

2-



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**  
**FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**



# **CURSO DE GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**

Monografia de Final de Curso

Aluna: Juliana Dias Dutra

**Orientador(a): Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marines Nobre dos Santos**

**Uchôa**

Ano de Conclusão do Curso: 2009



10/06/2009



1290004944

TCC/UNICAMP  
D953a  
FOP

**Juliana Dias Dutra**

**“AVALIAÇÃO DE DIVERSAS APLICAÇÕES DO  
LASER DE CO<sub>2</sub> NA REDUÇÃO DA  
DESMINERALIZAÇÃO DO ESMALTE DENTÁRIO  
HUMANO *IN VITRO*”**

*“In vitro evaluation of CO<sub>2</sub> laser irradiations on the inhibition of  
human dental enamel demineralization”*

Monografia apresentada ao Curso de Odontologia da Faculdade de  
Odontologia de Piracicaba –UNICAMP, para obtenção do Diploma de  
Cirurgia- Dentista.

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marinês Nobre dos Santos Uchoa  
**Colaboradoras:** Dr<sup>a</sup>. Karlla Almeida Vieira e Dr<sup>a</sup>. Carolina Steiner Oliveira

**PIRACICABA**

2009

Unidade - FOP/UNICAMP

TCC/UNICAMP

D953a Ed.

Vol. Ex.

Tombo 4944

C  D

Proc. 16P-139/10

Preço R\$ 11,00

Data 12/08/10

Registro 77.2023

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**  
Bibliotecária: Marilene Girello – CRB-8ª. / 6159

D953a Dutra, Juliana Dias.  
Avaliação de diversas aplicações do laser de CO<sub>2</sub> na redução da desmineralização do esmalte dentário humano *in vitro*. / Juliana Dias Dutra. -- Piracicaba, SP: [s.n.], 2009.  
24f. : il.

Orientadores: Marinês Nobre dos Santos Uchoa, Karlla Almeida Vieira, Carolina Steiner Oliveira.  
Monografia (Graduação) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Laser em odontologia. 2. Prevenção. I. Nobre dos Santos, Marinês. II. Vieira, Karlla Almeida. III. Steiner-Oliveira, Carolina. IV. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. V. Título.  
(mg/fop)

**Dedico este trabalho à Deus, por suas obras e ações e ao meu pai Gilvan, que sempre esteve ao meu lado me apoiando e lutando, tornando possível a realização de um sonho, transformando-o em uma vitória de toda a família. Dedico também aos meus irmãos e todos que sempre estiveram ao meu lado me apoiando ao longo desta trajetória de luta e conquistas.**

## AGRADECIMENTOS

*Agradeço à Deus por ter iluminado meus pensamentos e meus caminhos, além de ter abençoado todos ao meu redor e ter agraciado a minha família, amigos e professores com muita determinação, paciência e sabedoria.*

*Agradeço ao meu pai Gilvan, pela luta, pela compreensão e pelos ensinamentos. À minha irmã Camila por sempre estar ao meu lado para me ouvir, para me apoiar ou até mesmo para brigar comigo. E ao meu irmão Rodolfo, por sempre me receber de volta às sextas-feiras a tarde de braços abertos. Agradeço à minha avó Eva e Maria por serem um exemplo de vida para mim.*

*Agradeço à Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marinês Nobre dos Santos Uchoa, e às pós-graduandas Karlla Almeida Vieira e Carolina Steiner Oliveira, pela paciência, pela ajuda e pelos ensinamentos. Saibam que cada "puchão de orelha" foram essenciais para a minha formação acadêmica e pessoal.*

*Agradeço à todos os professores que com toda a sabedoria e paciência tornaram possível minha formação acadêmica.*

*Agradeço à minha amiga Fernanda Aseredo, que foi o meu porto seguro durante esta trajetória. À Luciana Amoroso Campoy por ser minha família e por sempre estar ao meu lado seja em dias bons ou ruins.*

*Agradeço à minha amiga Priscilla Siani que muitas vezes distante geograficamente, esteve ao meu lado me apoiando e me incentivando a lutar e jamais desistir.*

*Agradeço à todos os amigos que fizeram com que esses 4 anos de graduação se tornassem mágicos.*

*Muito obrigado a todos.*

## SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES	5
LISTA DE ABREVIATURAS	6
RESUMO	7
ABSTRACT	8
1.0 INTRODUÇÃO	9
2.0 OBJETIVOS	14
3.0 MATEIRAIS E MÉTODOS	14
3.1 Delineamento Experimental	14
3.2 Preparo dos blocos de esmalte	14
3.3 Irradiação com laser de CO <sub>2</sub>	15
3.4 Ciclagem de desmineralização e remineralização	15
3.5 Análise de microdureza	17
3.6 Determinação do perfil mineral	17
4.0 ANÁLISE ESTATÍSTICA	18
5.0 RESULTADOS	18
6.0 DISCUSSÃO E CONCLUSÃO	20
REFERENCIAS	21

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura1:** Esquema da ciclagem de desmineralização e remineralização do esmalte dentário .....p.17
- Figura 2.** Ilustração representativa das impressões a serem realizadas nos blocos durante análise de microdureza.....p.18
- Tabela1.** Perda mineral do esmalte dental( $\Delta Z$ ) de acordo com o grupo.....p. 19
- Tabela 2.** Valores de significância (p) dos grupos estudados. ....p. 20
- Gráfico 1.** Média dos valores de microdureza Knoop, com os respectivos desvios padrão .....p. 20

## LISTA DE ABREVIATURAS

CO <sub>2</sub>	Gás carbônico
TEA	<i>Transversely excited atmospheric pressure</i>
J	Joule
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
Hz	Hertz
KGy	KiloGray
W	Watts
KCl	Cloreto de potássio
KHN	<i>Knoop hardness number</i>
ANOVA	<i>Análise de variância</i>
ΔZ	Perda mineral

## RESUMO

Esta pesquisa teve como objetivos avaliar o efeito de diversas aplicações de laser de CO<sub>2</sub> na morfologia da hidroxiapatita como também, na redução da desmineralização do esmalte dentário mediante desafio cariogênico *in vitro*. Para tanto, foram utilizados terceiros molares retidos, os quais serão aleatoriamente divididos em 5 grupos de 13 blocos cada: C – controle; L1 – uma aplicação de laser de CO<sub>2</sub>; L2 – duas aplicações de laser de CO<sub>2</sub>; L3 – três aplicações de laser de CO<sub>2</sub> e L4 – quatro aplicações de laser de CO<sub>2</sub>. Os blocos de esmalte foram cobertos com verniz ácido-resistente, com área exposta de 16 mm<sup>2</sup> na qual será realizada irradiação com laser de CO<sub>2</sub> pulsado com comprimento de onda 10,6 μm. Todos os blocos foram submetidos à ciclagem de pH, para simulação do desafio cariogênico e após concluída essa etapa, os blocos dentários foram seccionados para análise de microdureza para se determinar a quantidade de mineral perdido. Tendo como resultado que a perda de mineral é menor quando realizadas 1 ou 4 aplicações, sendo que somente nesses grupos foram encontradas diferenças estatísticas (p<0,05)

## ABSTRACT

The purpose of this research was to evaluate the effect of CO<sub>2</sub> laser irradiations on the hydroxyapatite morphology as well as the dental enamel demineralization reduction upon an in vitro cariogenic challenge. In order to achieve that, It was used third molar included, which was divided randomly in 5 groups of 13 blocks each: C- Control group; L1 – one single CO<sub>2</sub> laser irradiation; L2 – two CO<sub>2</sub> laser irradiations; L3 – three CO<sub>2</sub> laser irradiations; L4 – four CO<sub>2</sub> laser irradiations. The dental enamel blocks were covered by an acid-resistant varnish, letting an exposed area of 16mm<sup>2</sup>, on which were performed the CO<sub>2</sub> laser irradiations pulses with a 10,6µm wavelength. All blocks were subjected to a pH recycle, to simulate the cariogenic challenge and after that stage is concluded, the dental blocks were sectioned for the microhardness analysis to determine the mineral loss quantity. As a result the mineral loss is reduced when 1 or 4 irradiations are performed, once that only in those two groups that statistical differences were found ( $p < 0,05$ ).

## INTRODUÇÃO

O declínio da doença cárie ocorrido no mundo (CLARKSON et al., 2000) nas últimas décadas tem sido atribuído ao amplo uso de compostos fluoretados, sendo que há um consenso que o principal efeito do flúor é interferir na dinâmica da cárie dentária, reduzindo a desmineralização e aumentando a remineralização dos tecidos duros dentários (TATEVOSSIAN, 1990). No entanto, o efeito do flúor é parcial já que o mesmo não consegue impedir completamente o desenvolvimento de lesões de cárie. (MEURMAN ET AL.,<sup>18</sup> 1997; NOBRE DOS SANTOS ET AL.,<sup>21</sup> 2001; HOSSAIN ET AL.,<sup>9</sup> 2002; RODRIGUES ET AL.,<sup>23</sup> 2006; STEINER-OLIVEIRA ET AL.,<sup>26</sup> 2006B; TAGLIAFERRO ET AL.,<sup>28</sup> 2007).

Entretanto, a cárie dentária ainda se manifesta em certos indivíduos ou grupos de indivíduos e tem se mostrado como uma das mais prevalentes doenças em adolescentes, com cerca de 85% dos indivíduos de 17 anos acometidos por cárie dentária (CLARKSON & MC LOUGHLIN, 2000; MARTHALER, 2004, GUSHI et al., 2005). Tal fato enfatiza a necessidade de se aperfeiçoar métodos preventivos já existentes, com a introdução de técnicas inovadoras que possam agir como coadjuvantes na prevenção e controle da cárie dentária neste segmento da população.

A laserterapia tem sido bastante estudada como uma alternativa promissora na prevenção da cárie. Pois, desde o desenvolvimento do laser de rubi por MAIMAN (1960), diferentes tipos de lasers, tais como Nd:YAG, Argônio, Er:YAG e CO<sub>2</sub> têm sido estudados para uso em Odontologia com o objetivo de prevenir a cárie dentária. O laser por se caracterizar como uma onda eletromagnética que apresenta frequência e fase bem definidas, se mostra com uma característica muito importante, a coerência, pois, existe a possibilidade de controlar não só a intensidade da luz, mas também a sua fase.

No entanto, o comprimento de onda ( $\lambda$ ) dos lasers de argônio ( $\lambda = 488-514$  nm) e Nd:YAG ( $\lambda = 1.064$  nm) não são absorvidos de forma efetiva pelo esmalte dentário, sendo estes utilizados na medicina. Os comprimentos de onda obtidos com os lasers de CO<sub>2</sub> ( $\lambda = 9,3, 9,6, 10,3$  e  $10,6$   $\mu\text{m}$ ), são mais apropriados para a utilização em esmalte dentário, pois produzem radiação na

região do infravermelho que coincide com algumas bandas de absorção da hidroxiapatita, principalmente os grupamentos fosfato e carbonato. Sendo que o esmalte dentário é um tecido acelular altamente mineralizado, onde 99% de seu peso seco correspondem à cristais microscópicos de fosfato de cálcio.(FEJERSKOV, O.; KIDD, D.; 2007). Assim, uma maior efetividade na prevenção de cárie pode ser obtida com menor ocorrência de efeitos deletérios aos tecidos dentários, proporcionando uma menor dissipação de raios incidentes e maior rapidez, bem como eficácia do laser. Com este laser, a maior parte da luz é absorvida nos poucos micrometros externos da superfície do esmalte e convertida em calor, causando perda de carbonato do mineral e fusão dos cristais de hidroxiapatita, tendo como consequência uma diminuição na reatividade ácida desta estrutura (Fried et al.,7 1997).

Existem várias hipóteses que tentam explicar os mecanismos pelos quais o laser de CO<sub>2</sub> inibe a desmineralização do esmalte dentário. Dentre elas, a redução da permeabilidade do esmalte a agentes químicos causada pelo derretimento da superfície do esmalte (Stern et al., 1972). No entanto, esta hipótese parece pouco provável, uma vez que o único estudo que testou a permeabilidade do esmalte irradiado demonstrou que a mesma é aumentada pela irradiação (Borggreven et al.,1 1980). Técnicas como a espectroscopia infravermelha e/ou difração por raios-X evidenciaram uma redução do conteúdo de água, proteína e carbonato nos espécimes irradiados, bem como formação de compostos fosfatados no esmalte dentário, como ortofosfato  $\alpha$ -cálcico, fosfato  $\alpha$ -tricálcico e fosfato tetracálcico (Stern et al.,27 1972; Kantola,13 1972; Kantola et al.,14 1973). A redução do conteúdo de carbonato decorrente da irradiação com laser é um fator positivo visto que, o carbonato torna a apatita mais instável e solúvel em ácido. Por outro lado, Fowler et al.6 (1986), salientaram que fosfato tetracálcico e fosfato  $\alpha$ -tricálcico são substancialmente mais solúveis em ácido que o esmalte dentário e a hidroxiapatita. Deste modo, a ação do laser na superfície irradiada pode ser benéfica ou prejudicial dependendo dos parâmetros de irradiação empregados. Assim, a quantidade de energia e a forma como esta energia é depositada no substrato são particularmente importantes. Outra explicação se baseia na redução da solubilidade do esmalte ocasionada pelo derretimento e recristalização dos

cristais de hidroxiapatita ou pela mudança de solubilidade da apatita aquecida pela formação de compostos fosfatados menos solúveis (Nelson et al.19,20 (1986, 1987). Por outro lado, análises por microscopia eletrônica de varredura demonstraram que quando presentes, as zonas de derretimento do esmalte não são homogêneas e ocorrem em áreas limitadas (Kantorowitz et al.,15 1998; Rodrigues et al.,23 2006). Por conseguinte, parece que este derretimento não é necessariamente a única causa para a diminuição da reatividade ácida do esmalte. Finalmente, a mais recente teoria preconiza que a irradiação com laser altera a matriz orgânica presente no esmalte que normalmente já desempenha um papel protetor em situações de desafio ácido. O uso de uma baixa densidade de energia

Estudos realizados por NOBRE DOS SANTOS et al (2001),demonstraram que provavelmente o mecanismo de ação do laser de CO2 na inibição da desmineralização pode ser uma combinação de alterações na estrutura do esmalte. Os primeiros estudos realizados obtiveram resultados promissores de inibição de cárie tanto em superfície lisa quanto em superfície oclusal, quando o esmalte íntegro e desmineralizado foram submetidos a desafios cariogênicos *in vitro*. Nestes estudos, foi utilizado um TEA laser de CO2 (Argus Photonics Group, Jupiter, FL) de comprimento de onda 9,6 µm com densidades de energia que variaram de 1 a 3 J/cm<sup>2</sup>. Embora não tenha sido realizada nenhuma análise morfológica da superfície irradiada, a microscopia de luz polarizada mostrou indícios da ocorrência de derretimento em algumas áreas. Tais resultados foram ratificados recentemente, com a utilização de um modelo de produção de cárie *in situ* onde o efeito do mesmo laser (1,5 J/cm<sup>2</sup>) foi testado. Neste estudo, zonas de derretimento e recristalização dos cristais de hidroxiapatita foram evidenciadas pela microscopia eletrônica de varredura.

Com a utilização de um laser de CO2 clínico (Opus 20), com comprimento de onda 10,6 µm e operando em modo pulsado, foram realizados outros 3 estudos *in vitro*. No primeiro, Klein et al.16 (2005) mostraram inibição da desmineralização do esmalte ao redor de restaurações de resina composta através da irradiação com 8 e 16 J/cm<sup>2</sup>. Zonas de derretimento e recristalização também foram evidenciadas por imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV). No entanto, Tagliaferro et al.28 (2007), também

mostraram inibição de progressão da desmineralização em esmalte decíduo irradiado com 5 J/cm<sup>2</sup>, porém, sem a ocorrência de alterações morfológicas da superfície do esmalte. Neste estudo, a análise da composição química do esmalte feita através de espectroscopia Raman transformada de Fourier (FT-Raman) evidenciou diminuição do conteúdo de carbonato e alteração na matriz orgânica do esmalte (dados não publicados). Já Steiner- Oliveira et al. (2006a) encontraram redução da desmineralização do esmalte dentário humano irradiado com 10 J/cm<sup>2</sup> evidenciando presença de zonas de derretimento e recristalização observados em MEV. Neste estudo também foram detectadas diminuições das bandas de carbonato e fosfato através da análise da composição química por espectroscopia FT-Raman.

Por conseguinte, o mecanismo de ação do laser de CO<sub>2</sub> na inibição da desmineralização do esmalte está intimamente relacionado com os parâmetros de irradiação usados e tipo de substrato irradiado. Mesmo em condições de irradiação similares, diferentes mecanismos podem atuar para diminuir a reatividade do esmalte aos ácidos.

O laser de CO<sub>2</sub>, desenvolvido por PATEL et al. (1964), laser usa uma mistura de CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub> e He, com o CO<sub>2</sub> como o meio ativo do laser. Para aplicações em Odontologia, os aparelhos de laser de CO<sub>2</sub> operam em um modo de não contato, contínuo ou pulsado (GONZALEZ et al., 1996). Para tecidos duros, o laser de CO<sub>2</sub> mais eficiente é o TEA laser. O nome TEA é um acrônimo para "*transversely excited atmospheric pressure*" e este laser usam um fluxo transversal de gás que opera em pressões mais altas que outros lasers de gases, geralmente em pressões próximas da pressão atmosférica. Este diferencial permite que o laser opere em um regime pulsado de poucos Hz de taxa de repetição e pulsos da ordem de 0,1 a 0,2 μs (WIDGOR et al., 1995).

FEATHERSTONE & NELSON (1987) mostraram que certos comprimentos de onda são altamente eficientes, no trabalho citado foi utilizando pulsos de laser de CO<sub>2</sub> em comprimento de onda entre 9,32-μm e 10,49-μm, com densidades de energia com intervalo de 10 a 50 J.cm<sup>2</sup>. Este tratamento com laser causou fusão superficial lesão e inibição da progressão de lesão cariogênica. Assim, através de estudos in vitro, obtiveram uma inibição subsequente da desmineralização do esmalte de até 50% com as condições de irradiação utilizadas.

A efetividade do tratamento com laser de CO<sub>2</sub> depende do emprego de comprimentos de onda que sejam bem absorvidos pela estrutura da hidroxiapatita do esmalte dentário. FEATHERSTONE *et al.* (1996) e KANTOROWITZ *et al.* (1998), comprovaram uma redução de cárie em esmalte de até 87% utilizando o comprimento de onda 10,6 µm. Esse comprimento de onda é o mais intenso da linha do laser de CO<sub>2</sub> e a maior parte dos lasers clínicos comercialmente disponíveis operam nesse comprimento de onda (RODRIGUES *et al.*, 2004; KLEIN *et al.*, 2005, STEINER-OLIVEIRA, *et al.*, 2006).

Outros estudos relataram que a irradiação do esmalte dentário com laser de CO<sub>2</sub>, utilizando densidades de energia de 0,3 a 12,5 J/cm<sup>2</sup>, promoveram redução significativa na perda mineral do esmalte, sendo que a densidade de energia considerada como ideal é de 10J/cm<sup>2</sup> (FEATHERSTONE, *et al.*, 1998; KANTOROWITZ, *et al.*, 1998, HSU, *et al.*, 2000; KLEIN *et al.*, 2005; STEINER-OLIVEIRA, *et al.*, 2006; TAGLIAFERRO *et al.*, 2007). A maior parte da luz laser é absorvida nos poucos micrometros externos da superfície do esmalte e convertida em calor, promovendo perda de carbonato do mineral e fusão dos cristais de hidroxiapatita, o que acarreta uma subsequente diminuição na reatividade ácida desta estrutura (FEATHERSTONE *et al.*, 1997).

No entanto, todos os estudos que utilizaram o laser de CO<sub>2</sub> fizeram uma única irradiação no esmalte dentário. Assim, não se conhece se existe um efeito adicional ou deletério para a prevenção da cárie dentária em esmalte com mais aplicações do laser, como também, não há relatos na literatura sobre as alterações morfológicas do esmalte dentário decorrentes de várias aplicações do laser de CO<sub>2</sub>. Neste estudo, então, foi analisada a profundidade e a perda mineral do esmalte, de acordo com o número de aplicações do laser de CO<sub>2</sub>.

## **OBJETIVO**

Avaliar o efeito de aplicações adicionais do laser de CO<sub>2</sub> na estrutura morfológica da hidroxiapatita como também na resistência do esmalte dentário à desmineralização mediante um alto desafio cariogênico in vitro.

## **OBJETIVO ESPECIFICO**

Analisar a profundidade e perda mineral do esmalte dentário após as aplicações do laser.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Como a realização desta pesquisa inclui experimentos com dentes humanos, o estudo somente foi conduzido após a aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FOP- UNICAMP, sob protocolo número 017/2009.

### **Delineamento Experimental**

Para realização deste trabalho, foi utilizado um delineamento experimental inteiramente casualizado, com 5 grupos e 13 repetições. Os espécimes de esmalte foram divididos nos 5 grupos da seguinte forma:

Grupo C - Controle;

Grupo L1 – uma irradiação com laser de CO<sub>2</sub>;

Grupo L2 - duas irradiação com laser de CO<sub>2</sub>;

Grupo L3 - três irradiação com laser de CO<sub>2</sub>;

Grupo L4 - quatro irradiação com laser de CO<sub>2</sub>;

### **Preparo dos blocos de esmalte**

Para a realização deste estudo, foram utilizados terceiros molares humanos inclusos, íntegros e extraídos por motivos que não os desta pesquisa. Após a extração, os dentes foram mantidos em solução de timol a 0,1% e subsequentemente esterilizados por radiação gama a uma dose de 25 KGy (AMAECHEI *et al.*, 1999). Posteriormente, empregando-se um micrótomo de baixa rotação, a porção radicular foi removida, através de um corte transversal

na região cervical do dente, próximo à junção amelo-cementária. Prosseguindo, foi feita uma secção longitudinal da coroa dentária no sentido méso-distal para obtenção dos blocos de esmalte com área de 4,0 x 4,0 mm. Os cortes foram realizados sob refrigeração com água destilada e deionizada e depois analisados com auxílio de lupa estereoscópica (aumento 10X) para verificar se estavam livres de machas intrínsecas e/ou extrínsecas e trincas. Cada bloco foi submetido à profilaxia com pasta de alumina de granulometria 5µm, por meio de taça de borracha em baixa velocidade, durante 60 segundos, lavado com água destilada e deionizada, e sonicado durante 5 minutos, por duas vezes.

### **Irradiação com laser de CO<sub>2</sub>**

Os blocos de esmalte dos grupos L1-L4 foram irradiados com laser de CO<sub>2</sub> (UNION MEDICAL ENGINEERING CO.) pulsado com comprimento de onda 10,6 µm, calibrado com os seguintes parâmetros: 1 pulso com duração de 10 ms com 10 ms de descanso, tendo portanto uma freqüência de 50 Hz; 0,7 W de potência média e diâmetro do feixe de 0,3 mm. Esses parâmetros determinam uma densidade de energia de 10,0 J/cm<sup>2</sup> (STEINER-OLIVEIRA *et al.*, 2006). A irradiação foi realizada através de varredura da área teste de 16mm<sup>2</sup> durante 60s utilizando-se uma plataforma com posicionamentos X-Y, para se obter uniformidade da irradiação em toda área.

### **Ciclagem de desmineralização e remineralização**

Após a irradiação, os blocos dentários foram recobertos com 2 camadas de verniz ácido-resistente deixando somente exposta a área de 2,0 x 2,0 mm. Para a realização desta ciclagem foi utilizado o modelo proposto por FEATHERSTONE *et al.*, (1986), acrescido de algumas modificações realizadas por Klein *et al.* (2005). Onde cada bloco foi mantido em uma solução desmineralizadora (DES) (5 mL/mm<sup>2</sup> de esmalte exposto) contendo 2,0 mmol/L de cálcio, 2,0 mmol/L fosfato em 75 mmol/L tampão acetato pH 4,6 por três horas. Eles foram então colocados em uma solução remineralizadora (RE) (2,5 mL/mm<sup>2</sup> de exmalte exposto) contendo 1,5 mmol/L de cálcio, 0,9 mmol/L de fosfato e 150 mmol/L KCl, em 20 mmol/L tampão cacodilato pH 7,0 para uma

média de 21 horas cada dia. Ambas as soluções foram mudadas diariamente, e o ciclo foi repetido por dez dias. Após cinco ciclos e no final do experimento, as placas permaneceram na solução remineralizadora por dois dias (37 ° C). Entre as etapas desmineralizante e remineralizante e no final da ciclagem de pH, as placas foram lavadas com água destilada e deionizada por dez segundos e limpo com papel de filtro. Ambas as soluções continham timol para impedir o crescimento de microorganismos.

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). O procedimento de ciclagem se iniciou com a solução desmineralizadora e foi repetido durante 5 dias consecutivos, havendo, a partir de então, um período de 48 h de imersão na solução remineralizadora. 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 10s, secos com papel absorvente e mantidos em ambiente fechado, úmido e sob refrigeração.

SOLUÇÃO RE- 10 mL:  
1,5 mmol/L de Ca  
0,9 mmol/L de PO<sub>4</sub>  
150 mmol/L de KCl  
20 mmol/L cacodilato  
37° C pH- 7,0

SOLUÇÃO DES- 20 mL:  
2 mmol/L de Ca  
2 mmol/L de PO<sub>4</sub>  
75 mmol/L de acetato  
pH- 4,6 37° C



**Figura1:** Esquema da ciclagem de desmineralização e remineralização do esmalte dentário

## Análise de microdureza

Todos os blocos foram submetidos à análise de microdureza do esmalte seccionado longitudinalmente. O aparelho utilizado foi o microdurômetro modelo HMV 2000 (Shimadzu, Japan) e o penetrador foi 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  $\mu\text{m}$  e com 12 impressões cada, foram executadas a partir de 10  $\mu\text{m}$  da superfície do esmalte, seguindo até a profundidade de 180  $\mu\text{m}$ , com intervalos de 10  $\mu\text{m}$  entre as 6 primeiras impressões e de 20  $\mu\text{m}$  entre as restantes, conforme ilustra a Figura 1.

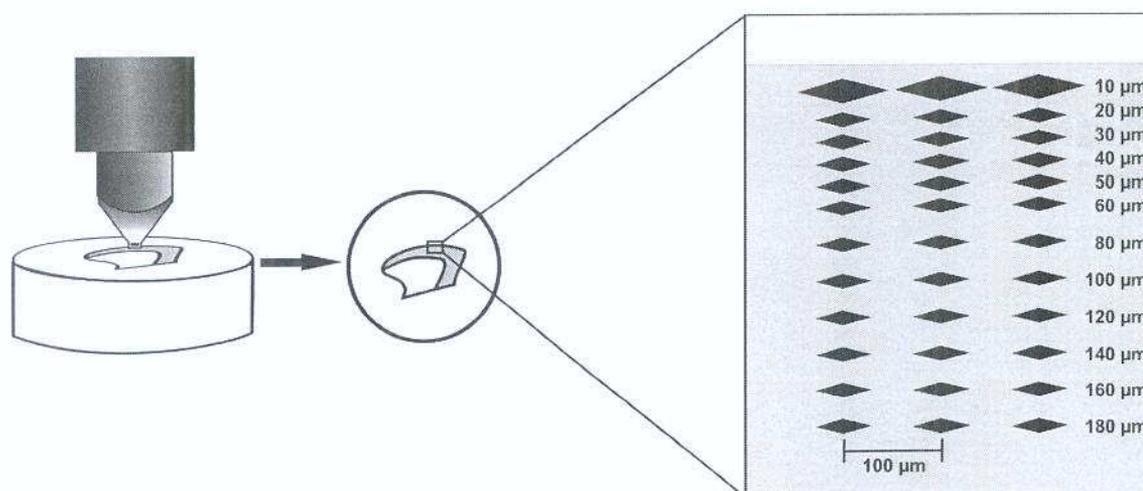


Figura 2. Ilustração representativa das impressões a serem realizadas nos blocos durante análise de microdureza.

## Determinação do perfil 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):  $\%vol = 4,3 \times (KHN)^{1/2} + 11,3$  em que KHN (*Knoop hardness number*) é o número de dureza Knoop médio em cada uma das profundidades analisadas.

## ANÁLISE ESTATÍSTICA

A variável analisada foi a porcentagem de volume mineral, tendo os tratamentos do esmalte como fontes de variação. Onde foi realizada a verificação das pressuposições para a análise de variância. Essa análise foi feita através do teste ANOVA e posteriormente, existindo diferença significativa entre os grupos, foi realizado o teste de Tukey, utilizando-se 5% como nível de significância. Com auxílio do programa BioEstat 2008 (AnalystSoft, versão 5.4.0.0.)

## RESULTADOS

A tabela 1 mostra a perda mineral ( $\Delta Z$ ) de acordo com o grupo. Mostrando que a menor perda mineral ocorreu no grupo com 1 e 4 aplicações de laser.

Tabela1. Perda mineral do esmalte dental( $\Delta Z$ ) de acordo com o grupo.

Grupos	$\Delta Z$ (%vol x $\mu\text{m}$ )
C	14802,50
L1	13720,76
L2	14427,40
L3	14220,90
L4	13025,77

Quando analisados estatisticamente os grupos, os grupos L1, L2 e L3 não diferem entre si, diferindo estatisticamente do grupo L4.

A tabela 2 mostra os valores de significância de cada grupo quando comparados ao grupo controle, onde podemos notar que 3 aplicações de laser não diferiram significativamente do grupo controle. Por outro lado, os grupos que receberam com 1, 2 ou 4 aplicações diferiram do grupo controle..

Tabela 2. Valores de significância (p) dos grupos estudados.

Grupos	Valor de significância (p)
L1	0,0323 (a)
L2	0,0545 (b)
L3	0,0780 (c)
L4	0,0194 (a)

O Gráfico 1 mostra as médias desvios padrão do número de dureza Knoop, de acordo com a profundidade de análise e o número de aplicações do laser de CO<sub>2</sub>.

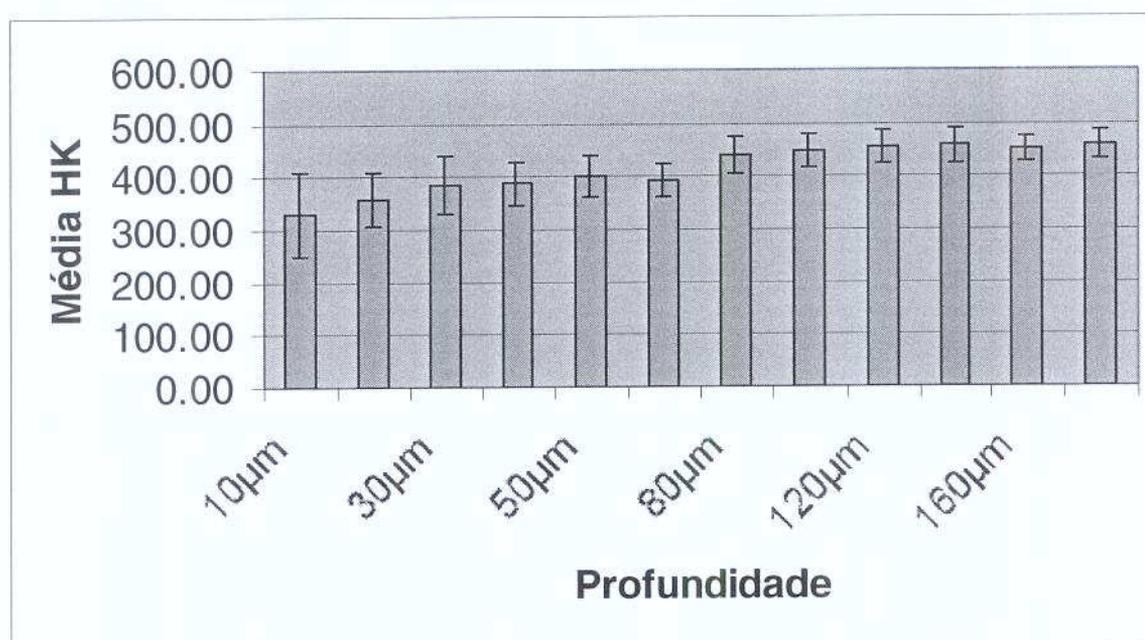


Gráfico 1. Média dos valores de microdureza Knoop, com os respectivos desvios padrão

## DISCUSSÃO e CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo mostram que 1, 2 ou 4 aplicações do laser de CO<sub>2</sub>, foram efetivas em reduzir a perda mineral do esmalte uma vez que estes grupos diferiram estatisticamente do grupo controle. Os resultados de redução de perda mineral obtido para o grupo L1 estão de acordo com aqueles obtidos que mostra que os estudos de FEATHERSTONE , *et al.* (1996), FEATHERSTONE , *et al.* (1998), e STEINER-OLIVEIRA , *et al* (2006), Observou-se também que a menor perda mineral ocorreu quando o esmalte dental foi irradiado 4 vezes. Estes resultados podem indicar que alterações mais significativas como fusão derretimento e recristalização tenham ocorrido na estrutura da hidroxiapatita decorrentes do aquecimento promovido pelas 4 aplicações com o laser de CO<sub>2</sub>. Por outro lado, quando o esmalte recebeu 3 aplicações de laser de CO<sub>2</sub>, não ocorreu uma redução significativa da perda mineral do esmalte uma vez que este grupo não diferiu do grupo controle. Quando comparados os grupo separadamente de acordo com o valor de significância encontrado, os valores dos grupos L2 e L3, não diferiu significamente do grupo controle. E os grupos L1 e L2 apresentaram valores estatísticos significantes ( $p < 0,05$ ).

O que nos leva a conclusão que quando realizadas 2 ou 3 aplicações a energia absorvida pelo dente não causa as mesmas alterações do que as alterações que ocorrem com 1 aplicação, como demonstrado por NELSON, D. G. A., *et al.* (1987) e STEINER-OLIVEIRA C, *et al.* (2006), não reduzindo assim a perda de mineral do dente quando em ambiente cariogênico. Uma comparação direta destes resultados com aqueles da literatura torna-se impossível uma vez que não existem trabalhos anteriores a este que tenham avaliado o efeito de repetidas aplicações do laser de CO<sub>2</sub>.

Com base no exposto, os resultados deste trabalho sugerem que o efeito máximo de redução de desmineralização do esmalte dental foi obtido com apenas uma aplicação com laser.

[Assinatura]

## BIBLIOGRAFIA

1. AMAECHI BT, HIFGHAM SM, EDGAR W M. The use of gamma irradiation for the sterilization of enamel for intra-oral cariogenicity tests. *J Oral Rehab.* 1999; 26: 804-813.
2. 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.
3. BORGGREVEN JMP, VAN DUK JW, DRIESENS FCM. Effect of laser irradiation on the permeability of bovine dental enamel. *Arch Oral Biol.* 1980;25 (11-12):831-2.
4. CLARKSON JJ, MC LOUGHLIN J. Role of fluoride in oral health promotion. *Int Dent J.* 2000; 50(3):119-28.
5. FEATHERSTONE JBD, et al. Effect of pulse duration and repetition rate on CO<sub>2</sub> laser inhibition of caries progression. *Lasers in Dentistry. SPIE.* 1996; 2972:80-87.
6. FEATHERSTONE JBD, FRIED D, BITTEN E R. Mechanisms of laser induced solubility reduction in dental enamel. *Lasers in Dentistry SPIE.* 1997; 2973:112-16.
7. FEATHERSTONE JBD, NELSON DGA. Laser effects on dental hard tissues. *Adv Dent Res.* 1987; 1(1):21-26.
8. FEATHERSTONE JBD, O'REILLY MM, SHARIATI M, et al. Enhancement of remineralization in vitro and in vivo. In: LEACH, S. A. Factors relating to demineralization and remineralization of the teeth, Oxford: IRL Press Limited, p.23-34, 1986.
9. FEATHERSTONE JBD, 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.
10. FEATHERSTONE JDB, BARRET-VESPONE NA, FRIED D, KANTOROVITZ Z, SEKA W. CO<sub>2</sub> laser inhibitor of artificial caries-like lesion progression in dental enamel. *J Dent Res.* 1998; 77:1397-403.
11. Gonzalez CD, Zakariasen KL, Dederich DN, Pruhs RJ. Potential preventive and therapeutic hard-tissue applications of CO<sub>2</sub>, Nd:YAG and

- argon lasers in dentistry: A review. *ASDC J Dent Child*. 1996;63(3): 196-207.
12. GUSHI LL, SOARES MDAC, FORNI TI, VIEIRA V, WADA RS, DE SOUSA MDAL. Cárie dentária em adolescentes de 15 a 19 anos de idade no Estado de São Paulo. *Cad Saude Publica*. 2005; 21(5):1383-1391.
  13. HOSSAIN MM, HOSSAIN M, KIMURA Y, KINOSHITA J, YAMADA Y, MATSUMOTO K. Acquired acid resistance of enamel and dentin by CO<sub>2</sub> laser irradiation with sodium fluoride solution. *J Clin Laser Med Surg*. 2002;20(2):77-82.
  14. 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;16:93-105.
  15. HSU CYS, JORDAN TH, DEDERICH DN, WEFEL JS. Laser matrix-fluoride effects on enamel demineralization. *J Dent Res*. 2000; 79(9):1725-30.
  16. KANTOROWITZ Z, FEATHERSTONE JD, FRIED D. Caries prevention by CO<sub>2</sub> laser treatment: dependency on the number of pulses used. *J Am Dent Assoc*. 1998;129(5):585-91.
  17. KLEIN AL, RODRIGUES LK, EDUARDO CP, NOBRE DOS SANTOS M, CURY JA. Caries inhibition around composite restorations by pulsed carbon dioxide laser application. *Eur J Oral Sci*. 2005; 113(3):239-44.
  18. MAIMAN TH. Stimulated optical radiation in ruby. *Nature*. 1960;187:493-4.
  19. MARINELLI CB, DONLY KJ, WEFEL JS, JAKOBSEN JR, DENEHY GE. An in vitro comparison of three fluoride regimens on enamel remineralization. *Caries Res* 1997;31:418-22.
  20. MARTHALER TM. Changes in dental caries 1953-2003. *Caries Res*. 2004; 38(3):173-181.
  21. MEURMAN JH, HEMMERLE J, VOEGEL JC, RAUHAMAA MAKINEN R, LUOMANEN. M. Transformation of hydroxyapatite to fluorapatite by irradiation with high-energy CO<sub>2</sub> laser. *Caries Res*. 1997;31(5): 397-400.
  22. 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; 20:289-99.
23. NELSON, D. G. A., et al. Morphology, histology and cristallography of human dental enamel treated with pulsed low-energy infrared laser irradiation. *Caries Res.* 1987; 21(5):411-26.
  24. NOBRE DOS SANTOS M, FEATHERSTONE JDB, FRIED D. Effect of a new carbon dioxide laser and fluoride on sound and demineralized enamel. *Lasers in Dent VII- SPIE.* 2001;4249:169-74.
  25. PAES LEME AF, DALCICO R, TABCHOURY CP, DEL BEL CURY AA, ROSALEN PL, CURY JA. In situ effect of frequent sucrose exposure on enamel demineralization and on plaque composition after APF application and F dentifrice use. *J Dent Res* 2004;83:71-5.
  26. PATEL CKN, MCFARLANE RA and FAUST WL. Selective excitation through vibrational energy transfer and optical maser action in N<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>. *Physiol Rev.*1964;13:617-9.
  27. RODRIGUES LKA, SANTOS MN, PEREIRA D, ASSAF AV, PARDI V. Carbon dioxide laser in dental caries prevention. *J Dent.* 2004; 32:531-40.
  28. RODRIGUES LK, NOBRE DOS SANTOS M, FEATHERSTONE JD. In situ mineral loss inhibition by CO<sub>2</sub> laser and fluoride. *J Dent Res* 2006;85:617-21.
  29. STEINER-OLIVEIRA C, RODRIGUES LK, SOARES LE, MARTIN AA, ZEZELL DM, NOBRE-DOS-SANTOS M. Chemical, morphological and thermal effects of 10.6-microm CO<sub>2</sub> laser on the inhibition of enamel demineralization. *Dent Mater J* 2006; 25(3):455-62.
  30. STEINER-OLIVEIRA C, RODRIGUES LKA, LIMA EB, , NOBRE-DOS-SANTOS M. Effect of the CO<sub>2</sub> laser combined with fluoridated products on the inhibition of enamel demineralization.
  31. STERN RH, VAHL J AND SOGNAES RF. Lased enamel: Ultrastructural observations of pulsed carbon dioxide laser effects. *J Dent Res.* 1972;51(2):455-60
  32. TAGLIAFERRO EP, RODRIGUES LK, NOBRE DOS SANTOS M, SOARES LE, MARTIN AA. Combined effects of carbon dioxide laser and

- fluoride on demineralized primary enamel: an in vitro study. *Caries Res.* 2007;41(1):74-6.
33. TATEVOSSIAN A. Fluoride in dental plaque and its effects. *J Dent Res.* 1990;69(Spec n.):645-52.
34. TEN CATE JM, DUIJSTERS PPE. The influence of fluoride in solution on tooth demineralization. I. Chemical data. *Caries Res.* 1983; 17(3): 193-199.
35. WIDGOR HA, WALSH JT, FEATHERSTONE JDB, VISURI SR, FRIED D, WALDVOGEL JL. Lasers in Dentistry. *Lasers Surg Med.* 1995;16(2):103-33.

