ALESSANDRA MARQUES CORRÊA AFONSO

Avaliação *in vitro* e *in situ* da eficácia de diferentes lasers no aumento de resistência ácida do esmalte em regiões de sulcos e fissuras.

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

Área de Concentração: Dentística

Orientador: Profa. Dra. Regina Guenka Palma Dibb

Ribeirão Preto

2009

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

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

Assinatura do autor:

Data: __/__/

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Tratamento da Informação do Serviço de Biblioteca – EESC-USP

Corrêa-Afonso, Alessandra Marques

Avaliação *in vitro* e *in situ* da eficácia de diferentes *lasers* no aumento da resistência ácida do esmalte em regiões de sulcos e fissuras. Ribeirão Preto, 2009.

91p. : il.; 30cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP. - Área de concentração: Dentística.

Orientador: Palma-Dibb, Regina Guenka

1. Laser Er:YAG. 2. Laser Nd:YAG. 3. Laser CO₂. 4. Cáries. 5. Oclusal.

CORRÊA-AFONSO, A. M. Avaliação *in vitro* e *in situ* da eficácia de diferentes *lasers* no aumento de resistência ácida do esmalte em regiões de sulcos e fissuras. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Dentística.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dra. Regina Guenka Palma Dibb	
Instituição: Faculdade de Odontologia de	Ribeirão Preto/USP
Julgamento	
Assinatura:	
Prof(a) Dr(a)	
Assinatura:	-
Prof(a). Dr(a).:	
Instituição:	
Julgamento	
Assinatura:	-
Prof(a), Dr(a).:	
Instituição:	
Julgamento	
Assinatura:	-
Prof(a). Dr(a).:	
Instituição:	
Julgamento	
Assinatura:	

Dedicatória

A minha filha Laura,

Que mesmo tão pequena soube compreender os meus momentos de ausências e falta de atenção. O presente maior que Deus poderia ter me dado!

Ao meu marido e companheiro, Eduardo

Que me incentivou desde o começo dessa caminhada, me apoiando quando tudo estava indo bem e sendo paciente nos momentos difíceis.

Aos meus pais, Sergio e Marilene,

Pelo amor, apoio incondicional, dedicação e compreensão. Vocês foram essenciais para mais esta vitória!

Aos meus queridos avós, Alcides e Maria Rosa

Pessoas muito amadas por mim e dignas de meu maior respeito. Exemplos de amor, fé e família.

Aos meus irmãos, Leandro e André

Pelo amor e carinho que vocês têm para comigo mesmo estando distantes. Pelo apoio e incentivo em todos os momentos da minha vida.

Aos meus sogros, Eduardo e Lúcia

Que tiveram grande papel nesta conquista, estando sempre dispostos a me auxiliar quando necessário.

A toda a minha família e amigos queridos...

Agradecimentos Especiais

Agradeço a **Deus** pelo dom da vida, pela sua presença em todos os momentos da minha caminhada, me concedendo sabedoria, paciência e força para atingir meus ideais. Obrigado, Senhor.

À *minha família*, que esteve ao meu lado incondicionalmente, me apoiando e incentivando nos momentos difíceis e me auxiliando sempre que necessário para que eu pudesse realizar mais esta conquista. Amo vocês!

À minha orientadora *Prof. Dra. Regina Guenka Palma Dibb*, por mais esta orientação repleta de ensinamentos e amizade. Pela confiança em mim depositada, paciência e disponibilidade em todos os momentos em que necessitei. Pessoa extremamente capaz, exemplo de dedicação ao ensino e a pesquisa. Você foi de extrema importância para o meu crescimento profissional!

Agradecimentos

À Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, através de seu Diretor **Prof. Dr. Osvaldo Luiz Bezzon**.

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa do **Prof. Dr. Manoel Damião de Souza Neto**, cujo respeito e admiração crescem a cada dia, por toda dedicação na busca de nossos interesses.

Ao **Prof. Dr. Marcelo Oliveira Mazetto**, vice-coordenador do curso de Pós-Graduação em Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Aos demais **Professores do Departamento de Odontologia Restauradora** pelo empenho e satisfação ao transmitirem seus conhecimentos.

Aos funcionários do Departamento de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, *Amália*, *Maria Isabel*, *Rosângela*.

Ao secretário do Curso de Pós-Graduação em Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, *Carlos*, por sua prontidão, dedicação e auxílio.

A professora *Raquel Fernanda Guerlach*, por permitir a utilização do equipamento de microscopia de luz polarizada do Departamento de Morfologia,

Estomatologia e Fisiologia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, e a pós graduanda *Carolina de Souza Guerra* por auxiliar durante as análises.

Ao professor **Jesus Djalma Pécora**, por permitir a utilização do equipamento de *laser* Er:YAG do Departamento de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, e ao técnico **Reginaldo Santana da Silva** pelo auxílio na execução dos procedimentos.

À técnica do laboratório de Dentística do Departamento de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, *Patrícia Marchi,* por todo auxílio prestado durante a execução do projeto.

Às funcionárias da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, *Isabel* e *Regiane*.

À Instituição de Fomento **FAPESP**, pela bolsa de doutorado e auxílio financeiro para realização desta pesquisa.

As amigas *Vivian*, *Danielle*, *Cristiane*, *Michelle*, *Aline*, *Juliane e Juliana* pelo apoio, companheirismo e momentos de alegria e dificuldade compartilhados. Verdadeiras amigas que sempre tiveram palavras de carinho, descontração e alegria tornando a caminhada mais tênue. Além de muita generosidade, sempre prontas a dividir seus conhecimentos e experiências, ajudando-me imensamente na conclusão deste e de outros estudos.

Aos amigos *Walter*, *César* e *Daniel* pela amizade, convivência e exemplo de dedicação às atividades de pesquisa.

Aos voluntários *Walter*, *César*, *Adrielly*, *Bruna*, *Daniel*, *Rodrigo*, *Danielle*, *Carlos*, *Flávio*, *Marcus*, *Carol*, *Martinha*, *Jaciara*, *Fernando* e *Francisco*, pela paciência, senso de cooperação, desprendimento e dedicação.

A **todos** que, de alguma forma colaboraram para que este trabalho se realizasse, meu especial agradecimento.

"A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original"

Albert Einsten

RESUMO

CORRÊA-AFONSO, A.M. Avaliação *in vitro* e *in situ* da eficácia de diferentes *lasers* no aumento de resistência ácida do esmalte em regiões de sulcos e fissuras. 2009. 91p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

O objetivo desse estudo foi avaliar *in vitro* e *in situ* a efetividade de irradiação dos lasers Er:YAG, Nd:YAG e CO₂ no aumento da resistência ácida do esmalte em regiões de sulcos e fissuras. Para o estudo in vitro foram utilizados molares humanos em fragmentos da porção oclusal de 8mmx4mm divididos em 3 grupos de acordo com o tipo de tratamento : Grupo 1 - Er:YAG: Grupo 2 - Nd:YAG; Grupo 3 -CO₂ (n=15). O tratamento de superfície foi feito apenas em metade da área do fragmento, sendo que a outra metade foi considerada controle. As áreas expostas ao desafio cariogênico (14mm²) foram submetidas a ciclagens de pH. Para o teste de microdureza os espécimes foram seccionados ao meio e a parede da secção é que sofreu o teste, a outra metade foi utilizada para análise em microscopia de luz polarizada para a medição da área da lesão de desmineralização e análise em MEV para verificar as alterações na morfologia do tecido dentário. As análises dos dados de microdureza (HKN) e área das lesões (mm²) foram feitas com o teste de Wilcoxon para a comparação interna de cada grupo com o seu controle e a comparação entre os grupos utilizou ANOVA para as áreas das lesões e Kruskal Wallis para a microdureza (α = 5%). Foi observada apenas diferença estatística significante para as amostras do grupo irradiado com laser CO2 entre as partes controle e experimental. Os demais grupos não apresentaram diferença estatisticamente significante com sua área controle. Na análise das medidas de lesão foram observadas diferença estatística significante para as amostras do grupo irradiado com os lasers CO₂ e Nd:YAG com suas partes controles, sendo as medidas de área de lesão apresentadas pela área irradiada inferiores a área controle. Na análise em MEV o grupo irradiado com laser CO₂ mostrou ausência de exposição dos prismas de esmalte e modificação de superfície na área irradiada. Para o estudo in situ foram utilizados molares humanos em fragmentos da porção oclusal de 4mmx4mm tratados com os 3 diferentes tipos de laser. Grupo 1 controle (sem tratamento); Grupo 2 – Er:YAG; Grupo 3 – Nd:YAG; Grupo 4 – CO₂ (n=15). Os espécimes foram adaptados a um dispositivo intrabucal que foi utilizado pelos voluntários durante 14 dias. Para o desafio cariogênico gotejou-se solução de sacarose 20% sobre os espécimes. Assim como no estudo in vitro, foram realizados o teste de microdureza, análise em microscópio de luz polarizada e análise em MEV. Para a análise dos dados de microdureza (HKN) foi utilizada ANOVA e teste de Fisher LSD (α = 5%). Foi observada diferença estatística significante para as amostras do grupo irradiado com *laser* CO₂ e Nd:YAG, que apresentaram maiores valores de microdureza do que o grupo controle e não foram diferentes estatisticamente entre si. Os valores de microdureza observados em profundidade foram maiores proporcionalmente a distância da superfície, ou seja, 20µm <30µm <40µm <50µm. Na análise em microscopia de luz polarizada a análise foi feita com teste de Wilcoxon e todos os grupos apresentaram semelhança estatística. Considerando os resultados obtidos nos dois estudo pode-se concluir que os lasers CO2 e Nd:YAG foram capazes de promover aumento de resistência ácida no esmalte dental localizado nas superfície de sulcos e fissuras.

Palavras-chave: Laser Er:YAG. Laser Nd:YAG. Laser CO_{2.} Cáries. Oclusal. Fissuras.

ABSTRACT

CORRÊA-AFONSO, A.M. *In vitro* and *in situ* assessment of lasers to increase enamel acid resistance on the pits and fissures surface. 2009. 91p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

The aim of this study was to assess in vitro and in situ the lasers Er:YAG, Nd:YAG e CO₂ in preventing enamel demineralization on the pits and fissures surface. For the in vitro study 45 occlusal enamel blocks were randomly divided into 3 groups in according with the treatment: G1 – Er:YAG; G2 – Nd:YAG; G3 – CO₂. Treatments were made only on a half of the specimen and the remaining part was considered as a control. The samples were submitted to an in vitro pH cycles. For the microhardness test the specimens were seccioned in the middle and the seccioned wall received the test. The other halves were analyzed using polarized light microscopy for the measurement of the caries-lesion areas and morphological SEM analyses. Wilcoxon test were performed for the statistical analysis of the data obtained from the microhardness test (KHN) and caries-lesion area measurements (mm^2) (α = 5%) when each groups was compared with its control. Variance analysis were performed for the difference in means of microhardness data and Kruskal Wallis test were performed for the difference in means of caries-lesion area measurements (α = 5%). For the microhardness data the G3 was statically different from its control area and the others groups presented statistical similarity among the experimental and control areas. For the caries-lesion area measurements statistical difference was observed for the groups G2 and G3 presenting smaller caries-lesion area when compared with their respective control areas. In the SEM analysis the G3 showed uniform surface without enamel-prism exposure. For the in situ study 60 occlusal enamel blocks were randomly divided into 4 groups in according with the treatment: G1 – Control (no treatment); G2 – Er:YAG; G3 – Nd:YAG; G4 – CO₂ (n=15). The specimens were fixed in intra oral appliances and worn by the volunteers for 14d. Sucrose solution (20%) was applied to each specimen 6 times/d. As the in vitro study the samples were removed, sectioned and examined for microhardness, carieslesion area measurements on the polarized light microcopy and morphological analyses on SEM. Variance analysis and the Fisher test were performed for the statistical analysis of the data obtained from the microhardness test (KHN) (α = 5%). The control group was statically different from G3 and G4, which present higher microhardness values and were statistical similar between them. The data of microhardness from the depth of surface were greater in proportion of distance from the surface, as 20µm <30µm <40µm <50µm. Wilcoxon test were performed for the statistical analysis of the data obtained from the caries-lesion area measurements (mm²) (α = 5%) and all the groups were statically similar. Considering the results obtained from the both of studies can be concluded that the laser CO2 and Nd:YAG were able to increase the enamel acid resistance on the surface of pits and fissures.

Key-words: *Laser* Er:YAG. *Laser* Nd:YAG. *Laser* CO_{2.} Caries. Occlusal. Pits. Fissures.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Secção da porção oclusal de terceiros molares humanos obtendo fragmentos de 8mmx4mmx2mm, observando-se a profundidade da fissura em pelo menos 1mm	34
Figura 2 -	Tratamento dos sulcos e fissuras de metade da área dos fragmentos com o respectivo <i>laser</i> de cada grupo	35
Figura 3 -	Amostras armazenadas em recipientes individuais nos quais foram adicionadas as soluções DES e RE	37
Figura 4 -	Secção do fragmento com separação da área controle e experimental, seguida de secção central do espécime para a realização das análises	38
Figura 5 -	Análise de microdureza na subsuperfície do fundo das fissuras. Penetrações realizadas a $20\mu m$, $30\mu m$, $40\mu m$, $50\mu m$, $100\mu m$ e $200\mu m$ abaixo da superfície	39
Figura 6 -	Padronização de medida da área da lesão de cárie considerando uma profundidade de 500µm da parte mais inferior da fissura até a porção mais oclusal	40
Figura 7 -	Fixação dos blocos de esmalte com cera para escultura e cobertura com tela plástica deixando um espaço de 1mm entre o espécime e a tela para o acúmulo de biofilme	47
Figura 8 -	Fotomicrografias representativas de análise em MLP do grupo CO ₂ /Controle. A) Área controle apresentando lesão moderada e sem delimitação definida, nas paredes de fundo e lateral da fissura. B) Área de fissura irradiada com <i>laser</i> CO ₂ , não apresentando lesão de desmineralização	55
Figura 9 –	Fotomicrografias representativas de análise em MLP do grupo Nd:YAG/Controle. A) Área controle apresentando lesão moderada nas paredes de fundo e lateral da fissura. B) Área de fissura irradiada com <i>laser</i> Nd:YAG, não apresentando lesão de desmineralização	56
Figura 10 –	Fotomicrografias representativas de análise em MLP do grupo Er:YAG/Controle. A) Área controle apresentando lesão moderada e pouco definida nas paredes de fundo e lateral da fissura. B) Área de fissura irradiada com <i>laser</i> Er:YAG apresentando lesão de desmineralização semelhante ao grupo controle.	56

- - -

Figura 17 -	Fotomicrografias representativas da análise da subsuperfície do grupo irradiado com laser Nd:YAG em MEV A) Ausência de lesão de desmineralização na extensão da fissura. B) Discreta desorganização do tecido na região de fundo da fissura	64
Figura 18 -	Fotomicrografias representativas da análise da subsuperfície do grupo irradiado com laser CO ₂ em MEV. A) Ausência de lesão de desmineralização na extensão da fissura. B) Discreta desorganização do tecido na região de fundo da fissura.	64
Figura 19 –	A)Fissura estreita e profunda irradiada por <i>laser</i> Nd:YAG. B) Fundo de fissura apresentando desorganização do tecido característica de desmineralização	64
Gráfico 1 –	Box-plot da dispersão dos dados para os diferentes grupos, bem como média, mediana e desvio padrão (%)	53
Gráfico 2 –	Médias dos dados de microdureza para cada profundidade em relação a cada grupo analisado (KHN)	61

.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Parâmetros utilizados para a irradiação dos espécimes	36
Tabela 2 –	Medidas mínimas, medianas e máximas dos dados de microdureza para cada grupo (KHN)	52
Tabela 3 –	Medidas médias e desvios padrão das percentagens de microdureza para cada grupo (%)	53
Tabela 4 –	Médias e desvio padrão das percentagens de microdureza para cada profundidade em relação a cada grupo analisado (%)	54
Tabela 5 –	Medidas mínimas, medianas e máximas dos dados de área de lesão para cada grupo (mm2)	54
Tabela 6 –	Médias e desvio padrão das percentagens de área da lesão para cada profundidade em relação a cada grupo analisado (%)	55
Tabela 7 –	Medidas médias e desvios padrão dos dados de microdureza para cada grupo (KHN)	60
Tabela 8 –	Medidas mínimas, medianas e máximas dos dados de área de lesão para cada grupo (mm ²)	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS E SÍMBOLOS

%	porcentagem
μS	microsegundo(s)
μm	micrometro(s)
~	semelhante
<	menor que
>	maior que
°C	grau(s) celcius
α	alfa
β	beta
λ	lambda (comprimento de onda)
ANOVA	análise de variância
CO2	dióxido de carbono
DES	desmineralizante
DP	desvio padrão
Er:YAG	óxido de itrio e alumínio ($Y_3AI_5O_{12}$) dopado com érbio (Er^3 +)
Er:YSGG	óxido de itrio e escandio($Y_3Sc_2Ga_3O_{12}$) dopado com érbio (Er^3 +)
et al	e colaboradores
gf	grama-força(s)
Hz	hertz
J/cm ²	joule por centímetro quadrado(s)
KHN	Knoop Hardness Number
kV	quilovolt(s)
М	Molar
MEV	microscópio eletrônico de varredura

mJ	milijoule(s)
ml	mililitro(s)
ml/min	mililitro por minuto(s)
MLP	microscópio de luz polarizada
mm	milímetro(s)
mm ²	milímetro quadrado(s)
mmol/l	milimol por litro(s)
ms	milisegundo(s)
mW	miliwatt(s)
n°	número
Nd:YAG	óxido de itrio e alumínio ($Y_3AI_5O_{12}$) dopado com neodímio (N^3 +)
Nd:YLF	cristal ítrio, lítio e fluoreto (YLiF ₄) dopado com neodímio (N ³ +)
nm	nanometro(s)
рН	logaritmo negativo de concentração hidrogeniônica (-log[H ⁺])
RE	remineralizante
W	watt(s)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	22
2. PROPOSIÇÃO	29
3. MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1 Estudo <i>in vitro</i>	31
3.1.1 Aspectos éticos	31
3.1.2 Delineamento experimental	31
3.1.3 Seleção dos dentes	32
3.1.4 Preparação dos espécimes	32
3.1.5 Irradiação das superfícies	35
3.1.6 Ciclos de Ph	37
3.1.7 Teste de microdureza subsuperficial	38
3.1.8 Análise da área da lesão de cárie/ MLP	_40
3.1.9 Análise morfológica da superfície dos espécimes – MEV	41
3.1.10 Análise dos dados	41
3.2 Estudo <i>in situ</i>	43
3.2.1 Aspectos éticos	43
3.2.2 Delineamento experimental	43
3.2.3 Seleção dos dentes	44
3.2.4 Preparação dos espécimes	44
3.2.5 Irradiação das superfícies dos espécimes	45
3.2.6 Seleção dos voluntários	46
3.2.7 Preparo do dispositivo intrabucal	46
3.2.8 Teste de microdureza subsuperficial	48
3.2.9 Análise da área da lesão / MLP	49
3.2.10 Análise morfológica da subsuperfície dos espécimes – MEV	49
3.2.11 Análise dos dados	<u>50 </u>
4. RESULTADOS	51
4.1 Estudo <i>in vitro</i>	51

4.2 Estudo <i>in situ</i>	60
5. DISCUSSÃO	65
6. CONCLUSÃO	
REFERÊNCIAS	77
ANEXOS	<u>8</u> 7

Nas últimas duas décadas pode-se observar um acentuado declínio da doença cárie no mundo todo (FEATHERSTONE, 2000). No entanto, estudos epidemiológicos (DUMMER; KINGDON A; KINGDON R, 1990; KASTE et al., 1996) mostram que uma grande porcentagem de crianças ainda apresenta um número expressivo de lesões de cárie, e, além disso, esse declínio não ocorreu de forma uniforme em todos os tipos de superfícies dentais, pois a maioria das novas lesões em crianças e adolescentes estão localizadas na superfície oclusal de molares. Nessas situações de alto risco a cárie, é que o desenvolvimento de novos métodos para a prevenção se torna extremamente importante para o controle completo da doença.

As regiões de sulcos e fissuras são consideradas nichos perfeitos para a proliferação de microorganismos cariogênicos devido à sua morfologia irregular e profunda (YANG et al., 2000), o que implica também em dificuldade de higienização e por isso maior risco a desmineralização do esmalte e consequente desenvolvimento de lesões cariosas.

Além disso, historicamente, a região oclusal apresenta-se como uma área de difícil tratamento preventivo ou conservador de lesões de cárie (YANG et al., 2000), uma vez que o flúor, apesar de ser um agente de prevenção bem estabelecido, apresenta um desempenho menos efetivo nessa região do que nas superfícies dentais lisas (ELLWOOD; BLINKHORN; DAVIES, 1998) e a monitorização clínica de uma efetiva remineralização também é bastante complicada nessas regiões.

Na tentativa de diminuir a grande incidência de lesões de cárie na região oclusal, desenvolveu-se os selantes de sulcos de fissuras, no entanto, a perda completa ou parcial desse material pode resultar em lesões de cáries secundárias (FEIGAL, 1998). Assim observa-se que a otimização de estratégias e medidas preventivas de lesão de cárie para a superfície oclusal se fazem necessárias.

Dentre estas tentativas de melhorias para a prevenção à lesão de cárie e diante dos estudos pioneiros de Goldman, Ruben e Sherman (1964) analisando os componentes inorgânicos de tecidos calcificados irradiados com *laser* rubi, sugeriu-

se o estudo do *laser* para essa finalidade. Nesse sentido Stern e Soggnaes (1964) foram os primeiros a demonstrar o aumento da resistência ácida do esmalte exposto à irradiação *laser*, abrindo caminho para outros pesquisadores que vêm demonstrando resultados satisfatórios com a utilização de outros tipos de *lasers* para a mesma finalidade (BAHAR; TAGOMORI, 1994; FEATHERSTONE et al., 1998; KANTOROWITZ, FEATHERSTONE e FRIED, 1998; HOSSAIN et al., 2000; HSU et al., 2000; HUANG et al., 2001; DELBEN et al., 2003; LIU et al., 2006; CASTELLAN et al., 2007; ZEZELL et al., 2009).

O uso do *laser* para terapia preventiva de cárie é baseado na redução de microorganismos (GOUW-SOARES et al., 2000), na alteração química (DELBEM et al., 2003; FOWLER; KURODA, 1986; BAHAR ; TAGOMORI, 1994) e morfológica (HOSSAIN et al., 2000) da estrutura do esmalte, não podendo causar ablação ou fusão do mesmo (APEL et al, 2005). Para isso, a energia deve ser fortemente absorvida e eficientemente convertida em calor sem danificar os tecidos subjacentes e adjacentes (FEATHERSTONE; NELSON, 1987), devendo alterar a composição e solubilidade do substrato dental.

Para a superfície oclusal, um efeito preventivo vem sendo demonstrado por alguns autores (BAHAR; TAGGOMORI, 1994; YANG et al., 2000; HUANG et al., 2001) através da fusão e recristalização do esmalte, selando desta maneira a superfície de fissuras. No entanto, estes estudos utilizaram altas densidades de energia, o que poderia causar danos aos tecidos subjacentes e adjacentes devido ao aquecimento gerado no tecido.

Muitos trabalhos (FOWLER; KURODA, 1986; APFELBAUM; MAYER; FEATHERSTONE, 1990; MEURMAN et al., 1992) têm tentado explicar a relação do aumento da resistência ácida com o aquecimento de esmalte dental ocasionado por diferentes tipos de *laser*. A teoria mais aceita, juntamente com a redução da permeabilidade após a irradiação a *laser*, é que o carbonato presente no esmalte é liberado quando o tecido é aquecido até 650°C e os íons ácidos se condensam formando o pirofosfato, o que reduz drasticamente a taxa de dissolução da hidroxiapatita (FOWLER; KURODA, 1986). No entanto quando a temperatura excede 650°C até 1430°C há a formação de tri-cálcio-fosfato que é extremamente solúvel em meio ácido (FOWLER; KURODA, 1986; APFELBAUM; MAYER;

24

FEATHERSTONE, 1990; MEURMAN; VOEGEL; RAUHAMAA-MÄKINEM 1992). Sendo por tanto necessário o conhecimento dos parâmetros empregados para a obtenção de um resultado significativo na prevenção da lesão de cárie. (LIU J; LIU Y; STEPHEN 2006; DELBEN et al., 2003).

Assim, dentre os diferentes *lasers* empregados com este intuito, estudos temse focado principalmente em três tipos: CO₂, Er:YAG e Nd:YAG. O *laser* CO₂ é composto por uma mistura dos gases dióxido de carbono, helio e nitrogênio, com meio ativo de dióxido de carbono. Foi desenvolvido por Patel, McFarlane e Faust em 1964, e desde então vem sendo utilizado na Odontologia para intervenções tanto em tecidos moles quanto em tecidos duros. Devido ao seu comprimento de onda, que pode variar de 9 a 11µm, é tido como o mais indicado para os tratamentos de prevenção de cárie (RODRIGUES et al., 2004), uma vez que esse comprimento de onda coincide com o pico de absorção de energia da hidroxiapatita. Dessa maneira, existe alta absorção da energia do *laser* no substrato dental que é convertida em calor e conduzida para dentro do tecido, sendo a dispersão desta energia insignificante (HSU et al., 2008; CAN et al., 2009).

Outro *laser* que vem sendo amplamente estudado para a prevenção de cárie é o Er:YAG (DELBEN et al., 2003; HOSSAIN et al., 2000; LIU et al, 2006), que desde o início vem se destacando no que diz respeito ao tratamento do tecido dental duro, sendo o primeiro aprovado pela FDA em 1997 (Food and Drug Administration – E.U.A.) para o uso em ablação do tecido dental. O *laser* Er:YAG possui como meio ativo cristais de *ytrium*, *aluminium* e *garnet* dopados de íons *erbium*, apresentando comprimento de onda de 2,94µm, o qual coincide com o comprimento de onda de absorção de energia da hidroxiapatita e da água. Devido à grande interação desse *laser* com o tecido dental e a água, este vem sendo empregado com densidades de energia subablativas para a obtenção do aumento de resistência ácida do tecido, não causando perda de tecido dental, mas sim alterações estruturais ou químicas que auxiliem na prevenção da desmineralização (LIU et al.2006).

O *laser* Nd:YAG também vem sendo indicado para essa finalidade, e possui comprimento de onda de 1,06µm, que é compatível com os picos de absorção da hemoglobina, melanina e outros pigmentos. Apesar de esse *laser* apresentar um

comprimento de onda pouco absorvido pelas estruturas dentais (ZEZELL et al., 2009), estudos mostram resultados promissores com relação a ação da irradiação na prevenção de lesões de cárie, principalmente quando associado a aplicação tópica de flúor (KORYTNICKI et al., 2006, CASTELLAN et al., 2007; ZEZELL et al., 2009).

Contudo, por se tratar de uma nova perspectiva do uso do *laser*, e a fim de se determinar os melhores parâmetros e suas influências sobre os tecidos mineralizados, são necessários estudos *in vitro*, *in situ* e *in vivo* para avaliação destas tecnologias sobre a inibição da desmineralização do tecido.

Os estudos in vitro relacionados ao estudo da doença cárie continuam sendo amplamente utilizados na Odontologia, sendo que vários modelos de formação de lesão de cárie in vitro foram propostos, e dentre eles os mais utilizados são os baseados em ciclos de pH (FEATHERSTONE et al., 1986; SERRA; CURY, 1992; FEATHERSTONE et al.. 1998; ARGENTA; TABCHOURY; CURY, 2003: CASTELLAN et al., 2007; BEVILACQUA et al., 2007; FREITAS et al., 2008; PERITO et al., 2009; CHEN; HUANG, 2009). Este tipo de metodologia simula as condições de desmineralização e remineralização existente na cavidade bucal através da imersão das amostras em soluções desmineralizadoras e remineralizadoras alternadamente, em tempo variado, acordo com a intensidade de de desmineralização pretendida.

Como alternativa para sanar algumas limitações encontradas nos modelos *in vitro*, a introdução dos modelos *in situ* para o estudo da cárie foi feita por Koulourides e Volker (1964), e desde então vêm sendo amplamente utilizados em estudos em todo o mundo. Este modelo consiste em um aparelho ou outro tipo de dispositivo que cria condições definidas no ambiente bucal humano simulando o processo de formação das lesões de cárie. Idealmente, o modelo *in situ* deve servir como ponte entre a situação clínica natural descontrolada e a situação laboratorial completamente padronizada (ZERO, 1995). A principal vantagem desse modelo é a exposição de uma superfície experimental padronizada ao ambiente bucal, incluindo a microflora humana residente (MARSH, 1995), e seu objetivo é mimetizar o que ocorre no processo de formação da lesão de cárie natural, fornecendo informações

26

clínicas relevantes em um período de tempo relativamente curto, sem causar danos à dentição natural (ZERO, 1995).

A avaliação do grau de perda mineral em indução de lesão de cárie artificial em esmalte seja ela in vitro (FEATHERSTONE et al., 1983; ARGENTA et al., 2003; CASTELAN et al, 2007; FREITAS et al, 2008; PERITO et al., 2009;) ou in situ (KOO; CURY, 1998; BOTTENBERG et al., 2000; APEL et al., 2004; CURY et al., 2005; CHIMELLO et al., 2008; GAMEIRO et al, 2009) pode ser eficazmente realizada através do teste de microdureza, o gual é uma maneira seguramente comprovada de avaliar as mudanças superficiais na densidade mineral dos tecidos dentais duros (ARENDS; SCHUTHOF; JONGEBLOED, 1980; KOULOURIDES; HOUSCH, 1983). Nesse teste um penetrador de diamante produz uma deformação permanente característica, de acordo com o tipo de ponta, cuja medida do comprimento define a profundidade de penetração. Assim, é possível se estabelecer uma relação direta entre o grau de dureza de uma região e a profundidade de penetração da ponta ativa do aparelho (KIELBASSA et al. 1999). O ensaio de microdureza apresenta efetividade comparada a avaliação por microrradiografia quantitativa (FEATHERSTONE et al., 1983). Contudo, os estudos de microdureza empregando laser em tratamento de sulcos e fissuras são escassos e as metodologias e parâmetros são diferentes, tornando-os insuficientes para que se possa chegar a uma conclusão a respeito da efetividade do tratamento para prevenção de cárie nessas regiões.

Além da microdureza, tem-se a possibilidade de utilização da microscopia de luz polarizada para a observação do esmalte dental sadio e desmineralizado, que é há muito tempo conhecida. Um estudo (HOLMEN et al., 1985) realizado na metade do século passado utilizando essa técnica permitiu a caracterização histológica detalhada das alterações do esmalte cariado, que são até hoje utilizadas em cariologia. A vantagem da análise por esta metodologia é que ela permite uma diferenciação mais clara das várias zonas de uma lesão, permitindo além de descrições qualitativas do esmalte, a análise quantitativa do tecido, fornecendo assim informações indiretas sobre a estrutura (WEFEL;HARLESS, 1984a). Apesar da quantificação mineral não ser possível, sem que as lâminas sejam embebidas em soluções de diferentes índices de refração, a imagem observada na microscopia de luz polarizada mostra um forte contraste entre as quatro zonas da lesão e, portanto

27

permite que ela seja medida em sua completa extensão (WEFEL; HARLESS, 1984a). A medida de profundidade de lesão através de microscopia de luz polarizada tem sido utilizada em diversos estudos avaliando o efeito de flúor tópico na progressão de cárie, os efeitos de outros métodos preventivos e também como método de referência para avaliação de novos métodos de quantificação de lesões (ARENDS; SCHUTHOF; JONGEBLOED, 1980; HICKS; SILVERSTONE, 1984; WEFEL; HARLESS, 1984b; LEGEROS, 1990; ARENDS; TEN BOSCH, 1992; HARA et al., 2003; MENDES; NICOLAU; DUARTE, 2003; LUSSI; HIBST e PAULUS, 2004; HARA et al., 2005; CHIMELLO et al., 2008; ESTEVES-OLIVEIRA et al., 2009).

Outra análise também relevante para este estudo é a avaliação da morfologia da superfície e subsuperfície do tecido irradiado, e dessa maneira a microscopia eletrônica de varredura é um dos métodos mais eficazes para que esse tipo de análise seja realizado (VAN MEERBEECK et al., 2000), pois pode revelar as possíveis alterações estruturais causadas pela irradiação, além de comprovar a efetividade do tratamento (CECHINI et al., 2005; LIU et al., 2006).

Diante dos aspectos relacionados acima, se observa a importância de analisar os reais efeitos de energias subablativas oriundas de diferentes tipos de *lasers* visando uma melhoria nos métodos preventivos ao desenvolvimento de lesões de cárie nas superfícies de sulcos e fissuras.

2. PROPOSIÇÃO

2. PROPOSIÇÃO

O objetivo desses estudos *in vitro* e *in situ* foi avaliar a efetividade da irradiação *laser* em diferentes comprimentos de onda na prevenção do desenvolvimento de lesão de cárie em sulcos e fissuras através:

- da microdureza das paredes de fundo dos sulcos e fissuras em diferentes profundidades após desafio cariogênico;
- da área de lesão formada após desafio cariogênico através da microscopia de luz polarizada;
- da morfologia das superfícies irradiadas ou subsuperfícies através de microscopia eletrônica de varredura após desafio cariogênico

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Estudo in vitro

3.1.1 Aspectos éticos

Este estudo foi desenvolvido após ser submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (Processo n°0065.0.138.000-06) (ANEXO A).

3.1.2 Delineamento experimental

Este estudo *in vitro* foi realizado em um período de 14 dias durante os quais os espécimes foram submetidos a desafio cariogênico por ciclagens em soluções desmineralizante e remineralizante.

O fator em estudo envolvido neste trabalho foi o tipo de *laser* utilizado para o tratamento de superfície em sulcos e fissuras, sendo em 3 níveis:

- Laser Er:YAG;
- Laser Nd:YAG;
- Laser CO₂;

Cada grupo foi comparado a uma superfície controle contida no próprio espécime.

A amostra do experimento foi de 45 corpos-de-prova divididos aleatoriamente em 3 grupos (n=15). A variável de resposta quantitativa foi a microdureza subsuperficial da amostra e a medida da área da lesão de cárie realizada através de análise em microscopia de luz polarizada, e a variável de resposta qualitativa foi análise morfológica da superfície em microscópio eletrônico de varredura.

3.1.3 Seleção dos dentes

Foram selecionados 45 molares humanos hígidos não irrompidos provenientes do Banco de dentes da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto -USP. Para a certificação de que os dentes selecionados eram não irrompidos estes foram especialmente doados ao Banco de dentes pela clínica de cirurgia desta faculdade com escolha dos dentes sob supervisão da pesquisadora. Os dentes foram limpos com curetas periodontais, pasta de pedra pomes e água aplicada com escovas de Robinson. Posteriormente foi feito exame radiográfico de cada dente para a padronização da espessura do esmalte, descartando-se aqueles com menos de 1mm de esmalte e anomalias. A desinfecção dos dentes foi realizada com solução de formol 1% (pH 7,0) preparada com tampão fosfato, na qual ficaram imersos durante uma semana (DOMINICI et al., 2001; CURY et al, 2000), após esse período os dentes foram lavados abundantemente em água corrente, e então armazenados em água destilada e deionizada a 4°C durante todo o período de preparação dos espécimes.

3.1.4 Preparação dos espécimes

Os dentes selecionados tiveram a porção oclusal seccionadas utilizando disco diamantado sob refrigeração, acoplado em uma máquina de corte (Minitrom, Struers

A/S, Copenhagen, DK-2610, Denmark). Após a obtenção das porções oclusais, estas foram seccionadas de forma a se obter fragmentos de 8mmx4mmx2mm contendo sulcos e fissuras de cada porção oclusal (Figura 1). As superfícies opostas a oclusal foram planificadas por meio de uma Politriz (DP-9U2, Panambra/Strues, A/S), usando lixa d`água de granulação 400 sob refrigeração constante.



Figura 1 - Secção da porção oclusal de terceiros molares humanos obtendo fragmentos de 8mmx4mmx2mm, observando-se a profundidade da fissura em pelo menos 1mm .

Foram então delimitadas as áreas de esmalte expostas as soluções desmineralizante e remineralizante durante o desafio cariogênico. A área exposta ao desafio foi de 14mm²(±0,5mm²) e considerou a irregularidade da fissura. Para isso, inicialmente a área foi delimitada com o auxílio de uma lâmina de chumbo nas medidas da área pretendida, a qual foi brunida contra a superfície oclusal e delimitada com cera, e posteriormente essa área delimitada foi checada através de um estereomicroscópio (MZ16, Leica Microsystems GmbH Wetzlar, Germany) e uma câmera (DFC 500, Leica Microsystems GmbH Wetzlar, Germany) que captaram uma sequência de fotos com diferentes micro focos da imagem. Essa sequência passou por uma automontagem (Auto Montage Pro, Synconscropy, Cambridge, United Kingdon) e através dessa imagem tridimensional adquirida foi possível, com o auxílio de um software (IM 50, Leica Microsystems GmbH Wetzlar, Germany) registrar a área requerida considerando as 3 dimensões.

3.1.5 Irradiação das superfícies

O tratamento de superfície foi feito apenas em metade da área isolada do fragmento, sendo que a outra metade foi considerada como controle individual de cada espécime (Figura 2). O tempo de irradiação para todos os grupos foi de 30 segundos.



Figura 2 - Tratamento dos sulcos e fissuras de metade da área dos fragmentos com o respectivo *laser* de cada grupo.

• Laser Er:YAG:

Para o tratamento dos espécimes experimentais com *laser* Er:YAG foi empregado o equipamento Kavo Key *Laser* II (Kavo Co., Biberach, Alemanha). Um *laser* de alta densidade de potência, comprimento de onda de 2,94 μ m, energia ajustável de 60 a 500 mJ, freqüência de 1 a 15 Hz, duração de pulso de 250 a 500 μ s, distância focal ideal de 12,0mm entre a lente de saída do feixe e o tecido alvo. Por apresentar comprimento de onda localizado na região do infravermelho do espectro eletromagnético, um *laser* diodo (λ = 635nm; potência = 1mW) foi usado como feixe guia. O diâmetro do feixe é de 0,63mm.

Para o tratamento da superfície de sulcos e fissuras o feixe foi empregado no modo não-contato, não focado, com energia por pulso de 80mJ e taxa de repetição de 2Hz. A distância entre a lente de saída do *laser* e o alvo foi de 4mm (PALMA-DIBB et al, 2009) (Tabela 1).
• Laser Nd: YAG:

Para o tratamento dos espécimes experimentais com *laser* Nd:YAG foi empregado o equipamento Twinlight (Fotona, Ljublijana, Slovenia) em modo contato através de uma fibra de quartzo de 0,3mm que foi posicionada perpendicularmente a amostra. O equipamento apresenta comprimento de onda de 1,064 µm, duração de pulso de 250 µs. A energia utilizada foi de 80mJ com freqüência de 10Hz, totalizando 1W (CASTELLAN, 2007) (Tabela 1).

• Laser CO₂:

Para o tratamento dos espécimes experimentais com *laser* CO_2 foi empregado o equipamento UM-L30 (Union Medical Engineering Co., Yangju-si, Gyeonggi-Do, Korea) que possui um comprimento de onda de 10,6µm e diâmetro do feixe de 0,3mm. O equipamento de *laser* foi utilizado com uma energia de 0,8W, no modo não contato, com uma freqüência de 20Hz (RECHMANN et al., 2008). A distância entre a lente de saída do *laser* e o alvo foi de 2,5mm (Tabela 1).

Laser	Potência/ Energia	Duração de pulso	Taxa de repetição	Distância de irradiação	Diâmetro do feixe/ Fibra
Er:YAG	80mJ	250µs	2Hz	4mm	0,63mm
Nd:YAG	1,0W	250µs	10Hz	contato	0,3mm
CO ₂	0,8W	10ms	20Hz	2,5mm	0,3mm

Tabela 1 – Parâmetros utilizados para a irradiação dos espécimes.

Os fragmentos foram armazenados em estufa a 37°C durante 24 horas anteriormente as ciclagens de pH.

3.1.6 Ciclos de pH

Após os tratamentos as amostras foram submetidas a um modelo *in vitro* de ciclagens de pH.

Cada amostra foi fixada com cera pegajosa a ponta de um fio ortodôntico que ficou suspenso em recipientes individuais, os quais continham as soluções desmineralizantes (DES) ou remineralizantes (RE) durante as ciclagens de pH(Figura 3).

As ciclagens de pH foram feitas de acordo com modelo proposto por Featherstone, O'Reilly e Shariati.(1986) e modificado por Serra e Cury (1992). As amostras foram individualmente imersas em 12ml de solução DES (2mmol/l de cálcio, 2mmol/l de fosfato e 75mmol/l de acetato em pH4,6) permanecendo imersas por 6 horas. Depois disso, foram removidas e lavadas com água destilada e deionizada por 10 segundos e levemente secas com papel absorvente. Em seguida as amostras foram imersas na mesma quantidade de solução RE (1,5mmol/l de cálcio, 0,9mmol/l de fosfato, 150mmol de cloreto de potássio e 20mmol/l de tampão cacodilato de pH 7,0) que apresenta um grau de saturação dos minerais semelhante a saliva, e semelhante ao proposto por ten Cate e Duijsters (1982), e ficaram imersas nesta por 18 horas. Todo o procedimento foi realizado em estufa a 37°C.



Figura 3 - Amostras armazenadas em recipientes individuais nos quais foram adicionadas as soluções DES e RE.

As soluções de DES e RE foram substituídas diariamente, e as ciclagens ocorreram durante 10 dias, sendo que a cada 5 dias as amostras ficaram individualmente imersas em solução remineralizante por 2 dias (finais de semana), totalizando então, um período experimental de 14 dias.

3.1.7 Teste de microdureza subsuperficial

Após o desafio cariogênico *in vitro* os espécimes foram limpos em ultrassom (3L; Dabi Atlante, Ribeirão Preto, SP, Brasil) por 15 minutos e seccionados ao meio no sentido cervico-oclusal utilizando um disco diamantado montado em máquina de corte com refrigeração (Minitrom, Struers A/S, Copenhagen, DK-2610, Denmark) separando a porção controle da porção experimental em cada espécime.

Os espécimes obtidos foram novamente seccionados na direção cervicooclusal nas suas porções centrais (Figura 4) e uma das secções obtidas de cada corte foi incluída em resina de poliéster (Milflex Indústria Química Ltda., São Bernardo do Campo, SP, Brasil) de modo que a superfície onde seria realizado o teste ficasse livre, para que fossem realizados os procedimentos de polimento.



Figura 4 - Secção do fragmento com separação da área controle e experimental, seguida de secção central do espécime para a realização das análises.

Para a planificação dos espécimes foram utilizadas lixas d'água de granulação 600 e 1200 nessa ordem, e para o polimento foram utilizados discos de feltro (Arotec, Cotia, São Paulo) com pasta de alumina 0,3µm e 0,05µm nessa ordem. Todo o procedimento de planificação e polimento foi realizado em máquina de polimento sob refrigeração (DP-9U2, Panambra/Strues, A/S). Posteriormente os cilindros de resina contendo os espécimes foram limpos por 10 minutos em ultrassom.

O teste foi realizado em um microdurômetro (Shimadzu Micro Hardness Tester HMV-2000, Japan), com auxílio de um penetrador de diamante para dureza Knoop (KHN) aplicando uma carga de 25gf com duração de 10 segundos, de maneira que a ponta do penetrador permanecesse paralela à subsuperfície do esmalte. As penetrações foram realizadas na região de subsuperfície do fundo das fissuras (Figura.5). A primeira marcação foi localizada 20µm abaixo da região de análise e as marcações seguintes foram realizadas a 30µm, 40µm, 50µm, 100µm, 200µm na mesma direção. Para cada região foram feitas 3 medidas, e a média *dessas medidas foi utilizada para a análise dos dados .*



Figura 5 - Análise de microdureza na subsuperfície do fundo das fissuras. Penetrações realizadas a $20\mu m$, $30\mu m$, $40\mu m$, $50\mu m$, $100\mu m$ e $200\mu m$ abaixo da superfície.

3.1.8 Análise da área da lesão de cárie - MLP

Treze amostras das secções remanescentes de cada grupo e seus respectivos controles foram incluídos em resina acrílica autopolimerizável transparente e seccionadas longitudinalmente em lâminas de 500µm de espessura utilizando disco diamantado sob refrigeração, acoplado em uma máquina de corte (Minitrom, Struers A/S, Copenhagen, DK-2610, Denmark). As secções foram planificadas e polidas manualmente utilizando lixas d'água de granulação 400 a 1200, até chegar a uma espessura entre 80-100µm, medidas através de um micrômetro com resolução de 1µm (Mitotoyo, Tokyo, Japão).

Para a análise as lâminas foram embebidas em água destilada e cobertas com lamínula de vidro para observação em microscópio de luz polarizada (Leica DMLB, Leica Microsystems, Nussloch GmbH,Germany) utilizando um polarizador cruzado com filtro $\lambda 6$ e aumento de 10X. As imagens foram capturadas e digitalizadas para análise da superfície adjacente a irradiação, e com auxílio de um software (AxioVision 4.7 Zeiss) foi medida a área da lesão em mm². Devido a diferenças nas profundidades das fissuras, para padronização da medição foi considerada uma profundidade de 500µm da parte mais inferior da fissura até a porção mais oclusal (Figura 6). Sob a microscopia de luz polarizada o tecido desmineralizado foi caracterizado por uma área marrom escura, enquanto o tecido sadio apareceu em tonalidades de azul ou amarelo.



Figura 6. Padronização de medida da área da lesão de cárie considerando uma profundidade de 500µm da parte mais inferior da fissura até a porção mais oclusal.

3.1.9 Análise morfológica da superfície dos espécimes - MEV

As três secções restantes de cada grupo e seus respectivos controles foram utilizados para a análise da morfologia da superfície em microscopia eletrônica de varredura. As secções foram levadas ao ultra-som, utilizando dois ciclos de 5 minutos para eliminar detritos provenientes dos procedimentos realizados anteriormente.

Após a limpeza as amostras foram imersas em solução de glutaraldeído (2,5%) tamponado com cacodilato de sódio (0,1 M) com pH 7,4 por doze horas a 4°C. Em seguida, foram lavadas com 10ml de tampão cacodilato de sódio (0,1 M) em pH 7,4 por uma hora e, novamente lavados com água destilada por um minuto. A desidratação foi realizada em séries crescentes de etanol 25%, 50% e 75% por 20 minutos cada, 95% por 30 minutos e 100% por 60 minutos. Cada grupo teve as amostras fixadas em stubs com a superfície oclusal voltada para face superior usando fita adesiva apropriada, e logo após os espécimes foram metalizados com cobertura de ouro. Foi utilizado o Microscópio Eletrônico de Varredura (XL30 FEG, Phillips, Eindhoven, Holanda) operando em 20 KV para realizar a varredura de toda a superfície verificando as alterações causadas no tecido dentário e fotografando as regiões mais representativas.

3.1.10 Análise dos dados

As médias dos dados encontrados nos testes de microdureza e medida de área das lesões foram analisadas utilizando-se o teste de Wilcoxon para verificar a comparação interna de cada grupo com o seu controle. Para a comparação entre os grupos experimentais empregou-se a variação percentual de microdureza em relação ao controle, utilizando-se a seguinte fórmula: (dureza controle - dureza experimental)*100)/dureza controle. Os dados não apresentaram distribuição normal e homogênea, dessa forma, a comparação entre os grupos foi realizada através do método estatístico não-paramétrico de Kruskal-Wallis (p<0,05). Na análise das profundidades também se empregou a variação percentual de microdureza em relação ao controle, e os dados foram normais e homogêneos, utilizando-se então o teste ANOVA a dois critérios (sendo um vinculado).

Da mesma forma, nas áreas das lesões, foi realizada a comparação entre os grupos empregando a variação percentual da área. Os dados apresentaram-se normais e homogêneos e empregou-se o teste de análise de variância a um critério.

Os dados da observação em microscopia eletrônica de varredura não foram analisados estatisticamente, uma vez que o objetivo da análise foi de uma comparação qualitativa das diferentes condições experimentais propostas no estudo.

3.2 Estudo in situ

3.2.1 Aspectos éticos

Este estudo foi desenvolvido após ser submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (Processo n°0065.0.138.000-06) (ANEXO A). Os objetivos e metodologias do estudo foram esclarecidos aos voluntários, ficando claro que poderiam desistir do experimento a qualquer momento e que os dados obtidos seriam confidenciais. Todas as informações constavam na Carta de Informação ao Paciente (ANEXO B) e no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXO C), os quais foram assinados em duas vias, pertencendo uma ao voluntário e outra aos pesquisadores.

3.2.2 Delineamento experimental

Este estudo *in situ* foi realizado em um período de 14 dias durante os quais os voluntários utilizaram dispositivos intrabucais contendo 4 espécimes de esmalte. Os parâmetros utilizados para este estudo foram os mesmos utilizados no estudo *in vitro* realizado anteriormente. O fator de estudo envolvido neste trabalho foi o método de tratamento para prevenção da lesão de cárie em sulcos e fissuras, em quatro níveis:

Controle:

• Nenhum tratamento;

Experimentais:

• Laser Er:YAG;

- Laser Nd:YAG;
- Laser CO₂.

A amostra do experimento foi de 60 corpos-de-prova divididos aleatoriamente em 4 grupos (n=15). O estudo foi realizado obedecendo a um delineamento em blocos completos casualizados. A variável de resposta quantitativa foi a microdureza subsuperficial da amostra e a medida da área da lesão de cárie realizada através de análise em microscopia de luz polarizada, e a variável de resposta qualitativa foi análise morfológica da subsuperfície em microscópio eletrônico de varredura.

3.2.3 Seleção dos dentes

60 molares humanos hígidos não irrompidos provenientes do Banco de dentes da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP foram selecionados da mesma maneira realizada no estudo *in vitro*. O procedimento de esterilização dos fragmentos foi feito com os mesmos mergulhados em um recipiente contendo soro fisiológico em autoclave em ciclo de 30 minutos (LIMA et al, 2009).

3.2.4 Preparação dos espécimes

Os dentes selecionados tiveram a porção oclusal seccionadas utilizando disco diamantado sob refrigeração, acoplado em uma máquina de corte (Minitrom, Struers A/S, Copenhagen, DK-2610, Denmark). Após a obtenção das porções oclusais, estas foram seccionadas de forma a se obter fragmentos de 4mmx4mmx2mm contendo sulcos e fissuras de cada porção oclusal. As superfícies opostas a oclusal foram planificadas por meio de uma Politriz (DP-9U2, Panambra/Strues, A/S), usando lixa d`água de granulação 400 sob refrigeração constante.

Foram então delimitadas as áreas de esmalte expostas ao desafio cariogênico, da mesma maneira realizada no estudo *in vitro*. A área exposta ao desafio em cada espécime foi de 7mm²(±0,5mm²) e considerou a irregularidade da fissura.

3.2.5 Irradiação das superfícies

• Laser Er:YAG:

Para o tratamento dos espécimes experimentais com *laser* Er:YAG foi empregado o equipamento Kavo Key *Laser* II (Kavo Co., Biberach, Alemanha). Um *laser* de alta densidade de potência, comprimento de onda de 2,94 μ m, energia ajustável de 60 a 500 mJ, freqüência de 1 a 15 Hz, duração de pulso de 250 a 500 μ s, distância focal ideal de 12,0mm entre a lente de saída do feixe e o tecido alvo. Por apresentar comprimento de onda localizado na região do infravermelho do espectro eletromagnético, um *laser* diodo (λ = 635nm; potência = 1mW) foi usado como feixe guia. O diâmetro do feixe é de 0,63mm.

Para o tratamento da superfície de sulcos e fissuras o feixe foi empregado no modo não-contato, não focado, com energia por pulso de 80mJ e taxa de repetição de 2Hz. A distância entre a lente de saída do *laser* e o alvo foi de 4mm (PALMA - DIBB et al, 2009)

• Laser Nd:YAG:

Para o tratamento dos espécimes experimentais com *laser* Nd:YAG foi empregado o equipamento Twinlight (Fotona, Ljublijana, Slovenia) em modo contato através de uma fibra de quartzo de 0,3mm que foi posicionada perpendicularmente a amostra. O equipamento apresenta comprimento de onda de 1,064 µm, duração de pulso de 250 µs. A energia utilizada foi de 80mJ com freqüência de 10Hz, totalizando 1W (CASTELLAN et al., 2007).

• Laser CO₂:

Para o tratamento dos espécimes experimentais com *laser* CO₂ foi empregado o equipamento UM-L30 (Union Medical Engineering Co., Yangju-si, Gyeonggi-Do, Korea) que possui um comprimento de onda de 10,6μm e diâmetro do feixe de 0,3mm. O equipamento de *laser* foi utilizado com uma energia de 0,8W, no modo não contato, com uma freqüência de 20Hz (RECHMANN et al., 2008). A distância entre a lente de saída do *laser* e o alvo foi de 2,5mm.

Os fragmentos que tiveram tratamento de superfície com *laser* foram armazenados em estufa a 37°C durante 24 horas anteriormente a instalação do aparelho intrabucal no voluntário.

3.2.6 Seleção dos voluntários

Foram selecionados 15 voluntários adultos jovens em idade entre 18 e 30 anos considerando-se os seguintes critérios de exclusão: fumante, presença de lesões de cárie ativa, utilização atual ou recente de medicamentos que afetam o fluxo salivar, tratamento de radioterapia ou quimioterapia, praticante de atividades aquáticas, presença de doença periodontal, presença de doenças sistêmicas, fluxo salivar estimulado menor que 1ml/min e não estimulado menor que 0,1ml/min.

Os voluntários foram submetidos a um exame clínico para a detecção de cáries ativas e doença periodontal e a testes salivares.

3.2.7 Preparo do dispositivo intrabucal palatino

Os arcos superiores e inferiores dos 15 voluntários foram moldados com alginato (Tropicalgin, Zhermack, Badia Polesine, Itália) em moldeiras de inox

3. MATERIAIS E MÉTODOS

(Zhermack, Badia Polesine, Itália) e vazados em gesso tipo IV (Herostone, Vigodent, Rio de Janeiro, Brasil). Um dispositivo intrabucal palatino foi confeccionado em resina acrílica para cada voluntário. O dispositivo continha duas cavidades de 6mmx6mmx4mm do lado direito do dispositivo e duas do lado esquerdo para o armazenamento dos espécimes preparados previamente. Os blocos de esmalte foram fixados com cera para escultura e cobertos com tela plástica deixando um espaço de 1 mm entre o espécime e a tela para acúmulo de biofilme (Figura 7).



Figura 7. Fixação dos blocos de esmalte com cera para escultura e cobertura com tela plástica deixando um espaço de 1mm entre o espécime e a tela para o acúmulo de biofilme.

Os dispositivos foram instalados nos voluntários após profilaxia e estes receberam orientações por escrito quanto ao uso do dispositivo (ANEXO B).

Juntamente com os dispositivos, os voluntários receberam um kit contendo um estojo plástico, uma porção de gazes e um frasco contendo água destilada e deionizada para o armazenamento do dispositivo intrabucal durante as refeições, um dentifrício fluoretado (Colgate Máxima Proteção Anti-cáries, Colgate-Palmolive, São Paulo, Brasil), um fio dental (Colgate, Colgate-Palmolive, São Paulo, Brasil) e uma escova de dente macia n°30 (Colgate Twister Fresh Colgate-Palmolive, São Paulo, Brasil) para a higiene dental, e um frasco com solução de sacarose 20% para o desafio cariogênico. A solução de sacarose foi substituída diariamente. O dispositivo foi instalado 12 horas antes do início da fase experimental para que houvesse a formação da película adquirida. Durante os 14 dias do período experimental os voluntários foram instruídos a utilizar o dispositivo durante todo o dia, inclusive à noite e exceto às refeições, quando os dispositivos permaneciam no interior do estojo plástico envoltos em gaze umedecida com água destilada e deionizada, além de manter seus hábitos dietéticos normais, e higiene dental 4x ao dia não escovando os fragmentos.

Para o desafio cariogênico o voluntário foi instruído a gotejar 1 gota de solução de sacarose 20% sobre os espécimes 6 vezes ao dia, considerando-se um intervalo de 120 minutos entre uma aplicação e outra (CCAHUANA-VÁSQUES et al., 2007; CHIMELLO et al, 2008). Cinco minutos após a aplicação o dispositivo voltava à cavidade bucal do voluntário, permanecendo assim até próxima aplicação.

3.2.8 Teste de microdureza subsuperficial

Após o desafio cariogênico *in situ* os espécimes foram limpos cuidadosamente, removendo todo o biofilme, e então levados para o ultrassom (3L; Dabi Atlante, Ribeirão Preto, SP, Brasil) por 2 minutos. Foram então incluídos em resina de poliéster (Milflex Indústria Química Ltda., São Bernardo do Campo, SP, Brasil) para serem seccionados em suas porções centrais no sentido cervico-oclusal utilizando um disco diamantado montado em máquina de corte com refrigeração (Minitrom, Struers A/S, Copenhagen, DK-2610, Denmark).

Uma das secções obtidas de cada corte, para todos os grupos, foi preparada através dos procedimentos de planificação, polimento e limpeza feitos a semelhança do estudo *in vitro*. O teste de microdureza Knoop foi então realizado utilizando carga de 25gf por 10 segundos na subsuperfície do fundo das fissuras também a semelhança do estudo *in vitro*.

3.2.9 Análise da área da lesão de cárie - MLP

As amostras examinadas em microscópio de luz polarizada foram seccionadas longitudinalmente em lâminas de aproximadamente 500 µm, e reduzidas manualmente em secções de 80µm de espessura a semelhança do estudo *in vitro*.

Para a análise as lâminas foram embebidas em água destilada e cobertas com lamínula de vidro para observação em microscópio de luz polarizada (Leica DMLB, Leica Microsystems, Nussloch GmbH,Germany) utilizando um polarizador cruzado com filtro $\lambda 6$ e aumento de 10X. As imagens foram capturadas e digitalizadas para análise da superfície adjacente a irradiação, e com auxílio de um software (AxioVision 4.7 Zeiss) foi medida a área da lesão em mm². A padronização das leituras foi feita da mesma forma que no estudo *in vitro*. Sob a microscopia de luz polarizada o tecido desmineralizado foi caracterizado por uma área marrom escura, enquanto o tecido sadio apareceu em tonalidades de azul ou amarelo.

3.2.10 Análise da subsuperfície dos espécimes - MEV

Três secções de cada grupo foram utilizadas para a análise da morfologia da subsuperfície em microscopia eletrônica de varredura. As secções foram levadas ao ultra-som, utilizando dois ciclos de 5 minutos para eliminar detritos provenientes dos procedimentos realizados anteriormente.

Após a limpeza as amostras foram preparadas a semelhança do estudo *in vitro*. Cada grupo teve as amostras fixadas em stubs com a subsuperfície polida voltada para face superior usando fita adesiva apropriada, e logo após os espécimes foram metalizados com cobertura de ouro. Foi utilizado o Microscópio Eletrônico de Varredura (XL30 FEG, Phillips, Eindhoven, Holanda) operando em 20 KV para

realizar a varredura de toda a subsuperfície das fissuras verificando as alterações causadas no tecido dentário e fotografando as regiões mais representativas.

3.2.11 Análise dos dados

Os dados obtidos na análise de microdureza foram normais e homogêneos, e dessa forma foi realizada a comparação entre os grupos através da análise de variância vinculada a dois critérios (ANOVA) (α = 5%), averiguando diferenças entre as médias através do teste de múltipla comparação de Fisher LSD ao nível de significância de 5%.

Para área de lesões a comparação entre os grupos foi realizada através do teste não paramétrico Wilcoxon ao nível de significância de 5% para averiguar diferenças entre as médias.

Os dados da observação em microscopia eletrônica de varredura não foram analisados estatisticamente, uma vez que o objetivo da análise foi de uma comparação qualitativa das diferentes condições experimentais propostas no estudo.

4. **RESULTADOS**

4. RESULTADOS

4.1 Estudo in vitro

A análise de microdureza foi realizada primeiramente comparando-se internamente cada grupo experimental a sua área controle, e pode-se observar diferença estatística significante entre as partes controle e experimental apenas para as amostras do grupo irradiado com *laser* CO₂ (p<0,05). Sendo as medidas de microdureza apresentadas pela área irradiada de maior valor que aquelas apresentadas pela área controle. Os demais grupos não apresentaram diferença estatisticamente significante entre sua área experimental e controle (Tabela 2).

Tabela 2 – Medidas mínimas, medianas e máximas dos dados de microdureza para cada grupo (KHN).

Grupos	Área	Mín.	Mediana	Máx.
1	controle	113	283a	537
	Er:YAG	86	276a	399
2	controle	35	253b	386
	Nd:YAG	50	249b	412
3	controle	59	256c	369
	CO ₂	81	291d	441

*Comparação interna entre área experimental/controle, letras iguais similaridade estatística.

Comparando-se as percentagens de variação da dureza (área controle/experimental) observou-se que as amostras irradiadas com o *laser* CO2 apresentaram maior percentagem de inibição da desmineralização em relação aos outros dois grupos, sendo esta diferença estatisticamente significante (p<0,05). Já

os *lasers* Nd:YAG e Er:YAG apresentaram similaridade estatística entre eles (Tabela 3).

Tabela 3 – Medidas médias e desvios padrão das percentagens de microdureza para cada grupo (%).

Grupos	Média / DP	
Er:YAG	-6,04 ±45,97	
Nd:YAG	-23,84 ±107,30	
CO ₂	-26,07 ±60,77	

*Sinal negativo (-) indica que o grupo experimental apresentou dureza superior ao controle.





Na comparação das distâncias observou-se que não houve diferença estatística entre elas, independente do grupo analisado (Tabela 4).

Grupo Profundidades	er:YAG	Nd:YAG	CO ₂
20µm	10,16± 43,77	-3,54± 38,36	-49,17± 118,09
30µm	-5,60± 38,95	-28,07± 70,39	-29,93± 58,28
40µm	-13,27± 38,76	-12,86± 48,34	-26,61± 43,75
50µm	-4,01± 47,57	-1,40± 31,38	-25,57± 48,46
100µm	-0,27± 35,00	2,61± 28,06	-16,40± 24,42
200µm	-0,20± 23,59	11,58± 21,15	-8,77± 21,76

Tabela 4 - Médias e desvio padrão das percentagens de microdureza para cada profundidade em relação a cada grupo analisado (%).

*Sinal negativo (-) indica que o grupo experimental apresentou dureza superior ao controle.

Na análise das medidas de área de lesão foram observadas diferença estatística significante para as amostras do grupo irradiado com *laser* CO_2 e Nd:YAG entre as partes controle e experimental (p<0,05). Sendo que a medidas de área de lesão de desmineralização apresentada pela área irradiada foram estatisticamente inferiores ao controle. O grupo irradiado com *laser* Er:YAG apresentou semelhança estatística entre a área experimental e controle (p>0,05) (Tabela 5).

Tabela 5 – Medidas mínimas, medianas e máximas dos dados de área de lesão para cada grupo (mm²).

Grupos	Área	Mín.	Mediana	Máx.
1	controle	0,07	0,11a	0,22
•	Er:YAG	0,02	0,11a	0,15
2	controle	0,03	0,12b	0,23
	Nd:YAG	0,00	0,07c	0,20
3	controle	0,09	0,12d	0,18
	CO ₂	0,06	0,08e	0,16

*Comparação interna entre área experimental/controle, letras iguais similaridade estatística.

Analisando a variação percentual da área da lesão pode-se observar comportamento semelhante entre os 3 grupos (Tabela 6)

Tabela 6 - Médias e desvio padrão das percentagens de área da lesão para cada profundidade em relação a cada grupo analisado (%).

Grupos	Média / DP	
Er:YAG	15,05 ±37,18	
Nd:YAG	37,42 ±34,72	
CO ₂	31,21 ±23,02	

Nas fotomicrografias da microscopia de luz polarizada foi possível observar a formação de lesão de desmineralização moderada e regular nas áreas controles de todos os grupos (Figura 8A, 9A e 10A), sendo que praticamente não foram encontradas lesões nos grupos irradiados pelos *lasers* CO₂ (Figura 8B) e Nd:YAG (Figura 9B), diferentemente daqueles irradiados com *laser* Er:YAG, que apresentou lesões semelhantes àquelas encontradas nas porções controles de seus espécimes (Figura 10B).



Figura 8 – Fotomicrografias representativas de análise em MLP do grupo CO₂/Controle. A) Área controle apresentando lesão moderada e sem delimitação definida nas paredes de fundo e lateral da fissura. B) Área de fissura irradiada com *laser* CO₂, não apresentando lesão de desmineralização.



Figura 9 – Fotomicrografias representativas de análise em MLP DO grupo Nd:YAG/Controle. A) Área controle apresentando lesão moderada e pouco definida nas paredes de fundo e lateral da fissura. B) Área de fissura irradiada com *laser* Nd:YAG, não apresentando lesão de desmineralização.



Figura 10 – Fotomicrografias representativas de análise em MLP do grupo Er:YAG/Controle. A) Área controle apresentando lesão moderada e pouco definida nas paredes de fundo e lateral da fissura. B) Área de fissura irradiada com *laser* Er:YAG apresentando lesão de desmineralização semelhante ao grupo controle.

Na análise em microscopia eletrônica de varredura pudemos observar que os grupos irradiados com *laser* Er:YAG e Nd:YAG apresentaram sinais de desmineralização, no entanto estes foram menos intensos dos que aqueles observados na área controle dos mesmos espécimes (Figuras 11 e 12). Já o grupo irradiado com *laser* CO₂ apresentou uma diferença mais evidente de sua superfície controle para a experimental, mostrando ausência de exposição dos prismas de esmalte e modificação de superfície na área irradiada (Figura 13).



Figura 11 – Fotomicrografias representativas de análise MEV. A) Área controle em aumento de 63X mostrando sinais de desmineralização intensa da superfície oclusal, inclusive com perda da camada superficial do tecido. B) Área experimental em aumento de 50X mostrando superfície oclusal em início de desmineralização. C) Área controle em aumento de 1000X mostrando desmineralização mais acentuada do que área irradiada com *laser* Nd:YAG, com intensa exposição dos prismas de esmalte (D).



Figura. 12 – Fotomicrografias representativas de análise em MEV. A) Área controle em aumento de 125X mostrando sinais de desmineralização intensa da superfície oclusal. B) Área experimental em aumento de 125X mostrando superfície oclusal em início de desmineralização. C) Área controle em aumento de 1000X mostrando desmineralização mais intensa do que área irradiada com *laser* Er:YAG, com exposição de prismas de esmalte e irregularidades da superfície (D).



Figura 13 – Fotomicrografias representativas de análise em MEV. A) Área controle em aumento de 125X mostrando sinais de desmineralização da superfície oclusal. B) Área experimental em aumento de 125X mostrando superfície oclusal com alteração de superfície e formação de trincas. C) Área controle em aumento de 1000X mostrando desmineralização acentuada, com exposição dos prismas de esmalte e irregularidade da superfície. D) Área irradiada com *laser* CO₂, mostrando ausência de desmineralização e formação de trincas na superfície (D).

4.2 Estudo in situ

Na análise dos dados observou-se que para a microdureza de subsuperfície houve diferença estatisticamente significante (p<0,05) entre os grupos irradiados com os *lasers* CO₂ e Nd:YAG, e o grupo controle, obtendo-se maiores valores para os grupos experimentais, e esses não diferindo entre si. O grupo irradiado com o *laser* Er:YAG, apesar de ter apresentado valores numéricos maiores que o grupo controle, não apresentou significância estatística com o mesmo (p>0,05) (Tabela 7). Em relação a profundidade observou-se diferença estatisticamente significante entre as mesmas até a distância de 50µm, a partir da qual os dados foram similares, sendo que os menores valores foram observados nas medidas mais próximas a superfície (20µm < 30µm < 40µm < 50µm~100 µm~200 µm) (Gráfico 1).

Tabela 7 – Medidas médias e desvios padrão dos dados de microdureza para cada grupo (KHN).

Grupos	Média / DP	
Controle	247±71	
Er:YAG	258±70	
Nd:YAG	272±73	
CO ₂	298±56	



Gráfico 2 – Médias dos dados de microdureza para cada profundidade em relação a cada grupo analisado (KHN).

Na análise das medidas de área de lesão foi observado que todos os grupos apresentaram semelhança estatística entre si (p<0,05) (Tabela 8).

Tabela 8 – Medidas mínimas, medianas e máximas dos dados de área de lesão para cada grupo (mm²).

Grupos	Mín.	Mediana	Máx.
Controle	0,02	0,095	1,08
Er:YAG	0,01	0,13	0,18
Nd:YAG	0,00	0,05	0,17
CO ₂	0,03	0,09	0,22

Nas fotomicrografias da microscopia de luz polarizada foi possível observar a formação de lesão de desmineralização intensa e bem delimitada que atingiu toda a área do fundo de fissura do grupo controle, mostrando uma camada superficial mais mineralizada do que o corpo da lesão (Figura 14A). No grupo irradiado com *laser* Er:YAG pode-se observar formação de lesão nas paredes laterais da fissura, mas não no fundo da mesma como no grupo controle (Figura 14B). Finalmente, nos

grupos irradiados com os *lasers* Nd:YAG e CO₂ não foram observadas lesões de desmineralização significativas (Figuras 14C e 14D).



Figura 14 - Fotomicrografias representativas da análise em MLP. A) Área controle apresentando lesão intensa, atingindo toda a área de fundo e paredes laterais da fissura. B) Área de fissura irradiada com *laser* Er:YAG apresentando lesão de desmineralização somente nas paredes laterais de entrada da fissura. C e D) Fissuras irradiadas com os lasers de Nd:YAG e CO₂ respectivamente, mostrando ausência de formação de lesão de desmineralização ao redor das mesmas.

Na análise da subsuperfície em MEV foi possível observar que o grupo controle apresentou lesão de desmineralização em toda a extensão da fissura, mostrando grande desorganização do tecido da subsuperfície do fundo da fissura (Figura 15). No grupo irradiado com *laser* Er:YAG observamos áreas de desmineralização na extensão da lesão, com algumas regiões íntegras, sendo que em maior aumento também é possível observar desorganização do tecido, caracterizando desmineralização (Figura 16).



Figura 15 - Fotomicrografias representativas da análise da subsuperfície do grupo controle em MEV. A) Lesão de desmineralização em toda a extensão da fissura. B) Desorganização do tecido na região de fundo da fissura.



Figura 16 - Fotomicrografias representativas da análise da subsuperfície do grupo irradiado com laser Er:YAG em MEV. A) Lesão de desmineralização na extensão da fissura, com algumas áreas íntegras. B) Desorganização do tecido na região de fundo da fissura.

Os grupos irradiados com os *lasers* CO₂ e Nd:YAG não apresentaram lesão na extensão das fissuras, e discreta desorganização pode ser observada em maior aumento no fundo da fissura (Figura 17 e 18).



Figura 17 - Fotomicrografias representativas da análise da subsuperfície do grupo irradiado com laser Nd:YAG em MEV.. A) Ausência de lesão de desmineralização na extensão da fissura. B) Discreta desorganização do tecido na região de fundo da fissura.



Figura 18 - Fotomicrografias representativa da análise da subsuperfície do grupo irradiado com laser CO₂ em MEV. A) Ausência de lesão de desmineralização na extensão da fissura. B) Discreta desorganização do tecido na região de fundo da fissura.

5. DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Apesar do conhecimento mais aprofundado que se tem atualmente sobre a instalação, o desenvolvimento e a progressão da doença cárie, e das medidas preventivas desenvolvidas para o seu controle, ainda hoje, é a doença bucal de maior prevalência na população jovem, sendo a superfície oclusal a mais acometida pelas lesões (DUMMER; KINGDON A; KINGDON R, 1990; KASTE et al., 1996). Este fato deve-se a morfologia irregular e profunda dos sulcos e fissuras, o que dificulta a higienização, o diagnóstico e o controle da progressão da lesão de cárie. Dessa forma, vem se buscando métodos mais eficazes de prevenção nessas superfícies.

É inegável que a utilização dos fluoretos seja o método de prevenção de maior responsabilidade no que diz respeito ao declínio da doença cárie nos últimos 20 anos. Devido ao seu método tópico de aplicação, é simples e de baixo custo, estando presente muitas vezes de forma oculta para a população em seus hábitos diários, como a ingestão da água fluoretada, medida esta considerada uma das dez mais importantes na saúde pública do século XX (LEVY, 2003). Quando o indivíduo apresenta alto risco a doença cárie, medidas de prevenção complementares como a aplicação tópica profissional de flúor, ou mesmo a recomendação de soluções para bochecho em concentrações mais elevadas são necessárias (NEWBRUN, 1999), associando-as ao controle de outros fatores envolvidos no processo da doença. No entanto, em se tratando de prevenção em superfícies oclusais, ocorre uma menor eficácia dessas soluções para essa finalidade (HOROWITZ, 1980; ELWOOD; BLINKHORN; DAVIES, 1998) devido à dificuldade de penetração do agente anticariogênico nas fissuras mais profundas, que muitas vezes estão bloqueadas por detritos impactados da cavidade bucal (BAHAR; TAGOMORI, 1994), impedindo que o fluoreto chegue a seu destino e cumpra sua função.

Buscando-se então, a resolução desta limitada eficiência do flúor nas superfícies de sulcos e fissuras, e considerando a grande susceptibilidade da região oclusal a formação de lesões de cárie, houve o desenvolvimento dos selantes de sulcos e fissuras por Cueto e Buonocore em 1967. Desde então, estudos empregando esse material têm apresentado alta efetividade em relação à prevenção de lesões de cárie nas superfícies oclusais (MJARE; MJOR, 1990; FEIGAL, 2002;

66

AHOVUO-SALORANTA et al., 2008) e sua efetividade está diretamente relacionada à retenção à superfície onde ele foi aplicado (ROMCKE et al., 1990; GRIFFIN et al., 2009). Contudo, a utilização do selante apresenta sensibilidade da técnica, uma vez que o pré-requisito para que se tenha uma eficiente retenção do mesmo, é a ausência completa de qualquer contaminação salivar (KATO et al., 2003). Esse tipo de tratamento é geralmente executado em crianças e adolescentes, os quais apresentam baixa colaboração durante a execução do procedimento, e, além disso, muitas vezes o dente em que se deseja realizar o tratamento preventivo está parcialmente irrompido e assim impossibilitado de receber o isolamento absoluto do campo operatório (KATO et al., 2003). Desta maneira a retenção do selante de sulcos e fissuras se torna uma problemática, podendo ocorrer falhas no selamento ou até mesmo a perda parcial ou total do material, levando assim a susceptibilidade de formação de lesão de cárie nessa região (ROMCKE et al., 1990; GRIFFIN et al., 2009).

Em função dos problemas encontrados com a utilização do flúor e dos selantes de sulcos e fissuras como medidas preventivas à formação de lesão de cárie nas superfícies oclusais, a irradiação a laser vem sendo estudada como medida alternativa para esse fim (MYERS; MYERS, 1985; STEWART; POWELL; WRIGHT, 1985; WALSH; PERHAM, 1991; BAHAR; TAGOMORI, 1994; BRUGNERA et al., 1997; MYAKI et al., 1998; YANG; FRIED; FEATHERSTONE, 2000; HUANG et al., 2001; MATSON et al., 2002; KATO et al., 2003; FIROOZMAND et al., 2007). Os estudos utilizam densidade de energias bastantes variáveis, assim como diferenças entre as análises realizadas. Apenas Yang et al. (2000) compararam diferentes comprimentos de onda como foi feito neste trabalho, sendo que os lasers utilizados por estes autores foram Er:YAG, Er:YSGG e CO₂ e as amostras avaliadas por microrradiografia transversa. Os melhores resultados foram obtidos para o laser Er:YSGG, sendo que os lasers Er:YAG e CO₂, mostraram 50% de inibição de lesão de cárie quando estes foram empregados, o que, resguardando as diferenças metodológicas, corrobora em parte com os achados do estudo in vitro que apresentou mais dureza do que a superfície controle nas amostras irradiadas com laser CO₂. Entretanto, na presente pesquisa não foi observada inibição de desmineralização quando foi empregado o laser Er:YAG, pois apesar de algumas semelhanças com os resultados deste estudo, Yang et al. (2000) utilizaram alta

densidade de energia (64J/cm²) o que, devido a grande interação deste comprimento de onda com a água e a hidroxiapatita, causou ablação do tecido dental, diferentemente do proposto pelo presente estudo que empregou baixa densidade de energia (2,25J/cm²).

Um fator importante considerado neste estudo foram os parâmetros empregados pelos diferentes tipos de lasers, em que se objetivou utilizar a irradiação do laser sem promover ablação do tecido dental. A utilização de energias subablativas por todos os lasers empregados se baseou em estudos prévios (LIU et al, 2006; CECHINNI et al., 2005; CHIANG et al., 2008; PALMA-DIBB et al., 2009) que mostraram alterações químicas e estruturais desfavoráveis ao aumento de resistência ácida do esmalte quando altas densidades de energia foram utilizadas. Cecchini et al. (2005) observaram em microscopia eletrônica de varredura que altas densidades energias empregadas pelo laser Er:YAG promoveram grande modificação na estrutura do esmalte, proporcionando um padrão de irradiação não homogêneo, formação de crateras e trincas profundas, além de uma grande exposição de prismas de esmalte, o que contribuiu para a perda mineral quando a superfície foi exposta ao desafio ácido. Além disso, foi também demonstrado (CECHINNI et al., 2005; PALMA-DIBB et al., 2009) gue o laser Er:YAG utilizado em modo focado, mesmo empregando baixas energias, pode causar ablação do tecido dental, que embora em menor quantidade do que aquela observada quando altas densidades de energia são utilizadas, promove exposição dos prismas de esmalte podendo levar ao aumento da solubilidade do tecido. Devido a esses fatores, no presente estudo o laser Er:YAG foi utilizado com uma densidade de energia baixa e em modo não focado, a uma distância de 4mm da superfície alvo (PALMA-DIBB et al., 2009).

Altas densidades de energia também foram utilizadas por pesquisadores que visaram em seus estudos alterarem morfologicamente a superfície de sulcos e fissuras com a irradiação a *laser*, promovendo assim a fusão do esmalte seguida de recristalização do mesmo, na tentativa de fazer um selamento dessas superfícies (STEWART; POWELL; WRIGHT, 1985; WALSH; PERHAM, 1991; BRUGNERA et al., 1997; MYAKI et al., 1998; MATSON et al., 2002; FIROOZMAND et al., 2007). No entanto, as áreas de fusão provocadas pela irradiação a *laser* não são homogêneas

(CECHINNI et al., 2005), e, Miaki et al.(1998), observaram em seu estudo que fissuras estreitas e profundas não tiveram um selamento efetivo.

Além disso, Fowler e Kuroda (1986) verificaram alterações do esmalte quando submetidos a aumento de temperatura em faixas específicas, ocorrendo modificações químicas na estrutura que alteraram sua solubilidade. Dentre as faixas de temperaturas estudadas por esses autores foi verificado que quando o esmalte foi aquecido a uma temperatura entre 100-650°C houve uma diminuição na quantidade de água e carbonato do tecido e os íons ácidos se condensaram formando o pirofosfato, resultando assim, em uma estrutura mais resistente em relação à dissolução ácida. Entretanto, quando foi atingida uma temperatura entre 650°C - 1.100°C ocorreu recristalização térmica e crescimento dos cristais, além da reação do pirofosfato com a apatita para a formação do tetra cálcio fosfato $(Ca_4(PO_4)_2O)$, juntamente com o β -tricálcio fosfato $(\beta - Ca_3(PO_4)_2)$, e acima de 1.100°C ocorreu a conversão do β-tricálcio fosfato em α-tricálcio fosfato (α- $Ca_3(PO_4)_2$), sendo que os produtos resultantes desse aumento de temperatura são extremamente solúveis em meio ácido (FOWLER; KURODA, 1986; APFELBAUM; MAYER; FEATHERSTONE, 1990; MEURMAN; VOEGEL; RAUHAMAA-MÄKINEM 1992). Para haver fusão do esmalte dental é necessário que a temperatura atingida seja maior que 1.000°C (FEATHERSTONE; FRIED, 2001) e, dessa maneira, pode ocorrer a formação de grande quantidade de α -Ca₃(PO₄)₂ e Ca₄(PO₄)₂O nas regiões de esmalte fundido e recristalizado, caracterizando assim uma superfície de maior solubilidade ácida (FOWLER; KURODA 1986). Assim, apesar dos pesquisadores que buscaram o selamento das superfícies de sulcos e fissuras obterem alteração benéfica em relação à morfologia da superfície quando o selamento foi promovido, do ponto de vista da estrutura do esmalte, um aumento da resistência ácida da superfície não foi obtido e, além disso, pode ter havido uma diminuição da resistência ácida inicial.

Sabe-se também que a interação da luz *laser* com o esmalte dental consiste principalmente em reflexão, dispersão, absorção e transmissão, e que a energia absorvida é transformada em calor e transferida aos tecidos adjacentes e subjacentes (CHIANG et al., 2007). Porém, parâmetros inapropriados utilizados na irradiação podem ocasionar danos a junção amelodentinária resultando inclusive em separação dos tecidos de esmalte e dentina além de danificar as próprias estruturas dos dois tecidos (Chiang et al. 2007). Alguns tipos de *lasers*, como por exemplo, Nd:YLF (1,054nm) e Nd:YAG (1,064nm) podem apresentar um processo de interação com a estrutura dental diferente, uma vez que não correspondem a zona de absorção dos componentes do esmalte, no entanto resultados similares foram encontrados para estes lasers empregando altas densidades de energia (SEKA et al., 1995).

Dessa forma, estudos utilizando baixas densidades de energia, com intuito de promoverem alterações ultra estruturais e químicas que auxiliem na prevenção das lesões de cárie, vêm sendo realizados (BAHAR; TAGOMORI, 1994; HUANG et al, 2001; CASTELLAN et al., 2007; FIROOZMAND 2007), sendo que apenas Bahar e Tagomori (1994) avaliaram o efeito de energias subablativas em superfícies de sulcos e fissuras. Essa escassez de trabalhos com laser em superfície oclusal se dá pela grande dificuldade encontrada pelos pesquisadores para a padronização desses experimentos em relação ao tipo de superfície, devido a intensa variabilidade na morfologia das sulcos e fissuras. Diante disso, o presente trabalho procurou desenvolver uma metodologia que pudesse diminuir essa variabilidade. principalmente no que diz respeito à profundidade e forma das fissuras. Para isso no estudo in vitro selecionaram-se dentes com morfologia oclusal semelhantes utilizando-se sempre o sulco principal dessa superfície, e, além disso, uma porção controle e outra experimental foram determinadas no mesmo fragmento. Essa metodologia colaborou também para a diminuição nos vieses dos dados de microdureza do esmalte, pois estudos (PHILLIPS; SWARTZ, 1948; CIRANO; ROMITO; TODESCAN, 2003) mostram que o dente humano apresenta grande variabilidade de comportamento nesses testes, e no caso da análise das fissuras não é possível realizar medidas de baseline para a seleção dos fragmentos a serem analisados, em função da irregularidade superficial. Dessa maneira optou-se pela comparação interna do tratamento experimental com o seu respectivo controle, eliminando assim essa variabilidade do tipo de substrato utilizado.

Nos resultados obtidos pela análise em microscopia de luz polarizada do estudo *in vitro* foi possível observar que o tempo de 14 dias empregado para a formação de lesão de cárie artificial através de ciclagens de pH, o qual faz parte de

uma metodologia já consagrada na literatura (FEATHERSTONE et al., 1986; SERRA; CURY, 1992; FEATHERSTONE et al., 1998; ARGENTA; TABCHOURY; CURY, 2003; CASTELLAN et al., 2007; BEVILACQUA et al., 2007; FREITAS et al., 2008; PERITO et al., 2009; CHEN; HUANG, 200), não foi suficiente para a formação de lesão significativa em nenhum dos grupos controles avaliados. Este fato provavelmente influenciou nos resultados da microdureza, promovendo similaridade entre todas as distâncias da superfície em que o teste foi realizado, e não sendo possível detectar efetividade do *laser* Nd:YAG para o aumento de resistência ácida, o qual obteve resultado satisfatório nas análises do tamanho das áreas das lesões de desmineralização. Esta inadequação da metodologia se deve principalmente a morfologia estreita e profunda das fissuras, o que pode ter retardado esse tipo de processo de desmineralização, e sugere que o tempo de desafio ácido através das ciclagens de pH deva ser revisto para a utilização em superfícies de sulcos e fissuras.

No estudo *in situ* as lesões observadas no grupo controle foram mais amplas e intensas, mostrando uma camada superficial parcialmente intacta, característica de uma área mais porosa, mas rica em minerais, e a subsuperfície danificada pelo processo de desmineralização via ácido do biofilme dental, caracterizando o corpo da lesão (AREND; CHRISTOFFERSEN, 1986), o que não foi observado tão nitidamente nas lesões formadas no estudo *in vitro*, uma vez que essa camada superficial não aparece em lesões iniciais, sendo formada durante a progressão da lesão e sob a presença de flúor na cavidade bucal (AREND; CHRISTOFFERSEN, 1986).

Dessa maneira, a formação de cárie artificial obtida pela metodologia *in situ* promoveu uma área controle mais expressiva, permitindo uma maior diferenciação da efetividade das medidas experimentais avaliadas, mostrando diferenças para os grupos irradiados com os *lasers* CO₂ e Nd:YAG em relação ao grupo controle no teste de microdureza. No entanto nas medidas de área da lesão foram observados resultados similares para todos os grupos, o que pode ter acontecido em função do grande desafio cariogênico e da variabilidade do substrato. Foi também possível observar diferenças nas densidades minerais nas diferentes distâncias das

71
superfícies avaliadas, até a distância de 50µm, a partir da qual não houve mais diferença, o que deve ser resultado da profundidade atingida pela desmineralização.

Esses resultados positivos obtidos para os lasers CO2 e Nd:YAG têm justificativas baseadas em alterações químicas e ultra estruturais do esmalte dental corroboram com estudos prévios realizados em superfícies lisas е (FEATHERSTONE et al, 1998; HSU et al, 2000; HOSSAIN et al, 2000; DELBEN et al, 2003; LIU et al, 2006; CASTELLAN, 2007; ZEZZEL et al, 2009). O laser CO2 apresenta comprimento de onda compatível com o pico de absorção da hidroxiapatita carbonatada, que corresponde a maior parte da estrutura do esmalte (95%) (LEGEROS, 1981), e assim sua energia é fortemente absorvidas pelo esmalte dental promovendo alterações guímicas (DELBEM et al., 2003; FOWLER; KURODA, 1986; BAHAR; TAGOMORI, 1994) e ultra estruturais (RODRIGUES et al, 2004) podendo serem capazes de diminuir a solubilidade do esmalte. No entanto, o laser Nd:YAG não apresenta comprimento de onda próximo a nenhuma banda de absorção dos componentes dos tecidos dentais, e ainda assim apresentou resultado favorável a inibição de cárie em sulcos e fissuras tanto no estudo in vitro quanto no in situ o que se deve, provavelmente, ao modo de ação deste laser, que diferentemente dos outros lasers empregados neste estudo, foi utilizado em modo de contato com a estrutura dental através de uma fibra de guartzo. Provavelmente esse contato com a superfície dental causou um aquecimento na superfície irradiada provocando uma alteração na superfície do esmalte, o que, resguardando variáveis metodológicas, está em concordância com outros estudos realizados com este mesmo laser empregando baixas energias (BAHAR; TAGOMORI, 1994; HUANG et al, 2001; CASTELLAN et al., 2007; FIROOZMAND 2007). No entanto, guando este laser foi utilizado em fissuras estreitas e profundas foi observada inibição da lesão de desmineralização apenas nas paredes de entrada da fissura, uma vez que não foi possível o contato da fibra de quartzo com o fundo da fissura (Figura 19), diferentemente do laser CO₂, que tem sua interação com feixe de luz e este possivelmente atingiu o fundo das fissuras mesmo quando estas eram estreitas e profundas.



Figura 19 – A)Fissura estreita e profunda irradiada por *laser* Nd:YAG. B) Fundo de fissura apresentando desorganização do tecido característica de desmineralização.

Dessa forma, acredita-se que, considerando as energias utilizadas por esse estudo, as prováveis causas dos resultados obtidos estão relacionadas à diminuição na quantidade de água e carbonato do tecido e condensação dos os íons ácidos, o que resultaria em uma estrutura mais resistente à dissolução ácida (Fowler e Kuroda 1986). Uma justificativa complementar aos resultados encontrados seria a interação da irradiação *laser* com a porção orgânica do esmalte (KORYTNICKI et al, 2006; CASTELLAN et al.,2007, MAUNG; WOHLAND; HSU, 2007), pois o desenvolvimento de lesões de cárie envolve, além da solubilidade da porção mineral, uma difusão de íons através dos espaços intra e inter prismáticos (FEJERSKOV; THYLSTRUP, 1986; FEATHERSTONE, 2000), e acredita-se que quando a irradiação é efetuada a temperatura necessária para a decomposição da matriz orgânica é atingida (~400°C) (RODRIGUES et al, 2004) e assim os canais de difusão do esmalte são ocupados por uma rede macromolecular de material orgânico, que pode então desempenhar um importante papel no controle de difusão de íons no esmalte dental, diminuindo sua permeabilidade (YING; CHUAH; HSU, 2004; MAUNG, 2007).

O laser Er:YAG, apesar de vir apresentando resultados promissores para o aumento de resistência ácida do esmalte em superfícies lisas (HOSSAIN et al., 2000; CASTELLAN et al, 2007; PALMA-DIBB et al., 2009), não apresentou resultados favoráveis no presente estudo. Acredita-se que isto se deva a utilização de refrigeração durante a irradiação (HOSSAIN et al, 2000; PALMA-DIBB et al, 2009), a qual causou um provável acúmulo de água no fundo das fissuras, não

permitindo que a temperatura necessária para as alterações químicas e estruturais da superfície fossem atingida. O comprimento de onda do *laser* Er:YAG coincide com o pico de absorção da água, ocorrendo grande interação entre a água e o mesmo. Por isso, para que se tenha uma interação efetiva com o tecido tanto para um efeito de prevenção de cárie, quanto para ablação do tecido, e não sejam causados danos aos tecidos adjacentes e subjacentes é necessário que haja uma quantidade ideal de água durante a irradiação (COLUCCI et al; 2008).

A similaridade encontrada entre os resultados obtidos no estudo *in vitro* e no estudo *in situ* sugere que outros estudos devam ser realizados a fim de melhor determinar parâmetros de irradiação para aumento de resistência ácida em superfícies de sulcos e fissuras, e dessa forma estudo clínicos longitudinais possam ser realizados para a sua efetiva comprovação. Fica evidente também que a efetividade do método depende também do controle dos outros fatores relacionados a doença cárie.

6. CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

Diante das limitações destes estudos pode-se concluir que:

- O *laser* CO₂ foi o que apresentou melhores resultados, sendo capaz de atingir a superfície das fissuras e assim proporcionar o aumento da resistência ácida do esmalte nessa região;
- O *laser* Nd:YAG foi capaz de promover o aumento de resistência ácida do esmalte, resguardando as fissuras muito estreitas e profundas, nas quais somente as paredes laterais de entrada da fissura foram beneficiadas com o tratamento;
- O *laser* Er:YAG, nos parâmetros utilizados, não foi capaz de promover o aumento de resistência ácida do esmalte nas superfícies de sulcos e fissuras.

REFERÊNCIAS¹

- 1. AHOVUO-SALORANTA, A.; HIIRI, A.; NORDBLAD, A.; MAKELA, M.; WORTHINGTON, H.V. Pits and fissures sealants for preventing dental decayin the permanent teethof children and adolescents. **Cochrane Database Systematic Review**, v.4, CD001830, 2008.
- APEL, C.; MEISTER, J.; GÖTZ, H.; DUSCHNER, H.; GUTKNECHT, N. Structural changes in human dental enamel after subablative erbium laser irradiation and its potential use for caries prevention. **Caries Research**, v.39, n.1, p.65-70, 2005.
- 3. APFELBAUM, F.; MAYER, I.; FEATHERSTONE, J.B.D. The role of HPO₄²⁻ and CO₃²⁻ ions in the transformation of synthetic apatites to β-Ca₅(PO₄)₂₋. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v.38, p.1-8, 1990.
- 4. ARENDS, J.; SCHUTHOF, J.; JONGEBLOED, W. lesion depth and microhardness indentations on artificial white spot lesions. **Caries Research**, v.14, n.4, p.190-195, 1980.
- 5. ARENDS, J.; TEN BOSCH, J.J. Demineralization and remineralization evaluation techniques. **Journal of Dental Research**, v.71, Spec No, p.924-928, 1992.
- ARGENTA, R.M.; TABCHOURY, C.P.; CURY, J.A. A modified pH-cycling model to evaluate fluoride effect on enamel demineralization. Pesquisa Odontológica Brasileira, v.17, n.3, p.241-246, 2003.
- 7. BAHAR, A.; TAGOMORI, S. The effect of normal pulsed Nd-YAG laser irradiation on pits and fissures in human teeth. **Caries Research**, v.28, p.460-467, 1994.
- BEVILÁCQUA, F.M.; ZEZELL, D.M.; MAGNANI, R.; DA ANA, P.A.; EDUARDO, C. DE P. Fluoride uptake and acid resistance of enamel irradiated with Er:YAG laser. Lasers in Medical Science, v.23, n.2, p.141-147, 2008.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas NBR 6023

- 9. BOTTENBERG, P.; CLEYMAET, R.; RÖHRKASTEN, K.; LAMPERT, F. Microhardness changes in surface enamel after application of bioadhesive fluoride tablets in situ. **Clinical Oral Investigations**, v.4, n.3, p.153-156, 2000.
- BRUGNERA JÚNIOR, A.; ROSSO, N.; DUARTE, D.; PINTO, A.C.; GENOVESE, W. The use of carbon dioxide laser in pit and fissure caries prevention: clinical evaluation. Journal of Clinical Laser Medicine and Surgery, v.15, n.2, p.79-82, 1997.
- CAN, A.M.; DARLING, C.L.; HO, C.; FRIED, D. Non-destructive assessment of inhibition of demineralization in dental enamel irradiated by a lambda=9.3-microm CO2 laser at ablative irradiation intensities with PS-OCT. Lasers in Surgery and Medicine, v.40, n.5, p.342-349,2008.
- CASTELLAN, C.S.; LUIZ, A.C.; BEZINELLI, L.M.; LOPES, R.M.; MENDES, F.M.; EDUARDO, C.P.; DE FREITAS, P.M. In vitro evaluation of enamel demineralization after Er:YAG and Nd:YAG laser irradiation on primary teeth. Photomedicine and Laser and Surgery, v.25, n.2, p.85-90, 2007.
- CCAHUANA-VÁSQUEZ, R.A.; TABCHOURY, C.P.; TENUTA, L.M.; DEL BEL CURY, A.A.; VALE, G.C.; CURY, J.A. Effect of frequency of sucrose exposure on dental biofilm composition and enamel demineralization in the presence of fluoride. **Caries Research**, v.41, n.1, p.9-15, 2007.
- CECCHINI, R.C.M.; ZEZEL, D.M.; OLIVEIRA, E.; FREITAS, P.M.; EDUARDO, C.P. Effect of Er:YAG laser on enamel acid resistance: morphological and atomicspectrometry analysis. Laser in Surgery and Medicine, v.37, p.366-372, 2005.
- 15. CHEN, C.C.; HUANG, S.T. The effects of lasers and fluoride on the acid resistance of decalcified human enamel. **Photomedicine and Laser and Surgery**, v.27, n.3, p.447-452, 2009.
- CHIANG, Y.C.; LEE, B.S.; WANG, Y.L.; CHENG, Y.A.; CHEN, Y.L.; SHIAU, J.S.; WANG, D.M.; LIN, C.P. Microstructural changes of enamel, dentin-enamel junction, and dentin induced by irradiating outer enamel surfaces with CO2 laser. Lasers in Medical Science, v.23, n.1, p.41-48, 2008.
- CHIMELLO, D.T.; SERRA, M.C.; RODRIGUES, A.L.J.R.; PÉCORA, J.D.; CORONA, S.A. Influence of cavity preparation with Er:YAG laser on enamel adjacent to restorations submitted to cariogenic challenge in situ: a polarized light microscopic analysis. Lasers in Surgery and Medicine, v.40, n.9,p.634-643, 2008.

- CHIMELLO, D.T.; SERRA, M.C.; RODRIGUES-JÚNIOR, A.L.; PÉCORA, J.D.; CORONA, S.A. Influence of Er:YAG laser on microhardness of enamel adjacent to restorations submitted to cariogenic challenge in situ. Photomedicine and Laser and Surgery,v.26, n.4, p.379-385, 2008.
- 19. CIRANO, F.R.; ROMITO, G.A.; TODESCAN, J.H. Determination of enamel and coronal dentin microhardness. **Brazilian Journal of Oral Science**, v.2, n.6, 2003.
- COLUCCI, V.; DO AMARAL, F.L.; PÉCORA, J.D.; PALMA-DIBB, R.G., CORONA, S.A. Water flow on erbium:yttrium-aluminum-garnet laser irradiation: effects on dental tissues. Lasers in Medical Science, v.24, n.5, p.811-818, 2009.
- 21. CUETO, E.; BUONOCORE, M.G. Sealing of pits and fissures with an adhesive resin: its use in caries prevention. **Journal of the American Dental Association**, v.75, p.121-128, 1967.
- 22. CURY, J.A.; SIMÕES, G.S.; DEL BEL CURY, A.A.; GONÇALVES, N.C.; TABCHOURY, C.P. Effect of a calcium carbonate-based dentifrice on in situ enamel remineralization. **Caries Research**, v.39, n.3, p.255-257, 2005.
- 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. Journal Clinical Laser Medical and Surgery, v.18, p139-143, 2000.
- DE FREITAS, P.M.; RAPOZO-HILO, M.; EDUARDO, C.P.; FEATHERSTONE, J.BD. In vitro evaluation of erbium, chromium:yttrium-scandium-gallium-garnet laser-treated enamel demineralization. Lasers in Medical Science, v.12, 2008, Epub ahead of print.
- DELBEM, A.C.; CURY, J.A.; NAKASSIMA, C.K.; GOUVEIA, V.G.; THEODORO, L.H. Effect of Er:YAG laser on CAF₂ formation and its anticariogenic action on human enamel. An in vitro study. Journal Clinical Laser Medical and Surgery, v.21, p.197-201, 2003.
- DUMMER, P.M., KINGDON, A.; KINGDON, R. Prevalence and distribution by tooth type and surface of developmental defects of dental enamel in a group of 15- to16-year-old children in South Wales. **Community Dental Health**, v.7,n.4, p.369-377, dec.1990.

- 27. ELLWOOD, R.P.; BLINKHORN, A.S.; DAVIES, R.M. Fluoride: how to maximize the benefits and minimize the risks. **Dental Update**, v.25, n.9, p.365-372, nov-1998.
- ESTEVES-OLIVEIRA, M.; ZEZELL, D.M.; MEISTER, J.; FRANZEN, R.; STANZEL, S.; LAMPERT, F.; EDUARDO, C.P.; APEL, C. CO2 Laser (10.6 microm) parameters for caries prevention in dental enamel. Caries Research, v.43, n.4, p.261-268, 2009.
- 29. FEIGAL, R.J. Sealants and preventive restorations: review of effectiveness and clinical changes for improvement. **Pediatric Dentistry**, v.20, n.2, p.85-92, 1998.
- 30. FEIGAL, R.J. The use of pits and fissures sealants. **Pediatric Dentistry**, v.24, p.415-422, 2002.
- 31. FEJERSKOV, O.; THYLSTRUP, A. Dental enamel, in: **Human Oral Embryology I.** Mjor and O. Fejerskov (eds.) Copenhagen: Blackwell Munksgaard, p.50-89
- 32. FEATHERSTONE, J.D.; TEN CATE, J.M.; SHARIATI, M.; ARENDS, J. Comparison of artificial caries-like lesions by quantitative microradiography and microhardness profiles. Caries Research, v.17, n.5, p.385-391, 1983.
- 33. FEATHERSTONE, J.D.B; O'REILLY, M.M.; SHARIATI, M.; et al: Enhancedment of remineralization in vitro and in vivo, in leach SA (ed): Factors relating to **Demineralization and Remineralization of the Teeth.** Oxford, IRL Press, pp.23-24, 1986.
- 34. FEATHERSTONE, J.D.B.; NELSON, D.G. Laser effects on dental hard tissues. Advances in Dental Research, v.1,n.1, p.21-26, 1987.
- FEATHERSTONE, J.D.B.; BARRETT-VESPONE, N.A.; FRIED, D.; KANTOROWITZ, Z.; SEKA W. CO2 laser inhibitor of artificial caries-like lesion progression in dental enamel. Journal Dental Research, v.77, n.61, p.1397-13403,1998.
- 36. FEATHERSTONE, J.D.B. The science and practice of caries prevention. **The Journal of American Dental Association**, v.131, p.887-899.

- 37. FEATHERSTONE, J.D.B.; FRIED, D. Fundamental interactions of lasers with dental hard tissues. **Medical** *Laser* **Applications**, v.16, n.3, p.181-194, 2001.
- FIROOZMAND, L.M.; SILVA, A.P.; PELINO, J.E.P.; ARAUJO, R.M. Efeito do laser Nd:YAG no selamento de fóssulas e fissuras – estudo in vivo. Revista Odonto Ciência – Faculdade de Odontologia PUCRS, v.22, n.55, 2007.
- 39. FOWLER, B.O.; KURODA, S. Changes in heated and in lased irradiated human tooth enamel and their probable effects on solubility. **Calcified Tissue International**, v.38, p.197-208, 1986.
- 40. GAMEIRO, G.H.; NOUER, D.F.; CENCI, M.S.; CURY, J.A. Enamel demineralization with two forms of archwire ligation investigated using an in situ caries model--a pilot study. **European Journal Orthodontics**, v.31, n.5, p.542-546, 2009.
- GOLDMAN, H.M.; RUBEN, M.P.; SHERMAN, D. The application of laser spectroscopy for the qualitative and quantitative analyses of the inorganic components of calcified tissues. Oral Surgery Oral Medicine and Oral Pathology, v.17, p.102-103, 1964.
- GOUW-SOARES, S.; GUTKNECHT, N.; CONRADS, G.; LAMPERT, F.; MATSON, E.; EDUARDO, C.P. The bactericidal effect of Ho:YAG laser irradiation within contaminated root dentinal samples. Journal Clinical Laser Medical and Surgery, v.18, p.81-87, 2000.
- 43. HARA, A.T.; QUEIROZ, C.S.; PAES LEME, A.F.; SERRA, M.C.; CURY, J.A. Caries progression and inhibition in human and bovine root dentine in situ. **Caries Research**, v.37, n.5, p.339-344, 2003.
- 44. HARA, A.T.; QUEIROZ, C.S.; FREITAS, P.M.; GIANNINI, M.; SERRA, M.C.; CURY, J.A. Fluoride release and secondary caries inhibition by adhesive systems on root dentine. European Journal of Oral Science, v.113, n.3, p.245-250, 2005.
- 45. HICKS, M.J.; SILVERSTONE, L.M. Acid-etching of caries-like lesions of enamel: a polarized light microscopic study. **Caries Research**, v.18, n.4, p.315-326, 1984.
- 46. HOLMEN, L.; THYLSTRUP, A.; OGAARD, B.; KRAGH, F. A polarized light microscopic study of progressive stages of enamel caries in vivo. **Caries Research**, v.19, n.4, p.348-354, 1985.

- 47. HOROWITZ, H.S. Established methods of prevention. **British Dental Journal**, v.149, p.311-318.
- 48. HOSSAIN, M.; NAKAMURA, Y.; KIMURA, Y.; MITSUHIRO I.; YAMADA, Y.; MATSUMOTO, K. Acquired acid resistance of dental hard tissues by Co₂ laser irradiation. Journal Clinical Laser Medical and Surgery, v.17, p.223-226, 1999.
- 49. HOSSAIN, M.; NAKAMURA, Y.; YAMADA, Y.; ITO, M.; MATSUMOTO, K. Caries –preventive effect of Er:YAG laser irradiation with or without water mist. **Journal Clinical Laser Medical and Surgery**, v.18, p.61-65, 2000.
- 50. 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*. **Journal of the Formosan Medical Association**, v.100, n.3, p.181-185, 2001.
- 51. HSU, C.Y.; 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. **Journal of Dental Research**, v.79, n.9, p.1725-1730, 2000.
- 52. HSU, D.J.; DARLING, C.L.; LACHICA, M.M.; FRIED, D. Nondestructive assessment of the inhibition of enamel demineralization by CO2 laser treatment using polarization sensitive optical coherence tomography. **Journal of Biomedical Optics**, v.13, n.5, p.054027, 2008.
- 53. KANTOROWITZ, Z.; FEATHERSTONE, J.D.B.; FRIED, D. Caries prevention by CO₂ laser treatment: dependency on the number of pulses used. **The Journal of the American Dental Association**, v.129, p.585-591, 1998.
- KASTE, L.M.; SELWITZ, R.H.; OLDAKOWSKI, R.J.; BRUNELLE, J.A.; WINN, D.M.; BROWN, L.J. Coronal caries in the primary and permanent dentition of children and adolescents 1-17 years of age: United States, 1988-1991. Journal Dental Research, v.75, p. 631-641, Feb1996, Spec No.
- KATO, J.; MORIYA, K.; JAYAWARDENA, J.A.; WIJEYEWEERA, R.L.; AWAZU, K. Prevention of dental caries in partially erupted permanent teeth with a CO2 laser. Journal of Clinical Laser Medicine and Surgery, v.21, n.6, p.369-374, 2003.

- 56. KIELBASSA AM, WRBAS KT, SCHULTE-MÖNTING J, HELLWIG E. Correlation of transversal microradiography and microhardness on in situ-induced demineralization in irradiated and nonirradiated human dental enamel. Archives of Oral Biology, v.44, n.3, p.243-251, 1999.
- 57. KOO, R.H.; CURY, J.A. Soluble calcium/SMFP dentifrice: effect on enamel fluoride uptake and remineralization. **American Journal of Dentistry**, v.11, n.4, p.173-176, 1998.
- 58. KOULOURIDES, T.; VOLKER, J.F. Changes of enamel microhardness in the human mouth. **Alabama Journal of Medical Science**, v.1, p.435-437, 1964.
- KOULORIDES, T.; HOUSCH, T. Hardness testing and micrography of enamel in relation to intraoral des and remineralization. In: Leach, S.A.; Edgar, W.M.
 Demineralization and Remineralization of the teeth, Oxford, IRL Press, p.255-272, 1983.
- KORYTNICKI, D.; MAYER, M.P.; DARONCH, M.; SINGER, J.D.A.M.; GRANDE, R.H. Effects of Nd:YAG laser on enamel microhardness and dental plaque composition: an in situ study. **Photomedicine and Laser and Surgery**, v.24, n.1, p.59-63, 2006.
- 61. LEGEROS, R.Z. Chemical and crystallographic events in the caries process. **Journal of Dental Research**, v.69, Spec No, p.567-574, 1990.
- 62. LEVY, S.M. An update of flurides and fluorosis. **Journal of the Canadian Dental Association**, v.69, n.5,p.286-291.
- LIMA, F.G.; ROMANO, A.R.; CORREA, M.B.; DEMARCO, F.F. Influence of microleakage, surface roughness and biofilm control on secondary caries formation around composite resin restorations: an in situ evaluation. Journal of Applied Oral Science, v.17, n.1, p.61-65, 2009.
- 64. LIU, J.; LIU, Y.; STEPHEN, H.Y.C. Optimal Er:YAG laser energy for preventing enamel demineralization. **Journal of Dentistry**, v.34, p.62-66, 2006.
- 65. LUSSI, A.; HIBST, R.; PAULUS, R. DIAGNOdent: an optical method for caries detection. **Journal of Dental Research**, v.83, Spec No C, p.80-83, 2004.
- 66. MARSH, P.D. The role of microbiology in models of dental caries. **Advances in Dental Research**, v.9, n.3, p.244-254, 1995.

- MATSON, J.R.; MATSON, E.; NAVARRO, R.S.; BOCANGEL, J.S.; JAEGER R.G.; EDUARDO, C.P. Er:YAG laser effects on enamel occlusal fissures: an in vitro study. Journal of Clinical Laser Medicine and Surgery, v.20, n.1, p.27-35, 2002.
- 68. MENDES, F.M.; NICOLAU, J.; DUARTE, D.A. Evaluation of the effectiveness of laser fluorescence in monitoring in vitro remineralization of incipient caries lesions in primary teeth. **Caries Research**, v.37, n.6, p.442-444, 2003.
- 69. MEURMAN, J.H.; VOEGEL, J.C.; RAUHAMAA-MÄKINEM, R. et al. Effects of carbon dioxide, Nd:YAG and carbon dioxide Nd:YAG combination lasers at high energy densities on synthetic hydroxiapatite. **Caries Research**, v.26, p.77-83, 1992.
- MEJARE, I.; MJÖR, I.A. Glass ionomer and resin-based fissure sealants: a clinical study. Scandinavian Journal of Dental Research, v.98, p.345-350, 1990.
- 71. MYAKI, S.I.; WATANABE, I.S.; EDUARDO, C.DE P.; ISSÁO, M. Nd:YAG laser effects on the occlusal surface of premolars. **American Journal of Dentistry**, v.11, n.3, p.103-105, 1998.
- 72. MYERS, T.D.; MYERS, W.D. The use of a laser for debridement of incipient caries. **Journal of Prosthetic Dentistry**, v.53, n.6, p.776-779, 1985.
- 73. PALMA-DIBB, R.G.; CORRÊA-AFONSO, A.M.; CICCONE-NOGUEIRA, J.C.; PÉCORA, J.D. Influence of Er:YAG laser irradiation distance and refrigeration on enamel demineralization. **Proceedings of IADR**, n.1155, 2009.
- 74. PATEL, C.K.N.; MCFARLANE, R.A.; FAUST, W.L. Selective excitation trhough vibrational energy transfer and optical maser action in N₂-CO₂. Physiological Rewiews, v.13, p.617-619, 1964.
- 75. PERITO, M.A.; JORGE, A.C.; DE FREITAS, P.M.; CASSONI, A.; RODRIGUES, J.A. Cavity Preparation and Influence of Restorative Materials on the Prevention of Secondary Caries. Photomedicine and Laser and Surgery, v.27, 2009, Epub ahead of print.
- 76. Phillips RW, Swartz ML. Effect of fluorides on hardness of tooth enamel. **Journal** of American Dental Association, v.37, p.1-13, 1948.

- 77. RECHMANN, P.; FRIED, D.; LE, C.Q.; NELSON, G.; RAPOZO-HILO, M.L.; RECHMANN, B.M.T.; FEATHERSTONE, J.D.B. Inhibition of caries in vital teeth by CO₂-laser treatment. **Proceedings of IADR**, n.1596, 2008.
- 78. RODRIGUES, L.K.; NOBRE DOS SANTOS, M.; PEREIRA, D.; ASSAF, A.V.; PARDI, V. Carbon dioxide laser in dental caries prevention. Journal of Dentistry, v.32, n.7, p.531-40, 2007.
- 79. ROMCKE, R.G.; LEWIS, D.W.; MAZE, B.D.; VICKERSON, R.A. Retention and maintenance of fissure sealants over 10 years. Journal of Canadian Dental Association, v,56, p.235-237, 1990.
- 80. SEKA, W.; FRIED, D.; FEATHERSTONE, J.D.B.; BORZILLARY, S.F. Light deposition in dental hard tissue and simulated thermal response. **Journal of Dental Research**, v.74, p.1086–1092, 1995.
- 81. SERRA, M.C.; CURY, J.A. The in vitro effect of glass-ionomer cement restoration on enamel subjected to a demineralization and remineralization model. **Quintessence International**, v.23, p.143-147, 1992.
- 82. STERN, R.H.; SOGNNAES, F. Laser beam effect on dental hard tissues. **Journal Dental Research**, v.43, p.573, 1964.
- 83. STEWART, L.; POWELL, G.L.; WRIGHT, S. Hydroxyapatite attached by laser: a potential sealant for pits and fissures. **Operative Dentistry**, v.10, n.1, p.2-5, 1985.
- 84. TEN CATE, J.M.; DJUISTERS, P.P.E. Alternating demineralization e remineralization of artificial enamel lesions. **Caries Research**, v.16, p.201-210, 1982.
- VAN MEERBEECK, B.; VARGAS, M.; INOUE, S.; YOSHIDA, Y.; PERDIGÃO, J.; LAMBRECHTS, P.; VANHERLE, G. Microscopy investigations. Techniques, results, limitations American Journal of Dentistry, v.13, Special Issue D, p.3D-18D, 2000.
- WALSH, L.J.; PERHAM, S.J. Enamel fusion using a carbon dioxide laser: a technique for sealing pits and fissures. Clinical Preventive Dentistry, v.13.n.3, p.16-20, 1991.

- 87. WEFEL, J.S.; HARLESS, J.D. Comparison of artificial white spots by microradiography and polarized light microscopy. **Journal of Dental Research**, v.63, n.11, p.1271-1275, 1984.
- 88. YING, D.; CHUAH, G.K.; HSU, C.Y. Effect of Er:YAG laser and organic matrix on porosity changes in human enamel. Journal of Dentistry, v.32, n.1, p.41-46, 2004.
- 89. YOUNG, D.A.; FRIED, D.; FEATHERSTONE, J.D.B. Treating oclusal pit and fissure surfaces by IR laser irradiation. **Proceedings of SPIE**, v.3910, p.247, 2000.
- 90. ZERO, D.T. In situ caries models. Advances in Dental Research, v.9, n.3, p.214-230, 1995.
- 91. ZEZELL, D.M.; BOARI, H.G.; ANA, P.A.; EDUARDO, C.P.; POWELL, G.L. Nd:YAG laser in caries prevention: a clinical trial. Lasers in Surgery and Medicine, v.41, n.1, p.31-35, 2009.

ANEXOS

ANEXO A – APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA Avenida do Café, s/n° - Telefone: (016) 3602-3963 14040-904 - Ribeirão Preto - SP - Brasil Fax: (016) 3633-0999

OF.CEP/424/FORP/29112006

Prezado(a) Senhor(a),

Ref.: Processo n. 2006.1.1238.58.0 Caae n. 0065.0.138.000-06

De ordem da Senhora Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa desta Faculdade, informamos que o referido Comitê, em sua 73ª Sessão realizada no dia 29 de novembro de 2006, deliberou **aprovar** o Projeto de Pesquisa envolvendo seres humanos intitulado: **"Uso do laser ER:YAG para a prevenção de cáries em sulcos e fissuras: estudo** *in vitro* e *in situ*", a ser desenvolvido por Vossa Senhoria na Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, devendo o atestado para publicação final ser expedido pelo Comitê de Ética em Pesquisa, após a entrega e aprovação do Relatório Final pelo referido Comitê.

Na oportunidade, lembramos da necessidade de entregar na Secretaria do Comitê, com o formulário preenchido pelo pesquisador responsável, os **Relatórios Parciais** até o dia **30 de novembro de 2007 e 30 de novembro de 2008** e o **Relatório Final** até o dia **30 de novembro de 2009.**

Atenciosamente,

Secretária do Comitê de Ética em Pesquisa

Ilma. Sra. ALESSANDRA MARQUES CORRÊA Pós-Graduanda do Departamento de Odontologia Restauradora – FORP/USP

Secretária do Comitê de Ética em Pesquisa - Glauce Della Rosa - e-mail: glauce@forp.usp.br

ANEXO B - INSTRUÇÕES AOS VOLUNTÁRIOS

- ✓ A fase experimental terá duração de 14 dias consecutivos (de 19/01 a 01/02), sendo que o aparelho deverá ser utilizado todos os dias ininterruptamente, inclusive para dormir, sendo retirado apenas para comer, beber e realizar higiene bucal;
- ✓ Na noite do dia 18/01 para 19/01 durma com o aparelho, assim como do dia 01/01 para 02/02, sendo o aparelho removido ao acordar e entregue ao pesquisador;
- Em todas as ocasiões em que for beber (inclusive água) ou comer, remova o aparelho da boca e coloque-o na caixa sobre a gaze umedecida com água deionizada (que será fornecida). Após a ingestão de alimentos e bebidas (com exceção de água) entre as refeições principais, enxágüe a boca com água corrente antes de colocar o aparelho novamente;
- Realize a higienização dos dentes naturais 4x por dia (após o café da manhã, almoço, jantar e antes de dormir) com a escova, o dentifrício e fio dental fornecidos;
- Escove somente a superfície interna do aparelho que fica em contato com o palato duas vezes por dia: ao acordar e antes de dormir. Não escove a superfície que contém os fragmentos recobertos com a tela plástica, e evite também que o dentifrício entre em contato com os fragmentos;
- ✓ Durante o experimento, interrompa o uso de qualquer solução para bochecho;
- ✓ A solução de sacarose deverá ser preparada e renovada diariamente da seguinte maneira:

Dilua 1 sachê (6g) de açúcar em 25 ml de água deionizada, misturando bem até a completa dissolução. Em seguida, coloque no frasco com conta-gotas. Ao reutilizar a embalagem lave bem em água corrente e seque.

- ✓ Pingue uma gota da solução de sacarose sobre cada um dos fragmentos e aguarde 5 minutos com o aparelho fora da boca e os fragmentos voltados para cima. Após este período, reposicione o dispositivo na cavidade bucal.
- ✓ Não seque a superfície da tela nem antes nem depois da aplicação de sacarose;
- ✓ Aplique a solução nos seguintes horários, totalizando seis vezes por dia, com intervalos de duas horas:

8:00	10:00
12:00	14:00
16:00	18:00

- ✓ Caso você tenha algum desconforto durante o experimento comunique imediatamente a pesquisadora responsável pelos telefones: (16)3602 4068, (16)81249019 ou (16)38774031;
- ✓ Sua colaboração é de extrema importância para o bom andamento deste experimento. Os horários e número de aplicações de sacarose, bem como o uso ininterrupto do aparelho são essenciais para que a pesquisa forneça resultados confiáveis;
- ✓ Agradecemos imensamente sua colaboração e disponibilidade, e estamos a disposição para quaisquer esclarecimentos!

ANEXO C – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

As informações contidas neste prontuário foram fornecidas por um profissional não envolvido na presente pesquisa, a ser realizada pela pós graduanda Alessandra Marques Corrêa, sob a orientação da Profa. Dra. Regina Guenka Palma Dibb, com objetivo de firmar acordo escrito mediante o qual o voluntário autoriza sua participação na pesquisa, com pleno conhecimento da natureza dos procedimentos a que se submeterá, com a capacidade de livre arbítrio e sem qualquer coação.

1. Título preliminar do projeto

"Uso do laser para a prevenção de cáries em sulcos e fissuras: estudo in situ"

2. Objetivo

Avaliar o efeito do laser para a prevenção de cáries em sulcos e fissuras em situações de alto consumo de açúcar e falta de higienização.

3. Justificativa

Alguns trabalhos *in vitro* vêm sendo realizados para análise da redução da permeabilidade e o aumento de resistência ácida do esmalte como efeitos cárie-preventivos do laser, porém pouco se sabe sobre esses efeitos em sulcos e fissuras, cabendo assim uma avaliação *in situ* da eficiência do laser na prevenção ao desenvolvimento da lesão de cárie.

4. Procedimentos

Os voluntários selecionados terão suas arcadas dentais moldadas para confecção de um aparelho removível de resina acrílica que ficará em contato com o céu da boca, contendo 4 pedaços de dente humano (previamente esterilizados) recobertos com uma tela. Sete dias antes do início do experimento e durante todo o período, os voluntários deverão utilizar exclusivamente a escova, pasta de dente e fio dental fornecidos pelas pesquisadoras. O experimento irá durar 14 dias sem interrupção, onde os voluntários pingarão uma gota de solução de sacarose (água com açúcar) sobre cada fragmento, seis vezes por dia, com intervalo médio de duas horas .Os voluntários continuarão higienizando os dentes normalmente com pasta de dente com flúor. O aparelho removível só poderá ser escovado na porção que fica em contato com a mucosa, ou seja, os fragmentos recobertos com tela plástica não deverão ser escovados. As avaliações serão realizadas logo após a retirada dos fragmentos de dente do aparelho.

5. Desconforto, riscos e benefícios esperados

Os voluntários poderão sentir um leve desconforto pelo uso do aparelho removível, que será minimizado com ajuste criterioso do dispositivo. Além disso, com o passar dos dias, poderá haver uma leve halitose, principalmente ao acordar, devido ao acúmulo do biofilme. Porém, este possível desconforto é totalmente suportável e não acarreta riscos à saúde geral ou bucal dos voluntários. O uso de pasta de dente com flúor e o contato mínimo da solução de sacarose com a cavidade bucal evita o aumento do risco à cárie nos dentes naturais.

6. Acompanhamento e assistência

Todos os procedimentos serão acompanhados pelos pesquisadores. Além disso, os mesmos oferecerão a assistência necessária durante a pesquisa, se o paciente tiver qualquer problema relacionado ao uso do dispositivo intrabucal.

7. Garantia de esclarecimentos

Os voluntários têm garantia de que receberão respostas a qualquer pergunta e esclarecimentos de qualquer dúvida quanto aos procedimentos, riscos e benefícios e outros assuntos relacionados com a pesquisa. Qualquer dúvida ou problema relativo à pesquisa deve ser comunicado com a maior brevidade possível à Alessandra Marques Corrêa pelos telefones (16) 36024068 ou (16) 81249019.

8. Retirada do consentimento

O voluntário tem a liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento, deixando de participar do estudo.

9. Ressarcimento ou indenização

Os voluntários serão ressarcidos de eventuais despesas com transporte para o comparecimento na FORP_USP para realização dos procedimentos laboratoriais. Não há indenização prevista, pois a presente pesquisa não oferece danos ao indivíduo.

10. Garantia de sigilo

Será mantido sigilo quanto à identidade de todos os voluntários na divulgação e publicação dos dados da pesquisa.

11. Todas as informações contidas neste documento serão explicadas verbalmente, numa linguagem acessível ao voluntário.

VOLUNTÁRIO

ALESSANDRA MARQUES CORRÊA AFONSO

Livros Grátis

(<u>http://www.livrosgratis.com.br</u>)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração Baixar livros de Agronomia Baixar livros de Arquitetura Baixar livros de Artes Baixar livros de Astronomia Baixar livros de Biologia Geral Baixar livros de Ciência da Computação Baixar livros de Ciência da Informação Baixar livros de Ciência Política Baixar livros de Ciências da Saúde Baixar livros de Comunicação Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE Baixar livros de Defesa civil Baixar livros de Direito Baixar livros de Direitos humanos Baixar livros de Economia Baixar livros de Economia Doméstica Baixar livros de Educação Baixar livros de Educação - Trânsito Baixar livros de Educação Física Baixar livros de Engenharia Aeroespacial Baixar livros de Farmácia Baixar livros de Filosofia Baixar livros de Física Baixar livros de Geociências Baixar livros de Geografia Baixar livros de História Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura Baixar livros de Literatura de Cordel Baixar livros de Literatura Infantil Baixar livros de Matemática Baixar livros de Medicina Baixar livros de Medicina Veterinária Baixar livros de Meio Ambiente Baixar livros de Meteorologia Baixar Monografias e TCC Baixar livros Multidisciplinar Baixar livros de Música Baixar livros de Psicologia Baixar livros de Química Baixar livros de Saúde Coletiva Baixar livros de Servico Social Baixar livros de Sociologia Baixar livros de Teologia Baixar livros de Trabalho Baixar livros de Turismo