

ELAINE PEREIRA DA SILVA TAGLIAFERRO

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ASSOCIAÇÃO DE LASER DE CO₂ E
FLÚOR FOSFATO ACIDULADO NA INIBIÇÃO DA PROGRESSÃO DE
CÁRIE EM ESMALTE DE DENTES DECÍDUOS**

*Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de
Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, para
obtenção do Título de Mestre em Odontologia, Área de
Concentração em Cariologia.*

**PIRACICABA
2004**

ELAINE PEREIRA DA SILVA TAGLIAFERRO

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ASSOCIAÇÃO DE LASER DE CO₂ E
FLÚOR FOSFATO ACIDULADO NA INIBIÇÃO DA PROGRESSÃO DE
CÁRIE EM ESMALTE DE DENTES DECÍDUOS**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do Título de Mestre em Odontologia, Área de Concentração em Cariologia.

Orientadora: Profa. Dra. Marinês Nobre dos Santos Uchôa

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Cecília Gatti Guirado

Profa. Dra. Josimeri Hebling Costa

Profa. Dra. Marinês Nobre dos Santos Uchôa

**PIRACICABA
2004**

Ficha Catalográfica

T128a Tagliaferro, Elaine Pereira da Silva.
Avaliação *in vitro* da associação de laser de CO₂ e flúor fosfato acidulado na inibição da progressão de cárie em esmalte de dentes decíduos. / Elaine Pereira da Silva Tagliaferro. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2004.
xiii, 73f. : il.

Orientadora : Prof^a Dr^a Marinês Nobre dos Santos Uchôa.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Cáries dentárias. 2. Lasers. 3. Odontologia. I. Uchôa, Marinês Nobre dos Santos. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Marilene Girello CRB/8–6159, da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP.

*Dedico este trabalho ao meu marido
Fábio, aos meus pais Toninho e Leninha
e às minhas irmãs Daniela e Aline, pelo
amor, apoio e compreensão.*

Amo vocês!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A Deus, pelo dom da vida, pela proteção, por ter iluminado meu caminho e dado forças para atingir meus ideais.

Aos meus pais, Toninho e Leninha, pelo apoio incondicional em todas as etapas desta jornada. A vocês, que me ensinaram princípios como honestidade e responsabilidade e sempre acreditaram em mim, o meu amor e a minha eterna gratidão.

Às minhas irmãs, Daniela e Aline, pelo carinho, amizade e incentivo em todos os momentos de nossas vidas.

Ao meu marido Fábio, pela compreensão nos momentos difíceis, pelo incentivo, carinho e companheirismo sempre presentes e pelo auxílio nas várias etapas desta pesquisa. A você, meu grande amor, o mais profundo agradecimento.

Às famílias Hereman, Pereira da Silva e Tagliaferro, pelo carinho e incentivo, sempre presentes nos reencontros, recados e telefonemas.

SINCEROS AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Marinês Nobre dos Santos Uchôa, pela orientação, amizade e pelos ensinamentos recebidos. Agradeço também o incentivo, a força nas horas difíceis e a disponibilidade em ajudar demonstrada em todos os momentos.

À M.Sc Lidiany Karla Azevedo Rodrigues, pela amizade, companheirismo e ajuda imprescindível em todas as fases deste trabalho. A admiração e o carinho ficarão guardados para sempre. Que Deus ilumine sempre o seu caminho!

AGRADECIMENTOS

Ao Magnífico Reitor da Universidade Estadual de Campinas, Prof. Dr. Carlos Henrique de Brito Cruz.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP, representada por seu Diretor, Prof. Dr. Thales Rocha de Mattos Filho.

Ao Prof. Dr. Lourenço Correr Sobrinho, Coordenador Geral da Pós-Graduação da FOP/UNICAMP, pela competente administração.

À Profa. Dra. Maria Cristina Volpato, Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, pela competência e atenção para com os alunos.

Ao Prof. Dr. Jaime A. Cury, Coordenador da área de Cariologia do Programa de Pós-Graduação em Odontologia e a todos os docentes, pela competência e por todos os ensinamentos recebidos.

Aos professores participantes da banca de qualificação, Prof. Dr. Jaime A. Cury, Prof. Dr. Luiz André F. Pimenta, Profa. Dra. Cíntia P. M. Tabchoury e Prof. Dr. Marcelo de Castro Meneghim, pela participação e colaboração.

Ao Prof. Dr. Carlos de Paula Eduardo, à Profa. M.Sc Luciane Azevedo e às funcionárias do Laboratório Especial de Laser em Odontologia, da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, Liliane e Maria Aparecida, pela disponibilidade e boa vontade em ajudar.

Ao físico Paulo Ricardo S. Wagner que prestou imenso auxílio tanto durante a irradiação das amostras quanto na elucidação das dúvidas.

Aos professores da área de Odontopediatria do Departamento de Odontologia Infantil, Profa. Dra. Cecília Gatti Guirado, pelo apoio, incentivo, amizade e confiança. À Profa. Dra.

Maria Beatriz D. Gavião e à Profa. Dra. Regina Maria Puppim Rontani pela amizade e apoio durante a realização desta pesquisa.

Às funcionárias do Departamento de Odontologia Infantil, Marcela C. de Souza e Maria de Lourdes G.C. Campos, pela boa vontade em ajudar.

Aos colegas do laboratório de Odontopediatria, Ana Flávia Borges, Ângela Teixeira, Gisele Correr, Kamila Kantowitz, Karlla Vieira, Leonardo Bonjardim, Luciano Pereira, Márcia Regina Cunha, Milena Teixeira, Paula Castelo e Viviane Degan, pela amizade e agradável convivência.

Aos técnicos do laboratório de Bioquímica Oral, Mariza J. C. Soares e José Alfredo da Silva, sempre prontos a ajudar.

Ao Prof. Dr. Lourenço Correr Sobrinho que prontamente disponibilizou a utilização de equipamentos do laboratório de Materiais Dentários.

Aos funcionários do laboratório de Materiais Dentários, Selma A. B. Segalla e em especial ao Marcos B. Cangiani, por não ter medido esforços em ajudar, além da competência e simplicidade.

À Maristela Lobo, Evelyn Vidigal, M.Sc Iriana Zanin, M.Sc Celso Queiroz e M.Sc André Klein, pelo fundamental auxílio durante a realização desta pesquisa.

À Iolanda Rufini do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA), pela competência, seriedade e boa vontade em ajudar.

Ao Prof. Dr. Carlos Tadeu dos Santos Dias, pela realização e esclarecimentos da análise estatística.

À Profa. Dra. Gláucia M. B. Ambrosano, pela atenção, colaboração e pelos esclarecimentos estatísticos.

Aos amigos e companheiros de mestrado, Carolina Aires, Cristiana Tengan, Débora Dias, Giovana Pecharki, Marcelo Napimoga, Maristela Lobo, Lílian Rihs, Lívia Gushi, Silvia Cypriano e de doutorado, Lívia Tenuta e Cecília Ribeiro, pela amizade e agradável convivência.

À amiga Cristiana Tengan, pelo companheirismo em todos os momentos e pelo apoio nas horas difíceis.

Às bibliotecárias Marilene Girello, pela colaboração na correção das referências bibliográficas e pelos esclarecimentos durante a redação da dissertação e Heloisa M. Ceccotti, pelas importantes informações.

À secretária do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Maria Elisa dos Santos e à Eliane M. Franco, pela ajuda e atenção em todas as fases administrativas.

Às secretárias da Pós-Graduação, Érika A. P. Sinhoreti e Sônia M. Lordello Arthur, pela atenção em todas as fases administrativas.

A todas as pessoas e cirurgiões-dentistas que doaram dentes decíduos.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro, concedendo Bolsa de Mestrado durante o desenvolvimento deste estudo.

A todas as pessoas que, com a mais simples palavra, atitude ou auxílio, contribuíram direta ou indiretamente na elaboração deste trabalho.

*“A maior recompensa para o trabalho
do homem não é o que ele ganha com
isso, mas o que ele se torna com isso”*

Jhon Ruskin

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS.....	01
RESUMO	04
ABSTRACT	06
1. INTRODUÇÃO	08
2. REVISÃO DA LITERATURA	10
2.1. Efeitos do laser de CO ₂ no esmalte dental e na prevenção da cárie	11
2.1.1. Laser de CO ₂ associado ao flúor*	21
2.2. Considerações sobre os métodos empregados	26
2.2.1. Ciclagem de pH	26
2.2.2. Análise de microdureza	28
3. PROPOSIÇÃO	30
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	31
4.1. Aspectos éticos	31
4.2. Delineamento do estudo.....	31
4.3. Obtenção dos dentes e preparo dos espécimes	34
4.4. Produção de lesão de cárie artificial no esmalte	34
4.5. Tratamento do esmalte com laser de CO ₂ pulsado	35
4.6. Tratamento do esmalte com flúor fosfato acidulado (FFA)	35
4.7. Ciclagem de pH	36
4.8. Análise de microdureza	37
4.8.1. Obtenção dos corpos de prova.....	37
4.8.2. Microdureza do esmalte seccionado longitudinalmente	38
4.8.3. Cálculo da perda mineral	39
4.9. Determinação das concentrações de fósforo e de flúor nas soluções da ciclagem de pH.....	41
4.9.1. Concentração de fósforo	41

* Termo genérico para definir as formas químicas iônica, ionizável e não-ionizável do elemento flúor.

4.9.2. Concentração de flúor	41
4.10. Análise estatística	42
5. RESULTADOS	43
5.1. Efeito dos tratamentos na perda mineral (ΔZ) e na inibição da progressão de cárie	43
5.2. Efeito dos tratamentos nas concentrações iônicas das soluções desmineralizadora (DES) e remineralizadora (RE)	46
5.2.1. Concentração de fósforo	46
5.2.2. Concentração de flúor	47
6. DISCUSSÃO	49
7. CONCLUSÃO	56
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
ANEXO 1	65
ANEXO 2	66
APÊNDICE	67
I) Considerações gerais sobre a luz laser	67
II) Lasers empregados em odontologia.....	72

LISTA DE ABREVIATURAS

%vol	porcentagem de volume mineral
[F]	concentração de flúor
[P]	concentração de fósforo
°C	grau(s) celsius
µg/mL	micrograma(s) por mililitro
µm	micrômetro(s)
µs	microsegundo(s)
Å	angstrom
AC	apatita carbonatada
APF	<i>acidulated phosphate fluoride</i>
cm	centímetro(s)
cm ²	centímetro(s) quadrado(s)
CO ₂	dióxido de carbono
DE	densidade de energia
DES	desmineralizadora
EF	esmalte fluoretado
EFi	esmalte fissurado
EFiC	esmalte fissurado e com crateras
EFNO	esmalte fluoretado não-orgânico
EHDP	etano-1-hidroxi-1-difosfonato
EN	esmalte normal
Er:YAG	érbio:ítrio-alumínio-granada
Er:YSGG	érbio:ítrio-escândio-gálio-granada
ErCr:YSGG	érbio-cromo:ítrio-escândio-gálio-granada
ESMO	esmalte sem matriz orgânica
F	grupo experimental tratado com FFA
FAP	fluorapatita

FFA	flúor fosfato acidulado
FL	grupo experimental tratado com FFA + laser
g	grama(s)
Ga-Al-As	arseneto de gálio e alumínio
h	hora(s)
HA	hidroxiapatita
HCl	ácido clorídrico
He-Ne	hélio-neônio
Ho:YAG	hólmio:ítrio-alumínio-granada
Ho:YLF	hólmio:ítrio-lantânio- flúor
Hz	hertz
J	joule(s)
J/cm ²	joule(s) por centímetro quadrado
JAD	junção amelo-dentinária
KHN	<i>Knoop hardness number</i>
L	grupo experimental tratado com laser
LF	grupo experimental tratado com laser + FFA
M	molar
MEV	microscopia eletrônica de varredura
mg	miligrama(s)
min	minuto(s)
mJ	milijoule(s)
mL	mililitro(s)
mL/mm ²	mililitro(s) por milímetro quadrado
mm	milímetro(s)
mm ²	milímetro(s) quadrado(s)
mmol/L	milimol(s) por litro
ms	milisegundo(s)
mV	milivolt(s)

mW	miliwatt(s)
NaF	fluoreto de sódio
Nd:YAG	neodímio:ítrio-alumínio-granada
Nd:YAP	neodímio:ítrio-alumínio-perovskita
Nd:YLF	neodímio:ítrio-lantânio-flúor
nm	nanômetro(s)
n°	número
ns	nanosegundo(s)
P	potência
pH	logaritmo negativo da concentração hidrogeniônica ($-\log [H^+]$)
ppm	parte(s) por milhão
RE	remineralizadora
ref.	referência
s	segundo(s) (de tempo)
sol.	solução
TEA	<i>transversely excited atmospheric pressure</i>
TISAB	<i>total ionic strength adjustor buffer</i>
W	watt(s)
W/cm ²	watt(s) por centímetro quadrado
Z _{ED}	perfil mineral do esmalte desmineralizado
Z _{EH}	perfil mineral do esmalte hígido
α	alfa
β	beta
ΔZ	delta Z (parâmetro que corresponde à perda mineral)
λ	comprimento de onda

RESUMO

A distribuição polarizada da experiência de cárie dental e o aumento da prevalência da doença na dentição decídua em algumas localidades têm impulsionado o desenvolvimento de novos métodos preventivos. Vários estudos têm demonstrado que a irradiação do esmalte dental com laser de CO₂, especialmente se associada ao flúor, aumenta a resistência do mineral ao desafio ácido. Contudo, a efetividade de tal combinação no esmalte de dentes decíduos ainda não foi investigada. Assim, o objetivo desta pesquisa *in vitro* foi avaliar os efeitos do laser de CO₂, comprimento de onda 10,6 µm, associado ao flúor fosfato acidulado (FFA) na inibição da progressão de cárie em esmalte dental decíduo desmineralizado. Molares decíduos hígidos foram seccionados méso-distalmente e o esmalte de 60 espécimes foi desmineralizado em solução tampão acetato (pH 5,0) 50% saturada em relação a hidroxiapatita durante 48 h. Posteriormente, os espécimes foram aleatoriamente divididos em 6 grupos (n=10), segundo os tratamentos: 1) grupo Cariado: armazenamento em ambiente úmido; 2) grupo Controle: ciclagem de pH; 3) grupo L: laser + ciclagem de pH; 4) grupo F: FFA + ciclagem de pH; 5) grupo LF: laser + FFA + ciclagem de pH; 6) grupo FL: FFA + laser + ciclagem de pH. O procedimento de ciclagem foi realizado durante 5 dias (solução desmineralizadora pH 4,6 e solução remineralizadora pH 7,0). A perda mineral foi avaliada com auxílio da análise de microdureza e a porcentagem de inibição da progressão de cárie foi calculada para os grupos L, F, LF e FL. Adicionalmente, as concentrações de fósforo e de flúor foram determinadas nas soluções des- e remineralizadora após ciclagem de pH. Os dados foram analisados pela Análise de Variância e pelo Teste de Tukey ao nível de significância de 5%. De acordo com os resultados, a perda mineral do grupo Controle foi significativamente maior quando comparada às dos grupos Cariado, L, F, FL e LF, os quais, por sua vez, não apresentaram diferença estatística entre si. As porcentagens de inibição da progressão de cárie obtidas foram de 67%, 60%, 97% e 87% para os grupos L, F, LF e FL, respectivamente. A análise química das soluções desmineralizadoras mostrou que a concentração de fósforo foi significativamente maior para o grupo Controle e nas soluções

remineralizadoras o mesmo foi observado para os grupos F e FL, quando comparados aos outros grupos. As concentrações de flúor em ambas as soluções des- e remineralizadora foram significativamente maiores para os grupos tratados com FFA comparados às dos grupos Controle e L. Os resultados deste estudo indicam que os tratamentos L, F, LF e FL, realizados no esmalte dental decíduo cariado, foram significativamente efetivos na inibição da progressão de cárie. Embora a combinação de laser de CO₂ e FFA tenha promovido os valores mais altos de inibição, este efeito adicional não foi estatisticamente evidenciado.

ABSTRACT

The polarized distribution of dental caries experience and the increase of disease's prevalence in primary teeth observed in some localities have impelled the development of new preventive methods. Several investigations have demonstrated that the CO₂ laser irradiation on dental enamel - especially if combined with fluoride - increases the mineral acid resistance. However, the effectiveness of this combination on primary teeth has not been studied yet. Thus the purpose of this *in vitro* study was to investigate the effect of a CO₂ laser at 10.6 μ m wavelength, in association with acidulated phosphate fluoride (APF) on the inhibition of caries-like progression in demineralized primary dental enamel. Sound primary molars were sectioned mesiodistally and the enamel of sixty specimens was demineralized in acetate buffer solution 50% saturated with hydroxyapatite (pH 5.0) for 48 h. Next, they were randomly assigned in 6 groups (n=10) according to the treatments: 1) Carious group: storage in moist environment; 2) Control group: pH cycling; 3) L group: laser + pH cycling; 4) F group: APF + pH cycling; 5) LF group: laser + APF + pH cycling; 6) FL group: APF + laser + pH cycling. The pH cycling model was performed in a 5-day period (demineralizing solution pH 4.6 and remineralizing solution pH 7.0). Mineral loss was assessed by means of microhardness analysis and the percentage of caries progression inhibition was calculated for the L, F, LF and FL groups. In addition, the phosphorus and fluoride concentrations were determined in both de- and remineralizing solutions after pH cycling. The data were analyzed by ANOVA and Tukey Test at a 5% level of significance. According to the results, the mineral loss of the Control group was significantly higher than that of Carious, L, F, LF and FL groups, which, on the other hand, were not statistically different. The percentages of inhibition of caries-like lesion progression were 67%, 60%, 97% and 87% for the L, F, LF e FL groups, respectively. Chemical analysis of demineralizing solutions showed that phosphorus concentration was significantly higher for Control group and in remineralizing solutions the same was observed for F and FL groups compared to other groups. Fluoride concentrations in both de- and remineralizing solutions were significantly higher for the groups treated with APF compared to Control and L

groups. The results of this study indicate that the treatments L, F, LF and FL carried out on the carious primary dental enamel were significantly effective on the inhibition of caries progression. Although the combination of CO₂ laser and APF provided the highest caries inhibition rates, this additive effect was not statistically evidenced.

1. INTRODUÇÃO

As condições de saúde bucal das crianças de países desenvolvidos têm melhorado ao longo dos últimos anos (Messer, 2000). O declínio da prevalência de cárie dental tem sido atribuído principalmente à utilização de substâncias contendo flúor (Cury, 2001), como os dentifrícios, a água de abastecimento público, os alimentos e bebidas preparados com água fluoretada, as soluções para bochecho e os géis fluoretados. Estes últimos têm sido indicados para os indivíduos de alto risco à cárie (Clarkson & McLoughlin, 2000), sendo os mais conhecidos na prática odontológica o fluoreto de sódio e o flúor fosfato acidulado (Cury, 1992; Narvai *et al.*, 2002).

Em consequência do declínio, a doença cárie tornou-se fortemente polarizada (Seppä, 2001). Cerca de 80% das superfícies dentais cariadas estão concentradas em apenas 25% das crianças e adolescentes de países ocidentais industrializados (Kaste *et al.*, 1996; Poulsen & Scheutz, 1999). Esta tendência também foi constatada por Mattos-Graner *et al.* (1996) que, ao estudar uma população infantil brasileira com idade de 6 a 36 meses, observaram que 17% das crianças apresentavam 46% do total das lesões de cárie detectadas.

Adicionalmente, a ocorrência da doença na dentição decídua tem mostrado indícios de progressão em algumas regiões do mundo como Reino Unido (Downer, 1994), países Nórdicos (von der Fehr, 1994), Ontário no Canadá (Speechley & Johnston, 1996) e Chandigarh na Índia (Chawla *et al.*, 2000). Vigild *et al.* (1996) também verificaram que no Kuwait a experiência de cárie em crianças de 4 e 6 anos aumentou no período de 1982 a 1993. Da mesma forma, a prevalência da doença em crianças de 5 anos, na Noruega, aumentou significativamente entre 1997 e 2000 (Haugejorden & Birkeland, 2002).

Diante dessas observações, a otimização dos métodos usuais de prevenção e o desenvolvimento de novas estratégias preventivas são de fundamental importância.

Neste contexto, vários estudos têm avaliado os efeitos do laser de dióxido de carbono (CO₂) na prevenção da cárie. Os relatos da literatura têm demonstrado que a

irradiação do esmalte dental com laser de CO₂, utilizando densidades de energia de 0,3 a 12,5 J/cm², tem promovido redução significativa da perda mineral (Featherstone *et al.*, 1998; Kantorowitz *et al.*, 1998; Tange *et al.*, 2000; Klein, 2002) e, quando associada a agentes preventivos, como o flúor, o efeito de inibição de cárie pode ser potencializado (Featherstone *et al.*, 1991; Nobre dos Santos *et al.*, 2001). Várias teorias têm sido propostas para explicar os mecanismos pelos quais o esmalte dental irradiado com laser de CO₂ é mais resistente ao desafio cariogênico. De acordo com Featherstone (2000), o laser de CO₂ produz radiação na região do espectro infravermelho muito próximo às bandas de absorção da apatita. Conseqüentemente, a maior parte da luz é absorvida pelo esmalte e convertida em calor, aquecendo a hidroxiapatita na superfície e na subsuperfície próxima a uma temperatura superior a 400°C. O efeito térmico pode resultar em redução do conteúdo de carbonato (Kuroda & Fowler, 1984; Nelson *et al.*, 1987; Phan *et al.*, 1999; Zuerlein *et al.*, 1999), aumento do tamanho dos cristais de hidroxiapatita (Kantola *et al.*, 1973; Ferreira *et al.*, 1989; McCormack *et al.*, 1995), derretimento (Kuroda & Fowler, 1984; Nelson *et al.*, 1987; Ferreira *et al.*, 1989; Meurman *et al.*, 1992; McCormack *et al.*, 1995; Tsai *et al.*, 2002), fusão e recristalização (Kantola *et al.*, 1973) do esmalte irradiado, resultando na diminuição da solubilidade do mineral frente ao desafio ácido.

A utilização da tecnologia laser associada ao flúor em crianças com alto risco de cárie ou lesões incipientes na dentição decídua poderia ser um recurso preventivo efetivo, com as vantagens de uma única aplicação ser suficiente para o controle do desenvolvimento e progressão da doença, além de ser um método indolor e não invasivo. Entretanto, não há na literatura relatos sobre os efeitos preventivos decorrentes da combinação de laser de CO₂ e flúor no esmalte de dentes decíduos. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da associação de laser de CO₂, com comprimento de onda 10,6 µm, e aplicação de flúor fosfato acidulado na inibição da progressão de cárie no esmalte dental decíduo desmineralizado, submetido a desafio cariogênico *in vitro*.

2. REVISÃO DA LITERATURA

Neste capítulo procurou-se revisar a literatura com relação aos efeitos do laser de CO₂ no esmalte dental e na prevenção da cárie, bem como redigir considerações a respeito dos métodos empregados na presente pesquisa. Assim, os assuntos pertinentes ao estudo foram divididos conforme segue:

2.1. Efeitos do laser de CO₂ no esmalte dental e na prevenção da cárie

2.1.1. Laser de CO₂ associado ao flúor

2.2. Considerações sobre os métodos empregados

2.2.1. Ciclagem de pH

2.2.2. Análise de microdureza

Algumas informações sobre o laser e os principais comprimentos de onda utilizados em Odontologia encontram-se no Apêndice.

2.1. EFEITOS DO LASER DE CO₂ NO ESMALTE DENTAL E NA PREVENÇÃO DA CÁRIE

Os primeiros pesquisadores a estudar os efeitos do laser de CO₂ sobre os tecidos dentais duros foram Lobene *et al.* (1968). Os autores irradiaram com laser de CO₂, comprimento de onda (λ) 10,6 μm , em modo contínuo, esmalte de dentes humanos extraídos e hidroxiapatita sintética pulverizada. No experimento foram utilizados os seguintes parâmetros: potência de 20 W, exposição variando de 0,1 a 5 s, diâmetro do feixe de 1 a 4 mm, densidade de energia total de 15 a 12000 J/cm². Secções dentais foram avaliadas por microscópio de luz e microrradiografia de contato e a hidroxiapatita em pó foi analisada pela difração por raios-X. Na região da exposição ao laser o esmalte estava fundido, duro, frágil e com aspecto de giz, no entanto, sem evidências de fechamento das fissuras ou fusão completa da hidroxiapatita sintética. Numerosas fendas estendendo-se da superfície do esmalte à junção amelodentinária também foram observadas. As alterações, segundo os autores, resultaram provavelmente do aumento da temperatura no local da irradiação.

Kantola *et al.* (1973) procuraram elucidar, com auxílio da difração por raios-X, a natureza cristalográfica das mudanças induzidas pela irradiação no esmalte dental com laser de CO₂. Para tanto, dentes hígidos foram irradiados com os seguintes parâmetros: potência de 100 W, tempo de irradiação de 2 a 3 s e densidade de energia de 10⁴ a 10⁵ J/cm². A irradiação causou fusão e recristalização do esmalte, bem como aumento do tamanho dos cristais quando se comparou com a hidroxiapatita não irradiada. Além disso, pôde-se observar nas amostras irradiadas a presença de ortofosfato α -cálcico, composto ausente na hidroxiapatita, formado no esmalte sob alta temperatura devido à irradiação.

Procurando analisar as mudanças decorrentes da irradiação laser sobre o esmalte dental humano, Kuroda & Fowler (1984) irradiaram superfícies vestibulares de incisivos hígidos com laser de CO₂ λ 10,6 μm , em modo contínuo, sob os seguintes parâmetros: diâmetro do feixe de 0,5 mm, tempo de irradiação de 1 s e potência de 20 W. No local irradiado foi produzida uma cratera cujo material foi removido, triturado a pó e

analisado pela difração por raios-X e espectroscopia de infravermelho. O material derretido e solidificado era composto por pequenas partes de fosfato α -tricálcico e fosfato tetracálcico, bem como uma fase principal de apatita modificada indicando que, durante a irradiação, foram atingidas temperaturas superiores a 1400°C. Também foram observados redução no conteúdo de água, proteína, carbonato e cloreto, possível incorporação de óxido substituindo alguns íons hidroxilas e traços de dióxido de carbono e cianato na apatita. A microscopia eletrônica de varredura revelou a presença de crateras cujas superfícies aparentavam aspecto liso, de derretimento e de recristalização.

No ano seguinte, Stewart *et al.* (1985) procuraram incorporar hidroxiapatita sintética ao esmalte natural objetivando um potencial selamento de fôssulas e fissuras. Os pesquisadores utilizaram dentes extraídos que foram submetidos ao ataque ácido e cobertos com uma fina camada de hidroxiapatita sintética. A irradiação com laser de CO₂ λ 10,6 μ m, em modo contínuo, foi realizada com os seguintes parâmetros: densidade de energia de 21 a 316 J/cm², potência de 1,5 a 3 W e tempos de irradiação de 0,125 a 1 s. Os dentes foram submetidos a testes de ciclagem térmica e de penetração de corante. Os pesquisadores verificaram que, dentro de parâmetros biológicos seguros, a hidroxiapatita sintética pode ser incorporada ao esmalte. No entanto, altas densidades de energia (maiores que 24 J/cm²) tenderam produzir microfendas na superfície do mineral.

De acordo com Fowler & Kuroda (1986), as mudanças induzidas pelo laser no esmalte dental supostamente resultam do aquecimento localizado. Assim, os pesquisadores, embasados em resultados de estudos prévios em que o esmalte dental foi progressivamente aquecido em fornos convencionais, correlacionaram as principais mudanças induzidas no esmalte pela elevação da temperatura com os prováveis efeitos na solubilidade do mineral. Segundo os autores, o aquecimento do esmalte entre 100°C e 650°C promove diminuição do conteúdo de água e de carbonato, sendo que a aproximadamente 350°C ocorre a decomposição protéica. De 650°C a 1100°C, há recristalização térmica com aumento do tamanho dos cristais de hidroxiapatita, formação de fosfato β -tricálcico, perda de água e de carbonato. Temperaturas maiores que 1100°C levam à formação de fosfato tetracálcico e à conversão de fosfato β -tricálcico em fosfato α -tricálcico, compostos substancialmente mais

solúveis em ácido que fosfato β -tricálcico, esmalte dental e hidroxiapatita e, portanto, podem aumentar marcadamente a solubilidade da superfície do mineral. Os pesquisadores sugeriram que as condições de irradiação com laser que produzam temperaturas localizadas acima de 650°C podem ter efeitos deletérios na solubilidade do esmalte.

Também em 1986, Nelson *et al.* procuraram investigar, na região infravermelha do espectro eletromagnético, os comprimentos de onda mais indicados à inibição da formação de lesões de cárie *in vitro*. Para tanto, irradiaram o esmalte de dentes humanos com laser TEA-CO₂ (TEA = *transversely excited atmospheric pressure*), comprimentos de onda 9,3 μ m, 9,6 μ m, 10,3 μ m e 10,6 μ m, sob as seguintes condições: taxa de repetição de 0,67 Hz, densidade de energia de 10-50 J/cm², duração de pulso de 100 a 200 ns e tempo de exposição de 1, 3 ou 10 min. Após a irradiação, as amostras foram imersas em solução desmineralizadora (pH 5,0) durante 14 dias para formar lesões de cárie. A análise de microdureza demonstrou que os comprimentos de onda 9,3 μ m e 10,6 μ m foram os mais efetivos na inibição de cárie. Lesões significativamente mais rasas e menos desmineralizadas foram encontradas nas amostras irradiadas com o λ 9,3 μ m, chegando a reduzir em 50% a desmineralização quando comparadas às do grupo controle. A análise química das soluções desmineralizadoras demonstrou menores concentrações de cálcio e fósforo por unidade de área que o grupo controle, confirmando os resultados obtidos na microdureza. Segundo os autores, as alterações causadas no esmalte pela irradiação influenciaram a permeabilidade e a hidratação do mineral, alterando seu comportamento de solubilidade durante a formação da lesão de cárie artificial.

No ano seguinte, o estudo de Nelson *et al.* (1987) examinou a morfologia e a cristalografia da superfície do esmalte humano, bem como o aspecto histológico das lesões de cárie produzidas artificialmente após tratamento com laser TEA-CO₂. Os autores utilizaram 51 dentes humanos, entre molares e pré-molares, 20 dos quais foram imersos por 14 dias em solução desmineralizadora (pH 5,0) para formar lesões de cárie após a aplicação do laser. A irradiação foi efetuada com os comprimentos de onda 9,3 μ m, 9,6 μ m, 10,3 μ m e 10,6 μ m seguindo os parâmetros: duração de pulso de 100 a 200 ns, densidade de energia de 10-50 J/cm² e taxa de repetição de 0,67 Hz para 400 pulsos. Adicionalmente, a

temperatura alcançada na superfície do esmalte durante a irradiação com densidade de energia de 50 J/cm^2 foi mensurada, com auxílio de um pirômetro infravermelho. Considerando a máxima densidade de energia utilizada (50 J/cm^2), os picos de temperaturas foram de $1050 \pm 40^\circ\text{C}$, $980 \pm 30^\circ\text{C}$, $835 \pm 30^\circ\text{C}$ e $810 \pm 30^\circ\text{C}$ para os comprimentos de onda $9,3 \text{ }\mu\text{m}$, $9,6 \text{ }\mu\text{m}$, $10,3 \text{ }\mu\text{m}$ e $10,6 \text{ }\mu\text{m}$, respectivamente, e a condutibilidade ficou limitada a $10\text{-}20 \text{ }\mu\text{m}$ sob a superfície derretida. As profundidades médias das lesões formadas no esmalte irradiado, analisadas pela microscopia de luz polarizada e pela microrradiografia transversal, foram menores que as lesões do grupo controle, chegando a exibir reduções de até 40% em profundidade. Sob microscopia de luz refletida, o $\lambda 10,6 \text{ }\mu\text{m}$ não causou qualquer rugosidade significativa na superfície; em contrapartida, $9,6 \text{ }\mu\text{m}$ e $9,3 \text{ }\mu\text{m}$ produziram, na parte central da região irradiada, uma área de aproximadamente 2 mm de diâmetro bem mais rugosa. A microscopia eletrônica de varredura demonstrou que o $\lambda 10,6 \text{ }\mu\text{m}$ produziu no esmalte uma zona de derretimento cuja área central aparentava superfície vítrea derretida, fina e lisa. A espectroscopia de infravermelho revelou que as amostras irradiadas com o $\lambda 9,6 \text{ }\mu\text{m}$ apresentaram menor conteúdo de carbonato (0,59%) que aquelas não irradiadas (1,63%). Segundo os autores, a irradiação com laser de CO_2 pode ter resultado na redução da permeabilidade e da solubilidade do esmalte, levando a inibição da formação de lesão de cárie.

Ferreira *et al.* (1989) examinaram as mudanças ultra-estruturais induzidas no esmalte dental pela irradiação com laser de CO_2 em modo contínuo, por meio da microscopia eletrônica e do teste de dureza Vickers. Assim, molares permanentes e pré-molares foram cortados em duas orientações, paralela ou perpendicular à junção amelo-dentinária (JAD) e as secções foram lixadas até espessuras de 550 a $590 \text{ }\mu\text{m}$. As amostras foram irradiadas com o $\lambda 10,6 \text{ }\mu\text{m}$, densidades de energia de $0,8$ a 200 J/cm^2 , densidades de potência de $6,6 \times 10^3$ a $5,2 \times 10^6 \text{ W/cm}^2$ e tempo médio de irradiação de 6 a $520 \text{ }\mu\text{s}$. A microscopia eletrônica de varredura revelou dois tipos distintos de alteração: a) esmalte fissurado (EFi) que, apesar da presença de uma rede de fendas/fissuras na superfície, exibiu transparência similar àquela encontrada no esmalte não irradiado; b) esmalte fissurado e com crateras (EFiC) que mostrou, juntamente com as fissuras, uma rede de crateras.

Adicionalmente, regiões de esmalte rugoso exposto foram verificadas tanto em EFi como em EFIC. A irradiação com baixas densidades de energia (aproximadamente $1,5 \text{ J/cm}^2$) provocou, principalmente próximo à JAD, rugosidades no esmalte, as quais foram ausentes próximo à superfície dental. Os achados obtidos na microscopia eletrônica de transmissão denotaram a presença de um novo cristal de apatita com formato diferente e tamanho maior no EFIC quando comparado ao esmalte original, indicando que ocorreu derretimento e cristalização. No teste de dureza Vickers, o esmalte irradiado com $1,5 \text{ J/cm}^2$ e 13 J/cm^2 foi consistentemente mais macio que o esmalte adjacente não submetido à irradiação, especialmente o EFIC devido à sua maior porosidade, introduzida pela presença de crateras e lacunas. Apesar de todas essas alterações, um melhoramento da ultra-estrutura do mineral não foi verificado. Entretanto, os autores concluíram que o maior tamanho dos cristais de apatita e a perda da estrutura prismática em áreas fissuradas e com crateras poderiam, parcialmente, explicar prévias observações de reduzida desmineralização subsuperficial em esmalte irradiado com laser.

Watanabe *et al.* (1990) estudaram os efeitos do laser de CO_2 em modo contínuo, potência de 10 W durante 0,2 s, no esmalte dental decíduo com auxílio da microscopia eletrônica de varredura. Segundo os autores, a irradiação levou à formação de um sulco longitudinal raso, contendo linhas sucessivas em forma de “ondas”, e de inúmeras gotículas de esmalte fundido sobre a área vitrificada. Além disso, fissuras na superfície do esmalte também foram observadas.

Em 1992, Meurman *et al.* pesquisaram as alterações causadas pela irradiação com lasers de CO_2 , Nd:YAG (neodímio:ítrio-alumínio-granada) ou a combinação CO_2 -Nd:YAG, na estrutura cristalina da hidroxiapatita. Para tanto, alíquotas de 20 mg de hidroxiapatita sintética, contendo aproximadamente 0,23% de carbonato, foram irradiadas por 20 s com laser de CO_2 em modo contínuo, CO_2 -Nd:YAG (50% de cada) e Nd:YAG plano com as seguintes densidades de energia: 500, 1000 e 3230 J/cm^2 . Como controle, foram usadas apatitas não irradiadas. As amostras foram avaliadas com auxílio da microscopia eletrônica de varredura e de transmissão, da difração eletrônica, da difração por raios-X e em experimentos de dissolução. As alterações morfológicas na apatita

irradiada com o laser de CO₂, avaliadas pela microscopia eletrônica, começaram a aparecer a partir da densidade de energia de 500 J/cm², destacando-se o derretimento que foi obtido por completo quando do emprego de 1000 J/cm². Em contrapartida, a irradiação Nd:YAG não causou derretimento do mineral. O efeito da combinação dos lasers (CO₂-Nd:YAG) transformou o pó de apatita em sólidos com forma de pérola cuja superfície irregular apresentou ranhuras e fôssulas profundas. O composto fosfato α -tricálcico foi identificado somente nas amostras irradiadas pela combinação dos lasers. Em experimentos de dissolução, as amostras irradiadas com densidades de energia de 3230 J/cm² dissolveram mais rápido que as não irradiadas pela combinação CO₂-Nd:YAG. Os autores sugeriram que a irradiação com laser de CO₂ foi a principal responsável pela formação de fosfato tricálcico, composto altamente solúvel, visto que o uso isolado do laser Nd:YAG não causou quaisquer mudanças mensuráveis na estrutura cristalina da hidroxiapatita.

Os efeitos do laser de CO₂ sobre o esmalte dental também foram avaliados por McCormack *et al.* (1995) com auxílio da microscopia eletrônica de varredura (MEV). Secções (aproximadamente 1 a 2 mm de espessura) de esmalte humano e bovino polidas e blocos de esmalte humano não polidos foram irradiados com os comprimentos de onda 9,3 μ m, 9,6 μ m, 10,3 μ m e 10,6 μ m em modo pulsado. Os parâmetros utilizados foram os seguintes: a) 25 pulsos com 100 μ s de duração, densidades de energia de 2, 5, 10 e 20 J/cm² por pulso e taxa de repetição de 10 Hz para as secções polidas; b) 5, 25 ou 100 pulsos, com 50, 100, 200 ou 500 μ s de duração, densidade de energia de 10 J/cm² e taxa de repetição de 10 Hz para os blocos dentais não polidos. A MEV foi realizada no meio da área irradiada que geralmente corresponde ao centro da zona de derretimento. As mudanças físicas no tamanho e forma do cristal seguiram um padrão distinto e o tipo de esmalte irradiado (bovino ou humano) não pareceu afetar significativamente os efeitos da irradiação. Antes de alcançar a temperatura para o derretimento, os cristais de esmalte mantiveram a forma de agulha e o tamanho do esmalte normal (aproximadamente 40 nm em diâmetro). Assim que a temperatura na superfície alcançou o valor para o derretimento, os cristais coalesceram em formas indefinidas e aumentaram em diâmetro. Após a temperatura exceder o estágio de derretimento, os cristais de esmalte fundiram-se em cristais poliedros

grandes (de 200 a 400 nm) e, em temperaturas mais altas, formaram uma massa sólida, com limites pouco distinguíveis. Estas modificações foram dependentes do comprimento de onda utilizado. O λ 10,6 μm com densidades de energia de 5 ou 10 J/cm^2 não produziu derretimento do esmalte e fusão dos cristais da superfície, porém promoveu a formação de fendas superficiais distintas associadas com o stress térmico criado pela interação com o laser. Segundo os autores, este λ pode ter alterado a composição química e estrutural dos cristais de esmalte. Por sua vez, o calor gerado pelos comprimentos de onda 9,3 μm ou 9,6 μm e, em menor extensão 10,3 μm , foi suficiente para causar rápido derretimento da superfície e fusão dos cristais de esmalte em densidades tão baixas quanto 5 J/cm^2 por pulso. Segundo os pesquisadores, pulsos mais longos, mantendo constante a densidade de energia, reduziram a extensão do derretimento superficial e da fusão dos cristais de hidroxiapatita. O número de pulsos, em contrapartida, não influenciou significativamente as alterações na superfície.

Featherstone *et al.* (1998) procuraram determinar os parâmetros ótimos da irradiação com laser de CO_2 que efetivamente potencializariam a inibição de cárie no esmalte. Para tanto, coroas de molares e pré-molares foram irradiadas com um dos quatro comprimentos de onda: 9,3 μm , 9,6 μm , 10,3 μm e 10,6 μm . A taxa de repetição foi de 10 Hz, o diâmetro do feixe de 1,6 mm, a densidade de energia de 1 a 12,5 J/cm^2 por pulso, o número de pulsos de 25 e a duração de cada pulso de 100 μs . Após a irradiação, as amostras foram submetidas ao processo de ciclagem de pH realizado durante 9 dias (soluções: desmineralizadora pH 4,3 e remineralizadora pH 7,0). A análise de microdureza revelou que as máximas inibições de cárie foram de 85%, 73%, 71% e 68% para os comprimentos de onda 10,6 μm , 10,3 μm , 9,6 μm e 9,3 μm , empregando as densidades de energia de 12,5 J/cm^2 , 10 J/cm^2 , 5 J/cm^2 e 5 J/cm^2 , respectivamente. Estes resultados, segundo os autores, foram comparáveis com a inibição de cárie produzida por tratamentos diários com dentifrícios fluoretados no mesmo modelo *in vitro*.

Também em 1998, Kantorowitz *et al.* conduziram um estudo com o objetivo de avaliar o potencial preventivo de várias condições de irradiação, explorar o efeito do número de pulsos usados e correlacionar a inibição de cárie com as mudanças na superfície

do esmalte por meio da análise de microdureza e da microscopia eletrônica de varredura. Coroas de molares inclusos apresentando uma área de esmalte exposta foram irradiadas com laser de CO₂ ajustável e pulsado. A fim de isolar o efeito do número de pulsos, os autores mantiveram todos os outros parâmetros constantes: duração de pulso de 100 μ s e taxa de repetição de 10 Hz. Para os comprimentos de onda 9,6 μ m e 10,6 μ m, a energia de cada pulso foi de 100 mJ e 240 mJ, enquanto a densidade de energia foi de 5 J/cm² e 12 J/cm² por pulso, respectivamente. O número de pulsos foi de 1, 5, 25 ou 100 para ambos os comprimentos de onda. Após a irradiação, uma ciclagem de pH foi realizada durante 9 dias (soluções: desmineralizadora pH 4,3 e remineralizadora pH 7,0). A microscopia eletrônica de varredura revelou a presença de alterações morfológicas na maior parte das superfícies irradiadas com o λ 9,6 μ m, as quais pareceram estar fundidas e compostas por novos cristais maiores que os do esmalte normal. Por sua vez, as áreas tratadas com o λ 10,6 μ m mostraram pouca ou nenhuma mudança morfológica, com poucos pontos de fusão, recristalização ou expulsão do esmalte. Na análise de microdureza, todos os grupos tratados com laser apresentaram lesões de cárie significativamente menores quando comparadas às do grupo controle, chegando a promover de 48% a 87% e de 28% a 59% de inibição de cárie para os comprimentos de onda 10,6 μ m e 9,6 μ m, respectivamente. Segundo os autores, os melhores resultados obtidos com o λ 10,6 μ m indicaram que o derretimento da superfície e a fusão não são necessários para aumentar a resistência do esmalte ao desafio ácido. Adicionalmente, o efeito inibitório dependeu do número de pulsos utilizados e, para os dois comprimentos de onda testados, menos de 25 pulsos foi considerado ideal.

Zuerlein *et al.* (1999) procuraram determinar a profundidade da decomposição do esmalte induzida termicamente, isto é, a perda de carbonato, utilizando parâmetros tidos como ideais na irradiação com laser de CO₂. Blocos de esmalte dental bovino foram irradiados com os comprimentos de onda 9,6 μ m e 10,6 μ m. A perda de carbonato, calculada por espectros infravermelhos, foi iniciada a temperaturas maiores que 400°C e só se completou quando da repetição da irradiação com energia acima do limiar de derretimento. Os autores demonstraram ainda que a perda do carbonato, tanto em

quantidade quanto em profundidade, foi superior com o comprimento de onda 10,6 μm comparado ao 9,6 μm , empregando pulsos com duração de 2 μs .

Hsu *et al.* (2000) investigaram os efeitos da irradiação com laser de CO_2 sobre a desmineralização do esmalte humano com ou sem matriz orgânica. Molares humanos hemiseccionados foram separados em dois grupos: a) esmalte normal (EN), com matriz orgânica; b) esmalte sem matriz orgânica (ESMO). Para remoção da matriz orgânica, duas extrações lipídicas (imersão em clorofórmio/metanol na proporção de 2:1, por 96 ou 15 h) intercaladas por uma extração protéica (imersão em hipoclorito de sódio com 10% a 13% de cloro por 4 h) foram efetuadas. Duas áreas de esmalte foram isoladas, uma delas serviu como controle e a outra foi tratada com laser de CO_2 sob os seguintes parâmetros: densidade de energia de 0,3 J/cm^2 , 2 W de potência, 5 ms por pulso, taxa de repetição de 20 Hz e diâmetro de feixe de 0,8 mm. Segundo os autores, um estudo piloto utilizando densidades de energia maiores que 3 J/cm^2 demonstrou haver formação de crateras e lascas na superfície do esmalte. Após a irradiação, as amostras foram submetidas à ciclagem de pH (soluções: desmineralizadora pH 4,6 e remineralizadora pH 7,0) durante 4 dias. Na microscopia de luz polarizada, os autores observaram que as amostras irradiadas permaneceram negativamente birrefringentes, sugerindo que a temperatura induzida pelo laser não alcançou 400°C. A microscopia eletrônica de varredura não evidenciou quaisquer derretimento superficial, formação de cratera ou elevação das superfícies de esmalte nos grupos irradiados. A extração orgânica não pareceu afetar a morfologia da superfície do esmalte desmineralizado. Por sua vez, a microrradiografia de contato revelou que a irradiação promoveu redução da perda mineral superior a 98% no EN e de 70% no ESMO, demonstrando significativa interação da matriz orgânica com o laser, resultando em efeito cárie-protetor com relação à perda mineral e profundidade de lesão.

Tange *et al.* (2000) analisaram *in vitro* os efeitos preventivos do laser pulsado TEA- CO_2 sobre o esmalte dental decíduo e permanente. Os autores irradiaram molares decíduos e permanentes com o λ 9,6 μm sob os seguintes parâmetros: 25 pulsos por ponto, duração do pulso de 5 μs , taxa de repetição de 0,5, 10 e 15 Hz, diâmetro do feixe de 1774 μm e densidade de energia por pulso de 1,0 e 1,5 J/cm^2 . Após a irradiação, realizaram

ciclagem de pH (soluções: desmineralizadora pH 4,3 e remineralizadora pH 7,0) durante 5 dias, avaliando, em seguida, as lesões de cárie com auxílio da análise de microdureza. De acordo com os resultados, todos os grupos tratados com laser exibiram lesões significativamente menores quando comparadas às do grupo controle, tendo sido obtida inibição de cárie variando de 29% a 57%. Ao considerar as mesmas condições de irradiação, a inibição no esmalte decíduo foi significativamente maior se comparado ao permanente, sendo de 54% e 49%, respectivamente.

Klein (2002) investigou *in vitro* o efeito do laser de CO₂ λ 10,6 μ m, em modo pulsado, sobre a inibição da desmineralização do esmalte ao redor de restaurações de resina composta. Assim, preparos cavitários padronizados foram realizados em blocos de esmalte dental humano provenientes de terceiros molares inclusos. A margem do ângulo cavo-superficial dos espécimes foi submetida à irradiação com densidades de energia de 5 J/cm² ou 10 J/cm² associada ou não à aplicação posterior de condicionamento ácido + adesivo. Outros parâmetros da irradiação foram mantidos constantes: tempo de exposição por pulso de 50 ms com intervalos de 500 ms e taxa de repetição de 2 Hz. Após os tratamentos, os preparos foram restaurados com resina composta e os espécimes submetidos às ciclagens térmica e de pH (soluções: desmineralizadora pH 4,6 e remineralizadora pH 7,0). A desmineralização do esmalte ao redor das restaurações foi quantificada pela análise de microdureza. De acordo com os resultados, as porcentagens de inibição de cárie variaram de 42,79% a 53,84% para os grupos irradiados com 5 J/cm² e de 46,12% a 57,12% para aqueles irradiados com 10 J/cm². O autor concluiu que o uso de laser de CO₂ (λ 10,6 μ m) foi efetivo em inibir a desmineralização adjacente à restauração de resina composta em situações de alto desafio cariogênico.

Tsai *et al.* (2002) testaram a efetividade dos lasers de CO₂ e de Nd:YAG pulsados sobre a resistência ácida *in vitro* do esmalte dental. Os autores empregaram 10 pré-molares que foram divididos em 3 partes sendo uma controle, outra irradiada com laser de CO₂, λ 10,6 μ m empregando 1 W de potência, duração de pulso de 667 μ s, diâmetro do feixe de 0,3 mm e a terceira parte com laser Nd:YAG utilizando 6 W de potência, duração de pulso de 800 μ s e diâmetro do feixe de 0,6 mm. A densidade de energia utilizada para os

dois lasers foi de 83,33 J/cm². Após a irradiação, os espécimes foram imersos individualmente em solução desmineralizadora (pH 4,5) por 24 ou 72 h. Por meio da microscopia de luz polarizada, os autores verificaram reduções de 46,1% e 23,9% na profundidade da lesão para os grupos tratados com laser de CO₂ e de 28,1% e 27,4% nas amostras irradiadas com o laser Nd:YAG após os desafios ácidos de 24 e 72 h, respectivamente. A microscopia eletrônica de varredura revelou que as superfícies tratadas com laser apresentaram-se com ablação, derretimento e rachaduras. O laser de CO₂ foi mais efetivo que o Nd:YAG no aumento da resistência do esmalte, considerando a mesma densidade de energia. De acordo com os pesquisadores, o tratamento com laser pode ser usado na prevenção da cárie desde que a formação de crateras e fissuras no esmalte irradiado possa ser resolvida.

2.1.1. Laser de CO₂ associado ao flúor

Os estudos que avaliaram a associação de laser de CO₂ e flúor na inibição de cárie empregaram, principalmente, o fluoreto de sódio (NaF) e o flúor fosfato acidulado (FFA). Alguns trabalhos mostraram que a aplicação isolada destes compostos no esmalte, previamente a desafios ácidos *in vitro*, pode promover redução da perda mineral da ordem de 35,9% a 55% (Chow *et al.*, 1992; Takagi *et al.*, 2000; Delbem & Cury, 2002). Por conseguinte, os efeitos da combinação destes agentes e laser de CO₂ na prevenção da cárie dental têm sido avaliados por várias pesquisas que são descritas a seguir.

Featherstone *et al.* (1991) produziram lesões de cárie incipientes no esmalte de molares e pré-molares, imergindo-os por 24 h em tampão lactato (pH 5,0). Posteriormente as amostras foram irradiadas com laser TEA-CO₂ λ 9,3 μ m, em modo pulsado, sob os seguintes parâmetros: taxa de repetição de 40 pulsos por min, duração dos pulsos de 100 a 200 ns, 15 ou 25 mJ por pulso. O tratamento com flúor, isoladamente ou após a irradiação, consistiu da aplicação de flúor fosfato acidulado (FFA) a 1,23% em gel por 5 min. Em seguida os grupos experimentais foram submetidos à ciclagem de pH por 5 dias (soluções: desmineralizadora pH 4,3 e remineralizadora pH 7,0). A microscopia eletrônica de

varredura mostrou que, quando um maior nível de energia e um maior tempo de exposição foram utilizados (25 mJ por pulso, 400 pulsos), algumas amostras apresentaram derretimento da superfície e remoção da camada superficial mais externa das lesões de cárie, expondo cristais subjacentes e abrindo dramaticamente os poros dentro da lesão. Por sua vez, níveis de energia mais baixos (15 mJ) e tempos de interação mais curtos (200 pulsos) não promoveram maiores danos superficiais. Na análise de microdureza, o grupo tratado somente com laser não diferiu significativamente dos grupos que não foram irradiados, enquanto o grupo tratado somente com FFA mostrou redução da progressão da lesão de aproximadamente 60%. A perda mineral das amostras tratadas com a combinação de laser e FFA não diferiu significativamente daquela referente ao grupo que não sofreu ciclagem de pH. Assim, o emprego do laser de CO₂ com baixa energia, juntamente com uma única aplicação de flúor, promoveu total inibição da progressão de lesões de cárie incipientes.

Fox *et al.* (1992) irradiaram blocos de esmalte humano com laser de CO₂ λ 10,6 μ m, em modo contínuo, potência de 50 W para períodos de 2 ou 4 s e densidades de energia de 65 e 130 J/cm², respectivamente. Após a irradiação, os blocos foram submetidos ao desafio ácido por 24 h em soluções desmineralizadoras (pH 4,5) que continham agentes químicos redutores da dissolução do esmalte: fluoreto de sódio (NaF), dodecilamina HCl ou etano-1-hidroxi-1-difosfonato (EHDP). A análise por microrradiografia quantitativa demonstrou que a irradiação com maior densidade de energia (130 J/cm²) resultou em aproximadamente 25% menos perda mineral que a exposição com densidade mais baixa (65 J/cm²). Adicionalmente, a combinação de irradiação com maior densidade de energia (130 J/cm²) e agentes químicos propiciou quase completa proteção contra o desafio ácido severo. O efeito inibitório de dissolução do flúor também foi melhorado pelo pré-tratamento com laser. Sob as condições empregadas no estudo, os autores concluíram que o laser e os agentes químicos utilizados agiram sinergicamente.

Visando a transformação da hidroxiapatita (HA) em fluorapatita por meio da irradiação com laser de CO₂, Meurman *et al.* (1997) misturaram HA sintética com fluoreto de sódio (NaF) na proporção 10:1 e irradiaram a mistura com laser de CO₂ em modo

contínuo, segundo as seguintes densidades de energia: 21, 38, 54, 105, 225 e 500 J/cm². As estruturas cristalinas foram investigadas com auxílio da difração por raios-X e da espectroscopia de infravermelho. De acordo com os resultados, o conteúdo de carbonato nos espécimes irradiados variou de 0,4% a 1%, enquanto nas amostras não irradiadas (apenas pó de NaF-HA) tal composto não foi detectado. Adicionalmente, picos de difração marcando somente fluorapatita foram observados apenas nas amostras irradiadas com densidades de energia iguais ou superiores a 38 J/cm², o que demonstrou ser possível transformar cristais de hidroxiapatita em fluorapatita instantaneamente na presença de flúor.

Hsu *et al.* (1998) avaliaram os efeitos do laser de CO₂ associado ou não a soluções fluoretadas sobre a desmineralização do esmalte dental humano. Os autores irradiaram blocos de esmalte com laser de CO₂ λ 10,6 μ m, em modo contínuo, potência de 50 W, diâmetro do feixe de 14 mm e densidades de energia de 42,5 a 170 J/cm². Após a irradiação as amostras foram expostas durante 24 h a uma solução desmineralizadora (pH 4,6) contendo ou não 0,2 ppm de flúor. Secções de esmalte foram examinadas pela microscopia ótica e pela microrradiografia quantitativa. A irradiação com laser induziu significativa redução da desmineralização do esmalte, devido primariamente à diminuição da solubilidade do mineral, alcançando a completa inibição quando foi utilizada densidade de energia de 170 J/cm². Quando as amostras foram imersas em soluções contendo flúor, a redução da perda mineral variou de 37,3% a 100%, suportando o conceito de sinergismo entre os efeitos do laser e solução de flúor na desmineralização do esmalte.

Phan *et al.* (1999) testaram a hipótese de que o laser de CO₂ associado ao flúor poderia efetivamente transformar a apatita carbonatada (AC) em fluorapatita (FAP). Blocos de esmalte bovino, com esmalte hígido ou desmineralizado artificialmente, foram previamente tratados com flúor fosfato acidulado (FFA) a 1,23%, durante 5 min, isoladamente ou associado ao laser TEA-CO₂ λ 9,6 μ m em modo pulsado. A irradiação seguiu os parâmetros: densidade de energia de 1 J/cm², duração do pulso de 4 μ s, taxa de repetição de 1 Hz e diâmetro do feixe de 1 mm. Os espécimes foram submetidos ao desafio ácido em solução desmineralizadora (pH 4,5) e a cada 2 min os perfis minerais de cálcio,

fósforo e flúor eram determinados. Além disso, as amostras foram avaliadas por meio da espectroscopia de infravermelho e da ressonância magnética nuclear. Os resultados mostraram ter havido perda de carbonato do mineral irradiado devido principalmente às modificações térmicas causadas pelo laser de CO₂, com densidade de energia de 1 J/cm². A incorporação de flúor no mineral hígido irradiado não foi muito diferente daquela observada no mineral não irradiado. Em contrapartida, no esmalte desmineralizado irradiado a incorporação de flúor foi até 45 vezes superior à do grupo controle, indicando que a dureza superficial do esmalte hígido retardou a difusão do flúor, enquanto que, no esmalte desmineralizado, a porosidade da superfície permitiu melhor difusão e deposição do íon. O mecanismo de transformação da AC em FAP, segundo os autores, é que durante a aplicação de flúor em gel, os íons difundiram por entre os poros interprismáticos formando uma camada de flúor que cobre todos os prismas de esmalte. Após a irradiação com laser de CO₂, esta fina camada e os micrômetros mais externos da superfície do esmalte foram termicamente derretidos e recristalizados para se rearranjarem em uma nova estrutura, o mineral de FAP.

Hsu *et al.* (2001) investigaram os efeitos da interação entre laser de CO₂, flúor e matriz orgânica sobre a desmineralização do esmalte humano. Para isso, seções de molares humanos foram separadas em dois grupos: a) esmalte fluoretado (EF); b) esmalte fluoretado não-orgânico (EFNO). Todas as amostras deste último grupo foram submetidas a duas extrações lipídicas intercaladas por uma extração protéica, conforme já descrito previamente (Hsu *et al.*, 2000). O esmalte dental de todas as amostras foi tratado com gel de fluoreto de sódio (NaF) a 2% por 4 min. A irradiação com laser de CO₂ foi realizada utilizando os seguintes parâmetros: duração do pulso de 5 ms, taxa de repetição de 20 Hz, diâmetro do feixe de 0,8 mm e potência de 2 W, com potência de pico de 0,346 W medida por potenciômetro. Um esquema de ciclagem de pH (soluções: desmineralizadora pH 4,6 e remineralizadora pH 7,0) foi realizado sob agitação durante 4 dias. A microscopia eletrônica de varredura revelou ausência de crateras ou elevações incomuns na superfície das amostras do grupo EF irradiado, inexistência de derretimento e a extração de lipídios e proteínas pareceu não afetar a morfologia da superfície do esmalte desmineralizado. A

combinação de flúor e laser mostrou, na análise microrradiográfica, ser efetiva na prevenção da desmineralização do esmalte, reduzindo a perda mineral em 98,3% no EF e 95,1% no EFNO quando comparados com o esmalte hígido. Ao comparar a perda mineral obtida no EFNO irradiado com aquela do esmalte não-orgânico irradiado, isto é, sem flúor, reduções significativas de 96% e 74% foram obtidas, respectivamente. De acordo com os autores, quando a matriz orgânica foi removida, houve um aumento da efetividade do flúor em virtude, possivelmente, da incorporação deste íon na superfície do cristal. Assim, o estudo demonstrou que o efeito reduzido da irradiação laser sobre o esmalte sem matriz orgânica poderia ser compensado pela presença de flúor durante a irradiação.

Nobre dos Santos *et al.* (2001) procuraram verificar os efeitos da associação de flúor e irradiação do esmalte dental com laser TEA-CO₂ λ 9,6 μ m, em modo pulsado, na inibição da progressão da lesão de cárie. Para realizar o estudo, os pesquisadores mantiveram 30 blocos hígidos e 80 foram imersos em solução tampão lactato (pH 5,0) por 48 h. O tratamento com laser foi realizado antes ou após a aplicação de flúor fosfato acidulado (FFA) sob a forma de gel por 5 min. A irradiação foi efetuada com os seguintes parâmetros: 25 pulsos por ponto, duração do pulso de 5 μ s, taxa de repetição de 10 Hz, diâmetro do feixe de 1,5 mm e densidades de energia de 1 e 1,5 J/cm² por pulso. Um esquema de ciclagem de pH foi realizado durante 5 dias a fim de simular um alto desafio cariogênico. A análise microrradiográfica dos espécimes demonstrou que, na ausência do flúor, a porcentagem de inibição de cárie variou de 35% a 42%, enquanto que, na presença do íon, uma inibição de 49% a 76% foi alcançada, sendo o melhor resultado observado quando o esmalte desmineralizado foi tratado com o flúor antes do laser. Os autores concluíram que a combinação do laser TEA-CO₂ e aplicação de FFA produziu um efeito protetor significativo contra a progressão da lesão no esmalte dental desmineralizado e isto foi conseguido com densidade de energia bastante baixa e pequeno número de pulsos por ponto irradiado.

2.2. CONSIDERAÇÕES SOBRE OS MÉTODOS EMPREGADOS

Este tópico teve por objetivo abordar algumas considerações relativas à ciclagem de pH e à análise de microdureza, métodos empregados no presente estudo.

2.2.1. Ciclagem de pH

A ciclagem de pH se refere a um modelo *in vitro* de desenvolvimento de cárie em que o substrato (esmalte/dentina) é exposto a combinações de desmineralização e remineralização, designadas para simular as variações dinâmicas na saturação do mineral e no pH associadas com o processo natural de cárie (White, 1995). É esta dinâmica do método que o diferencia de outros modelos de indução de lesão de cárie artificial como a imersão em solução tampão de acetato ou lactato; imersão em meio de cultura de bactérias acidogênicas e contato com gel acidificado cujo comportamento estático simula uma condição de ataque ácido bastante diferente do que ocorre no ambiente bucal. Dessa forma, quando o substrato dental é mantido na solução desmineralizadora, composta de tampões ácidos com cálcio e fosfato em pH baixo, mimetizam-se os vários momentos de decréscimo de pH que ocorrem no biofilme dental e na superfície do esmalte diariamente. O estágio de remineralização, por sua vez, é simulado com o emprego de soluções contendo cálcio e fosfato em um grau de saturação semelhante àquele da saliva.

De acordo com White (1995), lesões de 100-250 μm de profundidade, formadas em períodos tão curtos quanto dias ou semanas nos modelos *in vitro*, representam uma progressão clínica da lesão de 6 a 12 meses. Portanto, os sistemas *in vitro* aceleram a dinâmica mineral associada ao processo de desenvolvimento e reversão da lesão cáriosa dentro de períodos muito menores dos que ocorrem *in vivo*. Ainda segundo este autor (White, 1992, 1995), os modelos *in vitro* permitem avaliar os mecanismos envolvidos nos processos de desmineralização e remineralização com habilidade de quantificar efeitos sobre uma simples variável, mantidas as outras constantes. Por outro lado, apresentam algumas limitações como a inadequada simulação das condições intra-bucais complexas e

diversas que contribuem para o desenvolvimento da cárie; a dificuldade de simular o volume e a composição salivar em relação à área do dente encontrada na remineralização *in vivo*; os artefatos associados com a escolha do substrato; e as condições do teste, em especial os períodos de imersão na solução desmineralizadora ou remineralizadora.

O modelo pioneiro de ciclagem de pH foi proposto por ten Cate & Duijsters, em 1982. Os pesquisadores imergiram dentes bovinos com lesão de cárie subsuperficial em soluções desmineralizadora (DES) e remineralizadora (RE), alternadamente. A solução DES era constituída por 2,2 mmol/L de cálcio, 2,2 mmol/L de fósforo e 50 mmol/L de ácido acético em pH 4,7 e a solução RE continha 1,5 mmol/L de cálcio, 0,9 mmol/L de fósforo, 130 mmol/L de cloreto de potássio e 20 mmol/L de tampão cacodilato em pH 7,0. Adicionalmente, foram acrescentados 2 ppm de flúor nas soluções usadas para alguns grupos. A ciclagem foi realizada durante 10 dias e os espécimes foram mantidos na solução DES por 3 ou 8 h diárias. Determinações de cálcio, fósforo e flúor foram realizadas nas soluções e as lesões foram avaliadas com auxílio da análise de microdureza e da microrradiografia. De acordo com os autores, as condições experimentais do estudo foram semelhantes às do ambiente oral, comparadas com estudos de des- e remineralização conduzidos em separado.

Vários pesquisadores propuseram alterações nesse modelo, seja na composição ou no pH das soluções, no tempo de imersão dos espécimes, no volume de solução por área dental exposta ou na duração da ciclagem, de acordo com o delineamento experimental.

Featherstone *et al.* (1986) desenvolveram um modelo *in vitro* que apresentava correlação com experimentos *in vivo*. Na pesquisa *in vitro*, os espécimes de esmalte dental humano permaneciam 6 h em 40 mL de solução DES (pH 4,3) e aproximadamente 17 h em 20 mL de solução RE (pH 7,0). A composição das soluções era a mesma daquela usada por ten Cate & Duijsters (1982), entretanto, a concentração molar na solução DES era menor para cálcio (2 mmol/L) e fosfato (2 mmol/L) e maior para tampão acetato (75 mmol/L), enquanto na solução RE era maior para cloreto de potássio (150 mmol/L). O processo de ciclagem de pH era repetido durante 14 dias consecutivos sendo que, nos finais de semana,

os espécimes permaneciam na solução RE. Antes da imersão na solução RE, os espécimes foram tratados por 5 min com produtos fluoretados. No experimento *in vivo*, braquetes foram fixados em pré-molares que seriam extraídos por razões ortodônticas em 20 pacientes. Protocolos de uso dos produtos fluoretados foram entregues aos voluntários e, após 20 dias, os dentes foram extraídos e analisados pela microdureza em corte transversal, assim como os espécimes utilizados no estudo *in vitro*. Os resultados mostraram que a profundidade e a extensão da desmineralização ocorrida no modelo *in vitro* foi muito similar àquela observada no estudo *in vivo* de um mês e, desta forma, possibilitaria, ao menos para produtos fluoretados, uma razoável predição da eficácia clínica.

Argenta *et al.* (2003) modificaram o modelo de ciclagem de pH proposto por Featherstone *et al.* (1986) com o objetivo de preservar a superfície do esmalte e de produzir lesões iniciais que pudessem ser avaliadas pela análise de microdureza. Para isso, realizaram algumas alterações como a adição de flúor em baixa concentração nas soluções desmineralizadora e remineralizadora, a elevação do pH da solução remineralizadora para 7,4, a diminuição do período de permanência dos espécimes na solução desmineralizadora para 3 h diárias, a redução do número de ciclos que passou a ser 5 e a permanência dos espécimes na solução remineralizadora por 2 dias, depois de finalizados os ciclos. Os autores observaram que a profundidade da lesão formada no esmalte foi similar àquela encontrada por Featherstone *et al.* (1986) e concluíram que o modelo possibilita avaliar as variações de mineral ocorridas nas camadas mais externas do esmalte durante o desenvolvimento de cárie.

2.2.2. Análise de microdureza

A determinação das alterações do conteúdo mineral, resultantes da desmineralização e remineralização nos tecidos dentais duros, é importante em vários estudos na odontologia, especialmente na área de cariologia. Dentre os diversos métodos de quantificação mineral no esmalte destaca-se a microdureza em corte transversal, ou

microdureza do esmalte seccionado longitudinalmente, que indiretamente evidencia a perda e/ou ganho mineral.

No teste de microdureza, um penetrador é levemente pressionado contra a superfície a ser testada usando carga e tempo pré-definidos. Há dois tipos de penetradores utilizados em pesquisas na área de cariologia: o diamante Vickers e o diamante Knoop, que produzem impressões em forma de quadrado e losango, respectivamente (ten Bosch & Angmar-Månsson, 1991). O comprimento das impressões na amostra é determinado microscopicamente em micrômetros e se o valor aumenta, o tecido perdeu mineral, contrariamente, se diminui em magnitude, muito provavelmente o tecido ganhou mineral (Arends & ten Bosch, 1992).

Featherstone *et al.* (1983) verificaram, em estudo comparativo, que a porcentagem de volume mineral (%vol) determinada pela microrradiografia, uma técnica quantitativa, também pode ser calculada por meio da microdureza em corte transversal aplicando-se a seguinte fórmula: $\%vol = 4,3 \times (KHN)^{1/2} + 11,3$ onde KHN (*Knoop hardness number*) é o número de dureza Knoop. O coeficiente de correlação encontrado foi de 0,919 e os pesquisadores concluíram que a técnica de microdureza pode ser utilizada não somente na comparação de alterações de dureza, bem como uma medida de perda/ganho mineral resultante de processos de desmineralização e remineralização.

Kielbassa *et al.* (1999) também observaram relação linear ($r^2 = 0,915$) entre a raiz quadrada do KHN e a %vol e, segundo eles, os valores de microdureza podem ser convertidos em %vol usando a seguinte equação: $[21,19 + 3,66 \times (KHN)^{1/2}]$.

3. PROPOSIÇÃO

Avaliar *in vitro* o efeito da associação de laser de dióxido de carbono (CO₂), comprimento de onda 10,6 µm, e flúor fosfato acidulado na inibição da progressão de cárie em esmalte dental decíduo desmineralizado, submetido à ciclagem de pH.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. ASPECTOS ÉTICOS

Este estudo foi conduzido após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP, conforme Protocolo nº 146/2001 (Anexo 1). O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foi assinado pelos pais ou responsáveis dos doadores de dentes decíduos e o Termo de Doação de Dentes pelos Cirurgiões-dentistas.

4.2. DELINEAMENTO DO ESTUDO

Para avaliar o efeito *in vitro* da associação de laser de CO₂ e flúor fosfato acidulado (FFA) na inibição da progressão de cárie em esmalte dental decíduo desmineralizado, um delineamento experimental inteiramente casualizado com 6 grupos e 10 repetições foi empregado, conforme descrito a seguir:

- Grupo Cariado: 10 espécimes com esmalte cariado, mantidos em ambiente úmido;
- Grupo Controle: 10 espécimes com esmalte cariado, submetidos à ciclagem de pH;
- Grupo L: 10 espécimes com esmalte cariado, submetidos à irradiação com laser de CO₂, seguida pela ciclagem de pH;
- Grupo F: 10 espécimes com esmalte cariado, submetidos à aplicação de FFA, seguida pela ciclagem de pH;
- Grupo LF: 10 espécimes com esmalte cariado, submetidos à irradiação com laser de CO₂, seguida pela aplicação de FFA e ciclagem de pH;
- Grupo FL: 10 espécimes com esmalte cariado, submetidos à aplicação de FFA, seguida pela irradiação com laser de CO₂ e ciclagem de pH.

Os procedimentos experimentais empregados neste estudo estão esquematicamente representados na Figura 1. A Figura 2 ilustra as diversas etapas do experimento, desde o preparo dos espécimes até a realização das análises.

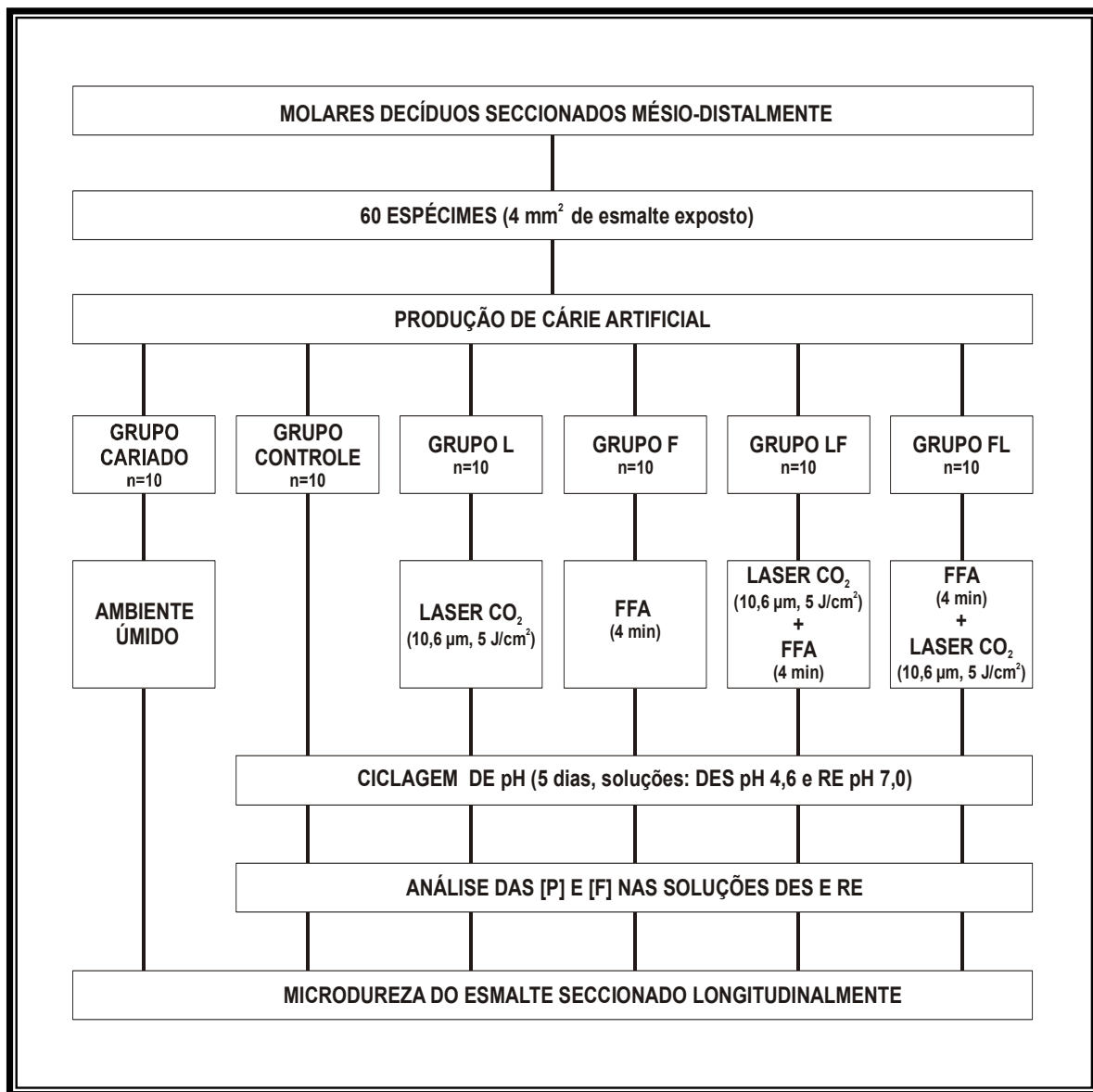


Figura 1. Fluxograma representando os procedimentos experimentais adotados no estudo.



Figura 2. a) Molares decíduos hígidos; b) Secção méso-distal; c) Área de esmalte exposta (4 mm^2); d) Produção de cárie artificial; e) Opus 20 (lasers $\text{CO}_2/\text{Er:YAG}$); f) Irradiação do espécime; g) Aplicação de FFA; h) Ciclagem de pH - solução DES; i) Ciclagem de pH - lavagem com água destilada e deionizada; j) Ciclagem de pH - solução RE; k) Microdurômetro para análise de microdureza; l) Espectrofotômetro para análise de fósforo; m) Eletrodo específico e analisador de íons para análise de flúor.

4.3. OBTENÇÃO DOS DENTES E PREPARO DOS ESPÉCIMES

Foram coletados 42 molares decíduos humanos hígidos, extraídos por razões que não as desta pesquisa. Os dentes foram armazenados em solução de timol 0,1% pelo período mínimo de 30 dias, após limpeza com cureta (nº 11 ½), explorador (nº 5) e holemback (nº 3) e remoção dos remanescentes radiculares com disco flexível diamantado dupla face (ref. 7020 - KG Sorensen) em motor de baixa rotação. Uma secção no sentido méso-distal das coroas foi realizada em cortadeira Isomet 1000 (Buehler) com disco diamantado nº 11-4253 (Buehler), totalizando 84 metades dentais. Posteriormente, os espécimes foram submetidos à profilaxia com escova Robinson em baixa rotação e pasta de alumina (5 µm) (Buehler) durante 30 s e a dois banhos de ultra-som (Unique) de 30 s cada. Em seguida, foram cuidadosamente examinados com lupa, selecionando-se aqueles cujo esmalte estava íntegro e livre de manchas brancas, trincas ou outras imperfeições. Cada espécime foi recoberto, no terço médio da face vestibular ou lingual, com verniz ácido-resistente, deixando-se uma área de esmalte dental exposta (janela) medindo 2x2 mm (Figura 2a,b,c). Sessenta espécimes foram selecionados para o experimento e os restantes foram utilizados em estudos pilotos.

4.4. PRODUÇÃO DE LESÃO DE CÁRIE ARTIFICIAL NO ESMALTE

Para produzir a lesão de cárie, cada espécime foi mantido individualmente em 25 mL (6,25 mL de solução/mm² de esmalte exposto) de solução tampão acetato 0,05 M pH 5,0 (Paes Leme *et al.*, 2003) 50% saturada em relação a hidroxiapatita (ref. F500), durante 48 h a 37°C (Figura 2d). O período de exposição foi determinado em estudo piloto com auxílio da análise de microscopia de luz polarizada que evidenciou, no esmalte dental decíduo, a presença de lesão de cárie subsuperficial com 50 µm de profundidade, em média. A concentração de cálcio encontrada na solução foi de 66,3 µg/mL, tendo sido determinada pela espectrometria de absorção atômica com chama em espectrofotômetro modelo 506 (Perkin Elmer). A concentração de fósforo foi de 32 µg/mL tendo sido determinada por meio do método colorimétrico de Fiske e Subbarow (1925) em espectrofotômetro modelo 800M (Analyser) ajustado a 660 nm.

4.5. TRATAMENTO DO ESMALTE COM LASER DE CO₂ PULSADO

A irradiação do esmalte dental decíduo desmineralizado foi realizada no Laboratório Especial de Laser em Odontologia (LELO), da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo usando um laser de CO₂ pulsado, comprimento de onda de 10,6 μm (Opus 20 n° de série AS 3101004; Figura 2e). Segundo as especificações do aparelho, o modo de emissão pode ser contínuo com potência média de até 10 W, ou pulsado com potência de até 6 W, enquanto a duração de pulso pode variar de 50 a 500 ms (Anexo 2). A seleção dos parâmetros da irradiação baseou-se em estudo prévio de Klein (2002), sendo o tempo de exposição por pulso de 50 ms com intervalos de 500 ms e a taxa de repetição de 1 Hz. O diâmetro do feixe foi de 0,8 mm. A potência ajustada no aparelho foi de 1 W, mas a medição por meio de potenciômetro (Coherent Radiation - Palo Alto Model - 201) indicou que a potência efetivamente empregada foi de 0,5 W, determinando uma densidade de energia de 5 J/cm² por pulso. Um dispositivo confeccionado com fio ortodôntico foi fixado junto à ponta do laser com o objetivo de padronizar a distância de 5 mm para a irradiação (Figura 2f). Todos os espécimes dos grupos L, LF e FL foram irradiados com laser de CO₂, realizando-se uma varredura da área de esmalte exposta. Considerando o diâmetro do feixe e a área a ser irradiada, o tempo total de irradiação foi de aproximadamente 30 s por espécime.

4.6. TRATAMENTO DO ESMALTE COM FLÚOR FOSFATO ACIDULADO (FFA)

Os grupos F, FL e LF foram submetidos à aplicação tópica de flúor fosfato acidulado em forma de gel (Odashcam – Dentsply) contendo 1,23% de flúor e pH 3,5. O tratamento foi realizado sobre o esmalte dental decíduo desmineralizado durante 4 min, utilizando-se aplicadores descartáveis (KG Sorensen), como ilustra a Figura 2g. Em seguida, os espécimes foram lavados com água destilada e deionizada por 15 s e secos com papel absorvente. A aplicação do gel de flúor foi realizada antes (grupo FL) ou após (grupo LF) o tratamento com laser.

4.7. CICLAGEM DE pH

Para a realização da ciclagem de pH foi utilizado o modelo proposto por Featherstone *et al.* (1986), acrescido de algumas modificações realizadas por Argenta *et al.* (2003). Cada espécime permaneceu imerso individualmente, durante 3 h, em 20 mL (5 mL/mm² de esmalte exposto) de solução desmineralizadora (DES), contendo 2 mmol/L de cálcio, 2 mmol/L de fosfato e 75 mmol/L de acetato em pH 4,6 (Figura 2h) que foi estabelecido por meio de estudos pilotos. Os espécimes eram removidos desta solução, lavados com água destilada e deionizada por 10 s (Figura 2i) e secos com papel absorvente. Em seguida, eram imersos individualmente, durante aproximadamente 21 h, em 10 mL (2,5 mL/mm² de esmalte exposto) de solução remineralizadora (RE) pH 7,0, contendo 1,5 mmol/L de cálcio, 0,9 mmol/L de fosfato, 150 mmol/L de cloreto de potássio e 20 mmol/L de tampão cacodilato (Figura 2j). A composição química desta solução aproxima-se do grau de saturação dos minerais da apatita encontrados na saliva, sendo semelhante à usada por ten Cate & Duijsters (1982). Ambas as soluções continham cristais de timol para evitar o crescimento bacteriano e foram preparadas usando os mesmos reagentes como fontes de cálcio e fosfato. As concentrações de cálcio, fósforo e flúor das soluções DES e RE encontram-se no Quadro 1.

Quadro 1. Concentração de cálcio, fósforo e flúor (µg/mL) encontrada nas soluções DES e RE antes da ciclagem de pH.

Solução	Concentração iônica (µg/mL)		
	Cálcio	Fósforo	Flúor
DES	88,59	59,22	0,016
RE	63,65	30,37	0,016

O procedimento de ciclagem iniciou-se com a solução RE e foi repetido durante 5 dias consecutivos, havendo, a partir de então, um período de 48 h de imersão na solução RE. Durante todo o processo, os espécimes permaneceram em estufa ajustada a 37°C,

exceto nos intervalos de lavagem e alternância das soluções. Terminada a ciclagem de pH, os espécimes foram lavados com jatos de água destilada e deionizada durante 10 s, secos com papel absorvente e mantidos em ambiente fechado, úmido e sob refrigeração até o preparo para leitura de microdureza.

4.8. ANÁLISE DE MICRODUREZA

4.8.1. Obtenção dos corpos de prova

Cada espécime foi fixado com cera pegajosa em placa de resina acrílica (40x40x4 mm) e seccionado longitudinalmente, passando pelo início da janela de esmalte, utilizando-se cortadeira elétrica Isomet 1000 (Buehler) e disco diamantado nº 11-4253 (Buehler). O embutimento foi realizado em resina de poliestireno autopolimerizável (Piraglass). Para isto, a face seccionada de cada espécime foi pressionada contra fita VHB™ dupla-face de espuma acrílica e de adesivo transferível (3M) colada em placa de vidro. Para o acondicionamento da resina, um cano de policloreto de vinila (pvc) de ½ polegada, medindo aproximadamente 2 cm de altura, foi posicionado sobre a fita, de modo que o espécime ficasse ao centro. A manipulação da resina seguiu as orientações do fabricante e um intervalo mínimo de 12 h foi mantido até o acabamento e polimento, realizados em politriz elétrica rotativa (Arotec APL-4) em alta velocidade. Para o acabamento, lixas abrasivas de óxido de alumínio refrigeradas a água e de granulação 400, 600 e 1200 foram utilizadas por 20 s, 30 s e 1 min, respectivamente. O polimento foi efetuado com discos de feltro, pastas diamantadas (Arotec) de 6 µm e 3 µm durante 20 s cada, além de suspensão de diamante de 1 µm (Buehler) por 1 min. Entre a troca das lixas todos os espécimes foram submetidos a banho de ultra-som (Unique) com água destilada e deionizada, durante 3 min, e entre as pastas/suspensão com detergente líquido comum diluído em água, durante 5 min. Em seguida, foram lavados abundantemente em água destilada e deionizada corrente e armazenados em ambiente úmido, fechado e sob refrigeração.

4.8.2. Microdureza do esmalte seccionado longitudinalmente

Para verificar os efeitos dos diversos tratamentos na inibição da progressão da lesão de cárie, todos os espécimes foram submetidos à análise de microdureza do esmalte seccionado longitudinalmente.

O aparelho utilizado foi o microdurômetro HMV-2 (Shimadzu, Figura 2k) com penetrador do tipo Knoop. As impressões foram realizadas mantendo o longo eixo do diamante do penetrador paralelo à superfície externa do esmalte e utilizando carga estática de 25 g durante 5 s, em pontos distintos, porém com distâncias padronizadas. Três fileiras, distanciadas entre si em 100 μm e com 12 impressões cada, foram executadas a partir de 10 μm da superfície do esmalte, seguindo até a profundidade de 180 μm , com intervalos de 10 μm entre as 6 primeiras impressões e de 20 μm entre as restantes, conforme ilustra a Figura 3.

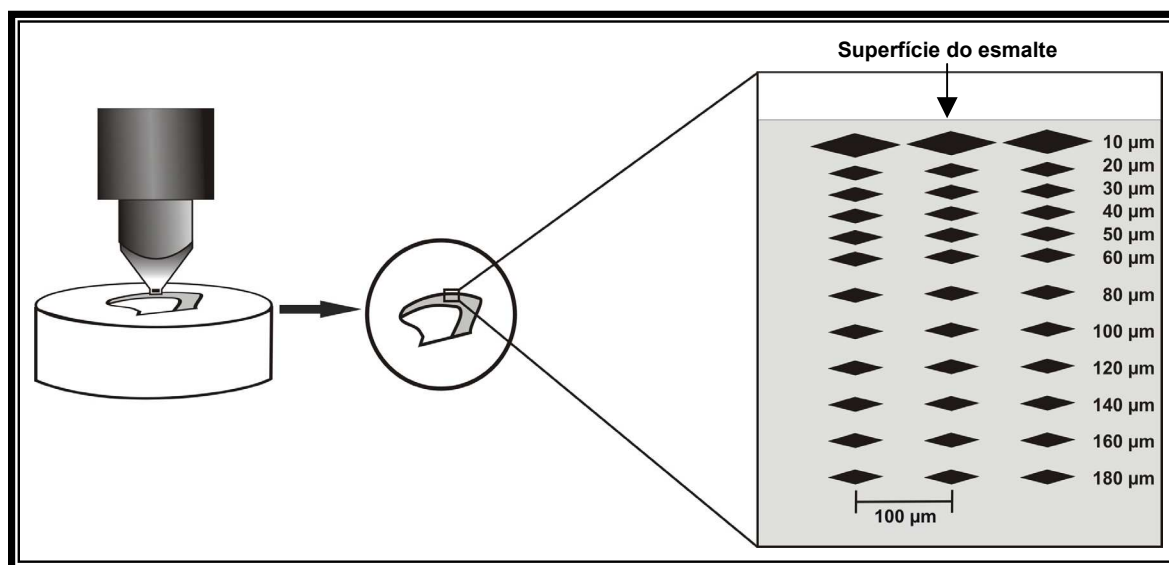


Figura 3. Ilustração representativa das impressões realizadas nos espécimes durante análise de microdureza.

4.8.3. Cálculo da perda mineral

Para o cálculo da perda mineral, as médias dos valores de dureza Knoop obtidos em cada profundidade foram transformadas em porcentagem de volume mineral (%vol) pela fórmula proposta por Featherstone *et al.* (1983):

$$\%vol = 4,3 \times (KHN)^{1/2} + 11,3$$

onde KHN (*Knoop hardness number*) é o número de dureza Knoop médio em cada uma das profundidades analisadas.

Os valores obtidos foram plotados em gráfico de forma que a ligação entre os pontos permitiu traçar uma curva. O perfil mineral foi determinado por meio do cálculo da área sob a curva construída. A Figura 4a ilustra o perfil mineral do esmalte desmineralizado (Z_{ED}) e a Figura 4b o perfil mineral do esmalte considerado hígido (Z_{EH}), obtido pela projeção da porcentagem de volume mineral média encontrada nas profundidades de 100, 120, 140, 160 e 180 μm . A diferença entre Z_{EH} e Z_{ED} resultou no parâmetro ΔZ (Figura 4c) que corresponde, em última análise, à perda mineral do esmalte.

Adicionalmente, a porcentagem de inibição da progressão de cárie foi calculada para os grupos L, F, LF e FL, utilizando-se a média ΔZ , por meio da fórmula:

$$\% \text{ de Inibição} = \frac{(\Delta Z \text{ Controle} - \Delta Z \text{ Cariado}) - (\Delta Z \text{ Tratamento} - \Delta Z \text{ Cariado})}{(\Delta Z \text{ Controle} - \Delta Z \text{ Cariado})} \times 100$$

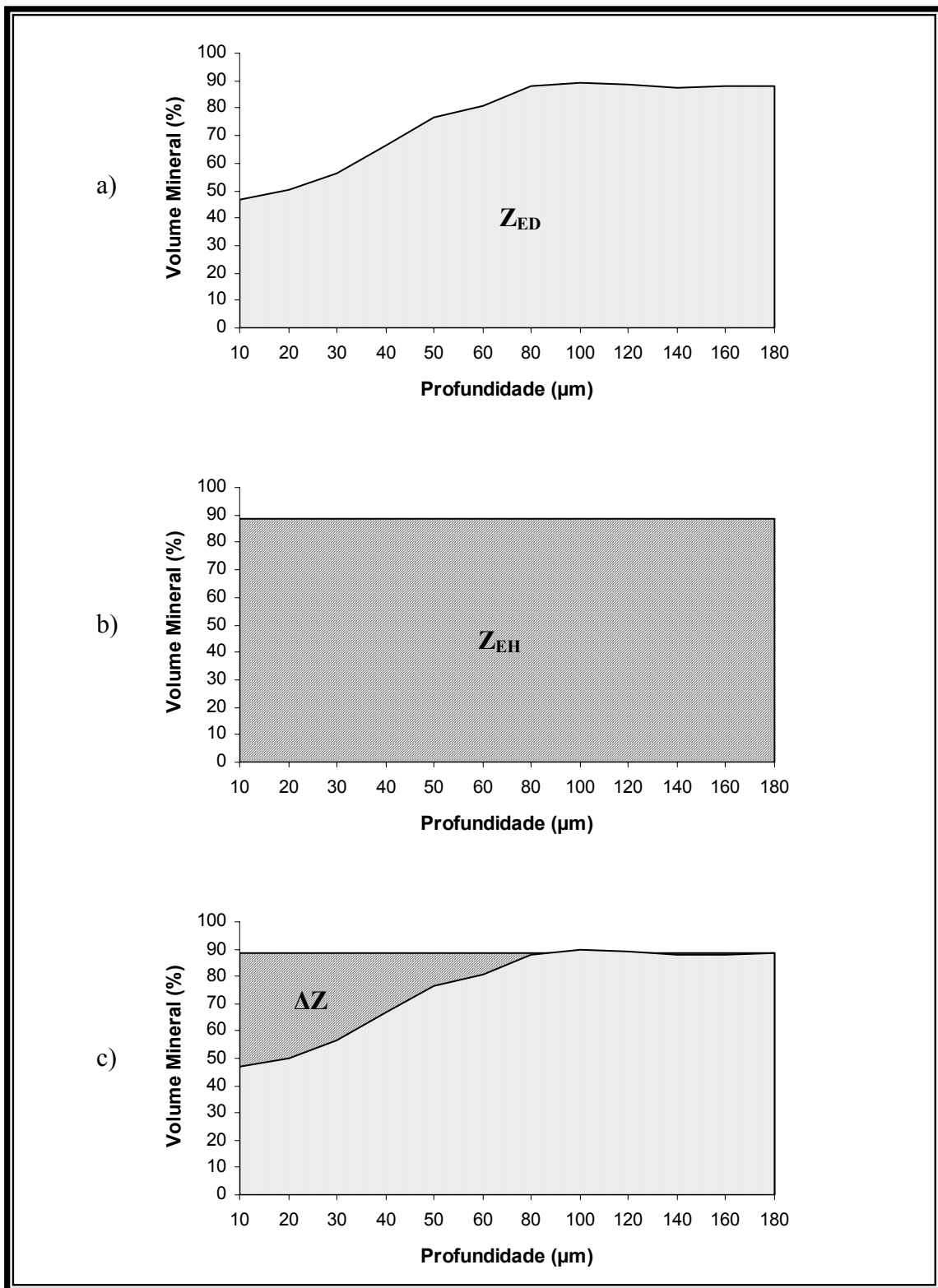


Figura 4. Ilustração do parâmetro ΔZ : a) Perfil mineral do esmalte desmineralizado; b) Perfil mineral do esmalte hígido; c) Perda mineral (ΔZ) do esmalte.

4.9. DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE FÓSFORO E DE FLÚOR NAS SOLUÇÕES DA CICLAGEM DE pH

Com o objetivo de avaliar o ganho ou a perda de mineral dos espécimes, foram determinadas as concentrações de fósforo e de flúor em cada uma das soluções desmineralizadora (DES) e remineralizadora (RE) que participaram da ciclagem de pH.

4.9.1. Concentração de fósforo

A determinação da concentração de fósforo nas soluções DES e RE foi conduzida utilizando-se o método colorimétrico de Fiske & Subbarow (1925), cujo princípio é a transformação do fósforo em fosfomolibdato o qual, por sua vez, é reduzido pelo ácido alfa-amino-naftol sulfônico a um produto de cor azul. Para obter-se a absorbância das soluções foi utilizado um espectrofotômetro modelo 800M (Analyser) ajustado a 660 nm (Figura 2l) e previamente calibrado com soluções padrões contendo 0,6 a 4,8 µg/mL de fósforo. As leituras foram convertidas em µg/mL de fósforo por meio da regressão linear da curva de calibração.

4.9.2. Concentração de flúor

A concentração de flúor foi determinada nas soluções DES e RE utilizadas na ciclagem de pH utilizando-se eletrodo específico modelo 96-09 (Orion) acoplado a um analisador de íons modelo EA 940 (Orion), ilustrados na Figura 2m. A calibração do sistema foi realizada com padrões de 0,015 a 0,5 µg/mL de flúor preparados em TISAB III, pH 5,0 na proporção de 1:10. As leituras, expressas em mV, foram convertidas em µg/mL de flúor por meio da regressão linear da curva de calibração.

4.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis respostas analisadas foram a perda mineral, representada pelo parâmetro ΔZ , e as concentrações de flúor e de fósforo nas soluções DES e RE da ciclagem de pH, tendo os tratamentos do esmalte como fontes de variação. Utilizando-se do pacote estatístico *Statistical Analysis System* (SAS Institute Inc., 2001), as seguintes análises foram realizadas:

- Verificação das pressuposições necessárias para Análise de Variância. Os dados referentes às variáveis perda mineral (ΔZ) e concentração de fósforo nas soluções DES e RE apresentaram distribuição normal e homogeneidade de variâncias. Por sua vez, a variável concentração de flúor na solução DES apresentou problemas na normalidade, na escala medida e heterogeneidade de variâncias, tendo sido transformada utilizando-se o método “potência ótima de BOX-COX” em $([F] \text{ DES})^{-1}$. A variável concentração de flúor na solução RE também apresentou problemas na normalidade e na escala medida, heterogeneidade de variâncias, tendo sido também transformada utilizando-se o método “potência ótima de BOX-COX” em $([F] \text{ RE})^{-0,3}$;
- Observação dos dados potencialmente discrepantes para analisar sua real excessiva influência e, se necessário, sua exclusão. Um valor extremo (“outlier”) foi excluído para cada uma das seguintes variáveis: concentração de fósforo na solução RE e concentração de flúor na solução RE;
- Comparações múltiplas entre médias, por meio do Teste de Tukey ao nível de significância de 5%.

Adicionalmente, empregou-se o teste *t* de Student ao nível de significância de 5%, utilizando-se do programa estatístico BioEstat 3.0 (Ayres *et al.*, 2003), para comparar as concentrações de fósforo e de flúor encontradas nas soluções DES e RE antes e após a ciclagem de pH.

5. RESULTADOS

Os resultados são apresentados quanto aos efeitos dos tratamentos na perda mineral (ΔZ (%vol x μm)) e nas concentrações iônicas das soluções desmineralizadora (DES) e remineralizadora (RE) após ciclagem de pH.

5.1. EFEITO DOS TRATAMENTOS NA PERDA MINERAL (ΔZ) E NA INIBIÇÃO DA PROGRESSÃO DE CÁRIE

O valor de ΔZ (%vol x μm) para cada tratamento, bem como a porcentagem de inibição da progressão de cárie para os grupos L, F, LF e FL estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Média e desvio padrão (n=10) da perda mineral (ΔZ (%vol x μm)) e porcentagem de inibição (%) da progressão de cárie no esmalte dental decíduo cariado após ciclagem de pH.

GRUPO	ΔZ (%vol x μm)	Inibição da progressão de cárie
Cariado (apenas esmalte cariado)	1552,45 $\pm$ 676,39 b	—
Controle (esmalte cariado + ciclagem de pH)	3077,40 $\pm$ 513,67 a	—
L (esmalte cariado + laser + ciclagem de pH)	2053,76 $\pm$ 814,77 b	67%
F (esmalte cariado + FFA + ciclagem de pH)	2160,63 $\pm$ 646,89 b	60%
LF (esmalte cariado + laser + FFA + ciclagem de pH)	1592,89 $\pm$ 474,25 b	97%
FL (esmalte cariado + FFA + laser + ciclagem de pH)	1748,81 $\pm$ 469,80 b	87%

Médias seguidas por letras distintas diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Na presente pesquisa, observou-se inibição da progressão de cárie de 60% a 97%. A análise da Tabela 1 também evidencia que a perda mineral (ΔZ) do esmalte dental decíduo cariado submetido à irradiação com laser de CO_2 ou à aplicação de FFA, ou ainda, à associação de ambos foi estatisticamente menor ($p < 0,05$) que aquela do grupo Controle.

Adicionalmente, verifica-se que a perda mineral (ΔZ) dos grupos L, F, LF e FL não diferiu significativamente ($p > 0,05$) daquela ocorrida no grupo que não foi submetido à ciclagem de pH (grupo Cariado), ou seja, os tratamentos preventivos empregados foram efetivos na inibição da progressão da lesão. Por outro lado, não foram observadas diferenças significativas nos valores de ΔZ ($p > 0,05$) entre os grupos L, F, LF e FL.

A Figura 5 ilustra a perda mineral média e a Figura 6 os traçados representativos dos valores médios de ΔZ , obtidos com auxílio da análise de microdureza, para cada grupo do experimento.

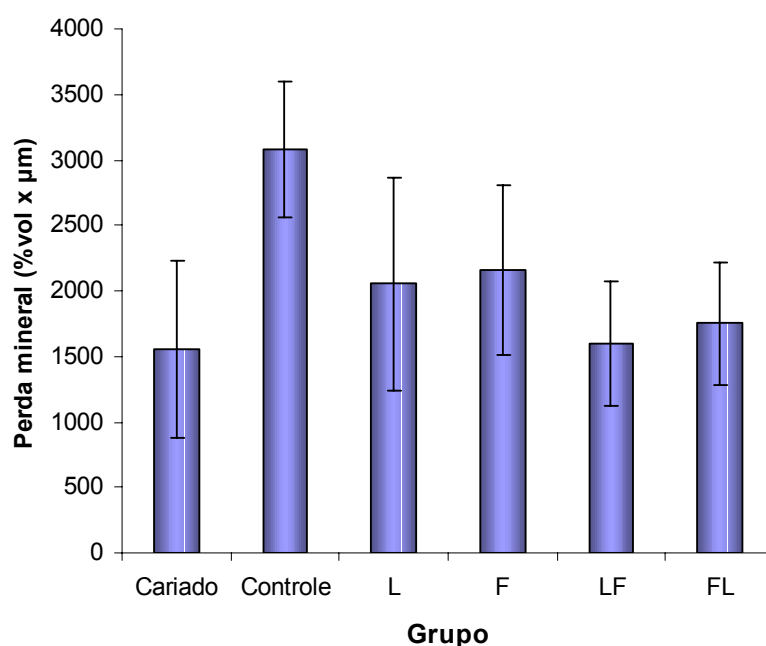


Figura 5. Representação gráfica da perda mineral média de acordo com os grupos. As barras de erro representam o desvio-padrão.

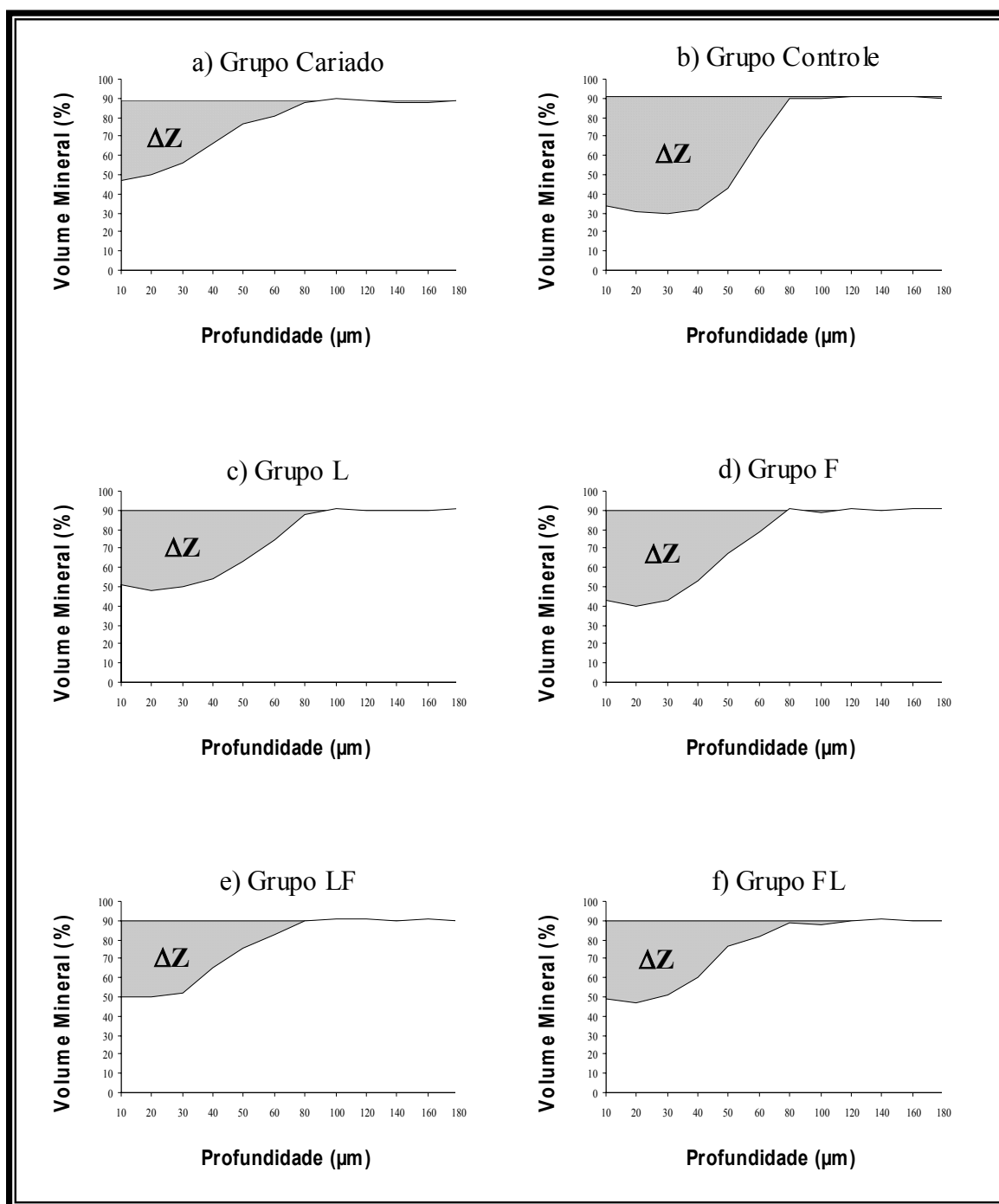


Figura 6. Ilustração representativa da perda mineral média (ΔZ (%vol x μm)) de esmalte dental decíduo cariado, de acordo com os tratamentos: a) Esmalte cariado mantido em ambiente úmido; b) Esmalte cariado + ciclagem de pH; c) Esmalte cariado + laser + ciclagem de pH; d) Esmalte cariado + FFA + ciclagem de pH; e) Esmalte cariado + laser + FFA + ciclagem de pH; f) Esmalte cariado + FFA + laser + ciclagem de pH.

5.2. EFEITO DOS TRATAMENTOS NAS CONCENTRAÇÕES IÔNICAS DAS SOLUÇÕES DESMINERALIZADORA (DES) E REMINERALIZADORA (RE)

5.2.1. Concentração de fósforo

Ao se comparar as soluções antes e após a ciclagem de pH, observou-se aumento significativo ($p < 0,05$) da concentração de fósforo nas soluções DES para todos os grupos. Por sua vez, uma redução significativa ($p < 0,05$) da concentração do íon foi detectada nas soluções RE para os grupos Controle, L, LF e FL. As concentrações de fósforo encontradas nas soluções DES e RE após a ciclagem, expressas em $\mu\text{g/mL}$, são descritas na Tabela 2 e ilustradas na Figura 7.

Tabela 2. Média e desvio padrão ($n=10^\dagger$) da concentração de fósforo ($\mu\text{g/mL}$)* encontrada nas soluções desmineralizadora e remineralizadora, após ciclagem de pH.

GRUPO	Solução desmineralizadora	Solução remineralizadora
Controle (esmalte cariado + ciclagem de pH)	$64,52 \pm 0,85$ a	$23,79 \pm 2,58$ b
L (esmalte cariado + laser + ciclagem de pH)	$62,94 \pm 1,38$ b	$24,24 \pm 1,42$ b
F (esmalte cariado + FFA + ciclagem de pH)	$62,24 \pm 1,87$ b	$29,60 \pm 2,26$ a
LF (esmalte cariado + laser + FFA + ciclagem de pH)	$61,69 \pm 0,72$ b	$25,51 \pm 2,60$ b
FL (esmalte cariado + FFA + laser + ciclagem de pH)	$62,37 \pm 0,81$ b	$28,68 \pm 1,49$ a

† Grupo F, solução remineralizadora: $n=9$.

*Concentração de fósforo antes da ciclagem de pH: $59,22 \mu\text{g/mL}$ para solução desmineralizadora e $30,37 \mu\text{g/mL}$ para solução remineralizadora.

Médias seguidas por letras distintas diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$).

Os resultados da Tabela 2 mostram que a concentração de fósforo encontrada na solução DES do grupo Controle foi significativamente maior ($p < 0,05$) que aquela dos grupos L, F, LF e FL. Adicionalmente, a ausência de diferença estatística entre os grupos L, F, LF e FL confirmou os resultados obtidos pela perda mineral (ΔZ). A análise das soluções remineralizadoras demonstrou que concentrações significativamente menores ($p < 0,05$) de fósforo foram encontradas nas soluções dos grupos Controle, L e LF quando comparadas às dos grupos F e FL.

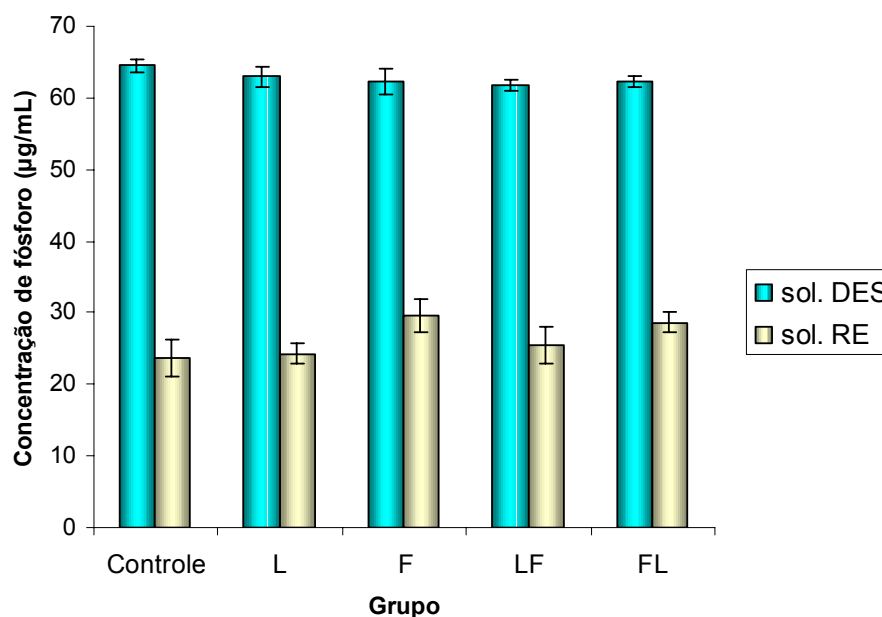


Figura 7. Representação gráfica das concentrações de fósforo encontradas nas soluções desmineralizadora e remineralizadora após ciclagem de pH, de acordo com os grupos. As barras de erro representam o desvio-padrão.

5.2.2. Concentração de flúor

Ao se comparar as concentrações de flúor nas soluções DES e RE antes e após a ciclagem de pH, observou-se um aumento significativo ($p < 0,05$) da concentração do íon nas soluções DES para os grupos F, LF e FL, enquanto nas soluções RE o aumento foi detectado para os grupos L, F, LF e FL. As concentrações de flúor encontradas nas soluções DES e RE após a ciclagem, expressas em $\mu\text{g/mL}$, são apresentadas na Tabela 3 e ilustradas na Figura 8. Os resultados indicam que os grupos tratados com FFA apresentaram concentrações de flúor significativamente maiores ($p < 0,05$), em ambas as soluções.

Tabela 3. Média e desvio padrão ($n=10^{\dagger}$) da concentração de flúor ($\mu\text{g/mL}$)* encontrada nas soluções DES e RE após ciclagem de pH.

GRUPO	Solução desmineralizadora	Solução remineralizadora
Controle (esmalte cariado + ciclagem de pH)	$0,015 \pm 0,002$ b	$0,019 \pm 0,004$ c
L (esmalte cariado + laser + ciclagem de pH)	$0,017 \pm 0,002$ b	$0,038 \pm 0,004$ b
F (esmalte cariado + FFA + ciclagem de pH)	$0,052 \pm 0,019$ a	$0,231 \pm 0,068$ a
LF (esmalte cariado + laser + FFA + ciclagem de pH)	$0,045 \pm 0,020$ a	$0,160 \pm 0,044$ a
FL (esmalte cariado + FFA + laser + ciclagem de pH)	$0,050 \pm 0,015$ a	$0,180 \pm 0,054$ a

$\dagger$ Grupo FL, solução remineralizadora: $n=9$.

*Concentração de flúor antes da ciclagem de pH: $0,016 \mu\text{g/mL}$ para as soluções desmineralizadora e remineralizadora. Médias seguidas por letras distintas diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ($p<0,05$).

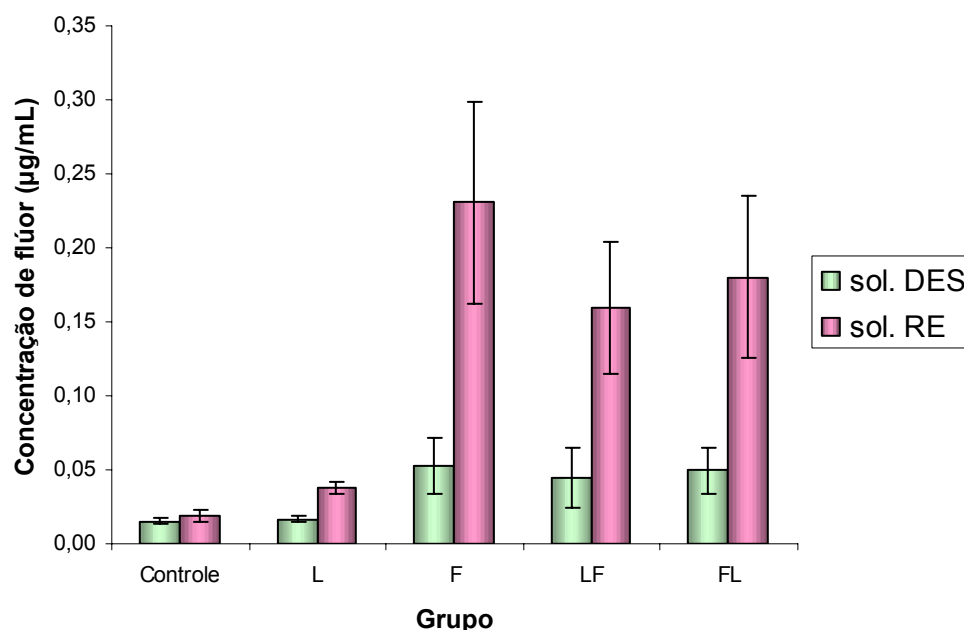


Figura 8. Representação gráfica das concentrações de flúor encontradas nas soluções desmineralizadora e remineralizadora após ciclagem de pH, de acordo com os grupos. As barras de erro representam o desvio-padrão.

6. DISCUSSÃO

Estudos têm mostrado que os lasers de CO₂ podem ser usados efetivamente para modificar a composição química e/ou a morfologia da superfície do esmalte dental e inibir *in vitro* a progressão de lesões de cárie (Nelson *et al.*, 1987; Featherstone *et al.*, 1998; Kantorowitz *et al.*, 1998; Hsu *et al.*, 2000, 2001; Tsai *et al.*, 2002). Durante a irradiação do esmalte dental com laser de CO₂ há eficiente conversão da luz laser em calor, aquecendo a hidroxiapatita na superfície e na subsuperfície próxima a uma temperatura superior a 400°C (Featherstone, 2000). Isto pode promover desde a redução do conteúdo de carbonato até o derretimento e a recristalização da hidroxiapatita (Kantola *et al.*, 1973; Kuroda & Fowler, 1984; Nelson *et al.*, 1987; Ferreira *et al.*, 1989; Meurman *et al.*, 1992; McCormack *et al.*, 1995; Phan *et al.*, 1999; Zuerlein *et al.*, 1999; Tsai *et al.*, 2002), reduzindo a dissolução do esmalte durante o desafio ácido. O laser de CO₂ apresenta quatro principais comprimentos de onda no espectro infravermelho: 9,3 µm, 9,6 µm, 10,3 µm e 10,6 µm. Dentre eles, os mais indicados para uso na prevenção da cárie, por serem mais bem absorvidos pelo esmalte, são o 9,3 µm e o 9,6 µm, com duração de pulso de 100 µs ou menos, a uma densidade de energia por pulso menor que 4 J/cm². Até o momento, entretanto, não há laser comercial disponível que possa produzir tais condições (Featherstone, 2000), de modo que as pesquisas realizadas com estes parâmetros utilizaram protótipos.

Assim, vários estudos têm empregado o comprimento de onda 10,6 µm que está presente na maioria dos aparelhos disponíveis no mercado. Quando emitido em modo pulsado há períodos de relaxamento térmico, inexistentes no modo contínuo, o que resulta em elevação localizada da temperatura até a profundidade de 10 a 20 µm da superfície (Nelson *et al.*, 1987) e, conseqüentemente, menor probabilidade de ocorrência de injúria pulpar. Logo, densidades de energia bem menores do que aquelas necessárias ao modo contínuo promovem alterações no mineral de hidroxiapatita sem ablação e aquecimento indesejável da subsuperfície (McCormack *et al.*, 1995). Lenz *et al.* (1982), citados por Fowler & Kuroda (1986), realizaram estudos *in vivo* a fim de estabelecer condições de irradiação seguras com o comprimento de onda 10,6 µm. Os autores observaram que densidades de energia ≤ 50 J/cm² não causaram injúria pulpar detectável em dentes de

macaco. Em acréscimo, verificaram que, ao empregar 9 a 16 J/cm², uma maior efetividade na redução de desmineralização subsuperficial no esmalte humano pode ser obtida. De fato, estudos em que foram utilizadas densidades de energia de 0,3 a 50 J/cm² têm mostrado inibição de cárie da ordem de 40% a 98% (Nelson *et al.*, 1986, 1987; Featherstone *et al.*, 1998; Kantorowitz *et al.*, 1998; Hsu *et al.*, 2000). Estes resultados, juntamente com a possibilidade de utilizar essa tecnologia disponível no mercado na prevenção da cárie, vêm estimulando o desenvolvimento de novas pesquisas com o λ 10,6 μ m.

Desta forma, empregou-se no presente estudo o laser de CO₂, comprimento de onda 10,6 μ m em modo pulsado, do aparelho Opus 20, um sistema que incorpora dois lasers cirúrgicos em um único aparelho: Er:YAG e CO₂. Conforme citado em Material e Métodos, a seleção dos parâmetros de irradiação baseou-se em estudo prévio de Klein (2002). Este autor observou, nos espécimes irradiados com 5 ou 10 J/cm², inibição de cárie adjacente à restauração de resina composta da ordem de 42,79% a 57,12%. Assim, potência de 0,5 W, quantificada por potenciômetro, tempo de exposição por pulso de 50 ms com intervalos de 500 ms, taxa de repetição de 1 Hz e densidade de energia de 5 J/cm² foram as condições utilizadas nesta pesquisa.

A irradiação promoveu, no esmalte dental decíduo cariado, significativa inibição da progressão de cárie quando comparada àquela do grupo Controle, que não foi submetido a qualquer tratamento preventivo (Tabela 1). Vários pesquisadores evidenciaram o efeito protetor do laser de CO₂ no esmalte dental submetido a desafios cariogênicos *in vitro* (Featherstone *et al.*, 1998; Kantorowitz *et al.*, 1998; Hsu *et al.*, 2000; Tange *et al.*, 2000; Klein, 2002; Tsai *et al.*, 2002). É importante salientar, contudo, que a comparação direta dos resultados desta pesquisa com aqueles relatados na literatura pode ser difícil, visto que as condições de irradiação empregadas são bastante distintas, com diferentes densidades de energia, durações de pulso, taxas de repetição, etc. Apesar disso, verifica-se que os achados deste estudo (67% de inibição) ratificam relatos anteriores em que a inibição de desmineralização no esmalte tem variado de 40% a 98% com emprego do λ 10,6 μ m a densidades de energia de 0,3 a 50 J/cm² (Nelson *et al.*, 1986, 1987; Featherstone *et al.*, 1998; Kantorowitz *et al.*, 1998; Hsu *et al.*, 2000; Klein, 2002).

Várias são as teorias que explicam o aumento da resistência ácida do esmalte dental irradiado com laser de CO₂. A redução do conteúdo de carbonato promovida pela irradiação com laser de dióxido de carbono (Kuroda & Fowler, 1984; Nelson *et al.*, 1987; Phan *et al.*, 1999; Zuerlein *et al.*, 1999) pode resultar em menor solubilidade da hidroxiapatita (Featherstone, 2000). O aumento do tamanho dos cristais (Kantola *et al.*, 1973; Ferreira *et al.*, 1989; McCormack *et al.*, 1995), o derretimento (Kuroda & Fowler, 1984; Nelson *et al.*, 1987; Ferreira *et al.*, 1989; Meurman *et al.*, 1992; McCormack *et al.*, 1995; Tsai *et al.*, 2002), a fusão e a recristalização (Kantola *et al.*, 1973) do esmalte irradiado também poderiam reduzir a dissolução da superfície do esmalte frente ao desafio ácido. Por outro lado, de acordo com alguns pesquisadores (Kantorowitz *et al.*, 1998; Hsu *et al.*, 2000), o derretimento e a fusão da superfície podem não ser necessários para aumentar a resistência ácida do esmalte. O emprego de densidades de energia entre 0,3 e 12 J/cm² com o λ 10,6 μ m, em modo pulsado, tem causado pouca ou nenhuma mudança morfológica (Kantorowitz *et al.*, 1998), ausência de derretimento (Hsu *et al.*, 2000, 2001) ou formação de crateras nas superfícies de esmalte avaliadas ao microscópio eletrônico de varredura (Hsu *et al.*, 2000) e a inibição de cárie tem sido de 48% a 98%.

Na presente pesquisa a aplicação de FFA foi realizada durante 4 min. Embora vários estudos tenham demonstrado não haver diferenças significativas na inibição (Delbem & Cury, 2002) ou na redução da profundidade da lesão de cárie (Garcia-Godoy *et al.*, 1994), bem como na incorporação de flúor ao esmalte (Hebling *et al.*, 1995; Delbem & Cury, 1996; Mendes *et al.*, 1996) com tempos de aplicação de 1 ou 4 min, optou-se por este último, visto que os trabalhos que avaliaram a associação de laser e flúor têm relatado períodos de 4 ou 5 min (Featherstone *et al.*, 1991; Phan *et al.*, 1999; Hsu *et al.*, 2001; Nobre dos Santos *et al.*, 2001). Assim, uma única aplicação de FFA durante 4 min sobre o esmalte decíduo cariado impediu em 60% a progressão da lesão (Tabela 1), corroborando os achados de Featherstone *et al.* (1991). Garcia-Godoy *et al.* (1994) verificaram reduções significativas (37-40%) na profundidade da lesão de cárie após aplicação de FFA no esmalte humano submetido ao desafio ácido. Outros estudos demonstraram que o tratamento do esmalte com FFA por 4 min reduziu em 55% (Takagi *et al.*, 2000) e em 35,9% (Delbem & Cury, 2002) a desmineralização *in vitro*. Tem sido relatado que quando

uma solução ou gel 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 reprecipitado na forma de fluoreto de cálcio (Margolis & Moreno, 1990). Este composto serve como um reservatório de flúor para ser liberado durante os desafios cariogênicos (Bruun & Givskov, 1991; Øgaard, 2001). Adicionalmente, a formação de depósitos minerais enriquecidos com flúor no interior do esmalte poderia bloquear parcialmente o transporte de ácidos no mineral (Takagi *et al.*, 2000), um fenômeno que reduziria a formação e/ou a progressão de lesões de cárie.

A associação de irradiação laser e FFA também mostrou ser significativamente efetiva na inibição da progressão de cárie quando comparada ao grupo Controle (Tabela 1). Uma inibição quase completa da perda mineral (97%) foi observada quando o esmalte dental decíduo cariado foi irradiado com laser de CO_2 e, posteriormente, submetido à aplicação de FFA. Na literatura, várias pesquisas têm analisado os efeitos da combinação de laser de CO_2 e flúor, embora nenhuma delas tenha empregado esmalte decíduo cariado. Confirmando os resultados do presente estudo, Hsu *et al.* (2001) também encontraram expressiva redução da perda mineral do esmalte (98,3%) quando combinaram flúor na forma de NaF à irradiação com λ 10,6 μm , em modo pulsado, e densidade de energia de 0,3 J/cm^2 . Nobre dos Santos *et al.* (2001) obtiveram inibição de cárie variando de 49% a 76% quando associaram aplicação de FFA por 5 min à irradiação do esmalte com λ 9,6 μm com densidade de energia de 1 e 1,5 J/cm^2 . Por outro lado, a ausência de diferença estatística entre os grupos L, LF e FL (Tabela 1) não permitiu inferir que existe sinergismo entre flúor e laser. Hsu *et al.* (2001) também não observaram efeito significativo do flúor no esmalte hígido irradiado. Phan *et al.* (1999), da mesma forma, demonstraram não haver diferenças estatísticas na redução da dissolução de cálcio e fosfato entre grupos tratados somente com laser e grupos tratados com laser e FFA. Por sua vez, Featherstone *et al.* (1991) e Nobre dos Santos *et al.* (2001) verificaram que a perda mineral do esmalte tratado com laser e FFA foi estatisticamente menor que aquela do grupo submetido somente a irradiação. Quando uma superfície de esmalte tratada com flúor na forma de gel é irradiada com laser, pode ocorrer o derretimento e a recristalização dos micrômetros mais externos da superfície, que, juntamente com uma fina camada de flúor que cobre os prismas

de esmalte, reorganizam-se formando uma nova estrutura, o mineral de fluorapatita (Phan *et al.*, 1999). Featherstone *et al.* (1991) observaram que a irradiação do esmalte com lesão de cárie inicial fundiu os cristais do mineral, produzindo poros maiores que, segundo os autores, permitiriam a entrada rápida e efetiva de flúor em alta concentração para o interior da lesão subsuperficial, inibindo a subsequente progressão de cárie. Adicionalmente, Fox *et al.* (1992) destacaram que, enquanto a irradiação com laser de CO₂ reduz a solubilidade do esmalte, transformando o controle de dissolução de um sítio de dissolução mais instável para um menos instável, o fluoreto atua por meio do efeito do íon comum sobre a superfície do complexo fluorapatítico, controlando a dissolução do mineral. No presente estudo, a associação dos tratamentos (laser e FFA) mostrou tendência em impedir mais efetivamente a progressão da lesão de cárie (87% e 97% de inibição, Tabela 1) quando comparado ao emprego isolado do laser (67% de inibição, Tabela 1). Entretanto, tal diferença não foi estatisticamente evidenciada, possivelmente devido à variabilidade inerente ao substrato, acrescida da variabilidade introduzida pela produção de cárie artificial e irradiação do esmalte dental. De qualquer forma, parece que os efeitos potencializadores e o mecanismo de ação da associação de laser de CO₂ e flúor na inibição de cárie ainda não estão completamente estabelecidos.

A ordem dos tratamentos, LF (laser + FFA) ou FL (FFA + laser), não influenciou significativamente a redução da perda mineral (Tabela 1). Por outro lado, Nobre dos Santos *et al.* (2001) encontraram melhores resultados quando o FFA foi aplicado antes do laser. É importante ressaltar, entretanto, que os substratos analisados, o comprimento de onda utilizado e as condições de irradiação com laser não foram os mesmos do presente estudo. Segundo McCormack *et al.* (1995), a aplicação de flúor antes da irradiação do esmalte dental com laser de CO₂ pode resultar no aprisionamento do fluoreto de cálcio e da apatita fluoretada devido aos processos de derretimento e fusão do esmalte. Meurman *et al.* (1997) transformaram cristais de hidroxiapatita sintética em fluorapatita, mas somente com densidades de energia iguais ou superiores a 38 J/cm² e emissão em modo contínuo. Considerando que no presente estudo foi empregado 5 J/cm² em modo pulsado, supõe-se a ausência de formação de fluorapatita.

A determinação das concentrações iônicas de fósforo e de flúor nas soluções desmineralizadora (DES) e remineralizadora (RE), antes e após a ciclagem de pH, foi realizada para avaliar as perdas ou ganhos destes íons.

A Tabela 2 demonstrou ter ocorrido um aumento significativo da concentração de fósforo nas soluções DES de todos os grupos após a ciclagem de pH, comprovando a dissolução do esmalte nesta condição ácida. Observou-se também que, quando comparados ao grupo Controle, os demais grupos apresentaram concentrações de fósforo significativamente menores. Além disso, não houve diferença significativa das concentrações de fósforo entre os grupos L, F, LF e FL. Tais resultados concordam com os de perda mineral (ΔZ), obtidos com auxílio da análise de microdureza (Tabela 1). Por outro lado, com exceção do grupo F, todos os demais apresentaram concentrações de fósforo nas soluções RE (Tabela 2) significativamente menores após a ciclagem, provavelmente devido a incorporação de íons pelo esmalte durante a permanência dos espécimes nesta solução. Segundo Cury (1992), o desenvolvimento de uma lesão de cárie é um processo dinâmico que se caracteriza por períodos alternados de des- e remineralização que ocorrem constantemente no ambiente bucal. Durante a desmineralização, várias fases minerais de íons cálcio, fósforo e flúor são dissolvidas e liberadas no meio bucal. Dessa forma, na ciclagem de pH do presente estudo, as soluções DES ganharam minerais provenientes da desmineralização do esmalte e as soluções RE perderam minerais para os espécimes, simulando as fases de des- e remineralização que ocorrem *in vivo*.

As concentrações de flúor nas soluções DES foram significativamente maiores nos grupos tratados com FFA, em comparação aos outros tratamentos (Tabela 3) e à concentração do íon na solução antes da ciclagem de pH. Estes resultados podem ser explicados pela dissolução do flúor fracamente ligado ao esmalte, formado durante o tratamento com o gel fluoretado. Quanto à solução RE (Tabela 3), tendência semelhante pode ser verificada. É importante lembrar que o processo de ciclagem de pH foi iniciado pela imersão dos espécimes nas soluções remineralizadoras a fim de se evitar a formação de micro-cavitações no esmalte decíduo que já se encontrava desmineralizado, o que poderia explicar o aumento da concentração de flúor nestas soluções.

Os resultados obtidos no presente estudo demonstraram, com auxílio da análise de microdureza, que com uma única aplicação de laser de CO₂ pulsado λ 10,6 μ m, associada ao flúor fosfato acidulado, expressiva inibição da progressão da lesão de cárie (97%, Tabela 1) foi obtida quando o esmalte foi submetido a um modelo de ciclagem de pH. Por outro lado, o uso isolado de laser ou de FFA não diferiu estatisticamente da associação de tratamentos. Phan *et al.* (1999) relataram que a associação de flúor e laser poderia superar as limitações de um único tratamento, visto que o íon não consegue penetrar nas fóssulas e fissuras e o laser poderia facilmente modificar a estrutura da superfície, aumentando a inibição de cárie. Em contrapartida, o flúor poderia difundir-se mais facilmente para a área interproximal, local onde o laser não alcançaria, e proteger a superfície dental. Assim, para aquele segmento da população que apresenta um grande número de lesões de cárie, é possível que o tratamento das superfícies com laser de CO₂ associado ao flúor seja uma medida preventiva efetiva.

Considerando os resultados da presente pesquisa, sugere-se que estudos futuros sejam conduzidos com o objetivo de investigar o mecanismo de ação da associação de laser de CO₂ e flúor. Adicionalmente, a utilização de modelos *in situ*, que forneçam dados complementares para uma avaliação mais ampla do comportamento do esmalte irradiado frente a desafios cariogênicos, torna-se necessária.

7. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos e considerando as condições empregadas no presente estudo, pode-se concluir que:

- o laser de CO₂ λ 10,6 μ m e a aplicação de flúor fosfato acidulado, empregados isoladamente ou em associação, promoveram significativa inibição da progressão de cárie no esmalte dental decíduo cariado;
- embora a associação de laser de CO₂ e flúor fosfato acidulado tenha promovido as maiores inibições da progressão de cárie, este efeito adicional não foi estatisticamente evidenciado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹

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

Argenta RMO, Tabchoury CPM, Cury JA. A modified pH-cycling model to evaluate fluoride effect on enamel demineralization. **Pesqui Odontol Bras.** 2003; 17(3): 241-6.

Ayres M, Ayres M Jr, Ayres DL, Santos AS. **BioEstat 3.0: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas.** Belém: Sociedade Civil Mamirauá; 2003.

Bagnato VS. Os fundamentos da luz laser. **Física na Escola.** 2001; 2(2): 4-9.

Brugnera Jr A, Villa RG, Genovese WJ. **Laser na Odontologia.** São Paulo: Pancast; 1991.

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 Res.** 1991; 25(2): 96-100.

Chawla HS, Gauba K, Goyal A. Trend of dental caries in children of Chandigarh over the last sixteen years [abstract]. **J Indian Soc Pedod Prev Dent.** 2000; 18(1): 41-5.

Chow LC, Takagi S, Shih S. Effect of a two-solution fluoride mouthrinse on remineralization of enamel lesions *in vitro*. **J Dent Res.** 1992; 71(3): 443-7.

Clarkson JJ, McLoughlin J. Role of fluoride in oral health promotion. **Int Dent J.** 2000; 50(3): 119-28.

Coluzzi DJ. An overview of laser wavelengths used in dentistry. **Dent Clin North Am.** 2000; 44(4): 753-65.

¹ De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseada no modelo Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

Cury JA. Uso do flúor e controle da cárie como doença. In: Baratieri LN, Monteiro Jr S, Andrada MAC, Vieira LCC, Ritter AV, Cardoso AC *et al.* **Odontologia restauradora – fundamentos e possibilidades**. São Paulo: Santos; 2001. p. 32-68.

Cury JA. Uso do flúor. In: Baratieri LN, Andrada MAC, Monteiro Jr S, Cardoso AC, Polidoro JS, Andrada RC *et al.* **Dentística - procedimentos preventivos e restauradores**. São Paulo: Santos; 1992. p.43-67.

Delbem ACB, Cury JA. Efeito do tempo de aplicação tópica de FFA na formação e retenção de “CaF₂” no esmalte dental humano. **Rev Odontol UNESP**. 1996; 25(2): 217-27.

Delbem ACB, Cury JA. Effect of application time of APF and NaF gels on microhardness and fluoride uptake of *in vitro* enamel caries. **Am J Dent**. 2002; 15(3): 169-72.

Downer MC. Caries prevalence in the United Kingdom. **Int Dent J**. 1994; 44(4 Suppl 1): 365-70.

Eduardo CP, Gouw-Soares S, Haypek P. Utilização clínica dos lasers. In: Cardoso RJA, Gonçalves EAN. **Dentística Laser**. São Paulo: Artes Médicas; 2002. p. 441-61.

Eduardo CP. Laser em odontologia. In: Dotto CA, Antoniazzi JH. **Opinion makers: tecnologia e informática**. São Paulo: VM Comunicações; 2002. p.50-55.

Einstein A. Zür quantentheorie der strahlung [On the quantum theory of radiation]. **Physiol Z**. 1917; 18: 121-8. *Apud* Sulewski JG. Historical survey of laser dentistry. **Dent Clin North Am**. 2000; 44(4): 717-52.

Featherstone JDB, Barrett-Vespone NA, Fried D, Kantorowitz Z, Seka W. CO₂ laser inhibition of artificial caries-like lesion progression in dental enamel. **J Dent Res**. 1998; 77(6): 1397-403.

Featherstone JDB, O'Reilly MM, Shariati M, Brugler S. Enhancement of remineralisation *in vitro* and *in vivo*. In: Leach SA. **Factors relating to demineralisation and remineralisation of the teeth**. Oxford: IRL Press; 1986. p. 23-34.

Featherstone JDB, ten Cate JM, Shariati M, Arends J. Comparison of artificial caries-like lesions by quantitative microradiography and microhardness profiles. **Caries Res.** 1983; 17(5): 385-91.

Featherstone JDB, Zhang SH, Shariati M, McCormack SM. Carbon dioxide laser effects on caries-like lesions of dental enamel. **Lasers Orthop Dent Vet Med.** 1991; SPIE 1424: 145 -9.

Featherstone JDB. Caries detection and prevention with laser energy. **Dent Clin North Am.** 2000; 44(4): 955-69.

Ferreira JM, Palamara J, Phakey PP, Rachinger WA, Orams HJ. Effects of continuous-wave CO₂ laser on the ultrastructure of human dental enamel. **Arch Oral Biol.** 1989; 34(7): 551-62.

Fiske CH, Subbarow Y. The colorimetric determination of phosphorus. **J Biol Chem.** 1925; 66(2): 375-400.

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

Fox JL, Yu D, Otsuka M, Higuchi WI, Wong J, Powell G. Combined effects of laser irradiation and chemical inhibitors on the dissolution of dental enamel. **Caries Res.** 1992; 26(5): 333-9.

Garcia-Godoy F, Hicks MJ, Flaitz CM, Berg J. Acidulated phosphate fluoride treatment and formation of caries-like lesions in enamel: effect of application time. **Pediatr Dent.** 1994; 16(2): 158.

Goldman L, Gray JA, Goldman J, Goldman B, Meyer R. Effect of laser beam impacts on teeth. **J Am Dent Assoc.** 1965; 70: 601-6.

Haugejorden O, Birkeland JM. Evidence for reversal of the caries decline among Norwegian children. **Int J Paediatr Dent.** 2002; 12(5): 306-15.

Hebling J, Santos-Pinto LM, Cury JA. Formação “in vitro” de fluoreto de cálcio sobre esmalte hígido, em função do tempo de aplicação de fluoreto acidulado. **Rev Bras Odontol.** 1995; 52(4): 30-5.

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

Hsu CYS, Jordan TH, Dederich DN, Wefel JS. Laser-matrix-fluoride effects on enamel demineralization. **J Dent Res.** 2001; 80(9): 1797-801.

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

Kantola S, Laine E, Tarna T. Laser-induced effects on tooth structure. VI. X-ray diffraction study of dental enamel exposed to a CO₂ laser. **Acta Odontol Scand.** 1973; 31(6): 369-79.

Kantorowitz Z, Featherstone JDB, Fried D. Caries prevention by CO₂ laser treatment: dependency on the number of pulses used. **J Am Dent Assoc.** 1998; 129(5): 585-91.

Kaste LM, Selwitz RH, Oldakowski RJ, Brunelle JA, Winn DM, Brown LJ. Coronal caries in the primary and permanent dentition of children and adolescents 1-17 years of age: United States, 1988-1991. **J Dent Res.** 1996; 75 (Spec No): 631-41.

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

Klein ALL. **Efeito do laser de CO₂ na inibição de cárie em esmalte adjacente a restaurações de resina composta – Estudo *in vitro*** [dissertação]. Piracicaba (SP): FOP - UNICAMP; 2002.

Kuroda S, Fowler BO. Compositional, structural, and phase changes in *in vitro* laser-irradiated human tooth enamel. **Calcif Tissue Int.** 1984; 36(4): 361-9.

Lenz P, Gilde H, Waltz R. Untersuchungen zur schmelzversiegelung mit dem CO₂-laser. **Dtsch Zahnärztl Z.** 1982; 37: 469-78. *Apud* Fowler BO, Kuroda S. Changes in heated and in laser-irradiated human tooth enamel and their probable effects on solubility. **Calcif Tissue Int.** 1986; 38(4): 197-208.

Lobene RR, Bhussry BR, Fine S. Interaction of carbon dioxide laser radiation with enamel and dentin. **J Dent Res.** 1968; 47(2): 311-7.

Lobene RR, Fine S. Interaction of laser radiation with oral hard tissues. **J Prosthet Dent.** 1966; 16(3): 589-97.

Maiman TH. Stimulated optical radiation in ruby. **Nature.** 1960; 187: 493-4.

Margolis HC, Moreno EC. Physicochemical perspectives on the cariostatic mechanisms of systemic and topical fluorides. **J Dent Res.** 1990; 69(Spec No): 606-13.

Mattos-Graner RO, Rontani RMP, Gavião MBD, Bocatto HARC. Caries prevalence in 6-36-month-old Brazilian children. **Community Dent Health.** 1996; 13(2): 96-8.

McCormack SM, Fried D, Featherstone JDB, Glana RE, Seka W. Scanning electron microscope observations of CO₂ laser effects on dental enamel. **J Dent Res.** 1995; 74(10): 1702-8.

Mendes S, Souza IP, Cury JA. Formação *in vitro* de fluoreto de cálcio e fluorapatita em esmalte humano hígido após a aplicação de gel de flúor-fosfato acidulado durante 1 e 4 minutos. **Rev Odontol Univ Sao Paulo.** 1996; 10(4): 281-5.

Messer LB. Assessing caries risk in children. **Aust Dent J.** 2000; 45(1): 10-6.

Meurman JH, Hemmerlé J, Voegel JC, Rauhamaa-Mäkinen R, Luomanen M. Transformation of hydroxyapatite to fluorapatite by irradiation with high-energy CO₂ laser. **Caries Res.** 1997; 31(5): 397-400.

Meurman JH, Voegel JC, Rauhamaa-Mäkinen R, Gasser P, Thomann JM, Hemmerle J *et al.* Effects of carbon dioxide, Nd:YAG and carbon dioxide-Nd:YAG combination lasers at high energy densities on synthetic hydroxyapatite. **Caries Res.** 1992; 26(2): 77-83.

Myers TD. The future of lasers in dentistry. **Dent Clin North Am.** 2000; 44(4): 971-80.

Narvai PC, Forni TIB, Junqueira SR, Cury JA, Castellanos RA, Soares MC. Uso de produtos fluorados conforme o risco de cárie dentária: uma revisão crítica. **Rev Ass Paul Cirur Dent.** 2002; 56(2): 101-7.

Nelson DGA, Shariati M, Glena R, Shields CP, Featherstone JDB. Effect of pulsed low energy infrared laser irradiation on artificial caries-like lesion formation. **Caries Res.** 1986; 20(4): 289-99.

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

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

Øgaard B. CaF₂ formation: cariostatic properties and factors of enhancing the effect. **Caries Res.** 2001; 35(Suppl 1): 40-4.

Paes Leme AF, Tabchoury CPM, Zero DT, Cury JA. Effect of fluoridated dentifrice and acidulated phosphate fluoride application on early artificial carious lesions. **Am J Dent.** 2003; 16(2): 91-5.

Phan ND, Fried D, Featherstone JDB. Laser-induced transformation of carbonated apatite to fluorapatite on bovine enamel. **Lasers in Dentistry V**. 1999; SPIE 3593: 233-40.

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

SAS Institute Inc. **SAS/STAT Guide for personal computers**. 8.ed. Cary: SAS Institute; 2001.

Seppä L. The future of preventive programs in countries with different systems for dental care. **Caries Res**. 2001; 35(Suppl 1): 26-9.

Speechley M, Johnston DW. Some evidence from Ontario, Canada, of a reversal in the dental caries decline. **Caries Res**. 1996; 30(6): 423-7.

Stern RH, Sognnaes RF. Laser beam effect on dental hard tissues. **J Dent Res**. 1964; 43(5): 873.

Stewart L, Powell GL, Wright S. Hydroxyapatite attached by laser: a potential sealant for pits and fissures. **Oper Dent**. 1985; 10(1): 2-5.

Sulewski JG. Historical survey of laser dentistry. **Dent Clin North Am**. 2000; 44(4): 717 - 52.

Takagi S, Liao H, Chow LC. Effect of tooth-bound fluoride on enamel demineralization/remineralization *in vitro*. **Caries Res**. 2000; 34(4): 281-8.

Tange T, Fried D, Featherstone JDB. TEA-CO₂ laser inhibition of artificial caries-like lesion progression in primary and permanent tooth enamel. **Lasers in Dentistry VI**. 2000; SPIE 3910: 306-13.

ten Bosch JJ, Angmar-Månsson B. A review of quantitative methods for studies of mineral content of intra-oral incipient caries lesions. **J Dent Res**. 1991; 70(1): 2-14.

ten Cate JM, Duijsters PPE. Alternating demineralization and remineralization of artificial enamel lesions. **Caries Res.** 1982; 16(3): 201-10.

Tipler PA. Os átomos. In: Tipler PA. **Física para cientistas e engenheiros**. Rio de Janeiro: LTC Editora; 1995. v.4. p.245-84.

Tsai CL, Lin YT, Huang ST, Chang HW. *In vitro* acid resistance of CO₂ and Nd-YAG laser-treated human tooth enamel. **Caries Res.** 2002; 36(6): 423-9.

Vigild M, Skougaard M, Hadi RA, Al-Zaabi F, Al-Yasseen I. Dental caries and dental fluorosis among 4-, 6-, 12- and 15-year-old children in kindergartens and public schools in Kuwait. **Community Dent Health.** 1996; 13(1): 47-50.

von der Fehr, FR. Caries prevalence in the Nordic countries. **Int Dent J.** 1994; 44(4 Suppl 1): 371-8.

Watanabe LS, Semprini M, Lopes RA, Morais JOR. Efeitos da irradiação do raio laser CO₂ no esmalte de dentes decíduos humanos: Estudo ao microscópio eletrônico de varredura. **Rev Bras Odontol.** 1990; 47(4): 22-7.

White DJ. The application of *in vitro* models to research on demineralization and remineralization of the teeth. **Adv Dent Res.** 1995; 9(3): 175-93.

White DJ. The comparative sensitivity of intra-oral, *in vitro*, and animal models in the 'profile' evaluation of topical fluorides. **J Dent Res.** 1992; 71: 884-94.

Wigdor HA, Walsh JT Jr, Featherstone JDB, Visuri SR, Fried D, Waldvogel JL. Lasers in dentistry. **Lasers Surg Med.** 1995; 16(2): 103-33.

Zuerlein MJ, Fried D, Featherstone JD. Modeling the modification depth of carbon dioxide laser-treated dental enamel. **Lasers Surg Med.** 1999; 25(4): 335-47.

ANEXO 1



UNICAMP

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de pesquisa intitulado "Avaliação dos efeitos do laser de CO₂ e do flúor sobre o esmalte decíduo íntegro e desmineralizado - estudo *in vitro*", sob o protocolo nº **146/2001**, da Pesquisadora **Elaine Pereira da Silva Tagliaferro**, sob a responsabilidade da Profa. Dra. **Marinês Nobre dos Santos Uchôa**, está de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS, de 10/10/96, tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa – FOP.

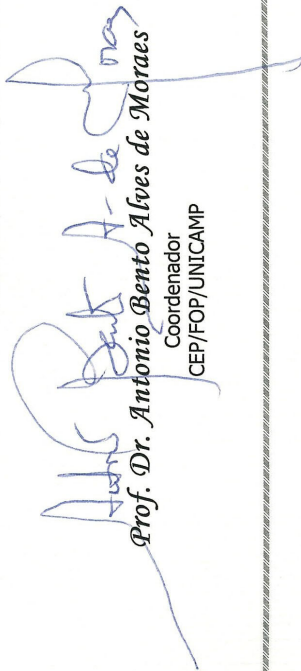
Piracicaba, 26 de novembro de 2001

We certify that the research project with title "Evaluation of CO₂ laser and fluoride effects in sound and demineralized primary enamel - an in vitro study", protocol nº **146/2001**, by Researcher **Elaine Pereira da Silva Tagliaferro**, responsibility by Prof. Dr. **Marinês Nobre dos Santos Uchôa**, is in agreement with the Resolution 196/96 from National Committee of Health/Health Department (BR) and was approved by the Ethical Committee in Research at the Piracicaba Dentistry School/UNICAMP (State University of Campinas).

Piracicaba, SP, Brazil, November 26 2001

WCGSbravati

Prof. Dr. Pedro Luiz Rosalen
 Secretário
 CEP/FOP/UNICAMP



Prof. Dr. Antonio Bento Alves de Moraes
 Coordenador
 CEP/FOP/UNICAMP

ANEXO 2



3.10 System Specifications

Operating Mode	Er:YAG			CO ₂
Laser type	Er:YAG			CO ₂
Wavelength	2.94 microns			10.6 microns
Emission mode	Pulsed			CW, SuperPulse
Exposure mode	Continuous, burst			Continuous, pulse, repeat
Average Power	Up to 12 watts			CW: Up to 10 watts SP: Up to 6 watts
Pulse repetition rate	7–12 pulses per second (PPS)	13–15 PPS	16–20 PPS	
Pulse Energy	Up to 1.0 J	Up to 0.7 J	Up to 0.5 J	
Pulse Duration	400 micro-seconds	300 micro-seconds	250 micro-seconds	On-time: 50–500 ms Off-time: 50 - 500 ms

APÊNDICE

I) CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A LUZ LASER

A descoberta do laser

A palavra laser é sigla da expressão inglesa *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation* que significa amplificação da luz por emissão estimulada de radiação. A base conceitual para a amplificação da luz vem das teorias propostas por Einstein sobre a emissão estimulada de energia radiante (Einstein, 1917 citado por Sulewski, 2000). O primeiro trabalho sobre laser foi publicado pelo físico inglês Theodore Maiman em 1960. Este autor relatava uma técnica de bombeamento ótico na qual um cristal de rubi, ao ser irradiado por uma lâmpada brilhante de alta potência, produzia temperaturas negativas e emissão ótica estimulada a um comprimento de onda de 6943 Å (Maiman, 1960).

Componentes do laser

No laser um intenso feixe de fótons coerentes é produzido graças à emissão estimulada (Tipler, 1995). Os componentes óticos estão relacionados com a criação de fótons e incluem o meio ativo, a fonte externa de energia, a cavidade ótica, os refletores de fótons (Figura 9), as lentes e filtros (Bagnato, 2001) e, dentre os componentes mecânicos, merecem destaque os sistemas de refrigeração e de entrega do feixe (Klein, 2002), descritos a seguir:

Meio ativo: pode ser gasoso, sólido ou líquido, e contém os átomos ou moléculas cujos elétrons, ao saltar entre os níveis de energia, emitem fótons que constituirão o laser;

Fonte externa de energia: promove a excitação dos elétrons do meio ativo. Quando a maioria dos átomos apresenta elétrons no estado excitado, o fenômeno é denominado de “inversão de população”, estágio fundamental para a produção do laser;

Cavidade ótica ou ressonador: é um tubo que abriga o meio ativo e os refletores de fótons;

Refletores de fótons: são dois espelhos, localizados nas extremidades da cavidade ótica, que provocam a reflexão dos fótons, estimulando os átomos a liberarem mais fótons idênticos o que resulta na amplificação da luz e criação do feixe de laser;

Lentes e filtros: as lentes são usadas para focar o feixe de laser e os filtros óticos são específicos ao comprimento de onda e inibem a propagação da luz, absorvendo-a ou refletindo-a;

Sistema de refrigeração: previne o sobreaquecimento do tecido alvo por meio de ventiladores ou jatos contínuos de água dispostos internamente, ou ainda por uma fonte externa;

Sistema de entrega: é o dispositivo que transmite a energia da ponta do laser ao tecido alvo. Os exemplos incluem fibras óticas, braços articulados, guias de onda e micromanipuladores.

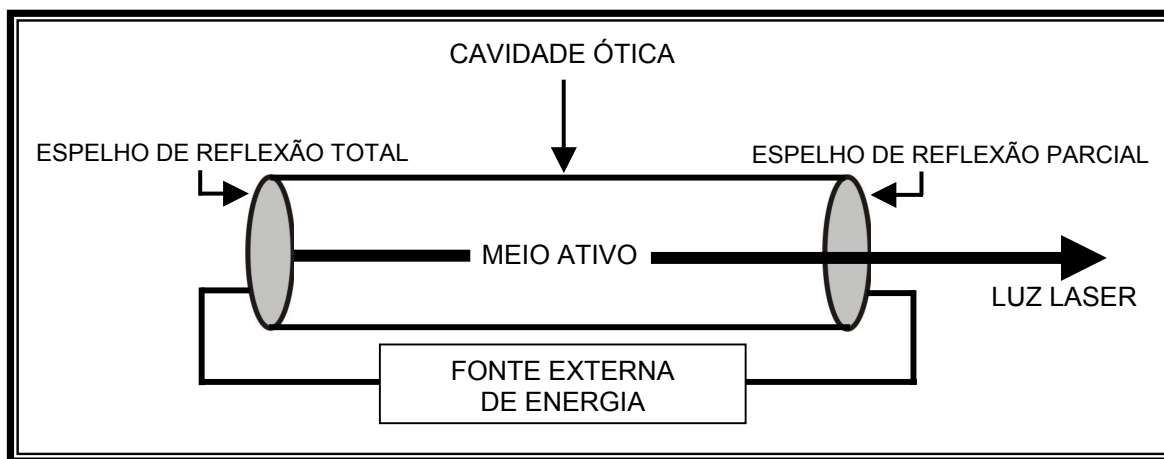


Figura 9. Diagrama dos componentes básicos de um laser.

Produção de luz no laser

A produção de luz no laser se inicia quando uma fonte externa de energia atua no meio ativo promovendo o fenômeno chamado de “inversão de população”, ou seja, a maioria dos átomos passa do estado fundamental para o estado excitado. Quando um destes átomos emite um fóton, mais luz é adicionada à porção já existente. Estes fótons se refletem nos espelhos da cavidade ótica e voltam para o sistema, provocando mais emissão estimulada. Uma porção desta luz emerge do conjunto constituindo o feixe da luz laser (Bagnato, 2001).

Características da luz laser

As principais características da luz laser são a monocromaticidade, a alta intensidade, a coerência e a colimação (Brugnera Jr. *et al.*, 1991; Coluzzi, 2000; Bagnato, 2001):

Monocromaticidade: os fótons da luz laser possuem o mesmo comprimento de onda, diferentemente das lâmpadas incandescentes ou fluorescentes, formadas por vários comprimentos de onda;

Alta intensidade: a potência da luz laser pode atingir ordens de tera (10^{12}) W, especialmente em lasers pulsados, onde a energia é emitida em diminutos intervalos de tempo, da ordem de 10^{-12} s;

Coerência: propriedade única caracterizada pela propagação unidirecional e simultânea dos fótons no tempo e no espaço;

Colimação: os feixes de luz laser apresentam tamanho e forma constantes.

Modo de irradiação

A emissão da energia laser pode ser realizada por três modos básicos: contínuo, pulsado e interrompido. No modo contínuo, o feixe é emitido continuamente. A emissão pulsada produz grandes picos de energia por um tempo extremamente curto, usualmente em

μ s, seguido por um período relativamente longo no qual o laser é desligado. Finalmente, o modo interrompido é conseguido pela abertura e fechamento alternados de um obturador mecânico em frente ao trajeto do feixe contínuo (Coluzzi, 2000).

Parâmetros dosimétricos

Para se calcular a dose de energia aplicada em uma determinada área, alguns parâmetros dosimétricos serão brevemente descritos, conforme Brugnera Jr. *et al.* (1991):

Potência: é a quantidade de energia depositada por unidade de tempo, sendo o watt (W) sua unidade de medida. É determinada pela fórmula: $P = \text{Energia (J)} / \text{Tempo (s)}$;

Densidade de energia: é a quantidade de energia depositada em uma determinada superfície, sendo medida em J/cm^2 . É calculada pela fórmula: $DE = \text{Energia (J)} / \text{Área do feixe (cm}^2\text{)}$;

Taxa de repetição: é a quantidade de pulsos por segundo, sendo medida em hertz (Hz).

Interação com a matéria

A energia da luz laser pode sofrer reflexão, absorção, transmissão ou dispersão ao atingir o tecido alvo (Coluzzi, 2000):

Reflexão: é o redirecionamento do feixe de laser para fora da superfície tecidual, sem efeito sobre o tecido alvo;

Absorção: ocorre quando há interação da luz laser com os átomos do tecido, geralmente se convertendo em calor. A quantidade de energia que é absorvida depende das características do tecido, do comprimento de onda e do modo de emissão do laser;

Transmissão: é quando a energia passa através do tecido sem causar qualquer efeito, sendo altamente dependente do comprimento de onda;

Dispersão: é a interação que enfraquece a energia e possivelmente não produz efeito biológico útil, podendo causar transferência de calor aos tecidos adjacentes ao sítio cirúrgico e injúrias térmicas indesejáveis.

Classificação

De acordo com Eduardo *et al.* (2002), inicialmente os lasers eram conhecidos por “soft lasers” e “hard lasers”. No presente, lasers de baixa intensidade são também chamados de lasers frios, não térmicos ou não cirúrgicos e os de alta intensidade são os lasers cirúrgicos, aqueles que resultam em efeito térmico.

Os lasers de baixa intensidade possuem potência fixa, expressa em mW, emitem luz na região entre o vermelho e o infravermelho próximo e como exemplo estão o Ga-Al-As e He-Ne. Por sua vez, lasers de alta intensidade apresentam potência e energia variáveis, expressas em W e mJ respectivamente, frequência em Hz, largura de pulso de μ s a ms e diversos sistemas de entrega, desde o braço articulado até as fibras óticas. Destacam-se os lasers de CO₂, Nd:YAG, Nd:YAP, Nd:YLF, Er:YAG, Er:YSGG, ErCr:YSGG, Ho:YLF, Ho:YAG, excimer, argônio e outros (Eduardo, 2002).

Segurança quando do uso do laser

Algumas normas devem ser seguidas quando da utilização dos lasers, destacando-se o uso de óculos de proteção específicos para cada comprimento de onda; a manutenção do aparelho em modo *stand-by* quando não estiver em uso; a proteção cuidadosa do tubo endotraqueal em caso da utilização de anestesia geral e de todos os tecidos orais que não serão tratados pelo laser; o acesso limitado e a sinalização do local de trabalho; a proteção de todo material inflamável e a disponibilidade de sugador de alta potência para evacuar fumaça formada pela possível ablação tecidual (Brugnera Jr. *et al.*, 1991; Wigdor *et al.*, 1995; Coluzzi, 2000).

II) LASERS EMPREGADOS EM ODONTOLOGIA

Após a descoberta do laser de rubi por Maiman em 1960, vários estudos foram conduzidos na odontologia utilizando esta tecnologia. De acordo com alguns pesquisadores, o laser de rubi causava fusão vítrea/transparente do esmalte que passava a mostrar birrefringência reduzida sob luz polarizada (Stern & Sognnaes, 1964) e provocava destruição superficial da coroa dental com formação de pequenas crateras na estrutura do mineral (Goldman *et al.*, 1965). Adicionalmente, Lobene & Fine (1966) observaram um aumento de 80°C a 90°C acima da temperatura ambiente no interior da câmara pulpar vazia. O laser de rubi, portanto, poderia causar injúrias ao órgão pulpar.

Dessa forma, outros tipos de lasers também foram investigados e, atualmente, há vários comprimentos de onda que podem ser aplicados em odontologia, como ilustra o Quadro 2.

Quadro 2. Principais lasers empregados em odontologia (adaptado de Myers, 2000).

Tipo	Comprimento de onda	Principal uso
Argônio	488; 514,5 nm	Polimerização; Tecido mole
Diodo	800-830; 950-1010 nm	Tecido mole; Periodontia
Nd:YAG	1,064 µm	Tecido mole; Periodontia
Er:YSGG	2,79 µm	Tecido duro
Er:YAG	2,94 µm	Tecido duro
CO ₂	10,6 µm	Tecido mole

Adicionalmente, outras aplicações e outros instrumentos estão sendo investigados, como o laser excimer para a remoção de cárie, ablação de esmalte, dentina/osso e endodontia; o laser de alexandrite de frequência dupla, para a ablação seletiva de cálculos; os lasers de CO₂, argônio, Nd:YAG, Ho:YAG, para dessensibilização da dentina hipersensível; o laser de Nd:YAG pulsado, para analgesia, clareamento dental e endodontia; o laser de Nd:YAP, para ablação de cárie e endodontia; o laser de Ho:YAG, para ablação de osso e remodelação de cartilagem; os lasers de diodo (nível baixo) e de hélio-neônio, para bioestimulação; o laser de érbio, para ablação óssea e, por fim, os lasers de Nd:YAG, argônio e CO₂, para aumentar a resistência do esmalte ao desenvolvimento de lesões de cárie (Sulewski, 2000).

Laser de CO₂

A energia emitida pelo laser de CO₂ é bem absorvida pela água, apresenta profundidade de penetração rasa e é especialmente útil em cortar tecido fibroso denso. Dentre os lasers usados em odontologia, é o que apresenta a mais alta absorção pela hidroxiapatita (Coluzzi, 2000).

É um laser cujo meio ativo é constituído por uma mistura de gases: dióxido de carbono, hélio e nitrogênio. Apresenta quatro principais comprimentos de onda no espectro infravermelho: 9,3 µm, 9,6 µm, 10,3 µm e 10,6 µm que está presente na maioria dos aparelhos comercialmente disponíveis. Em adição, há o TEA-CO₂ (TEA= *transversely excited atmospheric pressure*), laser que emite radiação com altíssima energia em pulsos de 0,1 a 2,0 µs e é bastante eficiente em tecido duro, por apresentar fluxo transversal de gases e operar a pressões mais altas que outros lasers cujo meio ativo seja gás (Wigdor *et al.*, 1995). A liberação do feixe de luz, em modo contínuo ou pulsado, é realizada por meio de um condutor de onda oco acoplado a uma peça de mão e a energia é conduzida através do guia de onda até o local alvo em modo de não-contato (Coluzzi, 2000).