser 0,25 W]	8.8850	< 0.01
Médias [controle] a [laser 0,25 W + carvão]	2.3965	> 0.05
Médias [controle] a [laser 0,50 W]	5.2392	< 0.01
Médias [controle] a [laser 0,50 W + carvão]	3.0815	> 0.05
Médias [controle] a [laser 0,75 W]	2.8448	> 0.05
Médias [controle] a [laser 0,75 W + carvão]	1.9573	> 0.05
Médias [FFA] a [laser 0,25 W]	6.0446	< 0.01
Médias [FFA] a [laser 0,25 W + carvão]	0.4440	> 0.05
Médias [FFA] a [laser 0,50 W]	8.0797	< 0.01
Médias [FFA] a [laser 0,50 W + carvão]	0.2411	> 0.05
Médias [FFA] a [laser 0,75 W]	5.6852	< 0.01
Médias [FFA] a [laser 0,75 W + carvão]	4.7977	< 0.05
Médias [laser 0,25 W] a [laser 0,25 W + carvão]	6.4886	< 0.01
Médias [laser 0,25 W] a [laser 0,50 W]	14.1243	< 0.01
Médias [laser 0,25 W] a [laser 0,50 W + carvão]	5.8035	< 0.01
Médias [laser 0,25 W] a [laser 0,75 W]	11.7298	< 0.01
Médias [laser 0,25 W] a [laser 0,75 W + carvão]	10.8423	< 0.01
Médias [laser 0,25 W + carvão] a [laser 0,50 W]	7.6357	< 0.01
Médias [laser 0,25 W + carvão] a [laser 0,50 W + carvão]	0.6850	> 0.05
Médias [laser 0,25 W + carvão] a [laser 0,75 W]	5.2412	< 0.01
Médias [laser 0,25 W + carvão] a [laser 0,75 W + carvão]	4.3537	> 0.05
Médias [laser 0,50 W] a [laser 0,50 W + carvão]	8.3207	< 0.01
Médias [laser 0,50 W] a [laser 0,75 W]	2.3945	> 0.05
Médias [laser 0,50 W] a [laser 0,75 W + carvão]	3.2820	> 0.05
Médias [laser 0,50 W + carvão] a [laser 0,75 W]	5.9263	< 0.01
Médias [laser 0,50 W + carvão] a [laser 0,75 W + carvão]	5.0387	< 0.05
Médias [laser 0,75 W] a [laser 0,75 W + carvão]	0.8875	> 0.05

Os resultados expostos a seguir valem para os grupos com aplicação de FFA, em comparação aos grupos controle e FFA, quando se demonstrou não haver diferença estatisticamente significativa na comparação entre tais grupos.

Resultados

TABELA 36: Resultados da análise de variância realizada para comparação entre as quantidades de cálcio encontradas nas soluções **RE 10 dias** dos grupos [controle], [FFA], [*laser* 0,25 W + FFA], [*laser* 0,25 W + carvão + FFA], [*laser* 0,50 W + FFA], [*laser* 0,50 W + carvão + FFA], [*laser* 0,75 W + FFA] e [*laser* 0,75 W + carvão + FFA]. Dados originais.

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	0.111152	7	0.015879	1.106641	0.36841	2.139656
Dentro dos grupos	1.033107	72	0.014349			
Total	1.14426	79				

Pelo gráfico a seguir, pode-se notar que os grupos [controle], [*laser* 0,25 W], [*laser* 0,25 W + FFA], [*laser* 0,25 W + carvão + FFA], [*laser* 0,50 W + FFA], [*laser* 0,50 W + carvão + FFA] e [*laser* 0,75 W + FFA] tiveram menores quantidades de cálcio nas soluções RE após 10 dias de ciclagem de pH, em comparação com as quantidades encontradas nas soluções RE 5 dias; tais diferenças não foram, contudo, evidenciadas estatisticamente, com exceção para o grupo [*laser* 0,25 W + FFA]. A comparação entre as quantidades de cálcio das soluções RE 5 e 10 dias dos demais grupos também não evidenciou diferenças estatisticamente significantes.

FIGURA 56: Representação gráfica das médias de cálcio (em mM) encontradas nas soluções RE 10 dias, em todos os grupos de tratamento deste estudo. As barras referem-se ao erro padrão.

FIGURA 57: Comparações entre as quantidades de cálcio constantes nas soluções RE 5 dias e RE 10 dias para todos os grupos. As barras referem-se ao erro padrão.

5.2.2.2. Análise de fósforo inorgânico

As quantidades de fósforo inorgânico encontradas nas soluções DES e RE após a ciclagem de pH, expressas em mM, são descritas na Tabela 58.

Ao se comparar as soluções DES e RE antes (inicial) e após a ciclagem de pH, observou-se aumento significativo ($p < 0,05$) da concentração de fósforo inorgânico nas soluções DES e RE para todos os grupos, nos tempos de 5 e 10 dias. Da mesma forma que o efetuado para a análise dos íons cálcio em solução, a análise estatística dos dados para a determinação de fósforo inorgânico nas soluções foi realizada comparando-se as soluções DES 5 dias, DES 10 dias, RE 5 dias e RE 10 dias de forma individualizada.

Resultados

TABELA 37: Média e desvio padrão da concentração de fósforo inorgânico (mM) encontrada nas soluções DES e RE, em 5 e 10 dias de ciclagem de pH. Dados originais.

Grupo	Discriminação	Após 5 dias		Após 10 dias	
		DES	RE	DES	RE
PM 1	Controle	2.33 ± 0.07	1.19 ± 0.19	2.31 ± 0.06	1.19 ± 0.29
PM 2	FFA	2.40 ± 0.13	1.34 ± 0.33	2.32 ± 0.09	1.38 ± 0.46
PM 3	0,25 W	2.24 ± 0.06	1.14 ± 0.40	2.49 ± 0.18	0.95 ± 0.14
PM 4	0,25 W + carvão	2.34 ± 0.09	2.38 ± 0.47	2,31 ± 0.10	1.71 ± 0.52
PM 5	0,25 W + FFA	2.28 ± 0.08	1.23 ± 0.37	2.43 ± 0.13	1.25 ± 0.32
PM 6	0,25 W + carvão + FFA	2.28 ± 0.10	1.48 ± 0.18	2.45 ± 0.11	1.77 ± 0.42
PM 7	0,50 W	2.29 ± 0.08	1.72 ± 0.36	2.29 ± 0.12	1.60 ± 0.19
PM 8	0,50 W + carvão	2.33 ± 0.06	1.71 ± 0.39	2.29 ± 0.07	1.53 ± 0.15
PM 9	0,50 W + FFA	2.29 ± 0.05	1.97 ± 0.77	2.29 ± 0.05	1.60 ± 0.34
PM 10	0,50 W + carvão + FFA	2.38 ± 0.13	1.57 ± 0.27	2.35 ± 0.05	1.55 ± 0.37
PM 11	0,75 W	2.27 ± 0.08	1.43 ± 0.33	2.27 ± 0.08	1.41 ± 0.29
PM 12	0,75 W + carvão	2.35 ± 0.09	1.71 ± 0.34	2.48 ± 0.06	1.60 ± 0.47
PM 13	0,75 W + FFA	2.52 ± 0.42	1.40 ± 0.40	2.36 ± 0.14	1.44 ± 0.36
PM 14	0,75 W + carvão + FFA	2.37 ± 0.08	1.54 ± 0.28	2.44 ± 0.05	1.42 ± 0.27

A figura a seguir ilustra as médias de fósforo inorgânico (Pi) encontradas nas soluções DES 5 dias para todos os grupos.

FIGURA 58: Representação gráfica das médias de fósforo inorgânico - Pi (em mM) encontradas nas soluções **DES 5 dias**, em todos os grupos de tratamento deste estudo. As barras referem-se ao erro padrão.

A tabela 36 reporta os resultados obtidos da análise de variância para as soluções DES 5 dias, considerando, inicialmente, os grupos que não tiveram aplicação de FFA, comparativamente aos grupos controle positivo e negativo. Levando-se em conta que houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos, houve a necessidade de realização do teste Post Hoc de Tukey.

TABELA 38: Resultados da análise de variância realizada para comparação entre as quantidades de fósforo inorgânico encontradas nas soluções **DES 5 dias** dos grupos [controle], [FFA], [laser 0,25 W], [laser 0,25 W + carvão], [laser 0,50 W], [laser 0,50 W + carvão], [laser 0,75 W] e [laser 0,75 W + carvão]. Dados originais.

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	0.200336	7	0.028619	3.888168	0.001206	2.139657
Resíduo	0.529966	72	0.007361			
Total	0.730302	79				

TABELA 39: Comparações múltiplas realizadas com o teste de Tukey. Dados originais.

<i>Tukey</i>	<i>Q</i>	<i>(p)</i>
Médias [controle] a [FFA]	2.6325	> 0.05
Médias [controle] a [laser 0,25 W]	3.0387	> 0.05
Médias [controle] a [laser 0,25 W + carvão]	0.5510	> 0.05
Médias [controle] a [laser 0,50 W]	1.0876	> 0.05
Médias [controle] a [laser 0,50 W + carvão]	0.1368	> 0.05
Médias [controle] a [laser 0,75 W]	3.1197	> 0.05
Médias [controle] a [laser 0,75 W + carvão]	0.9021	> 0.05
Médias [FFA] a [laser 0,25 W]	5.6712	< 0.01
Médias [FFA] a [laser 0,25 W + carvão]	2.0815	> 0.05
Médias [FFA] a [laser 0,50 W]	3.7201	> 0.05
Médias [FFA] a [laser 0,50 W + carvão]	2.4957	> 0.05
Médias [FFA] a [laser 0,75 W]	5.7522	< 0.01
Médias [FFA] a [laser 0,75 W + carvão]	1.7304	> 0.05
Médias [laser 0,25 W] a [laser 0,25 W + carvão]	3.5897	> 0.05
Médias [laser 0,25 W] a [laser 0,50 W]	1.9512	> 0.05
Médias [laser 0,25 W] a [laser 0,50 W + carvão]	3.1755	> 0.05
Médias [laser 0,25 W] a [laser 0,75 W]	0.0809	> 0.05
Médias [laser 0,25 W] a [laser 0,75 W + carvão]	3.9408	> 0.05
Médias [laser 0,25 W + carvão] a [laser 0,50 W]	1.6386	> 0.05
Médias [laser 0,25 W + carvão] a [laser 0,50 W + carvão]	0.4142	> 0.05
Médias [laser 0,25 W + carvão] a [laser 0,75 W]	3.6707	> 0.05
Médias [laser 0,25 W + carvão] a [laser 0,75 W + carvão]	0.3511	> 0.05
Médias [laser 0,50 W] a [laser 0,50 W + carvão]	1.2244	> 0.05
Médias [laser 0,50 W] a [laser 0,75 W]	2.0321	> 0.05
Médias [laser 0,50 W] a [laser 0,75 W + carvão]	1.9896	> 0.05
Médias [laser 0,50 W + carvão] a [laser 0,75 W]	3.2565	> 0.05
Médias [laser 0,50 W + carvão] a [laser 0,75 W + carvão]	0.7653	> 0.05
Médias [laser 0,75 W] a [laser 0,75 W + carvão]	4.0217	> 0.05

De acordo com os resultados obtidos, pode-se inferir que o grupo FFA apresentou média de Pi nas soluções **DES 5 dias** significativamente maior apenas que os grupos [laser 0,25 W] e [laser 0,75 W]. Não houve diferenças estatisticamente significativas nas demais comparações entre os grupos.

FIGURA 59: Intervalos de confiança (95%) para comparação entre a concentração de fósforo inorgânico (Pi) nas soluções **DES 5 dias** dos grupos [controle], [FFA], [*laser* 0,25 W], [*laser* 0,25 W + carvão], [*laser* 0,50 W], [*laser* 0,50 W + carvão], [*laser* 0,75 W] e [*laser* 0,75 W + carvão]. Dados originais.

As tabelas a seguir referem-se à análise estatística dos grupos em que o FFA foi aplicado, comparativamente aos grupos controle e FFA. Considerando os resultados dos testes prévios de Levene (homogeneidade), e Shapiro-Wilk (normalidade), observou-se que haveria necessidade de realização de teste não-paramétrico, uma vez que não foi possível a distribuição normal e homogênea dos dados, mesmo após sua transformação.

TABELA 40: Resultados do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para comparação entre as quantidades de fósforo inorgânico encontradas nas soluções **DES 5 dias** dos grupos [controle], [FFA], [*laser* 0,25 W + FFA], [*laser* 0,25 W + carvão + FFA], [*laser* 0,50 W + FFA], [*laser* 0,50 W + carvão + FFA], [*laser* 0,75 W + FFA] e [*laser* 0,75 W + carvão + FFA]. Dados originais.

Resultados do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis		
	Grupos	Postos médios
H = 14.1511 Graus de liberdade = 7 (p) Kruskal-Wallis = 0.0486	R [controle]	39.1000
	R [FFA]	48.8000
	R [<i>laser</i> 0,25 W + FFA]	28.9000
	R [<i>laser</i> 0,25 W + carvão + FFA]	28.2000
	R [<i>laser</i> 0,50 W + FFA]	28.9000
	R [<i>laser</i> 0,50 W + carvão + FFA]	50.0000
	R [<i>laser</i> 0,75 W + FFA]	50.4000
	R [<i>laser</i> 0,75 W + carvão + FFA]	49.7000

Os resultados das comparações entre cada grupo estão descritos na tabela 62 de acordo com o teste de Student-Newman-Keuls. Por estes resultados, observa-se não haver diferença estatisticamente significativa na comparação entre a quantidade de Pi presente nas soluções DES 5 dias para os grupos que tiveram aplicação de FFA, independentemente do tratamento prévio da superfície, com o grupo controle. O grupo [*laser* 0,75 W + FFA] apresentou a maior média deste conjunto de amostras ($2,52 \pm 0,42$ mM Pi), havendo significância nas comparações com os grupos [*laser* 0,25 W + FFA], [*laser* 0,25 W + carvão + FFA], [*laser* 0,50 W + FFA] e [*laser* 0,50 W + carvão + FFA].

TABELA 41: Comparações entre os grupos realizadas pelo teste de Student-Newman-Keuls. Dados originais.

<i>Comparações Student-Newman-Keuls</i>	<i>Dif. Postos</i>	<i>p-valor</i>
Médias [controle] a [FFA]	9.7000	0.3506
Médias [controle] a [laser 0,25 W + FFA]	10.2000	0.3263
Médias [controle] a [laser 0,25 W + carvão + FFA]	10.9000	0.2942
Médias [controle] a [laser 0,50 W + FFA]	10.2000	0.3263
Médias [controle] a [laser 0,50 W + carvão + FFA]	10.9000	0.2942
Médias [controle] a [laser 0,75 W + FFA]	11.3000	0.2769
Médias [controle] a [laser 0,75 W + carvão + FFA]	10.6000	0.3077
Médias [FFA] a [laser 0,25 W + FFA]	19.9000	0.0555
Médias [FFA] a [laser 0,25 W + carvão + FFA]	20.6000	0.0475
Médias [FFA] a [laser 0,50 W + FFA]	19.9000	0.0555
Médias [FFA] a [laser 0,50 W + carvão + FFA]	1.2000	0.9081
Médias [FFA] a [laser 0,75 W + FFA]	1.6000	0.8776
Médias [FFA] a [laser 0,75 W + carvão + FFA]	0.9000	0.9310
Médias [laser 0,25 W + FFA] a [laser 0,25 W + carvão + FFA]	0.7000	0.9463
Médias [laser 0,25 W + FFA] a [laser 0,50 W + FFA]	0.0000	1.0000
Médias [laser 0,25 W + FFA] a [laser 0,50 W + carvão + FFA]	21.1000	0.0423
Médias [laser 0,25 W + FFA] a [laser 0,75 W + FFA]	21.5000	0.0386
Médias [laser 0,25 W + FFA] a [laser 0,75 W + carvão + FFA]	20.8000	0.0453
Médias [laser 0,25 W + carvão + FFA] a [laser 0,50 W + FFA]	0.7000	0.9463
Médias [laser 0,25 W + carvão + FFA] a [laser 0,50 W + carvão + FFA]	21.8000	0.0359
Médias [laser 0,25 W + carvão + FFA] a [laser 0,75 W + FFA]	22.2000	0.0327
Médias [laser 0,25 W + carvão + FFA] a [laser 0,75 W + carvão + FFA]	21.5000	0.0386
Médias [laser 0,50 W + FFA] a [laser 0,50 W + carvão + FFA]	21.1000	0.0423
Médias [laser 0,50 W + FFA] a [laser 0,75 W + FFA]	21.5000	0.0386
Médias [laser 0,50 W + FFA] a [laser 0,75 W + carvão + FFA]	20.8000	0.0453
Médias [laser 0,50 W + carvão + FFA] a [laser 0,75 W + FFA]	0.4000	0.9693
Médias [laser 0,50 W + carvão + FFA] a [laser 0,75 W + carvão + FFA]	0.3000	0.9770
Médias [laser 0,75 W + FFA] a [laser 0,75 W + carvão + FFA]	0.7000	0.9463

As tabelas a seguir referem-se às análises da quantidade de fósforo inorgânico constantes nas soluções DES 10 dias.

Resultados

TABELA 42: Resultados do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para comparação entre as quantidades de fósforo inorgânico encontradas nas soluções **DES 10 dias** dos grupos [controle], [FFA], [*laser* 0,25 W], [*laser* 0,25 W + carvão], [*laser* 0,50 W], [*laser* 0,50 W + carvão], [*laser* 0,75 W] e [*laser* 0,75 W + carvão]. Dados originais.

Resultados do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis		
	Grupos	Postos médios
H = 26.1608 Graus de liberdade = 7 (p) Kruskal-Wallis = 0.0005	R [controle]	36.8500
	R [FFA]	39.0000
	R [<i>laser</i> 0,25 W]	59.3000
	R [<i>laser</i> 0,25 W + carvão]	35.9500
	R [<i>laser</i> 0,50 W]	29.8000
	R [<i>laser</i> 0,50 W + carvão]	31.0000
	R [<i>laser</i> 0,75 W]	26.6000
	R [<i>laser</i> 0,75 W + carvão]	65.5000

FIGURA 60: Intervalos de confiança (95%) para comparação entre a concentração de fósforo inorgânico (Pi) nas soluções **DES 10 dias** dos grupos [controle], [FFA], [*laser* 0,25 W], [*laser* 0,25 W + carvão], [*laser* 0,50 W], [*laser* 0,50 W + carvão], [*laser* 0,75 W] e [*laser* 0,75 W + carvão]. Dados originais.

TABELA 43: Comparações entre os grupos realizadas pelo teste de Student-Newman-Keuls. Dados originais.

<i>Comparações Student-Newman-Keuls</i>	<i>Dif. Postos</i>	<i>p-valor</i>
Médias [controle] a [FFA]	2.1500	0.8361
Médias [controle] a [laser 0,25 W]	22.4500	0.0308
Médias [controle] a [laser 0,25 W + carvão]	0.9000	0.9310
Médias [controle] a [laser 0,50 W]	7.0500	0.4975
Médias [controle] a [laser 0,50 W + carvão]	5.8500	0.5735
Médias [controle] a [laser 0,75 W]	10.2500	0.3240
Médias [controle] a [laser 0,75 W + carvão]	28.6500	0.0058
Médias [FFA] a [laser 0,25 W]	20.3000	0.0508
Médias [FFA] a [laser 0,25 W + carvão]	3.0500	0.7692
Médias [FFA] a [laser 0,50 W]	9.2000	0.3760
Médias [FFA] a [laser 0,50 W + carvão]	8.0000	0.4414
Médias [FFA] a [laser 0,75 W]	12.4000	0.2328
Médias [FFA] a [laser 0,75 W + carvão]	26.5000	0.0108
Médias [laser 0,25 W] a [laser 0,25 W + carvão]	23.3500	0.0246
Médias [laser 0,25 W] a [laser 0,50 W]	29.5000	0.0045
Médias [laser 0,25 W] a [laser 0,50 W + carvão]	28.3000	0.0065
Médias [laser 0,25 W] a [laser 0,75 W]	32.7000	0.0017
Médias [laser 0,25 W] a [laser 0,75 W + carvão]	6.2000	0.5508
Médias [laser 0,25 W + carvão] a [laser 0,50 W]	6.1500	0.5540
Médias [laser 0,25 W + carvão] a [laser 0,50 W + carvão]	4.9500	0.6339
Médias [laser 0,25 W + carvão] a [laser 0,75 W]	9.3500	0.3683
Médias [laser 0,25 W + carvão] a [laser 0,75 W + carvão]	29.5500	0.0045
Médias [laser 0,50 W] a [laser 0,50 W + carvão]	1.2000	0.9081
Médias [laser 0,50 W] a [laser 0,75 W]	3.2000	0.7581
Médias [laser 0,50 W] a [laser 0,75 W + carvão]	35.7000	0.0006
Médias [laser 0,50 W + carvão] a [laser 0,75 W]	4.4000	0.6720
Médias [laser 0,50 W + carvão] a [laser 0,75 W + carvão]	34.5000	0.0009
Médias [laser 0,75 W] a [laser 0,75 W + carvão]	38.9000	0.0002

De acordo com os dados obtidos, ressalta-se que o grupo [laser 0,25 w] foi o que apresentou a maior média de fósforo inorgânico nas soluções DES 10 dias (2.49 ± 0.18 mM Pi), sendo este valor significativamente superior aos dos grupos [controle], [laser 0,25 W + carvão], [laser 0,50 W], [laser 0,50 W + carvão] e [laser 0,75 W]. O grupo [laser 0,75 W + carvão] apresentou a segunda maior média (2.48 ± 0.06 mM Pi), sendo significativamente maior do que os grupos [controle], [FFA], [laser 0,25 W + carvão], [laser 0,50 W], [laser 0,50 W + carvão] e [laser 0,75 W].

Os dados que se seguem referem-se aos conteúdos de fósforo inorgânico das soluções DES 10 dias dos grupos [controle], [FFA], [laser 0,25 W +

Resultados

FFA], [laser 0,25 W + carvão + FFA], [laser 0,50 W + FFA], [laser 0,50 W + carvão + FFA], [laser 0,75 W + FFA] e [laser 0,75 W + carvão + FFA].

TABELA 44: Resultados do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para comparação entre as quantidades de fósforo inorgânico encontradas nas soluções **DES 10 dias** dos grupos [controle], [FFA], [laser 0,25 W + FFA], [laser 0,25 W + carvão + FFA], [laser 0,50 W + FFA], [laser 0,50 W + carvão + FFA], [laser 0,75 W + FFA] e [laser 0,75 W + carvão + FFA]. Dados originais.

Resultados do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis		
	Grupos	Postos médios
H = 26.6289 Graus de liberdade = 7 (p) Kruskal-Wallis = 0.0004	R [controle]	28.2000
	R [FFA]	31.1000
	R [laser 0,25 W + FFA]	51.3000
	R [laser 0,25 W + carvão + FFA]	57.7000
	R [laser 0,50 W + FFA]	19.3000
	R [laser 0,50 W + carvão + FFA]	37.2500
	R [laser 0,75 W + FFA]	40.6000
	R [laser 0,75 W + carvão + FFA]	58.5500

Pelo resultado obtido, vê-se que há diferença estatisticamente significativa entre os grupos; de acordo com o teste de Student-Newman-Keuls, observa-se que os grupos [laser 0,25 W + FFA], [laser 0,25 W + carvão + FFA] e [laser 0,75 W + carvão + FFA] apresentaram médias de Pi significativamente maiores do que o grupo controle ($p < 0.05$). Entretanto, apenas os grupos [laser 0,25 W + carvão + FFA] e [laser 0,75 W + carvão + FFA] apresentaram médias significativamente maiores do que o grupo [FFA]. Os resultados das demais comparações encontram-se a seguir.

TABELA 45: Comparações entre os grupos realizadas pelo teste de Student-Newman-Keuls. Dados originais.

<i>Comparações Student-Newman-Keuls</i>	<i>Dif. Postos</i>	<i>p-valor</i>
Médias [controle] a [FFA]	2.9000	0.7802
Médias [controle] a [laser 0,25 W + FFA]	23.1000	0.0262
Médias [controle] a [laser 0,25 W + carvão + FFA]	29.5000	0.0045
Médias [controle] a [laser 0,50 W + FFA]	8.9000	0.3918
Médias [controle] a [laser 0,50 W + carvão + FFA]	9.0500	0.3838
Médias [controle] a [laser 0,75 W + FFA]	12.4000	0.2328
Médias [controle] a [laser 0,75 W + carvão + FFA]	30.3500	0.0035
Médias [FFA] a [laser 0,25 W + FFA]	20.2000	0.0519
Médias [FFA] a [laser 0,25 W + carvão + FFA]	26.6000	0.0105
Médias [FFA] a [laser 0,50 W + FFA]	11.8000	0.2562
Médias [FFA] a [laser 0,50 W + carvão + FFA]	6.1500	0.5540
Médias [FFA] a [laser 0,75 W + FFA]	9.5000	0.3606
Médias [FFA] a [laser 0,75 W + carvão + FFA]	27.4500	0.0083
Médias [laser 0,25 W + FFA] a [laser 0,25 W + carvão + FFA]	6.4000	0.5380
Médias [laser 0,25 W + FFA] a [laser 0,50 W + FFA]	32.0000	0.0021
Médias [laser 0,25 W + FFA] a [laser 0,50 W + carvão + FFA]	14.0500	0.1764
Médias [laser 0,25 W + FFA] a [laser 0,75 W + FFA]	10.7000	0.3032
Médias [laser 0,25 W + FFA] a [laser 0,75 W + carvão + FFA]	7.2500	0.4854
Médias [laser 0,25 W + carvão + FFA] a [laser 0,50 W + FFA]	38.4000	0.0002
Médias [laser 0,25 W + carvão + FFA] a [laser 0,50 W + carvão + FFA]	20.4500	0.0491
Médias [laser 0,25 W + carvão + FFA] a [laser 0,75 W + FFA]	17.1000	0.0999
Médias [laser 0,25 W + carvão + FFA] a [laser 0,75 W + carvão + FFA]	0.8500	0.9348
Médias [laser 0,50 W + FFA] a [laser 0,50 W + carvão + FFA]	17.9500	0.0841
Médias [laser 0,50 W + FFA] a [laser 0,75 W + FFA]	21.3000	0.0404
Médias [laser 0,50 W + FFA] a [laser 0,75 W + carvão + FFA]	39.2500	0.0002
Médias [laser 0,50 W + carvão + FFA] a [laser 0,75 W + FFA]	3.3500	0.7472
Médias [laser 0,50 W + carvão + FFA] a [laser 0,75 W + carvão + FFA]	21.3000	0.0404
Médias [laser 0,75 W + FFA] a [laser 0,75 W + carvão + FFA]	17.9500	0.0841

Resultados

O gráfico a seguir ilustra as médias de Pi encontradas nas soluções DES 10 dias, o qual permite a visualização dos resultados expostos anteriormente.

FIGURA 61: Representação gráfica das médias de fósforo inorgânico - Pi (em mM) encontradas nas soluções **DES 10 dias**, em todos os grupos de tratamento deste estudo. As barras referem-se ao erro padrão.

De acordo com o gráfico a seguir, que ilustra as quantidades médias de Pi em todas as soluções desmineralizantes, pode-se inferir que apenas no grupo [laser 0,25 W] houve um aumento significativo de Pi na solução DES 10 dias quando comparado à solução DES 5 dias. Nos demais grupos de tratamento, as oscilações da quantidade de Pi entre as soluções DES 5 dias e DES 10 dias não se mostraram com diferenças significativas.

FIGURA 62: Comparações entre as quantidades de fósforo inorgânico (Pi) constantes nas soluções DES 5 dias e DES 10 dias para todos os grupos. As barras referem-se ao erro padrão.

Em seguida, foram realizadas as análises das concentrações de Pi nas soluções remineralizantes. A FIG. 63 ilustra as médias de Pi nas soluções RE 5 dias para os 14 grupos de tratamento e, em seguida, encontram-se os dados referentes às análises estatísticas realizadas.

FIGURA 63: Representação gráfica das médias de fósforo inorgânico (em mM) encontradas nas soluções **RE 5 dias**, em todos os grupos de tratamento deste estudo. As barras referem-se ao erro padrão.

Resultados

Os próximos dados referem-se à análise comparativa entre os grupos [controle], [FFA], [*laser* 0,25 W], [*laser* 0,25 W + carvão], [*laser* 0,50 W], [*laser* 0,50 W + carvão], [*laser* 0,75 W] e [*laser* 0,75 W + carvão]. Nesta etapa, foi possível realizar a análise de variância, seguida pelo teste Post Hoc de Tukey, devido à normalidade e homogeneidade dos dados.

TABELA 46: Resultados da análise de variância realizada para comparação entre as quantidades de fósforo inorgânico encontradas nas soluções **RE 5 dias** dos grupos [controle], [FFA], [*laser* 0,25 W], [*laser* 0,25 W + carvão], [*laser* 0,50 W], [*laser* 0,50 W + carvão], [*laser* 0,75 W] e [*laser* 0,75 W + carvão]. Dados originais.

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	4.983795	7	0.711971	5.323359	6.1464E-05	2.139657
Resíduo	9.629612	72	0.133745			
Total	14.61341	79

FIGURA 64: Intervalos de confiança (95%) para comparação entre a concentração de fósforo inorgânico nas soluções **RE 5 dias** dos grupos [controle], [FFA], [*laser* 0,25 W], [*laser* 0,25 W + carvão], [*laser* 0,50 W], [*laser* 0,50 W + carvão], [*laser* 0,75 W] e [*laser* 0,75 W + carvão]. Dados originais.

De acordo com o exposto, observa-se que os grupos [*laser* 0,25 W + carvão] e [*laser* 0,50 W + FFA] foram os que apresentaram as maiores médias de Pi nas soluções RE 5 dias (2.38 ± 0.47 e 1.88 ± 0.83 mM Pi, respectivamente).

Resultados

Algumas comparações entre os grupos apresentaram valores de $p < 0,05$, principalmente relacionados ao grupo [laser 0,25 W + carvão]. Tais comparações estão evidenciadas na tabela 45, a qual descreve os resultados obtidos de acordo com o teste de Tukey.

TABELA 47: Comparações múltiplas realizadas com o teste de Tukey. Dados originais.

Tukey	Q	(p)
Médias [controle] a [FFA]	0.7204	> 0.05
Médias [controle] a [laser 0,25 W]	1.0129	> 0.05
Médias [controle] a [laser 0,25 W + carvão]	5.3804	< 0.01
Médias [controle] a [laser 0,50 W]	4.0496	> 0.05
Médias [controle] a [laser 0,50 W + carvão]	3.9259	> 0.05
Médias [controle] a [laser 0,75 W]	1.5136	> 0.05
Médias [controle] a [laser 0,75 W + carvão]	3.9449	> 0.05
Médias [FFA] a [laser 0,25 W]	1.7333	> 0.05
Médias [FFA] a [laser 0,25 W + carvão]	4.6600	< 0.05
Médias [FFA] a [laser 0,50 W]	3.3292	> 0.05
Médias [FFA] a [laser 0,50 W + carvão]	3.2055	> 0.05
Médias [FFA] a [laser 0,75 W]	0.7932	> 0.05
Médias [FFA] a [laser 0,75 W + carvão]	3.2245	> 0.05
Médias [laser 0,25 W] a [laser 0,25 W + carvão]	6.3933	< 0.01
Médias [laser 0,25 W] a [laser 0,50 W]	5.0625	< 0.05
Médias [laser 0,25 W] a [laser 0,50 W + carvão]	4.9388	< 0.05
Médias [laser 0,25 W] a [laser 0,75 W]	2.5265	> 0.05
Médias [laser 0,25 W] a [laser 0,75 W + carvão]	4.9578	< 0.05
Médias [laser 0,25 W + carvão] a [laser 0,50 W]	1.3308	> 0.05
Médias [laser 0,25 W + carvão] a [laser 0,50 W + carvão]	1.4545	> 0.05
Médias [laser 0,25 W + carvão] a [laser 0,75 W]	3.8667	> 0.05
Médias [laser 0,25 W + carvão] a [laser 0,75 W + carvão]	1.4355	> 0.05
Médias [laser 0,50 W] a [laser 0,50 W + carvão]	0.1237	> 0.05
Médias [laser 0,50 W] a [laser 0,75 W]	2.5360	> 0.05
Médias [laser 0,50 W] a [laser 0,75 W + carvão]	0.1047	> 0.05
Médias [laser 0,50 W + carvão] a [laser 0,75 W]	2.4123	> 0.05
Médias [laser 0,50 W + carvão] a [laser 0,75 W + carvão]	0.0190	> 0.05
Médias [laser 0,75 W] a [laser 0,75 W + carvão]	2.4313	> 0.05

A seguir, encontram-se os resultados estatísticos para os grupos [controle], [FFA], [laser 0,25 W + FFA], [laser 0,25 W + carvão + FFA], [laser 0,50 W + FFA], [laser 0,50 W + carvão + FFA], [laser 0,75 W + FFA] e [laser 0,75 W + carvão + FFA]. Foi necessária a realização de teste não-paramétrico devido à distribuição não normal dos dados amostrais.

TABELA 48: Resultados do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para comparação entre as quantidades de fósforo inorgânico encontradas nas soluções **RE 5 dias** dos grupos [controle], [FFA], [*laser* 0,25 W + FFA], [*laser* 0,25 W + carvão + FFA], [*laser* 0,50 W + FFA], [*laser* 0,50 W + carvão + FFA], [*laser* 0,75 W + FFA] e [*laser* 0,75 W + carvão + FFA]. Dados originais.

Resultados do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis		
	Grupos	Postos médios
H = 20.0252 Graus de liberdade = 7 (p) Kruskal-Wallis = 0.0055	R [controle]	24.0000
	R [FFA]	33.6000
	R [<i>laser</i> 0,25 W + FFA]	24.6000
	R [<i>laser</i> 0,25 W + carvão + FFA]	47.0000
	R [<i>laser</i> 0,50 W + FFA]	56.2000
	R [<i>laser</i> 0,50 W + carvão + FFA]	51.4000
	R [<i>laser</i> 0,75 W + FFA]	37.2000
	R [<i>laser</i> 0,75 W + carvão + FFA]	50.0000

De acordo com os resultados obtidos, observa-se haver significância nas comparações entre os grupos supracitados. O grupo [controle] apresentou médias de Pi nas soluções RE 5 dias significativamente menores do que os grupos [*laser* 0,25 W + carvão + FFA], [*laser* 0,50 W + FFA], [*laser* 0,50 W + carvão + FFA] e [*laser* 0,75 W + carvão + FFA]. O grupo [*laser* 0,25 W + FFA] apresentou médias de Pi significativamente inferiores a todos os grupos comparados, com exceção feita ao grupo [controle].

TABELA 49: Comparações entre os grupos realizadas pelo teste de Student-Newman-Keuls. Dados originais.

<i>Comparações Student-Newman-Keuls</i>	<i>Dif. Postos</i>	<i>p-valor</i>
Médias [controle] a [FFA]	9.6000	0.3556
Médias [controle] a [laser 0,25 W + FFA]	0.6000	0.9540
Médias [controle] a [laser 0,25 W + carvão + FFA]	23.0000	0.0269
Médias [controle] a [laser 0,50 W + FFA]	32.2000	0.0019
Médias [controle] a [laser 0,50 W + carvão + FFA]	27.4000	0.0084
Médias [controle] a [laser 0,75 W + FFA]	13.2000	0.2040
Médias [controle] a [laser 0,75 W + carvão + FFA]	26.0000	0.0124
Médias [FFA] a [laser 0,25 W + FFA]	9.0000	0.3865
Médias [FFA] a [laser 0,25 W + carvão + FFA]	13.4000	0.1973
Médias [FFA] a [laser 0,50 W + FFA]	22.6000	0.0297
Médias [FFA] a [laser 0,50 W + carvão + FFA]	17.8000	0.0867
Médias [FFA] a [laser 0,75 W + FFA]	3.6000	0.7290
Médias [FFA] a [laser 0,75 W + carvão + FFA]	16.4000	0.1145
Médias [laser 0,25 W + FFA] a [laser 0,25 W + carvão + FFA]	22.4000	0.0311
Médias [laser 0,25 W + FFA] a [laser 0,50 W + FFA]	31.6000	0.0024
Médias [laser 0,25 W + FFA] a [laser 0,50 W + carvão + FFA]	26.8000	0.0099
Médias [laser 0,25 W + FFA] a [laser 0,75 W + FFA]	12.6000	0.2253
Médias [laser 0,25 W + FFA] a [laser 0,75 W + carvão + FFA]	25.4000	0.0145
Médias [laser 0,25 W + carvão + FFA] a [laser 0,50 W + FFA]	9.2000	0.3760
Médias [laser 0,25 W + carvão + FFA] a [laser 0,50 W + carvão + FFA]	4.4000	0.6720
Médias [laser 0,25 W + carvão + FFA] a [laser 0,75 W + FFA]	9.8000	0.3457
Médias [laser 0,25 W + carvão + FFA] a [laser 0,75 W + carvão + FFA]	3.0000	0.7728
Médias [laser 0,50 W + FFA] a [laser 0,50 W + carvão + FFA]	4.8000	0.6442
Médias [laser 0,50 W + FFA] a [laser 0,75 W + FFA]	19.0000	0.0675
Médias [laser 0,50 W + FFA] a [laser 0,75 W + carvão + FFA]	6.2000	0.5508
Médias [laser 0,50 W + carvão + FFA] a [laser 0,75 W + FFA]	14.2000	0.1718
Médias [laser 0,50 W + carvão + FFA] a [laser 0,75 W + carvão + FFA]	1.4000	0.8928
Médias [laser 0,75 W + FFA] a [laser 0,75 W + carvão + FFA]	12.8000	0.2181

Para as soluções **RE 10 dias**, as quantidades de Pi dosadas diferem das apresentadas para as soluções **RE 5 dias**. Considerando os grupos que

Resultados

tiveram aplicação tópica de FFA, observa-se que o grupo [*laser* 0,50 W + FFA] apresentou a maior média de Pi nas soluções RE 5 dias ($1,97 \pm 0,77$ mM Pi), sendo esta significativamente maior do que os grupos [controle], [FFA] e [*laser* 0,25 W + FFA]. Os grupos [*laser* 0,25 W + carvão + FFA], [*laser* 0,50 W + carvão + FFA] e [*laser* 0,75 W + carvão + FFA] também apresentaram maior dissolução de Pi quando comparados ao grupo [controle].

O gráfico a seguir ilustra as médias de Pi encontradas nas soluções RE 10 dias considerando todos os grupos de tratamento.

FIGURA 65: Representação gráfica das médias de fósforo inorgânico - Pi (em mM) encontradas nas soluções **RE 10 dias**. As barras referem-se ao erro padrão.

As tabelas que se seguem reportam os resultados da análise estatística realizada comparando-se os grupos [controle], [FFA], [*laser* 0,25 W], [*laser* 0,25 W + carvão], [*laser* 0,50 W], [*laser* 0,50 W + carvão], [*laser* 0,75 W] e [*laser* 0,75 W + carvão], quando foi necessária a realização de teste não-paramétrico devido à não-homogeneidade dos dados amostrais.

TABELA 50: Resultados do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para comparação entre as quantidades de fósforo inorgânico encontradas nas soluções **RE 5 dias** dos grupos [controle], [FFA], [*laser* 0,25 W], [*laser* 0,25 W + carvão], [*laser* 0,50 W], [*laser* 0,50 W + carvão], [*laser* 0,75 W] e [*laser* 0,75 W + carvão]. Dados originais.

Resultados do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis		
	Grupos	Postos médios
H = 31.5344 Graus de liberdade = 7 (p) Kruskal-Wallis = 0.0000	R [controle]	25.7000
	R [FFA]	38.1000
	R [<i>laser</i> 0,25 W]	11.1000
	R [<i>laser</i> 0,25 W + carvão]	55.2000
	R [<i>laser</i> 0,50 W]	54.9500
	R [<i>laser</i> 0,50 W + carvão]	51.2000
	R [<i>laser</i> 0,75 W]	38.8000
	R [<i>laser</i> 0,75 W + carvão]	48.9500

De acordo com os resultados obtidos, nota-se que o grupo [*laser* 0,25 W] apresentou a menor média de Pi nas soluções RE 10 dias, sendo significativamente menor do que as médias de Pi encontradas para todos os grupos considerados, com exceção do grupo [controle]. Em contraste, o grupo [controle] apresentou médias de Pi significativamente inferiores às encontradas nas análises das soluções RE 10 dias dos grupos [*laser* 0,25 W + carvão], [*laser* 0,50 W], [*laser* 0,50 W + carvão] e [*laser* 0,75 W + carvão].

TABELA 51: Comparações entre os grupos realizadas pelo teste de Student-Newman-Keuls. Dados originais.

<i>Comparações Student-Newman-Keuls</i>	<i>Dif. Postos</i>	<i>p-valor</i>
Médias [controle] a [FFA]	12.4000	0.2328
Médias [controle] a [laser 0,25 W]	14.6000	0.1601
Médias [controle] a [laser 0,25 W + carvão]	29.5000	0.0045
Médias [controle] a [laser 0,50 W]	29.2500	0.0049
Médias [controle] a [laser 0,50 W + carvão]	25.5000	0.0141
Médias [controle] a [laser 0,75 W]	13.1000	0.2075
Médias [controle] a [laser 0,75 W + carvão]	23.2500	0.0253
Médias [FFA] a [laser 0,25 W]	27.0000	0.0094
Médias [FFA] a [laser 0,25 W + carvão]	17.1000	0.0999
Médias [FFA] a [laser 0,50 W]	16.8500	0.1049
Médias [FFA] a [laser 0,50 W + carvão]	13.1000	0.2075
Médias [FFA] a [laser 0,75 W]	0.7000	0.9463
Médias [FFA] a [laser 0,75 W + carvão]	10.8500	0.2965
Médias [laser 0,25 W] a [laser 0,25 W + carvão]	44.1000	< 0.0001
Médias [laser 0,25 W] a [laser 0,50 W]	43.8500	< 0.0001
Médias [laser 0,25 W] a [laser 0,50 W + carvão]	40.1000	0.0001
Médias [laser 0,25 W] a [laser 0,75 W]	27.7000	0.0077
Médias [laser 0,25 W] a [laser 0,75 W + carvão]	37.8500	0.0003
Médias [laser 0,25 W + carvão] a [laser 0,50 W]	0.2500	0.9808
Médias [laser 0,25 W + carvão] a [laser 0,50 W + carvão]	4.0000	0.7003
Médias [laser 0,25 W + carvão] a [laser 0,75 W]	16.4000	0.1145
Médias [laser 0,25 W + carvão] a [laser 0,75 W + carvão]	6.2500	0.5476
Médias [laser 0,50 W] a [laser 0,50 W + carvão]	3.7500	0.7182
Médias [laser 0,50 W] a [laser 0,75 W]	16.1500	0.1202
Médias [laser 0,50 W] a [laser 0,75 W + carvão]	6.0000	0.5637
Médias [laser 0,50 W + carvão] a [laser 0,75 W]	12.4000	0.2328
Médias [laser 0,50 W + carvão] a [laser 0,75 W + carvão]	2.2500	0.8286
Médias [laser 0,75 W] a [laser 0,75 W + carvão]	10.1500	0.3287

As tabelas que se seguem referem-se à análise estatística das soluções RE 10 dias dos grupos que tiveram aplicação tópica de FFA, em comparação com os grupos controle positivo e negativo.

TABELA 52: Resultados da análise de variância realizada para comparação entre as quantidades de fósforo inorgânico encontradas nas soluções **RE 10 dias** dos grupos [controle], [FFA], [*laser* 0,25 W + FFA], [*laser* 0,25 W + carvão + FFA], [*laser* 0,50 W + FFA], [*laser* 0,50 W + carvão + FFA], [*laser* 0,75 W + FFA] e [*laser* 0,75 W + carvão + FFA]. Dados originais.

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	2.439056	7	0.348437	2.380575	0.030144	2.139657
Resíduo	10.53839	72	0.146367			
Total	12.97745	79

FIGURA 66: Intervalos de confiança (95%) para comparação entre a concentração de fósforo inorgânico (Pi) nas soluções **RE 10 dias** dos grupos [controle], [FFA], [*laser* 0,25 W + FFA], [*laser* 0,25 W + carvão + FFA], [*laser* 0,50 W + FFA], [*laser* 0,50 W + carvão + FFA], [*laser* 0,75 W + FFA] e [*laser* 0,75 W + carvão + FFA]. Dados originais.

Por esta análise, infere-se que não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos que tiveram aplicação tópica de FFA, independentemente do tratamento prévio da superfície. O grupo [*laser* 0,25 W + carvão + FFA] apresentou a maior média deste conjunto de dados, sendo significativamente maior quando comparado apenas ao grupo [controle].

TABELA 53: Comparações múltiplas realizadas com o teste de Tukey. Dados originais.

<i>Tukey</i>	<i>Q</i>	<i>(p)</i>
Médias [controle] a [FFA]	2.6032	> 0.05
Médias [controle] a [laser 0,25 W + FFA]	0.4395	> 0.05
Médias [controle] a [laser 0,25 W + carvão + FFA]	4.7482	< 0.05
Médias [controle] a [laser 0,50 W + FFA]	3.4034	> 0.05
Médias [controle] a [laser 0,50 W + carvão + FFA]	2.9200	> 0.05
Médias [controle] a [laser 0,75 W + FFA]	2.0755	> 0.05
Médias [controle] a [laser 0,75 W + carvão + FFA]	1.8697	> 0.05
Médias [FFA] a [laser 0,25 W + FFA]	2.1637	> 0.05
Médias [FFA] a [laser 0,25 W + carvão + FFA]	2.1450	> 0.05
Médias [FFA] a [laser 0,50 W + FFA]	0.8001	> 0.05
Médias [FFA] a [laser 0,50 W + carvão + FFA]	0.3168	> 0.05
Médias [FFA] a [laser 0,75 W + FFA]	0.5278	> 0.05
Médias [FFA] a [laser 0,75 W + carvão + FFA]	0.7336	> 0.05
Médias [laser 0,25 W + FFA] a [laser 0,25 W + carvão + FFA]	4.3087	> 0.05
Médias [laser 0,25 W + FFA] a [laser 0,50 W + FFA]	2.9639	> 0.05
Médias [laser 0,25 W + FFA] a [laser 0,50 W + carvão + FFA]	2.4805	> 0.05
Médias [laser 0,25 W + FFA] a [laser 0,75 W + FFA]	1.6360	> 0.05
Médias [laser 0,25 W + FFA] a [laser 0,75 W + carvão + FFA]	1.4302	> 0.05
Médias [laser 0,25 W + carvão + FFA] a [laser 0,50 W + FFA]	1.3449	> 0.05
Médias [laser 0,25 W + carvão + FFA] a [laser 0,50 W + carvão + FFA]	1.8282	> 0.05
Médias [laser 0,25 W + carvão + FFA] a [laser 0,75 W + FFA]	2.6728	> 0.05
Médias [laser 0,25 W + carvão + FFA] a [laser 0,75 W + carvão + FFA]	2.8786	> 0.05
Médias [laser 0,50 W + FFA] a [laser 0,50 W + carvão + FFA]	0.4833	> 0.05
Médias [laser 0,50 W + FFA] a [laser 0,75 W + FFA]	1.3279	> 0.05
Médias [laser 0,50 W + FFA] a [laser 0,75 W + carvão + FFA]	1.5337	> 0.05
Médias [laser 0,50 W + carvão + FFA] a [laser 0,75 W + FFA]	0.8445	> 0.05
Médias [laser 0,50 W + carvão + FFA] a [laser 0,75 W + carvão + FFA]	1.0503	> 0.05
Médias [laser 0,75 W + FFA] a [laser 0,75 W + carvão + FFA]	0.2058	> 0.05

A figura a seguir ilustra a variação de Pi nas soluções RE de 5 e 10 dias, para todos os grupos. Pode-se observar que não houve um padrão estabelecido para as oscilações das quantidades de Pi quando comparadas as soluções RE 5 dias e RE 10 dias para todos os grupos de tratamento. Também não foram detectadas diferenças estatisticamente significativas na comparação entre as quantidades de Pi para as soluções RE de 5 e 10 dias, para todos os 14 grupos.

FIGURA 67: Comparações entre as quantidades de fósforo inorgânico (Pi) constantes nas soluções RE 5 dias e RE 10 dias para todos os grupos. As barras referem-se ao erro padrão.

5.2.2.3. Análise de íon flúor

As quantidades de flúor encontradas nas soluções DES e RE após a ciclagem de pH, expressas em $\mu\text{g F}^-/\text{mL}$, são descritas na Tabela 52.

Resultados

TABELA 54: Média e desvio padrão da concentração de flúor ($\mu\text{g F}^-/\text{mL}$) encontrada nas soluções DES e RE, em 5 e 10 dias de ciclagem de pH. Dados originais.

Grupo	Discriminação	Após 5 dias		Após 10 dias	
		DES	RE	DES	RE
PM 1	Controle	0.03 $\pm$ 0.00	0.04 $\pm$ 0.04	0.03 $\pm$ 0.00	0.02 $\pm$ 0.02
PM 2	FFA	0.04 $\pm$ 0.00	0.05 $\pm$ 0.03	0.04 $\pm$ 0.01	0.06 $\pm$ 0.04
PM 3	0,25 W	0.03 $\pm$ 0.01	0.02 $\pm$ 0.03	0.04 $\pm$ 0.01	0.03 $\pm$ 0.01
PM 4	0,25 W + carvão	0.03 $\pm$ 0.00	0.12 $\pm$ 0.07	0.03 $\pm$ 0.00	0.07 $\pm$ 0.03
PM 5	0,25 W + FFA	0.04 $\pm$ 0.01	0.03 $\pm$ 0.03	0.03 $\pm$ 0.00	0.04 $\pm$ 0.04
PM 6	0,25 W + carvão + FFA	0.04 $\pm$ 0.01	0.11 $\pm$ 0.05	0.04 $\pm$ 0.00	0.14 $\pm$ 0.03
PM 7	0,50 W	0.04 $\pm$ 0.00	0.05 $\pm$ 0.02	0.04 $\pm$ 0.00	0.05 $\pm$ 0.04
PM 8	0,50 W + carvão	0.04 $\pm$ 0.00	0.11 $\pm$ 0.03	0.03 $\pm$ 0.00	0.12 $\pm$ 0.03
PM 9	0,50 W + FFA	0.06 $\pm$ 0.01	0.10 $\pm$ 0.09	0.04 $\pm$ 0.01	0.13 $\pm$ 0.07
PM 10	0,50 W + carvão + FFA	0.06 $\pm$ 0.01	0.11 $\pm$ 0.04	0.03 $\pm$ 0.00	0.10 $\pm$ 0.04
PM 11	0,75 W	0.03 $\pm$ 0.00	0.08 $\pm$ 0.06	0.04 $\pm$ 0.00	0.03 $\pm$ 0.01
PM 12	0,75 W + carvão	0.03 $\pm$ 0.00	0.09 $\pm$ 0.02	0.03 $\pm$ 0.00	0.04 $\pm$ 0.03
PM 13	0,75 W + FFA	0.06 $\pm$ 0.01	0.13 $\pm$ 0.06	0.04 $\pm$ 0.01	0.09 $\pm$ 0.07
PM 14	0,75 W + carvão + FFA	0.06 $\pm$ 0.02	0.14 $\pm$ 0.05	0.04 $\pm$ 0.00	0.07 $\pm$ 0.03

Conforme mostrado para as análises de cálcio e fósforo inorgânico das soluções des- e remineralizantes, a análise de flúor foi também realizada de forma segmentada, considerando-se as soluções DES 5 dias, DES 10 dias, RE 5 dias e RE 10 dias de forma isolada.

Para a análise das soluções desmineralizantes, não foi possível realizar a análise de variância pois os dados não se apresentaram distribuídos de forma homogênea, assim como não foi possível realizar transformações estatísticas que permitissem a homogeneização dos mesmos. Desta forma, optou-se pela realização de análise não paramétrica, empregando-se o teste de Kruskal-Wallis seguido pelas comparações de Student-Newman-Keuls.

Resultados

A seguir, estão apresentados os resultados da análise estatística realizada para comparação entre os grupos que não tiveram aplicação de FFA, comparativamente aos grupos controle e FFA.

TABELA 55: Resultados do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis. Dados originais.

Resultados do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis		
	Grupos	Postos médios
H = 56.1872 Graus de liberdade = 7 (p) Kruskal-Wallis = 0.0000	R [controle]	27.0000
	R [FFA]	62.1000
	R [laser 0,25 W]	36.2000
	R [laser 0,25 W + carvão]	27.0000
	R [laser 0,50 W]	54.3000
	R [laser 0,50 W + carvão]	66.0000
	R [laser 0,75 W]	27.0000
	R [laser 0,75 W + carvão]	24.4000

FIGURA 68: Representação gráfica das médias de flúor ($\mu\text{g F}^-/\text{mL}$) encontradas nas soluções **DES 5 dias**, para os grupos que não tiveram aplicação tópica de FFA, em comparação com os grupos controle e FFA. As barras referem-se ao erro padrão.

TABELA 56: Comparações entre os grupos realizadas pelo teste de Student-Newman-Keuls. Dados originais.

<i>Comparações Student-Newman-Keuls</i>	<i>Dif. Postos</i>	<i>p-valor</i>
Médias [controle] a [FFA]	35.1000	0.0007
Médias [controle] a [laser 0,25 W]	9.2000	0.3760
Médias [controle] a [laser 0,25 W + carvão]	0.0000	1.0000
Médias [controle] a [laser 0,50 W]	27.3000	0.0086
Médias [controle] a [laser 0,50 W + carvão]	39.0000	0.0002
Médias [controle] a [laser 0,75 W]	0.0000	1.0000
Médias [controle] a [laser 0,75 W + carvão]	2.6000	0.8024
Médias [FFA] a [laser 0,25 W]	25.9000	0.0127
Médias [FFA] a [laser 0,25 W + carvão]	35.1000	0.0007
Médias [FFA] a [laser 0,50 W]	7.8000	0.4529
Médias [FFA] a [laser 0,50 W + carvão]	3.9000	0.7075
Médias [FFA] a [laser 0,75 W]	35.1000	0.0007
Médias [FFA] a [laser 0,75 W + carvão]	37.7000	0.0003
Médias [laser 0,25 W] a [laser 0,25 W + carvão]	9.2000	0.3760
Médias [laser 0,25 W] a [laser 0,50 W]	18.1000	0.0816
Médias [laser 0,25 W] a [laser 0,50 W + carvão]	29.8000	0.0041
Médias [laser 0,25 W] a [laser 0,75 W]	9.2000	0.3760
Médias [laser 0,25 W] a [laser 0,75 W + carvão]	11.8000	0.2562
Médias [laser 0,25 W + carvão] a [laser 0,50 W]	27.3000	0.0086
Médias [laser 0,25 W + carvão] a [laser 0,50 W + carvão]	39.0000	0.0002
Médias [laser 0,25 W + carvão] a [laser 0,75 W]	0.0000	1.0000
Médias [laser 0,25 W + carvão] a [laser 0,75 W + carvão]	2.6000	0.8024
Médias [laser 0,50 W] a [laser 0,50 W + carvão]	11.7000	0.2602
Médias [laser 0,50 W] a [laser 0,75 W]	27.3000	0.0086
Médias [laser 0,50 W] a [laser 0,75 W + carvão]	29.9000	0.0040
Médias [laser 0,50 W + carvão] a [laser 0,75 W]	39.0000	0.0002
Médias [laser 0,50 W + carvão] a [laser 0,75 W + carvão]	41.6000	< 0.0001
Médias [laser 0,75 W] a [laser 0,75 W + carvão]	2.6000	0.8024

Pode-se observar, pelas análises acima, que os grupos [FFA] e [laser 0,50 W + carvão] apresentaram as maiores médias de flúor nas soluções DES 5 dias, não havendo diferença estatisticamente significativa entre eles, porém ambos apresentando médias significativamente superiores aos grupos [laser 0,25 W], [laser 0,25 W + carvão], [laser 0,75 W] e [laser 0,75 W + carvão]. O grupo [laser 0,75 W + carvão] apresentou a menor média, significativamente inferiores aos grupos [FFA] e [laser 0,50 W + carvão]. Nas concentrações de flúor encontradas, não foi observada relação com a irradiação laser ou a aplicação de carvão.

Os dados a seguir referem-se aos grupos [controle], [FFA], [laser

Resultados

0,25 W + FFA], [laser 0,25 W + carvão + FFA], [laser 0,50 W + FFA], [laser 0,50 W + carvão + FFA], [laser 0,75 W + FFA] e [laser 0,75 W + carvão + FFA].

TABELA 57: Resultados do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis para os grupos [controle], [FFA], [laser 0,25 W + FFA], [laser 0,25 W + carvão + FFA], [laser 0,50 W + FFA], [laser 0,50 W + carvão + FFA], [laser 0,75 W + FFA] e [laser 0,75 W + carvão + FFA]. Dados originais.

Resultados do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis		
	Grupos	Postos médios
H = 53.2108 Graus de liberdade = 7 (p) Kruskal-Wallis = 0.0000	R [controle]	6.5000
	R [FFA]	23.6000
	R [laser 0,25 W + FFA]	31.5500
	R [laser 0,25 W + carvão + FFA]	33.4500
	R [laser 0,50 W + FFA]	56.2000
	R [laser 0,50 W + carvão + FFA]	61.9000
	R [laser 0,75 W + FFA]	54.5500
	R [laser 0,75 W + carvão + FFA]	56.2500

FIGURA 69: Representação gráfica das médias de flúor ($\mu\text{g F}^-/\text{mL}$) encontradas nas soluções **DES 5 dias**, para os grupos [controle], [FFA], [laser 0,25 W + FFA], [laser 0,25 W + carvão + FFA], [laser 0,50 W + FFA], [laser 0,50 W + carvão + FFA], [laser 0,75 W + FFA] e [laser 0,75 W + carvão + FFA]. As barras referem-se ao erro padrão.

TABELA 58: Comparações entre os grupos realizadas pelo teste de Student-Newman-Keuls. Dados originais.

<i>Comparações Student-Newman-Keuls</i>	<i>Dif. Postos</i>	<i>p-valor</i>
Médias [controle] a [FFA]	17.1000	0.0999
Médias [controle] a [laser 0,25 W + FFA]	25.0500	0.0159
Médias [controle] a [laser 0,25 W + carvão + FFA]	26.9500	0.0095
Médias [controle] a [laser 0,50 W + FFA]	49.7000	< 0.0001
Médias [controle] a [laser 0,50 W + carvão + FFA]	55.4000	< 0.0001
Médias [controle] a [laser 0,75 W + FFA]	48.0500	< 0.0001
Médias [controle] a [laser 0,75 W + carvão + FFA]	49.7500	< 0.0001
Médias [FFA] a [laser 0,25 W + FFA]	7.9500	0.4443
Médias [FFA] a [laser 0,25 W + carvão + FFA]	9.8500	0.3432
Médias [FFA] a [laser 0,50 W + FFA]	32.6000	0.0017
Médias [FFA] a [laser 0,50 W + carvão + FFA]	38.3000	0.0002
Médias [FFA] a [laser 0,75 W + FFA]	30.9500	0.0029
Médias [FFA] a [laser 0,75 W + carvão + FFA]	32.6500	0.0017
Médias [laser 0,25 W + FFA] a [laser 0,25 W + carvão + FFA]	1.9000	0.8549
Médias [laser 0,25 W + FFA] a [laser 0,50 W + FFA]	24.6500	0.0177
Médias [laser 0,25 W + FFA] a [laser 0,50 W + carvão + FFA]	30.3500	0.0035
Médias [laser 0,25 W + FFA] a [laser 0,75 W + FFA]	23.0000	0.0269
Médias [laser 0,25 W + FFA] a [laser 0,75 W + carvão + FFA]	24.7000	0.0175
Médias [laser 0,25 W + carvão + FFA] a [laser 0,50 W + FFA]	22.7500	0.0286
Médias [laser 0,25 W + carvão + FFA] a [laser 0,50 W + carvão + FFA]	28.4500	0.0062
Médias [laser 0,25 W + carvão + FFA] a [laser 0,75 W + FFA]	21.1000	0.0423
Médias [laser 0,25 W + carvão + FFA] a [laser 0,75 W + carvão + FFA]	22.8000	0.0282
Médias [laser 0,50 W + FFA] a [laser 0,50 W + carvão + FFA]	5.7000	0.5834
Médias [laser 0,50 W + FFA] a [laser 0,75 W + FFA]	1.6500	0.8739
Médias [laser 0,50 W + FFA] a [laser 0,75 W + carvão + FFA]	0.0500	0.9962
Médias [laser 0,50 W + carvão + FFA] a [laser 0,75 W + FFA]	7.3500	0.4794
Médias [laser 0,50 W + carvão + FFA] a [laser 0,75 W + carvão + FFA]	5.6500	0.5867
Médias [laser 0,75 W + FFA] a [laser 0,75 W + carvão + FFA]	1.7000	0.8701

Pode-se observar, nesta etapa, que os grupos [laser 0,50 W + carvão + FFA] e [laser 0,75 W + carvão + FFA] apresentaram as maiores médias

Resultados

de flúor nas soluções DES 5 dias, sendo ambas as médias dos grupos significativamente superiores aos grupos [controle], [FFA], [laser 0,25 W + carvão] e [laser 0,25 W + carvão + FFA]. Todos os grupos irradiados com aplicação de FFA tiveram médias significativamente maiores do que o grupo [controle]. A aplicação prévia de carvão promoveu um discreto aumento das médias de flúor nas soluções DES 5 dias, porém sem diferença estatística quando comparadas com os grupos irradiados sem a pasta de carvão.

O gráfico a seguir ilustra as médias dos 14 grupos, de forma a permitir uma visualização global dos resultados obtidos para as soluções DES 5 dias.

FIGURA 70: Representação gráfica das médias de flúor (µg F⁻/mL) encontradas nas soluções **DES 5 dias**, em todos os grupos de tratamento deste estudo. As barras referem-se ao erro padrão.

As tabelas a seguir evidenciam os resultados obtidos para as soluções DES 10 dias.

TABELA 59: Resultados do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis para os grupos [controle], [FFA], [laser 0,25 W], [laser 0,25 W + carvão], [laser 0,50 W], [laser 0,50 W + carvão], [laser 0,75 W] e [laser 0,75 W + carvão]. Dados originais.

Resultados do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis		
	Grupos	Postos médios
H = 49.2775 Graus de liberdade = 7 (p) Kruskal-Wallis = 0.0000	R [controle]	26.5000
	R [FFA]	47.6500
	R [laser 0,25 W]	46.2500
	R [laser 0,25 W + carvão]	26.5000
	R [laser 0,50 W]	66.0000
	R [laser 0,50 W + carvão]	26.5000
	R [laser 0,75 W]	58.1000
	R [laser 0,75 W + carvão]	26.5000

FIGURA 71: Representação gráfica das médias de flúor ($\mu\text{g F}^-/\text{mL}$) encontradas nas soluções **DES 10 dias**, para os grupos [controle], [FFA], [laser 0,25 W], [laser 0,25 W + carvão], [laser 0,50 W], [laser 0,50 W + carvão], [laser 0,75 W] e [laser 0,75 W + carvão]. As barras referem-se ao erro padrão.

De acordo com os resultados obtidos na comparação entre os grupos que não tiveram aplicação tópica de FFA, observa-se que, nas soluções DES 10 dias, o grupo [laser 0,50W] apresentou a maior média de flúor, seguido pelo grupo [laser 0,75 W]. Tais grupos apresentaram quantidade de flúor similar ao grupo [FFA] e significativamente maior do que o grupo controle. Os grupos

Resultados

irradiados com aplicação prévia de carvão apresentaram quantidade de flúor semelhante ao grupo [controle] e significativamente inferior ao grupo [FFA]. Estes achados estão evidenciados pelas comparações realizadas pelo teste de Student-Newman-Keuls.

TABELA 60: Comparações entre os grupos realizadas pelo teste de Student-Newman-Keuls. Dados originais.

<i>Comparações Student-Newman-Keuls</i>	<i>Dif. Postos</i>	<i>p-valor</i>
Médias [controle] a [FFA]	21.1500	0.0418
Médias [controle] a [laser 0,25 W]	19.7500	0.0574
Médias [controle] a [laser 0,25 W + carvão]	0.0000	1.0000
Médias [controle] a [laser 0,50 W]	39.5000	0.0001
Médias [controle] a [laser 0,50 W + carvão]	0.0000	1.0000
Médias [controle] a [laser 0,75 W]	31.6000	0.0024
Médias [controle] a [laser 0,75 W + carvão]	0.0000	1.0000
Médias [FFA] a [laser 0,25 W]	1.4000	0.8928
Médias [FFA] a [laser 0,25 W + carvão]	21.1500	0.0418
Médias [FFA] a [laser 0,50 W]	18.3500	0.0774
Médias [FFA] a [laser 0,50 W + carvão]	21.1500	0.0418
Médias [FFA] a [laser 0,75 W]	10.4500	0.3146
Médias [FFA] a [laser 0,75 W + carvão]	21.1500	0.0418
Médias [laser 0,25 W] a [laser 0,25 W + carvão]	19.7500	0.0574
Médias [laser 0,25 W] a [laser 0,50 W]	19.7500	0.0574
Médias [laser 0,25 W] a [laser 0,50 W + carvão]	19.7500	0.0574
Médias [laser 0,25 W] a [laser 0,75 W]	11.8500	0.2542
Médias [laser 0,25 W] a [laser 0,75 W + carvão]	19.7500	0.0574
Médias [laser 0,25 W + carvão] a [laser 0,50 W]	39.5000	0.0001
Médias [laser 0,25 W + carvão] a [laser 0,50 W + carvão]	0.0000	1.0000
Médias [laser 0,25 W + carvão] a [laser 0,75 W]	31.6000	0.0024
Médias [laser 0,25 W + carvão] a [laser 0,75 W + carvão]	0.0000	1.0000
Médias [laser 0,50 W] a [laser 0,50 W + carvão]	39.5000	0.0001
Médias [laser 0,50 W] a [laser 0,75 W]	7.9000	0.4471
Médias [laser 0,50 W] a [laser 0,75 W + carvão]	39.5000	0.0001
Médias [laser 0,50 W + carvão] a [laser 0,75 W]	31.6000	0.0024
Médias [laser 0,50 W + carvão] a [laser 0,75 W + carvão]	0.0000	1.0000
Médias [laser 0,75 W] a [laser 0,75 W + carvão]	31.6000	0.0024

A seguir, encontram-se os dados pertinentes às comparações entre os grupos [controle], [FFA], [laser 0,25 W + FFA], [laser 0,25 W + carvão + FFA], [laser 0,50 W + FFA], [laser 0,50 W + carvão + FFA], [laser 0,75 W + FFA] e [laser 0,75 W + carvão + FFA].

TABELA 61: Resultados do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis para os grupos [controle], [FFA], [laser 0,25 W + FFA], [laser 0,25 W + carvão + FFA], [laser 0,50 W + FFA], [laser 0,50 W + carvão + FFA], [laser 0,75 W + FFA] e [laser 0,75 W + carvão + FFA]. Dados originais.

Resultados do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis		
	Grupos	Postos médios
H = 32.9327 Graus de liberdade = 7 (p) Kruskal-Wallis = 0.0000	R [controle]	19.0000
	R [FFA]	39.4500
	R [laser 0,25 W + FFA]	26.3000
	R [laser 0,25 W + carvão + FFA]	51.8500
	R [laser 0,50 W + FFA]	54.4500
	R [laser 0,50 W + carvão + FFA]	29.9500
	R [laser 0,75 W + FFA]	58.4500
	R [laser 0,75 W + carvão + FFA]	44.5500

FIGURA 72: Representação gráfica das médias de flúor ($\mu\text{g F}^-/\text{mL}$) encontradas nas soluções **DES 10 dias**, para os grupos [controle], [FFA], [laser 0,25 W + FFA], [laser 0,25 W + carvão + FFA], [laser 0,50 W + FFA], [laser 0,50 W + carvão + FFA], [laser 0,75 W + FFA] e [laser 0,75 W + carvão + FFA]. As barras referem-se ao erro padrão.

De acordo com as médias de flúor detectadas, observa-se que o grupo [laser 0,75 W + FFA] foi o que apresentou a maior concentração de flúor nas soluções DES 10 dias, sendo estatisticamente maior do que os grupos

[controle] e [FFA]. As demais diferenças estatisticamente significantes observadas encontram-se descritas na tabela 60.

TABELA 62: Comparações entre os grupos realizadas pelo teste de Student-Newman-Keuls. Dados originais.

<i>Comparações Student-Newman-Keuls</i>	<i>Dif. Postos</i>	<i>p-valor</i>
Médias [controle] a [FFA]	20.4500	0.0491
Médias [controle] a [laser 0,25 W + FFA]	7.3000	0.4824
Médias [controle] a [laser 0,25 W + carvão + FFA]	32.8500	0.0016
Médias [controle] a [laser 0,50 W + FFA]	35.4500	0.0006
Médias [controle] a [laser 0,50 W + carvão + FFA]	10.9500	0.2920
Médias [controle] a [laser 0,75 W + FFA]	39.4500	0.0001
Médias [controle] a [laser 0,75 W + carvão + FFA]	25.5500	0.0139
Médias [FFA] a [laser 0,25 W + FFA]	13.1500	0.2057
Médias [FFA] a [laser 0,25 W + carvão + FFA]	12.4000	0.2328
Médias [FFA] a [laser 0,50 W + FFA]	15.0000	0.1489
Médias [FFA] a [laser 0,50 W + carvão + FFA]	9.5000	0.3606
Médias [FFA] a [laser 0,75 W + FFA]	19.0000	0.0675
Médias [FFA] a [laser 0,75 W + carvão + FFA]	5.1000	0.6236
Médias [laser 0,25 W + FFA] a [laser 0,25 W + carvão + FFA]	25.5500	0.0139
Médias [laser 0,25 W + FFA] a [laser 0,50 W + FFA]	28.1500	0.0068
Médias [laser 0,25 W + FFA] a [laser 0,50 W + carvão + FFA]	3.6500	0.7254
Médias [laser 0,25 W + FFA] a [laser 0,75 W + FFA]	32.1500	0.0020
Médias [laser 0,25 W + FFA] a [laser 0,75 W + carvão + FFA]	18.2500	0.0791
Médias [laser 0,25 W + carvão + FFA] a [laser 0,50 W + FFA]	2.6000	0.8024
Médias [laser 0,25 W + carvão + FFA] a [laser 0,50 W + carvão + FFA]	21.9000	0.0351
Médias [laser 0,25 W + carvão + FFA] a [laser 0,75 W + FFA]	6.6000	0.5254
Médias [laser 0,25 W + carvão + FFA] a [laser 0,75 W + carvão + FFA]	7.3000	0.4824
Médias [laser 0,50 W + FFA] a [laser 0,50 W + carvão + FFA]	24.5000	0.0184
Médias [laser 0,50 W + FFA] a [laser 0,75 W + FFA]	4.0000	0.7003
Médias [laser 0,50 W + FFA] a [laser 0,75 W + carvão + FFA]	9.9000	0.3408
Médias [laser 0,50 W + carvão + FFA] a [laser 0,75 W + FFA]	28.5000	0.0061
Médias [laser 0,50 W + carvão + FFA] a [laser 0,75 W + carvão + FFA]	14.6000	0.1601
Médias [laser 0,75 W + FFA] a [laser 0,75 W + carvão + FFA]	13.9000	0.1811

FIGURA 73: Comparações entre as quantidades de flúor constantes nas soluções DES 5 dias e DES 10 dias para todos os grupos. As barras referem-se ao erro padrão.

As tabelas que se seguem referem-se às análises das concentrações de flúor encontradas nas soluções RE 5 dias, para os grupos que não receberam tratamento com FFA. Para estas análises, houve a necessidade de transformação logarítmica dos dados buscando-se condição de normalidade e homogeneidade. Tal condição permitiu o emprego de análise de variância, seguida pelo teste de Tukey.

TABELA 63: Resultados da análise de variância realizada para comparação entre as quantidades de flúor encontradas nas soluções **RE 5 dias** dos grupos [controle], [FFA], [laser 0,25 W], [laser 0,25 W + carvão], [laser 0,50 W], [laser 0,50 W + carvão], [laser 0,75 W] e [laser 0,75 W + carvão]. Dados transformados.

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	0.013117	7	0.001874	13.0372	1.029E-10	2.139656
Dentro dos grupos	0.010348	72	0.000144			
Total	0.023465	79				

TABELA 64: Comparações múltiplas realizadas com o teste de Tukey. Dados transformados.

<i>Tukey</i>	<i>Q</i>	<i>(p)</i>
Médias [controle] a [FFA]	1.7648	ns
Médias [controle] a [laser 0,25 W]	0.8896	ns
Médias [controle] a [laser 0,25 W + carvão]	7.9715	< 0.01
Médias [controle] a [laser 0,50 W]	2.3314	ns
Médias [controle] a [laser 0,50 W + carvão]	8.4666	< 0.01
Médias [controle] a [laser 0,75 W]	4.0518	ns
Médias [controle] a [laser 0,75 W + carvão]	6.8194	< 0.01
Médias [FFA] a [laser 0,25 W]	2.6543	ns
Médias [FFA] a [laser 0,25 W + carvão]	6.2068	< 0.01
Médias [FFA] a [laser 0,50 W]	0.5666	ns
Médias [FFA] a [laser 0,50 W + carvão]	6.7018	< 0.01
Médias [FFA] a [laser 0,75 W]	2.2870	ns
Médias [FFA] a [laser 0,75 W + carvão]	5.0546	< 0.05
Médias [laser 0,25 W] a [laser 0,25 W + carvão]	8.8611	< 0.01
Médias [laser 0,25 W] a [laser 0,50 W]	3.2210	ns
Médias [laser 0,25 W] a [laser 0,50 W + carvão]	9.3562	< 0.01
Médias [laser 0,25 W] a [laser 0,75 W]	4.9414	< 0.05
Médias [laser 0,25 W] a [laser 0,75 W + carvão]	7.7090	< 0.01
Médias [laser 0,25 W + carvão] a [laser 0,50 W]	5.6401	< 0.01
Médias [laser 0,25 W + carvão] a [laser 0,50 W + carvão]	0.4950	ns
Médias [laser 0,25 W + carvão] a [laser 0,75 W]	3.9198	ns
Médias [laser 0,25 W + carvão] a [laser 0,75 W + carvão]	1.1521	ns
Médias [laser 0,50 W] a [laser 0,50 W + carvão]	6.1352	< 0.01
Médias [laser 0,50 W] a [laser 0,75 W]	1.7204	ns
Médias [laser 0,50 W] a [laser 0,75 W + carvão]	4.4880	< 0.05
Médias [laser 0,50 W + carvão] a [laser 0,75 W]	4.4148	ns
Médias [laser 0,50 W + carvão] a [laser 0,75 W + carvão]	1.6472	ns
Médias [laser 0,75 W] a [laser 0,75 W + carvão]	2.7676	ns

De acordo com o obtido, observa-se que os grupos irradiados com aplicação prévia de carvão apresentaram médias de flúor nas soluções RE 5 dias significativamente maiores do que as médias apresentadas nos grupos [controle] e [FFA]. A aplicação de carvão previamente às irradiações aumentou significativamente as quantidades de flúor detectadas nas soluções RE 5 dias para as potências 0,25 W e 0,50 W quando comparadas aos seus respectivos grupos sem aplicação de carvão; o mesmo não ocorreu com a potência de 0,75 W.

FIGURA 74: Intervalos de confiança (95%) para comparação entre a concentração de flúor nas soluções **RE 5 dias** dos grupos [controle], [FFA], [laser 0,25 W], [laser 0,25 W + carvão], [laser 0,50 W], [laser 0,50 W + carvão], [laser 0,75 W] e [laser 0,75 W + carvão]. Dados transformados.

A seguir, são apresentados os resultados da análise estatística realizada para a comparação dos grupos que tiveram aplicação tópica de FFA, para as soluções RE 5 dias. Para este conjunto de dados, não foi necessária a transformação dos mesmos pois a distribuição encontra-se dentro dos padrões de homogeneidade e normalidade.

TABELA 65: Resultados da análise de variância realizada para comparação entre as quantidades de flúor encontradas nas soluções **RE 5 dias** dos grupos [controle], [FFA], [laser 0,25 W + FFA], [laser 0,25 W + carvão + FFA], [laser 0,50 W + FFA], [laser 0,50 W + carvão + FFA], [laser 0,75 W + FFA] e [laser 0,75 W + carvão + FFA]. Dados originais.

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	0.15398	7	0.021997	16.25738	1.216E-12	2.139657
Resíduo	0.09742	72	0.001353			
Total	0.2514	79				

TABELA 66: Comparações múltiplas realizadas com o teste de Tukey. Dados originais.

Tukey	Q	(p)
Médias [controle] a [FFA]	1.3755	ns
Médias [controle] a [laser 0,25 W + FFA]	0.3439	ns
Médias [controle] a [laser 0,25 W + carvão + FFA]	6.8777	< 0.01
Médias [controle] a [laser 0,50 W + FFA]	3.6967	ns
Médias [controle] a [laser 0,50 W + carvão + FFA]	5.6741	< 0.01
Médias [controle] a [laser 0,75 W + FFA]	9.5428	< 0.01
Médias [controle] a [laser 0,75 W + carvão + FFA]	10.3165	< 0.01
Médias [FFA] a [laser 0,25 W + FFA]	1.0316	ns
Médias [FFA] a [laser 0,25 W + carvão + FFA]	5.5021	< 0.01
Médias [FFA] a [laser 0,50 W + FFA]	2.3212	ns
Médias [FFA] a [laser 0,50 W + carvão + FFA]	4.2985	ns
Médias [FFA] a [laser 0,75 W + FFA]	8.1672	< 0.01
Médias [FFA] a [laser 0,75 W + carvão + FFA]	8.9410	< 0.01
Médias [laser 0,25 W + FFA] a [laser 0,25 W + carvão + FFA]	6.5338	< 0.01
Médias [laser 0,25 W + FFA] a [laser 0,50 W + FFA]	3.3529	ns
Médias [laser 0,25 W + FFA] a [laser 0,50 W + carvão + FFA]	5.3302	< 0.01
Médias [laser 0,25 W + FFA] a [laser 0,75 W + FFA]	9.1989	< 0.01
Médias [laser 0,25 W + FFA] a [laser 0,75 W + carvão + FFA]	9.9726	< 0.01
Médias [laser 0,25 W + carvão + FFA] a [laser 0,50 W + FFA]	3.1809	ns
Médias [laser 0,25 W + carvão + FFA] a [laser 0,50 W + carvão + FFA]	1.2036	ns
Médias [laser 0,25 W + carvão + FFA] a [laser 0,75 W + FFA]	2.6651	ns
Médias [laser 0,25 W + carvão + FFA] a [laser 0,75 W + carvão + FFA]	3.4388	ns
Médias [laser 0,50 W + FFA] a [laser 0,50 W + carvão + FFA]	1.9773	ns
Médias [laser 0,50 W + FFA] a [laser 0,75 W + FFA]	5.8460	< 0.01
Médias [laser 0,50 W + FFA] a [laser 0,75 W + carvão + FFA]	6.6198	< 0.01
Médias [laser 0,50 W + carvão + FFA] a [laser 0,75 W + FFA]	3.8687	ns
Médias [laser 0,50 W + carvão + FFA] a [laser 0,75 W + carvão + FFA]	4.6424	< 0.05
Médias [laser 0,75 W + FFA] a [laser 0,75 W + carvão + FFA]	0.7737	ns

Para as soluções RE 5 dias, pode-se inferir, de acordo com a análise dos dados, que os grupos [laser 0,25 W + carvão + FFA], [laser 0,50 W + carvão + FFA], [laser 0,75 W + FFA] e [laser 0,75 W + carvão + FFA] apresentaram médias de flúor significativamente superiores ($p < 0,01$) ao grupo [controle]. Estes mesmos grupos, com exceção do grupo [laser 0,50 W + carvão + FFA], apresentaram também médias de flúor significativamente maiores do que o grupo [FFA]. Pode-se observar também que a aplicação prévia de carvão induziu a um

Resultados

aumento nas concentrações de flúor encontradas nas soluções RE 5 dias das amostras irradiadas; entretanto, este fenômeno somente foi evidenciado estatisticamente na comparação entre os grupos [*laser* 0,25 W + FFA] e [*laser* 0,25 W + carvão + FFA].

FIGURA 75: Intervalos de confiança (95%) para comparação entre a concentração de flúor nas soluções RE 5 dias dos grupos [controle], [FFA], [*laser* 0,25 W + FFA], [*laser* 0,25 W + carvão + FFA], [*laser* 0,50 W + FFA], [*laser* 0,50 W + carvão + FFA], [*laser* 0,75 W + FFA] e [*laser* 0,75 W + carvão + FFA]. Dados originais.

Os resultados a seguir referem-se às análises de flúor pertinentes às soluções RE 10 dias, quando foi realizado teste não paramétrico devido a não homogeneidade dos dados, além da impossibilidade de transformação dos mesmos.

De acordo com os resultados obtidos, observa-se que todos os grupos considerados apresentaram médias de flúor nas soluções RE 10 dias significativamente maiores ($p < 0,05$) do que o grupo controle, com exceção feita para o grupo [*laser* 0,25 W], o qual não demonstrou diferença estatisticamente significativa quando comparado ao grupo controle ($p > 0,05$).

TABELA 67: Resultados do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis para os grupos [controle], [FFA], [laser 0,25 W], [laser 0,25 W + carvão], [laser 0,50 W], [laser 0,50 W + carvão], [laser 0,75 W] e [laser 0,75 W + carvão]. Dados originais.

Resultados do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis		
	Grupos	Postos médios
H = 47.8144 Graus de liberdade = 7 (p) Kruskal-Wallis = 0.0000	R [controle]	10.1000
	R [FFA]	45.6500
	R [laser 0,25 W]	28.0000
	R [laser 0,25 W + carvão]	57.9500
	R [laser 0,50 W]	39.4500
	R [laser 0,50 W + carvão]	73.1000
	R [laser 0,75 W]	34.7000
	R [laser 0,75 W + carvão]	35.0500

FIGURA 76: Médias de concentração de flúor nas soluções RE 10 dias encontradas considerando os grupos [controle], [FFA], [laser 0,25 W], [laser 0,25 W + carvão], [laser 0,50 W], [laser 0,50 W + carvão], [laser 0,75 W] e [laser 0,75 W + carvão]. As barras referem-se ao erro padrão.

Todos os grupos considerados apresentaram médias de concentração de flúor similares ao grupo [FFA], porém, o grupo [laser 0,50 W + carvão] apresentou médias significativamente superiores ao grupo [FFA]. A aplicação prévia de carvão aumentou significativamente a concentração de flúor

Resultados

encontrada nas soluções RE 10 dias dos grupos irradiados com potências médias de 0,25 W e 0,50W, o mesmo não ocorrendo para a potência *laser* de 0,75 W.

TABELA 68: Comparações entre os grupos realizadas pelo teste de Student-Newman-Keuls. Dados originais.

Comparações Student-Newman-Keuls	Dif. Postos	p-valor
Médias [controle] a [FFA]	35.5500	0.0006
Médias [controle] a [<i>laser</i> 0,25 W]	17.9000	0.0850
Médias [controle] a [<i>laser</i> 0,25 W + carvão]	47.8500	< 0.0001
Médias [controle] a [<i>laser</i> 0,50 W]	29.3500	0.0047
Médias [controle] a [<i>laser</i> 0,50 W + carvão]	63.0000	< 0.0001
Médias [controle] a [<i>laser</i> 0,75 W]	24.6000	0.0179
Médias [controle] a [<i>laser</i> 0,75 W + carvão]	24.9500	0.0164
Médias [FFA] a [<i>laser</i> 0,25 W]	17.6500	0.0894
Médias [FFA] a [<i>laser</i> 0,25 W + carvão]	12.3000	0.2366
Médias [FFA] a [<i>laser</i> 0,50 W]	6.2000	0.5508
Médias [FFA] a [<i>laser</i> 0,50 W + carvão]	27.4500	0.0083
Médias [FFA] a [<i>laser</i> 0,75 W]	10.9500	0.2920
Médias [FFA] a [<i>laser</i> 0,75 W + carvão]	10.6000	0.3077
Médias [<i>laser</i> 0,25 W] a [<i>laser</i> 0,25 W + carvão]	29.9500	0.0040
Médias [<i>laser</i> 0,25 W] a [<i>laser</i> 0,50 W]	11.4500	0.2706
Médias [<i>laser</i> 0,25 W] a [<i>laser</i> 0,50 W + carvão]	45.1000	< 0.0001
Médias [<i>laser</i> 0,25 W] a [<i>laser</i> 0,75 W]	6.7000	0.5191
Médias [<i>laser</i> 0,25 W] a [<i>laser</i> 0,75 W + carvão]	7.0500	0.4975
Médias [<i>laser</i> 0,25 W + carvão] a [<i>laser</i> 0,50 W]	18.5000	0.0750
Médias [<i>laser</i> 0,25 W + carvão] a [<i>laser</i> 0,50 W + carvão]	15.1500	0.1449
Médias [<i>laser</i> 0,25 W + carvão] a [<i>laser</i> 0,75 W]	23.2500	0.0253
Médias [<i>laser</i> 0,25 W + carvão] a [<i>laser</i> 0,75 W + carvão]	22.9000	0.0276
Médias [<i>laser</i> 0,50 W] a [<i>laser</i> 0,50 W + carvão]	33.6500	0.0012
Médias [<i>laser</i> 0,50 W] a [<i>laser</i> 0,75 W]	4.7500	0.6476
Médias [<i>laser</i> 0,50 W] a [<i>laser</i> 0,75 W + carvão]	4.4000	0.6720
Médias [<i>laser</i> 0,50 W + carvão] a [<i>laser</i> 0,75 W]	38.4000	0.0002
Médias [<i>laser</i> 0,50 W + carvão] a [<i>laser</i> 0,75 W + carvão]	38.0500	0.0003
Médias [<i>laser</i> 0,75 W] a [<i>laser</i> 0,75 W + carvão]	0.3500	0.9731

As tabelas a seguir referem-se às análises para os grupos [controle], [FFA], [*laser* 0,25 W + FFA], [*laser* 0,25 W + carvão + FFA], [*laser* 0,50 W + FFA], [*laser* 0,50 W + carvão + FFA], [*laser* 0,75 W + FFA] e [*laser* 0,75 W + carvão + FFA].

TABELA 69: Resultados do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis para os grupos [controle], [FFA], [*laser* 0,25 W + FFA], [*laser* 0,25 W + carvão + FFA], [*laser* 0,50 W + FFA], [*laser* 0,50 W + carvão + FFA], [*laser* 0,75 W + FFA] e [*laser* 0,75 W + carvão + FFA]. Dados originais.

Resultados do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis		
	Grupos	Postos médios
H = 48.5443 Graus de liberdade = 7 (p) Kruskal-Wallis = 0.0000	R [controle]	9.0000
	R [FFA]	32.0500
	R [<i>laser</i> 0,25 W + FFA]	22.1500
	R [<i>laser</i> 0,25 W + carvão + FFA]	68.4500
	R [<i>laser</i> 0,50 W + FFA]	58.1000
	R [<i>laser</i> 0,50 W + carvão + FFA]	50.6500
	R [<i>laser</i> 0,75 W + FFA]	40.7000
	R [<i>laser</i> 0,75 W + carvão + FFA]	42.9000

Pelos resultados obtidos, infere-se que todos os grupos apresentaram médias de flúor significativamente maiores do que o grupo [controle], com exceção do grupo [*laser* 0,25 W + FFA], o qual não apresentou médias distintas do grupo [controle]. O grupo [*laser* 0,25 W + carvão + FFA] foi o único que apresentou média de flúor significativamente maior do que o grupo [FFA]. Pela FIG. 76, observa-se que a concentração de flúor nas soluções RE 10 dias parece diminuir com o aumento da fluência *laser* empregada, exceção feita ao grupo [*laser* 0,25 W + FFA], o qual apresentou a menor média dos grupos irradiados. Entretanto, tal achado não foi evidenciado estatisticamente. A aplicação prévia de carvão não exerceu influência significativa sobre a concentração de flúor das soluções RE 10 dias provenientes das amostras irradiadas; entretanto, um aumento expressivo é observado na comparação entre os grupos [*laser* 0,25 W + FFA] e [*laser* 0,25 W + carvão + FFA].

TABELA 70: Comparações entre os grupos realizadas pelo teste de Student-Newman-Keuls. Dados originais.

<i>Comparações Student-Newman-Keuls</i>	<i>Dif. Postos</i>	<i>p-valor</i>
Médias [controle] a [FFA]	23.0500	0.0266
Médias [controle] a [laser 0,25 W + FFA]	13.1500	0.2057
Médias [controle] a [laser 0,25 W + carvão + FFA]	59.4500	< 0.0001
Médias [controle] a [laser 0,50 W + FFA]	49.1000	< 0.0001
Médias [controle] a [laser 0,50 W + carvão + FFA]	41.6500	< 0.0001
Médias [controle] a [laser 0,75 W + FFA]	31.7000	0.0023
Médias [controle] a [laser 0,75 W + carvão + FFA]	33.9000	0.0011
Médias [FFA] a [laser 0,25 W + FFA]	9.9000	0.3408
Médias [FFA] a [laser 0,25 W + carvão + FFA]	36.4000	0.0005
Médias [FFA] a [laser 0,50 W + FFA]	26.0500	0.0122
Médias [FFA] a [laser 0,50 W + carvão + FFA]	18.6000	0.0735
Médias [FFA] a [laser 0,75 W + FFA]	8.6500	0.4052
Médias [FFA] a [laser 0,75 W + carvão + FFA]	10.8500	0.2965
Médias [laser 0,25 W + FFA] a [laser 0,25 W + carvão + FFA]	46.3000	< 0.0001
Médias [laser 0,25 W + FFA] a [laser 0,50 W + FFA]	35.9500	0.0005
Médias [laser 0,25 W + FFA] a [laser 0,50 W + carvão + FFA]	28.5000	0.0061
Médias [laser 0,25 W + FFA] a [laser 0,75 W + FFA]	18.5500	0.0743
Médias [laser 0,25 W + FFA] a [laser 0,75 W + carvão + FFA]	20.7500	0.0459
Médias [laser 0,25 W + carvão + FFA] a [laser 0,50 W + FFA]	10.3500	0.3193
Médias [laser 0,25 W + carvão + FFA] a [laser 0,50 W + carvão + FFA]	17.8000	0.0867
Médias [laser 0,25 W + carvão + FFA] a [laser 0,75 W + FFA]	27.7500	0.0076
Médias [laser 0,25 W + carvão + FFA] a [laser 0,75 W + carvão + FFA]	25.5500	0.0139
Médias [laser 0,50 W + FFA] a [laser 0,50 W + carvão + FFA]	7.4500	0.4735
Médias [laser 0,50 W + FFA] a [laser 0,75 W + FFA]	17.4000	0.0941
Médias [laser 0,50 W + FFA] a [laser 0,75 W + carvão + FFA]	15.2000	0.1436
Médias [laser 0,50 W + carvão + FFA] a [laser 0,75 W + FFA]	9.9500	0.3383
Médias [laser 0,50 W + carvão + FFA] a [laser 0,75 W + carvão + FFA]	7.7500	0.4558
Médias [laser 0,75 W + FFA] a [laser 0,75 W + carvão + FFA]	2.2000	0.8323

FIGURA 77: Médias de concentração de flúor nas soluções RE 10 dias encontradas considerando os grupos [controle], [FFA], [laser 0,25 W + FFA], [laser 0,25 W + carvão + FFA], [laser 0,50 W + FFA], [laser 0,50 W + carvão + FFA], [laser 0,75 W + FFA] e [laser 0,75 W + carvão + FFA]. As barras referem-se ao erro padrão.

O gráfico a seguir ilustra as médias de flúor nas soluções RE dos 14 grupos deste estudo. Pode-se observar que os grupos [controle], [laser 0,25 W + carvão], [laser 0,75 W], [laser 0,75 W + carvão], [laser 0,75 W + FFA] e [laser 0,75 W + carvão + FFA] apresentaram uma diminuição significativa na concentração de flúor encontrada nas soluções RE 10 dias em comparação com as RE 5 dias. Os demais grupos não apresentaram diferenças significativas nos conteúdos de flúor das soluções RE 5 dias e RE 10 dias. Os grupos [controle], [FFA], [laser 0,25 W], [laser 0,25 W + FFA] e [laser 0,50 W] tiveram médias de flúor inferiores aos valores iniciais das soluções; os demais grupos apresentaram concentrações de flúor aumentadas com relação aos valores iniciais.

FIGURA 78: Comparações entre as quantidades de flúor constantes nas soluções RE 5 dias e RE 10 dias para todos os grupos. As barras referem-se ao erro padrão.

5.2.3. Análise de flúor fracamente ligado

A análise de flúor fracamente ligado, sob a forma de CaF_2 , demonstrou um aumento significativo na retenção de flúor nos grupos onde houve aplicação tópica de FFA, associado ou não com a irradiação *laser*. As médias obtidas de todos os grupos, em $\mu\text{g F}^-/\text{cm}^2$, estão descritas na Tabela 69, e ilustradas na FIG. 79.

TABELA 71: Média e desvio padrão das quantidades de flúor fracamente ligado sob a forma de CaF_2 ($\mu\text{g F/cm}^2$) nos diferentes grupos. Dados originais.

Grupos	Discriminação	CaF_2 ($\mu\text{g F/cm}^2$) Média $\pm$ D.P.
PM 1	Controle	0.63 $\pm$ 0.2
PM 2	FFA	18.87 $\pm$ 2.7
PM 3	0,25 W	2.19 $\pm$ 1.0
PM 4	0,25 W + carvão	1.87 $\pm$ 0.7
PM 5	0,25 W + FFA	25.13 $\pm$ 9.7
PM 6	0,25 W + carvão + FFA	21.78 $\pm$ 7.2
PM 7	0,50 W	2.43 $\pm$ 0.9
PM 8	0,50 W + carvão	2.02 $\pm$ 0.8
PM 9	0,50 W + FFA	44.78 $\pm$ 9.9
PM 10	0,50 W + carvão + FFA	36.03 $\pm$ 14.0
PM 11	0,75 W	1.53 $\pm$ 0.7
PM 12	0,75 W + carvão	1.16 $\pm$ 0.5
PM 13	0,75 W + FFA	45.30 $\pm$ 17.2
PM 14	0,75 W + carvão + FFA	61.07 $\pm$ 17.3

FIGURA 79: Representação gráfica das médias dos valores de flúor fracamente ligado ($\mu\text{g F}^-/\text{cm}^2$) nos diferentes grupos de tratamento. As barras correspondem ao erro padrão.

Conforme pode ser observado no gráfico acima, os grupos que tiveram aplicação tópica de FFA apresentaram uma quantidade visivelmente maior de flúor retido (médias ao redor de $1,5 \mu\text{g F}^-/\text{cm}^2$) do que os grupos onde o FFA não foi aplicado (médias acima de $18 \mu\text{g F}^-/\text{cm}^2$). Assim, da mesma forma que o realizado para a análise da perda mineral, os dados obtidos da análise de flúor fracamente ligado foram tratados estatisticamente de forma segmentada, buscando-se maior sensibilidade nos testes estatísticos.

Em um primeiro momento, foram comparados entre si os grupos que não tiveram aplicação tópica de FFA, buscando-se evidenciar a fluência *laser* que pudesse promover maior retenção de flúor. Os grupos comparados nesta fase foram: [controle], [*laser* 0,25 W], [*laser* 0,25 W + carvão], [*laser* 0,50 W], [*laser* 0,50 W + carvão], [*laser* 0,75 W] e [*laser* 0,75 W + carvão]. De acordo com os resultados obtidos pelos testes de homogeneidade e normalidade, houve a necessidade de transformação logarítmica dos dados, o que deu condições para a realização da análise de variância. Os valores da análise de variância, seguido pelas comparações múltiplas realizadas pelo teste de Tukey, assim como o gráfico representativo de seus intervalos de confiança, considerando-se significância de 5%, estão apresentados nas tabelas 70 e 71 e na FIG. 80.

Resultados

TABELA 72: Resultado da análise de variância realizado para comparação entre os grupos [controle], [laser 0,25 W], [laser 0,25 W + carvão], [laser 0,50 W], [laser 0,50 W + carvão], [laser 0,75 W] e [laser 0,75 W + carvão]. Dados transformados.

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	0.704472	6	0.117412	9.369006	2.44E-07	2.246409
Resíduo	0.789514	63	0.012532			
Total	1.493986	69				

TABELA 73: Comparações múltiplas realizadas pelo teste de Tukey. Dados transformados.

Tukey	Q	(p)
Médias [controle] a [laser 0,25 W]	7.8560	< 0.01
Médias [controle] a [laser 0,25 W + carvão]	6.7575	< 0.01
Médias [controle] a [laser 0,50 W]	8.8057	< 0.01
Médias [controle] a [laser 0,50 W + carvão]	7.2505	< 0.01
Médias [controle] a [laser 0,75 W]	5.0835	< 0.05
Médias [controle] a [laser 0,75 W + carvão]	3.2969	> 0.05
Médias [laser 0,25 W] a [laser 0,25 W + carvão]	1.0984	> 0.05
Médias [laser 0,25 W] a [laser 0,50 W]	0.9497	> 0.05
Médias [laser 0,25 W] a [laser 0,50 W + carvão]	0.6054	> 0.05
Médias [laser 0,25 W] a [laser 0,75 W]	2.7725	> 0.05
Médias [laser 0,25 W] a [laser 0,75 W + carvão]	4.5591	< 0.05
Médias [laser 0,25 W + carvão] a [laser 0,50 W]	2.0481	> 0.05
Médias [laser 0,25 W + carvão] a [laser 0,50 W + carvão]	0.4930	> 0.05
Médias [laser 0,25 W + carvão] a [laser 0,75 W]	1.6741	> 0.05
Médias [laser 0,25 W + carvão] a [laser 0,75 W + carvão]	3.4607	> 0.05
Médias [laser 0,50 W] a [laser 0,50 W + carvão]	1.5552	> 0.05
Médias [laser 0,50 W] a [laser 0,75 W]	3.7222	> 0.05
Médias [laser 0,50 W] a [laser 0,75 W + carvão]	5.5088	< 0.01
Médias [laser 0,50 W + carvão] a [laser 0,75 W]	2.1670	> 0.05
Médias [laser 0,50 W + carvão] a [laser 0,75 W + carvão]	3.9536	> 0.05
Médias [laser 0,75 W] a [laser 0,75 W + carvão]	1.7866	> 0.05

Os resultados estatísticos obtidos evidenciam que a irradiação laser pode promover maior retenção de flúor quando comparado ao grupo sem tratamento. Este efeito foi observado quando foram empregadas fluências de 2,8 J/cm² (0,25 W) e 5,6 J/cm² (0,50 W), quando foram apresentadas diferenças significativas ao nível de 1% na comparação com o grupo controle, e 8,5 J/cm²

Resultados

(0,75 W). A irradiação *laser* a 0,75 W, associado ao carvão, não apresentou diferença significativa quando comparado ao grupo controle.

A aplicação da pasta de pó de carvão previamente às irradiações não promoveu efeitos significativos na retenção de flúor, não sendo detectadas diferenças significativas entre os grupos irradiados e seus respectivos pares com aplicação prévia de carvão. Ainda assim, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes na comparação entre todas as fluências *laser*, ou seja, a fluência *laser* empregada não interfere com a retenção de flúor nas amostras.

FIGURA 80: Intervalos de confiança (95%) para comparação entre os grupos [controle], [*laser* 0,25 W], [*laser* 0,25 W + carvão], [*laser* 0,50 W], [*laser* 0,50 W + carvão], [*laser* 0,75 W] e [*laser* 0,75 W + carvão]. Dados transformados.

Após a realização destas análises, buscou-se verificar, em um segundo momento, se a associação do FFA com a irradiação *laser*, sob as diferentes fluências, pode interferir na retenção de CaF_2 formado. Assim, foram comparados entre si os grupos que tiveram aplicação tópica de FFA: [FFA], [*laser* 0,25 W + FFA], [*laser* 0,25 W + carvão + FFA], [*laser* 0,50 W + FFA], [*laser* 0,50 W + carvão + FFA], [*laser* 0,75 W + FFA] e [*laser* 0,75 W + carvão + FFA]. Para a realização destas análises, os testes de homogeneidade e normalidade prévios indicaram variâncias muito desiguais e amostras não homogêneas. Desta forma, os valores foram convertidos a logaritmos, proporcionando, assim, grupos amostrais homogêneos que viabilizassem a realização de análise de variância.

Resultados

Os valores da análise de variância, seguido pelas comparações múltiplas realizadas pelo teste de Tukey, assim como o gráfico representativo de seus intervalos de confiança, considerando-se significância de 5%, estão apresentados nas tabelas 72 e 73 e na FIG. 81.

TABELA 74: Resultado da análise de variância realizado para comparação entre os grupos [FFA], [*laser* 0,25 W + FFA], [*laser* 0,25 W + carvão + FFA], [*laser* 0,50 W + FFA], [*laser* 0,50 W + carvão + FFA], [*laser* 0,75 W + FFA] e [*laser* 0,75 W + carvão + FFA]. Dados transformados.

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	1.979567	6	0.329928	12.23274	4.502E-09	2.246409
Resíduo	1.699166	63	0.026971			
Total	3.678733	69

FIGURA 81: Intervalos de confiança (95%) para comparação entre os grupos [FFA], [*laser* 0,25 W + FFA], [*laser* 0,25 W + carvão + FFA], [*laser* 0,50 W + FFA], [*laser* 0,50 W + carvão + FFA], [*laser* 0,75 W + FFA] e [*laser* 0,75 W + carvão + FFA].

De acordo com os resultados destas análises, pode-se ressaltar que a irradiação *laser* sob fluências de 5,6 J/cm² (0,50 W) e 8,5 J/cm² (0,75 W) aumentou significativamente a retenção de flúor formado quando comparada ao

Resultados

grupo onde apenas o FFA foi aplicado sobre a superfície, com significância de 1% para ambos os casos. A irradiação *laser* sob fluência de $2,8 \text{ J/cm}^2$ (0,25 W), entretanto, não promoveu aumento significativo na retenção de flúor formado quando comparada ao grupo FFA.

Por estas análises, pode-se também evidenciar que o aumento da fluência *laser* empregada possibilitou também o aumento na retenção de flúor. O grupo irradiado com $2,8 \text{ J/cm}^2$ (0,25 W) obteve menores valores de retenção de CaF_2 quando comparado aos demais grupos irradiados, com significância de 1%. A comparação entre os grupos irradiados com fluências de $5,6 \text{ J/cm}^2$ (0,50 W) e $8,5 \text{ J/cm}^2$ (0,75 W) não possibilitou evidenciar diferenças significantes entre eles.

A aplicação prévia da pasta de pó de carvão não promoveu diferenças significativas com relação ao flúor retido em nenhuma das fluências *laser* testadas.

TABELA 75: Comparações múltiplas realizadas pelo teste de Tukey. Dados transformados.

Tukey	Q	(p)
Médias [FFA] a [<i>laser</i> 0,25 W + FFA]	0.6765	> 0.05
Médias [FFA] a [<i>laser</i> 0,25 W + carvão + FFA]	0.2539	> 0.05
Médias [FFA] a [<i>laser</i> 0,50 W + FFA]	5.9494	< 0.01
Médias [FFA] a [<i>laser</i> 0,50 W + carvão + FFA]	3.6890	> 0.05
Médias [FFA] a [<i>laser</i> 0,75 W + FFA]	6.4312	< 0.01
Médias [FFA] a [<i>laser</i> 0,75 W + carvão + FFA]	8.4399	< 0.01
Médias [<i>laser</i> 0,25 W + FFA] a [<i>laser</i> 0,25 W + carvão + FFA]	0.9304	> 0.05
Médias [<i>laser</i> 0,25 W + FFA] a [<i>laser</i> 0,50 W + FFA]	5.2729	< 0.01
Médias [<i>laser</i> 0,25 W + FFA] a [<i>laser</i> 0,50 W + carvão + FFA]	3.0125	> 0.05
Médias [<i>laser</i> 0,25 W + FFA] a [<i>laser</i> 0,75 W + FFA]	5.7547	< 0.01
Médias [<i>laser</i> 0,25 W + FFA] a [<i>laser</i> 0,75 W + carvão + FFA]	7.7633	< 0.01
Médias [<i>laser</i> 0,25 W + carvão + FFA] a [<i>laser</i> 0,50 W + FFA]	6.2034	< 0.01
Médias [<i>laser</i> 0,25 W + carvão + FFA] a [<i>laser</i> 0,50 W + carvão + FFA]	3.9429	> 0.05
Médias [<i>laser</i> 0,25 W + carvão + FFA] a [<i>laser</i> 0,75 W + FFA]	6.6852	< 0.01
Médias [<i>laser</i> 0,25 W + carvão + FFA] a [<i>laser</i> 0,75 W + carvão + FFA]	8.6938	< 0.01
Médias [<i>laser</i> 0,50 W + FFA] a [<i>laser</i> 0,50 W + carvão + FFA]	2.2604	> 0.05
Médias [<i>laser</i> 0,50 W + FFA] a [<i>laser</i> 0,75 W + FFA]	0.4818	> 0.05
Médias [<i>laser</i> 0,50 W + FFA] a [<i>laser</i> 0,75 W + carvão + FFA]	2.4904	> 0.05
Médias [<i>laser</i> 0,50 W + carvão + FFA] a [<i>laser</i> 0,75 W + FFA]	2.7422	> 0.05
Médias [<i>laser</i> 0,50 W + carvão + FFA] a [<i>laser</i> 0,75 W + carvão + FFA]	4.7509	< 0.05
Médias [<i>laser</i> 0,75 W + FFA] a [<i>laser</i> 0,75 W + carvão + FFA]	2.0086	> 0.05

5.2.4. Análise de flúor fortemente ligado

Para a determinação do flúor fortemente ligado extraído pelo processo de biópsia, faz-se necessário, inicialmente, conhecer as profundidades de esmalte removidas durante a extração, buscando-se verificar a possibilidade de comparação entre os grupos pela determinação da concentração de flúor no esmalte removido, em ppm. Os primeiros testes estatísticos realizados referem-se, assim, a evidenciar tais profundidades removidas e a observar se há diferenças entre os grupos de tratamento.

A tabela 74 descreve as profundidades médias de esmalte removido para todos os grupos deste estudo, e a tabela 75 contém os resultados obtidos na análise de variância realizada para as camadas de esmalte removidas nos primeiros 15 segundos de biópsia, para os 14 grupos deste trabalho. De acordo com os resultados expostos, observa-se que a biópsia do esmalte durante 15 segundos possibilitou a remoção de profundidades de esmalte ao redor de 3,0 μm .

FIGURA 82: Profundidades médias das camadas de esmalte removidas nos primeiros 15 segundos de biópsia. As barras referem-se ao erro padrão.

TABELA 76: Profundidades médias e concentração de flúor, com respectivos valores de desvio padrão, nas camadas de esmalte removido durante o processo de biópsia por 15 segundos de imersão em HCl 1 M. Dados originais.

Grupos	Discriminação	Profundidade de esmalte removido (μm)	Concentração de flúor na camada (ppm)
PM 1	Controle	2,64 $\pm$ 1,0	1325.64 $\pm$ 333.8
PM 2	FFA	2,72 $\pm$ 0,4	2108.54 $\pm$ 475.5
PM 3	0,25 W	2.86 $\pm$ 1.1	1051.26 $\pm$ 533.1
PM 4	0,25 W + carvão	2,92 $\pm$ 2,0	1012.88 $\pm$ 434.2
PM 5	0,25 W + FFA	3,01 $\pm$ 0,5	1937.04 $\pm$ 618.4
PM 6	0,25 W + carvão + FFA	2,42 $\pm$ 0,6	2427.38 $\pm$ 456.4
PM 7	0,50 W	3,61 $\pm$ 1.3	1610.49 $\pm$ 367.9
PM 8	0,50 W + carvão	2.64 $\pm$ 0.9	1361.28 $\pm$ 387.1
PM 9	0,50 W + FFA	3,22 $\pm$ 0,6	2296.36 $\pm$ 416.6
PM 10	0,50 W + carvão + FFA	3,15 $\pm$ 1,0	2296.05 $\pm$ 316.5
PM 11	0,75 W	3,20 $\pm$ 0.9	1424.16 $\pm$ 230.7
PM 12	0,75 W + carvão	3,45 $\pm$ 1,2	1818.58 $\pm$ 309.1
PM 13	0,75 W + FFA	3,04 $\pm$ 1,0	2147.47 $\pm$ 698.5
PM 14	0,75 W + carvão + FFA	3,32 $\pm$ 1,2	2651.95 $\pm$ 438.6

Pelo valor de **p** obtido, observa-se não haver diferença estatisticamente significativa entre as profundidades das camadas de esmalte removidas para todos os grupos deste estudo, no tempo de 15 segundos. A seguir, encontram-se os valores de profundidade de esmalte removido após biópsia realizada por 30 segundos.

Resultados

TABELA 77: Resultado da análise de variância realizada para comparação entre as camadas de esmalte removidas, em todos os grupos de tratamento, nos primeiros 15 segundos de biópsia. Dados originais.

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	13.29419	13	1.02263	0.9105	0.54	1.8085
Resíduo	125.7868	112	1.123097			
Total	139.081	125				

TABELA 78: Profundidades médias e concentração de flúor, com respectivos valores de desvio padrão, nas camadas de esmalte removido durante o processo de biópsia por 30 segundos de imersão em HCl 1 M. Dados originais.

<i>Grupos</i>	<i>Discriminação</i>	<i>Profundidade de esmalte removido (μm)</i>	<i>Concentração de flúor na camada (ppm)</i>
PM 1	Controle	8,49 $\pm$ 1,0	1061.41 $\pm$ 285.4
PM 2	FFA	7,73 $\pm$ 1,9	2058.61 $\pm$ 147.7
PM 3	0,25 W	9,60 $\pm$ 5,2	989.57 $\pm$ 649.3
PM 4	0,25 W + carvão	9,10 $\pm$ 3,7	1028.07 $\pm$ 407.0
PM 5	0,25 W + FFA	9,68 $\pm$ 2,9	1997.63 $\pm$ 381.7
PM 6	0,25 W + carvão + FFA	8,20 $\pm$ 1,5	2149.66 $\pm$ 423.9
PM 7	0,50 W	10,13 $\pm$ 4,9	1079.47 $\pm$ 410.1
PM 8	0,50 W + carvão	9,58 $\pm$ 2,9	975.55 $\pm$ 369.6
PM 9	0,50 W + FFA	9,23 $\pm$ 2,5	1626.30 $\pm$ 326.6
PM 10	0,50 W + carvão + FFA	10,24 $\pm$ 3,2	1843.27 $\pm$ 428.2
PM 11	0,75 W	8,60 $\pm$ 3,7	1060.44 $\pm$ 237.4
PM 12	0,75 W + carvão	8,43 $\pm$ 3,2	1204.01 $\pm$ 252.9
PM 13	0,75 W + FFA	10,15 $\pm$ 1,8	1655.45 $\pm$ 572.1
PM 14	0,75 W + carvão + FFA	9,05 $\pm$ 3,1	2109.39 $\pm$ 428.9

FIGURA 83: Profundidades médias das camadas de esmalte removidas em biópsia de 30 segundos realizada após a biópsia de 15 segundos inicialmente realizada. As barras referem-se ao erro padrão.

TABELA 79: Resultado da análise de variância realizada para comparação entre as camadas de esmalte removidas, em todos os grupos de tratamento, após 30 segundos de biópsia. Dados originais.

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	96.12209	13	7.394007	0.686894	0.77	1.813586
Resíduo	1141.028	106	10.76441			
Total	1237.15	119				

De acordo com o resultado da análise de variância obtido, observa-se também não haver diferença estatisticamente significativa entre as profundidades de esmalte removidas durante o processo de biópsia em 30 segundos ($p > 0.05$). Nestas biópsias, a média de profundidade de esmalte removido foi de 9,24 μm .

A seguir, encontram-se as médias dos valores de profundidade de esmalte removido após biópsia realizada por mais 60 segundos nas mesmas amostras empregadas anteriormente.

TABELA 80: Profundidades médias e concentração de flúor, com respectivos valores de desvio padrão, nas camadas de esmalte removido durante o processo de biópsia por 60 segundos de imersão em HCl 1 M. Dados originais.

Grupos	Discriminação	Profundidade de esmalte removido (μm)	Concentração de flúor na camada (ppm)
PM 1	Controle	19,09 $\pm$ 7,53	806.16 $\pm$ 262.6
PM 2	FFA	16,18 $\pm$ 3,31	1381.08 $\pm$ 196.9
PM 3	0,25 W	18,78 $\pm$ 9,47	783.83 $\pm$ 516.2
PM 4	0,25 W + carvão	17,89 $\pm$ 5,87	842.22 $\pm$ 426.4
PM 5	0,25 W + FFA	23,45 $\pm$ 3,86	1224.05 $\pm$ 139.9
PM 6	0,25 W + carvão + FFA	16,29 $\pm$ 4,51	1348.69 $\pm$ 329.4
PM 7	0,50 W	21,72 $\pm$ 14,06	806.41 $\pm$ 357.1
PM 8	0,50 W + carvão	20,50 $\pm$ 6,99	801.71 $\pm$ 303.0
PM 9	0,50 W + FFA	22,06 $\pm$ 6,57	1042.94 $\pm$ 357.8
PM 10	0,50 W + carvão + FFA	23,53 $\pm$ 8,2	1498.46 $\pm$ 367.9
PM 11	0,75 W	17,96 $\pm$ 9,91	696.93 $\pm$ 231.3
PM 12	0,75 W + carvão	22,21 $\pm$ 7,72	740.91 $\pm$ 233.3
PM 13	0,75 W + FFA	22,38 $\pm$ 5,64	1167.11 $\pm$ 259.7
PM 14	0,75 W + carvão + FFA	24,01 $\pm$ 5,96	1508.28 $\pm$ 219.2

FIGURA 84: Profundidades médias das camadas de esmalte removidas em biópsia de 60 segundos realizada após as biópsias de 15 e 30 segundos. As barras referem-se ao erro padrão.

TABELA 81: Resultado da análise de variância realizada para comparação entre as camadas de esmalte removidas, em todos os grupos de tratamento, após 60 segundos de biópsia. Dados originais.

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	906.179	13	69.70608	1.145498	0.33	1.823466
Resíduo	5841.81	96	60.85219			
Total	6747.989	109				

Para estas últimas biópsias realizadas com tempo de exposição de 60 segundos, observa-se também não haver diferença estatisticamente significativa entre as profundidades de esmalte removidas durante o processo ($p > 0.05$). Nesta última fase, a média de profundidade de esmalte removido foi de 20,61 µm.

Após a determinação das profundidades das camadas de esmalte

Resultados

removidas nos diferentes tempos de biópsia, assim como após a certificação da não diferença significativa entre as profundidades removidas nos 14 grupos de tratamento, foi verificada a concentração de flúor total extraído no esmalte por estes processos, para cada grupo de tratamento.

A figura a seguir ilustra a concentração média de flúor total, em ppm, de todos os grupos de tratamento para a primeira camada de esmalte removida, ou seja, para os primeiros 15 segundos de biópsia.

FIGURA 85: Médias das concentrações de flúor, em ppm, extraídas das camadas de esmalte nos primeiros 15 segundos de biópsia. As barras referem-se ao erro padrão.

Por este gráfico e pelos valores da concentração de flúor nas camadas anteriormente apresentados, pode-se inferir que os grupos que tiveram aplicação tópica de flúor apresentaram concentrações de flúor no esmalte visivelmente maiores quando comparados aos grupos onde não houve a aplicação tópica de FFA. Desta maneira, a análise estatística dos dados foi realizada de forma segmentada: primeiramente, foram comparados entre si os grupos que não tiveram aplicação tópica de FFA e, em seguida, foram

Resultados

comparados entre si, em uma segunda análise de variância, os grupos que tiveram aplicação tópica de FFA. Os resultados da primeira análise estatística dos dados, isto é, comparando-se os grupos [controle], [FFA], [*laser* 0,25W], [*laser* 0,25W + carvão], [*laser* 0,50W], [*laser* 0,50W + carvão], [*laser* 0,75W] e [*laser* 0,75W + carvão], estão descritos a seguir. Os testes prévios de Levene (para homogeneidade) e Shapiro-Wilk (para normalidade) mostraram que os dados de biópsia obtidos apresentaram distribuições normais e homogêneas, viabilizando as análises de variância realizadas.

TABELA 82: Resultado da análise de variância realizada para comparação entre as concentrações de flúor encontradas na camada de esmalte removida durante os primeiros 15 segundos de biópsia, considerando os grupos [controle], [FFA], [*laser* 0,25W], [*laser* 0,25W + carvão], [*laser* 0,50W], [*laser* 0,50W + carvão], [*laser* 0,75W] e [*laser* 0,75W + carvão]. Dados originais.

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	8709914	7	1244273	8.00018	5.93025E-07	2.156426
Dentro dos grupos	9953964	64	155530.7			
Total	18663878	71

FIGURA 86: Intervalos de confiança (95%) para comparação entre os grupos [controle], [FFA], [*laser* 0,25 W], [*laser* 0,25 W + carvão], [*laser* 0,50 W], [*laser* 0,50 W + carvão], [*laser* 0,75 W] e [*laser* 0,75 W + carvão]. Dados originais.

TABELA 83: Comparações múltiplas realizadas pelo teste de Tukey. Dados originais.

<i>Tukey</i>	<i>Q</i>	<i>p</i>
Médias [controle] a [FFA]	5.9556	< 0.01
Médias [controle] a [laser 0,25 W]	2.0872	> 0.05
Médias [controle] a [laser 0,25 W + carvão]	2.3793	> 0.05
Médias [controle] a [laser 0,50 W]	2.1668	> 0.05
Médias [controle] a [laser 0,50 W + carvão]	0.2712	> 0.05
Médias [controle] a [laser 0,75 W]	0.7494	> 0.05
Médias [controle] a [laser 0,75 W + carvão]	3.7499	> 0.05
Médias [FFA] a [laser 0,25 W]	8.0427	< 0.01
Médias [FFA] a [laser 0,25 W + carvão]	8.3348	< 0.01
Médias [FFA] a [laser 0,50 W]	3.7888	> 0.05
Médias [FFA] a [laser 0,50 W + carvão]	5.6844	< 0.01
Médias [FFA] a [laser 0,75 W]	5.2062	< 0.05
Médias [FFA] a [laser 0,75 W + carvão]	2.2057	> 0.05
Médias [laser 0,25 W] a [laser 0,25 W + carvão]	0.2921	> 0.05
Médias [laser 0,25 W] a [laser 0,50 W]	4.2539	> 0.05
Médias [laser 0,25 W] a [laser 0,50 W + carvão]	2.3583	> 0.05
Médias [laser 0,25 W] a [laser 0,75 W]	2.8366	> 0.05
Médias [laser 0,25 W] a [laser 0,75 W + carvão]	5.8370	< 0.01
Médias [laser 0,25 W + carvão] a [laser 0,50 W]	4.5461	< 0.05
Médias [laser 0,25 W + carvão] a [laser 0,50 W + carvão]	2.6504	> 0.05
Médias [laser 0,25 W + carvão] a [laser 0,75 W]	3.1287	> 0.05
Médias [laser 0,25 W + carvão] a [laser 0,75 W + carvão]	6.1291	< 0.01
Médias [laser 0,50 W] a [laser 0,50 W + carvão]	1.8956	> 0.05
Médias [laser 0,50 W] a [laser 0,75 W]	1.4174	> 0.05
Médias [laser 0,50 W] a [laser 0,75 W + carvão]	1.5831	> 0.05
Médias [laser 0,50 W + carvão] a [laser 0,75 W]	0.4782	> 0.05
Médias [laser 0,50 W + carvão] a [laser 0,75 W + carvão]	3.4787	> 0.05
Médias [laser 0,75 W] a [laser 0,75 W + carvão]	3.0005	> 0.05

Por estes resultados, observa-se que todos os grupos irradiados tiveram similar concentração de flúor no esmalte ao grupo controle, não sendo expressa diferença estatisticamente significativa entre estes grupos. Todos os grupos irradiados tiveram concentrações de flúor significativamente menores do que o grupo FFA, com exceção feita para os grupos [laser 0,50W] e [laser 0,75W + carvão], os quais apresentaram concentrações de flúor, na primeira camada de esmalte removida, semelhante ao grupo FFA.

A aplicação prévia da pasta de pó de carvão não interferiu na concentração de flúor encontrada na primeira camada de esmalte removido, evidência observada pela ausência de significância estatística na comparação

Resultados

entre os grupos [*laser* 0,25W] e [*laser* 0,25W + carvão], [*laser* 0,50W] e [*laser* 0,50W + carvão] e [*laser* 0,75W] e [*laser* 0,75W + carvão].

A seguir, encontram-se os resultados obtidos pela segunda análise de variância e seu posterior teste de Tukey, quando os seguintes grupos foram comparados entre si: [controle], [FFA], [*laser* 0,25W + FFA], [*laser* 0,25 W + carvão + FFA], [*laser* 0,50W + FFA], [*laser* 0,50 W + carvão + FFA], [*laser* 0,75W + FFA] e [*laser* 0,75 W + carvão + FFA].

TABELA 84: Resultado da análise de variância realizada para comparação entre as concentrações de flúor encontradas na camada de esmalte removida durante os primeiros 15 segundos de biópsia, considerando os grupos [controle], [FFA], [*laser* 0,25W + FFA], [*laser* 0,25 W + carvão + FFA], [*laser* 0,50W + FFA], [*laser* 0,50 W + carvão + FFA], [*laser* 0,75W + FFA] e [*laser* 0,75 W + carvão + FFA]. Dados originais.

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	9884661	7	1412094	6.0019	2.14E-05	2.15642
Resíduo	15057566	64	235274.5			
Total	24942227	71				

De acordo com o exposto, pode-se ressaltar que todos os grupos testados tiveram médias de concentração de flúor na primeira camada de esmalte removida significativamente maiores do que o grupo controle, com exceção feita para o grupo [*laser* 0,25 W + FFA], o qual teve média similar à do grupo controle. Todos os grupos irradiados tiveram médias de concentração de flúor semelhantes àquela do grupo FFA, não havendo diferença estatística detectada. Entre os grupos irradiados, também não foi observada diferença entre as fluências *laser* empregadas, assim como a aplicação prévia de carvão não promoveu modificações significativas na concentração de flúor encontrada na primeira camada de esmalte removido.

TABELA 85: Comparações múltiplas realizadas pelo teste de Tukey. Dados originais.

<i>Tukey</i>	<i>Q</i>	<i>(p)</i>
Médias [controle] a [FFA]	4.8421	< 0.05
Médias [controle] a [laser 0,25W + FFA]	3.7815	> 0.05
Médias [controle] a [laser 0,25W + carvão + FFA]	6.8142	< 0.01
Médias [controle] a [laser 0,50W + FFA]	6.0039	< 0.01
Médias [controle] a [laser 0,50W + carvão + FFA]	6.0018	< 0.01
Médias [controle] a [laser 0,75W + FFA]	5.0830	< 0.05
Médias [controle] a [laser 0,75W + carvão + FFA]	8.2031	< 0.01
Médias [FFA] a [laser 0,25W + FFA]	1.0607	> 0.05
Médias [FFA] a [laser 0,25W + carvão + FFA]	1.9720	> 0.05
Médias [FFA] a [laser 0,50W + FFA]	1.1617	> 0.05
Médias [FFA] a [laser 0,50W + carvão + FFA]	1.1597	> 0.05
Médias [FFA] a [laser 0,75W + FFA]	0.2408	> 0.05
Médias [FFA] a [laser 0,75W + carvão + FFA]	3.3609	> 0.05
Médias [laser 0,25W + FFA] a [laser 0,25W + carvão + FFA]	3.0327	> 0.05
Médias [laser 0,25W + FFA] a [laser 0,50W + FFA]	2.2224	> 0.05
Médias [laser 0,25W + FFA] a [laser 0,50W + carvão + FFA]	2.2204	> 0.05
Médias [laser 0,25W + FFA] a [laser 0,75W + FFA]	1.3015	> 0.05
Médias [laser 0,25W + FFA] a [laser 0,75W + carvão + FFA]	4.4216	> 0.05
Médias [laser 0,25W + carvão + FFA] a [laser 0,50W + FFA]	0.8103	> 0.05
Médias [laser 0,25W + carvão + FFA] a [laser 0,50W + carvão + FFA]	0.8123	> 0.05
Médias [laser 0,25W + carvão + FFA] a [laser 0,75W + FFA]	1.7312	> 0.05
Médias [laser 0,25W + carvão + FFA] a [laser 0,75W + carvão + FFA]	1.3889	> 0.05
Médias [laser 0,50W + FFA] a [laser 0,50W + carvão + FFA]	0.0021	> 0.05
Médias [laser 0,50W + FFA] a [laser 0,75W + FFA]	0.9209	> 0.05
Médias [laser 0,50W + FFA] a [laser 0,75W + carvão + FFA]	2.1992	> 0.05
Médias [laser 0,50W + carvão + FFA] a [laser 0,75W + FFA]	0.9189	> 0.05
Médias [laser 0,50W + carvão + FFA] a [laser 0,75W + carvão + FFA]	2.2013	> 0.05
Médias [laser 0,75W + FFA] a [laser 0,75W + carvão + FFA]	3.1201	> 0.05

FIGURA 87: Intervalos de confiança (95%) para comparação entre os grupos [controle], [FFA], [laser 0,25W + FFA], [laser 0,25 W + carvão + FFA], [laser 0,50W + FFA], [laser 0,50 W + carvão + FFA], [laser 0,75W + FFA] e [laser 0,75 W + carvão + FFA]. Dados originais.

Os dados apresentados a seguir referem-se às concentrações de flúor encontradas na segunda camada de esmalte removida, ou seja, em profundidades de aproximadamente 9,24 μm . O gráfico a seguir ilustra as médias encontradas para todos os grupos deste estudo.

FIGURA 88: Médias das concentrações de flúor, em ppm, extraídas da segunda camada de esmalte, com 30 segundos de biópsia. As barras referem-se ao erro padrão.

Da mesma forma que o realizado para a biópsia durante 15 segundos, foram separados dois grandes grupos para a realização das análises estatísticas. As tabelas a seguir descrevem os resultados obtidos para a análise realizada comparando-se os grupos [controle], [FFA], [laser 0,25W], [laser 0,25W + carvão], [laser 0,50W], [laser 0,50W + carvão], [laser 0,75W] e [laser 0,75W + carvão]. Neste momento, para a comparação destes grupos, o teste de Levene indicou distribuição não homogênea; ainda assim foi realizado o teste de Welch, o qual se trata de um teste mais robusto para a avaliação da homogeneidade. De acordo com o teste de Welch, as amostras apresentaram padrão homogêneo e, desta forma, teve-se embasamento para realizar a análise de variância.

Resultados

TABELA 86: Resultado da análise de variância realizada para comparação entre as concentrações de flúor encontradas na camada de esmalte removida durante os próximos 30 segundos de biópsia, considerando os grupos [controle], [FFA], [laser 0,25W], [laser 0,25W + carvão], [laser 0,50W], [laser 0,50W + carvão], [laser 0,75W] e [laser 0,75W + carvão]. Dados originais.

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	8208955	7	1172708	8.4093	2.96461E-07	2.1564
Resíduo	8924990	64	139453			
Total	17133945	71

FIGURA 89: Intervalos de confiança (95%) para comparação entre os grupos [controle], [FFA], [laser 0,25 W], [laser 0,25 W + carvão], [laser 0,50 W], [laser 0,50 W + carvão], [laser 0,75 W] e [laser 0,75 W + carvão]. Dados originais.

Pelos resultados evidenciados, observa-se que o grupo FFA apresentou médias significativamente maiores (ao nível de 1%) de concentração de flúor na segunda biópsia quando comparado aos demais grupos de tratamento. Todos os grupos irradiados tiveram médias de flúor similares às do grupo sem tratamento, não havendo diferenças estatísticas encontradas. Ainda

Resultados

assim, não houve nenhum efeito da fluência *laser* empregada ou mesmo da associação com carvão nas médias encontradas.

TABELA 87: Comparações múltiplas realizadas pelo teste de Tukey. Dados originais.

<i>Tukey</i>	Q	(p)
Médias [controle] a [FFA]	8.0111	< 0.01
Médias [controle] a [<i>laser</i> 0,25 W]	0.5771	> 0.05
Médias [controle] a [<i>laser</i> 0,25 W + carvão]	0.2679	> 0.05
Médias [controle] a [<i>laser</i> 0,50 W]	0.1450	> 0.05
Médias [controle] a [<i>laser</i> 0,50 W + carvão]	0.6899	> 0.05
Médias [controle] a [<i>laser</i> 0,75 W]	0.0078	> 0.05
Médias [controle] a [<i>laser</i> 0,75 W + carvão]	1.1455	> 0.05
Médias [FFA] a [<i>laser</i> 0,25 W]	8.5882	< 0.01
Médias [FFA] a [<i>laser</i> 0,25 W + carvão]	8.2790	< 0.01
Médias [FFA] a [<i>laser</i> 0,50 W]	7.8661	< 0.01
Médias [FFA] a [<i>laser</i> 0,50 W + carvão]	8.7010	< 0.01
Médias [FFA] a [<i>laser</i> 0,75 W]	8.0189	< 0.01
Médias [FFA] a [<i>laser</i> 0,75 W + carvão]	6.8656	< 0.01
Médias [<i>laser</i> 0,25 W] a [<i>laser</i> 0,25 W + carvão]	0.3092	> 0.05
Médias [<i>laser</i> 0,25 W] a [<i>laser</i> 0,50 W]	0.7221	> 0.05
Médias [<i>laser</i> 0,25 W] a [<i>laser</i> 0,50 W + carvão]	0.1128	> 0.05
Médias [<i>laser</i> 0,25 W] a [<i>laser</i> 0,75 W]	0.5693	> 0.05
Médias [<i>laser</i> 0,25 W] a [<i>laser</i> 0,75 W + carvão]	1.7226	> 0.05
Médias [<i>laser</i> 0,25 W + carvão] a [<i>laser</i> 0,50 W]	0.4129	> 0.05
Médias [<i>laser</i> 0,25 W + carvão] a [<i>laser</i> 0,50 W + carvão]	0.4220	> 0.05
Médias [<i>laser</i> 0,25 W + carvão] a [<i>laser</i> 0,75 W]	0.2601	> 0.05
Médias [<i>laser</i> 0,25 W + carvão] a [<i>laser</i> 0,75 W + carvão]	1.4134	> 0.05
Médias [<i>laser</i> 0,50 W] a [<i>laser</i> 0,50 W + carvão]	0.8349	> 0.05
Médias [<i>laser</i> 0,50 W] a [<i>laser</i> 0,75 W]	0.1528	> 0.05
Médias [<i>laser</i> 0,50 W] a [<i>laser</i> 0,75 W + carvão]	1.0005	> 0.05
Médias [<i>laser</i> 0,50 W + carvão] a [<i>laser</i> 0,75 W]	0.6821	> 0.05
Médias [<i>laser</i> 0,50 W + carvão] a [<i>laser</i> 0,75 W + carvão]	1.8354	> 0.05
Médias [<i>laser</i> 0,75 W] a [<i>laser</i> 0,75 W + carvão]	1.1533	> 0.05

A seguir, encontram-se os resultados obtidos nas comparações entre os grupos que tiveram aplicação de FFA.

Resultados

TABELA 88: Resultado da análise de variância realizada para comparação entre as concentrações de flúor encontradas na camada de esmalte removida durante os 30 segundos de biópsia, considerando os grupos [controle], [FFA], [*laser* 0,25W + FFA], [*laser* 0,25 W + carvão + FFA], [*laser* 0,50W + FFA], [*laser* 0,50 W + carvão + FFA], [*laser* 0,75W + FFA] e [*laser* 0,75 W + carvão + FFA]. Dados originais.

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	8289743	7	1184249	7.703044	9.89516E-07	2.156426
Resíduo	9839218	64	153737.8			
Total	18128961	71

FIGURA 90: Intervalos de confiança (95%) para comparação entre os grupos [controle], [FFA], [*laser* 0,25W + FFA], [*laser* 0,25 W + carvão + FFA], [*laser* 0,50W + FFA], [*laser* 0,50 W + carvão + FFA], [*laser* 0,75W + FFA] e [*laser* 0,75 W + carvão + FFA]. Dados originais.

TABELA 89: Comparações múltiplas realizadas pelo teste de Tukey. Dados originais.

<i>Tukey</i>	<i>Q</i>	<i>(p)</i>
Médias [controle] a [FFA]	7.6299	< 0.01
Médias [controle] a [laser 0,25 W + FFA]	7.1633	< 0.01
Médias [controle] a [laser 0,25 W + carvão + FFA]	8.3267	< 0.01
Médias [controle] a [laser 0,50 W + FFA]	4.3222	> 0.05
Médias [controle] a [laser 0,50 W + carvão + FFA]	5.9823	< 0.01
Médias [controle] a [laser 0,75 W + FFA]	4.5452	< 0.05
Médias [controle] a [laser 0,75 W + carvão + FFA]	8.0186	< 0.01
Médias [FFA] a [laser 0,25 W + FFA]	0.4666	> 0.05
Médias [FFA] a [laser 0,25 W + carvão + FFA]	0.6968	> 0.05
Médias [FFA] a [laser 0,50 W + FFA]	3.3077	> 0.05
Médias [FFA] a [laser 0,50 W + carvão + FFA]	1.6476	> 0.05
Médias [FFA] a [laser 0,75 W + FFA]	3.0847	> 0.05
Médias [FFA] a [laser 0,75 W + carvão + FFA]	0.3887	> 0.05
Médias [laser 0,25 W + FFA] a [laser 0,25 W + carvão + FFA]	1.1633	> 0.05
Médias [laser 0,25 W + FFA] a [laser 0,50 W + FFA]	2.8411	> 0.05
Médias [laser 0,25 W + FFA] a [laser 0,50 W + carvão + FFA]	1.1810	> 0.05
Médias [laser 0,25 W + FFA] a [laser 0,75 W + FFA]	2.6181	> 0.05
Médias [laser 0,25 W + FFA] a [laser 0,75 W + carvão + FFA]	0.8552	> 0.05
Médias [laser 0,25 W + carvão + FFA] a [laser 0,50 W + FFA]	4.0044	> 0.05
Médias [laser 0,25 W + carvão + FFA] a [laser 0,50 W + carvão + FFA]	2.3444	> 0.05
Médias [laser 0,25 W + carvão + FFA] a [laser 0,75 W + FFA]	3.7815	> 0.05
Médias [laser 0,25 W + carvão + FFA] a [laser 0,75 W + carvão + FFA]	0.3081	> 0.05
Médias [laser 0,50 W + FFA] a [laser 0,50 W + carvão + FFA]	1.6601	> 0.05
Médias [laser 0,50 W + FFA] a [laser 0,75 W + FFA]	0.2230	> 0.05
Médias [laser 0,50 W + FFA] a [laser 0,75 W + carvão + FFA]	3.6964	> 0.05
Médias [laser 0,50 W + carvão + FFA] a [laser 0,75 W + FFA]	1.4371	> 0.05
Médias [laser 0,50 W + carvão + FFA] a [laser 0,75 W + carvão + FFA]	2.0363	> 0.05
Médias [laser 0,75 W + FFA] a [laser 0,75 W + carvão + FFA]	3.4734	> 0.05

Assim, pode-se observar que todos os grupos, irradiados ou não, que tiveram aplicação tópica de FFA, apresentaram concentrações de flúor no esmalte significativamente superiores ao grupo controle, com exceção do grupo [laser 0,50 W + FFA], o qual não teve médias distintas significativamente das do grupo controle. Todos os grupos irradiados tiveram médias de concentração de flúor similares ao grupo FFA, não sendo detectadas diferenças entre a fluência laser empregada e a associação ou não com a pasta de pó de carvão.

O gráfico a seguir ilustra as médias de concentração de flúor, de

Resultados

todos os grupos, encontradas na terceira e última camada removida pela biópsia de 60 segundos. Por este gráfico, pode-se visualizar que os valores obtidos seguem o mesmo padrão já evidenciado nas camadas anteriores, ou seja, os grupos que tiveram aplicação de FFA apresentam médias significativamente maiores do que os grupos que não tiveram tal aplicação, independentemente da fluência *laser* ou da aplicação de carvão. As tabelas que se seguem evidenciam os resultados da análise de variância realizada para comparação entre os grupos que não tiveram aplicação de FFA.

FIGURA 91: Médias das concentrações de flúor, em ppm, extraídas da terceira e última camada de esmalte removido, com 60 segundos de biópsia. As barras referem-se ao erro padrão.

Resultados

TABELA 90: Resultado da análise de variância realizada para comparação entre as concentrações de flúor encontradas na camada de esmalte removida durante os próximos 60 segundos de biópsia, considerando os grupos [controle], [FFA], [laser 0,25W], [laser 0,25W + carvão], [laser 0,50W], [laser 0,50W + carvão], [laser 0,75W] e [laser 0,75W + carvão]. Dados originais.

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	2947790	7	421112.8	3.814344	0.001604	2.156426
Resíduo	7065755	64	110402.4			
Total	10013545	71

FIGURA 92: Intervalos de confiança (95%) para comparação entre os grupos [controle], [FFA], [laser 0,25 W], [laser 0,25 W + carvão], [laser 0,50 W], [laser 0,50 W + carvão], [laser 0,75 W] e [laser 0,75 W + carvão]. Dados originais.

Os resultados obtidos evidenciam que nenhum dos grupos irradiados apresentou concentração de flúor no esmalte significativamente diferente daquela apresentada pelo grupo controle. O grupo FFA apresentou concentração de flúor no esmalte significativamente maior do que todos os demais grupos. Também não houve diferenças com relação às fluências laser empregadas ou mesmo a associação de carvão não possibilitou evidenciar diferenças significativas entre os grupos irradiados.

TABELA 91: Comparações múltiplas realizadas pelo teste de Tukey. Dados originais.

<i>Tukey</i>	<i>Q</i>	<i>(p)</i>
Médias [controle] a [FFA]	5.1908	< 0.05
Médias [controle] a [laser 0,25 W]	0.2014	> 0.05
Médias [controle] a [laser 0,25 W + carvão]	0.3255	> 0.05
Médias [controle] a [laser 0,50 W]	0.0021	> 0.05
Médias [controle] a [laser 0,50 W + carvão]	0.0401	> 0.05
Médias [controle] a [laser 0,75 W]	0.9862	> 0.05
Médias [controle] a [laser 0,75 W + carvão]	0.5892	> 0.05
Médias [FFA] a [laser 0,25 W]	5.3922	< 0.01
Médias [FFA] a [laser 0,25 W + carvão]	4.8654	< 0.05
Médias [FFA] a [laser 0,50 W]	5.1887	< 0.05
Médias [FFA] a [laser 0,50 W + carvão]	5.2309	< 0.05
Médias [FFA] a [laser 0,75 W]	6.1770	< 0.01
Médias [FFA] a [laser 0,75 W + carvão]	5.7801	< 0.01
Médias [laser 0,25 W] a [laser 0,25 W + carvão]	0.5269	> 0.05
Médias [laser 0,25 W] a [laser 0,50 W]	0.2035	> 0.05
Médias [laser 0,25 W] a [laser 0,50 W + carvão]	0.1613	> 0.05
Médias [laser 0,25 W] a [laser 0,75 W]	0.7848	> 0.05
Médias [laser 0,25 W] a [laser 0,75 W + carvão]	0.3878	> 0.05
Médias [laser 0,25 W + carvão] a [laser 0,50 W]	0.3233	> 0.05
Médias [laser 0,25 W + carvão] a [laser 0,50 W + carvão]	0.3656	> 0.05
Médias [laser 0,25 W + carvão] a [laser 0,75 W]	1.3117	> 0.05
Médias [laser 0,25 W + carvão] a [laser 0,75 W + carvão]	0.9147	> 0.05
Médias [laser 0,50 W] a [laser 0,50 W + carvão]	0.0422	> 0.05
Médias [laser 0,50 W] a [laser 0,75 W]	0.9883	> 0.05
Médias [laser 0,50 W] a [laser 0,75 W + carvão]	0.5914	> 0.05
Médias [laser 0,50 W + carvão] a [laser 0,75 W]	0.9461	> 0.05
Médias [laser 0,50 W + carvão] a [laser 0,75 W + carvão]	0.5491	> 0.05
Médias [laser 0,75 W] a [laser 0,75 W + carvão]	0.3970	> 0.05

A seguir, encontram-se os resultados pertinentes à última análise de variância realizada para estudo de flúor total, quando os grupos que tiveram aplicação de FFA, isto é, [controle], [FFA], [laser 0,25W + FFA], [laser 0,25 W + carvão + FFA], [laser 0,50W + FFA], [laser 0,50 W + carvão + FFA], [laser 0,75W + FFA] e [laser 0,75 W + carvão + FFA], tiveram suas médias comparadas para as biópsias realizadas durante 60 segundos.

Resultados

TABELA 92: Resultado da análise de variância realizada para comparação entre as concentrações de flúor encontradas na camada de esmalte removida durante os últimos 60 segundos de biópsia, considerando os grupos [controle], [FFA], [laser 0,25W + FFA], [laser 0,25 W + carvão + FFA], [laser 0,50W + FFA], [laser 0,50 W + carvão + FFA], [laser 0,75W + FFA] e [laser 0,75 W + carvão + FFA]. Dados originais.

Fonte de variação	da	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos		3624350	7	517764.2	6.738177	5.48929E-06	2.156426
Resíduo		4917786	64	76840.4			
Total		8542136	71

FIGURA 93: Intervalos de confiança (95%) para comparação entre os grupos [controle], [FFA], [laser 0,25W + FFA], [laser 0,25 W + carvão + FFA], [laser 0,50W + FFA], [laser 0,50 W + carvão + FFA], [laser 0,75W + FFA] e [laser 0,75 W + carvão + FFA]. Dados originais.

TABELA 93: Comparações múltiplas realizadas pelo teste de Tukey. Dados originais.

<i>Tukey</i>	<i>Q</i>	<i>(p)</i>
Médias [controle] a [FFA]	6.2220	< 0.01
Médias [controle] a [laser 0,25 W + FFA]	4.5224	< 0.05
Médias [controle] a [laser 0,25 W + carvão + FFA]	5.8713	< 0.01
Médias [controle] a [laser 0,50 W + FFA]	2.5624	> 0.05
Médias [controle] a [laser 0,50 W + carvão + FFA]	7.4923	< 0.01
Médias [controle] a [laser 0,75 W + FFA]	3.9064	> 0.05
Médias [controle] a [laser 0,75 W + carvão + FFA]	7.5985	< 0.01
Médias [FFA] a [laser 0,25 W + FFA]	1.6995	> 0.05
Médias [FFA] a [laser 0,25 W + carvão + FFA]	0.3507	> 0.05
Médias [FFA] a [laser 0,50 W + FFA]	3.6596	> 0.05
Médias [FFA] a [laser 0,50 W + carvão + FFA]	1.2703	> 0.05
Médias [FFA] a [laser 0,75 W + FFA]	2.3156	> 0.05
Médias [FFA] a [laser 0,75 W + carvão + FFA]	1.3765	> 0.05
Médias [laser 0,25 W + FFA] a [laser 0,25 W + carvão + FFA]	1.3488	> 0.05
Médias [laser 0,25 W + FFA] a [laser 0,50 W + FFA]	1.9600	> 0.05
Médias [laser 0,25 W + FFA] a [laser 0,50 W + carvão + FFA]	2.9699	> 0.05
Médias [laser 0,25 W + FFA] a [laser 0,75 W + FFA]	0.6160	> 0.05
Médias [laser 0,25 W + FFA] a [laser 0,75 W + carvão + FFA]	3.0761	> 0.05
Médias [laser 0,25 W + carvão + FFA] a [laser 0,50 W + FFA]	3.3089	> 0.05
Médias [laser 0,25 W + carvão + FFA] a [laser 0,50 W + carvão + FFA]	1.6211	> 0.05
Médias [laser 0,25 W + carvão + FFA] a [laser 0,75 W + FFA]	1.9648	> 0.05
Médias [laser 0,25 W + carvão + FFA] a [laser 0,75 W + carvão + FFA]	1.7272	> 0.05
Médias [laser 0,50 W + FFA] a [laser 0,50 W + carvão + FFA]	4.9299	< 0.05
Médias [laser 0,50 W + FFA] a [laser 0,75 W + FFA]	1.3440	> 0.05
Médias [laser 0,50 W + FFA] a [laser 0,75 W + carvão + FFA]	5.0361	< 0.05
Médias [laser 0,50 W + carvão + FFA] a [laser 0,75 W + FFA]	3.5859	> 0.05
Médias [laser 0,50 W + carvão + FFA] a [laser 0,75 W + carvão + FFA]	0.1062	> 0.05
Médias [laser 0,75 W + FFA] a [laser 0,75 W + carvão + FFA]	3.6921	> 0.05

Da mesma forma que o evidenciado para as demais camadas, a associação da irradiação *laser*, associado ou não ao carvão, com o FFA promoveu concentrações de flúor similares à proporcionada pelo grupo onde apenas o FFA foi aplicado, não sendo detectada diferenças estatisticamente significantes entre estes grupos. Todos os grupos com aplicação de FFA tiveram médias de concentração de flúor, para a terceira camada de esmalte removido, significativamente maiores do que o grupo controle, exceção feita aos grupos [laser 0,50 W + FFA] e [laser 0,75 W + FFA], os quais não apresentaram médias

Resultados

estatisticamente diferentes do grupo controle. A associação de carvão com a irradiação *laser* e o FFA promoveu médias significativamente distintas do grupo controle ao nível de 1%.

Os gráficos a seguir ilustram a distribuição de flúor nas diferentes camadas de esmalte. Por estes gráficos, separados em grupos sem e com aplicação de FFA, respectivamente, para facilitar a visualização, pode-se considerar de forma mais clara os dados expostos anteriormente.

FIGURA 94: Concentração de flúor no esmalte (em ppm) para os grupos de tratamento [controle], [FFA], [laser 0,25 W], [laser 0,25 W + carvão], [laser 0,50 W], [laser 0,50 W + carvão], [laser 0,75 W] e [laser 0,75 W + carvão] com relação à distância da superfície (em μm).

Assim, a aplicação de FFA resulta na deposição de grandes quantidades de fluoreto sobre o esmalte, o qual tem sua concentração diminuída com o aumento da profundidade do esmalte. O mesmo padrão é observado para as amostras irradiadas em associação com o FFA. As amostras irradiadas sem a associação com o FFA tem significativamente menores conteúdos de fluoreto, de forma similar ao grupo controle. O grupo [laser 0,75 W + carvão + FFA] aparenta ser aquele que evidencia maior concentração de flúor no esmalte; entretanto, os valores obtidos não diferem estatisticamente do grupo FFA.

FIGURA 95: Concentração de flúor no esmalte (em ppm) para os grupos de tratamento [controle], [FFA], [laser 0,25 W + FFA], [laser 0,25 W + carvão + FFA], [laser 0,50 W + FFA], [laser 0,50 W + carvão + FFA], [laser 0,75 W + FFA] e [laser 0,75 W + carvão + FFA] com relação à distância da superfície (em μm).

6. DISCUSSÃO

O uso da tecnologia *laser* na Odontologia tem se tornado amplamente difundido entre os profissionais, considerando que o mesmo pode atuar como um excelente coadjuvante quando associado às técnicas convencionais, otimizando os resultados obtidos em várias especialidades odontológicas, seja na dentística operatória, periodontia, endodontia, cirurgia, e em muitas outras. Assim sendo, tem-se cogitado o uso da irradiação *laser* também como coadjuvante das terapias preventivas consagradas para prevenção da cárie, seja melhorando as características do substrato, tornando-o menos susceptível à desmineralização^{13,14,18,33,34,51,61,62,111}, ou mesmo potencializando os efeitos do flúor^{16,17,20,23,24,26,35,51,53,54,55,56,57,59,84,88}, principal agente empregado para prevenção da cárie^{1,2,3,4,6,39}. Os efeitos da irradiação *laser*, assim, poderiam beneficiar pacientes com alto risco de cárie, quando se torna necessária a terapia com alta concentração de fluoreto, e também pacientes com dificuldades de higienização, idosos e crianças, diante da perspectiva do prolongamento da manutenção do flúor na cavidade oral promovido pela irradiação *laser*.

Para promover estes efeitos, os *lasers* de alta intensidade são os mais indicados, pois podem exercer ação fototérmica sobre os tecidos duros dentais^{25,26,50} capazes de promover efeitos significativos seja na morfologia, na cristalografia ou mesmo na indução de mudanças químicas decorrentes da interação entre estes tecidos e provavelmente o flúor. Idealmente, para sua utilização com finalidade preventiva, a irradiação *laser* não deverá promover danos térmicos, morfológicos ou microestruturais no tecido irradiado, assim como em suas adjacências^{31,59,96}.

Por meio de sua absorção ressonante pelos radicais hidroxila tanto da água quanto da hidroxiapatita (FIG. 4), a irradiação *laser* de Er,Cr:YSGG atua em esmalte sob ação fotomecânica pelo mecanismo de ablação²⁵. Desta forma, para evitar que este mecanismo ocorresse, as fluências empregadas no presente estudo foram reduzidas às mínimas ajustáveis no aparelho comercialmente disponível, buscando-se doses abaixo do limiar de ablação estabelecido na literatura, reportado como 4 J/cm² (Belikov *et al.*, 1993)³⁰, 18 J/cm² (Fried *et al.*, 1996)²⁶ e 10 J/cm² (Apel *et al.*, 2002)³¹. Os últimos autores citados relatam que as

diferenças nos valores de limiar de ablação reportados por estes estudos devem-se provavelmente à região do dente irradiada, quando se encontram variações quanto às características ultra-estruturais do esmalte, ou mesmo ao tipo de equipamento *laser*, ao tipo de feixe originado (feixe gaussiano) ou à largura temporal dos pulsos, fato que influencia diretamente o aquecimento promovido no tecido alvo.^{50,64}. No presente trabalho, o equipamento *laser* utilizado apresenta largura temporal dos pulsos de 140 μ s, diferindo dos equipamentos utilizados nos estudos citados anteriormente. Ainda assim, no presente trabalho, a região irradiada dos dentes (superfícies vestibular e lingual) também diferem daquelas empregadas nos estudos supracitados. Assim, torna-se difícil a determinação exata do limiar de ablação, assim como a comparação entre os efeitos de um mesmo comprimento de onda, mas proveniente de equipamentos diferentes.

Embora, neste estudo, tenha havido a necessidade de preparo de uma grande quantidade de amostras, preferiu-se o emprego de dentes humanos, tendo em vista que os mesmos reproduzem com mais acuidade, *in vitro*, o processo de desmineralização e remineralização que ocorre *in vivo*. Embora os dentes de origem bovina apresentem estrutura e propriedades ópticas bastante semelhantes aos dentes humanos¹³¹, a taxa de progressão das desmineralizações é comprovadamente maior¹³². Vale observar que a composição do esmalte dental humano está sujeita a grande variabilidade decorrente da própria região do dente ou mesmo entre os indivíduos^{41,43,44}, o que incorre em variabilidade nos dados obtidos. Também deve ser considerado que, devido à necessidade de um grande número de espécimes, os dentes obtidos no presente trabalho foram cedidos por banco de dentes e, desta forma, torna-se difícil controlar as variáveis inerentes ao período de armazenamento, idade dental ou mesmo a etnia do indivíduo de onde o dente procedeu. Após a cessão dos dentes, ressalta-se que os mesmos foram armazenados em ambiente úmido sob refrigeração constante (+4° C) durante todo o período, visando minimizar as eventuais perdas iônicas que poderiam ocorrer sob armazenamento em água.

Pelas análises morfológicas apresentadas neste estudo, observou-se, ao contrário do esperado, que todas as fluências empregadas promoveram discretas micro-ablações no esmalte irradiado (FIG. 24 e 25), vistas sob microscópio eletrônico de varredura com aumento original de 1000 x, mesmo

empregando-se a fluência mais baixa, isto é, $2,8 \text{ J/cm}^2$, o que discorda do comentado por Belikov *et al.*, (1993)³⁰, Fried *et al.*, (1996)²⁶ e Apel *et al.* (2002)³¹, conforme citado anteriormente. Entretanto, padrões morfológicos similares aos obtidos no presente trabalho foram obtidos por Uzumez *et al.* (2002)¹³³, ao empregarem fluências de $2,7 \text{ J/cm}^2$ e $5,6 \text{ J/cm}^2$, quando foram reportados aspectos típicos de ablação, com exposição de prismas, projeções e depressões do esmalte vistos por microscopia eletrônica de varredura. No presente estudo, a irradiação com a fluência de $8,5 \text{ J/cm}^2$ promoveu, macroscopicamente, pontos esbranquiçados nas áreas irradiadas, decorrente da desidratação do tecido promovida pelas irradiações. Tal achado é semelhante ao reportado Ana *et al.*²⁸ em 2003 e, subsequente, por Freitas²⁴, em 2005, quando a utilização das fluências de $5,6 \text{ J/cm}^2$ e $8,5 \text{ J/cm}^2$ promoveu evidências de áreas ablacionadas detectadas também por microscopia óptica. Ressalta-se que as irradiações realizadas de forma manual desse último estudo citado²⁴ poderiam promover a sobreposição de pulsos *laser*, o que amplificaria o efeito sobre a superfície irradiada e, conseqüentemente, aumentaria o potencial de promover ablação; ou ao contrário, poderiam mater espaço entre os pulsos, resultando em grande área de superfície sem irradiação. Entretanto, no presente estudo, a irradiação da superfície com um estágio motorizado X-Y-Z micrométrico evitou que houvesse sobreposição de pulsos; assim, confirma-se que os parâmetros utilizados promovem ablação tecidual mesmo em um único pulso. Vale ressaltar que, neste estudo, as energias por pulso foram monitoradas imediatamente antes da irradiação de cada amostra, o que assegurou a precisão dos resultados morfológicos obtidos. As divergências encontradas na literatura a respeito das alterações morfológicas proporcionadas devem-se principalmente à variedade de equipamentos, com alterações na largura temporal dos pulsos que podem promover uma importante variação nos efeitos promovidos, de tal forma que diminuindo a largura temporal dos pulsos do *laser* de Er,Cr:YSGG pode-se minimizar os danos térmicos promovidos.¹³⁴.

Estudos anteriores reportam que as alterações morfológicas decorrentes das irradiações são clinicamente indesejáveis pois, embora possam ser imperceptíveis ao olho humano, as áreas ablacionadas apresentam maior rugosidade e, portanto, podem ser consideradas possíveis sítios de maior

retenção de placa bacteriana¹³⁵, o que poderia potencializar os efeitos de um ataque cariogênico⁹³. Entretanto, um estudo recente realizado *in situ* com *laser* de Nd:YAG mostra que a quantidade de biofilme formado sobre áreas irradiadas não difere daquele formado sobre áreas não irradiadas, sugerindo que os efeitos de redução da perda mineral devido à irradiação *laser* superam os efeitos negativos do biofilme formado¹³⁶. Em outro trabalho recente, foi demonstrado que a irradiação com *laser* de Er,Cr:YSGG, mesmo sob parâmetros sub-ablativos, pode resultar em micro-trincas no esmalte decorrentes do aquecimento promovido. Tais micro-trincas poderiam facilitar a desmineralização em regiões mais profundas, e este fato poderia anular os benefícios de ácido-resistência promovidos pela irradiação *laser*⁹⁶. Assim, a escolha de parâmetros de irradiação *laser* e de suas aplicações clínicas requer estudos criteriosos buscando-se estabelecer uma relação custo-benefício satisfatória.

Neste estudo, a opção da realização das irradiações com ausência de refrigeração deve-se ao fato da água exercer um importante efeito sobre a interação dos *lasers* de érbio com os tecidos duros dentais, aumentando-a significativamente^{108,109}. A presença de uma película de água, dependentemente de sua espessura¹³⁷, pode aumentar a eficiência de remoção do esmalte pelo *laser*, aumentando a taxa de ablação, alterar a morfologia e a composição química do esmalte irradiado^{108,109}, aumentando também a resistência do esmalte aos ácidos⁵⁹ ou mesmo tornando a superfície irradiada mais susceptível à percolação dos ácidos bacterianos⁹³. Considerando que, para promover um aumento da resistência à desmineralização do esmalte, os aumentos de temperatura proporcionados pela irradiação *laser* tornam-se mais desejáveis^{18,26,32,33} e a ablação deve ser evitada^{23,29,96}, preferiu-se remover o spray ar-água durante as irradiações, estratégia adotada com frequência para os *lasers* de Er:YAG⁵⁹ e Er,Cr:YSGG visando a prevenção da cárie^{24,28,88,96}. Destaca-se, aqui, a vantagem da utilização de um *laser* pulsado, o qual permite a relaxação térmica mais eficiente do tecido nos intervalos entre pulsos^{50,105,107} e, assim, minimiza a propagação de calor excessivo para o interior do elemento dental.

Contudo, a remoção da refrigeração durante as irradiações leva a uma preocupação com o calor que pode ser transmitido para o interior da polpa,

apesar da utilização de *lasers* com pulsos da ordem de 140 μ s de duração, o qual pode comprometer a vitalidade pulpar em longo prazo⁹⁹. Desta forma, buscando-se minimizar a transferência de calor da superfície do esmalte para o interior do tecido pulpar^{16,113}, assim como eventualmente aumentar as temperaturas superficiais atingidas durante as irradiações, uma camada de pasta de pó de carvão foi aplicada previamente às irradiações em alguns grupos deste estudo. Tal pasta, já aplicada *in vitro* e *in vivo* em estudos anteriores^{16,136}, apresenta-se de fácil manipulação, aplicação e remoção, quando comparada aos fotoabsorvedores classicamente empregados na literatura, representados principalmente pela tinta nanquim, a qual pode prejudicar a estética de dentes irradiados devido à dificuldade de sua remoção completa principalmente em fóssulas e fissuras de superfícies oclusais¹⁶. A utilização de substâncias fotoabsorvedoras é realizada principalmente antes da irradiação com *lasers* de comprimentos de onda pouco absorvidos pelo esmalte, tais como o *laser* de Nd:YAG¹⁶ e Ho:YLF¹⁰⁰, os quais serão altamente transmitidos e, por isso, são mais perigosos para a polpa^{16,50}. Considerando que a cor preta é bem absorvida pelos comprimentos de onda localizados na região do visível e infravermelho próximo, a aplicação da pasta de carvão poderá, mesmo com os *lasers* de érbio¹¹¹, aumentar a absorção do feixe *laser* e restringi-la à superfície do esmalte, certificando o depósito de energia a um pequeno volume de tecido. Assim, seria esperado que o aquecimento superficial fosse maior com a presença do carvão, o qual talvez promovesse mudanças morfológicas na superfície irradiada típicas de maior aquecimento, tais como fusão do esmalte. Entretanto, ao contrário do que se esperava, a aplicação de carvão não promoveu tais mudanças na morfologia do esmalte irradiado (FIG. 24 e 25), e sim promoveu áreas ablacionadas mais bem definidas na observação por microscopia eletrônica de varredura. Isto pode ter ocorrido, de fato, devido à interação da irradiação *laser* com a pequena quantidade de água presente na pasta manipulada (pasta composta de partículas de carvão diluídas em etanol 50% e água 50%), a qual pode ter potencializado a ação ablativa do *laser*, conforme citado anteriormente^{108,109,134,137}.

A confirmação dos valores de temperatura superficial atingidas durante as irradiações é o primeiro passo para ratificar se a irradiação *laser* proporciona mudanças na composição do esmalte. Os dados de temperatura

superficial obtidos neste trabalho evidenciam o potencial do *laser* de Er,Cr:YSGG em induzir modificações cristalográficas do esmalte quando empregado sob fluências de 5,6 J/cm² e 8,5 J/cm², uma vez que foram atingidas temperaturas superiores a 130° C (FIG. 27 e 28). Sabendo que a perda de água e de carbonato, componente que propicia o aumento da solubilidade do esmalte, se inicia em temperaturas ao redor de 100° C.^{32,34}, pode-se inferir que as irradiações com *laser* de Er,Cr:YSGG nestas fluências pode promover um aumento da resistência do esmalte à desmineralização. Em contrapartida, a irradiação sob fluência de 2,8 J/cm² parece não promover efeitos sobre a microestrutura do esmalte dependentes da temperatura pois não foram atingidos valores de temperatura superiores a 80° C.

A variação média de temperatura ao redor de 222,6° C atingida durante a irradiação com *laser* a 8,5 J/cm² é inferior aos 400° C reportado por Fried *et al.* (1996)²⁶ em estudo prévio; os mesmos autores reportam aumentos de temperatura em torno de 200° C com irradiação do esmalte sob fluência de 4 J/cm² em tempo de 0,4 ms de exposição. Além de considerarmos as diferenças entre os equipamentos *laser* utilizados neste estudo e no estudo de Fried *et al.* (1996)²⁶, os quais utilizaram um *laser* com pulsos curtos, com largura temporal de aproximadamente 1 µs de duração, a diferença entre os valores de temperatura mencionados deve-se provavelmente ao sistema de medida de temperatura adotado, pois o sistema de espelho elíptico com um detector de HgCdZnTe empregado pelos autores supracitados possui resolução temporal de 1 µs. Considerando que a largura de pulso do *laser* Er,Cr:YSGG empregado neste estudo é da ordem de 140 µs, os picos de temperatura promovida por tal irradiação surgem em tempo da ordem de dezenas ou poucas centenas de microssegundos. Conseqüentemente, mesmo com a velocidade de gravação ajustada para 900 Hz, a câmera termográfica somente detecta temperaturas após 1,1 milissegundo.¹¹⁹ O aumento de temperatura causado por cada pulso *laser* poderia ser monitorado apenas por uma técnica com detecção ainda mais rápida, como medidas de radiação de corpo negro por esfera integradora. Assim, supõe-se que os picos de temperatura promovidos pelas fluências *laser* utilizadas sejam maiores do que os detectados neste estudo.

A aplicação previa da pasta de pó de carvão aumentou as temperaturas superficiais atingidas em todos os grupos (FIG. 27), fato que comprova a concentração da energia *laser* na superfície devido à maior absorção pelo carvão ou pela água constituinte da pasta. A evidência de explosões durante as irradiações, detectadas pelas imagens em infravermelho, mostra que as partículas de carvão são ejetadas durante as irradiações, podendo inclusive carregar um pouco da energia *laser* absorvida; com isso, a transmissão do calor para o interior do elemento dental pôde ser bastante diminuída.

Buscando-se determinar parâmetros *laser* adequados para aplicação clínica, torna-se imprescindível averiguar as temperaturas pulpare atingidas durante as irradiações. Na análise de temperatura em dentina profunda (SPOT 2 – 4 mm abaixo da superfície do esmalte) com a câmera termográfica, constatou-se que o aumento da fluência *laser* empregada ocasionou o aumento significativo das temperaturas pulpare atingidas (FIG. 29). Entretanto, deve-se considerar, nesta análise, as limitações do equipamento para detecção de temperatura pulpar devido às amostras estarem seccionadas e, desta forma, apresentarem menor massa, o que influencia na propagação do calor.¹⁰¹ Assim, para a detecção acurada das temperaturas pulpare atingidas no momento das irradiações, tornou-se necessária a utilização de termopares de resposta rápida.

Para a análise da temperatura atingida na câmara pulpar, o monitoramento foi realizado utilizando-se condições que mais se aproximassem das condições clínicas, tais como o uso de banho térmico com temperatura controlada de 37° C para simulação de ambiente oral.¹⁰⁰, aplicação de pasta com condutividade térmica semelhante à da polpa.¹¹⁸ e irradiação com movimentos manuais de varredura sobre toda a superfície oclusal das amostras, simulando um procedimento clínico de prevenção.^{16,59}, o que não foi possível de ser realizado no experimento com a câmera termográfica, pois a obtenção de imagens dinâmicas não torna possível a análise de temperatura em regiões específicas e padronizadas. Além disso, o tempo de irradiação no experimento com termopares foi aumentado para 30 segundos, ao invés de 5 segundos utilizados no experimento da câmera termográfica, visando um monitoramento de temperatura na região intrapulpar em exposições mais prolongadas ao *laser* e próximas à

realidade clínica, o que não foi possível de ser realizado com a câmera termográfica.

Baseados nos dados obtidos, ressalta-se que nenhuma das fluências *laser* empregadas ultrapassou os limites críticos de temperatura para indução de pulpite, reportados em trabalho clássico de Zach e Cohen.¹⁰² como 5,5° C, mesmo com 30 segundos de irradiação contínua sobre a superfície oclusal das amostras. Entretanto, deve-se ter cautela quanto ao tempo de irradiação, pois estudos prévios mostram que 50 segundos de irradiação, sob as mesmas condições, induzem a aumentos de temperatura que podem superar o limiar estabelecido para pulpite.¹³⁸ O tempo de 30 segundos de irradiação foi definido como sendo um período clínico aceitável em que é possível irradiar toda a superfície oclusal de dentes molares hígidos, removendo-se toda a pasta de pó de carvão previamente aplicada. Períodos maiores de irradiação podem acarretar em riscos pulpare e são, portanto, desaconselhados. Ainda assim, estudos posteriores devem ser realizados para se determinar o tempo ideal de irradiação considerando dentes com menor massa, com algum grau de cárie ou presença de restaurações, características que alteram as propriedades térmicas dos tecidos.^{100,101,103,105}, assim como sugere-se a realização de estudos histológicos *in vivo*.

O aumento de temperatura pulpar pareceu ter uma relação positiva com a fluência *laser* empregada, o que corrobora resultados anteriores obtidos com outros comprimentos de onda.¹⁰⁶ Embora a ausência de refrigeração seja um passo crítico para a promoção de aumentos de temperatura.^{109,112,117}, o mesmo não foi verificado neste estudo. Isto se deve ao fato de terem sido empregadas fluências baixas, associado ao modo de aplicação pulsado do *laser* que permitiu um resfriamento do tecido entre os pulsos. A aplicação prévia da pasta de pó de carvão não reduziu a transmissão de calor da superfície para a polpa em todas as fluências *laser* testadas. Desta forma, a aplicação prévia de fotoabsorvedor propiciou o aumento da área de ablação; entretanto, não propiciou benefícios quanto às temperaturas pulpare ou superficiais atingidas durante as irradiações.

Diante dos resultados obtidos nestes estudos preliminares, é consequência natural avaliar o potencial dos parâmetros selecionados para prevenir a desmineralização, tendo em vista que os relatos encontrados na

literatura a respeito do *laser* de Er,Cr:YSGG para tal finalidade apresentam-se controversos.^{18,23,24,26,29,51,88,93,96}

Primeiramente, serão feitas considerações a respeito da metodologia empregada. A ação deste *laser* sobre a perda mineral foi avaliada pelo método de microdureza seccional, tendo em vista o alto coeficiente de correlação (0,919) entre o teste de microdureza e o teste padrão ouro de microrradiografia para a determinação da perda mineral.¹²⁴ Antes disso, as amostras foram submetidas ao desafio cariogênico *in vitro*, visando a simulação do processo de cárie. A ciclagem de pH se refere a um modelo *in vitro* de desenvolvimento de cárie em que o substrato (esmalte/dentina) é exposto a combinações de períodos de desmineralização e remineralização, designados para simular as variações dinâmicas na saturação do mineral e no pH associadas com o processo natural de cárie.¹³⁹ Essa dinâmica permite sua diferenciação de outros métodos clássicos de desmineralização, tais como a imersão em solução tampão de acetato ou lactato, imersão em meio de cultura de bactérias acidogênicas e contato com gel acidificado, os quais não se assemelham com o processo que ocorre no ambiente oral.²⁰ Dessa forma, quando o substrato dental é mantido na solução desmineralizadora, composta de tampão ácido com cálcio e fosfato em pH baixo, mimetizam-se os vários momentos de decréscimo de pH que ocorrem no biofilme dental e na superfície do esmalte diariamente. O estágio de remineralização, por sua vez, é simulado com o emprego de soluções contendo cálcio e fosfato em um grau de saturação semelhante àquele da saliva.^{139,140}, em pH neutro.

No presente estudo, a manipulação das soluções desmineralizantes e remineralizantes seguiu o protocolo estabelecido por Argenta *et al.* (2003).¹²¹, tendo em vista que a adição de pequenas concentrações de flúor nestas soluções permitiria a obtenção de lesões incipientes com integridade superficial. Este fato possibilita a determinação de microdureza seccional a pequenas distâncias da superfície, aumentando a acuidade para detecção de possíveis diferenças entre os tratamentos propostos. Considerando que a irradiação com *laser* de Er,Cr:YSGG atua em cerca de 2 μ m da superfície do esmalte,²⁵ esta superfície alterada poderia ter sua resistência à desmineralização significativamente aumentada.^{33,34} Além disso, a quantidade de flúor adicionada nas soluções DES e

RE simula a concentração de flúor encontrada na saliva dos indivíduos que ingerem água fluoretada regularmente, o que aproxima ainda mais o modelo proposto da situação que ocorre *in vivo*. A escolha do modelo proposto também foi motivada por permitir avaliar o efeito do fluoreto nos estágios iniciais de cárie.¹²¹

Entretanto, algumas modificações foram realizadas ao modelo proposto por Argenta *et al.* (2003).¹²¹ O período de ciclagem de pH foi aumentado de 5 para 10 dias pois, como os tratamentos aqui propostos envolvem o emprego de altas concentrações de flúor em pH baixo (aplicação de FFA), as quais originam uma grande formação de fluoreto de cálcio sobre a superfície do esmalte^{3,35,39,42,120}, seria necessária a obtenção de lesões com maior profundidade para possibilitar a detecção das possíveis diferenças entre os tratamentos, além de possibilitar a avaliação da perda mineral em profundidades maiores do que 25 µm, profundidade das lesões obtidas pelos autores supracitados. Outrossim, as soluções de ciclagem de pH foram trocadas no 5º dia de ciclagem, estratégia tomada buscando-se evidenciar a ação da irradiação *laser* sobre a dissolução do esmalte e a provável retenção de flúor. Isto seria detectado apenas após a troca das soluções pois, nos primeiros dias de ciclagem, todo o fluoreto de cálcio formado em virtude da aplicação tópica de FFA estaria dissolvido nas soluções DES-RE e a ação do *laser* não seria possivelmente detectada.

Na presente pesquisa, foi realizada aplicação de FFA durante 4 minutos.¹²⁰ Embora estudos anteriores tenham demonstrado não haver diferenças significativas na inibição ou na redução da profundidade da lesão de cárie, bem como na incorporação de flúor ao esmalte com tempos de aplicação de 1 ou 4 minutos.^{120,122}, optou-se por este último, visto que os trabalhos que avaliaram a associação de *laser* e flúor têm relatado períodos de 4 ou 5 minutos.^{17,20,22,55,56,57,59,88}, o que facilitaria a comparação dos resultados obtidos pelo presente estudo.

Os dados de perda mineral obtidos neste trabalho evidenciam que o grupo sem tratamento apresentou aproximadamente 60% de mineral perdido (FIG. 36) após o desafio cariogênico, de forma semelhante ao reportado por Fried *et al.*²⁶ (1996) e Argenta *et al.*¹²¹ (2003). A profundidade das lesões de cárie

atingidas foi, em média, de 80 μm , maiores do que a obtida por Argenta *et al.*¹²¹ (2003) devido ao maior número de dias de ciclagem de pH. Analisando-se os resultados obtidos neste trabalho, pode-se inferir que a irradiação do esmalte com *laser* de Er,Cr:YSGG foi capaz de promover redução significativa ($p < 0,01$) na perda mineral apenas quando empregado sob fluência de 8,5 J/cm^2 (FIG. 35); contudo, tal redução não foi estatisticamente diferente daquela promovida quando apenas o FFA é aplicado sobre o esmalte (TAB. 11). Tais efeitos corroboram os achados de temperatura superficial do presente trabalho, quando, na fluência de 8,5 J/cm^2 , foi evidenciado aumento de temperatura de aproximadamente 187° C, a qual propicia a remoção de água e carbonato o que, conseqüentemente, pode resultar em um tecido mais resistente à desmineralização (FIG. 27). Com a fluência de 5,6 J/cm^2 , os aumentos de temperatura detectados foram de menor proporção (cerca de 110° C) e, por isso, os efeitos sobre a perda mineral foram de menor significância; com 2,8 J/cm^2 , indicando que não houve modificações na estrutura cristalográfica do esmalte, pois as temperaturas não ultrapassaram a faixa de 20°C; portanto não seria esperado efeito sobre a resistência à desmineralização.

Os efeitos sobre a perda mineral observados aqui confirmam o já relatado por Fried *et al.* (1996)²⁶, quando o emprego de fluência de 9,6 J/cm^2 resultou em um decréscimo significativo da perda mineral, em torno de 30%. Em contrapartida, o trabalho posterior de Apel *et al.* (2004)²⁹ relatou que a fluência de 8 J/cm^2 não exerceu efeitos significativos sobre a microdureza de superfície em estudo *in situ*, embora tenha havido uma tendência de redução da desmineralização após a irradiação *laser*. Deve-se ressaltar, aqui, a diferença de metodologia do trabalho de Apel *et al.* (2004)²⁹ com a do presente trabalho, o que dificulta a comparação. Os resultados descritos aqui também corroboram os obtidos por Freitas (2005)²⁴, a qual, ao empregar metodologia de ciclagem de pH, reportou que apenas a fluência de 8,5 J/cm^2 resultou em decréscimo significativo da perda mineral, em contraste com as demais fluências empregadas (2,8 J/cm^2 e 5,6 J/cm^2) que não promoveram efeitos distintos aos obtidos pelo grupo sem tratamento.

No presente estudo, os efeitos da irradiação *laser* a $8,5 \text{ J/cm}^2$ sobre a perda mineral puderam ser visualizados até $40 \text{ }\mu\text{m}$ de profundidade (FIG. 35). A aplicação tópica de FFA promoveu efeitos em até $50 \text{ }\mu\text{m}$ de profundidade, assim como permitiu uma significativa redução na perda mineral quando comparado ao grupo controle (FIG. 33), resultados que condizem com a literatura^{35, 141}.

A aplicação da pasta de pó de carvão previamente às irradiações possibilitou discreta redução na perda mineral das amostras em todas as fluências *laser* empregadas neste estudo; porém, esta redução não pôde ser verificada estatisticamente (FIG. 33). O mesmo ocorreu na associação com a irradiação *laser* e a posterior aplicação de flúor, quando os grupos que tiveram aplicação de carvão apresentaram uma menor perda mineral, porém não significativa, quando comparado com os respectivos grupos sem a aplicação de carvão (FIG. 33). Este fato sugere que a aplicação de carvão não interferiu na interação da irradiação *laser* com o esmalte de forma que possibilitasse um aumento da resistência do esmalte irradiado à desmineralização. Os achados de temperatura superficial deste estudo, embora demonstrem que a pasta de carvão aumentou as temperaturas atingidas durante as irradiações (FIG. 27), evidenciam que tais aumentos não são suficientes para promover alterações cristalográficas mais importantes no esmalte em comparação com as amostras irradiadas sem o carvão. Desta forma, considerando que a remoção de carbonato se inicia em 100°C e tem sua remoção completa em temperaturas em torno de 1100°C , que a matriz orgânica do esmalte é destruída após 400°C e que a formação de pirofosfatos se inicia em 650°C ^{33,34,73}, incorre-se que a aplicação prévia da pasta de pó de carvão foi insuficiente para concentrar a energia *laser* para que haja aumento da temperatura atingida que propicie mudanças químicas no esmalte mais expressivas do que aquelas promovidas pela irradiação *laser* em si. Justificam-se, assim, as não-diferenças encontradas na perda mineral na comparação entre as amostras que tiveram ou não a aplicação prévia de carvão.

A associação da irradiação *laser* com a aplicação tópica de FFA promoveu diminuição significativa da perda mineral em relação ao grupo controle, independentemente da fluência *laser* empregada (FIG. 33), porém, não pôde ser evidenciado sinergia entre a irradiação *laser* e a aplicação tópica de flúor. Ainda

assim, a perda mineral promovida foi significativamente menor do que todos os grupos somente irradiados. Isto evidencia que o flúor em alta concentração e em pH baixo atua de forma expressiva sobre a desmineralização do esmalte^{2,3,6,35}, reduzindo-a com a formação de fluoreto de cálcio e de fluorapatita, e que os efeitos promovidos por ele superam o efeito da irradiação *laser* isoladamente, mesmo quando empregado sob a fluência de 8,5 J/cm². Embora as associações [*laser* + flúor] ou [*laser* + carvão + flúor] tenham promovido valores de perda mineral numericamente inferiores aos do grupo FFA, tais valores não diferiram estatisticamente deste grupo. A sinergia entre a aplicação de flúor, sob suas mais diversas formas, e a irradiação *laser* foi demonstrada em estudos prévios realizados principalmente com os *lasers* de CO₂^{17,54,55,86,87} e Nd:YAG^{16,56,57,58}, os quais podem promover elevações de temperatura de até 1200° C. Nesses estudos, ressalta-se que o aumento de temperatura decorrente das irradiações pode promover um aumento na retenção, difusão e na incorporação do flúor, potencializando o seu efeito sobre o esmalte, ou mesmo tornar o esmalte irradiado mais reativo à aplicação posterior de fluoreto⁸⁴. Com o *laser* de Er,Cr:YSGG, entretanto, tal temperatura é impossível de ser atingida utilizando-se as fluências empregadas neste estudo (FIG. 28). O único trabalho anterior que avaliou a associação do *laser* de Er,Cr:YSGG com o flúor (com a imersão de blocos de esmalte bovino em solução de NaF 1% durante 15 minutos) relatou haver uma redução na solubilidade de cálcio nas amostras irradiadas com 8 J/cm² associadas ao fluoreto, entretanto, a concentração de cálcio em solução também não diferenciou estatisticamente do grupo controle positivo²³. Entretanto, alguns autores reportam que, mesmo não havendo aumentos tão expressivos de temperatura, a irradiação *laser* pode aumentar a difusão de íons flúor para o interior do esmalte e a possível retenção do mesmo por período mais prolongado de tempo, fato demonstrado com o emprego do *laser* de Argônio^{78,79,80}. Tais autores sugerem que efeitos fotoquímicos podem ocorrer. Não se sabe, contudo, se tais efeitos podem ocorrer também com outros comprimentos de onda.

Buscando-se explicar as prováveis interações da irradiação *laser* com o flúor e dar suporte aos resultados de perda mineral obtidos, foram realizadas, posteriormente neste estudo, as análises de flúor fracamente e fortemente ligado. As concentrações de fluoreto de cálcio, em µg F⁻/cm²,

formadas neste trabalho mostram que a irradiação *laser*, quando aplicada isoladamente sob fluências de 2,8 J/cm² e 5,6 J/cm², é capaz de aumentar a retenção do flúor presente nas soluções des- e remineralizantes (FIG. 80). Esta afirmação é evidenciada pelo aumento estatisticamente significativo, ao nível de 1%, das quantidades de flúor fracamente ligado encontradas nos grupos [*laser* 0,25 W] e [*laser* 0,50 W] comparativamente ao grupo controle (TAB. 70 e 71). Não houve diferenças, contudo, entre as diferentes fluências empregadas. De fato, estes achados podem comprovar a teoria exposta anteriormente que a irradiação *laser* pode tornar o esmalte irradiado mais reativo ao fluoreto⁸⁴, aumentando, assim, a retenção do flúor presente em solução. Neste momento, deve-se ressaltar que, nestas amostras, não houve formação de CaF₂ uma vez que seria necessária uma concentração de flúor superior a 100 ppm para que isto ocorresse⁴⁰. Entretanto, a presença de flúor em solução, mesmo em concentrações inferiores a 0,1 ppm, poderá atrair o cálcio da mesma e adsorver-se aos cristais de hidroxiapatita, originando a fluorapatita^{39,41}. Assim, o flúor detectado nestas amostras que não tiveram aplicação de FFA pode ser decorrente de extração de fluorapatita, uma vez que, no presente estudo, foi empregada a consagrada solução de hidróxido de potássio na concentração de 1 M¹²⁶. Segundo trabalho recente de Larsen & Richards (2004)¹⁴², a concentração de 1M deveria ser reduzida para 1 mM pois, em pH acima de 12, a fluorapatita é cerca de 10 vezes mais solúvel que a hidroxiapatita e, assim, a solução de concentração de 1 M (a qual tem pH aproximado de 11^{xi}) pode extrair também fluorapatita ao invés de extrair apenas o CaF₂ que se encontra sobre a superfície. Entretanto, a ausência da comprovação desta hipótese na literatura com trabalhos posteriores ao supracitado motivou a realização da análise, neste trabalho, utilizando a clássica concentração de KOH 1M para possibilitar comparações com os trabalhos já publicados.

Pela análise de flúor fracamente ligado, pode-se verificar, evidentemente, que todos os grupos em que o FFA foi aplicado topicamente tiveram significativamente maior formação de fluoreto de cálcio (FIG. 79) quando comparados aos grupos que não receberam aplicação tópica. A irradiação *laser*

^{xi} Valor medido experimentalmente no Laboratório de Bioquímica Oral da FOP-UNICAMP.

previamente à aplicação de FFA possibilitou o aumento de CaF_2 retido com relação ao grupo onde apenas o FFA foi aplicado, sendo os valores obtidos significativamente diferentes apenas para as fluências $5,6 \text{ J/cm}^2$ e $8,5 \text{ J/cm}^2$ (FIG. 81). Isto mais uma vez corrobora o sugerido por Apel *et al.* (2002)²³, os quais afirmaram que fluências mais elevadas levam a maiores efeitos sobre o esmalte irradiado. No presente trabalho, observou-se também que o aumento da fluência *laser* foi fator determinante para possibilitar o aumento da retenção de flúor. Não se pode, entretanto, correlacionar estes achados com dados de incorporação de flúor uma vez que a quantidade de flúor formado nas amostras imediatamente após os tratamentos não foi determinada neste trabalho e sim será determinada posteriormente.

O aumento na retenção de flúor evidenciada no presente trabalho condiz com as hipóteses citadas por outros autores, os quais sugeriram que a remoção de água e carbonato durante as irradiações podem resultar em microespaços que provocariam a deposição de íons flúor, a qual seria facilitada, inclusive, com a dissolução do esmalte promovida pelo ácido fosfórico presente no FFA⁸³. Esta maior retenção de flúor favoreceria o efeito cariostático de tal forma que o mesmo seria mantido por um período maior de tempo^{85,79}. Entretanto, esta hipótese não pôde ser confirmada no presente estudo, pois seria necessário um maior período de desafio cariogênico.

A aplicação prévia da pasta de pó de carvão não interferiu na retenção de flúor fracamente ligado, fato evidenciado pela ausência de significância estatística entre os grupos irradiados e seus respectivos pares com aplicação de carvão (FIG. 81). Este fato confirma os resultados relatados de perda mineral (FIG. 33), quando se sugere que a aplicação de carvão parece ser insuficiente para promover diminuição da perda mineral. Ainda assim, os dados de temperatura superficial também sugerem que os aumentos de temperatura promovidos pela aplicação prévia de carvão não sejam suficientes para promover efeitos distintos, seja na perda mineral ou na retenção de flúor.

A determinação de flúor total confirma se ocorreu a formação de fluorapatita, no corpo das lesões de cárie produzidas, decorrente dos tratamentos propostos. Como tais tratamentos objetivam um aumento da resistência do

esmalte à desmineralização, poderia haver diferenças nas profundidades das camadas de esmalte removidas pelo HCl, o qual removeria menor massa daquelas amostras que se apresentassem mais resistentes à ação do ácido clorídrico. Este fato, entretanto, não ocorreu no presente trabalho tendo em vista a ausência de diferença estatística entre as profundidades das camadas de esmalte removidas para os diferentes tratamentos, o que possibilitou a comparação entre as concentrações de flúor (em ppm) encontradas nos diversos grupos (FIG. 82, 83 e 84).

Os tempos de exposição ao ácido clorídrico empregados no presente trabalho (15, 30 e 60 segundos) foram elegidos buscando-se demonstrar as possíveis diferenças entre os tratamentos. Considerando-se que o tratamento do esmalte com alta concentração de fluoreto em pH ácido potencializa a formação de fluoreto de cálcio.³⁹ (o qual, em grande quantidade, permite que haja um crescente nível de flúor nas camadas subsuperficiais.³) e que o FFA foi aplicado em muitos grupos deste trabalho, corria-se o risco de não ser evidenciada diferenças entre os tratamentos caso fossem removidas grandes camadas de esmalte. Ainda assim, sabe-se que a irradiação com o *laser* de Er,Cr:YSGG atua em profundidades de aproximadamente 2 μm .⁹⁰; desta forma, esperava-se que as maiores diferenças quanto à formação de fluorapatita pudessem ser detectadas na superfície das lesões de cárie.

As profundidades médias de esmalte removido neste trabalho foram de 3,0 μm , 9,24 μm e 20,61 μm com os tempos de biópsia de 15, 30 e 60 segundos, respectivamente. Tais profundidades de esmalte eram esperadas tendo em vista que trabalhos anteriores reportaram a remoção de camadas de esmalte de 10 μm de espessura com 30 segundos de exposição ao ácido e 20 μm de espessura com 60 segundos de exposição.¹⁴¹. Vale ressaltar que, para a determinação completa do flúor total, a profundidade considerada “ideal”, para este tipo de análise, é aquela que permite a remoção completa da lesão de cárie, o que, neste trabalho, seria atingido em profundidades ao redor de 80 μm . Entretanto, seriam necessárias maiores exposições ao ácido, o que não foi realizado no presente estudo mas que será realizada posteriormente.

De acordo com os resultados obtidos, observa-se que a aplicação de FFA resulta em grande quantidade de fluorapatita encontrada no esmalte com relação do grupo controle, o que confirma os dados observados na literatura.^{141,143} Ainda assim, os resultados concordam com a assertiva que o efeito mais proeminente dos produtos formados decorrente da aplicação de FFA é o enriquecimento expressivo do esmalte remineralizado com fluoreto.¹⁴⁴

Considerando a comparação entre os grupos que não tiveram aplicação tópica de FFA, observa-se que, nos primeiros 3 µm de profundidade, os grupos [*laser* 0,50 W] e [*laser* 0,75 W + carvão] tiveram médias de concentração de flúor no esmalte significativamente maiores do que o grupo controle, entretanto, tais valores foram similares ao grupo FFA (TAB. 80 e 81). Este fato demonstrou que apenas estes grupos tiveram maior quantidade de fluorapatita, a qual pode ter sido formada decorrente da reação entre o flúor presente nas soluções des- e remineralizantes. Este flúor, mesmo em baixas concentrações, pode ser adsorvido aos cristais de hidroxiapatita expostos durante o processo cariogênico.^{39,41} e, provavelmente, teve sua ação facilitada pela irradiação *laser*, a qual pode ter tornado o esmalte mais reativo.^{83,84} Entretanto, este fato não foi confirmado nos demais grupos irradiados. Ainda assim, a concentração de flúor encontrada nas amostras em que o FFA não foi aplicado topicamente pode ser intrínseca do próprio esmalte, decorrente dos primeiros estágios de mineralização.^{3,6,41,43} ou mesmo decorrentes de uma provável exposição anterior destes dentes ao flúor, considerando que os dentes empregados neste trabalho são provenientes de banco de dentes e, portanto, não se pôde controlar se estes dentes tiveram ou não exposição prévia ao flúor.

Nas demais profundidades de esmalte removidas, na comparação entre os grupos controle, positivo e negativo, e os grupos irradiados sem aplicação de FFA, observou-se não haver diferença na concentração de flúor entre os grupos irradiados, com ou sem carvão, e o grupo controle, assim como não houve efeitos das várias fluências *laser* empregadas (FIG. 89 e 92). Isto demonstra que as concentrações de flúor encontradas nas análises das camadas mais profundas são mesmo intrínsecas do esmalte.

Considerando os grupos irradiados que tiveram posterior aplicação tópica de FFA, visualizam-se, ainda nos primeiros 3 μm de profundidade, que tais grupos apresentaram médias similares ao grupo onde apenas o FFA foi aplicado, não havendo também diferenças entre as várias fluências empregadas (FIG. 87). O mesmo padrão foi observado nas demais profundidades consideradas neste estudo (FIG. 90 e 93). Assim, observa-se que aplicação de FFA possibilitou a formação significativa de fluorapatita, sendo esta quantidade formada mais expressiva nas camadas superficiais das lesões, o que confirma os achados da literatura^{141,145}. Ainda com relação à formação de fluorapatita, pode-se ressaltar que o efeito decorrente da aplicação tópica de FFA foi mais proeminente do que os efeitos da irradiação *laser* em si, de tal forma que não foi possível evidenciar diferenças entre os tratamentos mesmo nas menores profundidades do esmalte. Portanto, pode-se sugerir que a irradiação *laser* previamente à aplicação de FFA não proporciona diferenças quanto à quantidade de fluorapatita formada mesmo nas camadas mais superficiais do esmalte. Embora tenha sido reportado na literatura que a irradiação *laser* pode propiciar a formação de fluorapatita, este fato foi demonstrado apenas com o emprego do *laser* de CO_2 (de comprimento de onda de 9,6 μm), o qual possui coeficiente de absorção, em esmalte, cerca de 13 vezes maior quando comparado ao *laser* de Er,Cr:YSGG (TAB.1). Assim, o *laser* de CO_2 promove aumentos de temperatura acima de 1200° C. Desta forma, parece que o efeito da irradiação *laser* na formação de fluorapatita possa ser também dependente da temperatura atingida. Neste caso, sugere-se que a faixa de temperatura atingida quando empregadas as fluências selecionadas para o presente estudo parece ser insuficiente também para aumentar a formação de fluorapatita.

Os grupos [*laser* + carvão + FFA] tiveram um discreto, porém não estatisticamente significativo, aumento da concentração de fluorapatita em comparação com os respectivos grupos [*laser* + FFA] (FIG. 85, 88 e 91). Embora tal diferença não tenha sido detectada estatisticamente, pode-se observar que o pequeno aumento da concentração de flúor encontrada nestes grupos pode ser decorrente do carvão vegetal empregado. Ainda que não tenha sido dosada a quantidade de flúor que pode estar presente no carvão utilizado neste estudo, na literatura é conhecido que a queima de carvão produz flúor residual, o qual

inclusive pode estar associado à fluorose em alguns países com alto grau de poluição.^{3,146}. Infere-se, assim, que pode haver flúor no carvão vegetal empregado neste estudo. Desta forma, os poucos efeitos observados neste estudo decorrentes da aplicação prévia da pasta de pó de carvão pode estar relacionada com a quantidade, embora pequena, de flúor possivelmente presente no mesmo e não apenas com o potencial em promover maiores temperaturas durante as irradiações. Esta hipótese também pode ser aplicada aos achados de perda mineral, em que os menores valores de perda mineral encontrados nos grupos [*laser* + carvão + FFA], quando comparados aos respectivos grupos [*laser* + FFA], pode estar também relacionado a uma pequena quantidade de flúor presente no carvão vegetal. Como a pasta de pó de carvão foi aplicada previamente às irradiações, a irradiação *laser* posterior pode ter promovido a retenção do flúor, presente nas partículas de carvão, sobre a superfície do esmalte irradiado. Este flúor, embora em pequenas quantidades, pode ter exercido um efeito benéfico auxiliando a formação de fluorapatita. Os resultados da concentração de flúor encontrada nas soluções empregadas na ciclagem de pH podem também corroborar esta hipótese.

Buscando-se avaliar as perdas ou ganhos de cálcio, fósforo e flúor durante o desafio cariogênico *in vitro*, assim como para dar suporte aos resultados obtidos nas análises anteriores, foram realizadas as dosagens destes íons em todas as soluções desmineralizantes e remineralizantes empregadas no presente estudo, as quais foram substituídas no quinto dia de ciclagem. Tendo em vista as hipóteses mencionadas anteriormente que a irradiação *laser* propiciaria uma maior retenção de flúor no esmalte.^{83,84}, tal efeito provavelmente seria evidenciado nas soluções empregadas após o 5º dia de ciclagem, uma vez que o flúor formado decorrente das aplicações tópicas de FFA estaria dissolvido nas soluções empregadas nos primeiros dias de ciclagem, conforme evidenciado na literatura.¹⁴¹.

A análise de eletrólitos nas soluções desmineralizantes evidenciou um aumento na quantidade de cálcio para todos os grupos em relação aos valores iniciais, afirmação válida para ambas as soluções obtidas após 5 e 10 de ciclagem de pH (FIG. 47 e 50). O mesmo fato também ocorreu quanto às

quantidades de fósforo inorgânico detectadas nas mesmas soluções (FIG. 58 e 61). Este acontecimento comprova a ação de desmineralização destas soluções, com a conseqüente dissolução do esmalte para a formação da lesão incipiente de cárie, perdendo cálcio e fósforo para as soluções^{20,53,59, 121}, o que corrobora resultados anteriores obtidos com a irradiação do esmalte com outros comprimentos de onda *laser*. Assim, o modelo de ciclagem de pH proposto é capaz de simular eficientemente o processo dinâmico de cárie que ocorre *in vivo*, quando os íons cálcio, fósforo e flúor são dissolvidos e liberados no ambiente oral^{2,3}. As diferenças encontradas entre as concentrações de cálcio presentes nas soluções DES 5 dias e DES 10 dias foram insignificantes para todos os grupos de tratamento deste estudo (FIG. 51), o que evidenciou que o processo de desmineralização realizou-se de forma contínua durante todo o período de ciclagem de pH e que a troca de soluções não interferiu neste processo. A mesma evidência foi revelada quanto às diferenças entre as concentrações de fósforo inorgânico nas soluções DES 5 dias e DES 10 dias (FIG. 62).

Com relação às diferenças encontradas entre os tratamentos propostos, observa-se não haver diferença estatisticamente significativa comparando-se os grupos [controle] e [FFA] quanto às concentrações de cálcio e fósforo inorgânico encontradas nas soluções desmineralizantes, o que condiz com resultados encontrados na literatura²⁰, quando foi empregado o mesmo tipo de ciclagem de pH utilizado neste trabalho. Ainda assim, deve-se ser considerado que a quantidade de cálcio encontrada nas soluções provenientes das amostras que tiveram aplicação tópica de FFA pode também ser originada da dissolução do excedente dos produtos formados decorrentes da aplicação tópica de FFA¹²⁰ (CaF_2), o que pode mascarar os resultados de cálcio obtidos¹⁴¹.

Os diferentes grupos irradiados deste estudo também não promoveram diferenças nas quantidades de cálcio encontradas nas soluções desmineralizantes, com exceção do grupo [*laser* 0,50 W + FFA], o qual promoveu diminuição significativa na concentração de cálcio nas soluções DES 10 dias comparativamente aos grupos [controle] e [FFA] (TAB. 27). Tais resultados corroboram os evidenciados por Apel *et al.*²³ (2002), quando a irradiação do esmalte com *laser* de Er,Cr:YSGG sob fluências de 4 J/cm², 6 J/cm² e 8 J/cm² não promoveram menores perdas de cálcio quando comparados ao grupo sem

tratamento. Outrossim, nesse mesmo trabalho citado, não foi evidenciada diferença estatística significante na perda de cálcio dos grupos irradiados em associação com o fluoreto quando comparados ao grupo somente exposto ao flúor, embora os grupos tratados com flúor apresentaram concentrações de cálcio significativamente inferiores ao grupo sem tratamento. Vale ressaltar que, no trabalho supracitado, a desmineralização foi realizada empregando-se apenas solução tampão acetato, além do tempo de exposição ao flúor ser de 15 minutos, situações completamente diferentes das do presente estudo, o que dificulta a comparação. Para aqueles mesmos autores, a fluência do *laser* de Er,Cr:YSGG tem papel fundamental na quantidade de cálcio dissolvido, o que não foi confirmado neste trabalho. Estudos anteriores realizados com o *laser* de Er:YAG^{59,61} mostram que a quantidade de cálcio e fósforo dissolvidos nas soluções desmineralizantes não variam em função da fluência *laser*. Entretanto, ressalta-se aqui a ausência de trabalhos anteriores, empregando-se o *laser* de Er,Cr:YSGG, que empregaram modelos similares de ciclagem de pH ao utilizado neste estudo e avaliaram as concentrações de cálcio, fósforo inorgânico e flúor dissolvidos.

Nas análises de eletrólitos encontrados nas soluções remineralizantes, resultados distintos foram observados. Neste trabalho, o grupo [controle] apresentou um aumento na concentração de cálcio quando comparada à concentração inicial presente nas soluções remineralizantes; o grupo [FFA], contudo, apresentou discreta diminuição da concentração de cálcio, embora não evidenciada estatisticamente (FIG. 54 e 56). Assim, os resultados evidenciados no grupo [FFA] sugerem haver uma incorporação de íons cálcio pelo esmalte durante a permanência dos espécimes na solução remineralizante, o que evidencia, assim, a ação da mesma, embora em pequena magnitude, na remineralização das lesões, o que condiz com os fenômenos que ocorrem *in vivo*^{2,3}. Os demais grupos irradiados, independentemente de sua associação com o carvão ou com o FFA, apresentaram médias de cálcio, nas soluções remineralizantes, similares à do grupo [FFA], com exceção feita para o grupo [*laser* 0,25 W], o qual apresentou médias de cálcio discretamente inferiores ao grupo [FFA]. Estes achados demonstram que a irradiação *laser*, independentemente de sua associação com o carvão, FFA ou ambos, não

influencia na dinâmica do processo de cárie evidenciado pela dissolução de cálcio. Ainda assim, demonstra-se não haver uma perda expressiva de cálcio nas soluções remineralizantes, ao contrário do que ocorre nas desmineralizantes, o que também condiz com os achados da literatura²⁰.

Observando os achados de fósforo inorgânico nas soluções remineralizantes, nota-se que todos os grupos de tratamento deste estudo apresentaram concentração de fósforo inorgânico nas soluções remineralizantes significativamente aumentadas quando comparadas às concentrações de fósforo inorgânico iniciais, exceto para o grupo [*laser* 0,25 W], cujo aumento não foi detectado estatisticamente (FIG. 63 e 65). Estes achados evidenciam, ao contrário do que acontece com os íons cálcio, que a perda de fósforo inorgânico é mantida também nas soluções remineralizantes. Os grupos irradiados, independentemente de sua associação, também não apresentaram diferenças com relação ao grupo [FFA]. Tais achados corroboram o relatado por Tagliaferro²⁰ (2004), quando se detectou um aumento das concentrações de fósforo inorgânico nos grupos que tiveram aplicação tópica de FFA, independentemente se tiveram associação com a irradiação *laser* ou não, embora o *laser* empregado por essa autora seja de diferente comprimento de onda (*laser* de CO₂ de 10,6 µm). Sugere-se, assim, que a irradiação *laser* sob baixa fluência associada ao FFA, independentemente do comprimento de onda, não interfere na dinâmica do fósforo inorgânico, pois a ação do FFA parece prevalecer neste processo. Maiores estudos, contudo, são necessários para se confirmar tal hipótese.

Considerando as análises da concentração de flúor nas soluções desmineralizantes, observou-se que o grupo [controle] apresentou um declínio significativo na concentração de flúor quando comparado à quantidade inicialmente presente nas soluções antes da ciclagem de pH (FIG. 70), o que corrobora os achados da literatura²⁰. O mesmo achado pode ser visualizado para os grupos [*laser* 0,25 W], [*laser* 0,25 W + carvão], [*laser* 0,75 W] e [*laser* 0,75 W + carvão]. Isto evidencia que o flúor em baixa concentração presente nas soluções desmineralizantes é incorporado à lesão de cárie formada, auxiliando na formação da fluorapatita necessária para a remineralização das lesões, fenômeno semelhante ao que ocorre considerando a ação remineralizante da saliva *in vivo*^{2,3,39}. Tal achado confirma os resultados obtidos no presente trabalho quanto à

extração de flúor total (FIG. 94 e 95), o qual verificou maior presença de flúor na primeira camada de esmalte removido das lesões de cárie formadas de todos os grupos. A irradiação *laser*, nestes grupos considerados, parece não ter interferido neste processo.

Ainda considerando as soluções desmineralizantes, os valores da concentração de flúor para o grupo [FFA] não diferiram estatisticamente da concentração de flúor inicialmente presente nestas soluções (FIG. 73). Este achado evidencia que a aplicação tópica de FFA possibilitou a remineralização das lesões incipientes sem que houvesse remoção de flúor das soluções desmineralizantes, provavelmente utilizando-se do flúor presente no fluoreto de cálcio formado decorrente da aplicação tópica de FFA, o que confirma que o CaF_2 formado atuou como um reservatório de flúor, liberando o mesmo durante o desafio cariogênico, de forma semelhante ao que ocorre *in vivo*^{2,3}. Concentrações de flúor semelhantes ao grupo [FFA] foram também evidenciadas para os demais grupos irradiados com posterior aplicação de FFA, com exceção dos grupos [*laser* 0,50 W + FFA], [*laser* 0,50 W + carvão + FFA], [*laser* 0,75 W + FFA] e [*laser* 0,75 W + carvão + FFA], os quais apresentaram concentração de flúor nas soluções DES 5 dias significativamente superiores ao grupo [FFA], mas sem diferenças significantes entre si. Estes achados sugerem que a irradiação *laser*, nas potências médias de 0,50 W e 0,75 W (fluências de 5,6 J/cm² e 8,5 J/cm², respectivamente), pode ter induzido a uma maior formação de fluoreto de cálcio decorrente da aplicação tópica. Considerando que, nestas fluências, promove-se ablação tecidual, conforme demonstrado neste estudo pela análise de microscopia eletrônica de varredura (FIG. 24 e 25), a área de esmalte exposto torna-se amplamente aumentada²⁵. Embora possivelmente mais resistentes à desmineralização mediante a irradiação *laser* prévia, tais superfícies teriam um número consideravelmente maior de cristais de hidroxiapatita expostos à ação do ácido fosfórico presente no gel de flúor fosfato acidulado, o que propiciaria a maior disponibilidade de íons cálcio livres para a formação de fluoreto de cálcio, o qual seria formado em maior quantidade decorrente da maior área exposta. Esta hipótese condiz com afirmações já descritas na literatura, quando se mencionou que as alterações morfológicas promovidas pela irradiação *laser* podem aumentar a retenção do fluoreto e facilitar sua ação na desmineralização^{83,84}. A aplicação

prévia da pasta de carvão parece não ter interferido neste processo. Para a melhor discussão destes fenômenos, e para evidenciar se realmente a irradiação *laser* promove uma maior quantidade de fluoreto de cálcio em comparação com o esmalte não irradiado, seria necessária a extração de flúor fracamente ligado imediatamente após os tratamentos e antes da exposição das amostras ao desafio cariogênico. Entretanto, considerando que se trata de uma metodologia destrutiva, seriam necessárias novas amostras tratadas, o que não foi possível de ser realizado no presente estudo considerando o grande número de amostras já utilizado, porém tal análise será realizada posteriormente.

Nas soluções remineralizantes, observa-se que os grupos [controle] e [*laser* 0,25 W] apresentaram concentrações de flúor dissolvido significativamente menores do que a concentração inicial de flúor das soluções remineralizantes (FIG. 78). Este fenômeno demonstra, mais uma vez, que o flúor presente nas soluções remineralizantes foi adsorvido à lesão de cárie desenvolvida nas amostras destes grupos, originando a camada de fluorapatita superficial formada durante o processo de remineralização^{2,3,39,40}, demonstrada na FIG. 94. A irradiação com *laser* sob fluência de 2,8 J/cm² pareceu não ter interferido neste processo. Entretanto, ao observar as médias de concentração de flúor detectadas nas soluções remineralizantes dos grupos [FFA], [*laser* 0,25 W + FFA] e [*laser* 0,50 W], nota-se não haver diferenças significativas entre as concentrações encontradas após a ciclagem de pH e as concentrações de flúor inicialmente presente nas soluções (FIG. 78), o que evidencia, nestes grupos, que a ação do flúor presente nas soluções remineralizantes foi menor para a formação da fluorapatita na superfície destas lesões.

Observando as médias de concentração de flúor encontradas nas soluções remineralizantes dos demais grupos de tratamento (irradiados), observa-se um aumento significativo da concentração de flúor após a ciclagem de pH, em comparação com os valores iniciais de flúor presentes nas soluções. Isto demonstra novamente que, provavelmente em decorrência das alterações morfológicas mencionadas anteriormente, pode ter havido uma maior formação de fluoreto de cálcio nestas amostras que, formado abundantemente, foi também dissolvido nas soluções remineralizantes. Com relação aos grupos de tratamento, observa-se que este fenômeno ocorreu preponderantemente nas amostras

irradiadas com aplicação posterior de FFA, não havendo diferença significativa entre as fluências *laser* empregadas.

Entretanto, os grupos que foram irradiados com a aplicação prévia de carvão porém sem a aplicação de FFA (grupos genericamente denominados [*laser* + carvão]) apresentaram concentrações de flúor semelhantes aos grupos que tiveram aplicação posterior de FFA. Este fato demonstra novamente que o carvão possui uma quantidade de flúor que pode também ter se dissolvido nas soluções de ciclagem de pH, provavelmente sob a forma de um produto decorrente da ação da irradiação *laser* sobre o carbono e o flúor presente nas partículas de carvão. Este produto, embora detectado nas soluções remineralizantes, não deve interferir significativamente na dinâmica do processo de cárie, conforme foi demonstrado pelas análises de perda mineral.

Desta forma, pôde-se observar que o efeito mais promissor do laser de Er,Cr:YSGG, quando empregado sob os parâmetros selecionados para este estudo, é aumentar a área de reação para a formação dos produtos decorrentes da aplicação tópica de FFA. Para uma futura aplicação clínica com a finalidade de prevenção da cárie, deve-se ter em consideração as vantagens proporcionadas pela tecnologia laser, tais como a aceitabilidade pelo paciente e a necessidade de apenas uma única aplicação da terapia para permitir a manutenção do flúor em maior tempo na cavidade oral, o que traz muitos benefícios para paciente e profissional.

Embora tenha sido sugerido neste estudo que a irradiação *laser* possa promover um aumento na formação do produto de aplicação tópica de FFA, mais estudos ainda se fazem necessários para se avaliar se tal aumento pode ter um efeito em longo prazo principalmente para a prevenção da progressão das lesões cariosas. Ainda assim, estudos *in situ* se fazem necessários para se avaliar o comportamento do esmalte irradiado frente aos desafios cariogênicos, buscando-se também determinar a periodicidade que as irradiações devem ser realizadas e sua aplicabilidade clínica.

7. CONCLUSÕES

Com os parâmetros de irradiação *laser* de Er,Cr:YSGG selecionados para o presente estudo em esmalte dental humano, podem ser tiradas as seguintes conclusões:

- ❖ a irradiação *laser* promove discretas ablações no esmalte irradiado, as quais aumentam de área de acordo com a fluência empregada. A fluência de $8,5 \text{ J/cm}^2$ é também capaz de promover alterações morfológicas visíveis a olho nu;
- ❖ as fluências de $5,6 \text{ J/cm}^2$ e $8,5 \text{ J/cm}^2$ promovem aumentos de temperatura na superfície indicativos de promover alterações cristalográficas no esmalte;
- ❖ todas as fluências empregadas promovem aumentos na temperatura pulpar inferiores ao limiar aceito pela literatura, sendo consideradas potencialmente seguras para a vitalidade da mesma;
- ❖ a irradiação *laser* proporciona um aumento na retenção de fluoreto de cálcio originado da aplicação tópica de flúor fosfato acidulado, o que pode prolongar o seu efeito cariostático;
- ❖ tanto a irradiação *laser* a $8,5 \text{ J/cm}^2$ quanto a aplicação tópica de flúor fosfato acidulado demonstraram reduzir a desmineralização; entretanto, a associação destes tratamentos não apresentou maior efeito em reduzir a desmineralização do esmalte do que seus efeitos isolados.

8. APÊNDICES

APÊNDICE A – Carta de cessão dos dentes necessários à realização deste estudo pelo Banco de Dentes Humanos da FOUSP – SP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Odontologia
Banco de Dentes Humanos

São Paulo, 10 de dezembro de 2003.

Ao Comitê de Ética em Pesquisa do IPEN/CNEN-SP:

O Banco de Dentes Humanos da FOUSP (divisão Permanentes) declara que fornecerá 219 (duzentos e dezenove) dentes permanentes terceiros molares necessários ao projeto de pesquisa intitulado “Estudo *in vitro* de esmalte e dentina irradiados com o laser de Er, Cr:YSGG”.

Pesquisador(a) responsável: Profa. Dra. Denise Maria Zezell.

Obs.: Os dentes somente serão liberados após sua aprovação.

Prof. Dr. Jose Carlos P. Imparato
Responsável pelo BDH -FOUSP

APÊNDICE B – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa do IPEN/CNEN-SP **Parecer - Projeto Nº 094/CEP-IPEN/SP**

Com base nos pareceres apresentados pelos relatores, o protocolo de pesquisa "**Estudo *in vitro* de esmalte e dentina irradiados com o laser Er, Cr:YSGG**", de responsabilidade da **Profa. Dra. Denise Maria Zezell** foi considerado **APROVADO**.

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados, a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou finais, dependendo da duração do projeto) referentes ao andamento da pesquisa. Após o término da pesquisa, uma cópia do trabalho, em CD ou disquete, deve ser encaminhada a este CEP.

São Paulo, 24 de maio de 2004

Profa. Dra. Martha Marques Ferreira Vieira
Coordenadora do CEP-IPEN

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

- ¹ NARVAI, P.C. **Vigilância sanitária da fluoretação das águas de abastecimento público no município de São Paulo, Brasil, no período de 1990-1999**. 2001. Tese (Livre Docência), Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, São Paulo.
- ² LARSEN, M.J.; BRUN, C. A química da cárie dentária e o flúor – mecanismo de ação. In: THYLSTRUP, A.; FEJERSKOV, O. **Cariologia Clínica**, São Paulo, S.P.: Livraria Editora Santos, 1995, p. 231 - 252.
- ³ CURY, J.A. Uso do flúor e controle da cárie como doença. In: BARATIERI, L.N. et al. **Odontologia Restauradora – Fundamentos e Possibilidades**. São Paulo, S.P.: Editora Santos, 2001, p. 33 - 68.
- ⁴ CURY, J.A. Dentifrícios: Como escolher e como indicar. In: CARDOSO R.J.C.; GONÇALVES, E.A.N. **Odontologia – Odontopediatria e Prevenção**. São Paulo, S.P.: Artes Médicas, 2002, v. 4.
- ⁵ BRATTHALL, D.; HANSEL-PETERSSON, G.; SUNDBERG, G. Reasons for the caries decline: what do the experts believe? **Eur. J. Oral Sciences**, v. 104, p. 433 – 435, 1996.
- ⁶ CLARKSON, J.J.; MC LOUGHLIN, J. Role of fluoride in oral health promotion. **Int. Dent. J.**, v. 50, n. 3, p. 119-128, 2000.
- ⁷ MARTHALER, T.M. Changes in dental caries 1953 – 2003. **Caries Res.**, v. 38, p. 173-181, 2004.
- ⁸ LIMA, Y.B.O.; CURY, J.A. Seasonal variation of fluoride intake by children in a subtropical region. **Caries Res.**, v. 37, p. 335-338, 2003.
- ⁹ BASTOS, R.S.; OLYMPIO, O.; BIJELA, J.T.; BUZALAF, M.A.R.; BASTOS, J.R.M. Trends in dental caries prevalence in 12-year-old school children between 1976 and 2001 in Bauru, in Brazil. **Public Health**, v. 119, p. 269-275, 2005.
- ¹⁰ ETTINGER, R.L. Oral health needs of the elderly – an international review. **Int. Dent. J.**, v. 43, n. 4, p. 348-54, 1993.
- ¹¹ FEATHERSTONE, J.D.B. Caries detection and prevention with laser energy. **Dent. Clin. North Am.**, v. 44, p. 955-69, 2000.
- ¹² MAIMAN, T. H. Stimulated optical radiation in ruby. **Nature**, v. 187, n. 4736, p.493-494, 1960.

* De acordo com ABNT NBR-6023: 2000. Abreviatura de periódicos segundo Bases de Dados MEDLINE.

- ¹³ SOGNAES, R.F.; STERN, R.H. *Laser effect on resistance of human enamel to demineralization in vitro*. **J. S. Calif. Dent. Assoc.**, v. 33, p. 328-329, 1965.
- ¹⁴ STERN, R.H.; SOGNAES, R.F.; GOODMAN, F. *Laser effect on in vitro enamel permeability and solubility*. **J. Am. Dent. Assoc.**, v. 73, n. 4, p. 838-43, 1966.
- ¹⁵ STERN, R.H.; SOGNAES, R.F. *Laser inhibition of dental caries suggested by first tests in vivo*. **J. Am. Dent. Assoc.**, v. 85, p. 1087-1090, 1972.
- ¹⁶ ZECELL, D.M.; BOARI, H.G.D.; EDUARDO, C.P. Nd:YAG laser in caries prevention: a clinical study. **J. Oral Laser Appl.**, v. 1, p. 16- 16, 2001.
- ¹⁷ SANTOS, M.N.; FRIED, D.; HILO, M.R.; FEATHERSTONE, J.D.B. Effect of a new carbon dioxide laser and fluoride on occlusal caries progression in dental enamel. In: RECHMANN, P.; FRIED, D.; HENNIG, T. **Lasers in Dentistry II**. Bellingham, WA: Proc. SPIE n. 4610, p. 132 – 138, 2002.
- ¹⁸ FEATHERSTONE, J.D.B.; NELSON, D.G.A. *Laser effects on dental hard tissue*. **Adv. Dent. Res.**, v. 1, v. 21 – 26, 1987.
- ¹⁹ HICKS, J.; WINN, D. 2ND; FLAITZ, C.; POWELL, L. *In vivo caries formation in enamel following argon laser irradiation and combined fluoride and argon laser treatment: a clinical pilot study*. **Quintessence Int.**, v. 35, n.1, p. 15-20, 2004.
- ²⁰ TAGLIAFERRO, E.P.S. **Avaliação in vitro da associação de laser de CO₂ e flúor fosfato acidulado na inibição da progressão de cárie em esmalte de dentes decíduos**. 2004. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Odontologia da Unicamp, Piracicaba.
- ²¹ KINNEY, J.H.; HAUPT, D.L.; BALOOCH, M.; WHITE, J.M.; BELL, W.L.; MARSHALL, S.J.; MARSHALL, G.W. Jr. The threshold effects of Nd and Ho: YAG laser-induced surface modification on demineralization of dentin surfaces. **J. Dent. Res.**, v. 75, n. 6, p. 1388 – 95, 1996.
- ²² ZECELL, D.M.; CECCHINI, S.C.; EDUARDO, C.P.; MATSUMOTO, K.; DE ROSSI, W.; NOGUEIRA, G.E.; BERRETTA, JR.; VIEIRA JUNIOR, N.D.; MORATO, S.P. Experimental studies of the applications of the holmium laser in dentistry. **J. Clin. Laser Med. Surg.**, v. 13, n. 4, p. 283 – 9, 1995.
- ²³ APEL, C.; MEISTER, J.; SCHMITT, N.; GRABER, H.G.; GUTKNECHT, N. Calcium solubility of dental enamel following sub-ablative Er:YAG and Er,Cr:YSGG laser irradiation in vitro. **Lasers Surg. Med.**, v. 30, n. 5, p. 337-341, 2002.
- ²⁴ FREITAS, P.M. **Estudo in vitro do efeito da irradiação com o laser de Er,Cr:YSGG na inibição do processo de desmineralização do esmalte dental**. 2005. Tese (Doutorado). Faculdade de Odontologia da USP, São Paulo.

- ²⁵ SEKA, W.; FEATHERSTONE, J.D.B.; FRIED, D.; VISURI, S.R.; WALSH, J.T. Laser ablation of dental hard tissue: from explosive ablation to plasma-mediated ablation. In: WIGDOR, H.A.; FEATHERSTONE, J.D.B.; WHITE, J.M.; NEEV, J. **Lasers in Dentistry II**. Bellingham, WA. Proc. SPIE n. 2672, p. 144-158, 1996.
- ²⁶ FRIED, D.; FEATHERSTONE, J.D.B.; VISURI, S.R.; SEKA, W.W.; WALSH, J.T. The caries inhibition potential of Er:YAG and Er,Cr:YSGG laser irradiation. In: WIGDOR, H.A.; FEATHERSTONE, J.D.B.; WHITE, J.M.; NEEV, J. **Lasers in Dentistry II**. Bellingham, WA. Proc. SPIE n. 2672, p. 73-77, 1996.
- ²⁷ HOSSAIN, M.; KIMURA, Y.; NAKAMURA, Y.; YAMADA, Y.; KINOSHITA, J.I.; MATSUMOTO, K. A study on acquired acid resistance of enamel and dentin irradiated by Er,Cr:YSGG laser. **J. Clin. Laser Med. Surg.**, v. 19, n.3, p. 159-163, 2001.
- ²⁸ ANA, P.A.; BLAY, A.; BLAY, C.C.; EDUARDO, C.P.; ZECELL, D.M. Morfologia superficial do esmalte após a irradiação do laser Er,Cr:YSGG com baixas fluências. **Pesq. Odontol. Bras.**, v. 17, n. supl.2, p. 106-106, 2003.
- ²⁹ APEL, C.; BIRKER, L.; MEISTER, J.; WEISS, C.; GUTKNECHT, N. The caries-preventive potential of subablative Er:YAG and Er:YSGG laser radiation in an intraoral model: a pilot study. **Photomed. Laser Surg.**, v. 22, n.4, p. 312-7, 2004.
- ³⁰ BELIKOV, A.V.; EROFEEV, A.V.; SHUMILIN V.V.; TKACHUK, A.M. Comparative study of the 3 μ m laser action on different tooth tissue samples using free running Er-doped YAG, YSGG, YAP and YLF lasers. In: ALTSHULER, G.B.; HIBST, R. **Dental Applications of Lasers**. Bellingham, WA: Proc. SPIE, v. 2080, p. 60 – 67, 1993.
- ³¹ APEL, C.; MEISTER, J.; IOANA, R.S.; GUTKNECHT, N. The ablation threshold of Er:YAG and Er:YSGG laser irradiation in dental enamel. **Lasers Med. Sci**, v. 17, p. 246-252, 2002.
- ³² KURODA, S.; FOWLER, B.O. Compositional, structural, and phase changes in *in vitro* laser-irradiated human tooth enamel. **Calcif. Tissue Int.**, v. 36, p. 361-369, 1984.
- ³³ OHO, T.; MORIOKA, T. A possible mechanism of acquired acid resistance of human dental enamel by laser irradiation. **Caries Res.**, v. 24, n. 2, p. 86-92, 1990.
- ³⁴ FOWLER, B.O.; KURODA, S. Changes in heated and in laser-irradiated human tooth enamel and their probable effects on solubility. **Calcif. Tissue Int.**, v. 38, p. 197-208, 1986.
- ³⁵ DELBEM, A.C.B.; CURY, J.A.; NAKASSIMA, C.K.; GOUVEIA, V.G.; THEODORO, L.H. Effect of Er:YAG laser on CaF₂ formation and its anti-cariogenic action on human enamel: an *in vitro* study. **J. Clin. Laser Med. Surg.**, v. 21, p. 197-20, 2003.

- ³⁶ TEN CATE, A.R. **Histologia bucal: desenvolvimento, estrutura e função**. Rio de Janeiro, S.P.: Guanabara Koogan, 2001.
- ³⁷ LEGEROS, R.Z. Calcium phosphates in demineralization/remineralization processes. **J. Clin. Dent.**, v. 10, n. 2, p. 65 – 73, 1999.
- ³⁸ ROBINSON, C.; SHORE, R.C.; BROOKES, S.J.; STRAFFORD, S.; WOOD, S.R.; KIRKHAM, J. The chemistry of enamel caries. **Crit. Rev. Oral Biol. Med.**, v. 11, n. 4, p. 481-495, 2000.
- ³⁹ FEATHERSTONE, J.D.B. Prevention and reversal of dental caries: role of low level fluoride. **Comm. Dent. Oral Epidemiol.**, v. 27, p. 31-40, 1999.
- ⁴⁰ FERJESKOV, O.; KIDD, E. **Cárie Dentária: a doença e seu tratamento clínico**. São Paulo, S.P.: Editora Santos: 2005.
- ⁴¹ CHADWICK, D.J.; CARDEW, G. **Dental Enamel**. London, UK: Chichester-Wiley, 1997.
- ⁴² NEWBRUN, E. **Cariology**. Baltimore, Maryland: Williams & Wilkins, 1978.
- ⁴³ BRUDEVOLD, F. Chemical composition of the teeth in relation to caries. In: SOGNAES, R.F. **Chemistry and prevention of dental caries**. Springfield, MA: Charles C. Thomas, 1962, p. 32-88.
- ⁴⁴ GWINNETT, A.J. Structure and composition of enamel. **Oper Dent.**, Supl. 5, p. 10-17, 1992.
- ⁴⁵ MARGOLIS, H.C.; MORENO, E.C. Kinetic and thermodynamic aspects of enamel demineralization. **Caries Res.**, v. 19, p. 22-35, 1985.
- ⁴⁶ KEYES, P.H. The infectious and transmissible nature of experimental dental caries. **Arch. Oral Biol.**, v. 1, p. 304-320, 1960.
- ⁴⁷ THYLSTRUP, A.; FEJERSKOV, O. **Cariologia Clínica**. 3.ed. São Paulo: Editora Santos, 2001.
- ⁴⁸ NAVIA, J.M. Plaque biochemistry. In: MENAKER, L. **The biologic basics of dental caries**. Maryland: Harper & Row, 1980, p.276-292.
- ⁴⁹ TEN CATE, J.M.; BUIJS, M.J.; DAMEN, J.J.M. pH-cycling of enamel and dentin lesions in the presence of low concentrations of fluoride. **Eur. J. Oral Sci.**, v. 103, p. 362-367, 1995.
- ⁵⁰ ZECELL, D.M.; RIBEIRO, M.S.; MALDONADO, E.P. Apostila da Disciplina Interação da luz *laser* com tecidos biológicos: aplicações. **Curso Mestrado Profissionalizante "Lasers em Odontologia"**, 2005.

- 51 ANA, P.A.; BACHMANN, L.; ZECELL, D.M. *Laser effects on enamel for caries prevention. Laser Phys.*, v. 16, n. 5, p. 865 – 875, 2006.
- 52 FEATHERSTONE, J.D.B.; BARRETT-VESPONE, N.A.; FRIED, D.; KANTOROWITZ, Z.; SEKA, W. CO₂ *laser* inhibition of artificial caries-like lesion progression in dental enamel. *J. Dent. Res.*, v. 77, n. 6, p. 1397-403, 1998.
- 53 OLIVEIRA, M.E. **Potencial de inibição da progressão de cárie artificial por irradiação sub-ablativa com laser de CO₂ pulsado em esmalte dental bovino.** 2005. Dissertação (Mestrado). Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.
- 54 RODRIGUES, L.K.A.; NOBRE DOS SANTOS, M.; FEATHERSTONE, J.D.B. *In situ* mineral loss inhibition by CO₂ *laser* and fluoride. *J. Dent. Res.*, v. 85, n. 7, p. 617-621, 2006.
- 55 NOBRE DOS SANTOS, M.; FEATHERSTONE, J.D.B.; FRIED, D. Effect of a new carbon dioxide *laser* and fluoride on sound and demineralized enamel. In: RECHMANN, P.; HEINE, H.; FRIED, D.; HENNIG, T. **Lasers in Dentistry VII.** Bellingham, WA: Proc. SPIE, v. 4249, p. 169- 174, 2001.
- 56 MORIOKA, T.; TAGOMORI, S.; NARA, Y. Application of Nd:YAG *laser* and fluoride in the prevention of dental caries. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF LASERS IN DENTISTRY, 1988, Tokyo. **Proceedings...** Tokyo.
- 57 HUANG, G.F.; LAN, W.H.; GUO, M.K.; CHIANG, C.P. 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.*, v. 100, p. 181-185, 2001.
- 58 HARAZAKI, M.; HAYAKAWA, K.; FUKUI, T.; ISSHIKI, Y.; POWELL, L.G. The Nd-YAG *laser* is useful in prevention of dental caries during orthodontic treatment. *Bull. Tokyo Dent. Coll.*, v. 42, p. 79-86, 2001.
- 59 BEVILÁCQUA, F.M. **Estudo in vitro da incorporação de flúor e resistência ácida do esmalte dental irradiado com laser de Er:YAG: análise de espectrometria de absorção atômica e espectrofotometria.** 2002. Tese (Doutorado). Faculdade de Odontologia da USP, São Paulo.
- 60 NARA, Y.; TAGOMORI, S.; NUMATA, Y.; MORIOKA, T. Effect of Erbium:YAG *Laser* irradiation on acid resistance of human tooth enamel. *Surg. Med. Lasers*, v. 3, n. 4, p. 201-210, 1990.
- 61 CECCHINI, R.C.M.; ZECELL, D.M.; OLIVEIRA, E.; FREITAS, P.M.; EDUARDO, C.P. Effect of Er:YAG *laser* on enamel acid resistance: morphological and atomic spetrometric analysis. *Lasers Surg. Med.*, v. 37, n. 5, p. 366 – 372. 2005

-
- ⁶² LIU, J.F.; LIU, Y.; STEPHEN, H.C.Y. Optimal Er:YAG *laser* energy for preventing enamel demineralization. **J. Dent.**, v. 31, n.1, p. 62-66, 2005
- ⁶³ KWON., Y.H.; LEE, J.S.; CHOI, Y.H.; LEE, J.M.; SONG., K.B. Change of enamel after Er:YAG and CO₂ *laser* irradiation and fluoride treatment. **Photomed. Laser Surg.**, v. 23, v. 4, p. 389-394, 2005.
- ⁶⁴ BACHMANN, L.; ZEZELE, D.M. **Estrutura e composição de esmalte e dentina**. São Paulo, S.P.: Editora Livraria da Física, 2005.
- ⁶⁵ BORGGREVEN, J.M.P.; VAN DIJK, J.W.; DRIESSENS, F.C.M., Effect of *laser* irradiation on the permeability of bovine dental enamel. **Arch. Oral Biol.**, v. 25, n. 11, p. 831-1, 1980.
- ⁶⁶ NELSON, D.G.A.; SHARIATI, M.; GLENA, R.; SHIELDS, C.P.; FEATHERSTONE, J.D.B. Effect of pulsed low energy infrared *laser* irradiation on artificial caries-like lesion formation. **Caries Res.**, v.20, n. 5, p. 289 – 99, 1986.
- ⁶⁷ NELSON, D.G.A.; WEFEL, J.S.; JONGEBLOED, W.L.; FEATHERSTONE, J.D.B. Morphology, histology and crystallography of human dental enamel treated with pulsed low-energy infrared *laser* radiation. **Caries Res.**, v. 21, n. 5, p. 411 – 26, 1987.
- ⁶⁸ FERREIRA, J.N.; PALAMARA, J.; PHAKEY, P.P.; RACHINGER, W.A.; ORAMS, H.J. Effects of continuous-wave CO₂ *laser* on the ultrastructure of human dental enamel. **Arch. Oral. Biol.**, v. 34, n. 7, p. 5511- 62, 1989.
- ⁶⁹ KANTOROWITZ, Z.; FEATHERSTONE, J.D.B.; FRIED, D. Caries prevention by CO₂ *laser* treatment: dependency on the number of pulses used. **J. Am. Dent. Assoc.**, v. 129, n.5, p. 585-91, 1998.
- ⁷⁰ MCCORMACK, S.M.; FRIED, D.; FEATHERSTONE, J.D. Scanning electron microscope observations of CO₂ *laser* effects on dental enamel. **J. Dent. Res.**, v. 74, n. 10, p. 1702 – 8, 1995.
- ⁷¹ HSU, C.Y.S.; JORDAN, T.H.; DEDERICH, D.N.; WEFEL, J.S. Effects of low-energy CO₂ *laser* irradiation and the organic matrix on inhibition of enamel demineralization. **J. Dent. Res.**, v. 79, n.9, p. 1725-1730, 2000.
- ⁷² KANTOLA, S.; LAINE, E.; TARNA, T. *Laser*-induced effects on tooth structure. VI. X-ray diffraction study of dental enamel exposed to a CO₂ *laser*. **Acta Odontol. Scand.**, v. 31, n. 6, p. 369 – 379, 1973.
- ⁷³ BACHMANN, L.; CRAIEVICH, A.F.; ZEZELE, D.M. Crystalline structure of dental enamel after Ho:YLF *laser* irradiation. **Arch. Oral. Biol.**, v. 49, p. 923-929, 2004.

- ⁷⁴ FEATHERSTONE, J.D.B.; FRIED, D.; BITTEN, E.R. Mechanism of *laser* induced solubility reduction of dental enamel. In: WIGDOR, H.A.; FEATHERSTONE, J.D.B.; WHITE, J.M.; NEEV, J. ***Lasers in Dentistry II***. Bellinghan, WA: Proc. SPIE, v. 2672, p. 112-116, 1996.
- ⁷⁵ LOBENE, R.R.; BHUSSRY, B.R.; FINE, S. Interaction of carbon dioxide *laser* radiation with enamel and dentin. ***J. Dent. Res.***, v. 47, n. 2, p. 311-317, 1968.
- ⁷⁶ LIN, C.P.; LEE, B.S.; LIN, F.H.; KOK, S.H.; LAN, W.H. Phase, Compositional, and Morphological Changes of Human Dentin after Nd:YAG *Laser* Treatment. ***J. Endod.***, v. 27, n. 6, p. 389 – 393, 2001.
- ⁷⁷ ANIC, I.; VIDOVIC, D.; LUIC, M.; TUDJA, M. *Laser* induced molar tooth pulp chamber temperature changes. ***Caries Res.***, v. 26, n. 3, p. 165 – 169, 1992.
- ⁷⁸ WESTERMANN, G.H.; ELLIS, R.W.; LATTA, M.A.; POWELL, G.L. An *in vitro* study of enamel surface microhardness following argon *laser* irradiation and acidulated phosphate fluoride treatment. ***Ped. Dent.***, v. 25, n. 5, p. 497-500, 2003.
- ⁷⁹ NAMMOUR, S.; ROCCA, J.P.; PIREAUX, J.J.; POWELL, G.L.; MORCIAUX, Y.; DEMORTIER, G. Increase of enamel fluoride retention by low fluence argon *laser* beam: a 6-month follow-up study *in vivo*. ***Lasers Surg. Med.***, v. 36, p. 220-224, 2005.
- ⁸⁰ GOODMAN, B.D.; KAUFMAN, H.W. Effects of an argon *laser* on the crystalline properties and rate of dissolution in acid of tooth enamel in the presence of sodium fluoride. ***J. Dent. Res.***, v. 56, n. 10, p. 1201-7, 1977.
- ⁸¹ MORIOKA, T.; TAGOMORI, S.; TSUTSUNI, H. Effect os *laser* irradiation on fluoride uptake in enamel – by EPM surface scanning. ***J. Jap. Soc. Laser Dent.***, abstract, 1986.
- ⁸² MORIOKA, T.; TAGOMORI, S. Applicability of Nd:YAG *laser* on prevention of dental caries. *Laser surgery characterization and therapeutics*. In: ***Lasers in Dentistry***. Bellinghan, WA: Proc.SPIE, v. 907, p. 94 – 97, 1988.
- ⁸³ YOKOYAMA, K.; KIMURA, Y.; MATSUMOTO, K.; FIJISHIMA, A.; MIYAZAKI, T. Preventive effects of tooth fracture by pulsed Nd:YAG *laser* irradiation with diamine silver fluoride solution. ***J. Clin. Laser Med. Surg.***, v. 19, n. 6, p. 315-318, 2001.
- ⁸⁴ TAGOMORI, S.; MORIOKA, T. Combined effects of *laser* and fluoride on acid resistance of human dental enamel. ***Caries Res.***, v. 54, p. 15-7, 1989.
- ⁸⁵ HOSSAIN, M.M.; HOSSAIN, M.; KIMURA, Y.; KINOSHITA, J.; YAMADA, Y.; MATSUMOTO, K. Acquired acid resistance of enamel and dentin by CO₂ *laser* irradiation with sodium fluoride solution. ***J. Clin. Laser Med. Surg.***, v. 20, p. 77-82, 2002.

- ⁸⁶ MEURMAN, J.H.; HEMMERLE, J.; VOEGEL, J.C.; RAUHAMAA-MAKINEN, R.; LUOMANEN, M. Transformation of hydroxyapatite to fluorapatite with high-energy CO₂ laser. **Caries Res.**, v. 31, p. 397-400, 1997.
- ⁸⁷ PHAN, N.; FRIED, D.; FEATHERSTONE, J.D.B. Laser-induced transformation of carbonated apatite to fluorapatite on bovine enamel. In: FEATHERSTONE, J.D.B.; RECHMANN, P.; HEINE, H.; FRIED, D. **Lasers in Dentistry V**. Bellingham, WA: Proc. SPIE, v. 3593, p. 233 -240, 1999.
- ⁸⁸ ANA, P.A.; BLAY, A.; MARTIN, A.A.; SALVADOR, V.L.R.; BACHMANN, L.; TABCHOURY, C.P.M.; CURY, J.A.; ZECELL, D.M. Physico-chemical changes in enamel irradiated with Er,Cr:YSGG and its resistance to demineralization. **Caries Res.**, v. 40, n. 4, p. 337, 2006.
- ⁸⁹ SIEVERS, M.; KOORT, H.J.; ALTSHULER, G.; ERFEEV, A.; FRENTZEN, M. The ablation of dental hard tissues by Er:YSGG laser. In: INTERNATIONAL SOCIETY FOR LASERS IN DENTISTRY, 1992, Salt Lake City. **Proceedings...** Salt Lake City: p. 255-256.
- ⁹⁰ STOCK, K.; HIBST, R.; KELLER, U. Comparison of Er:YAG and Er:YSGG ablation of dental hard tissues. In: ALTSHULER, G.B.; BIRNGRUBER, R.; FANTE, M.D.; HIBST, R.; HOENIGSMANN, H.; KRASNER, N.; LAFFITTE, F. **Medical Applications of lasers in dermatology, ophtalmology, dentistry and endoscopy**. Bellingham, WA: Proc. SPIE, v. 3192, p. 88 – 95, 1997.
- ⁹¹ HADLEY, J.; YOUNG, D.A.; EVERSOLE, L.R.; GORNBEIN, J.A. A laser-powered hydrokinetic system for caries removal and cavity preparation. **J. Am. Dent. Assoc.**, v. 131, p. 777-785, 2000.
- ⁹² MATSUMOTO, K.; HOSSAIM, M.; HOSSAIM, M.M.I.; KAWANO, H.; KIMURA, Y. Clinical assessment of Er,Cr:YSGG laser application for cavity preparation. **J. Clin. Laser Med. Surg.**, v. 20, n.1, p. 17-21, 2002.
- ⁹³ APEL, C.; SCHÄFER, C.; GUTKNECHT, N. Demineralization of Er:YAG and Er,Cr:YSGG Laser-Prepared Enamel Cavities *in vitro*. **Caries Res.**, v. 37, p. 34–37, 2003.
- ⁹⁴ DA-GUANG, Y.; KIMURA, Y.; KINOSHITA, J.I.; MATSUMOTO, K. Morphological and atomic analytical studies on enamel and dentin irradiated by an erbium, chromium:YSGG laser. **J. Clin. Laser Med. Surg.**, v. 18, n.3, p. 139-143, 2000.
- ⁹⁵ HOSSAIN, M.; NAKAMURA, Y.; TAMAKI, Y.; YAMADA, Y.; MURAKAMI, Y.; MATSUMOTO, K. Atomic analysis and knoop hardness measurement of the cavity floor prepared by Er,Cr:YSGG laser irradiation *in vitro*. **J. Oral Rehabilitation**, v. 30, p. 515-521, 2003.
- ⁹⁶ APEL, C.; MEISTER, J.; GOTZ, H.; DUSCHNER, H.; GUTKNECHT, N. Structural changes in human dental enamel after subablative erbium laser irradiation and its potential use for caries prevention. **Caries Res.**, v. 39, p. 65-70, 2005.

- ⁹⁷ DARLING, L.A.; ETTINGER, R.L.; WEFEL, J.S.; COOPER, S.H.; QIAN, F. Prevention of demineralization by CO₂ and Er,Cr:YSGG *laser* irradiation of overdenture abutments. **Am. J. Dent.**, v. 19, p. 227-230, 2006.
- ⁹⁸ NYBORG, H.; BRÄNNSTRÖM, M.. Pulp reaction to heat. **J. Prosthet. Dent.**, v. 19, p. 605 – 612, 1968.
- ⁹⁹ BALDISSARA, P.; CATAPANO, S.; SCOTTI, R. Clinical and histological evaluation of thermal injury thresholds in human teeth: a preliminary study. **J. Oral Rehabilitation**, v. 24, p. 791-801, 1997.
- ¹⁰⁰ ZECELL, D.M.; CECCHINI, S.C.M.; PINOTTI, M.; EDUARDO, C.P. Temperature changes under Ho:YLF irradiation. In: WIGDOR, H.; FEATHERSTONE, J.D.B.; WHITE, J.M.; NEEV, J. **Lasers in Dentistry II**. Bellingham, WA: Proc. SPIE, v. 2672, p. 34-39, 1996.
- ¹⁰¹ BROWN, W.S.; DEWEY, W.A.; JACOBS, H.R. Thermal properties of teeth. **J. Dent. Res.**, v. 49, n. 4, p. 752-755, 1970.
- ¹⁰² ZACH, L.; COHEN, G. Pulp response to externally applied heat. **Oral Surg.**, v. 19, p. 515-530, 1965.
- ¹⁰³ WHITE, J.M.; MARK, C.F.; GOODIS, H.E. Intrapulpal temperature during pulsed Nd:YAG *laser* treatment on dentin, *in vitro*. **J. Periodontol.**, v. 65, p. 255-259, 1994.
- ¹⁰⁴ SRIMANEEPONG, V.; PALAMARA, J.E.A.; WILSON, P.R. Pulpal space pressure and temperature changes from ND:YAG *laser* irradiation of dentin. **J. Dent.**, v. 30, p. 291-296, 2002.
- ¹⁰⁵ FRIED, D.; ZUERLEIN, M.J.; FEATHERSTONE, J.D.B.; MACHULE, D. Thermal and chemical modification of dentin by pulsed CO₂ *laser* irradiation at 9-11 µm. In: WIGDOR, H.A.; FEATHERSTONE, J.D.B.; RECHMANN, P. **Lasers in Dentistry III**. Bellingham, WA: Proc. SPIE, v. 2973, p. 94-100, 1997.
- ¹⁰⁶ YU, D.; POWELL, G.L.; HIGUCHI, W.I.; FOX, J.L. Comparison of three *lasers* on dental pulp chamber temperature change. **J. Clin. Laser Med. Surg.**, v. 11, n. 3, p. 119-122, 1993.
- ¹⁰⁷ WALSH, J.T.; FLOTTE, T.J.; DEUTSCH, T.F. Er:YAG *laser* ablation of tissue: effect of pulse duration and tissue type on thermal damage. **Lasers Surg. Med.**, v. 9, p. 314-26, 1989.
- ¹⁰⁸ FRIED, D.; ASHOURI, N.; BREUNIG, T.; SHORI, R. Mechanism of water augmentation during IR *laser* ablation of dental enamel. **Lasers Surg. Med.**, v. 31, p. 186 – 193, 2002.
- ¹⁰⁹ BURKERS, E.J.; HOKE, J.; GOMES, E.; WOLBARSHT, M. Wet versus dry enamel ablation by Er:YAG *laser*. **J. Prosthet. Dent.**, v. 67, p. 847 – 851, 1992.

- ¹¹⁰ ROSA, A.D.; SARMA, A.V.; LE, C.Q.; JONES, R.S.; FRIED, D. Peripheral thermal and mechanical damage to dentin with microsecond and sub-microsecond 9,6 µm, 2,79 µm and 0,355 µm *laser* pulses. ***Lasers Surg. Med.***, v. 35, p. 214-228, 2004.
- ¹¹¹ MORIOKA, T.; TAGOMORI, S.; OHO, T. Acid resistance of lased human enamel with Er:YAG *laser*. ***J. Clin. Laser Med. Surg.***, v. 9, p. 215-217, 1991.
- ¹¹² HOSSAIN, M.; NAKAMURA, Y.; KIMURA, Y.; YAMADA, Y.; ITO, M.; MATSUMOTO, K. Caries preventive effect of Er:YAG *laser* irradiation with or without water mist. ***J. Clin. Laser Med. Surg.***, v. 18, p. 61-65, 2000.
- ¹¹³ JENNETT, E.; MOTAMEDI, M.; RASTEGAR, S.; FREDERICKSON, C.; ARCORIA, C.; POWERS, J.M. Dye-enhanced ablation of enamel by pulsed *lasers*. ***J. Dent. Res.***, v. 73, p. 1841-1847, 1994.
- ¹¹⁴ NAMMOUR, S.; KOWALYK, K.; VALICI, C.; ZEINOUN, T.; ROCCA, J.P.; POWELL, G.L.; VAN RECK, J. Safety parameters for pulp temperature during selective ablation of caries by KTP *laser in vitro*. ***J. Clin. Laser Med. Surg.***, v. 22, n. 2, p. 99-104, 2004.
- ¹¹⁵ EVERSOLE, L.R.; RIZOIU, I.; KIMMEL, A.I. Pulpal response to cavity preparation by an erbium, chromium:YSGG *laser*-powered hydrokinetic system. ***J. Am. Dent. Assoc.***, v. 128, p. 1099 -1106, 1997.
- ¹¹⁶ RIZOIUI, I.; KOHANGHADOSH, F.; KIMMEL, A.I.; EVERSOLE, L.R. Pulpal thermal responses to an erbium,chromium:YSGG pulsed *laser* hydrokinetic system. ***Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.***, v. 86, n. 2, p. 220-223, 1998.
- ¹¹⁷ YAMAZAKI, R.; GOYA, C.; DA-GUANG, Y.; KIMURA, Y.; MATSUMOTO, K. Effects of erbium,chromium:YSGG *laser* irradiation on root canal walls: a scanning electron microscopic and thermographic study. ***J. Endod.***, v. 27, n. 1, p. 9-12, 2001.
- ¹¹⁸ CHANG, J.C.; WILDER-SMITH, P. *Laser*-induced thermal events in empty and pulp-filled dental pulp chambers. ***Lasers Surg. Med.***, v. 22, p. 46-50, 1998.
- ¹¹⁹ FLIR SYSTEMS. ***ThermaCAM SC 3000 Operator's manual***. Boston: FLIR Systems AB, n. 557379, 1999.
- ¹²⁰ DELBEM, A.C.B.; CURY, J.A. Effect of application time of APF and NAF gels on microhardness and fluoride uptake of *in vitro* enamel caries. ***Am. J. Dent.***, v. 15, n. 3, p. 169-172, 2002.
- ¹²¹ ARGENTA, R.M.O.; TABCHOURY, C.P.M.; CURY, J.A. A modified pH-cycling model to evaluate fluoride effect on enamel demineralization. ***Pesq. Odontol. Bras.***, v. 17, n. 3, p. 241 – 246, 2003.

- ¹²² DELBEM, A.C.B.; CURY, J.A. Efeito do tempo de aplicação tópica de FFA na formação e retenção de “CaF₂” no esmalte dental humano. **Rev. Odontol. UNESP**, v. 25, n. 2, p. 217 – 227, 1996.
- ¹²³ FEATHERSTONE, J.D.B.; O'REILLY, M.M.; SHARIATI, M.; AREDS, J. Enhancement of remineralization *in vitro* and *in vivo*. In: S.A. LEACH (Eds.) **Factors relating to demineralization and remineralization of the teeth**. Oxford: IRL Press, 1986, p. 23-34.
- ¹²⁴ FEATHERSTONE, J.D.B.; TEN CATE, J.M.; SHARIATI, M.; AREDS, J. Comparision of artificial caries-like lesions by quantitative microradiography and microhardness profiles. **Caries Res.**, v. 17, p. 385-391, 1983.
- ¹²⁵ FREDDY, C.; VAITSMAN, D. **Análise instrumental**. Rio de Janeiro, R.J.: Interciência, 2000.
- ¹²⁶ CASLAVSKA, V.; MORENO, E.C.; BRUDEVOLD, F. Determination of the calcium fluoride formed from *in vitro* exposure of human enamel to fluoride solutions. **Arch. Oral Biol.**, v. 20, p. 333-339, 1975.
- ¹²⁷ KOO, R.H.; CURY, J.A. Soluble calcium/SMFP dentifrice: effect on enamel fluoride uptake and remineralization. **Am. J. Dent.**, v. 11, n. 4, p. 173 – 176, 1998.
- ¹²⁸ FISKE, C.H.; SUBARROW, Y. The colorimetric determination of phosphorous. **J. Biol. Chem.**, v. 66, n. 2, p. 375-400, 1925.
- ¹²⁹ PAGE, M.C.; BRAVER, S.L.; MACKINNON, D.P. **Levine's guide to SPSS for analysis of variance**. Mahwah, New Jersey: Lawrence Erlbaum Associates, 2003.
- ¹³⁰ MORGAN, G.A.; LEECH, N.L.; GLOECKNER, G.W.; BARRET, K.C. **SPSS for introductory statistics – use and interpretation**. Mahwah, New Jersey: Lawrence Erlbaum Associates, 2004.
- ¹³¹ SHELLIS, R.P. Relationship between human enamel structure and the formation of caries-like lesions *in vitro*. **Arch. Oral Biol.**, v.29, n.12, p.975-81, 1984.
- ¹³² FEATHERSTONE, J.D.B.; MELBERG, J.R. Relative rates of progress of artificial carious lesions in bovine, ovine and human enamel. **Caries Res.**, v. 15, p. 109-114, 1981.
- ¹³³ USUMEZ, S.; ORHAN, M.; USUMEZ, A. Laser etching of enamel for direct bonding with an Er,Cr:YSGG hydrokinetic laser system. **Am. J. Orthod. Dentofacial Orthop.**, v. 122, n. 6, p. 649-656, 2002.
- ¹³⁴ SHETH, K.K.; STANINEC, M.; SARMA, A.V.; FRIED, D. Selective targeting of protein, water, and mineral in dentin using UV and IR pulse lasers: the effect on the bond strength to composite restorative materials. **Lasers Surg. Med.**, v. 35, p. 245-253, 2004.

- 135 QUIRYNEN, M.; AND BOLLEN, C.M.L. The influence of surface roughness and surface-free energy on supra and subgingival plaque formation in man - a review of the literature. **J. Clin. Periodontol.**, v. 22, p. 1-14, 1995.
- 136 KORYTNICKI, D.; MAYER, M.P.A.; DARONCH, M.; SINGER, J.M.; GRANDE, R.H.M. Effects of Nd:YAG Laser on Enamel Microhardness and Dental Plaque Composition: An *in situ* Study. **Photom. Laser Surg.**, v. 24, n.1, p. 59 – 63, 2006.
- 137 STANINEC, M.; XIE, J.; LE, C.Q.; FRIED, D. Influence of an optically thick water layer on the bond-strength of composite resin to dental enamel after IR laser ablation. **Lasers Surg. Med.**, v. 33, p. 264-269, 2003.
- 138 ANA, P.A.; ZECELL, D.M. Modificações na temperatura intrapulpar de dentes irradiados com laser de Er,Cr:YSGG com e sem fotoabsorvedor. **Braz.Oral Res.**, v. 19, Supl 1, p. 122.
- 139 WHITE, D.J. The application of *in vitro* models to research on demineralization and remineralization of the teeth. **Adv. Dent. Res.**, v. 9, n. 3, p. 175-93, 1995.
- 140 QUEIROZ, C.S. **Modelos de estudos in vitro para avaliar o efeito do fluoreto na desmineralização e remineralização do esmalte e dentina**. 2004. Tese (Doutorado). Faculdade de Odontologia da Unicamp, Piracicaba.
- 141 PAES LEME, A.F.; TABCHOURY, C.P.M.; ZERO, D.T.; CURY, J.A. Effect of fluoridated dentifrice and acidulated phosphate fluoride application on early artificial caries lesions. **Am. J. Dent.**, v. 16, n.2, p. 91-95, 2003.
- 142 LARSEN, M.J.; RICHARDS, A. Conditions for extraction of CaF₂: a study of Caslavská's method. **Caries Res.**, v. 38, p. 373, 2004.
- 143 TAKAGI, S.; LIAO, H.; CHOW, L.C. Effect of tooth-bound fluoride on enamel demineralization/remineralization *in vitro*. **Caries Res.**, v. 34, p. 281-288, 2000.
- 144 WHITE, D.J. Reactivity of fluoride dentifrices with artificial caries. I. Effects on early lesions: F uptake, surface hardening and remineralization. **Caries Res.**, v. 21, p. 126-140, 1987.
- 145 MENDES, S.; SOUZA, I.P.; CURY, J.A. Formação *in vitro* de fluoreto de cálcio e fluorapatita em esmalte humano hígido após a aplicação de gel flúor-fosfato acidulado durante 1 e 4 minutos. **Rev. Odontol.Univ. São Paulo**, v. 10, n. 7, p. 281-285, 1996.
- 146 ZAKRZEWSKA, H.; MACHOY-MOKRZYNSKA, A.; MATERNY, M.; GUTOWSKA, I.; MACHOY, Z. Estimation of fluoride distribution in the mandible and teeth of the red deer (*Cervus elaphus* L.) from industrially polluted areas in Poland. **Arch. Oral Biol.**, v. 50, n. 3, p. 309-16, 2005.