



MÁRCIA REGINA CABRAL OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DA MICRODUREZA DO ESMALTE
DENTAL BOVINO IRRADIADO COM LASER
ULTRAPULSADO DE CO₂ E USO DE DIFERENTES
FLUORETOS EM LESÃO DE CÁRIE INCIPIENTE**

São Paulo

2016



MÁRCIA REGINA CABRAL OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DA MICRODUREZA DO ESMALTE
DENTAL BOVINO IRRADIADO COM LASER
ULTRAPULSADO DE CO₂ E USO DE DIFERENTES
FLUORETOS EM LESÃO DE CÁRIE INCIPIENTE**

Dissertação apresentada à ao programa de
Pós-Graduação em Biofotônica aplicada à área da
Saúde da Universidade Nove de Julho para
Obtenção do título de Mestre
Orientadora: Profa. Dra. Anna Carolina Ratto
Tempestini Horliana

São Paulo
2016

Oliveira, Márcia Regina Cabral.

Avaliação da microdureza do esmalte dental bovino irradiado com laser ultrapulsado de CO₂ e uso de diferentes fluoretos em lesão de cárie incipiente. / Márcia Regina Cabral Oliveira. 2016.

61f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2016.

Orientador (a): Prof^ª. Dr^ª. Anna Carolina Ratto Tempestini Horliana.

1. Esmalte dentário. 2. Cárie dentária. 3. Fluoretos. 4. Dureza. 5. Laser.

I. Tempestini, Anna Carolina Ratto. II. Título

CDU 615.831

São Paulo, 16 de dezembro de 2016.

TERMO DE APROVAÇÃO

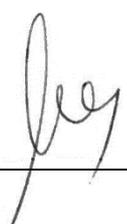
Aluna: MARCIA REGINA CABRAL OLIVEIRA

Titulo da Dissertação: "Avaliação da microdureza do esmalte dental bovino irradiado com laser de CO2 e uso de diferentes fluoretos em lesão de cárie incipiente "

Presidente: PROF[^]. DR[•] ANNA CAROLINA RATTO TEMPESTINI HORLIANA



Membro: PROF^o. DR[^]. MARIA CRISTINA CHAVANTES



Membro: PROF. DR. RICARDO SCARPARO NAVARRO



Dedico esta dissertação

A minha família

Aos meus pais, pela educação e eterno incentivo

Aos meus estudos, ao meu esposo e filhos

Pelo amor incondicional e

compreensão.

Agradecimentos

A Universidade Nove de Julho pela oportunidade de dar continuidade aos meus estudos com a concessão de bolsa integral do curso de mestrado.

A Professora Kristianne Porta Santos Fernandes, coordenadora do programa de Pós-Graduação em Biofotônica aplicada à área da Saúde da Universidade Nove de Julho, e à Professora Dra. Sandra Kalil Bussadori, pela oportunidade de aperfeiçoamento profissional nesta renomada instituição.

À Profa. Anna Carolina Ratto Tempestini Horliana, pela orientação, incentivo e paciência. Não saberia usar as palavras para agradecer por todas as oportunidades e possibilidades que você me proporcionou. Serei eternamente grata por todos os ensinamentos e pela valiosa contribuição no meu crescimento pessoal e profissional. Obrigado pelas broncas, conselhos, pelos momentos que passamos juntas. Jamais terei como te agradecer os caminhos que buscou para que eu conseguisse terminar essa etapa da minha vida.

Aos demais membros da equipe docente do Programa de pós-Graduação da Uninove, professores Prof. Dr Alessandro Melo Deana, Profa. Dra. Raquel Agnelli Mesquita Ferrari, Profa. Dra. Daniela de Fátima Teixeira da Silva, Prof. Dr. Renato Prates.

Aos meus colegas de turma de mestrado pelos momentos de aprendizado e companheirismo durante o curso.

Ao Prof. Dr. Paulo Francisco César por trabalhar conosco e enriquecer com seus conhecimentos nossos estudos e pelo suporte para realização do teste de microdureza.

Agradeço a todas as pessoas, que, direta ou indiretamente contribuíram na elaboração desse trabalho.

Agradecimentos Especiais

Início meus agradecimentos a Deus, por colocar pessoas tão especiais no meu caminho, sem as quais certamente não teria conseguido.

Aos meus Pais, Pedro Ilário Cabral e Maria José Silva Cabral, meus eternos agradecimentos por sempre se colocarem ao meu lado em todos os momentos, me fortalecendo quando me sentia fraca, especialmente meu amado pai que sempre foi minha fortaleza e por minha mãe que é uma imensa fonte de carinho e amor.

Ao meu esposo Luiz Antônio da Silva Oliveira, por ser tão importante em minha vida, e está sempre ao meu lado me apoiando e me fazendo acreditar que tudo daria certo. Obrigado por amor compreensão e força.

Aos meus filhos Pedro Henrique Cabral Oliveira e Luiz Henrique Cabral Oliveira, difícil de agradecer por tudo que fizeram por mim.

As queridas amigas de sempre Erika Horácio de Souza e Guiliana G. Anselmo Ramos, que sempre estivemos lado a lado nesta caminhada dividindo os momentos de alegria e passando pelas dificuldades de modo que elas se tornassem mais suaves, agradece a Deus por todos os nossos momentos.

A professora Maria Cristina Chavantes. Obrigado por todos os conhecimentos, pelo auxílio no desenvolvimento da metodologia e experiência que foram transmitidos isso fará de mim uma melhor professora, uma melhor pesquisadora e uma pessoa melhor. Tenho orgulho muito grande poder ter convivido e ter tido a oportunidade de receber as orientações de tão importante professora.

A Professora Dra. Sandra Kalil Bussadori pelos ensinamentos científicos e pessoais compartilhados. Acima de tudo, pela paciência, dedicação e pelas oportunidades ao longo destes anos. Minha gratidão e admiração profissional e pessoal à senhora, só aumentou depois destes anos de convivência. Obrigado pela confiança em meu trabalho e por abrir portas importantes para mim. Obrigado pela oportunidade de poder trabalhar contigo e de considera-la como grande amiga. Além de uma excelente professora um exemplo de pessoa que levarei em meu coração por toda eternidade.

RESUMO

Atualmente, os lasers de CO₂ estão sendo utilizados para prevenção de cárie por tornar o esmalte mais ácido resistente, contudo as doses para o seu uso não estão bem consolidadas na literatura e o uso do laser para tratamento de lesão incipiente tem sido pouco reportado. O uso do laser de CO₂ pode promover a reorganização dos prismas de esmalte e deixar o substrato mais responsivo ao flúor. A terapia com fluoretos já está bem estabelecida na literatura, entretanto os protocolos de uso são extensos demandando várias sessões, o que dificulta a adesão do paciente ao tratamento. A associação do uso do laser e o flúor pode catalisar a remineralização ou promover uma remineralização mais eficiente. O objetivo deste estudo foi avaliar, *in vitro*, os valores de microdureza de diferentes formas de aplicação tópica de flúor sobre lesão de cárie artificial em esmalte dental bovino irradiado com um novo parâmetro de laser de CO₂. Os espécimes foram preparados para a formação da lesão de cárie artificial, com ciclagem de pH. Foram divididos aleatoriamente em 7 grupos (n=10): tratados somente com laser (G1), gel de flúor neutro a 2% + laser (G2), gel flúor fosfato acidulado a 1,23% + laser (G3), mousse de flúor acidulado 1,23% + laser (G4), verniz de flúor + laser (G5), hígido- laser + solução remineralizadora (G6), hígido - laser + água (G7). Nos grupos experimentais foram utilizados o laser ultra pulsátil com comprimento de onda de 10.600nm, intervalo de pulso de 0,99s, tempo de pulso de 0,005s e frequência de 1Hz. A microdureza (KNH) do esmalte foi avaliada com penetrador Knoop e carga de 0,098N, por meio de 5 leituras em diferentes áreas da mesma superfície. A análise foi realizada após 7, 14, 21, 28 dias e sua estabilidade após uma semana do término. Realizou-se a análise de variâncias Two-way (ANOVA) e Tukey. Os resultados de (KNH) uma semana após o término do tratamento foram G1-104,8±8,3; G2-84,5±7; G3-99±4,8; G4-137±9; G5-214,7±5; G6-236,1±6,2; G7-236,1±9. Pode-se concluir que os novos parâmetros dosimétricos propostos associados ou não ao flúor foram capazes de elevar os valores de (MKH).

Palavras chave: Esmalte dentário, Cárie dentária, Fluoretos, dureza, laser

ABSTRACT

Currently, CO₂ laser systems are being used to prevent caries by making the enamel acider resistant. As doses for its use are not well established in the literature, the laser use for treatment of incipient lesions has been poorly reported. The application of CO₂ laser can promote a reorganization of enamel prisms and make the substrate more responsive to fluoride. Fluoride therapy is already well established in the literature; however extensive use protocols require several sessions. Use of laser and fluoride can catalyze remineralization or promote more efficient remineralization. The objective of this study was to evaluate, *in vitro*, the microhardness values of different forms of fluoride topical application on the artificial caries in bovine dental enamel irradiated with a new parameter of CO₂ ultrapulsed laser. The specimens were prepared for a formation artificial caries lesion, and treatment with pH. Our experimental groups applied an ultra-pulsed laser wavelength 10.600nm, pulse interval of 0.99s, pulse rate of 0,005s. (G1) 2% fluoride gel and laser (G2), 1.23% acidulated fluorine phosphate gel and laser (G3) 1.23% fluoride mousse and laser (G4) varnish fluoride and laser (Duraphat 5%) (G5), higid- laser and remineralizing solution (G6), higid- laser and water (G7). The enamel microhardness (KNH) were evaluated with Knoop penetration and 0.098N load, through 5 readings in different areas of the same surface. The analysis were performed after 7, 14, 21, 28 days and its stability after one week of the end of procedures. A two-way (ANOVA) and Tukey were performed. Results described (KNH) after one week of the end of treatment were G1-104.8 (8.3); G2-84.5 (7); G3-99 (4.8); G4-137 (9); G5-214.7 (5); G6-236,16,2; G7-236.1 (9). It can be concluded that the new laser dosimetry methods associated to the use of fluoride or not were able to increase the (MHK) values.

KEYWORDS: Dental enamel, Dental caries, Fluorides, hardness, laser

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1. CONTEXTUALIZAÇÃO | 11 |
| 2. PROPOSIÇÃO | 14 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS | 15 |
| 5. RESULTADOS..... | 18 |
| 3.1 Artigo: Evaluation of hardness of dental enamel with white-spot lesions after irradiation with carbon dioxide laser: a pilot study | 19 |
| 3.2 Artigo: Microdureza de lesão de cárie artificial tratada com laser de dióxido de carbono e diversos tipos de fluoretos em relação ao tempo..... | 36 |
| 6. DISCUSSÃO | 52 |
| 7. CONCLUSÕES | 56 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 57 |
| ANEXOS | 60 |

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

J-Joules

J/cm² - Joules por centímetro cuadrado

W/cm² - Wats por centímetro cuadrado

S - segundos

nm - nanometro

mm - milímetros

pI- intervalo de pulso

pL- largura de pulso

CONTEXTUALIZAÇÃO

Apesar do uso de fluoretos estar inserido no cotidiano de uma grande parcela da população, a cárie continua sendo a doença bucal mais prevalente no mundo, e a presença de cavidades continua sendo um problema de Saúde Pública. Estudos indicam um número crescente de lesões de cáries em jovens, contudo, a gravidade da doença se potencializa com a idade, principalmente, quando consideramos presença de cáries secundárias ou recorrentes⁸. É importante ressaltar que a cárie dental é um processo dinâmico e reversível^{14,15}. A lesão inicial se inicia como uma zona superficial desmineralizada no esmalte, a outra subjacente intacta¹⁵. Esse tipo de lesão pode ser paralisado, ou revertido quando o desafio ácido é removido e a saliva saturada de cálcio e fosfato devolvem minerais para a superfície de esmalte desmineralizado, assim reparando a estrutura de hidroxiapatita⁴. Atualmente, o controle da doença cárie consiste no controle do biofilme e no equilíbrio das reações desmineralização e remineralização, considerando fatores individuais para impedir recorrência e/ou nova incidência⁹.

A abordagem não-cirúrgica para o tratamento de lesões incipientes de maior eleição é a aplicação de flúor tópico, a partir de várias fontes. Uma vez, que os fluoretos estabilizam o mineral apatita, promovem remineralização do esmalte e o tornam mais resistentes à desmineralização^{26,33}. Contudo, para o sucesso do tratamento não operatório das lesões incipientes, as mesmas devem ser detectadas no início, o consumo de carboidrato deve ser monitorado e o uso adequado dos fluoretos deve ser realizado. Entretanto, é importante que o clínico geral conheça as limitações e desvantagens do uso de fluoretos tópico como alternativa terapêutica¹⁶. O uso de flúor tópico continua sendo a melhor alternativa não invasiva para o tratamento de lesões de mancha branca, no entanto, é necessária a assiduidade do paciente. Além disso, o uso de alguns tipos de fluoretos pode ser contraindicado em pacientes com problemas gastrointestinais e, pacientes que não controlam a deglutição¹⁶

Paralelamente ao desenvolvimento de diferentes materiais a base de fluoreto de sódio com diversas apresentações e pH, ocorreu o desenvolvimento do laser, e há mais de 50 anos, quando foram iniciados os primeiros experimentos em

Odontologia²⁰. Foi notada a capacidade do laser de alterar a estrutura dos tecidos dentais mineralizados tornando-os mais ácido-resistentes⁵. Os lasers podem ter afinidade pelo esmalte dental ou dentina de forma específica, de acordo com o comprimento de onda que emitem^{11,19,30,35}. O esmalte dental é composto em volume por 85% de mineral, 12% de água e 3% de matéria orgânica^{11,19}. A parte mineral é formada em grande parte por cristais de hidroxiapatita carbonada organizados em prismas de aproximadamente 5 μm de diâmetro²⁴. Os usos dos lasers de alta potência preconizam a remoção das impurezas do esmalte (água e a porção orgânica), assim, promovem uma superfície mais vítrea e com maior quantidade mineral^{2,3,15}. Devido à sua composição o esmalte apresenta uma alta absorção para comprimentos de onda na região do infravermelho entre 2700 e 3000 nm , emitidos pelos lasers de érbio e para os comprimentos entre 9000-11000 nm , emitidos pelos lasers de CO_2 . Nessas regiões do espectro, a dispersão é quase nula e a deposição de energia é determinada pelo coeficiente de absorção e reflexão^{27,35,36}.

As duas regiões do espectro mencionadas têm, portanto, um maior potencial de interação com esmalte e dentina. Contudo, os quatro principais comprimentos de onda emitidos pelo laser de CO_2 , apresentam um coeficiente de absorção maior no esmalte do que evidenciam os lasers de érbio ($\mu\text{a} = 480$ e 800 cm^{-1} , respectivamente para 2790 e 2940 nm). Esta interação com o substrato torna a ação do laser mais eficiente do ponto de vista energético, e as modificações superficiais são benéficas para aumentar a ácido resistência do esmalte quando irradiado corretamente. Fried *et al.*, em 1998, observaram que o laser de CO_2 , com comprimento de onda a partir de 9300 nm utilizado com refrigeração, reduz a dissolução do esmalte dental, e que o seu uso sem a refrigeração pode causar exposição excessiva ao calor e favorecer a desmineralização. Verificou-se também que os cristais são mais susceptíveis à dissolução. Tepper *et al.*, em 2004 verificaram que a associação da irradiação com o laser de CO_2 aos fluoretos pode promover um efeito sinérgico com maior incorporação de flúor no esmalte dental e um menor desenvolvimento de trincas visto que o flúor pode atuar refrigerando o esmalte durante a irradiação, favorecendo a receptação imediata de minerais^{6,34}. Rechmann *et al.*, 2011 realizaram um estudo clínico em pacientes com cárie ativa e inicial, que faziam uso de aparelhos ortodônticos. Os pré-molares receberam irradiação com laser ao lado do bracket com um comprimento de onda de 9600 nm , duração do pulso de 2×10^5 s e taxa de repetição de 20 Hz, diâmetro do feixe 1.100 μm , com fluência média $4,1 \pm 0.3 \text{ J} / \text{cm}^2$. Ao avaliar microdureza e

remineralização, concluíram que clinicamente a aplicação do laser nessas condições é benéfica para a remineralização de lesão de cárie em pacientes com alto risco.

Portanto, são necessários estudos que avaliem a associação dos fluoretos tópicos presentes no mercado e o laser de CO₂, como alternativa terapêutica para cárie inicial. Tal associação pode otimizar o tempo de terapia para o tratamento de cárie incipiente e poderá proporcionar uma superfície mais estável, com características favoráveis para as condições orais almejadas³⁰.

PROPOSIÇÃO

Objetivo principal

Avaliar *in vitro* da microdureza de esmalte dental bovino com lesão de cárie irradiado com laser de CO₂ e flúor

Objetivos secundários

Assim, os objetivos específicos foram:

- Realizar a avaliação de microdureza Knoop superficial do esmalte dental bovino com a presença de lesão de cárie artificial 24h associado ao uso de novo parâmetro dosimétrico do laser ultra pulsado de CO₂ (Artigo submetido ao periódico *Lasers Medical in Science*).
- Avaliar os valores de microdurezas Knoop em esmalte dental bovino com lesões de cárie incipientes após utilização do laser ultra pulsado de CO₂ e fluoretos (Artigo será submetido à *J Biophotonics*)

MATERIAL E MÉTODOS

Calibração

A calibração foi realizada através da mensuração de 30 endentações com intervalo de uma semana, empregando os mesmos critérios do estudo em 6 blocos de esmalte dental bovino cariados e 6 blocos hígidos não pertencentes ao estudo. A reprodutibilidade foi calculada, utilizando teste Kappa, não sendo encontrada diferença estatística entre os dois exames. O tratamento das amostras foi realizado por apenas um operador cego para os ensaios de dureza e caracterização de superfície.

Tabela 2- Tabela com nome comercial, composição, concentração fabricante e tempo de aplicação dos materiais utilizados.

| Nome Comercial | Composição | Concentração | Fabricante | Tempo de Aplicação |
|----------------|--|--------------|-------------------|--------------------|
| Flúor Gel® | Fluoreto de sódio acidulado | 1,23% | Sultan Topex, DFL | 1 min. |
| Flugel® | NaF | 2% | Sultan Topex, DFL | 1 min. |
| Fluor Care® | Fluoreto de sódio acidulado | 1,23% | FGM | 1 min. |
| Duraphat® | NaF | 5% | Colgate | 1 min |
| Solução Des. | H ₂ O, KOH, CH ₃ COOH, C ₂ H ₃ NaO ₂ , H ₃ PO ₄ pH 3,5 a 4 | 100% | Fórmula & Ação | Ciclagem pH |
| Solução Re. | H ₂ O, HCL, KOH, CaCl ₂ , (HOCH ₂) ₃ CNH ₂ pH 7 | 100% | Fórmula & Ação | Ciclagem pH |

Preparo dos Espécimes

A lei brasileira 11/797/08 (que regula os procedimentos com animais), publicado em 08 de outubro de 2008, parágrafo §3º, do artigo 3º define experiências com animais como: "procedimentos realizados em animais vivos", portanto, uma vez que todas as amostras foram obtidas *post mortem* de peças descartáveis de animais cultivadas para fins de abate comerciais no frigorífico este trabalho não exige a aprovação do Comitê de ética animal.

Foram utilizados 70 dentes bovinos recém-extraídos, mantidos em solução de timol 0,1% a 4°C. Os dentes foram limpos, e distribuídos aleatoriamente em 7 grupos (Tabela 1). Todos os dentes tiveram a superfície vestibular sequencialmente

abrasionadas com lixas d'água de carbeto de silício nas granulações 400, 600 e 1200 (Buehler) e polidos com disco de feltro e pastas diamantadas nas granulações 3µm, 2 µm, 1 µm e 0,5 µm (FOX Foco Tools - São Caetano do Sul, São Paulo Brasil) deixando-as preparadas para o ensaio de microdureza. Blocos de esmalte com 7x4x4mm foram seccionados da superfície vestibular preparada com discos de diamante dupla face (7020; KG Sorensen, Barueri, SP, Brasil) em baixa rotação sob refrigeração (Kavo, Joinville, SC, Brasil). Os blocos de esmalte dental bovino tiveram as laterais isoladas com esmalte de unha (COLORAMA- L'Oréal-São Paulo, Brasil) deixando exposta somente a superfície de esmalte planificada (Vieira *et al.*, 2005).

Formação da Lesão de Cárie Artificial e Ciclagem de pH

Os espécimes foram mantidos em estufa biológica a 37°C, sendo que receberam ciclagem de pH por 30 dias para a indução de cárie artificial, 18 horas na solução desmineralizadora e 6 horas em solução remineralizadora Featherstone *et al.*, 1986, Featherstone *et al.*, 1983). A ciclagem de pH foi realizada após a indução de cárie artificial, durante e após tratamento com flúor. Os corpos de prova foram imersos em 5ml de solução desmineralizadora por 6 horas intercalados por lavagem em abundância com água destilada. E estes foram imersos novamente na solução remineralizadora por 18 horas a 37° C sobre mesa agitadora (MacLab-Jacareí, SP), para simular o que acontece clinicamente em um paciente de alto risco de cárie (Featherstone *et al.*, 1986, Featherstone *et al.*, 1983).

Irradiação do Laser

Foram realizados blocos em dias diferentes com um intervalo de uma semana entre as irradiações. Foi utilizado laser de ultra pulsado CO₂ com comprimento de onda de 10.600nm, com scanner manual de design quadrangular, que cobriu toda a superfície de esmalte em ambos os grupos com refrigeração a ar constante. A distância focal do laser coaxial, guia de diodo, foi de 75mm.

Tabela 3 – Parâmetros dosimétricos utilizados no estudo.

| | |
|--------------------|--------|
| Potência | 1W |
| Intervalo de pulso | 0,99s |
| Tempo de pulso | 0,005s |
| Energia de pulso | 5mJ |

W- Watts, S- segundos, J-Joules

Tratamento com Flúor

Os grupos experimentais G2, G3, G4 e G5 foram submetidos às aplicações tópicas semanalmente de acordo com as recomendações do fabricante (Tabela 1), por um período total de 28 dias após a indução de cárie artificial e o grupo controle foi mantido sem tratamento, porém com ciclagem de pH. Os excessos dos fluoretos foram removidos imediatamente com um papel absorvente e os espécimes foram colocados novamente na solução remineralizadora sobre agitador (MacLab-Jacarei, SP).

Determinação da Microdureza Superficial

A microdureza superficial foi verificada com a ponta indentadora Knoop com 50g por 20 segundos, utilizando-se um microdurômetro (HMV Micro Hardness Tester; Shimadzu-Japão). Os espécimes foram divididos em quadrantes, foi utilizado um quadrante em cada tempo, as endentações foram realizadas a partir do centro do quadrante evitando as áreas próximas às laterais, a quinta leitura foram realizadas 500µm de distância das primeiras endentações do quadrante 1 para garantir que não seja mensurada a mesma área. Realizou-se 5 endentações com 100µm de distância entre si e serão utilizadas as médias das endentações (Featherstone *et al.*, 1983). A mensuração de microdureza superficial foi realizada em 5 períodos, logo após os preparos das amostras com esmalte hígido, após indução de cárie, imediatamente após a irradiação 0,7, 14, 21, 28 e 7 dias após o termino do tratamento com flúor.

RESULTADOS

- 1- Artigo 1 - Avaliação da Microdureza do Esmalte Dental Bovino Irradiado com laser de CO₂ e uso de diferentes fluoretos em lesão de Cárie: “*Evaluation of hardness of dental enamel with white-spot lesions after irradiation with carbon dioxide laser: a pilot study*” que foi submetido ao periódico *Lasers Medical Science*.
- 2- Artigo 2 - Microdureza de lesão de cárie artificial após tratamento com laser de dióxido de carbono e diversos tipos de flúor em relação ao tempo: “*Microhardness of artificial lesion caries with treatment of ultrapulsed carbon dioxide laser and various types of fluorine in relation to time*” que será submetido ao periódico *J Biofotonics*

Artigo I: Evaluation of hardness of dental enamel with white-spot lesions after irradiation with carbon dioxide laser: a pilot study

Marcia Regina Cabral Oliveira¹ cabral-oliveira@uol.com.br

Pedro Henrique Cabral Oliveira² cabral-oliveira@live.com

Luiz Henrique Cabral Oliveira³ luizhenrique.c.o@icloud.com

Ravana Angelini Sfalcin⁵ ravana-sfalcin@yahoo.com.br

Paulo Francisco César⁶ paulofc@usp.br

Daniela de Fátima Teixeira da Silva⁸ dfatesi@gmail.com

Maria Cristina Chavantes⁸ mcchavantes@uol.com.br

Sandra Kalil Bussadori^{8,9} PhD sandra.skb@gmail.com

Anna Carolina Ratto Tempestini Horliana, PhD⁸ annacrth@gmail.com

- (1) Master degree student, Postgraduate program in Biophotonics Applied to Health Sciences, Universidade Nove de Julho, UNINOVE, São Paulo, Brazil
- (2) PhD student, Dental Research and Graduate Studies Division, Department of Restorative Dentistry, Guarulhos University, Guarulhos, SP, Brazil
- (3) Undergraduate research, Postgraduate program in Biophotonics Applied to Health Sciences, Universidade Nove de Julho, UNINOVE, São Paulo, Brazil
- (4) Undergraduate research, Postgraduate program in Biophotonics Applied to Health Sciences, Universidade Nove de Julho, UNINOVE, São Paulo, Brazil
- (5) PhD student, Postgraduate program in Biophotonics Applied to Health Sciences, Universidade Nove de Julho, UNINOVE, São Paulo, Brazil
- (6) Associate Professor, Department of Biomaterials and Oral Biology, University of São Paulo, São Paulo, Brazil
- (7) Professor of Program in Medicine, Universidade Nove de Julho, UNINOVE, São Paulo, Brazil

(8) Professor, Postgraduate program in Biophotonics Applied to Health Sciences,
Universidade Nove de Julho, UNINOVE, São Paulo, Brazil

(9) Professor, Postgraduate program in Rehabilitation Sciences, Universidade Nove de
Julho, UNINOVE, São Paulo, Brazil

Conflict of interest statement: The authors declare that they have no conflict of interest.

The Research Ethics Committee: Paragraph 3 of Article 3 of Brazilian law 11/797/08, issued on October 8th, 2008, defines animal experimentation as procedures involving living animals. As all samples were obtained post mortem from bovines raised for the purposes of the commercial beef industry, this study did not require approval from the animal ethics committee.

Source of financial support or funding: The research will be financed in full by the researchers.

CORRESPONDING AUTHOR:

Anna Carolina Ratto Tempestini Horliana annacrth@gmail.com

Postgraduate program in Biophotonics Applied to Health Sciences, Universidade Nove de Julho/UNINOVE R. Vergueiro, 235/249, CEP 01504-001- São Paulo, Brazil Phone: +55 (11) 3385-9222

Introdução

Apesar do uso de fluoretos no cotidiano de uma grande parcela da população mundial, a cárie continua sendo a doença bucal mais prevalente, e a presença de cavidades continua sendo um problema de Saúde Coletiva (Cummins, 2013). A epidemiologia das lesões de cárie apresenta número crescente em jovens, contudo a gravidade da doença se potencializa com a idade. (Cummins, 2013; Dye et al., 2010). É importante ressaltar que as lesões de cárie dental são um processo dinâmico e reversível (Featherstone 2003; Featherstone 2006). A lesão inicial se inicia como uma zona superficial desmineralizada no esmalte e outra subjacente intacta. Esse tipo de lesão pode ser paralisada ou revertida, quando o desvio ácido é removido, a saliva saturada de cálcio e fosfato devolvem minerais para a superfície de esmalte desmineralizado, assim reparando a estrutura de hidroxiapatita (Arends & Christoffersen 1986). Atualmente, o controle da doença cárie consiste no controle do biofilme e no equilíbrio das reações desmineralização, remineralização, considerando fatores individuais para impedir recorrência e nova incidência (Cury & Tenuta 2009). Contudo, pesquisadores tem investigado para otimizar e tornar o tratamento de lesões de cárie incipiente mais eficaz e minimamente invasiva utilizando tecnologias e recursos diversos.

A mais de três décadas Patel *et al.*, 1964 iniciaram os primeiros estudos utilizando o dióxido de carbono, Nitrogênio e Hélio para a produção de laser. (Patel *et al.*, 1964). Tal evento se fez importante para toda comunidade médico-científica, incluindo a odontologia, paralelamente ao desenvolvimento dos lasers de alta potência iniciaram-se os primeiros experimentos em Odontologia (Goldman *et al.*, 1964), nos quais foi notada a capacidade da luz laser de modificar os tecidos dentais duros tornando-os mais ácido-resistentes. (Blankenau *et al.*, 1999). Os lasers podem ter afinidade pelo esmalte dental e dentina de forma específica de acordo com o comprimento de onda específico que emitem (Dibin, 1993; Fried *et al.*, 1997, Rechmann. *et al.*, 2011). Os lasers de CO₂ apresentam-se como uns dos mais indicados para esmalte dentário, porque produz radiação na região do infravermelho (9,3, 9,6, 10,3, e 10,6 μm), proporcionando modificações positivas no esmalte. (Featherstone *et al.*, 1998; Klein *et al.*, 2005.) Estes apresentam um coeficiente de absorção maior no esmalte do que a apresentam os lasers de érbio ($\mu\text{a}= 480$ e 800 cm^{-1} , respectivamente para 2790 e 2940 nm), o que torna a interação mais eficiente

do ponto de vista energético, as modificações superficiais são benéficas para aumentar a ácido resistência do esmalte quando irradiado corretamente (Rechmann. *et al.*, 2011). Fried *et al.*, em 1998, observaram que o laser de CO₂ com comprimento de onda a partir de 9300 nm utilizado com refrigeração reduz a dissolução do esmalte dental, e que o seu emprego sem a refrigeração pode causar exposição excessiva ao calor, favorecer a desmineralização e ocasionar carbonização, pois são produzidos cristais modificados e, conseqüentemente mais susceptíveis a dissolução e fratura. Recentemente um estudo realizado por Poosti *et al.*, 2014 observou que a aplicação de um laser fracionado de CO₂ antes ou após o uso de fluoretos, foi mais eficaz em remineralizar o esmalte cariado, após um período de 90 dias em comparação com os grupos controle e a irradiação do laser antes do tratamento de fluoreto causou um aumento significativo na microdureza superficial e sub superficial do esmalte dental (Poosti *et al.*, 2014). Zancopé *et al.*, 2016 avaliaram o uso do laser de CO₂ ($\lambda=10.600\text{nm}$) associado à seguinte dose (11.3 or 20.0 J/cm²) associado ao gel de flúor fosfato acidulado na absorção de CaF₂ antes ou após a aplicação do laser. Eles concluíram que independente da ordem de aplicação do gel a captação de CaF₂ aconteceu de forma mais evidente. Entretanto, permanece desconhecida a dose adequada para ser usada sobre uma lesão de mancha branca, e se estes efeitos benéficos são unicamente devido ao uso do laser no esmalte dental hígido por promover mudanças induzidas nas propriedades físico-químicas do esmalte sobre a sua solubilidade ou também suas características de superfície e se isso ocorre em uma lesão de cárie incipiente (Esteves-Oliveira *et al.*, 2016), haja visto que as características físicas e químicas são distintas do ponto de vista micro-morfológico e mineral de um esmalte dental hígido e cariado (Wang *et al.*, 2016).

Este estudo propõe um novo protocolo dosimétrico para a indução da remineralização de cárie incipiente, em esmalte dental bovino através o uso do laser ultra pulsado de dióxido de carbono com comprimento de onda de 10600nm.

Objetivos

Avaliar a eficiência da irradiação do laser ultra pulsado de CO₂ com comprimento de onda de 10600nm, intervalo de pulso de 0,99s, tempo de pulso de 0,005s com energia de pulso 5 mJ sobre lesão de cárie incipiente, e verificar seu potencial remineralizador.

Material e Métodos

Preparo dos espécimes

A lei brasileira 11/797/08 (que regula os procedimentos com animais), publicado em 08 de outubro de 2008, parágrafo §3º, do artigo 3º define experiências com animais como: "procedimentos realizados em animais vivos", portanto, uma vez que todas as amostras foram obtidas *post mortem* de peças descartáveis de animais cultivadas para fins de abate comerciais no frigorífico este trabalho não exige a aprovação do comitê de ética animal.

Foram utilizados 24 dentes bovinos recém-extraídos, mantidos em solução de timol 0,1% a 4°C. Os dentes foram limpos, distribuídos aleatoriamente em 2 grupos, com lesão de cárie e hígidos. Todos os dentes tiveram a superfície vestibular sequencialmente abrasionadas com lixas d'água de carbetto de silício nas granulações 400, 600 e 1200 (Buehler), polidos com disco de feltro e pastas diamantadas nas granulações 3µm, 2 µm, 1 µm e 0,5 µm (FOX Foco Tools - São Caetano do Sul, São Paulo Brasil) deixando-as preparadas para o ensaio de microdureza. Cada dente extraído gerou dois blocos de esmalte com 4x4x4mm, tais blocos foram seccionados da superfície vestibular preparada com discos de diamante dupla face (7020; KG Sorensen, Barueri, SP, Brasil), em baixa rotação sob refrigeração (Kavo, Joinville, SC, Brasil). Os blocos de esmalte dental bovino tiveram as laterais isoladas com esmalte de unha (COLORAMA- L'Oréal-São Paulo, Brasil), deixando exposto somente a superfície de esmalte planificada (Vieira *et al.*, 2005).

Formação da lesão de cárie artificial e ciclagem de pH

Os espécimes foram mantidos em estufa biológica a 37°C, sendo que sofreram ciclagem de pH por 30 dias para a indução de cárie artificial, 18 horas na solução desmineralizadora e 6 horas em solução remineralizadora Featherstone *et al.*, 1986,

Featherstone *et al.*, 1983). Os corpos de prova foram imersos em 5ml de solução remineralizadora por a 37° C por 24h sobre mesa agitadora (MacLab-Jacareí, SP), para simular o que acontece clinicamente em um paciente (Featherstone *et al.*, 1986, Featherstone *et al.*, 1983).

Tabela 1 Composição e fabricante

| | | | |
|--------------|---|-------------------|----------------|
| | H ₂ O,KOH, CH | | |
| Solução Des. | ₃ COOH,C ₂ H ₃ NaO ₂ , H ₃ PO ₄ pH 3,5 a 4 | Fórmula & Ação | Ciclagem pH |
| Solução Re. | H ₂ O,HCL,KOH,CaCl ₂ , (HOCH ₂) ₃ CNH ₂ pH 7 | Fórmula & Ação | Ciclagem pH |

Irradiação do laser

A irradiação das amostras foi realizada imediatamente após a mensuração de microdureza Knoop seguido da indução de cárie artificial, foi utilizado o laser ultra pulsado de CO₂. Ultralase 30 (South, inc Atl USA) com comprimento de onda de 10600nm.

Para o presente estudo piloto a irradiação foi realizada e três blocos em dias diferentes com um intervalo de uma semana entre as irradiações. Utilizou-se um termo higrômetro digital (Digital Series-China) para controlar a temperatura e umidade relativa do laboratório. As mensurações foram realizadas em todos os momentos da irradiação, inicialmente e após a irradiação. As amostras foram irradiadas em uma temperatura média 23,5° C e 54% de umidade.

Tabela 1 – Parâmetros dosimétricos utilizados no estudo

| | |
|--------------------|--------|
| Potência | 1W |
| Intervalo de pulso | 0,99s |
| Tempo de pulso | 0,005s |
| Energia de pulso | 5mJ |

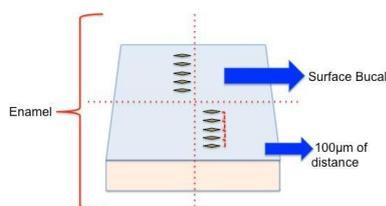
W- Watts, S- segundos, J-Joules

Foi utilizado laser ultra pulsado de CO₂ com comprimento de onda de 10600nm, com scanner manual, com laser coaxial de diodo como guia, com distância focal de

75mm, intervalo de pulso 0,99s, tempo de pulso 0,005s com formato quadrangular de forma a cobrir toda a superfície de esmalte em ambos os grupos com refrigeração a ar constante com energia de pulso 5mJ (Tabela 1). Após a irradiação as amostras foram mantidas em estufa biológica a 37°C, imersas em solução remineralizadora por 24 h.

Determinação da microdureza superficial

A microdureza superficial foi verificada com a ponta indentadora Knoop com 50g por 20 segundos, utilizando-se um microdurômetro (HMV Micro Hardness Tester; Shimadzu-Japão). As endentações foram realizadas a partir do centro do corpo de prova evitando as áreas próximas às laterais. Realizou-se 5 endentações com 100µm de distância entre si e utilizou-se as médias das endentações (Featherstone *et al.*, 1983). A mensuração de microdureza superficial foi realizada em 3 períodos, logo após os preparos das amostras com esmalte hígido, após indução de cárie, 24hs após a irradiação do Laser.



Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As análises foram realizadas em microscópio quanta 600 FEG, marca FEI, Quantax 400 (tecnologia SDD – Silicon Drift Detector) e software Sprit, marca Bruker. As amostras foram aderidas em fita dupla face de carbono, recobertas com carbono e fixadas em suporte próprio para MEV. Foi realizada a coleta de imagens de elétrons secundários das superfícies de esmalte nas etapas experimentais hígido, pós lesão de cárie, após tratamento, foram preparadas para a análise 3 amostras de cada etapa experimental. Foram selecionadas as imagens que representaram melhor os grupos após tratamento.

Análise estatística

Realizou-se a tabulação dos dados e para testar a normalidade dos dados foi utilizado o teste de Shapiro-Wilks. Uma vez que todos os dados apresentados tiveram

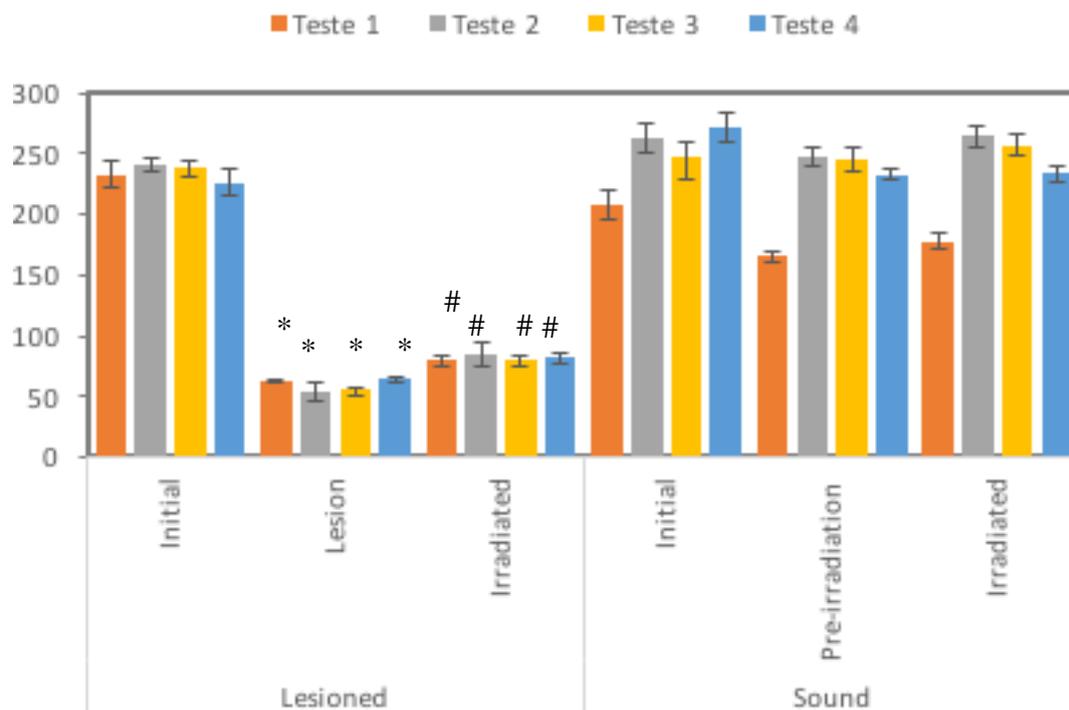
distribuição normal ($p > 0,05$), que será descrito em termos da sua média \pm erro padrão. Os grupos lesão de cárie e grupos de hígido foram comparados utilizando ANOVA de uma via. O nível de significância foi fixado em $\alpha = 0,05$.

Resultados

Microdureza Superficial

Os resultados são compostos das leituras de microdureza Knoop 24 horas após a irradiação de laser em amostras hígidas e com lesão de cárie artificial imersas em solução remineralizadora.

Figura 1 – A Figura 1 apresenta a média \pm e desvio padrão de 2 grupos: Grupo hígido e Grupo cariado. Esses grupos foram testados em 4 dias diferentes (Testes 1-4). Os dados foram analisados estatisticamente. ($p < 0,0001$)



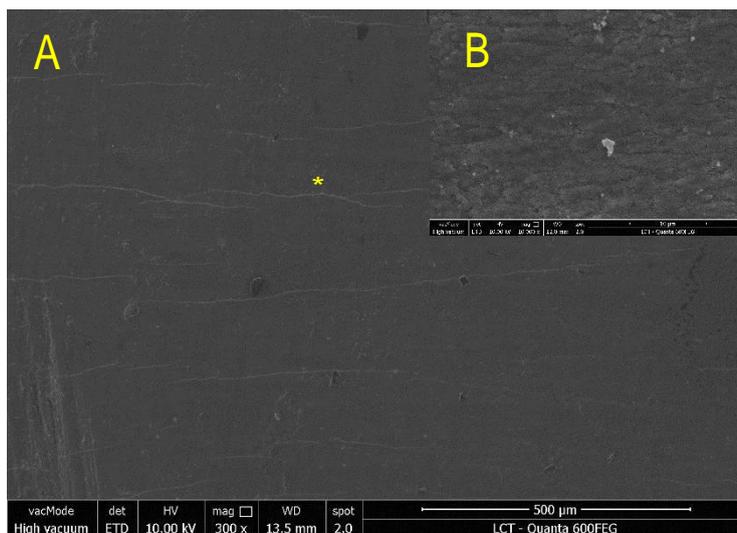
A Figura 1 mostra que a lesão de cárie diminuiu significativamente a dureza para todos os grupos ($*p < 0,0001$) para todas as comparações do Teste- t. A irradiação do grupo lesão aumentou significativamente a dureza para todos os testes, ($\#p = 0,0043, 0,0018, 0,0062$ e $0,0259$ para "Teste 1", "Teste 2", "3 Teste" e "Teste 4", respectivamente.), mas foi incapaz de devolver as amostras às suas condições

originais ($p = 0,0001$, $0,0001$, $<0,0001$ e $<0,0001$ para "teste 1", "teste 2", "teste 3" e "teste 4", respectivamente). No grupo hígido, a irradiação com laser não foi capaz de alterar a dureza ($p > 0,05$).

Análise de superfície

Logo após a mensuração final de dureza superficial as amostras foram preparadas e foram registradas as imagens de elétrons secundários da superfície das amostras. Foram escolhidas as amostras que melhor representassem os grupos experimentais. Na Fig.2 pode-se observar o esmalte dental bovino hígido no aumento de 300 e 10000 vezes da mesma região respectivamente. A topografia do esmalte se apresenta uniforme e com ausência de áreas erodidas, apenas trincas provenientes da técnica, no maior aumento pode-se observar o arranjo natural superficial.

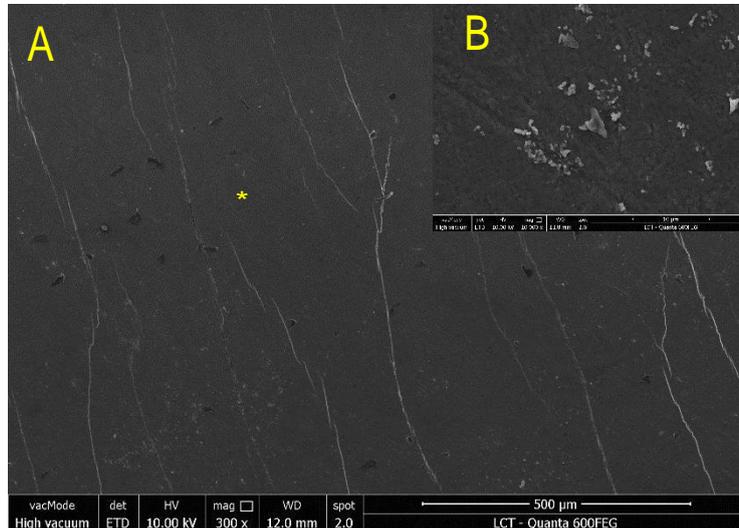
Fig.2 Eletromicrografia do bloco de esmalte dental bovino hígido.



(A) Eletromicrografia do bloco de esmalte hígido no aumento 300X (*) região ampliada (B) Eletromicrografia do bloco de esmalte hígido no aumento 10000X

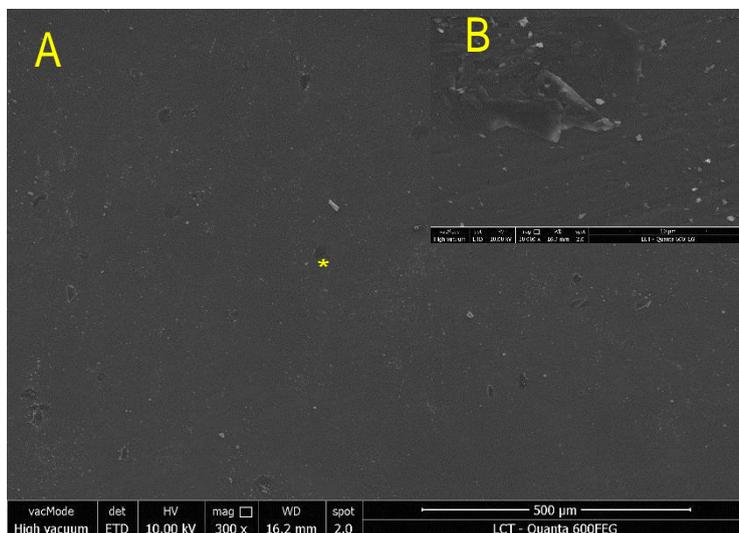
A Figura 3 consiste na eletromicrografia de esmalte hígido irradiado com laser de CO₂ na dose descrita acima no menor aumento não é possível observar alterações de superfície principalmente quando comparado a Fig 2. Contudo, no maior aumento pode-se notar uma discreta modificação superficial no qual não é possível observar as estruturas prismáticas e uma nova deposição sobre a superfície.

Fig.3 Eletromicrografia de do bloco de esmalte dental bovino hígido irradiado com laser CO₂ em 300x e 10000x. *no maior aumento nota-se uma discreta modificação de superfície e algumas precipitações na superfície.



(B) Eletromicrografia do bloco de esmalte hígido no aumento 300X (*) região ampliada (B)
Eletromicrografia do bloco de esmalte hígido no aumento 10000X

Fig.4 Eletromicrografia de do bloco de esmalte dental bovino após indução de cárie artificial em 300x e 10000x



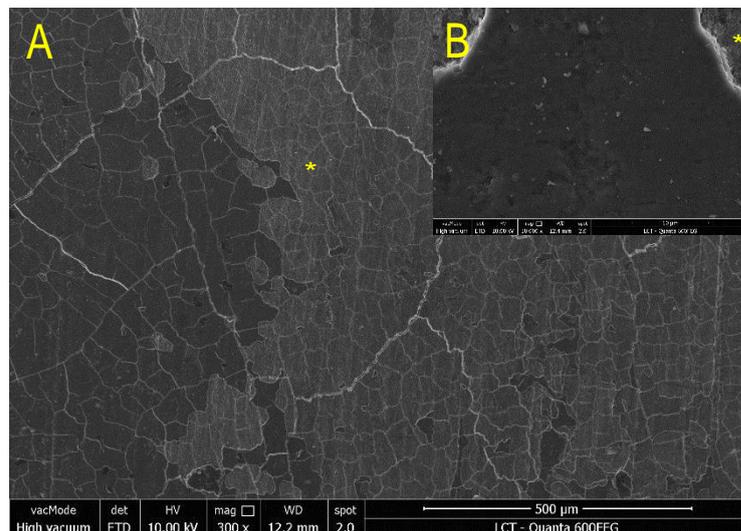
(C) Eletromicrografia do bloco de esmalte hígido no aumento 300X (*) região ampliada (B)
Eletromicrografia do bloco de esmalte hígido no aumento 10000X

A figura 4 mostra uma eletromicrografia de bloco de esmalte dental bovino após indução de cárie artificial em 300x é possível observar crateras decorrentes da perda de mineral ocasionada pela indução de cárie. Esses poros caracterizam a eficiência

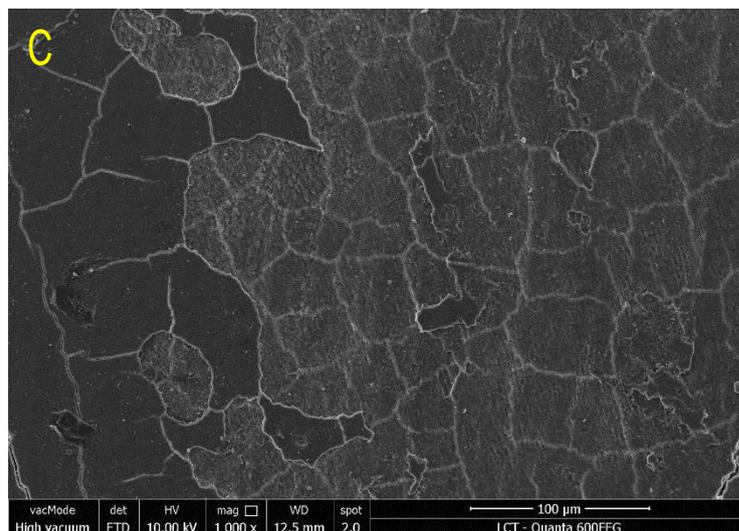
da criação de uma lesão de cárie incipiente *in vitro*. Após a irradiação com o laser nos espécimes com cárie artificial (Fig. 5 e 6) em ambos aumentos podemos observar uma notória mudança das características superficiais.

A presença do craquelado em toda superfície é evidente e pode-se observar na Fig.5 uma camada uniforme mais vítrea em alguns locais da amostra proveniente da irradiação do laser. Na Fig. 6 nota-se uma área de intersecção onde os prismas de esmalte aparecem ao fundo sem nenhuma camada sobreposta. As imagens sugerem uma drástica modificação de superfície proporcionada pela irradiação do laser.

Fig.5 Eletromicrografia de do bloco de esmalte dental bovino após indução de cárie artificial com irradiação com laser de CO₂.



(D) Eletromicrografia do bloco de esmalte hígido no aumento 300X (*) Camada sobreposta a superfície do esmalte desmineralizado e craquelado da superfície do esmalte (B) Eletromicrografia do bloco de esmalte hígido no aumento 10000X



- (E) Eletromicrografia do bloco de esmalte hígido no aumento 300X (*) região ampliada (B)
Eletromicrografia do bloco de esmalte hígido no aumento 10000X

Discussão

O papel do laser de dióxido de carbono na prevenção da cárie tem sido explorado por muitos investigadores, que usaram diferentes comprimentos de onda do laser de CO₂ tendo por objetivo o aumento da resistência à cárie por promover redução na taxa de desmineralização da superfície de esmalte (Rodrigues *et al.*, 2004). Diversos autores demonstraram em seus experimentos, que o esmalte dental irradiado com laser de CO₂ pode apresentar maior resistência ao ácido, principalmente, os ácidos de origem no biofilme que são depositados lentamente na superfície dental (Esteves–Oliveira *et al.*, 2009. da Silva Tagliaferro *et al.*, 2009). Algumas teorias têm sido propostas tentando explicar os resultados positivos obtidos através da utilização da irradiação do laser de CO₂ no esmalte. Sugere-se que alterações químicas aconteçam na superfície. Alguns autores (Zuerlein *et al.* 1999) descreveram que a superfície do esmalte irradiada a 10600 nm perde 100% a 66% do teor de carbonato após cinco impulsos e um pulso, respectivamente (Zuerlein *et al.* 1999). Além da diminuição do conteúdo de carbonato, os estudos também demonstram uma perda considerável na porção de água (Fowler *et al.*, 1986. Corrêa-Afonso *et al.*, 2012). Contudo, poucos estudos propõe o uso de laser de CO₂ para tratamento de lesão incipiente, pela heterogeneidade do tecido e fragilidade. O tecido cariado se apresenta mais poroso e com características de absorção de energia diferente e que uma dose inadequada de energia pode desfavorecer o processo terapêutico (Poosti *et al.*, 2014).

A hipótese mais provável para efeitos do laser na inibição de cárie é a fusão de cristais de hidroxiapatita, que podem ser observados no presente estudo Figura 5 e 6. A eletromicrografia mostra uma superfície vítrea criada pela irradiação do laser e pela eliminação de carbonato e água, também foi observado por diversos autores (Zuerlein *et al.* 1999, Fowler *et al.*, 1986 Corrêa-Afonso *et al.*, 2012. Poosti *et al.*, 2014).

Os comprimentos de onda característicos do laser em questão, associado à frequência e pulso, pode ser apresentado como um problema de dose, principalmente sobre a lesão incipiente. O aumento de dureza no presente estudo deve-se a eficiência da dose proposta, pois o uso de um laser ultrapulsado pode apresentar algumas

características benéficas no tecido semelhante ao laser contínuo, promove o derretimento dos prismas de esmalte e a eliminação das impurezas. A aplicação com o laser com intervalo de pulso de 0,99s e tempo de pulso de 0,005s proporcionou resultados promissores, pois foi capaz de entregar uma dose de energia adequada para modificar a superfície e com um espaçamento que foi capaz de resfriar o esmalte sem prejuízos ou erosões.

Zancopé *et al.*, 2016 sugeriu que o fenômeno de fusão pode estar relacionado com a inibição da desmineralização e o aumento da dureza encontrados nos grupos irradiados. Estas descobertas estão em concordância com os nossos resultados iniciais, em que a energia de pulso foi semelhante à usada no presente estudo.

Nossos resultados sugerem que a superfície do esmalte foi selada por irradiação com laser ultrapulsado e simultaneamente uma formação de “CaF₂-like material” na superfície do esmalte (Fig. 5 e 6) diferente do que pode ser observado na Fig.4 no qual o esmalte hígido apresenta uma discreta modificação. Acredita-se que o tecido cariado quando exposto a dose proposta neste trabalho foi capaz de absorver maior quantidade de energia. Os resultados demonstraram que a irradiação com laser ultrapulsado de CO₂ pode ser utilizada com êxito para a inibição da cárie dentária esmalte. No entanto, nesse estudo foi utilizado um laser ultrapulsado de CO₂ com comprimento de onda de 10600nm, o que limita a comparabilidade com outros estudos. Há falta de evidência clínica sobre comprimentos de onda do laser clinicamente adequadas e dose.

Em relação a microdureza no presente estudo houve aumento no grupo irradiado com lesão de cárie, quando comparado com o hígido irradiado, o que indica que o efeito de dureza superficial da irradiação com laser ultrapulsado apresenta maior interação com tecido desmineralizado. Acredita-se que o aumento da microdureza 24 h após a irradiação com laser pode estar relacionada com as alterações ultra-estruturais também observadas no presente estudo. Incluindo crescimento tamanho do cristal (Fig. 5 e 6), a cristalização do esmalte poroso e a fusão da hidroxiapatita como resultado da elevação de temperatura na superfície sem danos adicionais como observado por Esteves-Oliveira *et al.*, 2011.

Comercialmente, lasers de CO₂ disponíveis possuem um comprimento de onda de 10600nm. No entanto no comprimento usado a absorção foi maior, e com a forma de aplicação resultou em uma deposição eficaz de energia na camada de esmalte

exterior, com menor risco de danos polpa mesmo considerando uma profundidade de absorção no esmalte 11 μ m (Fried *et al.*, 2001), o que resultou em uma camada mais espessa principalmente em uma lesão de mancha branca. Embora a emissão a 10600 nm tenha sido utilizada neste estudo, a irradiação foi realizada com ultra pulso com um espaçamento considerável (Tab.1) afim de minimizar a deposição de energia acumulada, o que determinou o aumento da temperatura da polpa, contudo sem alcança-la. (Jordão *et al.*, 2016). Não obstante, a comparação entre os estudos não pode ser feita de forma apropriada uma vez que diferentes parâmetros de laser / e também foram utilizados diferentes em diferentes modelos experimentais, principalmente, quando se trata de tratamento de lesão de mancha branca, são muito escassos o número de estudos com laser.

É importante ressaltar que laser ultrapulsado de CO₂ não é comercialmente projetado para aplicações em odontologia. Mais melhorias no “design” e acessórios se fazem necessários para torná-lo mais confortável para aplicações em dentes. São necessários novos estudos sobre os potenciais benefícios do laser ultra pulsado de CO₂ em outras áreas da odontologia e seus efeitos sobre a elevação da temperatura nos tecidos subjacentes e morfologia da superfície do som e esmalte desmineralizado.

Conclusão

Foram observados resultados promissores com os parâmetros dosimétricos que foram propostos pelo estudo. A microdureza do esmalte dental bovino melhorou após irradiação com laser ultrapulsado de CO₂, contudo não foi capaz de devolver a microdureza de um esmalte hígido.

Referência

1. Cummins D. Dental caries: a disease which remains a public health concern in the 21st century. The exploration of a breakthrough technology for caries prevention. *Journal of Clinical Dentistry* 2013;24(Spec Iss A):A1–14.
2. Dye BA, Arevalo O, Vargas CM (2010). Trends in paediatric dental caries by poverty status in the United States, 1988-1994 and 1999-2004. *Int J Paediatr Dent* 20(2):132-143.
3. Featherstone JD. The caries balance: contributing factors and early detection. *Journal of the Californian Dental Association* 2003;31:129–33.
4. Featherstone JD. Caries prevention and reversal based on the caries balance.

- Pediatric Dentistry 2006;28:128–32
5. Arends J, Christoffersen J. The nature of early caries lesions in enamel. *Journal of Dental Research* 1986;65:2–11.
 6. Cury JA, Tenuta LM. Enamel remineralization: controlling the caries disease or treating early caries lesions? *Braz Oral Res* 2009;23(Suppl 1):23–30.
 7. Patel CKN, McFarlane RA, Faust WL. Selective excitation through vibrational energy transfer and optical maser action in N₂–CO₂. *Phys Rev Lett* 1964;13:617–9.
 8. Goldman L, Hornby P, Meyer R, Goldman B. Impact of the laser on dental caries. *Nature*. 1964; 203: 417.
 9. Blankenau RJ, Powell G, Ellis RW, Westerman GH. In vivo caries-like lesion prevention with argon laser: pilot study. *J. Clin. Laser Med. Surg.* 1999; 17: 241-3.
 10. Dibdin GH. The water in human dental enamel and its diffusional exchange measured by clearance of tritiated water from enamel slabs of varying thickness. *Caries Res* 1993; 27(2):81-6.
 11. Fried D, Zuerlein M, Featherstone JDB, Seka W, McCormack SM. IR laser ablation of dental enamel: mechanistic dependence on the primary absorber. *Appl.Surf. Sci.* 1997: 127–129: 852-56.
 12. Rechmann P, Fried D, Le CQ, Nelson G, Rapozo-Hilo M, Rechmann BM, Featherstone JD. Caries inhibition in vital teeth using 9.6- μ m CO₂-laser irradiation. *J Biomed Opt.* 2011 Jul;16(7):071405.
 13. Wang Y, Mei L, Gong L, Li J, He S, Ji Y, Sun W. Remineralization of early enamel caries lesions using different bioactive elements containing toothpastes: An in vitro study. *Technol Health Care.* 2016 May 20
 14. JD B Featherstone, NA Barrett-Vespone, D Fried, Z Kan-torowitz, and W Seka, "CO₂ laser inhibition of artificial caries-like lesion progression in dental enamel," *Journal of Dental Research*, vol. 77, no. 6, pp. 1397–1403, 1998.
 15. ALL Klein, L K A. Rodrigues, C P Eduardo, M N Dos Santos, and J A Cury, "Caries inhibition around composite restorations by pulsed carbon dioxide laser application," *Euro- pean Journal of Oral Sciences*, vol. 113, no. 3, pp. 239–244, 2005.
 16. Fried D, Zuerlein M, Featherstone JDB, Seka W, McCormack SM. IR laser ablation of dental enamel: mechanistic dependence on the primary absorber. *Appl.Surf. Sci.* 1997: 127–129: 852-56.

17. Poosti M, Ahrari F, Moosavi H, Najjaran H. The effect of fractional CO₂ laser irradiation on remineralization of enamel white spot lesions. *Lasers Med Sci.* 2014 Jul;29(4):1349-55.
18. Esteves-Oliveira M, El-Sayed KF, Dörfer C, Schwendicke F. Impact of combined CO₂ laser irradiation and fluoride on enamel and dentin biofilm-induced mineral loss. *Clin Oral Investig.* 2016 Jun 23
19. Rodrigues LK, Nobre Dos Santos M, Pereira D, Assaf AV, Pardi V. Carbondioxide laser in dental caries prevention. *J Dent* 2004;32(7):531–40
20. Esteves-Oliveira M, Zezell DM, Meister J, Franzen R, Stanzel S, Lampert F, et al. CO₂ laser (10.6 microm) parameters for caries prevention in dental enamel. *Caries Res* 2009;43(4):261–8.
21. da Silva Tagliaferro EP, Rodrigues LK, Soares LE, Martin AA, Nobredos-Santos M. Physical and compositional changes on demineralized primary enamel induced by CO₂ laser. *Photomed Laser Surg* 2009;27(4):585–90.
22. 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.
23. Fowler BO, Kuroda S. Changes in heated and in lased irradiated human tooth enamel and their probable effects on solubility. *Calcif Tissue Int* 1986;38(4):97–208.
24. Corrêa-Afonso AM, Bachmann L, Almeida CG, Corona SA, Borsatto MC. FTIR and SEM analysis of CO₂ laser irradiated human enamel. *Arch Oral Biol.* 2012 Sep;57(9):1153-8.
25. Poosti M, Ahrari F, Moosavi H, Najjaran H. The effect of fractional CO₂ laser irradiation on remineralization of enamel white spot lesions. *Lasers Med Sci.* 2014 Jul;29(4):1349-55.
26. Zancopé BR, Rodrigues LP, Parisotto TM, Steiner-Oliveira C, Rodrigues LK, Nobre-dos-Santos M. CO₂ laser irradiation enhances CaF₂ formation and inhibits lesion progression on demineralized dental enamel-in vitro study. *Lasers Med Sci.* 2016 Apr;31(3):539-47.
27. Esteves-Oliveira M, Pasaporti C, Heussen N, Eduardo CP, Lampert F, Apel C (2011) Rehardening of acid-softened enamel and prevention of enamel softening through CO₂ laser irradiation. *J Dent* 39(6):414–421.
28. Fried D, Ragadio J, Akrivou M, Featherstone JD, Murray MW, sealed transverse excited atmospheric-pressure lasers operating at $\lambda=9.6$ and 10.6 microm. *J Biomed Opt.* 2001;6:231-8.

29. Jordão MC, Forti GM, Navarro RS, Freitas PM, Honório HM, Rios D. CO₂ laser and/or fluoride enamel treatment against in situ/ex vivo erosive challenge. *J Appl Oral Sci.* 2016 May-Jun;24(3):223-8.

Artigo II: MICRODUREZA DE LESÃO DE CÁRIE ARTIFICIAL APÓS TRATAMENTO COM LASER ULTRAPULSADO DE DIOXIDO DE CARBONO E DIVERSOS TIPOS DE FLUORETOS EM RELAÇÃO AO TEMPO

Marcia Regina Cabral Oliveira¹ cabral-oliveira@uol.com.br

Pedro Henrique Cabral Oliveira² cabral-oliveira@live.com

Luiz Henrique Cabral Oliveira³ luizhenrique.c.o@icloud.com

Ravana Angelini Sfalcin⁵ ravana-sfalcin@yahoo.com.br

Paulo Francisco César⁶ paulofc@usp.br

Alessandro de Melo Deana amdeana@uni9.pro.br

Maria Cristina Chavantes⁸ mcchavantes@uol.com.br

Sandra Kalil Bussadori^{8,9} PhD sandra.skb@gmail.com

Anna Carolina Ratto Tempestini Horliana, PhD⁷ annacrth@gmail.com

- (1) Master degree student, Postgraduate program in Biophotonics Applied to Health Sciences, Universidade Nove de Julho, UNINOVE, São Paulo, Brazil
- (2) PhD student, Dental Research and Graduate Studies Division, Department of Restorative Dentistry, Guarulhos University, Guarulhos, SP, Brazil
- (3) Undergraduate research, Postgraduate program in Biophotonics Applied to Health Sciences, Universidade Nove de Julho, UNINOVE, São Paulo, Brazil
- (4) Undergraduate research, Postgraduate program in Biophotonics Applied to Health Sciences, Universidade Nove de Julho, UNINOVE, São Paulo, Brazil
- (5) PhD student, Postgraduate program in Biophotonics Applied to Health Sciences, Universidade Nove de Julho, UNINOVE, São Paulo, Brazil
- (6) Associate Professor, Department of Biomaterials and Oral Biology, University of São Paulo, São Paulo, Brazil
- (7) Professor of Graduate Program in Medicine and Biophotonics, Universidade Nove de Julho, UNINOVE, São Paulo, Brazil

(8) Professor, Postgraduate program in Biophotonics Applied to Health Sciences,
Universidade Nove de Julho, UNINOVE, São Paulo, Brazil

(9) Professor, Postgraduate program in Rehabilitation Sciences, Universidade Nove de
Julho, UNINOVE, São Paulo, Brazil

CORRESPONDING AUTHOR:

Anna Carolina Ratto Tempestini Horliana annacrth@gmail.com

Postgraduate program in Biophotonics Applied to Health Sciences, Universidade Nove de
Julho/UNINOVE R. Vergueiro, 235/249, CEP 01504-001- São Paulo, Brazil Phone: +55 (11)
3385-922

INTRODUÇÃO

A cárie dentária continua sendo um problema significativo de Saúde Pública, as lesões não tratadas na dentição permanente apresentam-se como, a doença oral crônica mais prevalente observado no estudo Global Burden of Disease, em 2010 (Marceses *et al.*, 2013 American Academy of Pediatrics. 2008). Cerca de 35% da população mundial, ou 2,4 bilhões de pessoas, são afetadas, haja visto que a mesma apresenta uma influência significativa na qualidade de vida, bem como as implicações para a saúde sistêmica (Petersen *et al.*, 2008, Richards *et al.*, 2015). Atualmente, o controle da doença cárie consiste no controle do biofilme e no equilíbrio das reações desmineralização e remineralização, considerando fatores individuais para impedir recorrência e nova incidência (Cury *et al.*, 2009). A abordagem não-cirúrgica para o tratamento de lesões incipientes de maior eleição é a aplicação de flúor tópico a partir de várias fontes. Uma vez que os fluoretos estabilizam o mineral apatita, resulta na remineralização do esmalte, tornando-se significativamente mais resistentes à desmineralização (Marinho *et al.*, 2004, Tenuta *et al.*, 2009). Contudo, para o sucesso do tratamento não operatório das lesões incipientes as mesmas devem ser detectadas no início, o consumo de carboidrato monitorado e o uso adequado dos fluoretos deve ser realizado. Entretanto, é importante que o clínico geral conheça a eficácia das modalidades de fluoretos, e suas características em relação ao tempo (Fejerskov *et al.*, 2015). Vários estudos demonstraram a eficiência do uso de fluoretos na prevenção e controle de cárie incipiente, mas ainda são escassos os dados na literatura sobre a melhor forma de apresentação de fluoretos para terapia de lesão incipiente após tratamento, (ten Cate *et al.*, 1990; Marinho *et al.*, 2004; Cury *et al.*, 2009; Benson *et*

al., 2013; Featherstone *et al.*, 1986). É relevante conhecer como se apresenta a estrutura mineral após a realização do tratamento não operatório. Contudo, pesquisadores tem investigado para otimizar e tornar o tratamento de lesões de cárie incipiente mais eficaz, minimamente invasiva, utilizando tecnologias e recursos diversos.

Há mais de três décadas Petel *et al.*, 1964 iniciaram os primeiros estudos utilizando o dióxido de carbono, Nitrogênio e Hélio para a produção de laser. (Patel *et al.*, 1964). Tal evento se fez importante para toda comunidade médico científica incluindo a odontologia, paralelamente ao desenvolvimento dos lasers de alta potência, iniciou os primeiros estudos em Odontologia (Goldman *et al.*, 1964), nos quais foi notada a capacidade da luz laser de modificar os tecidos dentais duros tornando-os mais ácido-resistentes. (Blankenau *et al.*, 1999). Os lasers podem ter afinidade pelo esmalte dental e dentina de forma específica de acordo com o comprimento de onda específico que emitem (LeGeros 2001, Dibin, 1993; Fried *et al.*, 1997, Rechmann. *et al.*, 2011). Os lasers de CO₂ apresentam se como uns dos mais indicados para o esmalte dentário, porque produzem radiação na região do infravermelho (9.300, 9.600, 10.300, e 10.600 nm) proporcionando modificações positivas no esmalte (Featherstone *et al.*, 1998; Klein *et al.*, 2005). Estes evidenciam um coeficiente de absorção maior no esmalte do que a apresentam os lasers de érbio ($\mu\alpha = 480$ e 800 cm^{-1} , respectivamente para 2,79 e 2,94 μm), o que torna a interação mais eficiente do ponto de vista energético, sendo que as modificações superficiais são benéficas para aumentar a ácido resistência do esmalte quando irradiado corretamente. Fried *et al.*, em 1998, observaram que o laser de CO₂ com comprimento de onda a partir de 9,3 μm utilizado com refrigeração, reduz a dissolução do esmalte dental, em contrapartida o seu uso sem a refrigeração pode causar exposição excessiva ao calor pode favorecer a desmineralização, ocasionando carbonização, cristais modificados são produzidos e conseqüentemente mais susceptíveis a dissolução e fratura.

Recentemente, um estudo realizado por Poosti *et al.*, 2014 observou a aplicação de um laser fracionado de CO₂, antes ou após o uso de fluoretos, em ambos os momentos o uso do laser foi mais eficaz em remineralizar o esmalte cariado após um período de 90 dias em comparação com os grupos controle. E a irradiação do laser

antes do tratamento de fluoreto causou um aumento significativo na microdureza superficial e sub superficial do esmalte dental (Poosti *et al.*,2014)

Zancopé *et al.*,2016 avaliaram o uso do laser de CO₂ ($\lambda=10.600$ nm) com à seguinte dose (11.3 ou 20 J/cm², 0.4 ou 0.7W), associado ao gel de flúor fosfato acidulado na absorção de CaF₂, antes ou após a aplicação do laser, e concluíram que independente da ordem de aplicação do gel a captação de CaF₂ aconteceu de forma mais evidente.

Entretanto, se faz necessário testar e aprimorar uma dose de irradiação para ser usada sobre uma lesão de mancha branca quando, associados aos diversos tipos de fluoretos, e se estes efeitos benéficos são unicamente devido ao uso do laser no esmalte dental hígido por promover mudanças induzidas nas propriedades físico-químicas do esmalte sobre a sua solubilidade ou também suas características de superfície e se isso ocorre em uma lesão de cárie incipiente (Esteves-Oliveira *et al.*,2016), haja visto que as características físicas e químicas são distintas do ponto de vista micro morfológico e mineral de um esmalte dental hígido e cariado (Wang *et al.*,2016).

OBJETIVO

Avaliar os valores de microdurezas Knoop em esmalte dental bovino com lesões de cárie incipiente associado ao uso de laser ultra pulsado de CO₂ e 4 apresentações comerciais de fluoretos em 9 tempos (baseline, após indução de cárie, imediatamente após a irradiação, 7, 14, 21, 28 e uma semana pós termino do tratamento).

MATERIAL E MÉTODOS

Delineamento Experimental

Os fatores em estudo foram o “tempo” em 9 níveis: baseline, lesão de cárie, pré irradiação, imediatamente após a irradiação com laser de CO₂, 7, 14, 21,28 e 7 dias após o termino tratamento com fluoreto e associação com 5 diferentes formulações de flúor (Tabela 1): G1- controle - lesão de cárie imersa em solução remineralizadora (para avaliar o efeito do laser sem a ação de fluoretos), G2- Gel de flúor neutro a 2% (Sultan Topex DFL-Jacarepaguá, Brasil), G3- Gel Flúor fosfato

acidulado a 1,23% (DFL Sultan Topex-Jacarepaguá, Brasil), G4- Mousse de flúor acidulado a 1,23% (Flúor care FGM- Joinville, Brasil) G5- Verniz de flúor a 5,0% Duraphat Colgate-Pharbil Waltrop, German), G6- controle (hígido) - imerso em solução remineralizadora assim podemos avaliar a eficácia da solução e G7 - imerso em água para podermos isolar o efeito da irradiação do laser de CO₂, sem que haja efeito da solução remineralizadora no esmalte dental (vide Fluxograma Anexo I). As unidades experimentais foram compostas de 70 fragmentos de esmalte dental bovino divididos em 7 grupos (n=10). O experimento foi realizado em blocos para minimizar o risco de viés cada bloco foi composto por uma amostra de cada grupo experimental. Este estudo foi realizado por apenas um operador calibrado para o ensaio de microdureza.

Tabela 1- Delineamento experimental

| Grupos* | Tratamento | Armazenamento | Avaliação da Microdureza |
|----------------|-------------------|----------------------|--|
| G1 | Cárie | | |
| G2 | Flúor Neutro | | |
| G3 | Flúor Acidulado | Saliva | Baseline, após lesão de cárie, após irradiação |
| G4 | Mousse | | 7, 14, 21,28 dias e 7 dias |
| G5 | Verniz | | após o término do tratamento |
| G6 | Hígido | | |
| G7 | Hígido | Água | |

*Todos os grupos receberão irradiação de laser

Calibração

A calibração foi realizada através da mensuração de 30 endentações com intervalo de uma semana, utilizando os mesmos critérios do estudo em 6 blocos de esmalte dental bovino cariado e 6 blocos hígidos não pertencentes ao estudo. A reprodutibilidade foi calculada utilizando teste Kappa, não sendo encontrada diferença estatística entre os dois exames. O tratamento das amostras foi realizado por apenas um operador cego para os ensaios de dureza e caracterização de superfície.

Tabela 2- Tabela com nome comercial, composição, concentração fabricante e tempo de aplicação dos materiais utilizados.

| Nome Comercial | Composição | Concentração | Fabricante | Tempo de Aplicação |
|----------------|--|--------------|-------------------|--------------------|
| Flúor Gel® | Fluoreto de sódio acidulado | 1,23% | Sultan Topex, DFL | 1 min. |
| Flugel® | NaF | 2% | Sultan Topex, DFL | 1 min. |
| Fluor Care® | Fluoreto de sódio acidulado | 1,23% | FGM | 1 min. |
| Duraphat® | NaF | 5% | Colgate | 1 min |
| Solução Des. | H ₂ O, KOH, CH ₃ COOH, C ₂ H ₃ NaO ₂ , H ₃ PO ₄ pH 3,5 a 4 | 100% | Fórmula & Ação | Ciclagem pH |
| Solução Re. | H ₂ O, HCL, KOH, CaCl ₂ , (HOCH ₂) ₃ CNH ₂ pH 7 | 100% | Fórmula & Ação | Ciclagem pH |

Preparo dos Espécimes

A lei brasileira 11/797/08 (que regula os procedimentos com animais), publicado em 08 de outubro de 2008, parágrafo §3º, do artigo 3º define experiências com animais como: "procedimentos realizados em animais vivos". Portanto, uma vez que todas as amostras foram obtidas *post mortem* de peças descartáveis de animais cultivadas para fins de abate comerciais no frigorífico este trabalho não exige a aprovação do comitê de ética animal.

Foi utilizado 70 dentes bovinos recém-extraídos, mantidos em solução de timol 0,1% a 4°C. Os dentes foram limpos, e distribuídos aleatoriamente em 7 grupos (tabela 1). Todos os dentes tiveram a superfície vestibular sequencialmente abrasionadas com lixas d'água de carbeto de silício. Estas apresentaram granulações 400, 600 e 1200 (Buehler), polidos com disco de feltro e pastas diamantadas nas granulações 3µm, 2 µm, 1 µm e 0,5 µm (FOX Foco Tools - São Caetano do Sul, São Paulo Brasil), deixando-as preparadas para o ensaio de microdureza. Blocos de esmalte com 7x4x4mm foram seccionados da superfície vestibular preparada com discos de diamante dupla face (7020; KG Sorensen, Barueri, SP, Brasil) em baixa rotação sob refrigeração (Kavo, Joinville, SC, Brasil). Os blocos de esmalte dental bovino terão as laterais isoladas com esmalte de unha (COLORAMA- L'Oréal-São Paulo, Brasil), deixando exposto somente a superfície de esmalte planificada (Vieira *et al.*, 2005).

Formação da Lesão de Cárie Artificial e Ciclagem de pH

Os espécimes foram mantidos em estufa biológica a 37°C, sendo que sofrerão ciclagem de pH por 30 dias, para a indução de cárie artificial, 18 horas na solução desmineralizadora e 6 horas em solução remineralizadora Featherstone *et al.*, 1986, Featherstone *et al.*, 1983). A ciclagem de pH foi realizada após a indução de cárie artificial, durante e após tratamento com flúor. Os corpos de prova serão imersos em 5ml de solução desmineralizadora por 6hs intercalados por lavagem em abundância com água destilada e imersos novamente na solução remineralizadora por 18 horas a 37° C sobre mesa agitadora (MacLab-Jacareí, SP), para simular o que acontece clinicamente em um paciente de alto risco de cárie (Featherstone *et al.*, 1986, Featherstone *et al.*, 1983).

Irradiação do Laser

Este estudo foi realizado em blocos (uma amostra de cada grupo) em dias diferentes com um intervalo de uma semana entre as irradiações. Nos grupos experimentais foram utilizados o laser ultrapulsado de CO₂ com comprimento de onda de 10.600nm, intervalo de pulso de 0,99s, tempo de pulso de 0,005s e frequência de 1Hz A distância focal do laser coaxial, guia de diodo será de 75mm, com scanner manual de design quadrangular que cobriu toda a superfície de esmalte em ambos os grupos com refrigeração a ar constante.

Tratamento com Flúor

Os grupos experimentais G2, G3, G4 e G5 foram submetidos às aplicações tópicas semanalmente de acordo com as recomendações do fabricante (Tabela 1), por um período total de 28 dias após a indução de cárie artificial e o grupo controle foram mantidos sem tratamento, porém com ciclagem de pH. Os excessos dos fluoretos foram removidos imediatamente com um papel absorvente e os espécimes foram recolocados na solução remineralizadora sobre agitador (MacLab-Jacarei, SP).

Determinação da Microdureza Superficial

A microdureza superficial foi verificada com a ponta indentadora Knoop com 50g por 20 segundos, utilizando-se um microdurômetro (HMV Micro Hardness Tester; Shimadzu-Japão). Os espécimes foram divididos em quadrantes, será utilizado um quadrante em cada tempo, as endentações foram realizadas a partir do centro do quadrante evitando as áreas próximas às laterais, a quinta leitura será realizada 500 µm de distância das primeiras endentações do quadrante 1 para garantir que não seja mensurada a mesma área. Realizou-se 5 endentações com 100µm de distância entre si, utilizadas as médias das endentações (Featherstone *et al.*, 1983). A mensuração de microdureza superficial foi realizada em 5 períodos, logo após os preparos das amostras com esmalte hígido, após indução de cárie, imediatamente pós a irradiação do laser 7, 14, 21, 28 e 7 dias após o termino do tratamento com flúor.

Análise Estatística

Foram realizadas equações de estimação generalizadas (EEG) com distribuição marginal normal e função de ligação identidade, supondo matriz de correlações entre os momentos as análises foram comparados entre os grupos com uso de análise de variâncias Two-way (ANOVA) e Tukey.conforme resultado da Two-way (ANOVA).

Resultados

Os valores de microdureza superficial apresentaram comportamento médio estatisticamente diferente dos grupos ao longo dos momentos avaliados ($p < 0,001$), conforme pode ser observado nos grupos: G1 apresentou um constante aumento na dureza em relação ao tempo, mesmo sem tratamento com fluoretos.

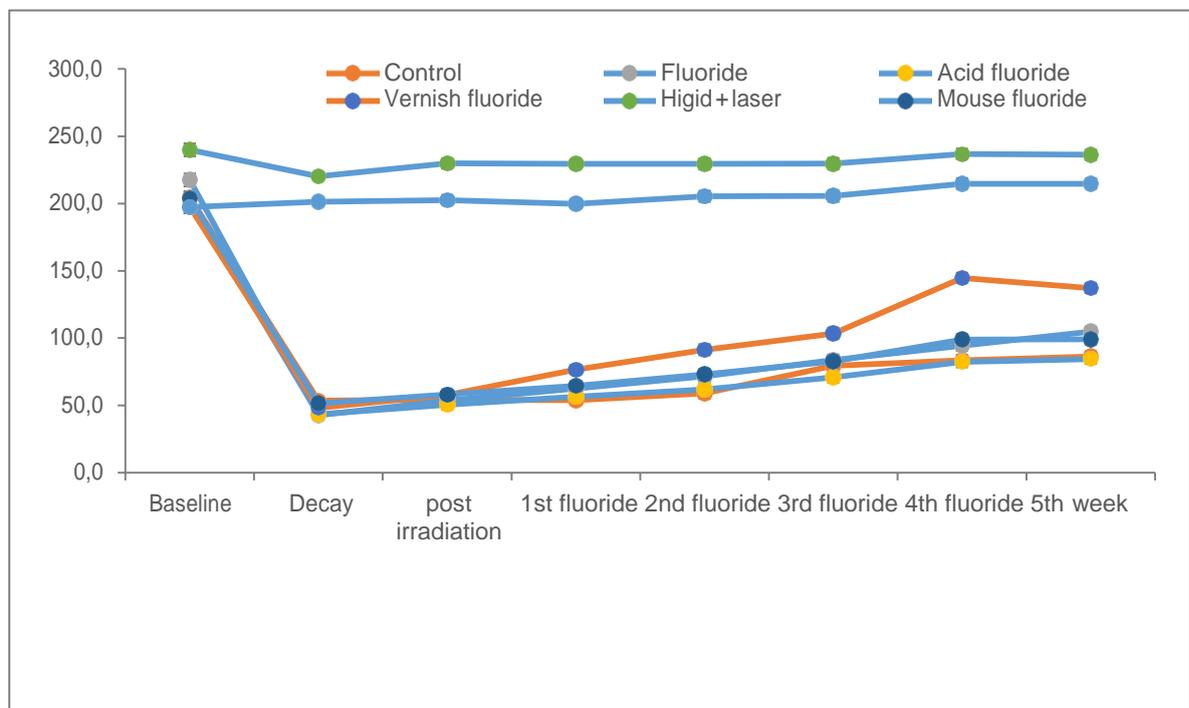
Tabela 4- Tabela apresenta média e erro padrão de todos os grupos em relação ao tempo

| Momento | G1 | | G2 | | G3 | | G4 | | G5 | | G6 | | G7 | | P Grupo | Pmomento | P Interação |
|-------------------|-------|------|-------|------|-------|------|-------|------|-------|------|-------|------|-------|------|---------|----------|-------------|
| Hígido | 217,5 | ±8,3 | 203,2 | ±7,8 | 204,0 | ±6,2 | 197,5 | ±9,2 | 197,4 | ±3,7 | 239,8 | ±8,9 | 239,8 | ±5,3 | < 0.05 | < 0.0001 | < 0.0001 |
| Lesão de cárie | 42,7 | ±3,3 | 43,3 | ±2,6 | 51,5 | ±2,4 | 48,1 | ±1,6 | 201,4 | ±3,2 | 220,2 | ±5,5 | 220,2 | ±7,0 | | | |
| Após irradiação | 53,5 | ±7,4 | 50,6 | ±2,8 | 58,1 | ±5,3 | 57,9 | ±3,2 | 202,6 | ±3,6 | 229,7 | ±7,4 | 229,7 | ±5,1 | | | |
| 1ªSemana de Fluor | 62,6 | ±9,6 | 56,5 | ±4,1 | 64,4 | ±5,8 | 76,7 | ±6,1 | 199,8 | ±1,9 | 229,3 | ±5,0 | 229,3 | ±5,3 | | | |
| 2ªSemana de Fluor | 71,7 | ±8,2 | 62,0 | ±7,1 | 73,0 | ±6,8 | 91,3 | ±8,0 | 205,4 | ±3,0 | 229,3 | ±4,4 | 229,3 | ±7,5 | | | |
| 3ªSemana de Fluor | 83,7 | ±8,3 | 71,0 | ±7,1 | 82,9 | ±6,6 | 103,4 | ±7,6 | 205,5 | ±4,2 | 229,6 | ±5,7 | 229,6 | ±8,1 | | | |
| 4ªSemana de Fluor | 94,3 | ±7,8 | 82,2 | ±6,4 | 99,0 | ±5,1 | 144,7 | ±6,1 | 214,7 | ±5,0 | 236,8 | ±6,1 | 236,8 | ±5,2 | | | |
| 5ªSemana de Fluor | 104,8 | ±8,3 | 84,5 | ±7,0 | 99,0 | ±4,8 | 137,0 | ±9,0 | 214,7 | ±5,0 | 236,1 | ±6,2 | 236,1 | ±9,0 | | | |

Os grupos G6 e G7 mantiveram-se constantes durante todo o ensaio, contudo o G5 revelam valores elevados de microdureza superficial, podendo ser comparado com os grupos controle G6 e G7.

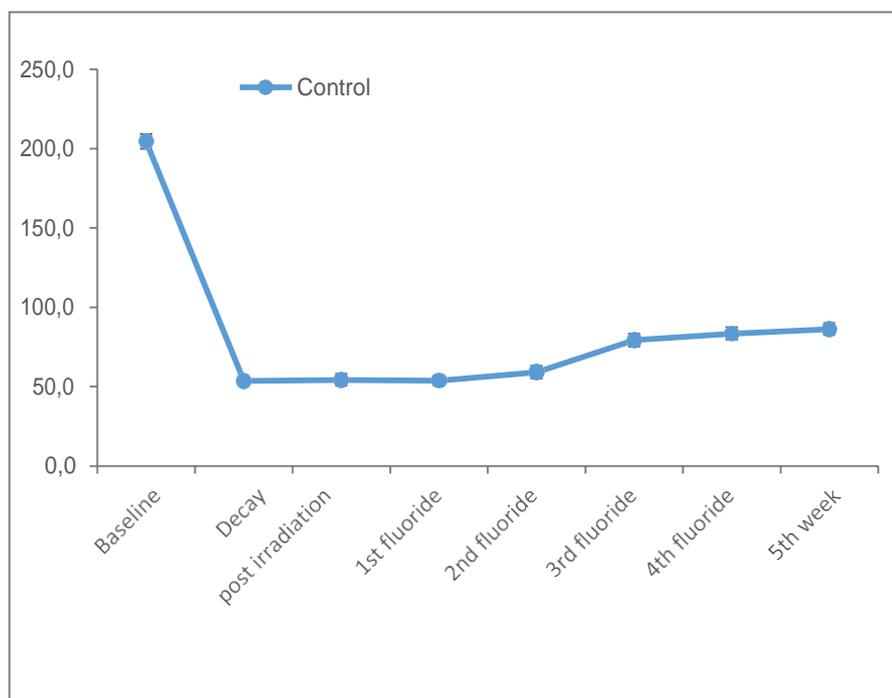
Pode-se observar um discreto aumento nos resultados com uma tendência positiva nos valores 24 horas após irradiação em todos os grupos que sofreram indução de cárie artificial. Contudo, os grupos G6 e G7 evidenciam uma mudança inferior aos outros

Gráfico 1- O gráfico apresenta os valores médios de microdureza (MKH) de todos os grupos em relação ao tempo.



O Gráfico 1 ilustra a estabilidade de dureza dos grupos G6 e G7, que são considerados controles, o G7 grupo de esmalte dental hígido e armazenado em água mostrou uma ligeira diminuição após 40 dias de imersão em água destilada. O G5 apresentou grande diferença estatística em relação aos demais apresentando-se como o melhor tratamento com flúor em relação aos demais, mas não foi capaz de devolver os valores aos mesmos parâmetros dos grupos hígidos de dureza após 5ª semana de leitura.

Gráfico 2- O gráfico apresenta os valores médios (MKH) de microdureza do grupo controle em relação ao tempo.



O Gráfico 2 mostra de forma isolada os valores de dureza do G1 que recebeu apenas tratamento com laser após indução de cárie após, a indução de cárie sua média de dureza foi 42,3 MKH com progressão lenta onde se apresentou seu pico na 5ª semana 104,3 MKH, que não revelem a diferença entre os grupos G2, G3 e G4.

Discussão

A utilização de produtos com alta concentração de flúor está indicada no tratamento de indivíduos com alto risco ou atividade da doença cárie e em grupos especiais, seu uso proporciona benefícios na clínica diária (Marinho *et al.*2004; Richards *et al.* 2015; Tenuta *et al.*2009). As modalidades de flúor em gel, mousse e verniz vem sendo utilizadas principalmente na Odontopediatria, porém ainda existem algumas questões a serem debatidas como o tempo de aplicação e forma de

apresentação destes produtos, e sua capacidade de interferir na remineralização de lesão de cárie inicial em esmalte dental como observado neste estudo.

O presente trabalho acompanhou o comportamento da remineralização do esmalte durante 4 semanas, que é o tempo preconizado no tratamento de lesões incipientes e uma semana após. Afim de confirmar a validade da remineralização *in vitro* associada ao uso do laser de CO₂ que se mostrou efetivo como boa alternativa preventiva (Featherstone *et al.*, 1998; Klein *et al.*, 2005). Ambas as formas de apresentação de flúor gel revelaram-se benéficas. Contudo, os estudos demonstram maior eficiência na remineralização e na formação de fluoreto de cálcio, quando foi utilizado o flúor fosfato acidulado gel. Isso também foi observado, o grupo FFA que apresentou os melhores resultados de dureza juntamente com o grupo Verniz, porém microscopicamente a camada de fluoreto de cálcio criada por ele se mostra mais uniforme e menos rugosa, podendo ser um benefício adicional quando se considera o aspecto clínico (Alexandria *et al.*, 2016; Park *et al.*, 2012). Entretanto, é contraindicado para pacientes de grupos especiais e na idade pré-escolar, por causa do risco de ingestão e injúrias gástricas, devido ao aumento do risco de toxicidade (Maguire *et al.*, 2014). Poucos estudos propõem o uso de laser de CO₂ para tratamento de lesão incipiente, pela heterogeneidade do tecido e fragilidade. O tecido cariado se apresenta mais poroso e com características de absorção de energia diferente sendo uma dose inadequada de energia poderá vir a desfavorecer o processo terapêutico. (Poosti *et al.*, 2014). Isso pode ser observado no presente estudo, pois o laser de dióxido de carbono apresentou efeito nos parâmetros escolhidos em esmalte desmineralizado nos grupos G6 e G7 controles hígidos as mudanças foram sutis. A hipótese mais provável para efeitos do laser na inibição de cárie é devido à fusão de cristais de hidroxiapatita (Corrêa-Afonso *et al.*, 2012. Poosti *et al.*, 2014). Neste presente estudo podemos considerar, que os cristais expostos pela desmineralização e sem a camada de esmalte aprismático foi soldado, visto que a temperatura variou entre 45°-50°, promovendo uma hipertermia ou em alguns momentos um *welding*.

Os comprimentos de onda característicos do laser usado no presente estudo associado a frequência e pulso pode ser apresentado como um problema de dose principalmente sobre a lesão incipiente, o aumento de dureza significativo que obtivemos em nosso estudo deve-se a eficiência da dose proposta, e o uso dos fluoretos apresentaram resultados positivos com um significativo aumento da dureza

corroborando com os resultados de Poosti *et al.*, 2014 que associou o uso de fluoretos durante a irradiação.

O uso de um laser ultrapulsado demonstraram algumas modificações benéficas no tecido semelhante ao CW laser contínuo, promovendo o selamento dos prismas de esmalte e a eliminação das impurezas, que podemos considerar a parte orgânica e água. A aplicação do laser nos parâmetros propostos proporcionou resultados promissores, pois foi capaz entregar uma dose de energia adequada para modificar a superfície e com um espaçamento suficiente de resfriar o esmalte sem prejuízos ou erosões. Zancopé *et al.*, 2016 sugeriu que o fenômeno de fusão pode estar relacionado com a inibição da desmineralização e o aumento da dureza encontrados em todos os grupos do presente estudo. Estas constatações corroboram com os nossos resultados iniciais, em que a densidade de energia foi semelhante a densidade de energia (fluência) usada em nosso estudo 5 mJ. Nossos demonstram que a superfície do esmalte tenha sido selada por irradiação com laser, bem como simultaneamente sugerindo que possa ter ocorrido deposição de fluoreto de cálcio, favorecendo o aumento de dureza, e conseqüentemente otimizando a remineralização na lesão de mancha branca. Contudo, o esmalte hígido apresentou uma discreta modificação, podendo-se inferir que o tecido cariado quando exposto a dose proposta foi capaz de absorver maior quantidade de energia, facilitando a interação.

Os resultados demonstraram que a irradiação com laser ultrapulsado de CO₂ associada ao uso de fluoretos, pode ser utilizado para a inibição da lesão de cárie de esmalte pois houve um aumento significativo a partir da segunda semana na microdureza do esmalte. O G5 (verniz de flúor) apresenta altas concentrações de flúor e grande substantividade, por isso, provavelmente, tenha se destacado com maior dureza. O G1 (controle – lesão de cárie associada ao laser de CO₂) apresentou resultados de dureza promissores durante todas as semanas e após 5^a semana, se apresentou semelhante aos grupos G2, G3, G4 e G5. Tal efeito deve ser considerado benéfico, haja visto que os fluoretos são propostos como tratamento mais eficaz para lesão de cárie incipiente minimamente invasiva, mas seu uso é realizado semanalmente por no mínimo quatro semanas. O presente estudo foi uma alternativa mais econômica, com menor disponibilidade do paciente e menor risco de toxicidade. No entanto, nesse estudo foi empregado um laser ultra pulsado de CO₂ com comprimento de onda de 10600nm, o que limita a comparabilidade com outros estudos. A falta de ampla evidência clínica para esta eficácia pode ser atribuída ao

fato de que não há consenso sobre comprimentos de onda do laser, clinicamente, adequadas e parâmetros dosimétricos. Em relação à elevação da foi significativamente maior no grupo irradiado associado com o verniz, do que quando comparado com os demais. Tal fato não modificou a dureza dos controles hígidos, mesmo quando utilizado água ou saliva como armazenamento, o que indica que o efeito de dureza superficial da irradiação com laser ultrapulsado indica maior interação com tecido desmineralizado.

Comercialmente os CW lasers de CO₂ disponíveis possuem comprimento de onda de 10.600 nm, podendo ser adaptados para operar em outros comprimentos de onda. No entanto, neste comprimento de onda a absorção é maior e ainda oferece menor risco de danos à polpa mesmo considerando uma profundidade de absorção no esmalte 11 µm (Fried *et al.*, 2001). Embora a emissão a 10.600 nm tenha sido aplicada neste estudo, a irradiação foi realizada com ultra pulso com um espaçamento considerável (Tab.1) afim de minimizar a deposição de energia acumulada, o que poderia determinar o aumento da temperatura da polpa. (Jordão *et al.*, 2016). No entanto, a comparação entre os estudos não pôde ser feita de forma apropriada, uma vez que existem diferentes parâmetros de laser empregados e diversos tipos de fluoretos. Além disso, existem diferentes modelos experimentais, principalmente quando se trata de tratamento de lesão de mancha branca, principalmente com uso de laser.

O laser ultrapulsado de CO₂ não foi comercialmente projetado para aplicações em Odontologia. Mais melhorias no “design” e acessórios se fazem necessárias para torná-lo mais confortável para aplicações em dentes humanos. Novos futuros estudos se fazem importantes para discutir sobre os potenciais benefícios do laser ultrapulsado de CO₂ em outras áreas da odontologia, avaliando seus efeitos sobre o aumento da temperatura nos tecidos subjacentes, morfologia da superfície e esmalte desmineralizado

Conclusão

Dentro das limitações desse estudo podemos concluir que os novos parâmetros propostos pelo presente estudo, foi capaz de melhorar a dureza do esmalte dental bovino com a presença de lesão de cárie incipiente. Ademais, os parâmetros associadas ao uso dos fluoretos também foi capaz de aumentar a dureza do esmalte

de forma eficiente e sobretudo, mantiveram estabilidade de dureza uma semana após o término do tratamento mostrando-se, como uma boa alternativa clínica.

Referências

American Academy of Pediatrics: Preventive oral health intervention for pediatricians. *Pediatrics* 2008; 122: 1387-94.

Marcenes W, Kassebaum NJ, Bernabé E, et al. Global burden of oral conditions in 1990-2010: a systematic analysis. *J Dent Res* 2013; 92: 592-597.

Petersen PE. World Health Organization global policy for improvement of oral health – World Health Assembly 2007. *Int Dent J* 2008; 58: 115-121.

Richards D. Fluoride gel effective at reducing caries in children. *Evid Based Dent*. 2015 Dec;16(4):108-9

Cury JA, Tenuta LM. Enamel remineralization: controlling the caries disease or treating early caries lesions? *Braz Oral Res* 2009;23(Suppl 1):23–30.

Marinho VC, Higgins JP, Sheiham A, Logan S. Combinations of topical fluoride (toothpastes, mouthrinses, gels, varnishes) versus single topical fluoride for preventing dental caries in children and adolescents. *Cochrane Database Syst Rev* 2004;(1). Art. No.: CD002781.

Tenuta LM, Zamataro CB, Del Bel Cury AA, Tabchoury CP, Cury JA. Mechanism of fluoride dentifrice effect on enamel demineralization. *Caries Res* 2009;43:278–85.

Fejerskov O, Cury JA, Tenuta LMA, Marinho V. Fluorides in caries control. In: Fejerskov O, Kidd E, editors. *Dental caries: the disease and its clinical management*. third ed. Oxford: Wiley Blackwell; 2015. p. 245–76.

Cury JA, Tenuta LM. Enamel remineralization: controlling the caries disease or treating early caries lesions? *Braz Oral Res*. 2009;23 Suppl 1:23-30.

Benson PE1, Parkin N, Dyer F, Millett DT, Furness S, Germain P. Fluorides for the prevention of early tooth decay (demineralised white lesions) during fixed brace treatment. *Cochrane Database Syst Rev*. 2013

Featherstone JDB, O'Reilly MM, Shariati M, Brugler S. Enhancement of remineralization *in vitro* and *in vivo*. In: Leach SA. Factors relating to demineralization and remineralization of the teeth. Oxford: IRL Press; 1986:23-24.

Patel CKN, McFarlane RA, Faust WL. Selective excitation through vibrational energy transfer and optical maser action in N₂-CO₂. *Phys Rev Lett* 1964;13:617-9.

Goldman L, Hornby P, Meyer R, Goldman B. Impact of the laser on dental caries. *Nature*. 1964; 203: 417.

Blankenau RJ, Powell G, Ellis RW, Westerman GH. In vivo caries-like lesion prevention with argon laser: pilot study. *J. Clin. Laser Med. Surg.* 1999; 17: 241-3.

Dibdin GH. The water in human dental enamel and its diffusional exchange measured by clearance of tritiated water from enamel slabs of varying thickness. *Caries Res* 1993; 27(2):81-6.

Fried D, Zuerlein M, Featherstone JDB, Seka W, McCormack SM. IR laser ablation of dental enamel: mechanistic dependence on the primary absorber. *Appl.Surf. Sci.* 1997: 127-129: 852-56.

Rechmann P, Fried D, Le CQ, Nelson G, Rapozo-Hilo M, Rechmann BM, Featherstone JD. Caries inhibition in vital teeth using 9.6- μ m CO₂-laser irradiation. *J Biomed Opt.* 2011 Jul;16(7):071405.

Wang Y, Mei L, Gong L, Li J, He S, Ji Y, Sun W. Remineralization of early enamel caries lesions using different bioactive elements containing toothpastes: An *in vitro* study. *Technol Health Care*. 2016 May 20

JD B Featherstone, NA Barrett-Vespone, D Fried, Z Kan-torowitz, and W Seka, "CO₂ laser inhibition of artificial caries-like lesion progression in dental enamel," *Journal of Dental Research*, vol. 77, no. 6, pp. 1397-1403, 1998.

ALL Klein, L K A. Rodrigues, C P Eduardo, M N Dos Santos, and J A Cury, "Caries inhibition around composite restorations by pulsed carbon dioxide laser application," *Euro-pean Journal of Oral Sciences*, vol. 113, no. 3, pp. 239-244, 2005.

Alexandria AK, Meckelburg Nde A, Puetter UT, Salles JT, Souza IP, Maia. Do pediatric medicines induce topographic changes in dental enamel? LC. Braz Oral Res. 2016;30(1).

Park JW, Song CW, Jung JH, Ahn SJ, Ferracane JL. The effects of surface roughness of composite resin on biofilm formation of *Streptococcus mutans* in the presence of saliva. Oper Dent. 2012 Sep-Oct;37(5):532-9

Maguire A. ADA clinical recommendations on topical fluoride for caries prevention. Evid Based Dent. 2014 Jun;15(2):38-9.

Poosti M, Ahrari F, Moosavi H, Najjaraan H. The effect of fractional CO₂ laser irradiation on remineralization of enamel white spot lesions. Lasers Med Sci. 2014 Jul;29(4):1349-55.

Corrêa-Afonso AM, Bachmann L, Almeida CG, Corona SA, Borsatto MC. FTIR and SEM analysis of CO₂ laser irradiated human enamel. Arch Oral Biol. 2012 Sep;57(9):1153-8.

Jordão MC, Forti GM, Navarro RS, Freitas PM, Honório HM, Rios D. CO₂ laser and/or fluoride enamel treatment against in situ/ex vivo erosive challenge. J Appl Oral Sci. 2016 May-Jun;24(3):223-8.

Discussão

Ambas as formas de apresentação de flúor gel apresentaram-se benéficas. Contudo estudos demonstram uma maior eficiência na remineralização e na formação de fluoreto de cálcio quando utilizado o flúor fosfato acidulado gel. Isso também foi observado, o grupo FFA que apresentou os melhores resultados de dureza juntamente com o grupo Verniz.^{1,28}

O papel do laser de dióxido de carbono na prevenção da cárie tem sido explorado por muitos investigadores, que usaram diferentes comprimentos de onda, tendo por objetivo o aumento da resistência à cárie por promover redução na taxa de desmineralização da superfície de esmalte³². Diversos autores demonstraram em seus experimentos que o esmalte dental irradiado com laser de CO₂ pode apresentar maior resistência ao ácido, principalmente os ácidos de origem no biofilme que são depositados lentamente na superfície dental^{10,12,13}. Uma variedade de teorias tem sido proposta tentando explicar os resultados positivos obtidos através da utilização da irradiação do laser de CO₂ no esmalte. Sugere-se que alterações químicas acontecem na superfície. Foi descrito que³⁶ a superfície do esmalte irradiada a 10.600 nm perde 100% e 66% do teor de carbonato após cinco impulsos e um pulso, respectivamente³⁶. Além da diminuição do conteúdo de carbonato, os estudos também demonstram uma perda considerável na porção de água^{7,17}. Contudo, poucos estudos propõe o uso de laser de CO₂ para tratamento de lesão incipiente, pela heterogeneidade do tecido e fragilidade. O tecido cariado se apresenta mais poroso e com características de absorção de energia alterados, e uma dose inadequada de energia, pode desfavorecer o processo terapêutico²⁹.

A hipótese mais aceita para explicar os efeitos do laser na inibição de cárie é a fusão de cristais de hidroxiapatita, que podem ser observados neste estudo (Fig. 5 e 6). A eletromicrografia mostra claramente uma superfície vítrea criada pela irradiação

do laser e pela eliminação de carbonato e água como observado por diversos autores^{7,17,29,36}. O aumento de dureza significativo que obtivemos deve-se a eficiência da dose proposta. O laser ultra-pulsátil pode apresentar algumas características benéficas ao tecido, semelhante ao laser contínuo. Promove o derretimento dos prismas de esmalte e a eliminação das impurezas. Essa dose foi capaz de entregar energia adequada para modificar a superfície, com um espaçamento capaz de resfriar o esmalte sem prejuízos ou erosões. Zancopé *et al.*, 2016 sugeriu que o fenômeno de fusão pode estar relacionado com a inibição da desmineralização e o aumento da dureza encontrados nos grupos irradiados. Estas descobertas estão em concordância com os nossos resultados iniciais, em que a densidade de energia foi semelhante a densidade usada no presente estudo 5 mJ. A superfície do esmalte foi selada por irradiação com laser e simultaneamente a formação de “CaF₂-like material” na superfície pois o esmalte hígido apresenta uma discreta modificação. Provavelmente o tecido cariado quando exposto a dose proposta foi capaz de absorver maior quantidade de energia.

Os resultados do piloto e dos grupos associados com flúor demonstraram que a irradiação com laser de CO₂ pode ser utilizada com êxito para a inibição da cárie dentária esmalte. No entanto, nesse estudo foi utilizado um laser de CO₂ ultra-pulsátil com comprimento de onda de 10600nm, o que limita a comparabilidade com outros estudos. A falta de ampla evidência clínica para esta eficácia pode ser atribuída ao fato de que não há consenso sobre comprimentos de onda do laser clinicamente adequadas e dose. Em relação à microdureza, o aumento foi significativamente maior nos grupos irradiados com lesão de cárie quando comparado com o hígido irradiado, o que indica que o efeito de dureza superficial da irradiação com laser ultra-pulsátil apresenta maior interação com tecido desmineralizado. Acredita-se que o aumento da microdureza 24 hs após a irradiação com laser está relacionada com as alterações ultra-estruturais também observadas no presente estudo, incluindo crescimento tamanho do cristal (Fig 5 e 6) e à recristalização do esmalte poroso e a fusão da hidroxiapatita como resultado do aumento de temperatura na superfície sem danos adicionais como observado por Esteves-Oliveira *et al.*, 2011. Neste trabalho, a irradiação foi realizada com ultra pulso com um espaçamento considerável (Tab.1) para minimizar a deposição de energia acumulada, o que determina o aumento da temperatura da polpa²³.

A utilização de produtos com alta concentração de flúor está indicada no tratamento de indivíduos com alto risco ou atividade da doença cárie e em grupos especiais, e seu uso proporciona benefícios na clínica diária^{26,31,33}. O presente estudo acompanhou o comportamento da remineralização durante 4 semanas que é o tempo preconizado no tratamento de lesões incipientes e uma semana após o que pode confirmar a validade da remineralização *in vitro* associado ao uso do laser de CO₂ que se mostrou efetivo na literatura como boa alternativa preventiva^{2,15}. Entretanto, é contraindicado para pacientes de grupos especiais e na idade pré-escolar, por causa do risco de ingestão e injúrias gástricas e aumento do risco de toxicidade²⁵. Contudo, poucos estudos propõem o uso de laser de CO₂ para tratamento de lesão incipiente, pela heterogeneidade do tecido e fragilidade. O tecido cariado se apresenta mais poroso e com características de absorção de energia diferente e que uma dose inadequada de energia pode desfavorecer o processo terapêutico. (Poosti *et al.*, 2014) isso pode ser observado em nossos estudos, pois o laser de dióxido de carbono apresentou efeito nos parâmetros escolhidos em esmalte desmineralizado nos grupos G6 e G7 controles hígidos em ambos ensaios, as mudanças foram sutis.

A hipótese mais frequentemente para efeitos do laser na inibição de cárie é a fusão de cristais de hidroxiapatita (Corrêa-Afonso *et al.*, 2012. Poosti *et al.*, 2014). Neste estudo podemos considerar que os cristais expostos pela desmineralização e sem a camada de esmalte aprismático foi soldado, visto que a temperatura variou entre 45°-50° promovendo uma hipertermia ou em alguns momentos um *welding*. Os resultados dos nossos estudos sugerem que a superfície do esmalte foi selada por irradiação com laser e simultaneamente sugere-se que conseqüentemente ocorreu uma deposição de fluoreto de cálcio favorecendo o aumento de dureza e conseqüentemente otimizando a remineralização na lesão de mancha branca. Os resultados demonstraram que a irradiação com laser de CO₂ associada ao uso de fluoretos pode ser utilizado com êxito para a inibição da cárie dentária esmalte e pode-se observar um aumento significativo a partir da segunda semana, somente o G5 onde o tratamento foi realizado com o verniz de flúor que apresenta altas concentrações de flúor e grande substantividade se destacou com maior dureza. O G1 controle cárie associado ao laser de CO₂ apresentou resultados de dureza promissores durante todas as semanas e após na 5ª semana se apresentou estatisticamente semelhante aos grupos G2, G3, G4 e G5. Tal efeito deve ser considerado benéfico, haja visto que

os fluoretos são propostos como tratamento mais eficaz para lesão de cárie incipiente minimamente invasivo, mas seu uso é realizado semanalmente por no mínimo quatro semanas. Os presentes estudos mostraram que poderemos ter uma alternativa mais econômica, com menor disponibilidade do paciente e menor risco de toxicidade. No entanto, nesse estudo foi utilizado um laser de CO₂ ultra-pulsátil com comprimento de onda de 10600nm, o que limita a comparabilidade com outros estudos. A falta de ampla evidência clínica para esta eficácia pode ser atribuída ao fato de que não há consenso sobre comprimentos de onda do laser clinicamente adequadas e dose.

O laser de CO₂ ultra-pulsátil não é comercialmente projetado para aplicações em odontologia. Mais melhorias no design e acessórios são necessárias para torná-lo mais confortável para aplicações em dentes. Estudos futuros devem ser realizados testando seus potenciais benefícios e seus efeitos sobre o aumento da temperatura nos tecidos subjacentes e morfologia da superfície do esmalte.

CONCLUSÃO

A associação do novo parâmetro associada ao uso dos fluoretos foi capaz de aumentar a dureza do esmalte de forma eficiente, e mantiveram estabilidade de dureza uma semana após o término do tratamento mostrando-se como uma boa alternativa clínica. O grupo com melhores resultados foi o grupo em que se aplicou laser de CO₂ e verniz de flúor.

REFERÊNCIAS

1. Alexandria AK, Meckelburg Nde A, Puetter UT, Salles JT, Souza IP, Maia. Do pediatric medicines induce topographic changes in dental enamel? LC. Braz Oral Res. 2016;30(1).
2. ALL Klein, L K A. Rodrigues, C P Eduardo, M N Dos Santos, and J A Cury, "Caries inhibition around composite restorations by pulsed carbon dioxide laser application," Euro- pean Journal of Oral Sciences, vol. 113, no. 3, pp. 239–244, 2005.
3. ALL Klein, L K A. Rodrigues, C P Eduardo, M N Dos Santos, and J A Cury, "Caries inhibition around composite restorations by pulsed carbon dioxide laser application," Euro- pean Journal of Oral Sciences, vol. 344, no. 6, pp. 239–244, 2003. (B)
4. Arends J, Christoffersen J. The nature of early caries lesions in enamel. Journal of Dental Research 1986;65:2–11.
5. Blankenau RJ, Powell G, Ellis RW, Westerman GH. In vivo caries-like lesion prevention with argon laser: pilot study. J. Clin. Laser Med. Surg. 1999; 17: 241-
6. Ceballo L, Toledano M, Osorio R, Tay FR, Marshall GW. Bonding to Er-YAG-laser-treated dentin. J. Dent. Res. 2002;81: 119-22.
7. Corrêa-Afonso AM, Bachmann L, Almeida CG, Corona SA, Borsatto MC. FTIR and SEM analysis of CO2 laser irradiated human enamel. Arch Oral Biol. 2012 Sep;57(9):1153-8.
8. Cummins D. Dental caries: a disease which remains a public health concern in the 21st century. The exploration of a breakthrough technology for caries prevention. Journal of Clinical Dentistry 2013;24(Spec Iss A):A1–14.
9. Cury JA, Tenuta LM. Enamel remineralization: controlling the caries disease or treating early caries lesions? Braz Oral Res 2009;23(Suppl 1):23–30.

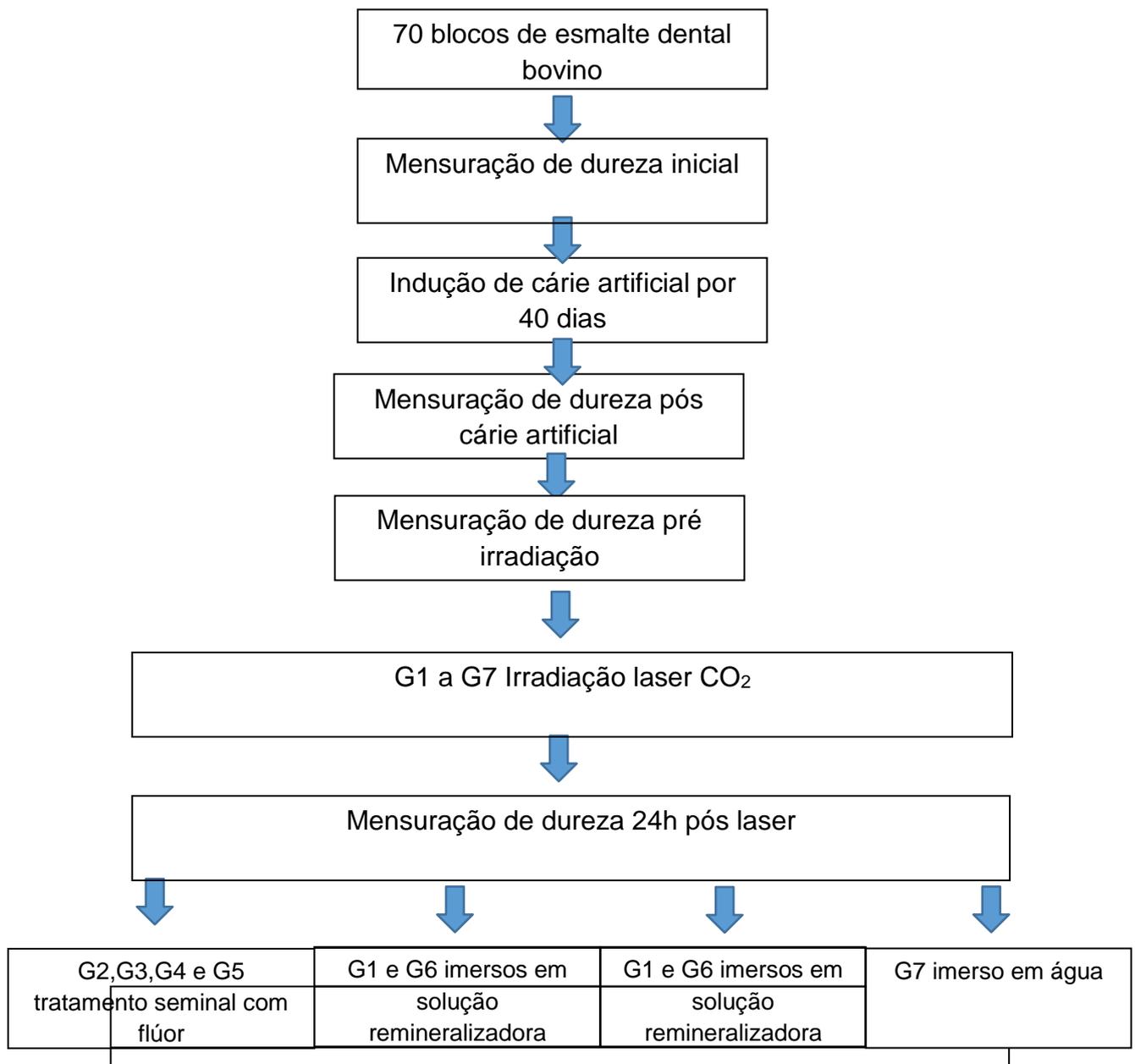
10. da Silva Tagliaferro EP, Rodrigues LK, Soares LE, Martin AA, Nobredos-Santos M. Physical and compositional changes on demineralized primary enamel induced by CO₂ laser. *Photomed Laser Surg* 2009;27(4):585–90.
11. Dibdin GH. The water in human dental enamel and its diffusional exchange measured by clearance of tritiated water from enamel slabs of varying thickness. *Caries Res* 1993; 27(2):81-6.
12. Esteves-Oliveira M, Zezell DM, Meister J, Franzen R, Stanzel S, Lampert F, et al. CO₂ laser (10.6 microm) parameters for caries prevention in dental enamel. *Caries Res* 2009;43(4):261–8.
13. Esteves-Oliveira M, Pasaporti C, Heussen N, Eduardo CP, Lampert F, Apel C (2011) Rehardening of acid-softened enamel and prevention of enamel softening through CO₂ laser irradiation. *J Dent* 39(6):414–421.
14. Featherstone JD. Caries prevention and reversal based on the caries balance. *Pediatric Dentistry* 2006;28:128–32
15. Featherstone JD. The caries balance: contributing factors and early detection. *Journal of the Californian Dental Association* 2003;31:129–33.
16. Fejerskov O, Cury JA, Tenuta LMA, Marinho V. Fluorides in caries control. In: Fejerskov O, Kidd E, editors. *Dental caries: the disease and its clinical management*. third ed. Oxford: Wiley Blackwell; 2015. p. 245–76.
17. Fowler BO, Kuroda S. Changes in heated and in lased irradiated human tooth enamel and their probable effects on solubility. *Calcif Tissue Int* 1986;38(4):97–208.
18. Fried D, Ragadio J, Akrivou M, Featherstone JD, Murray MW, sealed transverse excited atmospheric-pressure lasers operating at $\lambda=9.6$ and 10.6 microm. *J Biomed Opt.* 2001;6:231-8.
19. Fried D, Zuerlein M, Featherstone JDB, Seka W, McCormack SM. IR laser ablation of dental enamel: mechanistic dependence on the primary absorber. *Appl.Surf. Sci.* 1997: 127–129: 852-56.
20. Goldman L, Hornby P, Meyer R, Goldman B. Impact of the laser on dental caries. *Nature.* 1964; 203: 417.
21. JD B Featherstone, NA Barrett-Vespone, D Fried, Z Kantorowitz, and W Seka, "CO₂ laser inhibition of artificial caries-like lesion progression in dental enamel," *Journal of Dental Research*, vol. 77, no. 6, pp. 1397–1403, 1998.

22. JD B Featherstone, NA Barrett-Vespone, D Fried, Z Kan-torowitz, and W Seka, "CO₂ laser inhibition of artificial caries-like lesion progression in dental enamel," *Journal of Dental Research*, vol. 77
23. Jordão MC, Forti GM, Navarro RS, Freitas PM, Honório HM, Rios D. CO₂ laser and/or fluoride enamel treatment against in situ/ex vivo erosive challenge. *J Appl Oral Sci*. 2016 May-Jun;24(3):223-8.
24. LeGeros RZ. Calcium phosphates in oral biology and medicine. *Monogr Oral Sci* 1991; 15(201).
25. Maguire A. ADA clinical recommendations on topical fluoride for caries prevention. *Evid Based Dent*. 2014 Jun;15(2):38-9.
26. Marinho VC, Higgins JP, Sheiham A, Logan S. Combinations of topical fluoride (toothpastes, mouthrinses, gels, varnishes) versus single topical fluoride for preventing dental caries in children and adolescents. *Cochrane Database Syst Rev* 2004;(1).
27. Niemz MH. *Laser-tissue interactions: fundamentals and applications*. first ed. Berlin: Springer-Verlag; 1996.
28. Park JW, Song CW, Jung JH, Ahn SJ, Ferracane JL. The effects of surface roughness of composite resin on biofilm formation of *Streptococcus mutans* in the presence of saliva. *Oper Dent*. 2012 Sep-Oct;37(5):532-9
29. Poosti M, Ahrari F, Moosavi H, Najjaran H. The effect of fractional CO₂ laser irradiation on remineralization of enamel white spot lesions. *Lasers Med Sci*. 2014 Jul;29(4):1349-55
30. Rechmann P, Fried D, Le CQ, Nelson G, Rapozo-Hilo M, Rechmann BM, Featherstone JD. Caries inhibition in vital teeth using 9.6- μ m CO₂-laser irradiation. *J Biomed Opt*. 2011 Jul;16(7):071405.
31. Richards D. Fluoride gel effective at reducing caries in children. *Evid Based Dent*. 2015 Dec;16(4):108-9
32. Rodrigues LK, Nobre Dos Santos M, Pereira D, Assaf AV, Pardi V. Carbon dioxide laser in dental caries prevention. *J Dent* 2004;32(7):531-40
33. Tenuta LM, Zamataro CB, Del Bel Cury AA, Tabchoury CP, Cury JA. Mechanism of fluoride dentifrice effect on enamel demineralization. *Caries Res* 2009; 43:278-85.
34. Tepper SA, Zehnder M, Pajarola GF, Schmidlin PR. Increased fluoride uptake and acid resistance by CO₂ laser-irradiation through topically applied fluoride on human enamel in vitro. *J. Dent*. 2004; 32: 635-41.

35. Zancopé BR, Rodrigues LP, Parisotto TM, Steiner-Oliveira C, Rodrigues LK, Nobre-dos-Santos M. CO₂ laser irradiation enhances CaF₂ formation and inhibits lesion progression on demineralized dental enamel-in vitro study. *Lasers Med Sci.* 2016 Apr;31(3):539-47
36. Zuerlein MJ, Fried D, Featherstone JDB. Modeling the modification depth of carbon dioxide laser-treated dental enamel. *Lasers Surg Med* 1999; 25(4):335-47.

ANEXO I

Flow Chart





ANEXO II

Sampaio-Filho H, Sotto-Ramos J, Pinto EH, Cabral MR, Longo PL, Tortamano IP, Marcos RL, Silva DF, Pavani C, Horliana AC. Evaluation of low-level laser at auriculotherapy points to reduce postoperative pain in inferior third molar surgery: study protocol for a randomized controlled trial. *Trials*. 2016 Sep 2;17(1):432.