

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

ALINE EVANGELISTA DE SOUZA GABRIEL

**Progressão da lesão de cárie no esmalte dental após aplicação de compostos
fluoretados e irradiação com laser de CO₂**

Ribeirão Preto

2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

ALINE EVANGELISTA DE SOUZA GABRIEL

**Progressão da lesão de cárie no esmalte dental após aplicação de compostos
fluoretados e irradiação com laser de CO₂**

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

Área de concentração: Odontologia Restauradora, opção Dentística.

Orientadora: Profa. Dra. Silmara Aparecida Milori Corona

Co-orientadora: Profa. Dra. Mônica Campos Serra

Ribeirão Preto

2009

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E/OU DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DA PRESENTE OBRA POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, DESDE QUE SEJA CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Integrado de Bibliotecas da USP

Souza-Gabriel, Aline Evangelista de.

Progressão da lesão de cárie no esmalte dental após aplicação de compostos fluoretados e irradiação com laser de CO₂/ Aline Evangelista de Souza Gabriel; orientadora Profa. Dra. Silmara Aparecida Milori Corona - Ribeirão Preto, 2009.

65p. : il.; 30cm.

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/ Universidade de São Paulo. Área de Concentração: Odontologia Restauradora.

1. Laser de CO₂. 2. Esmalte. 3. Cárie. 4. Flúor. 5. Microdureza.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Aline Evangelista de Souza Gabriel

Progressão da lesão de cárie no esmalte dental após aplicação de compostos fluoretados e irradiação com laser de CO₂

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

Área de concentração: Odontologia Restauradora, opção Dentística.

Aprovada em: ___ / ___ / ___

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedico esse trabalho...

À minha filhinha Helena Souza Gabriel, sinônimo de amor puro e verdadeiro, pela minha ausência nesses primeiros meses de sua vida para que eu pudesse concluir esse trabalho.

Ao meu marido, Paulo Rogério Santini Gabriel, pelos sonhos compartilhados, suporte emocional nos momentos difíceis, incentivo constante às minhas escolhas, carinho e amor. Agradeço também por me possibilitar ter a felicidade de compreender o que é ser mãe.

Aos meus queridos pais, Adalberto Evangelista de Souza e Maria Aparecida Barichello Evangelista de Souza, por estarem presentes em todos os momentos importantes da minha vida, além de lutarem incondicionalmente pelo sucesso e bem estar dos filhos. Serei eternamente grata a vocês pela amável e incansável dedicação à Helena, nesta importante fase de minha vida.

Aos meus irmãos, André Evangelista de Souza e Elias Evangelista de Souza, por me fazerem lembrar todos os dias que, em nossa família, nunca se está só, mesmo estando longe. Agradeço o companheirismo, união e amor fraterno.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Silmara Aparecida Milori Corona, pela orientação deste trabalho, amizade e ensinamentos recebidos. Agradeço o incentivo nas horas difíceis e a disponibilidade em ajudar demonstrada em todos os momentos. Sua contribuição para minha formação intelectual, científica e pessoal, desde a graduação, foi imprescindível para que eu chegasse até aqui.

À Profa. Dra. Mônica Campos Serra, co-orientadora desta tese, por ser exemplo de seriedade e dedicação para a área de Cariologia. Agradeço o importante auxílio neste trabalho e a constante cooperação para meu crescimento científico.

À Universidade de São Paulo, representada pela Magnífica Reitora Profa. Dra. Suely Vilela.

À Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (FORP) - USP, representada pelo Diretor Prof. Dr. Oswaldo Luiz Bezzon.

À Presidente da Comissão de Pós-Graduação da FORP-USP, Profa. Dra. Léa Assed Bezerra da Silva, pela oportunidade de realizar o curso de doutorado.

Ao Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Odontologia Restauradora da FORP-USP, Prof. Dr. Manoel Damião de Sousa Neto, por ser um incentivante em minha vida acadêmica, pelas oportunidades a mim concedidas e pelos valiosos conhecimentos transmitidos durante nosso convívio.

Ao chefe do Departamento de Odontologia Restauradora da FORP-USP, Prof. Dr. Jesus Djalma Pécora, pela dedicação em seu trabalho, pelos conselhos sempre oportunos e por ser um referencial em pesquisa científica.

Aos docentes do Departamento de Odontologia Restauradora da FORP-USP, em especial à Profa. Dra. Telma Nunes do Nascimento e Profa. Dra. Isabel Cristina Fröner pelos conhecimentos transmitidos e acolhimento.

À Profa. Dra. Regina Guenka Palma Dibb, pelos anos de agradável convívio, pela ajuda de forma tão prestativa sempre que necessária e pelo constante aprendizado a mim proporcionado.

Ao Prof. Dr. Ricardo Gariba Silva, pela competência com que executa suas atividades e por tornar nossos momentos de trabalho mais prazerosos.

À Profa. Dra. Alma Blásida Elisaur Concepcion Benitez Catirse, pela nossa amizade e por ter me mostrado o universo da pesquisa, me incentivando a prosseguir.

À Profa. Dra. Maria Cristina Borsatto, pela agradável convivência, receptividade e apoio constante.

À Profa. Dra. Cecília Pedrozzo Turssi, pela seriedade e competência com que executa seu trabalho. Agradeço a preciosa ajuda no delineamento e correção dos artigos científicos e, em especial, ao tratamento estatístico dos dados deste estudo.

À Profa. Dra. Livia Maria Andaló Tenuta, pela importante orientação nas análises da concentração do flúor do estudo *in situ* e pela maneira carinhosa e prestativa com que me recebeu na FOP - UNICAMP.

Ao Prof. Dr. Jaime A. Cury, pelos esclarecimentos sobre flúor e gentileza com que me recebeu no laboratório de Bioquímica Oral da FOP - UNICAMP.

Ao Prof. Dr. Luciano Bachman, Profa. Dra. Mônica Campos Serra e Profa. Dra. Silmara Aparecida Milori Corona pela colaboração e participação em minha banca de qualificação.

À Vivian Colucci, pela fundamental ajuda no delineamento e fase experimental do estudo, além da colaboração na execução das ilustrações do trabalho. Agradeço também pelo companheirismo durante todo o curso de doutorado.

Aos funcionários do Departamento de Odontologia Restauradora da FORP-USP, em especial, ao secretário do Programa de Pós-graduação, Carlos Feitosa dos Santos, e à técnica do laboratório em Pesquisa em Dentística, Patricia Marchi, pela disponibilidade e boa vontade em ajudar.

Às funcionárias da Seção de Pós-Graduação da FORP-USP, Isabel Cristina Galino Sola e Regiane Cristina Moi Sacilotto, pela eficiência ao atender as solicitações dos alunos.

Ao técnico do laboratório de Bioquímica Oral da FOP - UNICAMP, Valdomiro Vieira Filho, pela contribuição na realização das análises do flúor.

À Universidade de Ribeirão Preto – UNAERP, na presença da Magnífica Reitora Elmara Bonini.

À Prof. Dra. Yara Teresinha Correa Silva Sousa, Coordenadora da Graduação e Pós-Graduação do Curso de Odontologia da UNAERP, pela oportunidade de exercer a carreira de docente, pelos agradáveis momentos do nosso convívio e, principalmente, por acreditar e confiar no meu trabalho.

Aos docentes do Curso de Odontologia da UNAERP, em especial à Profa. Dra. Melissa Andrea Marchesan, pela amizade cultivada ao longo desses anos; e Prof. José Carlos Dal Secco Leandrini, por compartilhar comigo de maneira tão prazerosa a disciplina de Dentística.

À Alessandra Correa Afonso, pelo companheirismo em todos os momentos e apoio nas horas difíceis.

Aos alunos da Pós-graduação do Departamento de Odontologia Restauradora da FORP-USP, em especial à Danielle Messias, Juliana Ciccone e Cristiane Savaris, pela amizade, troca de experiências e agradável convivência.

Aos voluntários do estudo *in situ* que tornaram possível a realização da parte experimental.

À Central do Óxido de Etileno do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, pela esterilização dos fragmentos dentais utilizados neste trabalho.

À técnica Claudia Aparecida Rodrigues (Unesp – Jaboticabal) pelo auxílio na realização da microscopia eletrônica de varredura.

Ao meu querido irmão André Evangelista de Souza, pela importante ajuda na correção e formatação deste trabalho.

Ao meu sogro José Waldemir Gabriel e sogra Maria Tereza Santini Gabriel, aos quais tenho profundo respeito e admiração, agradeço o carinho que cultivam por mim e pela pequena Helena.

Às minhas cunhadas Olga Gabriel, Iully Freire e Vanessa Rodrigues, por me presentarem com momentos felizes e amizade sincera.

À todos os amigos e familiares que fazem parte de minha vida e torcem pelo meu sucesso.

Não desanimes

Não cultives o pessimismo

Esqueça as sugestões do meio destrutivo

Siga adiante, mesmo varando na sombra dos próprios erros

Avance, ainda que seja por lágrimas

Trabalhe constantemente

Não te impressiones diante da dificuldade

Não desistas da paciência

Não creias em realização sem esforço

O trabalho sempre será o prodígio da vida, criando reconforto, progresso e renovação

Francisco Cândido Xavier

RESUMO

SOUZA GABRIEL, A. E. **Progressão da lesão de cárie no esmalte dental após aplicação de compostos fluoretados e irradiação com laser de CO₂**. 2009. 65p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

A presente tese foi dividida em 2 estudos cujos objetivos específicos foram: 1) Comparar *in vitro* o efeito da irradiação do laser de CO₂ a compostos fluoretados na inibição da progressão de lesões de cárie, e testar se o padrão de resposta é similar ao esmalte humano e bovino. 2) Avaliar *in situ* a progressão da lesão de cárie no esmalte bovino e verificar as quantidades de flúor no biofilme e no esmalte após tratamento com verniz fluoretado associado ou não ao laser de CO₂. No primeiro estudo, 96 fragmentos de esmalte (48 humanos e 48 bovinos) foram distribuídos aleatoriamente em 4 grupos (n=12): CO₂ - laser de CO₂ (10,6 μm), VF – verniz fluoretado a 5%, FFA – flúor fosfato acidulado a 1,23% e ST – sem tratamento. Os espécimes foram submetidos a 14 dias de desafio cariogênico (ciclagem de pH). A microdureza (KHN) foi medida a 30 μm da superfície. Vinte fragmentos adicionais de cada substrato receberam os mesmos tratamentos (n=5) e foram analisados em microscopia eletrônica de varredura (MEV). No estudo *in situ* (cruzado e realizado em 2 fases de 14 dias cada), 14 voluntários (n=14) utilizaram um dispositivo palatino contendo blocos de esmalte bovino que foram previamente submetidos a um dos 4 tratamentos: VF + CO₂ - verniz Fluoretado a 5% + laser de CO₂, VF- verniz fluoretado a 5%, VP - verniz placebo sem flúor, VP + CO₂ - verniz placebo + laser de CO₂. Biofilme dental foi acumulado sobre os blocos e 6 vezes ao dia os voluntários gotejavam solução de sacarose, simulando um desafio cariogênico. Após cada fase, os blocos foram removidos para avaliação da desmineralização do esmalte (teste de microdureza) e concentração de fluoreto no biofilme e esmalte após o desafio cariogênico. A microdureza foi avaliada pela Análise de Variância e teste de Tukey e as dosagens de flúor no biofilme e esmalte pelo teste não paramétrico de Friedman ($\alpha = 5\%$). No estudo *in vitro*, verificou-se que o laser de CO₂ promoveu a menor perda mineral, seguido do tratamento com VF e FFA, o desempenho inferior na inibição da progressão de cárie foi obtido com o grupo controle (ST) ($p < 0,05$), em resumo: CO₂ > VF > FFA > ST. O dente bovino apresentou maiores valores de microdureza que o humano, embora o comportamento dos substratos tenha sido o mesmo para todos os tratamentos. A MEV demonstrou presença de fino precipitado granuloso para o grupo VF e fusão e fissuras para o grupo tratado com CO₂. No estudo *in situ*, independentemente da aplicação dos vernizes fluoretado ou placebo, a microdureza do esmalte foi estatisticamente superior ($p < 0,05$) quando esse substrato foi

irradiado com laser de CO₂. Quando a aplicação dos vernizes não foi seguida pela irradiação com laser de CO₂, não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) na microdureza do esmalte bovino em função do uso do produto fluoretado e placebo. Ao analisar o biofilme dental, observou-se que o grupo tratado com VF apresentou maior quantidade de flúor, estatisticamente diferente dos demais grupos ($p < 0,05$), que foram estatisticamente semelhantes entre si ($p > 0,05$). No esmalte, a maior quantidade de flúor foi encontrada no grupo VF + CO₂ ($p < 0,05$), que não diferiu estatisticamente do VF ($p > 0,05$). Conclui-se que: 1) O laser de CO₂ controlou a progressão de cárie *in vitro* mais eficazmente que compostos fluoretados de alta concentração e, que o esmalte bovino pode ser um substituto ao esmalte humano em estudos desta natureza; 2) O laser de CO₂ promoveu maior inibição da progressão de cárie, em modelo *in situ*, independentemente da aplicação dos vernizes fluoretado ou placebo. O uso do verniz fluoretado resultou em maior quantidade de flúor no biofilme dental, enquanto que, a associação verniz fluoretado e laser de CO₂ proporcionou maior incorporação de flúor no esmalte.

Palavras-chave: Laser de CO₂, esmalte, cárie, flúor e microdureza.

ABSTRACT

SOUZA GABRIEL, A. E. **Progression of caries-like lesions following CO₂ laser irradiation or fluoride sources in human and bovine enamel.** 2009. 65p. Thesis (Doctorate) – Ribeirão Preto School of Dentistry, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

This thesis was divided into 2 studies whose specific objectives were: 1) To compare the ability of CO₂ laser and fluoride sources to inhibit caries-like lesions in human enamel and to test whether a similar pattern of response would hold for bovine enamel. 2) Evaluate *in situ* the progression of caries lesions in bovine enamel and to verify the amount of fluoride present in biofilm and enamel after treatment with fluoride varnish combined with CO₂ laser. In the first study, 96 enamel slabs (48 from bovine and 48 from human teeth) were randomly distributed into 4 groups (n=12): CO₂ - CO₂ laser, FV - 5% fluoride varnish, APF - 1.23% acidulated phosphate fluoride gel, or WT – without treatment (control). Specimens were subjected to a 14-day *in vitro* cariogenic challenge. Microhardness (SMH) was measured at 30 µm from the surface. Additional 20 slabs of each substrate (n=5) received the same treatment described above and were analyzed by scanning electron microscopy (SEM). In the *in situ* study (crossover and performed in 2 phases of 14 days each), 14 (n = 14) wore palatal appliance with bovine enamel blocks that were previously submitted to one of the 4 treatments: FV + CO₂ - 5% fluoride varnish + CO₂ laser, FV – fluoride varnish, PV – placebo varnish without fluoride, PV + CO₂ – placebo varnish + CO₂ laser. Dental biofilm was allowed to accumulate on the blocks and 6 times a day a drop of saccharose solution was dispensed into enamel blocks by volunteers, simulating a cariogenic challenge. After each phase, the blocks were removed to evaluate enamel demineralization (microhardness test) and concentration of fluoride in biofilm and enamel after cariogenic challenge. Microhardness was evaluated by ANOVA and Tukey test, and the amount of fluoride present in biofilm and enamel were analysed by non-parametric Friedman test ($\alpha = 5\%$). CO₂ laser promoted the least mineral loss. Treatment with FV resulted in the second highest values, which was followed by APF. Untreated specimens performed the worst ($p < 0,05$), in summary: CO₂ > FV > APF > WT. Bovine teeth presents higher values of microhardness than human, although the performance of both substrates were the same. SEM showed a granulate precipitate on FV group and fusion and fissures on lased-specimens. In *in situ* study, regardless of the application of fluoride or placebo varnish, the microhardness of enamel was statistically superior ($p < 0.05$) when the substrate was irradiated with CO₂ laser. When the varnishes application were not followed by the irradiation of CO₂ laser, no significant statistical

diference were observed in the bovine enamel ($p > 0.05$). When analyzing the dental biofilme, it was observed that the group treated with VF presented larger amount of fluoride, statistically different from the other groups ($p < 0.05$), which were statistically similar among themselves ($p > 0.05$). In the enamel, the largest amount of fluoride was found in the FV + CO₂ group ($p < 0.05$), which was not statistically different from FV ($p > 0.05$). It was concluded that: 1) CO₂ laser may control caries progression more efficiently than fluoride sources and bovine teeth may be a suitable substitute for human teeth in studies of this nature; 2) CO₂ laser promoted larger inhibition of the caries progression, in *in situ* model, independently of the application of fluoride or placebo varnish. The use of fluoride varnish fluoretado resulted in larger amount of fluoride in dental biofilme, while, the association of fluoride varnish and CO₂ laser provided larger fluoride uptake in the enamel.

Keywords: CO₂ laser, enamel, caries, fluoride and microhardness.

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 PROPOSIÇÃO	19
3 MATERIAL E MÉTODO.....	20
3.1 Estudo <i>in vitro</i>	20
3.2 Estudo <i>in situ</i>	28
4 RESULTADOS	41
4.1 Estudo <i>in vitro</i>	41
4.2 Estudo <i>in situ</i>	44
5 DISCUSSÃO	48
6 CONCLUSÕES.....	57
REFERÊNCIAS	58
ANEXOS	

Introdução

1. INTRODUÇÃO

O esmalte dental é composto basicamente de hidroxiapatita [$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$] (HA), em aproximadamente 96% de porção mineral. Histologicamente, o esmalte é constituído de prismas circundados por água e material orgânico (TEN CATE; FEATHERSTONE, 1991). A princípio, a composição química e estrutural do esmalte de todos os mamíferos é igual, porém pode haver alguma variação dependendo da espécie do animal (MORIWAKI et al., 1968). Os dentes bovinos são comumente utilizados em estudos laboratoriais por não possuírem restrições éticas, serem mais facilmente obtidos que os humanos e possuírem tamanho amplo (TANAKA et al., 2008). Estudos demonstraram que apesar de ser mais poroso que o humano (MORIWAKI et al., 1968; MELLBERG, 1992), o dente bovino possui composição mais uniforme (MELLBERG, 1992), podendo produzir resposta aos desafios cariogênicos com menor variação (FEATHERSTONE; MELLBERG, 1981).

O processo de formação das lesões de cárie se baseia na desmineralização do esmalte após a formação de ácidos pelo biofilme (provenientes da metabolização de carboidratos fermentáveis), bem como no reparo natural dos “defeitos” produzidos por esses ácidos no esmalte pelo fluido do biofilme e saliva, quando em pH neutro (remineralização) (TEN CATE; FEATHERSTONE, 1991). Os espaços interprismáticos do esmalte por onde os ácidos se difundem também permitem a entrada de outros íons presentes no meio bucal como o fluoreto (CHRISTOFFERSEN et al., 1984).

Reconhecidamente, a aplicação de flúor é o método que mais contribuiu para o declínio da cárie dental (CLARKSON, 2000; MESSER, 2000). Isso explica a vasta utilização desta substância no cotidiano, principalmente em dentifrícios (CURY et al., 2004), água de abastecimento público (PARNELL et al., 2000), alimentos e bebidas preparados com água fluoretada (CURY et al., 2001), soluções para bochecho e agentes fluoretados de uso

profissional, como géis e vernizes (SEPPÄ, 2001, PAES LEME et al., 2004). Em consequência do declínio, a doença cárie tornou-se fortemente polarizada (SEPPÄ, 2001). Cerca de 80% das superfícies dentais cariadas estão concentradas em 25% dos indivíduos (POULSEN; SCHEUTZ, 1999). Nesse grupo em que a manifestação da doença ainda permanece alta, a aplicação tópica profissional de flúor tem sido recomendada, visando aumentar a disponibilidade do fluoreto na cavidade bucal (CHRISTOFFERSEN et al., 1984; ZIMMER et al., 2001; MARINHO et al., 2002). Os produtos fluoretados de alta concentração promovem reação química do fluoreto com o tecido dental, formando fluoreto de cálcio (CaF_2) ou flúor fracamente ligado, e fluorapatita [$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$] (FAP) ou flúor fortemente ligado, dependendo do pH e concentração iônica do meio (SAXEGAARD; RÖLLA, 1988; TEN CATE; FEATHERSTONE, 1991).

Por muitos anos, acreditou-se que a FAP fosse o principal elemento na dinâmica do processo de cárie por se incorporar à estrutura dental e diminuir sua solubilidade, se comparada a hidroxiapatita (HA) (RÖLLA et al., 1993). Na realidade, mesmo que o dente seja enriquecido com uma grande quantidade de FAP, apenas 10% corresponde à substituição de HA por FAP (TEN CATE, 1999). A contribuição da FAP para o aumento da resistência dental está no fato desta ser um mineral que tende a se precipitar mais facilmente do que a HA em meio contendo cálcio e fosfato (presentes na saliva e biofilme), e a perda mineral do substrato é reduzida (ÖGAARD, 2001). Dessa forma, a presença de um reservatório de fluoreto sobre o esmalte seria mais importante do que a própria deposição de FAP (CHRISTOFFERSEN et al., 1984; ÖGAARD, 1990).

O CaF_2 é o principal produto da reação do flúor com a HA, que é armazenado na forma de glóbulos e funciona como reservatório de liberação lenta do fluoreto para a cavidade bucal, pois pode ser dissociado no momento em que ocorre a queda do pH durante o processo de desmineralização (RÖLLA et al., 1993; ÖGAARD, 2001; TENUTA et al., 2008). Assim, a

utilização de uma substância capaz de permanecer por período prolongado em contato com o esmalte, depositando o CaF_2 sobre o mesmo (como o verniz fluoretado), é relevante para o mecanismo de inibição da desmineralização dental (RÖLLA et al., 1993; SEPPÄ, 2001).

É preciso considerar ainda que a formação de biofilme dental bacteriano sobre a superfície dos dentes determina a perda de minerais do esmalte para o meio bucal (TENUTA et al., 2008). O grau de saturação do fluido do biofilme (porção aquosa entre as bactérias e a matriz) em relação à HA e FAp, sob distintos pHs, determina a dissolução ou a precipitação desses minerais (MARGOLIS; MORENO, 1994). Considerando que a queda de pH promove a mobilização de minerais do esmalte para o fluido, uma maior concentração de fluoreto no biofilme pode reduzir sua cariogenicidade (TEN CATE et al., 1999). É possível, portanto, determinar se ocorreu desmineralização ou remineralização do substrato por meio da análise das concentrações de fluoreto no esmalte e fluido do biofilme, uma vez que essas concentrações controlam o grau de saturação dos minerais presentes na cavidade bucal (MARGOLIS; MORENO, 1994; TENUTA et al., 2006).

Diante dessas observações, a otimização dos métodos usuais de prevenção da cárie dental e o desenvolvimento de novas estratégias são de fundamental importância para a promoção de saúde bucal. Nesse contexto, a tecnologia laser vem sendo utilizada como coadjuvante aos procedimentos preventivos (FEATHERSTONE et al., 1998; KANTOROWITZ et al., 1998; TEPPER et al., 2004; ESTEVES-OLIVEIRA et al., 2009). O laser (cuja sigla em inglês significa *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*, ou seja, Amplificação da Luz por Emissão Estimulada de Radiação) é um dispositivo que capaz de produzir energia luminosa com características específicas: monocromática, coerente e colimada (EINSTEIN, 1916). Estudos demonstram que a irradiação do esmalte dental com laser pode promover aumento da resistência à desmineralização decorrente de desafios cariogênicos (CEBALLOS et al., 2000; HOSSAIN et al., 2002; CECCHINI et al., 2005;

KWON et al., 2005). Para tal propósito, o laser de CO₂ parece ser o mais indicado do ponto de vista da eficiência (KANTOROWITZ et al., 1998; RODRIGUES et al., 2004).

Os comprimentos de onda obtidos com os lasers de CO₂ ($\lambda = 9,3, 9,6, 10,3$ e $10,6 \mu\text{m}$) são mais apropriados para a utilização em esmalte dental, pois produzem radiação na região do espectro infravermelho muito próximo às bandas de absorção da hidroxiapatita (FEATHERSTONE et al., 1998; KANTOROWITZ et al., 1998). A maior parte da luz é absorvida nos primeiros micrômetros externos da superfície do esmalte e convertida em calor (CHIANG et al., 2008). O efeito térmico do laser de CO₂ seria o responsável por aumentar a resistência do esmalte dental à ação dos ácidos (FOX et al., 1992; PHAN et al., 1999).

Ao aquecer a superfície dental, o laser de CO₂ causa redução no conteúdo de carbonato e desnaturação parcial da matriz do esmalte (FEATHERSTONE; NELSON, 1987; HSU et al., 2000), o que provoca a diminuição da permeabilidade, dificulta a difusão dos ácidos e, conseqüentemente, reduz a desmineralização da estrutura (CAN et al., 2008; ESTEVES-OLIVEIRA et al., 2009). Além dessas alterações, o efeito térmico da irradiação com laser de CO₂ pode resultar em alterações morfológicas, como fusão e derretimento da superfície do esmalte, e aumento dos cristais de HA, resultando na diminuição da solubilidade do esmalte (HOSSAIN et al., 2001; CAN et al., 2008).

A utilização do laser de CO₂ associado ao flúor em pacientes com alto risco de cárie ou em lesões incipientes poderia ser um recurso preventivo eficaz (SCHMIDLIN et al., 2007; STEINER-OLIVEIRA et al., 2008), com as vantagens de uma única aplicação ser suficiente para o controle do desenvolvimento e progressão da doença (HSU et al., 2001).

Especula-se que flúor aplicado na superfície se difunda por entre os poros interprismáticos e, após a irradiação com laser de CO₂, esta fina camada de flúor e os micrômetros mais externos da superfície sejam derretidos e recristalizados para se rearranjarem em uma nova estrutura: o mineral de FAp (PHAN et al., 1999; HSU et al.,

2001). No entanto, de acordo com alguns pesquisadores (KANTOROWITZ et al., 1998; HSU et al., 2000), a fusão e o derretimento da superfície podem não ser necessários para aumentar a resistência ácida do esmalte. FOX et al. (1992) e TEPPER et al. (2004) encontraram resultados promissores de inibição de cárie quando associaram o comprimento de onda 10,6 μm ao flúor ou outros agentes químicos.

Vale ressaltar que os estudos acima mencionados são experimentos laboratoriais. O único trabalho *in situ*, encontrado na literatura até o momento, que envolve a utilização do laser de CO_2 , associada ou não ao uso de dentifrícios fluoretados, na inibição da desmineralização do esmalte dental é RODRIGUES et al. (2006). Neste estudo, os autores irradiaram dentes humanos extraídos com o equipamento *transversally excited atmospheric pressure* (TEA) (comprimento de onda 9,6 μm), que é um protótipo do laser de CO_2 , não disponível comercialmente.

Embora os trabalhos considerem promissores o uso do laser de CO_2 na prevenção de cárie, há a necessidade de se realizarem trabalhos *in vitro* para validar ou não a utilização do substrato bovino como substituto ao humano em estudos de progressão de cárie após tratamento com laser de CO_2 . Além disso, nenhum estudo prévio a este teve o objetivo de comparar *in vitro* o laser de CO_2 a diferentes formas de flúor tópico em altas concentrações (como os géis e vernizes) quando empregados isoladamente sobre o esmalte.

O efeito da associação do laser de CO_2 aos compostos fluoretados tópicos de alta concentração na inibição da desmineralização do substrato, bem como a incorporação do fluoreto ao esmalte ou liberação deste íon para o biofilme também não foram avaliados em delineamento *in situ*.

Dessa forma, torna-se necessária a utilização de modelos experimentais *in vitro* e *in situ* que forneçam dados para avaliar o esmalte irradiado frente a desafios cariogênicos, previamente à indicação do laser de CO_2 com a finalidade de inibir lesões de cárie dental.

Proposição



2. PROPOSIÇÃO

A presente tese teve como objetivo geral avaliar o efeito do laser de CO₂ na progressão de cárie no esmalte dental. Para tanto, esta foi dividida em 2 estudos cujos objetivos específicos são os seguintes:

1. Comparar *in vitro* o efeito da irradiação do laser de CO₂ a aplicação de dois compostos fluoretados de alta concentração (gel e verniz) na inibição da progressão de lesões de cárie artificial, no esmalte humano e bovino.
2. Avaliar *in situ* a progressão da lesão de cárie no esmalte bovino e verificar as quantidades de flúor fracamente e fortemente ligado no esmalte e flúor total no biofilme formado sobre este substrato após a aplicação de verniz fluoretado de alta concentração associada ou não à irradiação com laser de CO₂.

Material e Método

3. MATERIAL E MÉTODO

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (protocolo n° 0078.0.138.000-09).

3.1 Estudo *in vitro*

Delineamento experimental

Os fatores em estudo foram o *substrato dental*, em 2 níveis: esmalte bovino e esmalte humano; e *tratamento superficial do esmalte dental*, em 4 níveis: CO₂ - laser de CO₂ com comprimento de onda 10,6 µm, VF - verniz fluoretado [2,26% de íons flúor (F⁻) ou 22,600 ppm como fluoreto de sódio (NaF) a 5 %], FFA - flúor fosfato acidulado a 1,23% e ST - sem tratamento (controle). A amostra do experimento foi composta por 96 fragmentos de esmalte (48 de cada substrato) que foram distribuídos entre os 4 tratamentos de superfície (n = 12), de acordo com um delineamento em blocos completos e casualizados. A variável de resposta quantitativa foi a microdureza subsuperficial (KHN) do substrato submetido ao desafio cariogênico. Vinte fragmentos adicionais de cada substrato (n = 5) foram analisados em microscopia eletrônica de varredura (MEV) com o objetivo de observar as características topográficas da superfície do esmalte após os diferentes tratamentos.

Preparo dos fragmentos dentais

Terceiros molares humanos hígidos, recém-extraídos, provenientes do Banco de Dentes da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP e incisivos bovinos recém-extraídos armazenados em solução de timol 0,1% a 9°C (KWON et al., 2005) foram

selecionados para o estudo. Os dentes foram lavados em água corrente por 24 h para remoção dos traços da solução e, em seguida, submetidos à raspagem e polimento com pedra pomes e água. A ausência de defeitos estruturais foi comprovada através de inspeção em lupa estereoscópica (Nikon Inc. Instrument Group, Melville, NY, EUA).

Os dentes humanos e bovinos foram seccionados na junção amelo-cementária em cortadeira de precisão (Isomet 1000; Buehler, Lake Buff, IL, EUA) de modo a separar as porções coronárias e radiculares. Nos dentes humanos, foram obtidos 4 fragmentos retangulares das faces vestibulares e linguais medindo 2 x 3 x 3 mm. Nos dentes bovinos, os 4 fragmentos (com as mesmas medidas do humano) foram extraídos do centro da face vestibular.

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

Para que se obtivesse uma amostra de fragmentos padronizada, foram realizadas três leituras na lateral dos fragmentos (subsuperfícies) distantes 30 μm da superfície e a 100 μm uma da outra no microdurômetro HMV-2000 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão) (HARA et al., 2003) com penetrador de diamante para dureza Knoop (KHN) e célula de carga de 25 gramas durante 5 segundos (KLEIN et al., 2005; RODRIGUES et al., 2006). A média das 3 medidas foi utilizada como o valor de microdureza do fragmento, sendo que os fragmentos que apresentaram valor médio superior ou inferior ao valor da média geral de todos os fragmentos foram descartados (HARA et al., 2006). Quarenta e oito fragmentos dentais de cada substrato foram selecionados baseados nos valores de dureza Knoop da lateral de seus

fragmentos, uma vez que a superfície não recebeu polimento e foi submetida ao desafio cariogênico.

Desafio cariogênico inicial

Com o objetivo de se obterem lesões iniciais microscópicas de mancha branca padronizadas, simulando pacientes com alta atividade da doença cárie, realizou-se desafio cariogênico artificial em todos os fragmentos de esmalte.

Para tal propósito, os espécimes foram fixados em hastes metálicas com cera para fundição. Essas hastes foram, por sua vez, fixas à recipiente plástico, de modo que apenas as superfícies dentais ficaram expostas. Os espécimes foram ciclados durante 5 dias conforme o protocolo descrito por FEATHERSTONE et al. (1986) e modificado por SERRA; CURY (1992). Neste modelo, lesões de cárie artificial são produzidas pela imersão dos fragmentos em solução desmineralizante (pH 5,0, por 6 h) e solução remineralizante (pH 7,0, por 18 h) a 37°C.

Tratamento superficial

De acordo com o delineamento de blocos completos e casualizados (sequência de tratamento determinada através de sorteio aleatório), os espécimes preparados foram divididos em 4 grupos (n = 12): CO₂ - laser de CO₂ (Opus 20; Opus Dent, Tel Aviv, Israel), VF - verniz fluoretado a 5% (Duraphat; Colgate-Palmolive Ind. Com. Ltda, São Paulo, SP, Brasil), FFA - flúor fosfato acidulado a 1,23% (DFL Ind. Com. Ltda, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e ST - sem tratamento (controle).

O equipamento Opus 20 é um sistema que incorpora dois lasers de alta potência em um único sistema: Er:YAG e CO₂. Segundo as especificações do fabricante, o laser de CO₂ possui comprimento de onda de 10,6 µm, o modo de emissão pode ser contínuo com potência

média de 1 a 10 W, ou pulsado com potência entre 1 e 6 W e a duração de pulso pode variar de 50 a 500 ms. O diâmetro de saída do feixe de energia do equipamento é de 0,8 mm. A seleção dos parâmetros de irradiação baseou-se em estudos preliminares bem como na tentativa de utilizar menores densidades de energia e, assim, diminuir a possibilidade de ocorrência de danos teciduais e não ablacionar a superfície do esmalte. O equipamento Opus 20 foi calibrado por técnico especializado antes da realização deste experimento (Anexo 1).

O laser de CO₂ foi irradiado com a ponta curva metálica (NOMELINI et al., 2009), no modo contínuo (*CW*) de emissão de energia (CHIN-YING et al., 2004), com 2 W de potência (HSU et al., 2001; TEPPER et al., 2004; CHIN-YING et al., 2004; KLEIN et al., 2005), 2 Hz de frequência (KLEIN et al., 2005), 50 ms de duração de pulso (KLEIN et al., 2005; TAGLIAFERRO et al., 2007) por 10 segundos. Durante a irradiação, o operador manteve a ponta do laser perpendicular ao substrato, com distância ponta/substrato de aproximadamente 5 mm (KLEIN et al., 2005; TAGLIAFERRO et al., 2007). Após a irradiação, os espécimes foram mantidos em saliva artificial a 37°C.

Nos fragmentos que receberam o verniz fluoretado (Duraphat, Colgate), 0,1 g produto (ATTIN et al., 2005) foi aplicado com *microbrush* (Dentsply Ind. Com. Ltda, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) na superfície seca do esmalte. Após 4 minutos, os espécimes foram imersos em saliva artificial. Nos fragmentos que receberam o flúor fosfato acidulado 1,23% em gel (DFL), 0,1 g do produto foi aplicada por 1 minuto (VILLENA et al., 2009) na superfície dental também com auxílio de *microbrush* e, em seguida, foram lavados por 10 segundos e armazenados em saliva artificial a 37°C. O grupo controle não recebeu tratamento, mas foi também armazenado em saliva artificial a 37°C. Após 24 h de armazenamento, o verniz fluoretado foi removido com auxílio de lâmina de bisturi, simulando a escovação dental.

Desafio cariogênico pós-tratamento superficial

Os espécimes foram fixados novamente nas hastas metálicas presas ao dispositivo plástico e todas as faces, exceto a superfície tratada, foram cobertas com cera de fundição. Realizou-se a ciclagem de pH do mesmo modo descrito anteriormente, porém, desta vez o tempo foi de 14 dias, com o objetivo de simular um alto desafio cariogênico.

Teste de Microdureza

Após o período de desafio cariogênico, os espécimes foram seccionados longitudinalmente e, em seguida, os fragmentos foram fixados com cera fundida deixando a parte interna (seccionada) da amostra exposta, que por sua vez, foi polida em Politriz da mesma forma descrita acima. Após o polimento, os fragmentos foram observados no microscópio óptico para verificar a lisura superficial e submetidos à limpeza em ultra-som (Dabi Atlante, Ribeirão Preto, SP, Brasil) por 2 minutos para a remoção dos debris. As impressões foram realizadas em uma das hemi-seções mantendo o longo eixo do diamante do penetrador paralelo à superfície externa do esmalte e utilizando carga estática de 25 g durante 5 s (KLEIN et al., 2005; RODRIGUES et al., 2006; TAGLIAFERRO et al., 2007). Foram realizadas 5 cinco medidas no centro do fragmento, com 100 µm de distância uma da outra, a 30 µm da superfície. A média dos 5 valores de microdureza de cada espécime foi empregada na análise estatística.

A Figura 1 apresenta o desenho esquemático da metodologia empregada para o teste de microdureza, após desafio cariogênico *in vitro*.

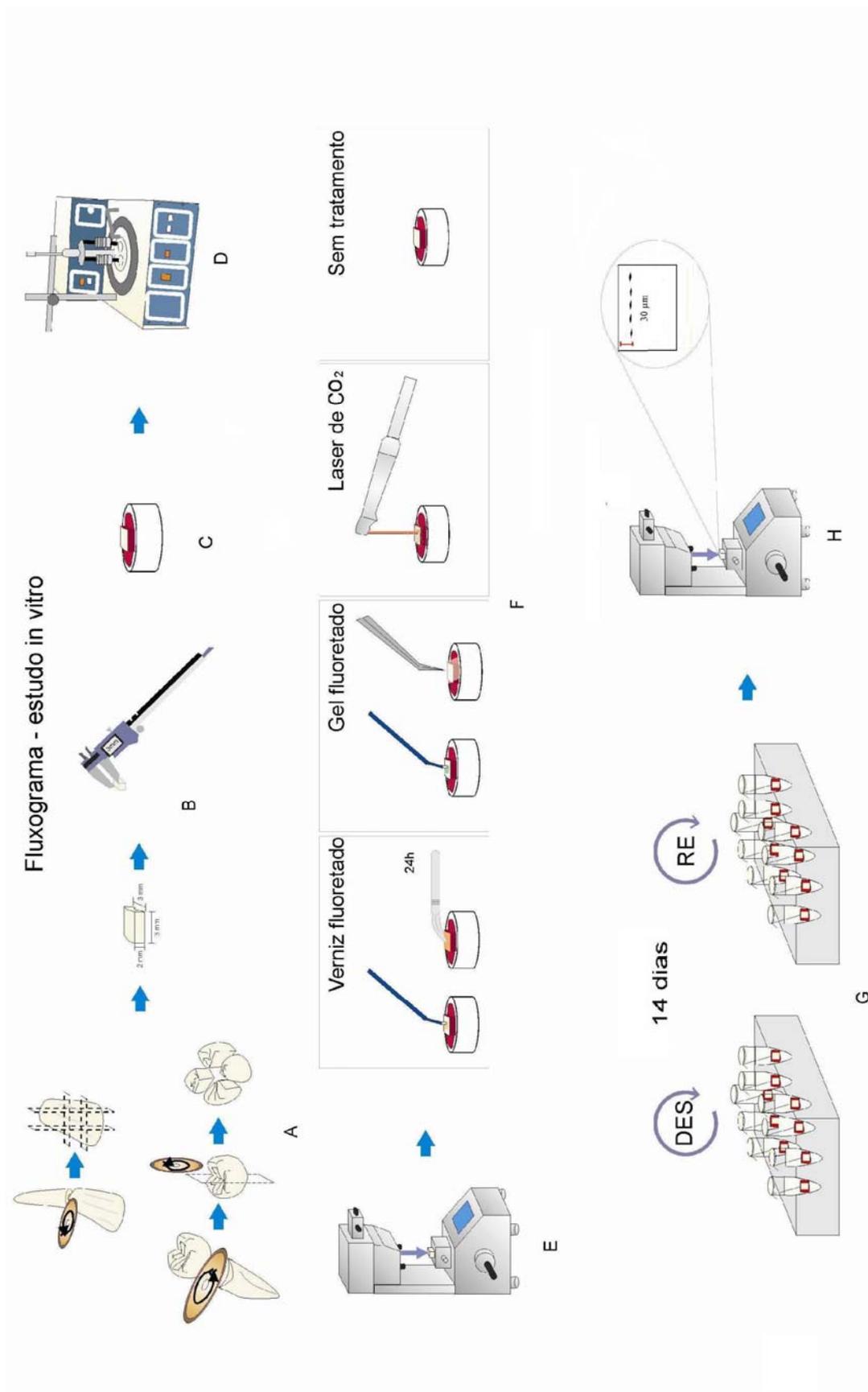


Figura 1
 A. Secção dos dentes; B. Aferição das dimensões dos fragmentos; C. Fixação dos espécimes nos cilindros de resina acrílica; D. Polimento das laterais dos fragmentos; E. Seleção dos fragmentos; F. Tratamentos; G. Ciclos de desmineralização e remineralização; H. Leituras de microdureza subsuperficial

Análise Estatística do Estudo in vitro

Os valores médios de microdureza foram analisados utilizando o software Statgraphics Centurion XV. A homogeneidade e normalidade da distribuição amostral foram analisadas pelos testes de Bartlett e Shapiro-Wilks, respectivamente. Análise de Variância a dois critérios (ANOVA) foi realizada para verificar se houve efeito significativo da interação entre *o tipo de esmalte e tratamento de superfície*, bem como o efeito desses principais fatores. Comparações múltiplas entre médias foram realizadas por meio do Teste de Tukey. O nível de significância foi estabelecido em 5%.

Microscopia Eletrônica de Varredura

Vinte fragmentos de esmalte adicionais de cada substrato (esmaltes bovino e humano) foram tratados com laser de CO₂, verniz de fluoreto de sódio, gel de flúor fosfato acidulado ou foram deixados sem tratamento (controle) (n = 5), como descrito anteriormente.

Depois de receberem os tratamentos, os espécimes foram limpos em ultra-som por 10 minutos. Para garantir que as amostras ficassem secas, estas foram armazenadas por 48 horas a 37 °C e, em seguida, foram fixadas em *stubs* metálicos com fita dupla-face de carbono (3M, São Paulo, Brasil) e cobertas com uma camada de 30 µm da liga ouro-paladium (Bal - Tec SCD 005, Zurique, Suíça) em aparelho de vácuo (SDC 050, Balzers, Liechtenstein).

Os espécimes foram examinados em microscópio eletrônico de varredura (JEOL modelo JSM 5410; Technic Jeol Co., Tóquio, Japão), operando em 15 kV. Inicialmente, as amostras foram analisadas em visão panorâmica, e posteriormente, foram realizadas fotomicrografias das áreas mais representativas de cada grupo com ampliação padronizada (x3500) (Figura 2).

Fluxograma da Microscopia Eletrônica de Varredura

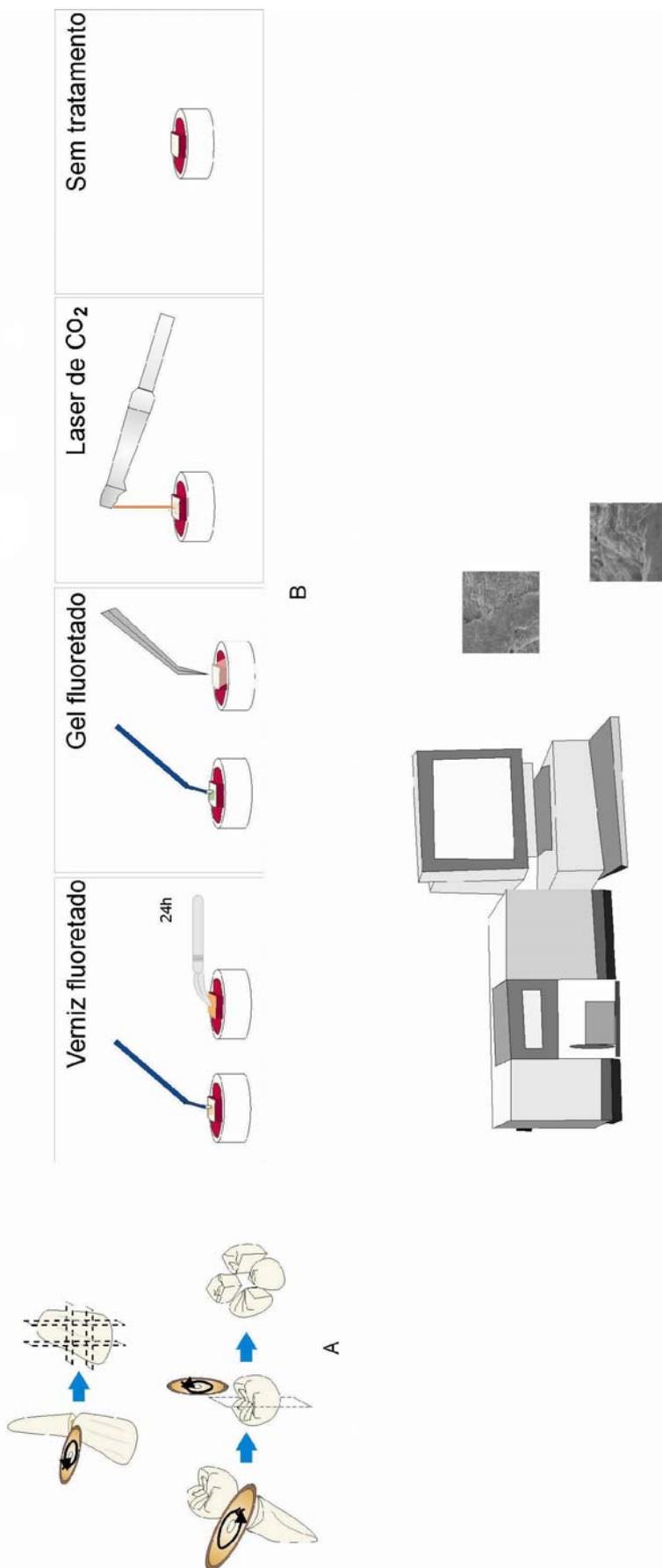


Figura 2
A. Secção dos dentes; B. Tratamentos; C. Obtenção das imagens de microscopia eletrônica de varredura

3.2 Estudo *in situ*

Delineamento experimental

Realizou-se um estudo *in situ* com delineamento cruzado (*crossover*), controlado por placebo, randomizado e duplo cego, em 2 fases de 14 dias com intervalo de 7 dias entre cada fase. Os fatores em estudo foram: *Verniz*, em 2 níveis - Fluoretado (5% NaF e 2,26% F⁻) ou placebo e *Laser de CO₂* (10,6 μm) também em 2 níveis – presente ou ausente. O estudo foi realizado com réplicas. O substrato selecionado foi o esmalte bovino, em virtude do resultado obtido com o estudo *in vitro*. A amostra do experimento foi composta por 56 fragmentos de esmalte, que foram fixados em dispositivos acrílico para uso intra-oral e divididos aleatoriamente entre os 14 voluntários em cada uma das duas fases (4 tratamentos x 14 voluntários). Os voluntários foram considerados blocos estatísticos. Os três princípios básicos da experimentação (aleatorização, repetição e blocagem) foram respeitados. As variáveis de resposta quantitativas foram microdureza subsuperficial (KHN) do substrato (esmalte seccionado longitudinalmente) e concentração de íons flúor [F⁻] no esmalte e no biofilme formado sobre este substrato após desafio cariogênico *in situ*.

Aspectos éticos

Os voluntários foram esclarecidos quanto à metodologia do experimento, seus riscos e benefícios, sendo também informados sobre seus direitos de desistirem da pesquisa em qualquer fase da execução da mesma. Recebidas as informações, os voluntários assinaram um “Termo de Consentimento Livre e Esclarecido” (Anexo 2), que atendia a Resolução n°196 de 10/03/1996 do Conselho Nacional de Saúde (Brasília, DF), concordando em participar e colaborar com a realização do experimento.

Critérios de seleção dos voluntários

Para o presente estudo, foram selecionados 14 voluntários de ambos os sexos, com idade entre 22 e 34 anos (média de 28 anos), que se enquadraram nos critérios de inclusão e não apresentaram os de critérios exclusão. Previamente à execução do experimento, os voluntários foram submetidos à anamnese e exame clínico. Realizou-se a avaliação do fluxo salivar estimulado, conforme proposto por KRASSE (1988) e o pH do meio bucal foi aferido utilizando fita colorimétrica de papel indicador universal de pH (JProlab Comércio de Produtos para Laboratório, São José dos Pinhais, Paraná, Brasil). Os critérios de inclusão e exclusão estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Critérios de inclusão e exclusão dos voluntários para participação do experimento*

Critérios de inclusão	Critérios de exclusão
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Disponibilidade para seguir a programação estabelecida para o experimento ▪ Fluxo salivar estimulado > 0,7mL/min ▪ pH do meio bucal acima de 6 ▪ Experiência passada de cárie, porém sem atividade 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Alta atividade de cárie ou doença periodontal ▪ Uso de medicamentos que interferem na secreção salivar e microbiota nos últimos 2 meses ▪ Radioterapia ou quimioterapia ▪ Gravidez ou lactação ▪ Prótese removíveis, aparelho ortodôntico ou placas oclusais ▪ Doenças sistêmicas

*Adaptados dos critérios propostos por ZERO (1995)

Confecção dos dispositivos intra-bucais

Cada voluntário selecionado teve suas arcadas (superior e inferior) moldadas com hidrocolóide irreversível de presa rápida (Tropicalgin; Zhermack, Badia Polesine, Rovigo, Itália). Os moldes foram vazados em gesso pedra (Velmix; Sybron Kerr, São Paulo, SP,

Brasil), obtendo-se os respectivos modelos de trabalho. Foram confeccionados dispositivos palatinos em resina acrílica autopolimerizável transparente (Ortoclass; Belo Horizonte, MG, Brasil) com 4 nichos (2 no lado esquerdo e 2 no lado direito) da superfície externa medindo 6 x 6 x 5 mm, para a fixação dos fragmentos de esmalte.

Seleção dos dentes

Incisivos bovinos recém-extraídos armazenados em solução de timol 0,1% a 9°C (KWON et al., 2005) foram selecionados para o estudo. Os dentes foram lavados em água corrente por 24 h para remoção dos traços da solução e submetidos à raspagem e polimento com pedra pomes e água. A ausência de defeitos estruturais foi comprovada através de inspeção em lupa estereoscópica (Nikon). Os dentes foram seccionados em cortadeira de precisão (Isomet) de modo a se obterem 4 fragmentos retangulares do centro das faces vestibulares medindo 3 x 3 x 4 mm.

Os fragmentos foram fixados em matrizes de Teflon utilizando com as subsuperfícies voltadas para o meio externo e polidos em Politriz (Struers) refrigerada com lixas d'água de granulação 1200 (Hermes) e pasta de alumina 0.3- μ m (Arotec) em feltro polidor (ATM) (HARA et al., 2003).

A fim de se padronizar a amostra, realizou-se a seleção de 56 fragmentos dentais bovinos com base na microdureza média (KHN) de cada espécime. Tal procedimento foi realizado como descrito para o estudo *in vitro*. Os fragmentos que apresentaram valor médio superior ou inferior ao valor da média geral de todos os fragmentos foram descartados (HARA et al., 2006).

Após a seleção, os fragmentos foram esterilizados em óxido de etileno (no Centro de Esterilização com Óxido de Etileno da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (THOMAS et al., 2007)).

Desafio cariogênico inicial

Da mesma maneira que realizado no estudo *in vitro*, os fragmentos de esmalte bovino foram submetidos à ciclagem de pH (desafio cariogênico artificial) por 5 dias com o objetivo de se obterem lesões microscópicas de cárie ativa e justificar o uso dos tratamentos. As lesões de cárie artificial foram produzidas pela imersão dos fragmentos em solução desmineralizante (pH 5,0, por 6 h) e solução remineralizante (pH 7,0, por 18 h) a 37°C. O volume da solução foi calculado baseado na área de esmalte exposta.

Tratamento Superficial

De acordo com o delineamento de blocos completos e casualizados, os espécimes preparados foram divididos em 4 grupos (n = 14): VF + CO₂ - Verniz Fluoretado a 5% (aviado na farmácia “Fórmula e Ação”, São Paulo, SP, Brasil) + laser de CO₂ (Opus 20; Opus Dent, Tel Aviv, Israel), VP - Verniz placebo sem flúor (controle) (aviado na farmácia “Fórmula e Ação”), VP + CO₂ - Verniz placebo sem flúor + laser de CO₂. Os vernizes (fluoretado e sem flúor) foram aviados em farmácia de manipulação especializada em produtos odontológicos, pois foi necessário obter um verniz placebo similar ao fluoretado.

Aplicou-se 0,1 g produto (verniz de fluoreto de sódio ou placebo) com *microbrush* (Dentsply Ind. Com. Ltda, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) na superfície seca dos fragmentos esmalte. Após 4 minutos, os espécimes foram imersos em saliva artificial.

Nos grupos que receberam o laser de CO₂, a irradiação foi realizada após os 4 min da aplicação do verniz. O laser de CO₂ foi irradiado nas mesmas condições e com os mesmos parâmetros empregados no estudo *in vitro*: modo contínuo de emissão de energia (CHIN-YING et al., 2004), 2 W de potência (HSU et al., 2001; TEPPER et al., 2004; CHIN-YING et al., 2004; KLEIN et al., 2005), 2 Hz de frequência (KLEIN et al., 2005), 50 ms de duração de pulso (KLEIN et al., 2005; TAGLIAFERRO et al., 2007), a 5 mm da superfície (KLEIN et al., 2005; TAGLIAFERRO et al., 2007), durante 10 segundos..

Fase intra-bucal

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

A sequência do tratamento utilizada por cada voluntário foi determinada em sorteio aleatório. Na primeira fase do experimento, metade dos voluntários utilizaram os 2 tratamentos com flúor (VF + CO₂ e VF) e a outra metade dos voluntários utilizaram os 2 tratamentos sem flúor (VP + CO₂ e VP). Ao final do experimento, todos os voluntários fizeram uso do dispositivo com todos os tratamentos.

Quatro blocos de esmalte foram fixados com cera em cada dispositivo palatino (2 tratamentos x 2 réplicas). No primeiro dia de cada fase, os blocos foram fixados na mesma altura do dispositivo acrílico e os voluntários foram instruídos a escovarem a superfície do fragmento 3 x ao dia com 20 movimentos de vai-vem. Esta etapa teve o objetivo de remover o excesso de verniz da superfície do fragmento, simulando as primeiras 24 h de condição clínica após a aplicação do verniz nos dentes.

No segundo dia de cada fase, os voluntários devolveram os dispositivos à pesquisadora. Os fragmentos foram cuidadosamente removidos dos nichos e fixados novamente nos mesmos, porém, desta vez, permaneciam 2 mm aquém da superfície do dispositivo. Sobre cada um dos fragmentos foi fixada uma tela plástica para facilitar o acúmulo de biofilme (BENELLI et al., 1993; HARA et al., 2003; CHIMELLO et al., 2008). Essa tela tem a finalidade de aumentar da massa bacteriana e dificultar a difusão dos

constituintes salivares, que não são capazes de alcançar as camadas mais profundas do biofilme em contato com a superfície do esmalte, caracterizando um alto desafio cariogênico (ZERO, 1995) (Figura 3).

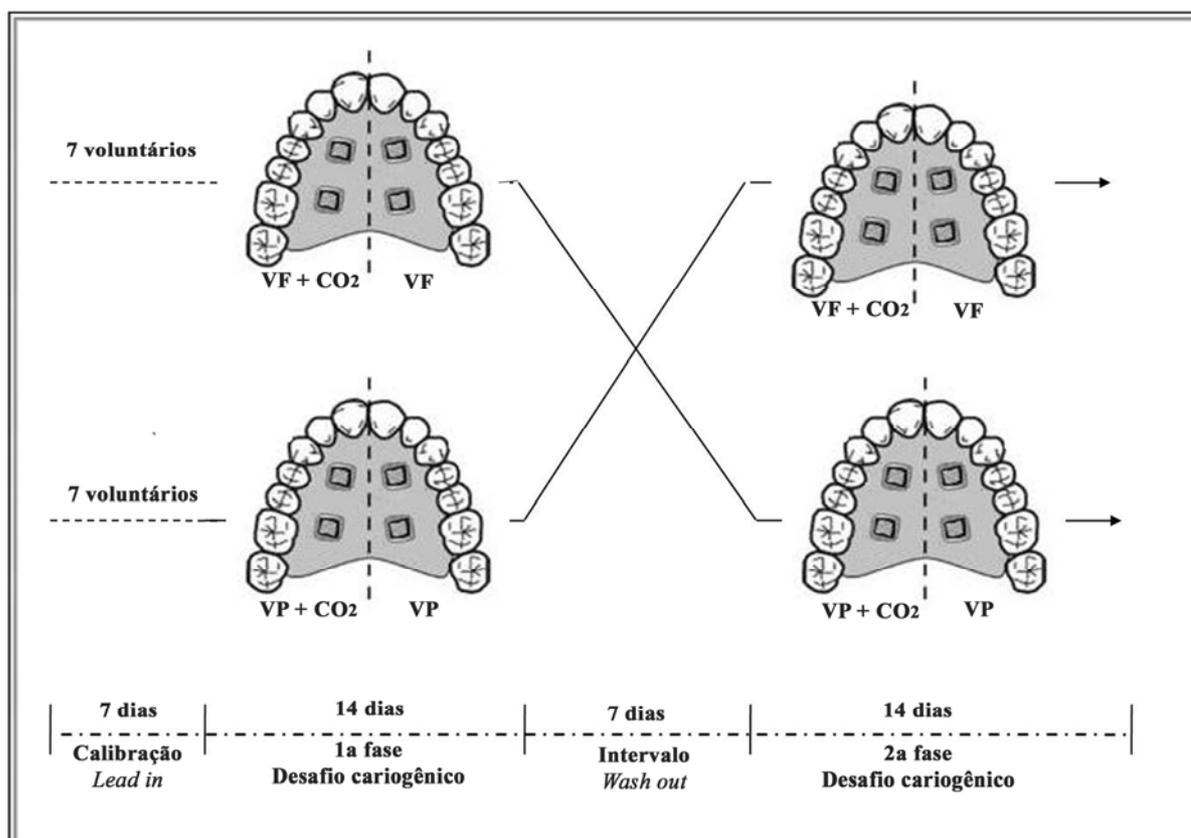


Figura 3. Desenho esquemático do delineamento cruzado (*crossover*) com as fases experimentais do estudo *in situ*. VF + CO₂ = verniz fluoretado + laser de CO₂, VF = verniz fluoretado, VP + CO₂ = verniz placebo (sem flúor) + laser de CO₂ e VP = verniz placebo.

O aparelho instalado foi utilizado por 14 dias e o desafio cariogênico foi iniciado no segundo dia de cada fase. Os voluntários foram instruídos a remover o dispositivo palatino e gotejar solução de sacarose 20% seis vezes ao dia, em cada um dos fragmentos (às 8:00; 11:00; 15:00; 17:00; 19:00 e 21:00 horas). Cinco minutos depois, o dispositivo deveria ser re-inserido na cavidade bucal (PAES LEME et al., 2004). Durante o período experimental, os voluntários puderam higienizar a porção do dispositivo que permanecia em contato com o

palato. Entre cada uma das fases do experimento, foi estabelecido um período de 7 dias de intervalo (*wash-out*), para evitar interferência de um tratamento no outro (efeito *carry over*).

Após o período de desafio cariogênico de cada uma das fases, o biofilme formado sobre cada fragmento foi cuidadosamente coletado com espátula de madeira descartável e imediatamente congelado em frasco de *ependorf* estéril codificado (Genuine, Axygen quality, Axygen Scientific Inc., CA, EUA) para análise da [F⁻] no fluido.

Os 4 fragmentos de esmalte foram removidos dos nichos. Dois deles foram submetidos ao teste de microdureza e os outros 2 foram reservados para a análise da [F⁻] (biopsia de esmalte).

Teste de Microdureza

Os espécimes foram fixados em lâminas de *plexglass* e seccionados longitudinalmente no sentido cérvico-incisal em cortadeira de precisão. Em seguida, uma das hemi-metades foi fixada em matriz cilíndrica com cera fundida deixando a parte interna (seccionada) voltada para o meio externo, que, por sua vez, foi polida em Politriz da mesma forma descrita anteriormente.

Após o polimento, os fragmentos foram observados no microscópio óptico para verificar a lisura superficial e submetidos à limpeza em ultra-som por 2 minutos para a remoção dos debris. As impressões foram realizadas mantendo o longo eixo do penetrador de diamante paralelo à superfície externa do esmalte e utilizando carga estática de 25 g durante 5 s (KLEIN et al., 2005; RODRIGUES et al., 2006; TAGLIAFERRO et al., 2007). Foram realizadas 5 cinco medidas no centro do fragmento, com 100 µm de distância uma da outra, a 30 µm da superfície. A média dos 5 valores de microdureza de cada espécime foi empregada na análise estatística. A Figura 4 apresenta o desenho esquemático da metodologia empregada para o teste de microdureza, após desafio cariogênico *in situ*.

Fluxograma - Estudo *in situ*

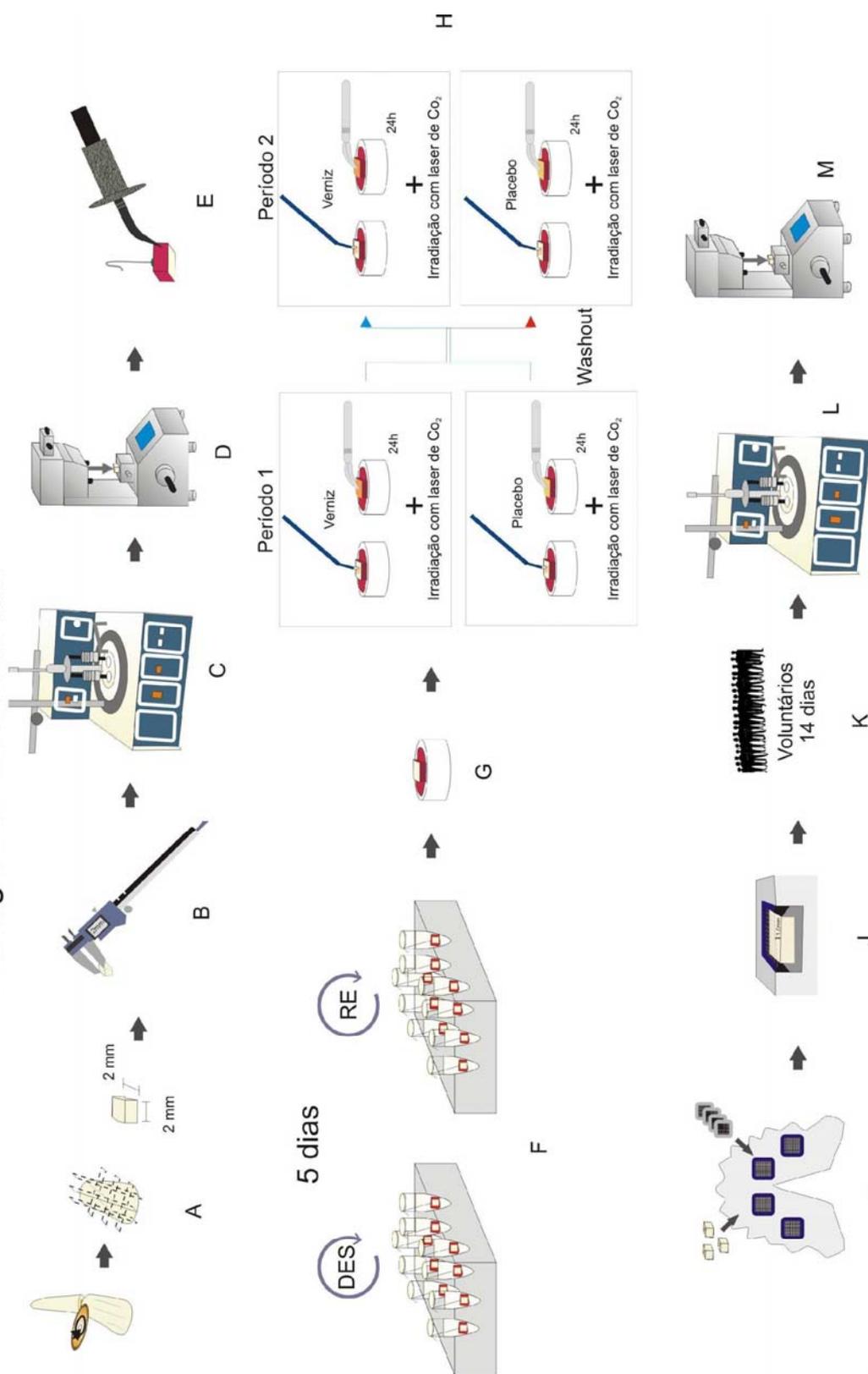


Figura 4
 A. Secção dos dentes; B. Aferição das dimensões com paquímetro; C. Polimento da lateral dos fragmentos; D. Seleção dos espécimes; E. Enceramento das laterais dos fragmentos; F. Desafio cariogénico inicial; G. Fixação dos espécimes nos discos de resina acrílica; H. Realização dos tratamentos; I. Inserção dos fragmentos nos dispositivos palatinos e fixação das telas; J. Visão aproximada dos nichos com o fragmento dental e a tela posicionada; K. Fase clínica; L. Polimento dos fragmentos; M. Realização das leituras de microdureza subsuperficial

Determinação da concentração de fluoreto no fluido do biofilme

O biofilme coletado foi descongelado em temperatura ambiente e submetido à secagem a vácuo por 24 h. Em seguida, o biofilme de cada frasco foi pesado individualmente em balança analítica de 5 dígitos (Ohaus Analytical Plus, Ohaus Corp., NJ, EUA) para obtenção do peso seco.

Como os valores obtidos foram menores que 1 mg ($\pm 10 \mu\text{g}$), adicionou-se 100 μL de HCl 0,5 M em cada *eppendorf* e procedeu-se a agitação em agitadores de tubos (Vortex; Phoenix Ind. Com. Equip. Científicos LTDA, Araraquara, SP, Brasil) e homogeneização em homogeneizador sanguíneo rotativo (Phoenix Ind. Com. Equip. Científicos LTDA, Araraquara, SP, Brasil) a 30 rpm, em temperatura ambiente por 3 h, sendo que a cada 1 h, os frascos foram agitados no agitador Vortex (TENUTA et al., 2006).

Os frascos foram então submetidos à centrifugação (10.000 g por 5 min a 4°C) (Centrífuga modelo Spin 1; Incibras, São Paulo, Brasil) para separação do fluido (sobrenadante) e parte sólida (precipitado) (VOGEL et al., 1997). A porção sobrenadante foi coletada com micropipetas, neutralizada com NaOH 0,2 M (0,125 mL para cada 10 mg de biofilme seco), homogeneizadas e armazenadas a 4°C. No momento da leitura da [F], o sobrenadante foi tamponado com solução TISAB (*Total Ionic Strength Adjustment Buffer*) III (Thermo Electron, Walthamam, MA, EUA), pH 5,0, na proporção 1:10 e no mesmo volume do HCl (TENUTA et al., 2006).

A concentração de flúor foi determinada utilizando-se eletrodo específico (modelo 96-09; Orion Research, Boston, MA, EUA) acoplado a um analisador de íons (modelo EA 940; Orion Research, Boston, MA, EUA) em circuito fechado (Figura 5).

A calibração do sistema foi realizada com padrões de 0,125 a 64 $\mu\text{g/mL}$ também preparados em TISAB III (1:10). As leituras, expressas em mV, foram convertidas em $\mu\text{g/mL}$ de flúor por meio da regressão linear da curva de calibração.

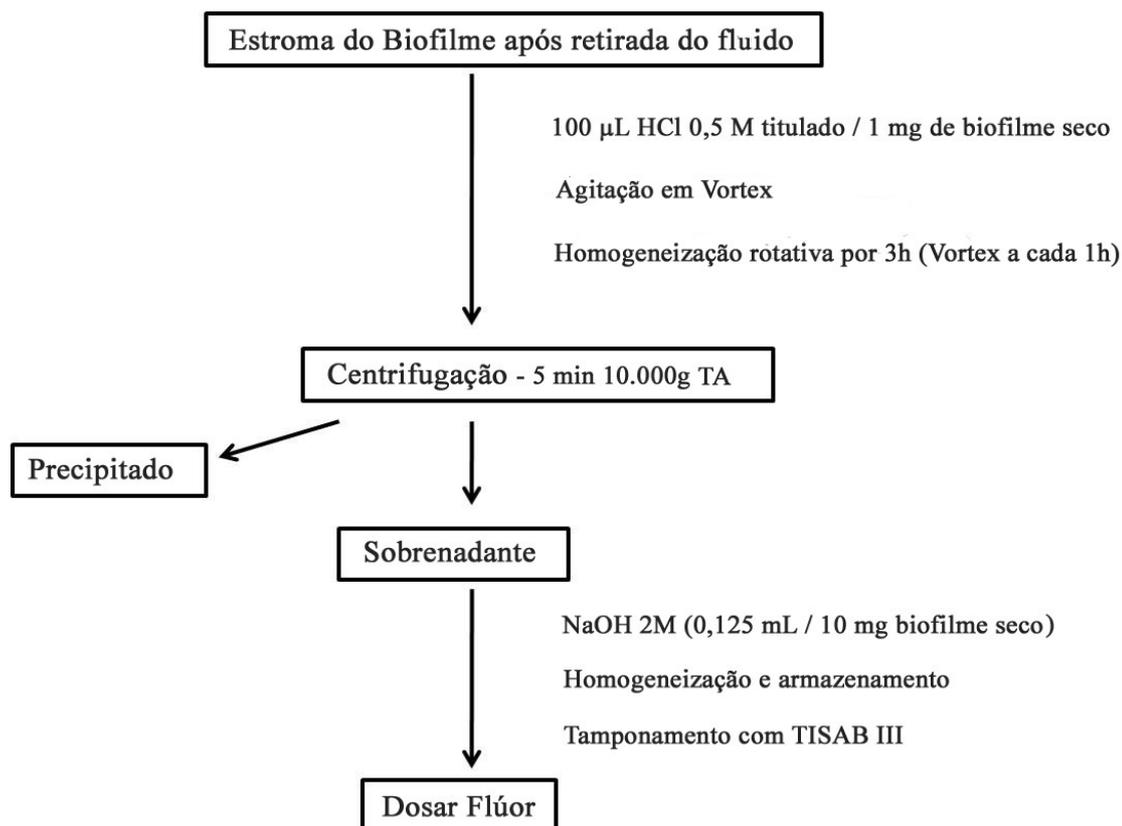


Figura 5. Fluxograma contendo método de extração para análise da concentração de flúor no biofilme dental

Determinação da concentração de fluoreto nos blocos de esmalte

- Concentração de fluoreto fracamente aderido (CaF_2)

Os blocos de esmalte foram cobertos com cera 7, deixando-se apenas a superfície de esmalte exposta. Foram então individualmente imersos em 1,0 mL de KOH 1,0M durante 24h. Após esse período, os blocos foram tamponados com 1 mL de solução TISAB II (1,0 M tampão acetato com pH 5,0, 1M NaCl e 0,4% de CDTA) modificada com 20 g NaOH/L. A concentração de CaF_2 foi determinada utilizando-se eletrodo específico (Orion) acoplado a um analisador de íons (Orion) em circuito fechado. As leituras, expressas em mV, foram convertidas em $\mu\text{g F/cm}^2$ (Figura 6).

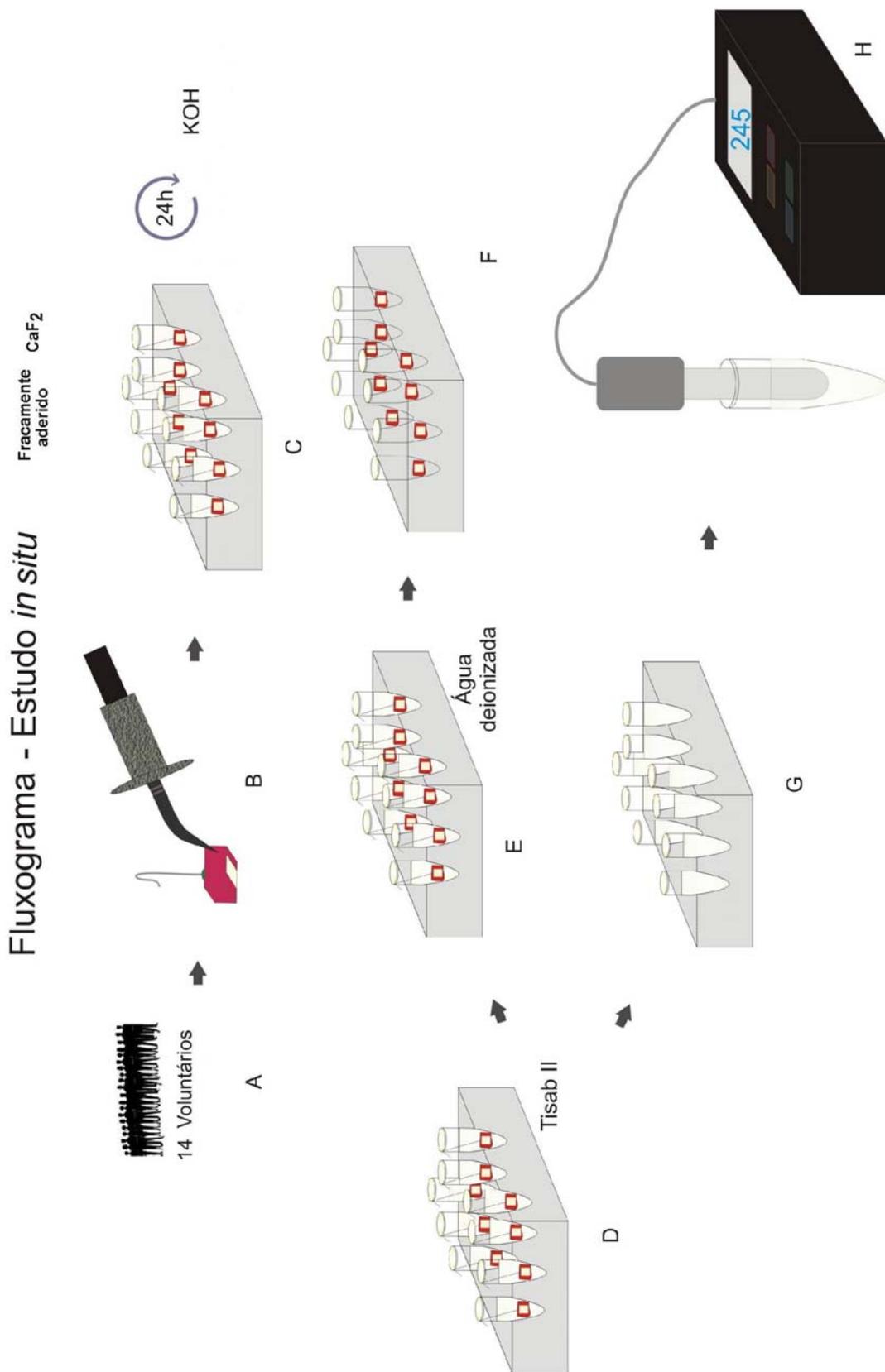


Figura 6
 A. Fase intraoral; B. Enceramento dos espécimes; C. Imersão em KOH M por 24 horas sob agitação; D. Neutralização com Tisab II; E. Lavagem com água deionizada; F. Armazenamento dos fragmentos; G. Soluções neutralizadas; H. Leitura das soluções após a realização da curva de calibração

- Concentração de fluoreto firmemente aderido (FAp)

Após a extração com KOH, estimou-se a concentração de FAp por meio da remoção de 1 camada de esmalte. Para tal, adicionou 1 mL de HCl 0,5 M a cada amostra e agitou-se por 30 segundos em agitador de tubos (Vortex). Sequencialmente, removeu-se o bloco de esmalte, agitou-se a solução e acrescentou-se 1 mL de solução TISAB II modificada com 20 g NaOH/L para neutralização. A concentração de FAp foi determinada utilizando-se o mesmo eletrodo (Orion) acoplado ao analisador de íons (Orion). As leituras, expressas em mV, foram convertidas em $\mu\text{g F/mg}$ de biofilme (Figura 7).

Análise Estatística do Estudo in situ

As análises foram realizadas utilizando o software Statgraphics Centurion XV. A homogeneidade e a normalidade das distribuições amostrais foram analisadas pelos testes de Bartlett e Shapiro-Wilks, respectivamente. Os valores médios de microdureza foram analisados por Análise de Variância e teste de Tukey. As dosagens de flúor presente no esmalte e biofilme foram analisadas por meio do teste não-paramétrico de Friedman. O nível de significância foi fixado em 5% para todos os testes.

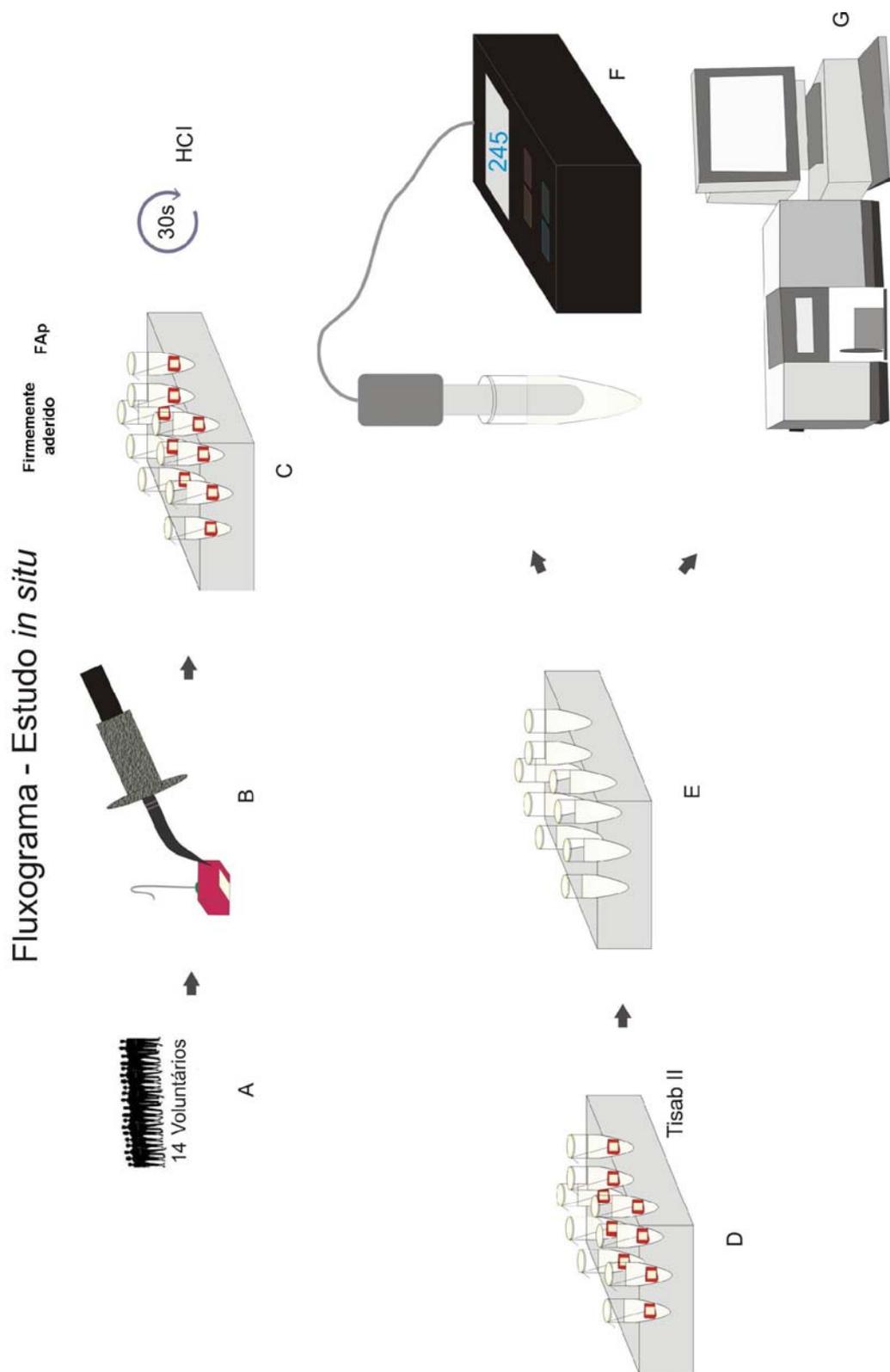


Figura 7
 A. Fase intraoral; B. Enceramento dos espécimes; C. Imersão em HCl por 30 segundos;
 D. Neutralização com Tisab II; E. Soluções neutralizadas; F. Dosagem de flúoreto; F. Dosagem de fósforo

Resultados

4. RESULTADOS

4.1 Estudo *in vitro*

Teste de Microdureza

Por meio do teste de Shapiro-Wilks ($p < 0,05$), verificou-se que os dados não apresentam distribuição normal de erros. Entretanto, como a pressuposição essencial à condução da Análise de Variância é a de homocedasticidade, e esta acusou homogeneidade dos dados, prosseguiu-se com a análise paramétrica.

A Análise de Variância não demonstrou efeito significativo para a interação entre os fatores *Substrato* e *Tratamento* ($p = 0,1717$), mas houve diferença estatisticamente significativa entre o *Substrato*, sendo que o esmalte bovino apresentou os maiores valores de microdureza ($p = 0,0019$). Também houve diferença estatisticamente significativa para o fator *Tratamento* ($p < 0.0001$).

Após o teste de Tukey ao fator *Tratamento*, observou-se que todos os grupos diferiram significativamente entre si ($p < 0,05$). Os substratos irradiados com laser de CO_2 (CO_2) apresentaram microdureza estatisticamente superior aos demais tratamentos. A menor microdureza foi observada para o grupo controle, no qual não se realizou tratamento (ST). O gel de flúor fosfato acidulado a 1,23% (FFA) e o verniz fluoretado a 5% (VF) geraram valores intermediários de microdureza. Portanto, evidenciou-se que: $\text{CO}_2 > \text{VF} > \text{FFA} > \text{ST}$.

A Tabela 2 exibe as médias e desvios padrões da microdureza do esmalte para os distintos tratamentos independentemente dos substratos. A Tabela 3 mostra exibe as médias e desvios padrões da microdureza do esmalte para os substratos (humano e bovino) independentemente dos tratamentos.

Tabela 2. Médias (n = 12) e desvios padrões da microdureza (KHN) obtida para os distintos tratamentos, independentemente dos substratos, após desafio cariogênico *in vitro*

Laser de CO ₂ 10,6 μm (2W)	Verniz fluoretado a 5% (NaF)	Gel de flúor fosfato acidulado a 1,23%	Sem tratamento (controle)
(252 ± 32)a	(207 ± 26)b	(172 ± 23)c	(154 ± 20)d

Letras minúsculas distintas implicam em diferença significativa entre tratamentos ($p < 0,05$).

Tabela 3. Médias (n = 12) e desvios padrões da microdureza (KHN) obtida para ambos os substratos, independentemente dos tratamentos, após desafio cariogênico *in vitro*

Bovino	Humano
(204 ± 49)a	(188 ± 41)b

Letras minúsculas distintas implicam em diferença significativa entre substratos ($p < 0,05$).

Microscopia Eletrônica de Varredura

As fotomicrografias não indicaram diferença qualitativa relevante entre o esmalte humano e bovino.

Os espécimes tratados com gel de flúor fosfato acidulado a 1,23% exibiram superfícies de esmalte com padrão semelhante às obtidas nos grupos que não receberam tratamento (controles). Os prismas de esmalte não estavam expostos e a maior parte da superfície estava coberta por camada de *smear* (Figuras 8A, 8B, 8C e 8D).

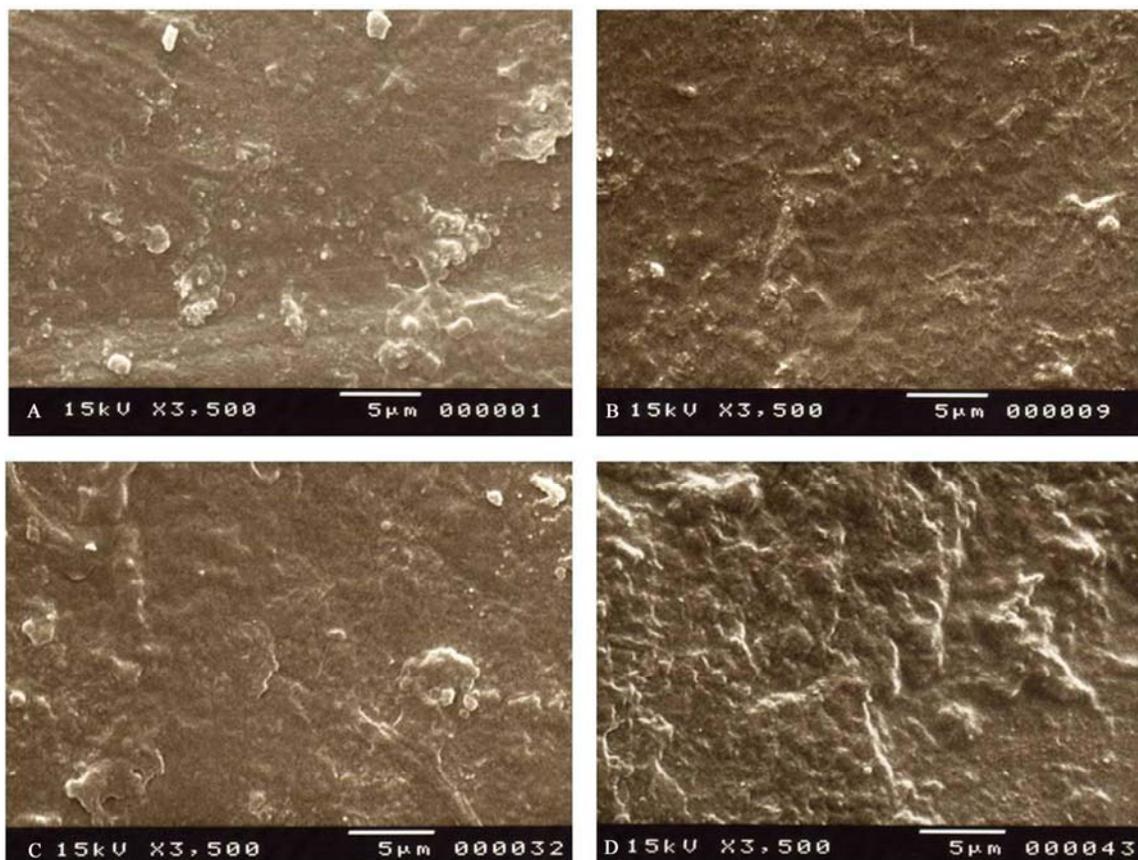


Figura 8. A) Esmalte humano sem tratamento (3500x), B) Esmalte bovino sem tratamento (3500x), C) Esmalte humano após aplicação de gel de flúor fosfato acidulado a 1,23% (3500x), e D) Esmalte bovino após aplicação de gel de flúor fosfato acidulado a 1,23% (3500x) – Notar ausência de alteração morfológica relevante entre os grupos, além de camada de *smear* recobrendo a superfície.

Os espécimes tratados com verniz de fluoreto de sódio a 5% revelaram superfície irregular com remanescente de camada de *smear*. As superfícies de esmalte também apresentaram fina camada granulosa de estruturas globulares, provavelmente derivadas do precipitado do verniz fluoretado. Esta característica topográfica foi mais evidente para o esmalte bovino (Figuras 9A e 9B).

Quando a superfície foi irradiada com laser de CO₂ (10,6 μm), as modificações estruturais foram notáveis. No esmalte humano, foi possível observar camada superficial modificada pela ação do laser, com coalescência dos cristais e formação de massa sólida e irregular (Figura 9C). No esmalte bovino, a irradiação com laser de CO₂

promoveu fusão e recristalização da superfície, com aspecto uniforme. Também foram observadas fissuras distribuídas pela superfície dos espécimes (Figura 9D).

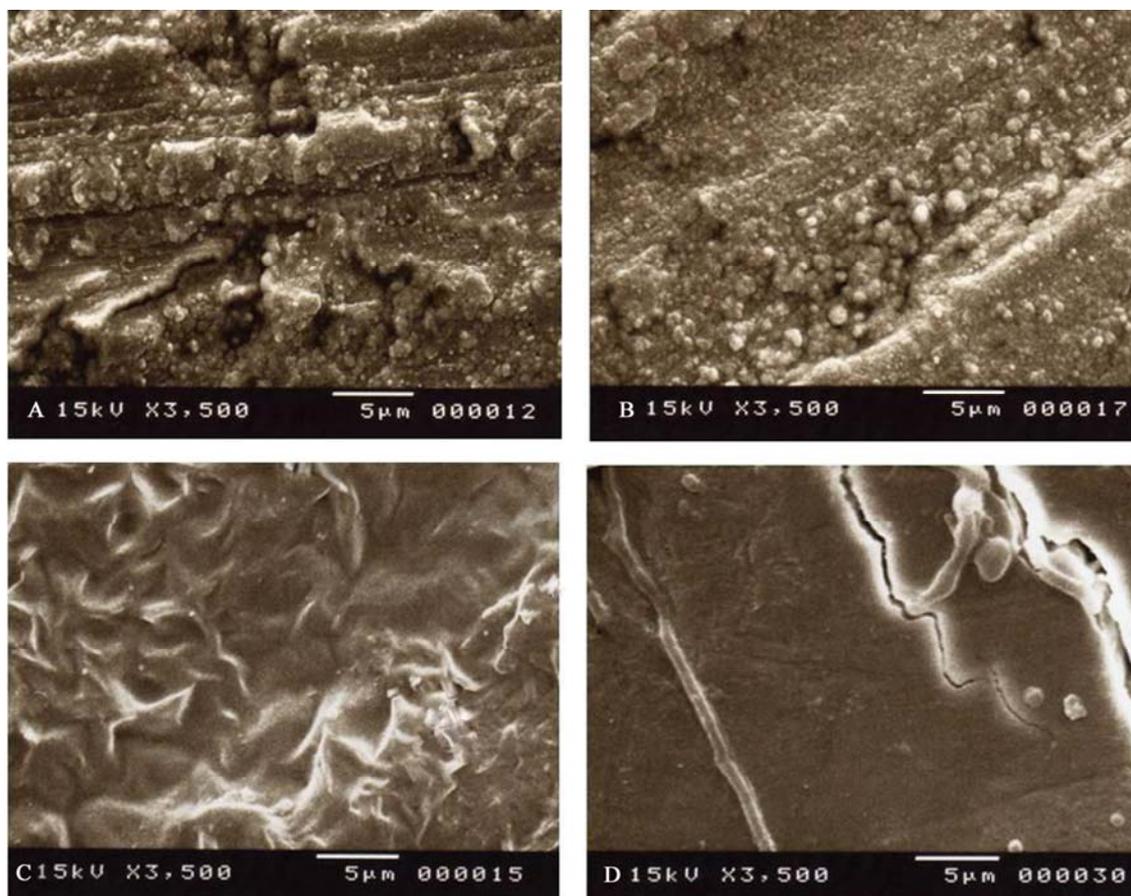


Figura 9. A) Esmalte humano após aplicação do verniz de fluoreto de sódio a 5% (3500x), B) Esmalte bovino após aplicação do verniz de fluoreto de sódio a 5% (3500x) – Observar estruturas globulares esparsas sobre a superfície provavelmente derivadas do precipitado do verniz. C) Esmalte humano irradiado com laser de CO₂ (3500x) e D) Esmalte bovino irradiado com laser de CO₂ (3500x) – Notar fusão, recristalização e fissuras na superfície.

4.2 Estudo *in situ*

4.2.1 Teste de Microdureza

O teste pareado revelou que não houve efeito residual da primeira fase na segunda, sendo assim, o efeito de *carry-over* não foi significativo ($p = 0,124$).

O teste de Shapiro-Wilks ($p = 0,00106223$) demonstrou que os dados não apresentam distribuição normal de erros. Entretanto, como a pressuposição essencial à condução da Análise de Variância é a de homocedasticidade, e o Teste de Bartlett's ($p = 0,168323$) acusou homogeneidade dos dados, prosseguiu-se com a análise paramétrica.

A Análise de Variância (ANOVA) a dois critérios revelou que houve efeito significativo da interação dos fatores *Verniz* e *Laser* ($p = 0,0001$).

Independentemente da aplicação dos vernizes fluoretado ou placebo, a microdureza do esmalte foi estatisticamente superior ($p < 0,05$) quando esse substrato foi irradiado com laser de CO₂.

Quando a aplicação dos vernizes não foi seguida pela irradiação com laser de CO₂, não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) na microdureza do esmalte bovino em função do uso do produto fluoretado e placebo.

A Tabela 4 exhibe as médias e desvios padrões da microdureza do esmalte bovino em cada grupo experimental e o Gráfico 1 ilustra os resultados obtidos.

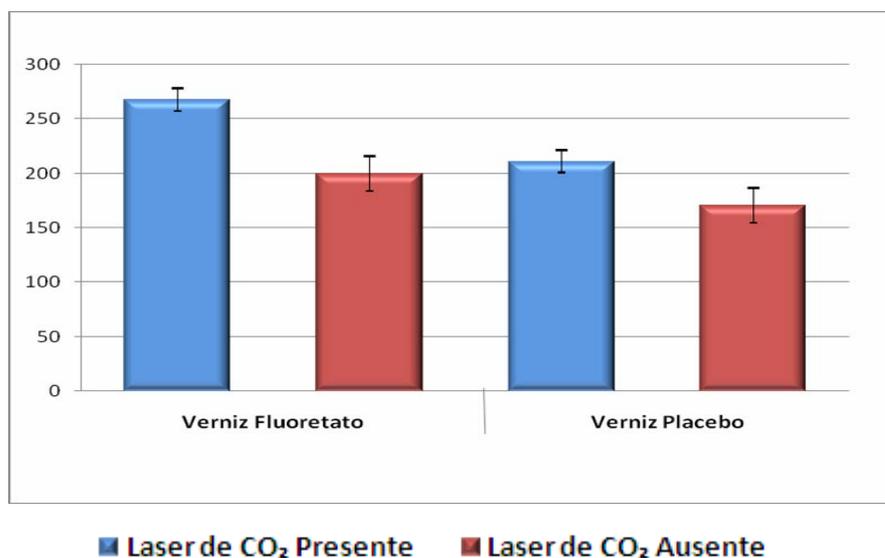
Tabela 4. Médias ($n = 14$) e desvios padrões da microdureza (KHN) do esmalte bovino de acordo com cada grupo experimental, após desafio cariogênico *in situ*

Verniz	Laser de CO ₂	Presente	Ausente
	Fluoretado	(267,6 ± 10,4) Aa	(199,7 ± 16,2) Ab
Placebo	(210,8 ± 20,1) Ba	(170,5 ± 15,9) Ab	

Letras maiúsculas distintas implicam em diferença significativa entre substratos dentro de uma mesma coluna ($p < 0,05$).

Letras minúsculas distintas implicam em diferença significativa entre tratamentos dentro de uma mesma linha ($p < 0,05$).

Gráfico 1. Microdureza do esmalte bovino seccionado longitudinalmente (KHN) após diferentes tratamentos da superfície e subsequente desafio cariogênico *in situ*.



Análise da concentração de flúor no biofilme e esmalte

Diante do não atendimento às pressuposições do modelo de análise paramétrica (Análise de Variância), foram aplicados, nos dados obtidos, testes não paramétricos de Friedman e de comparações múltiplas por variável ($\alpha = 0,05$).

Ao analisar o biofilme dental formado sobre os blocos de esmalte após o desafio cariogênico, observou-se que o grupo tratado com verniz fluoretado apresentou maior quantidade de flúor, estatisticamente diferente dos demais grupos ($p < 0,05$), que, por sua vez, foram estatisticamente semelhantes entre si ($p > 0,05$) (Tabela 5).

No esmalte, as dosagens de fluoreto fracamente aderido (CaF₂) e de fluoreto firmemente aderido (FAp), apesar das diferenças numéricas, apresentaram resultados estatísticos com desempenho similares.

As maiores quantidade de flúor foram encontradas nos grupos tratados com verniz fluoretado associado ao laser de CO₂ ($p < 0,05$), que não diferiram estatisticamente dos grupos que receberam a aplicação apenas do verniz fluoretado ($p > 0,05$). As menores dosagens

foram obtidas para os grupos do verniz placebo ($p < 0,05$), que por sua vez, não foram diferentes estatisticamente dos grupos tratados com laser de CO₂ associado ao verniz placebo ($p > 0,05$). O verniz fluoretado não diferiu estatisticamente do verniz placebo associado ao laser de CO₂ (Tabela 5).

Tabela 5. Soma das ordens (S.O.), média e desvios padrões (dp) da concentração de flúor no esmalte ($\mu\text{gF}/\text{cm}^2$) e biofilme ($\mu\text{gF}/\text{mg}$ placa) e resultados dos testes de Friedman de acordo com cada grupo experimental, após desafio cariogênico *in situ*

	CaF ₂		FAp		F _{biofilme}	
	S.O.	Média ± dp	S.O.	Média ± dp	S.O.	Média ± dp
VP	14 A	(0,59 ± 0,53)	17 A	(1,25 ± 0,64)	23 A	(0,1 ± 0,1)
VP + CO₂	30 AB	(1,76 ± 1,81)	25 AB	(1,82 ± 1,51)	22 A	(0,3 ± 0,4)
VF	43 BC	(3,97 ± 2,52)	36 BC	(2,96 ± 1,39)	48 B	(4,7 ± 2,9)
VF + CO₂	53 C	(6,97 ± 4,96)	42 C	(4,14 ± 1,75)	27 A	(0,5 ± 0,4)

Letras maiúsculas distintas implicam em diferença significativa entre tratamentos dentro de uma mesma coluna ($p < 0,05$)

V.P. = verniz placebo, V.P. + CO₂ = verniz placebo + CO₂, VF = verniz fluoretado e VF + CO₂ = verniz fluoretado + laser de CO₂

CaF₂: $\chi^2 = 36,60$ e diferença mínima significativa (dms) = 18 (n = 14)

FAp: $\chi^2 = 18,70$ e dms = 17 (n=12)

F_{biofilme}: $\chi^2 = 22,30$ e dms = 17 (n = 12)

Discussão

5. DISCUSSÃO

A valorização da Odontologia Preventiva contribuiu para o avanço nas pesquisas com laser de CO₂ com finalidade de inibir a formação e/ou progressão das lesões de cárie (KLEIN et al., 2005; RODRIGUES et al., 2006; TAGLIAFERRO et al., 2007; STEINER-OLIVEIRA et al., 2008). A composição química e a morfologia do esmalte dental são modificadas pela ação do laser de CO₂ a ponto de aumentar a resistência ácida da superfície, sem alterar o aspecto macroscópico da estrutura dental (NELSON et al., 1987; FEATHERSTONE et al., 1998; KANTOROWITZ et al., 1998; HSU et al., 2001, TEPPER et al., 2004).

Diferentes métodos são utilizados para avaliar a capacidade de inibição da progressão das lesões de cárie no esmalte, destacando-se a análise da microdureza da subsuperfície que foi submetida ao desafio cariogênico (FEATHERSTONE et al., 1998; KANTOROWITZ et al., 1998, STEINER-OLIVEIRA et al., 2008; TAGLIAFERRO et al., 2007; ESTEVES-OLIVEIRA et al., 2009). A determinação da microdureza pode fornecer evidência indireta do ganho ou perda mineral no tecido dental duro em estágios iniciais da lesão de cárie (ARENDS; TEN BOSH, 1992; ZERO, 1995). WHITE (1978) demonstrou substancial correlação linear (0,94) entre mudanças observadas na microdureza e imagens obtidas por microradiografias durante o processo de remineralização da estrutura dental. Como o teste de microdureza é altamente sensível às alterações de conteúdo mineral do substrato (FEATHERSTONE et al., 1983), avaliou-se, no presente estudo, o efeito da irradiação do laser de CO₂ e de compostos fluoretados na progressão da lesão de cárie do esmalte, por meio desse método.

O uso do esmalte bovino em substituição ao humano em estudos de cárie envolvendo laser de CO₂ foi validado no trabalho *in vitro* desta tese. Apesar de o esmalte bovino tratado com CO₂ ou composto fluoretado ter apresentando valores de microdureza estatisticamente

superiores ao humano, o comportamento de ambos os substratos foi similar para os diferentes tratamentos propostos, incluindo. O esmalte bovino é mais irregular que o humano, pois se desenvolve mais rapidamente antes e após sua erupção (MORIWAKI et al., 1968; MELLBERG, 1992). TANAKA et al. (2008) relataram maior densidade do dente bovino em relação ao humano, o que indica diferença no grau de mineralização dos substratos e pode, provavelmente, explicar os maiores valores médios de microdureza encontrados para o substrato bovino. Entretanto, a diferença entre os substratos é apenas quantitativa e não qualitativa (MELLBERG, 1992).

Lesões de cárie artificiais incipientes e padronizadas foram obtidas por meio da ciclagem de pH, que é um método *in vitro* no qual o substrato dental é mantido na solução desmineralizadora, composta de tampões ácidos com cálcio e fosfato em baixo pH, com o objetivo de simular os episódios de queda de pH que ocorrem no biofilme dental e na superfície do esmalte. O estágio de remineralização é simulado com a imersão do fragmento dental em soluções contendo cálcio e fosfato em um grau de saturação semelhante ao da saliva (TEN CATE; DUIJSTERS, 1982; FEATHERSTONE et al., 1986; TAGLIAFERRO et al., 2007). Além da utilização deste método no estudo *in vitro*, optou-se por realizar a ciclagem de pH por 5 dias antes do desafio cariogênico *in situ*, com o objetivo de se obterem lesões microscópicas de cárie ativa (simulando pacientes de alto risco de cárie) e justificar o uso dos tratamentos propostos.

Os resultados obtidos no estudo *in vitro* demonstraram maiores valores de microdureza do esmalte com uma única aplicação de laser de CO₂ (10,6 µm), se comparada aos demais grupos, independentemente do tipo de substrato dental utilizado. Isto sugere que houve aumento da resistência ácida dental e, conseqüentemente, inibição da progressão das lesões de cárie. Estudos prévios também verificaram *in vitro* a inibição da formação e/ou

progressão da cárie quando o esmalte foi irradiado com laser de CO₂ (10,6 μm) (FOX et al., 1992; TEPPER et al., 2004; STEINER-OLIVEIRA et al., 2008).

Distintas explicações para o aumento da resistência ácida no esmalte tratado com laser de CO₂ tem sido sugeridas. Especula-se que a matriz de esmalte seja desnaturada parcialmente e sua permeabilidade diminuída após a irradiação com laser de CO₂, o que dificulta a difusão ácida por entre os poros do substrato, reduzindo as chances de desmineralização (FEATHERSTONE; NELSON, 1987; FOX et al., 1992; TEPPER et al., 2004; KWON et al., 2005).

Outra provável explicação está na combinação de permeabilidade reduzida com menor solubilidade do substrato causada pela fusão e recristalização das microestruturas da superfície de esmalte (RODRIGUES et al., 2004; MOSHONOV et al., 2005; CHIANG et al., 2008). O conteúdo de água e carbonato do esmalte também foi descrito como reduzido quando a superfície foi irradiada com laser de CO₂ (McCORMACK et al., 1995; PHAN et al., 1999). FOX et al. (1992) atribuíram a diminuição da solubilidade do esmalte após a irradiação com laser de CO₂ às mudanças na dissolução da taxa de hidroxiapatita, criando um composto menos reativo.

No presente estudo irradiou-se a superfície do esmalte com baixos parâmetros do laser de CO₂ (2W, 10 s, 50 ms, 2Hz) com o objetivo de modificar a superfície do esmalte sem realizar ablação do substrato, o que seria indesejável em uma condição clínica. O aumento dos parâmetros de irradiação e, conseqüentemente, da densidade de energia liberada, reduzem a progressão da cárie até um limiar de inibição alcançado por determinada temperatura. Ultrapassado esse limiar, a irradiação do esmalte pode promover modificações da estrutura que acabam por tornar o esmalte mais solúvel (FOWLER; KURODA, 1986; NELSON et al., 1987). Nesse caso a hidroxiapatita carbonatada da estrutura é transformada em fases mais solúveis como difosfato de tetracálcio (NELSON et al., 1987).

A análise das fotomicrografias revelou que a irradiação com laser de CO₂ (10,6 μm) causou derretimento e recristalização do esmalte, criando um aspecto liso, embora com algumas fissuras distribuídas pela superfície. A fusão dos cristais hexagonais do esmalte irradiado com laser de CO₂ também foi observado por WU et al. (2002) em MEV. Porém, outros estudos afirmam que a fusão da superfície do esmalte não é necessária para aumentar a resistência à desmineralização (McCORMACK et al., 1995; KANTOROWITZ et al., 1998; HSU et al., 2001). Alterações químicas nos cristais de apatita (não visualizadas por MEV), em uma profundidade próxima à superfície, poderiam ser responsáveis pelo efeito anticárie do substrato irradiado com laser de CO₂ (McCORMACK et al., 1995).

Considerando-se os tratamentos fluoretados empregados no delineamento *in vitro*, verificou-se que os resultados deste estudo são consistentes com o trabalho de YAMAZAKI et al., (2007), os quais relataram que a progressão da lesão de cárie foi inibida pelas soluções fluoretadas de alta concentração, em modelo artificial de ciclagem de pH.

Quando um composto contendo alta concentração de flúor entra em contato com a superfície dental, ocorre dissolução da camada mais externa do esmalte (0,1 a 0,2 μm) e o cálcio dissolvido é precipitado na forma de CaF₂ (SAXEGAARD; RÖLLA, 1988; MARGOLIS; MORENO, 1990). Este composto serve como um reservatório de flúor para ser liberado durante os desafios cariogênicos (BRUUN; GIVSKOV, 1991; ØGAARD, 2001; TENUTA et al., 2008). O flúor é precipitado na superfície e os reservatórios permanecem por mais tempo liberando CaF₂ para o meio, especialmente quando se utilizam substâncias como os vernizes fluoretados, cuja permanência na superfície dental se dá por um período maior (ATTIN et al., 2005). Adicionalmente, o uso dos vernizes permite a formação de depósitos minerais enriquecidos com flúor no interior do esmalte que podem bloquear parcialmente o transporte de ácidos no mineral (diminuição da taxa de difusão), um fenômeno que reduziria a formação e/ou a progressão de lesões de cárie (MAIA et al., 2003; SËPPA, 2004).

As fotomicrografias dos espécimes tratados com verniz fluoretado revelaram uma fina camada de estruturas globulares de diferentes tamanhos depositados na superfície do esmalte, provavelmente derivadas da zona de precipitação de CaF_2 . Esses achados contribuem para explicar a superioridade nos resultados, expressa em valores de microdureza, encontradas quando o esmalte foi tratado com verniz de fluoreto de sódio a 5% se comparado ao gel de flúor fosfato acidulado a 1,23%.

SHOBHA et al. (1987) reportaram que ambos, o flúor fosfato acidulado e o verniz fluoretado, inibem a desmineralização da superfície, mas o verniz fluoretado a 5% foi significativamente mais efetivo na inibição da progressão das lesões de cárie (50 vs. 30% de redução) do que o flúor fosfato acidulado a 1,23%. Estudo de meta-análise (MARINHO et al., 2002) e revisão sistemática da literatura (HIIRI et al., 2006) demonstraram substancial efeito inibitório na progressão das lesões de cárie quando o esmalte foi tratado com verniz de fluoreto de sódio a 5%. Porém, é importante enfatizar que a atuação do fluoreto na prevenção da desmineralização do esmalte é dependente das condições experimentais utilizadas, como a técnica e frequência de aplicação da substância fluoretada (MANDEL et al., 1996; CLARKSON et al., 2000). O potencial efeito cariostático das fontes de fluoreto testadas neste estudo poderia ser maior se tivesse sido realizada mais de uma aplicação.

No segundo estudo, optou-se por empregar um delineamento *in situ*, pois este modelo possibilita a interação do corpo-de-prova com o ambiente oral (saliva e biofilme) e o controle das variáveis experimentais, de modo não alcançado com estudos totalmente clínicos (ZERO, 1995).

Dessa forma, este estudo foi projetado para reproduzir a situação clínica na qual a terapia de fluoreto é combinada com tratamento de laser de CO_2 . Para tanto, analisaram-se as alterações na microdureza do esmalte seccionado longitudinalmente, a concentração de flúor

no fluido do biofilme e no esmalte, permitindo estudar o efeito anticárie de maneira padronizada e reprodutível.

No estudo *in situ*, tal como no trabalho *in vitro*, constatou-se maior microdureza do esmalte bovino quando da irradiação com laser de CO₂, independentemente da aplicação dos vernizes fluoretado ou placebo, o que sugere maior inibição da progressão das lesões de cárie com o uso do laser. Ressaltam-se aqui as mesmas justificativas relatadas anteriormente para o estudo *in vitro* para o fato do laser de CO₂ ter apresentado desempenho superior aos demais tratamentos.

Quando a aplicação dos vernizes não foi seguida pela irradiação com laser de CO₂, não houve diferença significativa na microdureza do esmalte bovino em função do uso do produto fluoretado e placebo. A similaridade de comportamento entre o verniz placebo e verniz fluoretado, difere do estudo *in vitro*, cujo grupo tratado com verniz foi estatisticamente superior ao sem tratamento (controle). Porém, há de se ressaltar as diferenças metodológicas de ambos os estudos, especialmente no que se refere às condições do meio bucal presente no delineamento *in situ*.

Em situação clínica, a penetração do flúor por entre a estrutura cristalina do esmalte pode ser um processo lento (ARENDS; CHRISTOFFERSEN, 1986). O tempo necessário para que o flúor se torne ativo pode chegar ao dobro do requerido em lesões artificiais, devido, em parte, à presença de substâncias orgânicas e variações de concentração do meio bucal (ARENDS; SCHUTHOF; 1980). ARENDS; GELHARD (1983) apresentaram evidência experimental de que o flúor necessita de aproximadamente 90 dias para penetrar 50 µm em lesões subsuperficiais naturais com profundidade em torno de 100 µm.

No presente estudo *in situ*, como o tempo decorrido entre a aplicação do verniz fluoretado e a realização do teste de microdureza foi de apenas 14 dias, e as indentações

foram realizadas a 30 μm da superfície, pode-se supor que as leituras de microdureza tenham sido feitas em uma profundidade do esmalte em que o flúor não tenha atingido.

É importante considerar também que o meio bucal apresenta flúor disponível proveniente dos dentifrícios, soluções de bochecho, alimentos, água e bebidas, que podem contribuir para a inibição da progressão das lesões de cárie (ARENDS; CHRISTOFFERSEN, 1986; POULSEN; SCHEUTZ, 1999). Neste estudo, visando simular a condição *in vivo*, todos os voluntários utilizaram dentifrício fluoretado mesmo nos grupos que receberam o tratamento placebo (verniz sem flúor), o que pode ter favorecido o comportamento similar entre os vernizes placebo e fluoretado.

Ao analisar o biofilme formado sobre os blocos de esmalte após o desafio cariogênico, observou-se que o grupo tratado com verniz fluoretado apresentou maior quantidade de flúor, o que sugere que os reservatórios de CaF_2 foram ativados e liberaram flúor para o biofilme durante o período experimental. TENUTA et al. (2008) observaram que após 30 min de uso do dispositivo (desafio *in situ*), elevada concentração de flúor foi observada no biofilme dos fragmentos tratados com flúor fosfato acidulado em comparação com o controle. Os autores descrevem, portanto, evidente relação entre a concentração de CaF_2 no esmalte decorrente do uso de compostos fluoretados de alta concentração e o flúor encontrado no biofilme dental.

No esmalte, a combinação do verniz fluoretado com o laser de CO_2 proporcionou maior concentração de flúor fracamente ligado (CaF_2) e fortemente ligado (FAp), sem diferença estatisticamente significante do tratamento apenas com verniz fluoretado. A esse respeito, TEPPER et al., (2004); CHIN-YING et al. (2004) reportaram que a irradiação do laser de CO_2 sobre esmalte pré-tratado com compostos fluoretados promoveu aumento significante na concentração de flúor do esmalte, no entanto ambos estudos são modelos *in vitro* de delineamento.

Há dois principais mecanismos envolvidos com o aumento da dosagem de flúor no esmalte após irradiação com laser de CO₂. O primeiro baseia-se no fato de que o calor aumenta a incorporação do fluoreto no esmalte, o que altera sua propriedade cristalina (TEPPER et al., 2004). O calor provocado pela irradiação laser poderia, portanto, ter favorecido o processo de deposição do flúor nos espaços interprismaticos do esmalte. O segundo mecanismo relaciona-se com as alterações morfológicas que o laser causa na superfície, principalmente as microfissuras que favorecem a deposição e fixação do flúor ao substrato irradiado (ZHANG et al., 1996). Neste estudo, a irradiação do esmalte com o laser de CO₂ (10,6 μm) com 2W de potência promoveram fissuras na superfície, observadas em MEV. ZUERLEIN et al. (1999) relataram que o efeito laser-flúor pode estar concentrado nos primeiros 20-30 μm da superfície.

Outro aspecto a ser considerado é que o pH crítico (5,5) para a dissolução do esmalte é reduzido para 4,8 após a irradiação com laser de CO₂. Quando o flúor estiver presente na superfície irradiada, esse pH crítico é reduzido ainda mais (4,3), o que dificulta a formação e/ou progressão de lesões de cárie (FOX et al., 1992).

A redução do pH do meio bucal abaixo do limiar crítico determina o início do processo de desmineralização da estrutura dental (ARENDS; TEN BOSCH, 1992). Se houver flúor no meio bucal no momento em que o pH do biofilme voltar a subir ou quando este for removido pela escovação, ocorrerá a ativação da remineralização, ou seja, a precipitação de mineral nos locais em que houve perda (ARENDS; TEN BOSCH, 1992; CURY et al., 2004). Portanto, mais importante do que ter flúor em altas concentrações no esmalte, é possuir fluoreto disponível na cavidade bucal para ser incorporado à estrutura dental, quando o mineral solúvel HA for dissolvido como consequência do processo de cárie (TENUTA et al., 2008).

Apesar do efeito sinérgico do flúor e laser de CO₂ não ter sido evidenciado no presente estudo, essa associação poderia ser interessante clinicamente. O flúor não consegue penetrar facilmente nas fóssulas e fissuras dentais, ao passo que o laser pode criar microfissuras na estrutura da superfície que favorecem a penetração deste no esmalte. O flúor também poderia difundir-se mais facilmente para a área interproximal, local onde o laser não alcançaria (PHAN et al., 1999).

Os resultados da presente pesquisa abrem perspectivas para que estudos futuros sejam conduzidos com o objetivo de investigar o mecanismo de ação da associação do flúor com o laser de CO₂ na estrutura dental. Cumpre ressaltar que comparações mais apropriadas dos resultados desta pesquisa com aqueles relatados na literatura não puderam ser realizadas em virtude da falta de trabalhos *in situ* utilizando o laser de CO₂ com o intuito de inibir a desmineralização dental. Ademais, os achados da literatura são conflitantes sob muitos aspectos, especialmente no que se refere ao comprimento de onda dos equipamentos e parâmetros de irradiação do laser de CO₂.

Embora o laser de CO₂ tenha se mostrado uma ferramenta promissora para a Odontologia Preventiva, ainda há muito que se investigar em torno desta tecnologia antes que seja utilizado na prática clínica.

Conclusões



6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos e considerando as condições empregadas neste estudo, pode-se concluir que:

1. O laser de CO₂ evitou a progressão das lesões de cárie artificial mais eficientemente que o verniz fluoretado a 5% e gel de flúor fosfato acidulado a 1,23% no esmalte bovino e humano.
2. O esmalte bovino pode ser um substituto ao esmalte humano em estudos de formação e/ou progressão das lesões de cárie envolvendo o laser de CO₂.
3. O laser de CO₂ promoveu maior inibição da progressão de cárie, em modelo *in situ*, independentemente da aplicação dos vernizes fluoretado ou placebo.
4. O uso do verniz fluoretado a 5% resultou em maior quantidade de flúor no biofilme dental, enquanto que, a associação verniz fluoretado a 5% e laser de CO₂ proporcionou maior incorporação de flúor (fracamente ligado – CaF₂ e fortemente ligado – FAp) no esmalte.

Referências

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

ARENDS, J.; SCHUTHOF, J. Microharness and lesion depth studies of artificial caries lesions: a comparison of gelatin and HEC based systems. **Journal of Biology Buccale**, v. 8, n.2, p.175-81, 1980.

ARENDS, J.; GELHARD, T. Enamel remineralization in vivo. **Zahnarzt**, v. 27, n. 5, p. 295-304, 1983 *apud* ARENDS, J.; CHRISTOFFERSEN, J. The nature of early caries lesions in enamel. **Journal of Dental Research**. v. 65, n. 1, p. 2-11. 1986.

ARENDS, J.; CHRISTOFFERSEN, J. The nature of early caries lesions in enamel. **Journal of Dental Research**. v. 65, n. 1, p. 2-11. 1986.

ARENDS, J.; TEN BOSCH, J. J. Demineralization and remineralization evaluation techniques. **Journal of Dental Research**, v.71, p. 924-928, 1992.

ATTIN, T.; GRIEME, R.; PAQUÉ, F.; HANNIG, C.; BUCHALLA, W.; ATTIN, R. Enamel fluoride uptake of a novel water-based fluoride varnish. **Archives of Oral Biology**, v. 50, n. 3, p. 317-322, 2005.

BENELLI, E. M.; SERRA, M. C.; RODRIGUES, A. L. JR.; CURY, J. A. In situ anticariogenic potential of glass ionomer cement. **Caries Research**, v. 27, n. 4, p. 280-284, 1993.

BRUUN, C.; GIVSKOV, H. Formation of CaF₂ on sound enamel and in caries-like enamel lesions after different forms of fluoride applications in vitro. **Caries Research**, v. 25, n. 2, p. 96-100, 1991.

CAN, A. M.; DARLING, C. L.; HO, C.; FRIED, D. Non-destructive assessment of inhibition of demineralization in dental enamel irradiated by CO₂ laser at ablative irradiation intensities with PS-OCT. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 40, n. 5, p. 342-349, 2008.

CEBALLOS, L.; OSORIO, R.; TOLEDANO, M.; MARSHALL, G. W. Er:YAG laser pretreatment on in vitro secondary caries formation around composite restorations. **American Journal of Dentistry**, v.13, n. 1, p. 46-49, 2000.

CECCHINI, R. C. M.; ZECELL, D. M.; OLIVEIRA, E.; FREITAS, P. M.; EDUARDO, C. P. Effect of Er:YAG laser on enamel acid resistance: morphological and atomic spectrometry analysis. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 37, n. 5, p. 366-372, 2005.

*De acordo com as normas ABNT 2009 (diretrizes para teses USP)

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. JR.; PÉCORÁ, 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.

CHIN-YING, S. H.; XIAOLI, G.; JISHENG P.; WEFEL, J. S. Effects of CO₂ laser on fluoride uptake in enamel. **Journal of Dentistry**, v. 32, n. 2, p. 161-167, 2004.

CHRISTOFFERSEN, M. R.; CHRISTOFFERSEN, J. The inhibitory effects of ATP, ADP, and AMP on the rate of dissolution of calcium hydroxyapatite. **Calcified Tissue International**, v. 36, n. 6, p. 659-661, 1984.

CLARKSON, J. J. International collaborative research on fluoride. **Journal of Dental Research**, v. 79, p. 893-904, 2000.

CURY, J. A.; HASHIZUME, L. N.; DEL BEL CURY, A. A.; TABCHOURY, C. P. Effect of dentifrice containing fluoride and/or baking soda on enamel demineralization/remineralization: an in situ study. **Caries Research**, v. 35, n. 2, p. 106-110, 2001.

CURY, J. A.; TENUTA, L. M.; RIBEIRO, C. C.; PAES LEME, A. F. The importance of fluoride dentifrices to the current dental caries prevalence in Brazil. **Brazilian Dental Journal**, v. 15, n. 3, p. 167-174, 2004.

EISNTEIN, A.V. Deustsh. Phys. Ges, v. 18, p. 318, 1916. *apud* GOLDMAN, L.; GRAY, J. A.; GOLDMAN, J.; GOLDMAN, B.; MEYER, R. Effects of laser impacts on teeth. **Journal of American Dental Association**, v. 70, p. 601-6, 1965.

ESTEVEZ-OLIVEIRA, M.; ZECELL, D. M.; MEISTER, J.; FRANZEN, R.; STANZEL, S.; LAMPERT, F.; EDUARDO, C. P.; APEL, C. CO₂ laser (10.6 µm) parameters for caries prevention in dental enamel. **Caries Research**, v. 43, n. 4, p. 261-268, 2009.

FEATHERSTONE, J. D.; MELLBERG, J. R. Relative rates of progress of artificial carious lesions in bovine, ovine and human enamel. **Caries Research**, v. 15, n. 1, p. 109-114, 1981.

FEATHERSTONE, J. D. B.; O'REALLY, M. M.; SHARIATY, M. Enhancement of remineralization in vitro and in vivo. In: Leach AS, editor. Factors relating to demineralization and remineralization of teeth. IRL: Oxford, p. 23-34, 1986.

FEATHERSTONE, J. D.; NELSON, D. G. Laser effects on dental hard tissues. **Advances in Dental Research**, v. 1, n. 1, p. 21-26, 1987.

FEATHERSTONE, J. D.; BARRETT-VESPONE, N. A.; FRIED, D.; KANTOROWITZ, Z.; SEKA, W. CO₂ laser inhibitor of artificial caries-like lesion progression in dental enamel. **Journal of Dental Research**, v. 77, n. 6, p. 1397-1403, 1998.

FONSECA, R. B.; HAITER-NETO, F.; CARLO, H. L.; SOARES, C. J.; SINHORETI, M. A.; PUPPIN-RONTANI, R. M.; CORRER-SOBRINHO, L. Radiodensity and hardness of enamel and dentin of human and bovine teeth, varying bovine teeth age. **Archives of Oral Biology**, v. 53, n. 11, p. 1023-1029, 2008.

FOWLER, B. O.; KURODA, S. Changes in heated and in laser-irradiated human tooth enamel and their probable effects on solubility. **Calcified Tissue International**, v. 38, n. 4, p. 197-208, 1986.

FOX, J. L.; YU, D.; OTSUKA, M.; HIGUCHI, W. I.; WONG, J.; POWELL, G. L. Initial dissolution rate studies on dental enamel after CO₂ laser irradiation. **Journal of Dental Research**, v. 71, n. 7, p. 1389-1398, 1992.

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.

HARA, A. T.; TURSSI, C. P.; ANDO, M.; GONZÁLEZ-CABEZAS, C.; ZERO, D. T.; RODRIGUES, A. L. JR.; SERRA, M. C.; CURY, J. A. Influence of Fluoride-Releasing Restorative Material on Root Dentine Secondary Caries *in situ*. **Caries Research**, v. 40, n. 5, p. 435-439, 2006.

HIIRI, A.; AHOVUO-SALORANTA, A.; NORDBLAD, A.; MÄKELÄ, M. Pit and fissure sealants versus fluoride varnishes for preventing dental decay in children and adolescents. **Cochrane Database System Review**, v. 18, n. 4, CD003067, 2006.

HOSSAIN, M.; NAKAMURA, Y.; KIMURA, Y.; YAMADA, Y.; KAWANAKA, T.; MATSUMOTO, K. Effect of pulsed Nd:YAG laser irradiation on acid demineralization of enamel and dentin. **Journal of Clinical Laser in Medical Surgery**, v. 19, n. 2, p. 105-108, 2001.

HOSSAIN, M.M.; HOSSAIN, M.; KIMURA, Y.; KINOSHITA, J.; YAMADA, Y.; MATSUMOTO, K. Acquired acid resistance of enamel and dentin by CO₂ laser irradiation with sodium fluoride solution. **Journal of Clinical Laser in Medical Surgery**, v. 20, n. 2, p. 77-82, 2002.

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.

HSU, C. Y.; JORDAN, T. H.; DEDERICH, D. N.; WEFEL, J. S. Laser-matrix-fluoride effects on enamel demineralization. **Journal of Dental Research**, v. 80, n. 9, p. 1797-801, 2001.

KANTOROWITZ, Z.; FEATHERSTONE, J. D.; FRIED, D. Caries prevention by CO₂ laser treatment: dependency on the number of pulses used. **Journal of American Dental Association**, v. 129, n. 5, p. 585-591, 1998.

KLEIN, A. L.; RODRIGUES, L. K.; EDUARDO, C. P.; NOBRE DOS SANTOS, M.; CURY, J. A. Caries inhibition around composite restorations by pulsed carbon dioxide laser application. **European Journal of Oral Science**, v. 113, n. 3, p. 239-244, 2005.

KRASSE, B. Biological factors as indicators of future caries. **International Dental Journal**, v. 38, n. 4, p. 219-225, 1988.

KWON, Y. H.; LEE, J. S.; CHOI, Y. H.; LEE, J. M.; SONG, K. B. Change of enamel after Er:YAG and CO₂ laser irradiation and fluoride treatment. **Photomedicine Laser Surgery**, v. 23, n. 4, p. 389-394, 2005.

MAIA, L. C.; DE SOUZA, I. P.; CURY, J. A. Effect of a combination of fluoride dentifrice and varnish on enamel surface rehardening and fluoride uptake in vitro. **European Journal of Oral Science**, v. 111, n. 1, p. 68-72, 2003.

MANDEL, I. D. Caries prevention: current strategies, new directions. **Journal of American Dental Association**, v. 127, n. 10, p. 1477-1488, 1996.

MARGOLIS, H. C.; MORENO, E. C. Physicochemical perspectives on the cariostatic mechanisms of systemic and topical fluorides. **Journal of Dental Research**, v. 69 (Spec. Issue), p.606-613, 1990.

MARGOLIS, H. C.; MORENO, E. C. Composition and cariogenic potential of dental plaque fluid. **Critical Reviews in Oral Biology and Medicine**, v. 5, n. 1, p. 1-25, 1994.

MARINHO, V. C., HIGGINS, J. P., LOGAN, S., SHEIHAM, A. Fluoride varnishes for preventing dental caries in children and adolescents. **Cochrane Database System Review**, v. 3, CD002279, 2002.

McCORMACK, S. M.; FRIED, D.; FEATHERSTONE, J. D.; GLENA, R. E.; SEKA, W. Scanning electron microscope observations of CO₂ laser effects on dental enamel. **Journal of Dental Research**, v. 74, n. 10, p. 1702-1708, 1995.

MELLBERG J. R. Hard-tissue substrates for evaluation of cariogenic and anti-cariogenic activity in situ. **Journal of Dental Research**; v.71 (Spec. Issue), p.913-999, 1992.

MESSER, L. B. Assessing caries risk in children. **Australian Dental Journal**, v. 45, n. 1, p. 10-6, 2000.

MORIWAKI, Y.; KANI, T.; KOZATANI, T.; TSUTSUMI S, SHIMODE, N.; YAMAGA, R. The crystallinity change of bovine enamel during maturation. **Japanese Journal of Dentistry**, v. 9, p. 78-85, 1968.

MOSHONOV, J.; STABHOLZ, A.; BAR-HILEL, R.; PERETZ, B. Chemical analysis and surface morphology of enamel and dentin following 9.6 µm CO₂ laser irradiation versus high speed drilling. **Journal of Dentistry**, v. 33, n. 5, 427-432, 2005.

NELSON, D. G.; WEFEL, J. S.; JONGEBLOED, W. L.; FEATHERSTONE, J. D. B. Morphology, histology and crystallography of human dental enamel treated with pulsed low-energy infrared laser radiation. **Caries Research**, v. 21, n. 5, p. 411-426, 1987.

NOMELINI, S. M.; SOUZA-GABRIEL, A. E.; MARCHESAN, M. A.; SOUSA-NETO, M. D.; SILVA-SOUSA, Y. T. Ultrastructural analysis of dental surface submitted to CO₂ laser at different parameters. **Microscopic Research and Technique**, v. 72, n. 10, p. 737-743, 2009.

ÖGAARD, B. Effects of fluoride on caries development and progression in vivo. **Journal of Dental Research**, v. 69, (Special Issue), p. 813-819, 1990.

ÖGAARD, B. CaF₂ formation: Cariostatic properties and factors of enhancing the effect. **Caries Research**, v. 35, (suppl 1), p. 40-44, 2001.

PAES LEME, A. F.; DALCICO, R.; TABCHOURY, C. P. M.; DEL BEL CURY, A. A.; ROSALEN, P. L.; CURY, J. A. In situ effect of frequent sucrose exposure on enamel demineralization and on plaque composition after APF application and F dentifrice use. **Journal of Dental Research**, v. 83, n. 1, p. 71-75, 2004.

PARNELL, C.; WHELTON, H.; O'MULLANE, D. Water fluoridation. **European Archives of Paediatric Dentistry**, v. 10, n. 3, p. 141-148, 2009.

PHAN, N. D.; FRIED, D.; FEATHERSTONE, J. D. B. Laser-induced transformation of carbonated apatite to fluorapatite on bovine enamel. **Proceedings of SPIE**, v. 3593, p. 233-240, 1999.

POULSEN, S.; SCHEUTZ, F. Dental caries in Danish children and adolescents 1988-1997. **Community Dental Health**, v. 16, n. 3, p. 166-170, 1999.

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. 531-540, 2004.

RODRIGUES, L. K.; NOBRE DOS SANTOS, M.; FEATHERSTONE, J. D. *In situ* mineral loss inhibition by CO₂ laser and fluoride. **Journal of Dental Research** v.85, n. 7, p.617-621, 2006.

RÖLLA, G.; ÖGAARD, B.; DE ALMEIDA CRUZ, R. Topical application of fluorides on teeth. New concepts of mechanisms of interaction. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 20, n. 2, p. 105-108, 1993.

SAXEGAARD, E.; RÖLLA, G. Fluoride acquisition on and in human enamel during topical application in vitro. **Scandinavian Journal of Dental Research**, v. 96, n. 6, p. 523-535, 1988.

SEPPÄ, L. The future of preventive programs in countries with different systems for dental care. **Caries Research**, v. 35, (suppl 1), p. 26-29, 2001.

SEPPÄ, L. Fluoride varnishes in caries prevention. **Medical Principles and Practice**, v. 13, n. 6, p. 307-311, 2004.

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, n. 2, p. 143-147, 1992.

SHOBHA T, NANDLAL B, PRABHAKAR AR, SUDHA P. Fluoride varnish versus acidulated phosphate fluoride for schoolchildren in Manipal. **Journal of Indian Dental Association**. v.59, n.6, p.157-160, 1987.

STEINER-OLIVEIRA, C.; RODRIGUES, L. K.; LIMA, E. B.; NOBRE DOS SANTOS, M. Effect of the CO₂ laser combined with fluoridated products on the inhibition of enamel demineralization. **Journal of Contemporary Dental Practice**, v. 9, n. 2, p. 113-121, 2008.

TAGLIAFERRO, E. P.; RODRIGUES, L. K.; NOBRE DOS SANTOS, M.; SOARES, L. E.; MARTIN, A. A. Combined effects of carbon dioxide laser and fluoride on demineralized primary enamel: An in vitro study. **Caries Research**, v. 41, n. 1, p. 74-76, 2007.

TANAKA, J. L.; MÉDICI FILHO, E.; SALGADO, J. A.; SALGADO, M. A.; MORAES, L. C.; MORAES, M. E.; CASTILHO, J. C. Comparative analysis of human and bovine teeth: radiographic density. **Brazilian Oral Research**, v. 22, n. 4, p. 346-351, 2008.

TEN CATE, J. M.; DUIJSTERS, P. P. E. Alternating demineralization and remineralization of artificial enamel lesions. **Caries Research**, v. 16, n. 3, p. 201-210, 1982.

TEN CATE, J. M.; FEATHERSTONE, J. D. B. Mechanistic aspects of the interactions between fluoride and dental enamel. **Critical Reviews in Oral Biology and Medicine**, v. 2, n. 3, p. 283-296, 1991.

TEN CATE, J. M. Current concepts on the theories of the mechanism of action of fluoride. **Acta Odontologica Scandinavia**, v. 57, n. 6, p. 325-329, 1999.

TENUTA L. M.; RICOMINI FILHO, A. P.; DEL BEL CURY, A. A.; CURY, J. A. Effect of sucrose on the selection of *mutans streptococci* and *lactobacilli* in dental biofilm formed in situ. **Caries Research**, v. 40, n. 6, p. 546-549, 2006.

TENUTA, L. M.; CEREZETTI, R. V.; DEL BEL CURY, A. A.; TABCHOURY, C. P.; CURY, J. A. Fluoride release from CaF₂ and enamel demineralization. **Journal of Dental Research**, v. 87, n. 11, p. 1032-1036, 2008.

TEPPER, S. A.; ZEHNDER, M.; PAJAROLA, G. F.; SCHMIDLIN, P. R. Increased fluoride uptake and acid resistance by CO₂ laser-irradiation through topically applied fluoride on human enamel in vitro. **Journal of Dentistry**, v. 32, n. 8, p. 635-641, 2004.

THOMAS, R. Z.; RUBEN, J. L.; TEN BOSCH, J. J.; HUYSMANS, M. C. Effect of ethylene oxide sterilization on enamel and dentin demineralization in vitro. **Journal of Dentistry**, v. 35, n. 7, p. 547-551, 2007.

VILLENA, R. S.; TENUTA, L. M.; CURY, J. A. Effect of APF gel application time on enamel demineralization and fluoride uptake *in situ*. **Brazilian Dental Journal**, v. 20, n. 1, p. 37-41, 2009.

VOGEL, G. L.; MAO, Y.; CAREY, C. M.; CHOW, L. C. Increased overnight fluoride concentrations in saliva, plaque, and plaque fluid after a novel two-solution rinse. **Journal of Dental Research**, v.76, n.1, p.761-767, 1997.

ZERO, D. T. In situ caries models. **Advance in Dental Research**, v. 9, n. 3, p. 214-230, 1995.

ZHANG, C.; KIMURA, Y.; MATSUMOTO, K. The effects of pulsed Nd:YAG laser irradiation with fluoride on root surface. **Journal of Clinical Laser in Medicine and Surgery**, v. 14, n. 6, p.399-403, 1996.

ZIMMER, S.; BIZHANG, M.; SEEMANN, R.; WITZKE, S.; ROULET J. F. The effect of a preventive program, including the application of low-concentration fluoride varnish, on caries control in high-risk children. **Clinical Oral Investigation**, v. 5, n. 1, p. 40-44, 2001.

ZUERLEIN, M. J.; FRIED, D.; FEATHERSTONE, J. D. Modeling the modification depth of carbon dioxide laser-treated dental enamel. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 25, n. 4, p. 335-347, 1999

YAMAZAKI, H.; LITMAN, A.; MARGOLIS, H.C. Effect of fluoride on artificial caries lesion progression and repair in human enamel: regulation of mineral deposition and dissolution under in vivo-like conditions. **Archives of Oral Biology**, v. 52, n.2, p.110-120, 2007.

WHITE, S. C.; STAFFORD, M. L.; BEENINGA, L. R. Intraoral xeroradiography. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology**, v. 46, n. 6, p. 862-70, 1978.

Anexos



RELATÓRIO DE MANUTENÇÃO DE EQUIPAMENTO

RELAT. Nº: 00291008

CLIENTE: UNIVERSIDADE DE RIBEIRÃO PRETO - UNAERP		
END.: AV. COSTÁBILE ROMANO, 2201		
☎: (16) 3603-6717	RESPONSÁVEL: PROF. ALINE/ PROF. EDSON	
LASER TIPO: Er/CO2	MARCA: OPUS DENT	MODELO: OPUS 20
Nº DE SÉRIE EQ.: 003-03362	FABRICAÇÃO: DEZEMBRO/2000	
DATA DE INSTALAÇÃO: 29/01/2001	INSTALADO POR: PAULO WAGNER	
DATA DO SERVIÇO: 28/10/2008	EXECUTADO POR: PAULO WAGNER	

1 - OCORRÊNCIAS:

O motivo da chamada pelo cliente foi a verificação das condições de operação do equipamento e informação de perda total de potência do laser de CO₂. Na data do serviço, foi realizada a limpeza completa do sistema óptico, checagem do alinhamento óptico dos componentes, preenchimento do reservatório de água deionizada, utilizada para a refrigeração do laser de Er:YAG e calibração dos lasers. O laser de Er:YAG apresentou condição normal de operação. No entanto, constatou-se, através de medidas de potência óptica em medidor externo, que em ambas as fibras do laser de Er:YAG apresentavam perda de, aproximadamente, 60%, sugerindo que sejam substituídas. Durante o procedimento de calibração do laser de CO₂, verificou-se que a potência máxima do feixe laser tanto no modo CW como no modo SP (superpulso) foi de 5W. No procedimento de teste da fibra do laser de CO₂, verificou-se que havia a perda excessiva devido ao não alinhamento de um dos espelhos no bloco óptico. Feita a correção do alinhamento, a fibra passou a apresentar desempenho normal (perda de potência de aproximadamente 30%, já compensada pelo software do equipamento). Verificou-se, também, que a perda nesta fibra aumenta significativamente (além do normal) enquanto diminui o raio de curvatura da fibra. Isto impossibilita o uso do medidor externo do equipamento para a calibração das ponteiros. A correção desta situação ocorrerá com a substituição da fibra.

2 - CONCLUSÕES:

Apesar de se ter verificado a necessidade da troca das fibras, o laser de CO₂ pode ser utilizado normalmente. O mesmo não ocorre com o laser de Er:YAG, pois as fibras estão muito danificadas.

3 - OBSERVAÇÕES:

O presente serviço de manutenção preventiva foi acompanhado pela Profa. Aline, onde foi possível o esclarecimento de algumas dúvidas quanto à operação do equipamento.

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Convido o voluntário _____, a participar da pesquisa “*PROGRESSÃO DA LESÃO DE CÁRIE NO ESMALTE DENTAL APÓS APLICAÇÃO DE COMPOSTOS FLUORETADOS E IRRADIAÇÃO COM LASER CO₂*”

Todas as informações contidas neste documento serão explicadas verbalmente pela pós-graduanda Aline Evangelista de Souza Gabriel (responsável pela pesquisa), orientada pela professora Silmara Aparecida Milori Corona, numa linguagem acessível ao voluntário.

1. Título do projeto

“Progressão da lesão de cárie no esmalte dental após aplicação de compostos fluoretados e irradiação com laser CO₂”

2. Objetivo

Este estudo irá avaliar se o aparelho de laser e o uso do flúor são capazes de prevenir a de cárie no dente. O laser é uma luz, que não faz ruído ou vibração, e quando bate no dente muda o aspecto da superfície, porém essa mudança não é visível a olho nú.

3. Justificativa

Crianças ou adultos com alto risco de ter a cárie nos dentes podem ser beneficiados com o uso do laser e do flúor ao mesmo tempo, pois o laser pode fazer com que o flúor penetre melhor no dente e este ficará mais forte e as bactérias que causam a cárie não conseguirão penetrar no dente.

4. Procedimentos

O céu da boca dos voluntários será copiado com uma massa mole que endurece depois de alguns segundos. Depois o dentista fará um aparelho contendo 4 pedaços de dente esterilizados (sem nenhuma bactéria) que ficará em contato com o céu da boca durante 14 dias. Depois o voluntário não usará o aparelho por 7 dias e, em seguida, usará o aparelho novamente por mais 14 dias. O voluntário receberá um kit de higiene oral (escova, pasta e fio dental) e o dentista vai ensinar como devera ser escovado o aparelho e os dentes. As avaliações serão realizadas logo após a retirada dos pedaços de dente do aparelho.

5. Desconforto, riscos e benefícios esperados

Os voluntários poderão sentir um leve desconforto pelo uso do aparelho. Caso isso ocorra, deve-se avisar o dentista para que o aparelho seja levemente desgastado. Não há riscos à saúde geral do voluntário. Os voluntários receberão benefícios indiretos através de esclarecimento de questões importantes para a saúde da boca, como métodos de prevenção da cárie.

6. Acompanhamento e assistência

Todos os procedimentos serão acompanhados pelos pesquisadores. Além disso, os pesquisadores sempre estão prontos a ajudar o voluntário se o paciente tiver algum problema relacionado ao uso do aparelho.

7. Garantia de esclarecimentos

Os voluntários têm garantia de que receberão respostas a qualquer pergunta e dúvida nos assuntos relacionados com a pesquisa (antes, durante ou após a realização da mesma).

8. Retirada do consentimento

O voluntário tem a liberdade de desistir de participar da pesquisa a qualquer momento, sem que isto cause qualquer penalidade.

9. Ressarcimento, indenização e recursos financeiros

Não haverá qualquer custo ao voluntário que participar da pesquisa, pois esta será totalmente custeada pelo pesquisador responsável. Caso necessário, os voluntários receberão ajuda em dinheiro para pagamento do transporte para comparecimento na Universidade de Ribeirão Preto - UNAERP ou Universidade de São Paulo - FORP. Não há indenização prevista, pois a pesquisa não oferece prejuízo ao indivíduo.

10. Garantia de sigilo

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

Qualquer dúvida ou problema deve ser comunicado à Aline Evangelista de Souza Gabriel pelos telefones (16) 91020020, (16) 38778303 ou Rua Portugal, 1690 Ribeirão Preto. E-mail: aline.gabriel@gmail.com

Aline Evangelista de Souza Gabriel (CPF 282928788-66)

Prof^ª. Dr^ª. Silmara Aparecida Milori Corona (CPF 145399108-50)

Assinatura do voluntário

Livros Grátis

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

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 Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)