

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC  
CENTRO DE ENGENHARIA, MODELAGEM E CIÊNCIAS SOCIAIS APLICADAS  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA

Elizabete dos Santos Ferreira Silva

**Estudo *in vitro* dos efeitos do laser de Er,Cr:YSGG quando empregado  
para prevenção da desmineralização da dentina.**

SÃO BERNARDO DO CAMPO - SP

2018

Elizabete dos Santos Ferreira Silva

**Estudo *in vitro* dos efeitos do laser de Er,Cr:YSGG quando empregado para prevenção da desmineralização da dentina.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica da Universidade Federal do ABC, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Engenharia Biomédica.

**Orientadora:** Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Patrícia Aparecida da Ana

**Co-orientadora:** Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Ilka Tiemy Kato Prates

SÃO BERNARDO DO CAMPO - SP

2018

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca da Universidade Federal do ABC

Dos Santos Ferreira Silva, Elizabete

Título: Estudo *in vitro* dos efeitos do laser de Er,Cr:YSGG quando empregado para prevenção da desmineralização da dentina.

104 fls.:il.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Patrícia Aparecida da Ana.

Co-orientadora: Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Ilka Tiemy Kato Prates.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do ABC, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica, São Bernardo do Campo, 2018.

1. Dentina. 2. Laser de Er,Cr:YSGG. 3. Cárie. 4. Fluoreto. 5. Prevenção.

Declaração de atendimento às observações da banca examinadora.

Este exemplar foi revisado e alterado em relação à versão original, de acordo com as observações levantadas pela banca no dia do exame, sob responsabilidade única do autor e com a anuência do seu orientador e co-orientador.

São Bernardo do Campo, 19 de março de 2018.

Assinatura do autor: Elizete de Santa Fátima de

Assinatura do Orientador: Salvador de

Assinatura do Co-orientador: CPA KP



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO**  
**Fundação Universidade Federal do ABC**  
**Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica**  
Avenida dos Estados, 5001 – Bairro Santa Terezinha – Santo André – SP  
CEP 09210-580 · Fone: (11) 4996-0017  
ppgebm@ufabc.edu.br

### FOLHA DE ASSINATURAS

Assinaturas dos membros da Banca Examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Elizabeth dos Santos Ferreira Silva, realizada em 19 de março de 2018:

Prof.(a) Dr.(a) **Patricia Aparecida da Ana** (Universidade Federal do ABC) – Presidente

Prof.(a) Dr.(a) **Nasser Ali Daghanli** (Universidade Federal do ABC) – Membro Titular

Prof.(a) Dr.(a) **Claudia Bianchi Zamataro** (Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares) – Membro Titular

Prof.(a) Dr.(a) **Juliana Kelmy Macário Barboza Daguano** (Universidade Federal do ABC) – Membro Suplente

Prof.(a) Dr.(a) **Carolina Benetti** (Universidade Federal do ABC) – Membro Suplente



## DEDICATÓRIA

À Deus, por ter mudado a minha trajetória e providenciado para que tudo acontecesse da melhor maneira possível até realizar meus sonhos.

Aos meus pais Américo e Deolinda, por todo apoio e pelo carinho que tem me proporcionado em todos os momentos, dos mais difíceis até aos de imensa alegria. Ao incentivo que sempre me deram aos meus estudos, orgulhosa sou de tê-los como meus pais.

Aos meus filhos Diego, André e Andreza, pela compreensão e apoio nos momentos difíceis desse caminho trilhado até aqui. Orgulhosa estou de tê-los ao meu lado, são a alegria do meu viver e motivo de nunca esmorecer.

Ao meu irmão Eduardo, por todo seu apoio e incentivo aos meus estudos.

Aos muitos amigos que fiz nessa trajetória, alguns ainda estão comigo, e outros estão seguindo seus sonhos, mas ainda moram no meu coração.

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do ABC pela bolsa concedida.

À coordenação do curso de pós-graduação da Engenharia Biomédica.

À Prof.<sup>a</sup> Dra. Patrícia Aparecida da Ana e à Prof.<sup>a</sup> Dra. Ilka Tiemy Kato Prates, pelo acompanhamento pontual e competente.

Aos professores do curso de Pós-Graduação da UFABC.

À Central Multiusuário da UFABC e seus técnicos Adrian, Tanil e Victor.

Ao Centro de Lasers e Aplicações (CLA) do IPEN-CNEN/SP, pela disponibilização de equipamentos e espaço para realização deste trabalho.

À Prof.<sup>a</sup> Dra. Denise Maria Zzell.

À Prof.<sup>a</sup> Dra. Carolina Benetti.

Aos Profs. Anderson Stevens Leônidas Gomes (UFPE) e Marcello Magri Amaral (Universidade Brasil).

Aos colegas Matheus Del Valle, Sérgio Luiz Machado dos Santos Jr, Daísa de Lima Pereira e Mariana Mioti Sebastião.

Ao CNPq (INCT # 465763/2014-6 – Photonics National Institute– INFO).

À CAPES-PROCAD edital 071/2013- 88881.068505/2014-01.

A todos que direta e indiretamente contribuíram para realização deste trabalho.

*“<sup>16</sup>Apliquei-me a conhecer a sabedoria e a considerar a fadiga que se realiza sobre a terra, pois o homem não conhece repouso, nem de dia, nem de noite.<sup>17</sup>Observei o conjunto da obra de Deus e percebi que o homem não consegue descobrir tudo o que acontece debaixo do sol. Por mais que o homem se fadigue em pesquisar, não chega a compreendê-la. E mesmo que o sábio diga que a conhece, nem por isso é capaz de entendê-la.”*

**ECLESIASTES 8,16-17**



## RESUMO

Lasers de érbio podem ser usados para prevenção de cárie radicular, o que é de suma importância para os idosos. Contudo, parâmetros seguros e eficazes de irradiação para a dentina radicular ainda não foram determinados empregando-se o laser de Er,Cr:YSGG para tal finalidade. Esse estudo tem por objetivo avaliar os aumentos de temperatura pulpar e superficial, assim como as alterações morfológicas, decorrentes da irradiação da dentina radicular com laser de Er,Cr:YSGG quando empregado com finalidade preventiva, e avaliar os efeitos de um dos parâmetros estabelecidos na composição e resistência à desmineralização da dentina radicular. O estudo foi dividido em duas fases experimentais. Na primeira, os efeitos morfológicos e de variação de temperatura pulpar e superficial foram avaliados a partir de três potências médias do laser de Er,Cr:YSGG, enquanto que, na segunda, um dos parâmetros selecionados foi avaliado quanto às mudanças composicionais, morfológicas e ópticas promovidas na dentina radicular. Na primeira fase experimental, 30 dentes unirradulares humanos e 30 blocos de dentina radicular bovina foram aleatoriamente distribuídos em três grupos experimentais para irradiação com laser de Er,Cr:YSGG (2,78  $\mu\text{m}$ , 600  $\mu\text{m}$ , 20 Hz, 60  $\mu\text{s}$ , sem refrigeração): G1a –potência média de 0,10W; G1b - potência média de 0,25W; G1c - potência média de 0,50W. Foram determinadas as variações de temperatura intrapulpar empregando-se termopares, variações de temperatura superficial com termografia e alterações morfológicas por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Na segunda fase experimental, 75 blocos de dentina radicular bovina foram aleatoriamente distribuídos em 5 grupos experimentais: G1b: sem tratamento; G2b: tratamento com flúor fosfato acidulado (FFA, 1,23% F-, pH= 3,6 = 3,9); G3b: irradiação com potência média de 0,25W; G4b: irradiação laser seguida de aplicação de FFA; G5b: aplicação de FFA seguida da irradiação laser. Foram efetuadas avaliação composicional por espectroscopia de absorção no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), óptica por tomografia por coerência óptica (OCT) e morfológica por MEV. Em seguida, as amostras foram submetidas à ciclagem de pH por 8 dias e, no fim, foi avaliado o coeficiente de atenuação óptico obtido por nova avaliação por OCT. A análise estatística foi efetuada individualmente para cada variável resposta, sendo adotado o nível de significância estatística de 5%. Todos os parâmetros laser promoveram alterações de temperatura inferior ao limiar para danos pulpares; contudo, apenas o grupo tratado com 0,50 W promoveu aumentos de temperatura superficial superiores a 100° C, indicativos de alterações químicas na dentina. Os grupos irradiados com 0,25W e 0,50 W promoveram microablações na dentina, observados pelo MEV. Na segunda fase experimental,

observou-se pelo FTIR que a irradiação laser isoladamente não altera a composição da dentina, mas a aplicação prévia de FFA seguida da irradiação laser diminuiu significativamente o conteúdo de  $\nu_{3\nu_4}$  carbonato da dentina. Da mesma forma, este tratamento também promove maior alteração morfológica e de coeficiente de atenuação óptica quando comparado aos tratamentos isoladamente. Após desmineralização, observou-se que tanto a irradiação laser isoladamente, quanto a aplicação de FFA previamente à irradiação, promoveram aumento significativo do coeficiente de atenuação óptica, indicando menor desmineralização das amostras para este grupo. Desta forma, foi possível concluir que o laser de Er,Cr:YSGG apresenta potencial para uso em prevenção da desmineralização da dentina radicular, sendo segura sua aplicação com potência média de 0,25W e mais eficiente quando precedido da aplicação de FFA.

**Palavra-chave:** dentina, laser de Er,Cr:YSGG, cárie, fluoreto, prevenção.

## ABSTRACT

Erbium lasers can be used to prevent root caries, which is important for the elderly. However, safe and effective irradiation parameters have not yet been determined for root dentin using the Er,Cr:YSGG laser for this purpose. The objective of this study was to evaluate the pulp and surface temperature increases, as well as the morphological alterations, due to Er,Cr:YSGG laser irradiation on root dentin when used for preventive purposes, and to evaluate the effects of one of the parameters in the composition and resistance to demineralization of root dentin. The study was split into two experimental phases. In the first one, the morphological and pulp and surface temperature variations were evaluated from three average powers of the Er,Cr:YSGG laser, while in the second phase, the compositional, morphological and optical properties promoted by one selected laser parameter were evaluated in root dentin. In the first experimental phase, 30 unirradiated human teeth and 30 bovine root dentin slabs were randomly distributed in three experimental groups for irradiation with Er,Cr:YSGG laser (2.78  $\mu\text{m}$ , 600  $\mu\text{m}$ , 20 Hz, 60  $\mu\text{s}$ , without refrigeration): G1a - average power of 0.10W; G1b - average power of 0.25W; G1c - average power of 0.50W. The pulpal temperature variations were determined using fast response thermocouples, the surface temperature variations were measured using infrared thermography and morphological changes were observed by scanning electron microscopy (SEM). In the second experimental phase, 75 slabs of bovine root dentin were randomly distributed in 5 experimental groups: G1b: without treatment; G2b: treatment with acidulated fluoride phosphate (APF, 1.23% F<sup>-</sup>, pH = 3.6 = 3.9); G3b: irradiation with average power of 0.25W; G4b: laser irradiation followed by APF application; G5b: application of APF followed by laser irradiation. The compositional evaluation was performed by Fourier transformed infrared spectroscopy (FTIR), the optical aspect was observed by optical coherence tomography (OCT) and morphology was evaluated by SEM. Afterwards, the samples were submitted to pH-cycling for 8 days and, finally, the optical attenuation coefficient was obtained by a new OCT evaluation. The statistical analysis was performed individually for each response variable, considering the level of significance of 5%. All the laser parameters promoted changes in temperature below the threshold for pulp damage; however, only the group treated with 0.50 W promoted surface temperature increases above 100 °C, indicative of chemical changes in dentin. The groups irradiated with 0.25W and 0.50 W promoted microablation in dentin. In the second experimental phase, it was observed that the laser irradiation alone does not alter the composition of the dentin, but the previous

application of APF followed by the laser irradiation significantly decreased the content of  $\nu_3$  and  $\nu_4$  carbonate of the dentin. In the same way, this treatment also promotes greater morphological alterations when compared to treatments alone. After demineralization, it was observed that both the laser irradiation alone and the application of APF previously to the laser irradiation promoted a significant increase in the optical attenuation coefficient, indicating a lower demineralization of this group. In this way, it was possible to conclude that the Er,Cr:YSGG laser presents potential for use for preventing root dentin demineralization. Its application is safe with a mean power of 0.25W and more efficient when preceded by APF application.

**Keywords:** dentin, Er,Cr:YSGG laser, caries, fluoride, prevention.

## Índice

1. INTRODUÇÃO .....	15
2. OBJETIVO .....	19
3. HIPÓTESE .....	19
4. REVISÃO DE LITERATURA.....	20
4.1. Anatomia dos tecidos dentários .....	20
4. 2. Carie dentária .....	22
4.3. Aplicação tópica de flúor .....	25
4.4 Irradiação laser em alta intensidade nos tecidos duros dentais .....	26
4.5. O laser de Er,Cr:YSGG, sua ação dos tecidos duros e ação na prevenção da cárie.....	28
5. MATERIAL E MÉTODO .....	33
5.1. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL .....	33
5.2. EQUIPAMENTO LASER EMPREGADO NESTE ESTUDO .....	35
5.3. FASE EXPERIMENTAL 1: .....	36
DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS SEGUROS DE IRRADIAÇÃO.....	36
5.3.1. AVALIAÇÃO DE TEMPERATURA SUPERFICIAL.....	36
5.3.2. AVALIAÇÃO DA TEMPERATURA PULPAR.....	40
5.3.3. AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA .....	42
5.4. FASE EXPERIMENTAL 2: .....	44
AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA IRRADIAÇÃO LASER DURANTE DESAFIO CARIOGÊNICO <i>IN VITRO</i> .....	44
5.4.1. Preparo das amostras .....	44
5.4.2. Análise composicional .....	45
5.4.3. Análise morfológica .....	47
5.4.4. Desafio cariogênico <i>in vitro</i> : ciclagem de pH.....	47

5.4.5. Análise do coeficiente de atenuação óptico (OCT).....	49
5. RESULTADOS .....	54
5.1. FASE 1: DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS SEGUROS DE IRRADIAÇÃO .....	54
5.1.1. AVALIAÇÃO DE TEMPERATURA SUPERFICIAL.....	54
5.1.2. ANÁLISE DE TEMPERATURA PULPAR.....	56
5.1.3. ANÁLISE MORFOLÓGICA.....	57
5.2. FASE 2: AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA IRRADIAÇÃO LASER DURANTE APÓS CARIOGÊNICO <i>IN VITRO</i> .....	62
5.2.1. AVALIAÇÃO COMPOSICIONAL .....	62
5.2.2. AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA.....	65
5.2.3. AVALIAÇÃO DO COEFICIENTE DE ATENUAÇÃO ÓPTICO .....	69
6. DISCUSSÃO .....	76
7. CONCLUSÕES .....	83
11. ANEXOS .....	84
Anexo A .....	84
ANEXO B .....	86
ANEXO C.....	87
12. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	90

## 1. INTRODUÇÃO

O aumento da expectativa de vida da população mundial trouxe para o Cirurgião-Dentista uma série de novos desafios. Políticas públicas e ações preventivas promovidas ao longo das décadas, conjuntamente com a mudança de paradigmas na Odontologia atual, permitiram que ocorresse a manutenção do elemento dental no idoso. Contudo, muitos destes indivíduos apresentam uma série de doenças e limitações que podem comprometer a manutenção da saúde bucal.

Considerando o aumento de expectativa de vida da população brasileira, tem-se observado uma preocupação com o aumento da incidência de cárie radicular, sendo esta considerada um problema de saúde bucal das pessoas com mais de 60 anos [1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11]. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2010), estima-se que mais de 20% da população global ultrapassará a idade de 60 anos em 2050 [12]. Esta projeção também foi confirmada pela OMS para a população brasileira. De acordo com o IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) em projeção efetuada e revisada em 2008, supõe-se que, em 2050, seremos mais de 215 milhões de brasileiros e, destes, mais de 64 milhões terão acima de 60 anos de idade, o que corresponderá a 30% da população [13].

Em relação à estimativa da prevalência de cáries nesta população acima de 60 anos, dados do último levantamento feito pelo Ministério da Saúde Brasileiro em 2010 (Pesquisa Nacional de Saúde Bucal - SB Brasil 2010) apresentam a cárie como o principal problema de saúde bucal, levando à perda dentária de adultos [14]. Neste levantamento, conclui-se que 16,7% da população adulta e 13,6% da população idosa apresenta cárie radicular, sendo que no Brasil existem locais que essa condição não é sequer tratada, mais frequente nas regiões Norte e Centro Oeste.

Na América do Norte e Europa os dados também confirmam essa tendência, sendo observada a diminuição da porcentagem de casos de cárie em idosos; porém, essa ainda se mantém acima dos 30% na população com mais de 60 anos [2,7,10,11,15,16,17,18]. Portanto, considerando-se as estimativas da Organização Mundial da Saúde em relação ao envelhecimento da população, a maioria dos idosos agora são dentados [16,18,19] e, assim, há necessidade de estratégias clínicas e públicas que devem ser adotadas para que ocorra a prevenção do surgimento e da progressão das lesões de cárie radicular. Esse tipo de lesão é associado a uma colonização bacteriana no biofilme aderido, à dieta com carboidratos fermentáveis, entre outros fatores, e à perda de inserção periodontal ao longo dos anos a qual

expõe a dentina a esses fatores. Esta perda de inserção está associada à higiene oral inadequada e/ou má oclusão, e representa uma característica importante da relação entre cárie e envelhecimento [2,9,20,21]. Na fase de envelhecimento, as pessoas idosas passam a ter uma série de transformações, assim como doenças associadas. Existem dificuldades visuais e motoras, fazendo com que a higienização se torne insuficiente [7, 22]. Devido às doenças que se associam, muitas pessoas têm xerostomia (ausência de saliva), dificuldade com mastigação, gustação e deglutição [20,21,23].

A dieta também é alterada, pois muitos idosos passam a se alimentar de comidas pastosas; ainda assim, a maioria deles faz uso de próteses, fato esse que interfere mais ainda nessa questão. Apesar de muitos idosos terem problemas complexos de restauração, perda óssea devido a doenças periodontais, cáries e problemas periapicais não resolvidos, eles tornaram-se menos dispostos a aceitar as soluções simples do passado, como extrair os dentes remanescentes e fazer reabilitação com próteses totais [9,16,24]. Essa tendência vem se mantendo devido à gradativa melhoria das condições de saúde bucal nas últimas décadas, o que indica que as futuras gerações de idosos manterão seus elementos dentários e, como a recessão gengival é característica dessa idade, haverá um maior número de superfícies radiculares expostas à cárie [9,10,11]. Todos esses fatores associados aumentam a probabilidade destes indivíduos apresentarem lesões de cárie, principalmente radicular.

Quanto aos métodos de prevenção da cárie, o mais amplamente usado é o flúor, e seu uso em uma ou mais formas proporcionou o declínio mundial desta doença [9,17,22,25,26,27,28,29,30]. Diferentes formas de aplicação tópica de flúor estão disponíveis como dentifrícios, vernizes, géis, soluções enxaguatórias e diamino fluoreto de prata [9, 25,31,32,33]. Embora o uso tópico do flúor seja um método consagrado na prevenção da cárie de esmalte [25,26,27,34,35,36] e estudos demonstrem a eficácia deste método para prevenção da desmineralização da dentina [9,17,27,37,37,38,39,40,41,42], ainda há necessidade de novas estratégias preventivas para reduzir o número de casos de lesões de cárie radicular, especialmente no idoso, considerando que, para se manter sua eficácia, o fluoreto deve ser mantido constantemente no meio oral, o que às vezes não é possível considerando pacientes debilitados ou com acesso deficiente à água fluoretada.

A irradiação dos tecidos duros dentais com laser tem sido proposta como uma alternativa para essas situações, pois pode originar um aumento na resistência do elemento dentário perante os desafios ácidos do ambiente bucal durante os processos fisiológicos [43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65]. A literatura mostra que altas temperaturas superficiais, entre 100°C e 400°C, ocasionam perda de água e



diminuição do carbonato dos tecidos duros, com conseqüente diminuição da solubilidade destes tecidos [57,66]. Entre os principais mecanismos que conduzem a uma estrutura dos tecidos duros menos solúvel, destacam-se a diminuição dos íons carbonato, evaporação de água e a decomposição da matriz orgânica [44,57,67,68]. Temperaturas mais elevadas promovem outros efeitos, tais como a alteração das características cristalográficas da matriz mineral (parâmetros da rede cristalina) [58,69]. A elevação de temperatura nos tecidos dentários também possibilita a formação de novas fases cristalinas que podem resultar em tecidos mais resistentes quimicamente [70]. Na faixa de temperatura entre 100-650 °C, a HAP (hidroxiapatita) é estável e apresenta apenas uma expansão do parâmetro de rede  $\alpha$ . Entre as temperaturas de 650 °C a 1000 °C ocorre o crescimento de cristais de HAP, a expansão do parâmetro de rede  $\alpha$  e a formação do fosfatotricálcico na fase  $\beta$  (TCF- $\beta$ ). Em temperatura maior que 1100 °C a fase TCF- $\beta$  é convertida em fosfato tricálcico (FTC) na fase  $\alpha$ , ocorre a fusão da HAP a uma temperatura de 1280 °C e a conseqüente presença do fosfato tetra cálcico [71].

A elevação da temperatura nos tecidos duros de forma não controlada pode ocasionar danos aos tecidos pulpare. A irradiação da superfície dentária, sendo ela de dentina ou esmalte, promove uma propagação de calor por esses tecidos alcançando o tecido pulpar ou periodontal [51,52,53,72,73,74]. Parâmetros seguros de temperatura para o tecido pulpar têm sido pesquisados desde o trabalho de Zach e Cohen (1965) [75], que chegaram ao limiar de aumento de 5,6 °C para manutenção da vitalidade pulpar. A absorção da radiação proveniente do Laser em alta intensidade com os tecidos dentários libera calor e, desta forma, investigações da propagação do calor pelos tecidos até os tecidos pulpares e os seus efeitos nesse tecido são importantes e foram estudas [46,53,74,76,77,78,79,80,81,82]. A segurança dessas aplicações clínicas ainda é uma questão importante a ser considerada.

O laser de Er,Cr:YSGG (laser de óxido de gálio, escândio e ítrio dopado com cromo e érbio) tem comprimento de onda de 2,78  $\mu\text{m}$  e esta radiação é absorvida por íons OH<sup>-</sup> presentes na hidroxiapatita e na água [57,83]. Por este motivo, a radiação proveniente deste *laser* é muito utilizada para remoção de esmalte, dentina e osso por ablação [45,77]; por outro lado, a irradiação destes tecidos com o laser de Er,Cr:YSGG em condições sub-ablativas pode promover alterações químicas [43,57,62] e, desta forma, aumentar a resistência destas estruturas à desmineralização. Contudo, existem poucos estudos relacionados ao potencial para prevenir a desmineralização da dentina radicular, o que motiva a realização do presente estudo. Ainda assim, considerando a escassez de trabalhos que evidenciem os aumentos de temperatura superficial e na câmara pulpar decorrentes da irradiação da dentina radicular com

laser de Er,Cr:YSGG com finalidade preventiva, faz-se necessária a avaliação destes parâmetros buscando-se a determinação de condições seguras de irradiação.

## **2. OBJETIVO**

Tendo em vista a constante necessidade de aperfeiçoamento dos métodos preventivos, este estudo tem por objetivo avaliar os aumentos de temperatura pulpar e superficial, assim como as alterações morfológicas, decorrentes da irradiação da dentina radicular com laser de Er,Cr:YSGG quando empregado com finalidade preventiva e avaliar os efeitos de um dos parâmetros estabelecidos na composição e resistência à desmineralização da dentina radicular. Através das técnicas de FTIR, OCT, MEV; antes e após ciclagem de pH.

## **3. HIPÓTESE**

Este estudo avalia a hipótese de que a irradiação da dentina para prevenção da cárie radicular com laser de Er,Cr:YSGG eleva a temperatura da superfície da dentina e, conseqüentemente, da câmara pulpar, de forma dependente com a densidade de energia empregada, e que existe uma densidade de energia empregada capaz de aumentar a resistência da dentina radicular à desmineralização, sem causar danos pulpares.

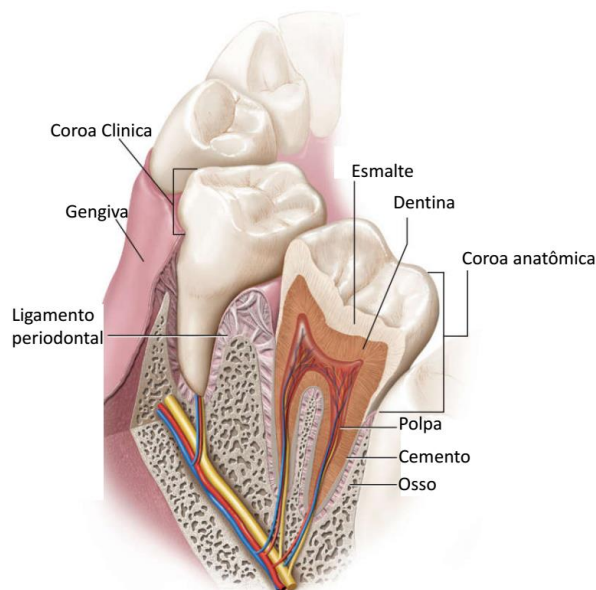
## 4. REVISÃO DE LITERATURA

A literatura foi revisada com ênfase nos tópicos que consideramos mais concernentes com o presente estudo: os tecidos dentários, com interesse maior na dentina que é o material de nossas amostras; doença cárie, com enfoque no processo de surgimento das lesões de cárie e seus mecanismos, transportando para a cárie radicular assim como sua epidemiologia; o uso do laser em alta intensidade para a prevenção da cárie, assim como outros métodos preventivos como o flúor, vantagens e desvantagens que se apresentam na literatura; e o laser de Er,Cr:YSGG, sua ação nos tecidos duros e na prevenção da cárie.

### 4.1. Anatomia dos tecidos dentários

Os dentes são divididos anatomicamente em coroa e raiz (Figura 1). A coroa é a parte externa e visível; já a raiz se encontra inserida no tecido ósseo por uma série de estruturas, como ligamento periodontal e o alvéolo, geralmente não está visível e se encontra protegida pela gengiva inserida. No interior do órgão dental encontra-se a polpa, dividida didaticamente em polpa coronária e radicular, sendo que a polpa radicular se aloja na raiz, a qual tem uma menor espessura de dentina em relação à dentina coronária [84,85,86].

Figura 1: Distribuição dos vários tipos de tecido em um dente molar.



Fonte: [86]

Os dentes são formados por tecidos duros (esmalte, dentina e cimento) e pela polpa, que é um tecido conjuntivo frouxo [87]. O esmalte é o tecido mais duro do corpo humano, porém é muito friável e necessita de um tecido resiliente abaixo dele, como a dentina, para absorver as cargas mastigatórias [84,88]. A dentina, o segundo tecido mais duro do corpo, faz o arcabouço do dente e na coroa é revestida pelo esmalte e na raiz pelo cimento. No interior dos dentes, existe uma câmara oca que é denominada câmara pulpar na coroa e canal radicular na raiz. A polpa contida nessa câmara é constituída por tecido conjuntivo que abriga diversos tipos celulares [84,86].

O esmalte é constituído de 96% de matéria inorgânica, 1% de material orgânico e 3% de água [88]. A dentina é formada por 70% de material inorgânico, 18% de material orgânico e 12% de água em peso [89]. A matéria inorgânica da dentina consiste de uma formação cristalina de hidroxiapatita -  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  [84], majoritariamente sob a forma de hidroxiapatita carbonatada, e outros íons como carbonato, magnésio, potássio, sódio e flúor também estão presentes, porém em menor quantidade [84]. A matéria orgânica é secretada pelos odontoblastos, composta principalmente por fibrilas de colágeno tipo I, glicosaminoglicanos, fosfoproteínas, fosfolípidios, proteoglicanas, glicoproteínas [88,89].

O complexo dentino-pulpar, a dentina e a polpa têm a mesma origem embrionária no mesênquima. Os odontoblastos realizam a dentinogênese com a formação da pré-dentina, que consiste em um material mesenquimal composto por fibras colágenas não mineralizadas [88]. Os odontoblastos não são aprisionados pelo produto que formam, como no tecido ósseo, na verdade uma longa expansão do citoplasma permanece dentro dos túbulos dentinários [84, 87,]. A maturação da dentina ou mineralização da pré-dentina ocorre logo após a aposição da pré-dentina pelos odontoblastos. Na fase primária, os cristais de hidroxiapatita são depositados nas fibras colágenas como glóbulos de calcificação na pré-dentina, o que permite a expansão e fusão durante a fase de mineralização primária. Na fase secundária, mais áreas de cristais são arranjadas de maneira regular. [89]. A dentina passa a ser denominada de peritubular, intertubular, dentina do manto e dentina circumpulpar [84,87,88,89,91] isso justifica a dentina ser um material de difícil caracterização. A aposição de dentina ocorre durante toda vida do dente e, por este motivo, pode ser classificada como dentina primária, que é a dentina que se forma antes da erupção do dente; dentina secundária, que é a dentina que se forma depois da erupção dentária, e dentina terciária ou reacional, que é a que se forma diante um trauma mecânico ou químico sofrido no dente [84]. A dentina é avascular e a nutrição dos odontoblastos provém do fluído tissular, que passa pelos túbulos dentinários, o

qual é originado a partir dos vasos sanguíneos localizados no tecido pulpar adjacente [84,86,88].

A polpa é constituída de tecido conjuntivo frouxo vascularizado e innervado [88]. A polpa é um órgão sensorial; todos os estímulos de vibração, químicos ou variação de temperatura são transmitidos por um axônio aferente presente na polpa ao encéfalo e este percebe como dor [84]. Além da função sensorial, a polpa possui a função de proteção, pois atua na produção de dentina secundária pelos odontoblastos [86], além de manutenção, sustentação e nutrição do dente. O tecido conjuntivo da polpa é composto de fibroblastos, odontoblastos, células mesenquimais indiferenciadas (células tronco), leucócitos, eritrócitos, fibras colágenas e reticulares, suprimento sanguíneo e linfáticos rudimentares. A polpa possui fibras nervosas mielínicas e amielínicas [84,88].

#### **4. 2. Carie dentária**

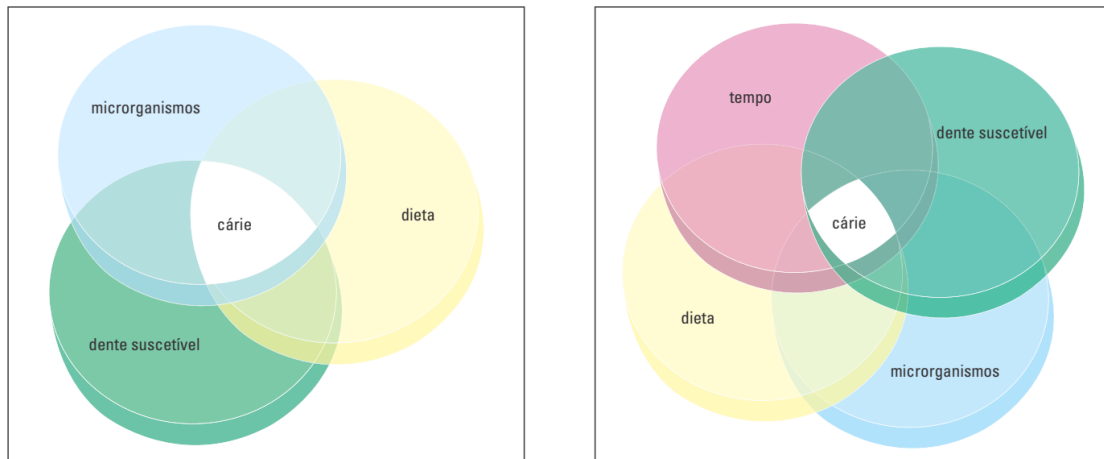
A literatura reporta um crescimento dos índices de carie radicular nos últimos anos, o que justifica a necessidade de políticas preventivas. Anteriormente, Fejerskov *et al.* (1993) [18], em um estudo sobre a população da Escandinávia, constataram que 30 a 40% dos idosos acima de 60 anos apresentavam lesões de cárie radicular e, no mesmo ano, Beck (1993) [2], em seu estudo sobre a prevalência de cárie radicular na população da América do Norte, comprovou que o fator idade está associado à cárie radicular e que mais da metade dos idosos pesquisados apresentavam cárie radicular. Meneguim *et al.* (2002) [3] em estudo sobre os idosos da cidade de Piracicaba na faixa etária de 75 anos, observaram que 59% deles apresentavam lesões de carie radicular e que a retração gengival agiu como fator predisponente para a cárie. Hihs *et al.* (2005) [5] fizeram um estudo da prevalência de cárie em São Paulo e constataram que 31,8% dos idosos entre 65 e 74 anos apresentavam lesões de cárie radicular. Henriques *et al.*(2007) [6] observaram que 38% dos idosos tinham lesões de cárie radicular no município de Araraquara-SP. Petersen *et al.* (2010) [7], em levantamento da saúde bucal da população global de idosos, comprovaram a necessidade políticas públicas para idosos devido à seriedade da presente situação. Ettinger (2010) [19] apresentou o desenvolvimento de uma nova especialidade, a Odontogeriatría, para a necessidade crescente da população idosa no Canadá com os novos desafios que o envelhecimento da população vem trazendo.

De Mata *et al.* (2011) [20] constataram que o envelhecimento da população e retenção dos dentes aumenta a necessidade de cuidados para essa população. Marques *et al.* (2013) [8] concluíram que há uma grande variação da prevalência e de extensão de cárie radicular na população brasileira e a maior parte é composta por lesões não tratadas. Para Bignozzi *et al.* (2014) [10], a recessão gengival devido aos problemas periodontais expõe superfícies radiculares mais extensas e, conjuntamente a outros fatores como má higiene e dietas cariogênicas, levam à ocorrência de cárie radicular nos idosos. Hayes *et al.* (2017) [11] relataram uma larga faixa de prevalência carie radicular indo de 25% a 100% dos idosos da população global. Todos esses estudos comprovam a seriedade da situação, tanto nacionalmente quanto mundialmente.

A lesão de cárie se inicia pelo desequilíbrio do processo fisiológico de desmineralização e remineralização [90,91,92] que ocorre devido a muitos fatores inerentes à rotina do ambiente bucal [93]. Esses fatores podem ser classificados como desencadeantes, tais como a microbiota, a frequência de alimentação, a baixa exposição ao flúor ou a xerostomia; e protetivos, tais como a saliva, a suficiente exposição ao flúor, a higiene oral adequada que promova a desorganização do biofilme e a dieta com mais fibras e menos carboidratos fermentáveis [20,94].

Inicialmente, o conceito dos fatores etiológicos da cárie baseava-se na interação dos fatores substrato, presença de microrganismos e dieta cariogênicas, tal como representado no Diagrama de Keyes (Figura 2) [93]. Para Newbrum (1983), a cárie é resultado de um processo crônico, que surge após algum tempo, com a presença e a interação desses três fatores [95]. Outros fatores como desigualdade, iniquidade social e nível sócio econômico foram incluídos [28] e houve a modificação ao longo dos anos de modelo unicausal para multicausal e do individual para o populacional. A cárie é, portanto, um problema complexo, multifatorial e com características populacionais, sendo que a simples eliminação do microrganismo não é suficiente para eliminação da cárie [96].

Figura 2: Diagrama de Keyes (à esquerda) e Diagrama de Keyes modificado de Newbrum (à direita).



Fonte: [93]

Os processos de desmineralização e remineralização são processos físico-químicos que ocorrem devido à variação do pH no ambiente bucal, principalmente no biofilme dentário aderido à superfície do dente. Em pH entre de 6,7 a 5,6 [97] ocorre o início da desmineralização da dentina, com a desagregação da HAP. Neste processo, íons cálcio e fosfato ficam livres na superfície do dente e no biofilme aderido, sendo dissolvidos na saliva que se encontra subsaturada em relação ao dente. A elevação do pH favorece o efeito tampão da saliva, fazendo com que a mesma se torne supersaturada em relação à dentina; desta forma, os íons cálcio e fosfato voltam a se ligar à dentina e, assim, ocorre a remineralização [90,92,98]. A equação de equilíbrio da solubilidade da hidroxiapatita dental é apresentada abaixo:



A saliva promove um efeito de tamponamento, sendo que o pH permanece crítico por um período que vai de 20 minutos até horas [99], elevando o pH do ambiente e possibilitando a remineralização. O efeito de tamponamento da saliva advém do bicarbonato, fosfato e proteínas que neutralizam os ácidos produzidos pelas bactérias [99].

A queda do pH bucal se dá devido à presença de ácidos oriundos do processo de fermentação das bactérias do biofilme, tais como lático, acético e propiônico. A glicose, frutose, sacarose, maltose e lactose são carboidratos fermentáveis que podem ser metabolizados por bactérias presentes na microbiota da cavidade bucal, entre elas *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* e *Lactobacilli sp.* [100], que constituem o biofilme e são consideradas cariogênicas.

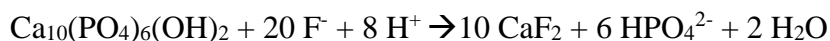


Além da dissolução da porção mineral, o processo de formação da lesão de cárie radicular resulta na exposição da matriz orgânica e a sua degradação por enzimas presentes nos fluidos circundantes (saliva, fluido do biofilme, fluido dentinário) [87,97]. Essas enzimas endógenas são da família das metaloproteinases (MMPs), responsáveis por degradar várias matrizes de proteínas, incluindo as diferentes formas de colágeno [101]. As MMPs participam do processo de cárie na dentina, degradam a matriz orgânica da dentina exposta pela desmineralização e continuam esse processo mesmo enquanto ocorre o processo de tamponamento da saliva [101]. Na dentina desmineralizada, as MMPs e as cisteínas-catepsinas com habilidade de quebrar os terminais non-helicóides das moléculas do colágeno (telo peptídeos) podem levar a perda gradual dos *gaps* intramoleculares, o que compromete a capacidade de remineralização intrafibrilar [102,103]. Por consequência, a cárie dentinária é de progressão mais rápida em relação ao esmalte, pois existe maior quantidade de matriz orgânica na dentina sujeita à degradação pelos ácidos e enzimas oriundos das bactérias e as MMPs humanas e as cisteínas-catepsinas.

### **4.3. Aplicação tópica de flúor**

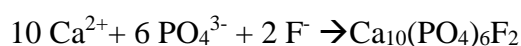
Considerando a etiologia da lesão e sua necessidade de prevenção [27], sabe-se que o método preventivo mais consagrado é a aplicação tópica de fluoreto. Na literatura temos estudos sobre mecanismo de atuação do flúor, assim como a quantidade de flúor necessária para a prevenção e remineralização da cárie na dentina [41].

Os principais mecanismos de atuação do flúor são: interferir no metabolismo das bactérias, formação de fluoreto de cálcio e fluorapatita [25]. O flúor interfere no metabolismo das bactérias presentes na região bucal impedindo a proliferação destas, com a difusão de moléculas de ácido fluorídrico para dentro da bactéria. A difusão do ácido fluorídrico (HF) e sua dissociação em íons  $H^+$  e  $F^-$  no interior da bactéria influenciam na atividade de algumas enzimas, com destaque para enalose, responsável pelo metabolismo de carboidratos, processo essencial para sobrevivência e proliferação bacteriana [104]. A formação de fluoreto de cálcio ( $CaF_2$ ) [30] na superfície do dente ocorre com o uso do flúor tópico presente em dentifrício, solução enxaguatórias, verniz e gel e na água de abastecimento no Brasil. O fluoreto de cálcio pode ficar adsorvido (fracamente ligado) sobre a dentina, formando uma reserva de flúor e, em caso de queda de pH, o íon fluoreto será liberado. A reação apresentada abaixo expressa a liberação desse íon:



O fluoreto de cálcio é considerado o mais significativo agente cariostático dos produtos utilizados para aplicação tópica. Porém, a saliva age na dissolução do fluoreto de cálcio, e conseqüentemente, a aplicação tópica de flúor periódica se faz necessária [17,30].

A formação de fluorapatita ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$ ) devido a sua lenta dissolução frente a quedas bruscas de pH, o flúor da fluorapatita está fortemente ligado, como é lenta a dissolução da fluorapatita a perda de apatita na dentina é dificultada [17,22,25,26,30]. Com o aumento do pH, o processo de remineralização da dentina se inicia e os íons flúor presentes se ligam aos íons cálcio e fosfato, podendo levar à formação da fluorapatita, conforme observado nas equações químicas abaixo [104]. Pode ser observado que a presença do fluoreto de cálcio leva a formação de apatitas menos solúveis e inibe a formação de compostos fosfatados mais ácidos solúveis [105].



#### **4.4 Irradiação laser em alta intensidade nos tecidos duros dentais**

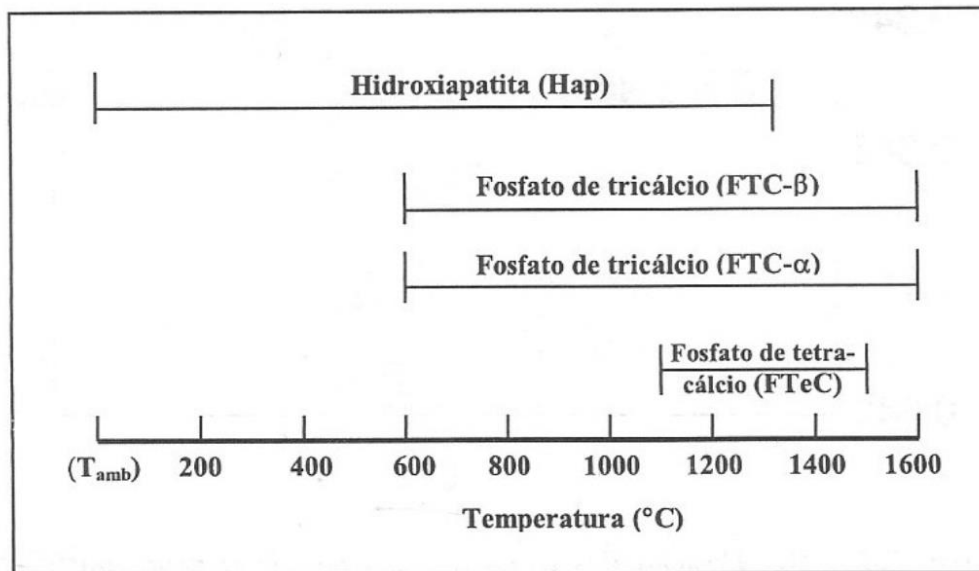
O uso do laser em alta intensidade mostra-se eficaz para tratamentos em tecidos biológicos dentre eles a dentina e o esmalte [45,47,48,49,50,52,54,55,56,58,65]. Dentre esses tratamentos, o presente estudo propõe pesquisar o uso do laser em alta intensidade para a prevenção da cárie radicular.

O efeito preventivo do laser em alta intensidade ocorre quando o tecido absorve a energia irradiada e promove um efeito térmico localizado, o que geralmente é conseguido, considerando os tecidos duros dentais, quando se utiliza radiação com comprimento de onda na região do Infravermelho (IR) [52,55,57,58].

O efeito térmico provoca modificações químico-estruturais nos tecidos duros dentais, os quais dependem da temperatura atingida. A matriz orgânica do esmalte e da dentina é degradada com temperaturas inferiores a 350 °C [106]. Os constituintes da matriz mineral são mais estáveis termicamente. No entanto, como apresentado na figura 3, a eliminação de carbonato começa a ser observada após aquecimento a 100°C, sendo quase totalmente eliminado após aquecimento a 1100°C [68]. Entre 100°C e 650°C ocorre oxidação de fosfato

e formação de pirofosfatos, entretanto o fosfato não apresenta grandes variações na sua concentração somente após a fusão da HAP, em aproximadamente 1280°C, e a formação de novas estruturas cristalográficas, tais como fosfatotricálcico na fase  $\alpha$  e  $\beta$  e fosfato tetracálcico [68].

Figura 3: Formação das fases cristalinas em relação à temperatura.



Fonte: [71]

Um dos mecanismos propostos para explicar a ação da irradiação laser na prevenção da lesão de cárie propõe que ocorre a formação de micro espaços devido à remoção de componentes orgânicos (Microablação), água e carbonato do tecido pela irradiação, o que origina sítios para deposição de íons liberados pela desmineralização, como por exemplo, cálcio [119]. Quando associado ao fluoreto, propôs-se que a irradiação laser poderia originar a conversão de hidroxiapatita em fluorapatita. Contudo, altas temperaturas teriam que ser atingidas para isso. Entretanto, trabalhos efetuados com lasers que não promovem fusão da superfície irradiada também demonstraram uma maior formação e retenção de cristais de fluoreto de cálcio decorrentes da associação da irradiação laser com a aplicação de flúor fosfato acidulado (FFA), o que aumentaria o efeito cariostático do flúor [65,104].

Em relação ao uso do laser de Er,Cr:YSGG, a literatura reporta maioria dos estudos nos efeitos no esmalte [44,45,49,51,54,56,57,59,60,64,65,69,70,104,109], sendo poucos os estudos para esse Laser na dentina [43,44,45,47,61,63,74,82]. É relevante considerar que, na dentina, o conteúdo orgânico e de água, é muito maior que no esmalte [84,88] e, portanto, parece haver uma maior absorção da irradiação. Sendo assim, essa absorção pela água e

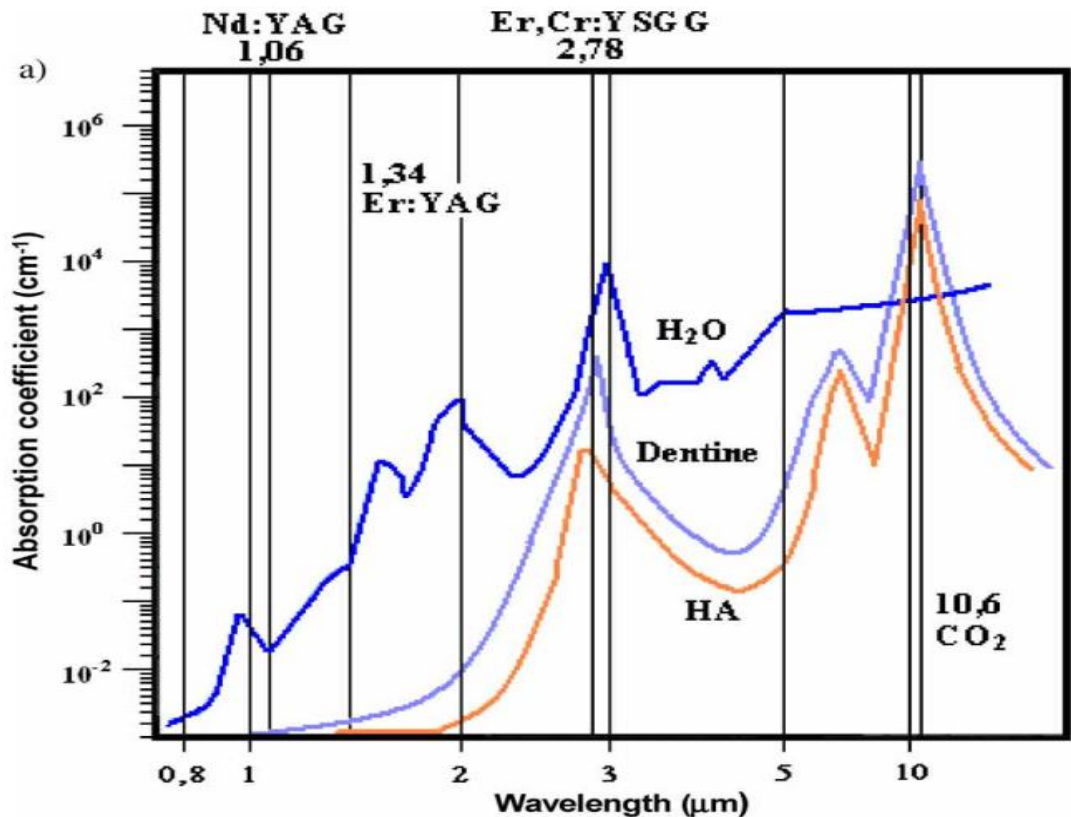
proteínas deve também ter uma importante relação com os efeitos observados e deve ser considerada na definição de parâmetros seguros para uso da irradiação Laser na dentina. Como o esmalte, a dentina apresenta baixa absorção da irradiação na região espectral do visível, mas apresenta maior espalhamento que o esmalte, o que pode resultar em maiores consequências negativas como a vaporização da sub-superfície, trincas do tecido e necrose pulpar [49,73,77], dependendo da densidade de energia empregada. Além disso, já foi demonstrado que quanto menor a espessura de dentina maior o aumento da temperatura nesse tecido [51,107], e também na polpa. Assim, parece ser necessário o uso de densidades de energia menores que as usadas para tratar o esmalte.

Considerando o uso dos lasers de érbio para finalidade preventiva, observa-se a necessidade de uso de densidades de energia sub-ablativas pois a ablação e seus efeitos morfológicos são indesejáveis em uma atividade preventiva, o que poderia resultar principalmente em danos estéticos. Segundo Zezell *et al.* [71], o carbonato da HAP começa a ser eliminado quando a dentina é aquecida a uma temperatura de 100°C, sabendo-se que não é desejada a ablação da dentina pelo Laser para prevenção da cárie, pesquisadores buscaram o limite de ablação dos tecidos dentários. Para o esmalte foi encontrado o limite de ablação entre 2,8 J/cm<sup>2</sup> a 14 J/cm<sup>2</sup> [51,57] e Lin *et al.* (2011)[83] em seu estudo encontraram o limite de ablação da dentina entre 2,69 - 3,66 J/cm<sup>2</sup> com refrigeração ar/água 60-70% e pulso de 140 µs.

#### **4.5. O laser de Er,Cr:YSGG, sua ação dos tecidos duros e ação na prevenção da cárie**

O laser de Er,Cr:YSGG (óxido (do tipo granada) de gálio, escândio e ítrio dopado com cromo e érbio), tem comprimento de onda de 2,78 µm, o qual tem alta absorção pela água e pelos íons OH<sup>-</sup> da hidroxiapatita [64]. O coeficiente de absorção na água é de 6500 cm<sup>-1</sup> e para o esmalte o (figura 4) coeficiente de absorção é de 400 cm<sup>-1</sup> [55].

Figura 4 Coeficientes de absorção da água da hidroxiapatita e da dentina em função dos comprimentos de onda da região do infravermelho.

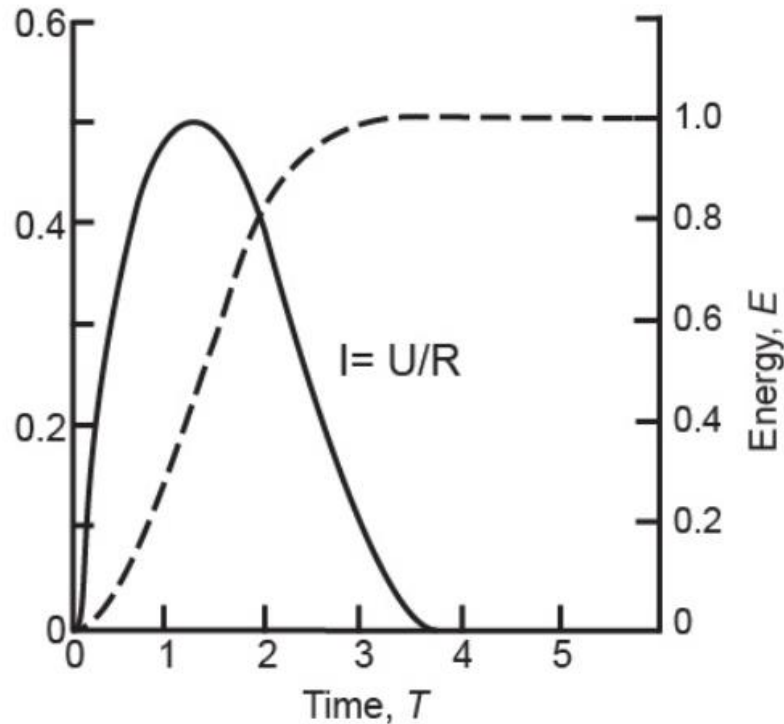


Fonte: [56]

A alta absorção promove o aquecimento destas moléculas a temperaturas superiores a 100°C, ocasionando o aumento da pressão e conseqüente ablação[57]. De acordo com a Lei de Beer-Lambert, o comprimento de absorção é inversamente proporcional ao coeficiente de absorção, o que torna o laser Er,Cr:YSGG com um dos menores valores de profundidade média de transferência de energia para o tecido em comparação com os demais lasers de érbio. Devido ao fenômeno de ablação, este laser é indicado para procedimentos em Odontologia como remoção tecidual, preparos cavitários, gengivoplastias, e incisões em tecido ósseo [55].

Na literatura, os estudos com o pulso do Laser e suas características observaram que o pulso é em forma de sino assimétrico (perfil gaussiano do feixe), com a largura total do intervalo, o pico máximo e na metade do pulso sempre mais próximo do começo de que do final. A forma temporal é típica com tempo de subida lento e um declínio caudal longo. Durante o pulso a energia não é constante [107] como representado na figura 5

Figura 5. Perfil gaussiano do feixe do laser.



Fonte: [107]

Fried *et al.* (1996) [57] estudaram a eficiência dos lasers de Er:YAG e Er,Cr:YSGG para a inibição de cárie analisando também a temperatura superficial por radiometria no infravermelho. Através imagens de MEV, foi observada a ocorrência de ablação a uma temperatura de 300°C para Er:YAG e de 800°C na irradiação do esmalte com o laser Er,Cr:YSGG.

Hossain *et al.* (2001) [45] irradiaram amostras de dentina e esmalte humanos com densidade de energia de 56,6 J/cm<sup>2</sup> e com refrigeração com água a 32% e sem refrigeração. Após submissão das amostras à imersão em 0,1 M de ácido láctico por 24 horas a 36°C e análise por espectrofotometria de força atômica, os autores observaram a baixa dissolução de cálcio nas amostras irradiadas, assim como mudanças morfológicas no tecido, comprovando a eficiência desse laser no aumento da resistência do tecido irradiado à desmineralização e a possibilidade do uso do laser de Er,Cr:YSGG na prevenção das caries.

A diminuição da perda mineral por ação do laser tem sido estudada por diversos autores [45,108,109] que observam o potencial uso para a prevenção das caries. assim como também a associação do flúor com o laser.

Os seguintes autores correlacionaram o uso do laser de Er,Cr:YSGG com aumento a resistência a desmineralização dos tecidos dentários, nesses estudos foi relacionado o uso do flúor como um possível potencializador do efeito do laser:

Freitas *et al.* 2010 [49] observaram em seu estudo com amostras de esmalte humano tratadas com laser Er,Cr:YSGG a 8,5 J/cm e logo após submetidas a ciclagem de pH por 2 semanas que essa pode ser uma alternativa de aprimoramento da resistência ácida do esmalte, outras densidades energia mais baixas também produziram um potencial cariostático similar ao uso do dentífrico fluoretados.

Ana *et al.* 2012 [110], num estudo *in vitro* cego constataram que ocorreu uma maior concentração de fluoreto de cálcio nos grupos irradiados com o laser Er,Cr:YSGG seguidos de aplicação tópica de flúor em comparação ao grupo tratado apenas com o gel de flúor fosfato acidulado e que o laser a 8,5 J/cm<sup>2</sup> de densidade de energia foi capaz de diminuir a perda de dureza do esmalte.

Geraldo-Martins *et al.* (2012) [54] com o objetivo de avaliar os efeitos da resistência ácida do esmalte usaram 40 dentes humanos e observaram que na comparação das profundidades que o laser Er,Cr:YSGG era na camada superficial que atuava. A presença de água durante a irradiação dificulta a obtenção de uma superfície de esmalte mais resistente aos ácidos.

Geraldo-Martins *et al.* (2014) [43] usaram 100 amostras de dentina radicular humana para irradiação com laser de érbio e uso de flúor neutro a 2%, as amostras foram submetidas a ciclagem de pH por 2 semanas. Concluíram que o uso da irradiação laser Er,Cr:YSGG a 4,64 J/cm<sup>2</sup> e 8,92 J/cm<sup>2</sup> sem arrefecimento com água e associado com NaF a 2% podem aumentar a resistência ácida da dentina humana.

Zamataro *et al.* 2013 [65] avaliaram a sinergia da aplicação profissional de flúor acidulado com o laser de Er,Cr:YSGG a 8,5 J/cm<sup>2</sup>, e observaram que o conteúdo de fluoreto de cálcio formado com a aplicação do laser após a ATF (aplicação tópica de flúor) não foi estatisticamente significativo quando comparado aos grupos controle.

Oliveira *et al.* (2017) [64] avaliaram o efeito do laser Er,Cr:YSGG na erosão ácida do esmalte. As taxas de repetição de 10 e 15 Hz mostraram uma diminuição da dureza da superfície. Após um desafio erosivo, grupos de 0,5 e 0,75 W mostraram aumento na dureza da superfície. Os grupos 0,25, 0,5, 0,75 e 1 W mostraram alterações menores na rugosidade da

superfície. A taxa de repetição de pulso de 30 Hz e a potência média de 0,50 W foi considerada o melhor parâmetro para evitar a erosão ácida do esmalte.



## 5. MATERIAL E MÉTODO

### 5.1. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Foi conduzido um estudo *in vitro* randomizado o qual foi dividido em 2 fases experimentais, buscando-se avaliar, na primeira fase, parâmetros seguros do laser de Er,Cr:YSGG ( $\lambda = 2,78 \mu\text{m}$ , 20 Hz, largura temporal de pulso de 60  $\mu\text{s}$ , modo varredura sem refrigeração) para aplicação em prevenção da cárie radicular e, na segunda fase, avaliou-se os efeitos químicos, morfológicos e ópticos de um dos parâmetros selecionados em associação com fluoreto na dentina radicular.

Na primeira fase experimental (Tabela 1), foram realizados estudos de temperatura pulpar, temperatura superficial e morfológico, em que foram empregados 30 dentes unirradiculares humanos e 21 blocos de dentina radicular bovina, respectivamente, os quais foram aleatoriamente distribuídos em três grupos experimentais distintos: **G1**- amostras irradiadas sob densidade de energia de 2,4 J/cm<sup>2</sup>; **G2**- amostras irradiadas com 6 J/cm<sup>2</sup>; **G3**- amostras irradiadas com 12 J/cm<sup>2</sup>. As variações da temperatura superficial foram registradas por meio de termografia no infravermelho; as variações na temperatura pulpar foram avaliadas por termopares tipo K e as alterações morfológicas foram visualizadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV).

Tabela 1: Delineamento experimental da primeira fase deste estudo.

Fatores em estudo	Potências médias – 3 níveis	0,1 W 0,25 W 0,50 W
Unidades experimentais	dentes unirradiculares humanos	estudo de temperatura pulpar
	blocos de dentina radicular bovina	estudo de temperatura superficial e morfológico
Variáveis resposta	variação de temperatura pulpar.	
	variação de temperatura superficial	
	alterações morfológicas.	

Na segunda fase experimental (Tabela 2), foram empregados 90 blocos de dentina radicular bovina, os quais foram aleatoriamente distribuídos em 5 grupos experimentais: **G1**- grupo sem tratamento (controle negativo); **G2**- grupo tratado com flúor fosfato acidulado (FFA, 1,23% F<sup>-</sup>, 4 min, controle positivo); **G3**- amostras irradiadas sob densidade de energia

de 6 J/cm<sup>2</sup>; **G4**- amostras irradiadas e com aplicação posterior de FFA; **G5**- amostras com aplicação de FFA e posterior irradiação laser.

Tabela 2: Delineamento experimental da segunda fase deste estudo.

Fatores em estudo	Potência média – 1 nível	0,25 W
	Aplicação de FFA – 2 níveis	sem aplicação com aplicação
	Ordem dos tratamentos	FFA antes da irradiação laser FFA após a irradiação laser
Unidades experimentais	blocos de dentina radicular bovina	
Variáveis resposta	alterações composicionais	
	alterações no coeficiente de atenuação óptico	
	alterações morfológicas	

Após tratamentos, 3 amostras de cada grupo experimental foram destinadas à avaliação morfológica por MEV, enquanto as demais foram avaliadas composicionalmente pela técnica de reflexão atenuada da espectroscopia de absorção no infravermelho por transformada de Fourier (ATR-FTIR), e opticamente por tomografia por coerência óptica (OCT). Em seguida as amostras foram submetidas a um desafio cariogênico *in vitro* por meio de ciclagem de pH durante 8 dias. Após a ciclagem de pH as amostras foram avaliadas por tomografia por coerência óptica (OCT), onde foi determinado o coeficiente de atenuação óptico das amostras. A análise estatística foi efetuada separadamente para cada variável resposta, considerando-se o nível de significância estatístico de 5%. Para tal, foi considerado o tratamento como fator de variação, sendo a unidade experimental o bloco/dente, dependendo da fase experimental e, como variáveis resposta, tem-se as alterações de temperatura pulpar, temperatura superficial, composicional e de coeficiente de atenuação óptico.

**Análise descritiva:** os dados são quantitativos, contínuos e independentes. As homogeneidades e normalidades dos dados foram testadas com os testes de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente.

**Inferência estatística:** se os pressupostos de homogeneidade e normalidade são confirmados, foi usado o One-Way-ANOVA seguido do teste post hoc de Tukey. Porém, se os pressupostos de homogeneidade e normalidade não foram confirmados, foi empregado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido do teste de Student-Newman-Keuls para diferenciar os grupos.

## 5.2. EQUIPAMENTO LASER EMPREGADO NESTE ESTUDO

Neste estudo, foi empregado o laser de Er,Cr:YSGG (WaterLase MD, Biolase Technology Inc., San Clemente, CA), do Laboratório de Biofotônica do Centro de Lasers e Aplicações do IPEN-CNEN/SP (Figura 6). Este *laser* emite no comprimento de onda de 2,78  $\mu\text{m}$ , com largura temporal de pulso de 60  $\mu\text{s}$ , por meio de uma fibra óptica flexível de 600  $\mu\text{m}$  de diâmetro terminada por uma ponta de cristal de safira banhada por um spray de ar/água ajustável. Em todas as fases experimentais deste estudo, as irradiações foram realizadas com ponta de safira tipo MZ6 (600  $\mu\text{m}$  de diâmetro), com ausência de spray ar-água, taxa de repetição de 20 Hz e distância padronizada de 1 mm da superfície da dentina. Para padronização da distância e da velocidade das irradiações, foi empregado um deslocador micrométrico de passo X-Y-Z (Modelo ESP300, Newport Corporation, CA, USA), ajustado com velocidade controlada de 7,6 mm/s [111]. Antes de cada irradiação, as energias emitidas pelo equipamento laser foram aferidas com medidor de potência e energia (FieldMaster GS + Detector LM45, Coherent, USA).

Figura 6: Posicionamento da peça de mão do laser durante as irradiações.



Fonte: próprio autor.

### **5.3. FASE EXPERIMENTAL 1:**

#### **DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS SEGUROS DE IRRADIAÇÃO**

##### **5.3.1. AVALIAÇÃO DE TEMPERATURA SUPERFICIAL**

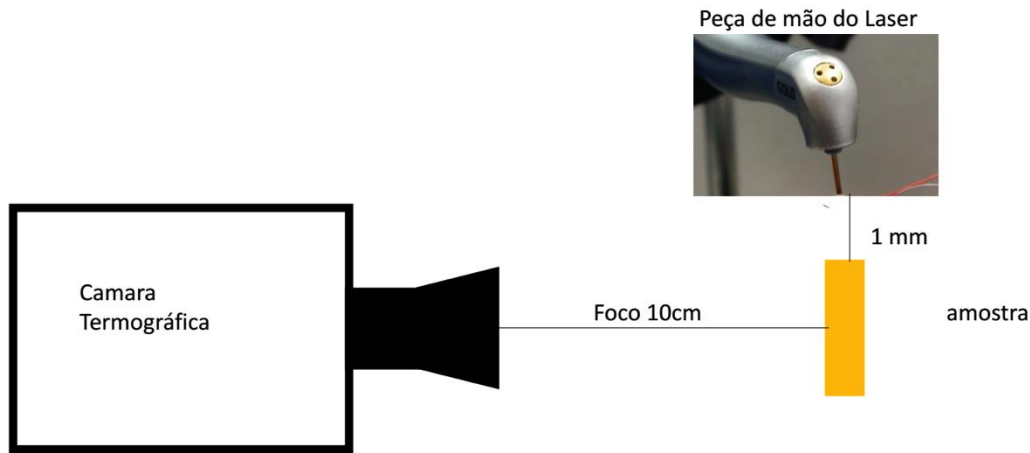
###### **5.3.1.1. Preparo das amostras**

Quinze dentes incisivos inferiores bovinos foram obtidos em frigorífico certificado após a aprovação do presente estudo pela Comissão de Ética em Uso de Animais da Universidade Federal do ABC (CEUA) protocolada sob número CEUAx3055120915 (Anexo B). Após lavagem e limpeza dos dentes, as raízes foram separadas das coroas na altura da junção amelocementária (JAC) com discos de carborundum sob refrigeração. As coroas foram reservadas e as raízes foram separadas no seu longo eixo, obtendo-se 30 amostras. Cada raiz de dente bovino foi lixada e planificada até a obtenção de amostras com espessura de 2 mm, aferida com micrômetro digital (Digimess, 100.249, China). Após o preparo, as mesmas foram limpas em cuba ultrassônica e conservadas em água deionizada com timol a 0,1% sob refrigeração +4°C até o momento dos experimentos.

###### **5.3.1.2. Procedimento experimental**

Para estas análises, as amostras foram posicionadas individualmente em suportes ópticos com auxílio de cera odontológica tipo 7, sobre o motor de passo micrométrico com velocidade de 7,6mm/s, possibilitando que a amostra se movimente abaixo da peça de mão do laser. Desta forma, foi possível verificar a elevação de temperatura decorrente de apenas um único pulso laser. A peça de mão do laser foi posicionada por meio de suportes ópticos, de forma que a ponta de safira se mantivesse estática e perpendicular, a uma distância padronizada de 1 mm da superfície da amostra a ser irradiada, na borda da amostra, conforme pode ser verificado na Figura 7. A montagem foi realizada de forma que apenas uma única linha de irradiação fosse efetuada na borda da amostra voltada para a câmera termográfica, o que possibilitou a análise da elevação da temperatura decorrente de um único pulso, e não da sobreposição dos mesmos.

Figura 7: Esquema de montagem realizada para mensuração da temperatura superficial da dentina durante as irradiações.

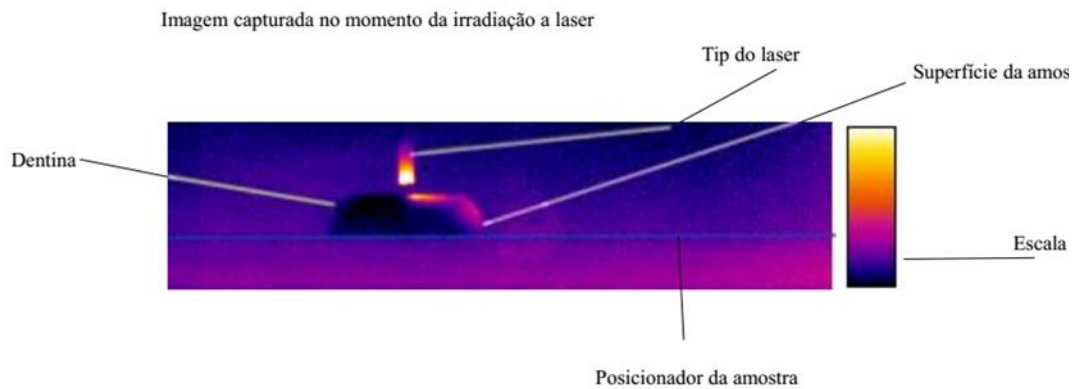


Fonte: próprio autor

Para as análises, foi empregada uma câmera termográfica (ThermaCam FLIR SC3000 Systems, USA), pertencente ao Laboratório de Biofotônica do Centro de Lasers e Aplicações (IPEN-CNEN/SP), a qual foi posicionada de frente para a borda da amostra e ponta de safira do *laser*, a uma distância padronizada de 10 cm. Para as medidas, a temperatura ambiente foi mantida estável e controlada em 21,1°C, umidade relativa do ar controlada (ao redor de 68%) e considerando a emissividade do dente igual a 0,91[112].

Buscando uma melhor definição das imagens e melhor detecção das variações de temperatura considerando-se a largura temporal do *laser*, as imagens foram obtidas com resolução de 0,01°C, utilizando-se frequência de gravação da câmera de 180 Hz e faixa de gravação de temperatura da câmera para os grupos 1 e 2 de 10°C a 100°C, e para o grupo 3 de 100°C a 500°C. A Figura 8 mostra uma imagem em infravermelho em que é possível evidenciar o posicionamento entre amostra e ponta de safira do laser, o que possibilita a análise de temperatura na borda da amostra.

Figura 8: Imagem em infravermelho representativa para evidenciar o posicionamento da amostra em relação à ponta de safira.



Fonte: próprio autor.

Para este experimento, as amostras foram aleatoriamente distribuídas em três grupos experimentais ( $n = 10$ ):

- **Grupo1:** potência média de 0,10W, energia por pulso de 4,32 mJ e densidade de energia de  $2,4 \text{ J/cm}^2$ .
- **Grupo2:** potência média de 0,25W, energia por pulso de 8,67 mJ e densidade de energia de  $6 \text{ J/cm}^2$ .
- **Grupo3:** potência média de 0,50W, energia por pulso de 18,9 mJ e densidade de energia de  $12 \text{ J/cm}^2$ .

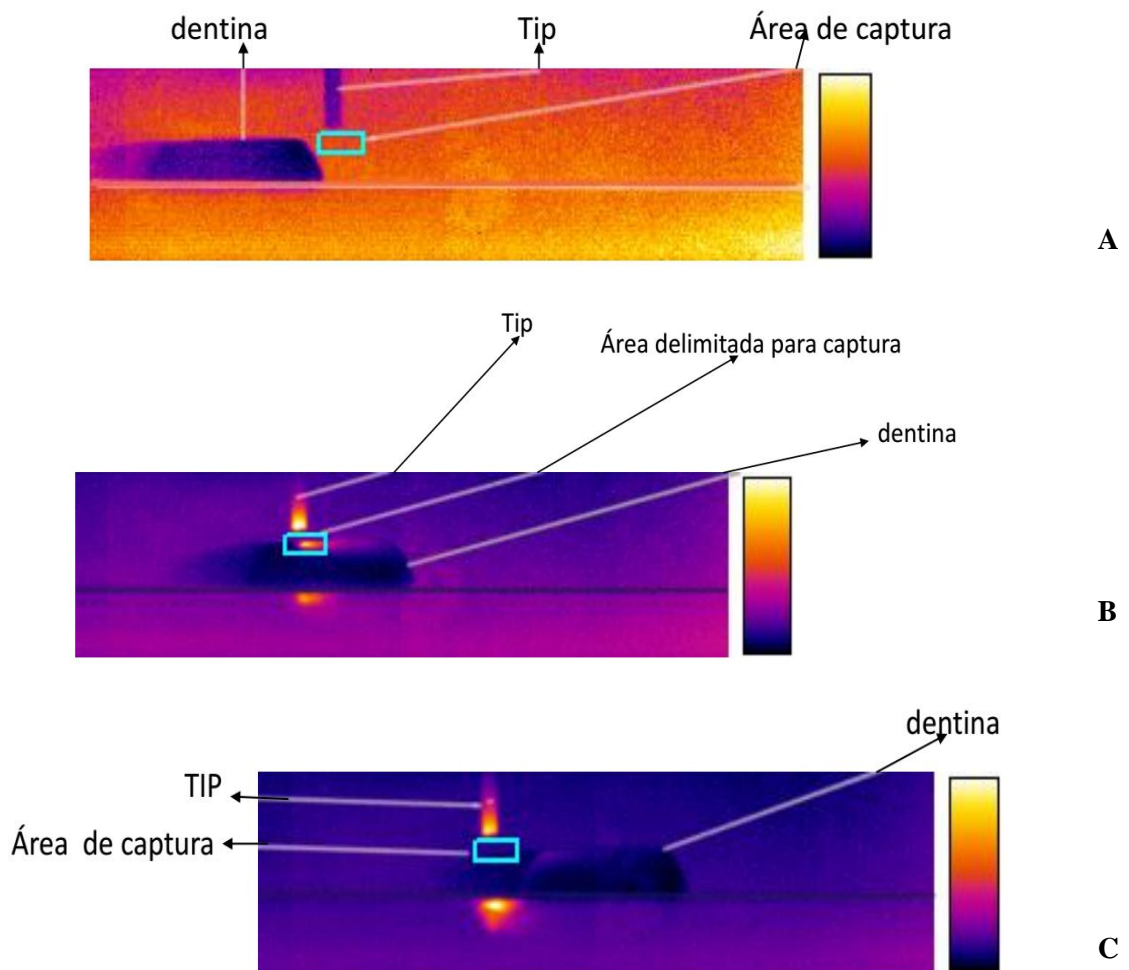
No momento das irradiações, a câmera foi mantida ligada por 5 s antes da irradiação laser para se verificar a temperatura inicial da medida; em seguida, a irradiação laser foi efetuada por um tempo padronizado de 2 s e, após, a câmera foi mantida ligada por mais 1 minuto visando-se gravar o declínio da temperatura de cada amostra ao seu valor inicial [51].

### 5.3.1.3. Análise dos dados

Os dados de temperatura foram gravados filmes. Para as análises, foi delimitada uma área retangular superficial, imediatamente adjacente à fibra óptica do laser, o que garantiu a detecção da maior temperatura da dentina ocorrida durante as irradiações. A Figura 9 apresenta imagens em infravermelho representativas obtidas pela câmera termográfica durante diferentes momentos no experimento. As temperaturas máximas foram capturadas pelo

software Image View somente na área delimitada pelo retângulo; observa-se que a *tip* do *laser* foi deixada fora do retângulo e somente a superfície da amostra estava contida nele.

Figura 9: Imagens em infravermelho representativas de diferentes momentos de gravação durante medidas de temperatura superficial durante as irradiações. Em A, observa-se a imagem anterior a irradiação; em B a imagem durante a irradiação, em que se nota que a área delimitada não incluiu a *tip* do laser; em C a imagem após a irradiação, nota-se que a *tip* do laser ainda apresenta temperatura elevada, porém fora da área delimitada.



Fonte: próprio autor

## **5.3.2. AVALIAÇÃO DA TEMPERATURA PULPAR**

### **5.3.2.1. Preparo das amostras**

Para a realização deste estudo, foram utilizados 30 dentes incisivos inferiores humanos, os quais foram obtidos por exodontias de pacientes sob atendimento odontológico, por motivos que não os desta pesquisa, após aprovação do presente projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do ABC (CAAE 49456715.0.0000.5594, número do parecer 1.334.133, Anexo C).

Os dentes foram lavados com água corrente e detergente aniônico, e se realizou a raspagem ultrassônica e profilaxia com pedra-pomes e água para a remoção de seus indutos orgânicos. Até o momento dos experimentos, as amostras foram mantidas em ambiente úmido (em algodão estéril umedecido com água deionizada com timol a 0,1% sob refrigeração a 4°C).

A remoção de restos pulpare e limpeza completa de seus condutos radiculares e da câmara pulpar foi realizada por meio de limas endodônticas tipo K #80 e água destilada. Com auxílio de seringas descartáveis para insulina, uma "polpa artificial" foi introduzida na câmara pulpar. A função desta "polpa artificial" foi proporcionar um material que preencha o espaço vazio dentro da câmara pulpar, proporcionando um ambiente térmico de condução semelhante à polpa vital. Para tal, a câmara pulpar e o canal radicular destes dentes foram preenchidos em sua totalidade com uma solução de gelatina a 10% [113]. Seus componentes, sendo predominantemente proteína e água, são muito semelhantes a uma polpa dentária e, desta maneira, espera-se que ofereça propriedades térmicas semelhantes. Outra vantagem deste material é que o mesmo se comporta a um gel que, desta maneira, pode segurar o termopar no lugar correto dentro da câmara pulpar.

Em cada dente foi feito, pela face lingual, com brocas esféricas diamantadas #1012 em alta rotação, um acesso na região cervical até a câmara pulpar para inserção dos termopares.



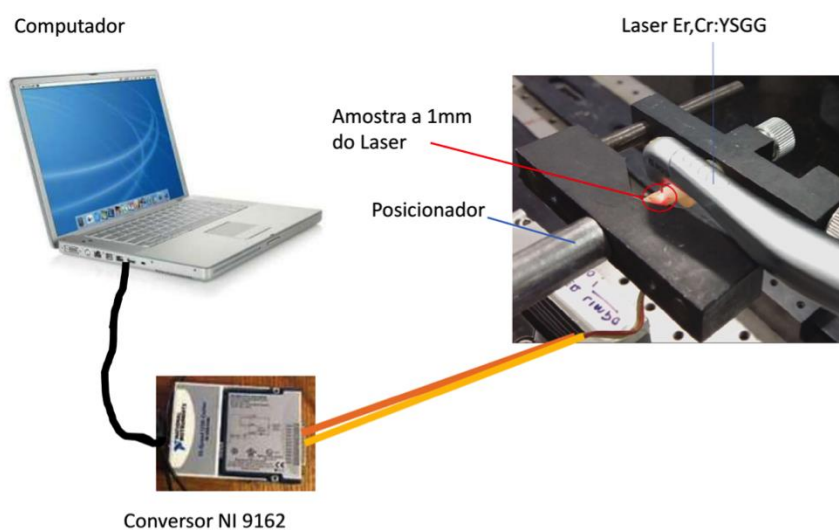
### 5.3.2.2. Procedimento experimental

As amostras assim preparadas foram aleatoriamente distribuídas em três grupos experimentais (n = 10):

- **Grupo1:** potência média de 0,10W, energia por pulso de 3,74 mJ e densidade de energia de 2,4 J/cm<sup>2</sup>.
- **Grupo2:** potência média de 0,25W, energia por pulso de 8,08 mJ e densidade de energia de 6 J/cm<sup>2</sup>.
- **Grupo3:** potência média de 0,50W, energia por pulso de 16,8 mJ e densidade de energia de 12 J/cm<sup>2</sup>.

Para as irradiações, a fibra óptica do laser foi posicionada em suporte óptico, de forma que fosse mantida a distância fibra-amostra preconizada de 1 mm, conforme esquema mostrado na Figura 10. A fibra do laser foi posicionada perpendicularmente à superfície vestibular cervical das raízes das amostras, simulando a aplicação da irradiação em local da exposição dentinária de maior ocorrência de lesões cervicais cariosas. O experimento foi realizado a uma temperatura controlada de 21°C e umidade relativa do ar ao redor de 74%.

Figura 10: Esquema de montagem da amostra em relação à peça de mão do laser para medida de temperatura pulpar.



Fonte: próprio autor.

As irradiações foram realizadas sob a forma de varredura durante 10 s, sobre uma superfície de 3 x 3 mm de dentina radicular cervical, visando simular um procedimento clínico. A fibra óptica do laser, juntamente com os suportes ópticos de sustentação, foi movimentada por um deslocador automático micrométrico ajustado a uma velocidade de 7,6 mm/s.

A mensuração da temperatura pulpar durante as irradiações foi aferida com termopares de resposta rápida inseridos nas raízes dos dentes, até a câmara pulpar, pelas aberturas realizadas na face lingual dos dentes. Os termopares calibrados do tipo K (chromel-alumel, Omega Engineering, Stamford, USA), com 0,05 mm de diâmetro da ponta e sensibilidade para variações entre 0,1-100°C, foram conjugados a um conversor (NI USB 9162, National Instruments, Texas, USA) conectado a um computador. Todo o sistema pertence ao Laboratório de Biofotônica do Centro de Lasers e Aplicações do IPEN-CNEN/SP. Após a inserção do termopar na câmara pulpar, foi observado, em estudo piloto, que foram necessários 3 minutos de espera para que a temperatura da amostra ficasse estável. Cada grupo foi irradiado por 10 segundos e aguardaram-se mais 5 minutos até que a temperatura da amostra retornasse ao estado inicial.

### **5.3.2.3. Análise dos dados**

Os dados de temperatura x tempo foram gravados pelo software NI LabView Signal Express (Texas, USA), em seguida, foram transportados para planilhas em Microsoft Excel (Redmond, USA), onde foram calculados os valores de variação de temperatura (Delta), com os valores das médias e desvios-padrão. Os gráficos foram traçados usando-se o software OriginPro 8 (Massachusetts, USA).

### **5.3.3. AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA**

A partir de 3 dentes incisivos inferiores bovinos, os quais foram obtidos em frigorífico certificado após a aprovação do presente estudo pela Comissão de Ética em Uso de Animais da Universidade Federal do ABC (CEUA) protocolada sob número CEUAx 3055120915 Anexo B, foram obtidos 6 blocos de dentina radicular cervical de 4 x 4 x 2 mm [114] empregando-se discos de carborundum sob refrigeração. Os blocos de dentina foram depois

conservados em água deionizada com timol a 0,1% e sob refrigeração +4°C até o momento dos tratamentos. Os blocos de dentina foram aleatoriamente distribuídos em 3 grupos de 2 amostras cada:

- **Grupo1:** potência média de 0,10W, energia por pulso de 3,74 mJ e densidade de energia de 2,4 J/cm<sup>2</sup>.
- **Grupo2:** potência média de 0,25 W, energia por pulso de 8,08 mJ e densidade de energia de 6 J/cm<sup>2</sup>.
- **Grupo3:** potência média de 0,50 W, energia por pulso de 16,8 mJ e densidade de energia de 12 J/cm<sup>2</sup>.

As irradiações foram efetuadas empregando-se metodologia descrita no item 5.3.2.2. Após, as amostras foram desidratadas em soluções de concentrações crescentes de álcool (30%, 50%, 70%, 90%, 96% e 100%), com duas lavagens de 5 minutos em cada solução. Após a desidratação, as amostras foram coladas em suportes metálicos apropriados (*stubs*) com fita carbono dupla face, com o uso de evaporador a vácuo (*sputtering* da marca LEICA EM ACE 2000) onde foi depositado um filme fino de ouro (espessura de 10µm) sobre as amostras por 20 segundos.

A avaliação morfológica foi efetuada empregando-se o microscópio eletrônico de varredura FEI Quanta, pertencente à Central Multiusuário da UFABC.

## **5.4. FASE EXPERIMENTAL 2:**

### **AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA IRRADIAÇÃO LASER DURANTE DESAFIO CARIOGÊNICO *IN VITRO***

#### **5.4.1. Preparo das amostras**

Quarenta e cinco dentes incisivos inferiores bovinos foram obtidos em frigorífico certificado após a aprovação do presente estudo pela Comissão de Ética em Uso de Animais da Universidade Federal do ABC (CEUA) protocolada sob número CEUAx 3055120915 Anexo B. Após lavagem e limpeza dos dentes, as raízes foram separadas das coroas na altura da junção amelocementária (JAC) com discos de carborundum sob refrigeração. As coroas foram reservadas e as raízes foram separadas no seu longo eixo. Setenta e cinco blocos de dentina de 4x4x2 mm foram assim retirados do terço cervical das raízes dos dentes bovinos [115].

Os blocos de dentina foram planificados, lixados e polidos [114] depois conservados em água deionizada com timol a 0,1% e sob refrigeração +4°C até o momento dos tratamentos. Os blocos de dentina foram aleatoriamente distribuídos em 5 grupos de 18 amostras cada:

- Grupo1: sem tratamento (grupo controle negativo);
- Grupo2: aplicação de flúor fosfato acidulado (FFA, grupo controle positivo);
- Grupo3: irradiação laser;
- Grupo4: irradiação laser seguida da aplicação de FFA;
- Grupo5: aplicação de FFA seguida da irradiação laser.

As irradiações foram feitas empregando-se potência média de 0,25 W, energia por pulso de 8,36 mJ e densidade de energia de 6 J/cm<sup>2</sup>. A área irradiada foi de 7 x 7 mm<sup>2</sup> regulada pelo motor de passo micrométrico X-Y-Z, conforme descrito anteriormente.

Na aplicação de tópica de FFA, foi empregado o Flúor Gel Maquira (Maquira, Maringá, Paraná, Brasil), 1,23% de flúor, 0,1 M de ácido fosfórico e pH entre 3,6 a 3,9. Este foi aplicado abundantemente na superfície das amostras com auxílio de cotonetes e deixado em repouso por 4 minutos [114]. O gel foi retirado, após esse período, com enxague em água deionizada por um minuto, sendo as amostras secas com lenços de papel.

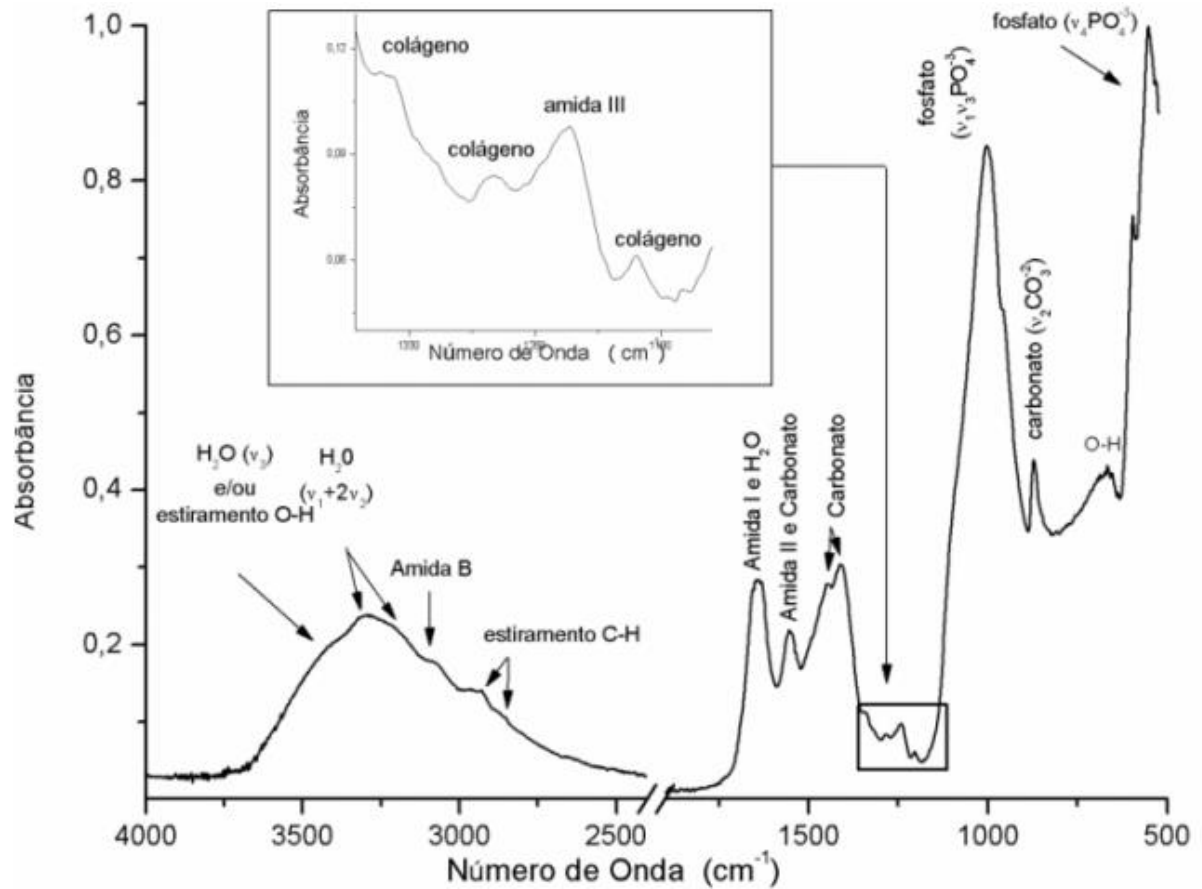
Das 18 amostras de cada grupo experimental, 15 foram submetidas à análise composicional, posterior ciclagem de pH e avaliação do coeficiente de atenuação óptico, enquanto que as 3 amostras restantes foram destinadas à avaliação morfológica imediatamente após os tratamentos, conforme descrito a seguir.

#### **5.4.2. Análise composicional**

A análise composicional foi realizada empregando-se a técnica de reflexão total atenuada da espectroscopia de absorção no infravermelho por transformada de Fourier (ATR-FTIR). Os espectros ATR-FTIR de cada amostra foram obtidos com resolução de  $4,0\text{ cm}^{-1}$ , com 80 varreduras, na faixa espectral entre  $4000$  a  $650\text{ cm}^{-1}$ , em um espectrômetro Frontier (Perkin Elmer, EUA) usando um cristal de diamante. Em cada bloco, foi coletado um único espectro em uma área de  $1,5\text{ mm}^2$  que corresponde ao tamanho do cristal de diamante. Antes de cada coleta, foi subtraído um sinal de *background*.

As bandas de absorção consideradas para este estudo foram: fosfato ( $1300-900\text{ cm}^{-1}$ ), amida I ( $1680-1600\text{ cm}^{-1}$ ), amida II ( $1580-1480\text{ cm}^{-1}$ ), amida III ( $1200-1300\text{ cm}^{-1}$ ), o modo de vibração  $\nu_2$  do carbonato (cerca de  $870\text{ cm}^{-1}$ ) e a superposição do alongamento  $\nu_3$  e flexão  $\nu_4$  modo de vibração do carbonato (entre  $1600-1300\text{ cm}^{-1}$ ) representadas na figura 11.

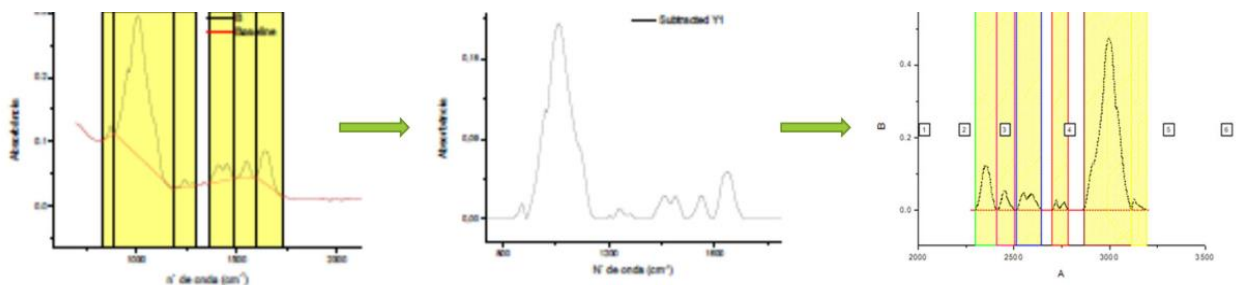
Figura 11: Bandas de absorção na dentina observadas no FTIR.



Fonte: [111]

Após a seleção das bandas, houve a subtração da linha de base e, para uma comparação semi-quantitativa entre os grupos, as áreas sob as bandas de absorção consideradas foram calculadas após a normalização pela área da faixa de fosfato (1300-900  $\text{cm}^{-1}$ ) [111,116] como apresentado na figura 12

Figura 12: Gráficos feitos no Origin 8, com a subtração da baseline e a normalização.



### 5.4.3. Análise morfológica

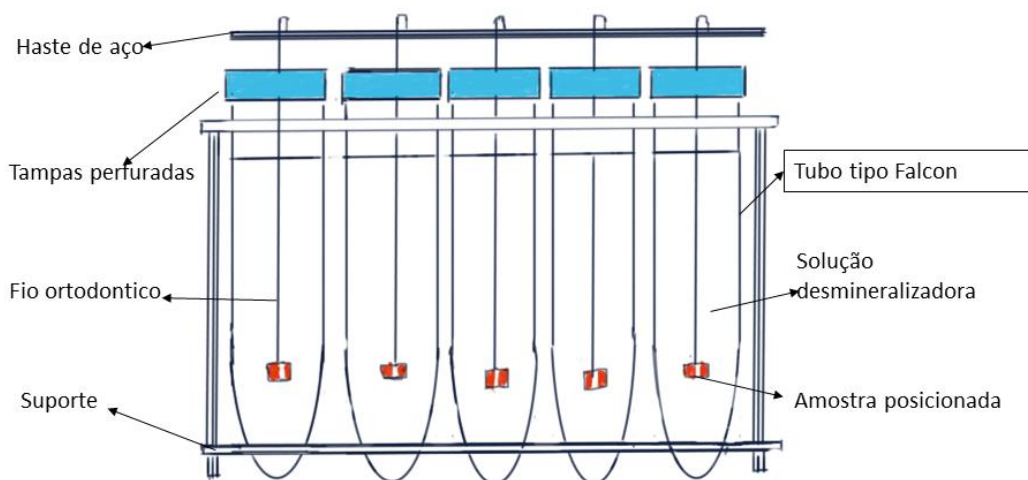
Três amostras de cada grupo experimental, que não foram submetidas à ciclagem de pH, foram submetidas à lavagem ultrassônica (Cristófoli, Brasil) por 10 minutos. Em seguida, as amostras foram desidratadas em soluções de concentrações crescentes de álcool (30%, 50%, 70%, 90%, 96% e 100%), com duas lavagens de 5 minutos em cada solução. Após a desidratação, as amostras foram coladas em suportes metálicos apropriados (*stubs*) com fita carbono dupla face, onde foi depositado um filme fino de ouro (espessura de 10 µm) sobre as mesmas por 20 segundos com uso de um *sputtering* (LEICA EM ACE 2000). A avaliação morfológica foi efetuada empregando-se o microscópio eletrônico de varredura FEI Quanta, pertencente à Central Multiusuário da UFABC.

### 5.4.4. Desafio cariogênico *in vitro*: ciclagem de pH

Para a simulação do desafio cariogênico *in vitro* por ciclagem de pH, foi necessário delimitar a área das amostras que foram submetidas a ciclagem de pH [117]. Em etiquetas autoadesivas (Pimaco, RJ, Brasil), foram confeccionadas máscaras de 2 x 4 mm, as quais foram coladas na superfície tratada das amostras. O restante da amostra foi protegido com verniz ácido resistente em 2 camadas e posteriormente recobertas com cera 7 (Lysanda, SP, Brasil). O adesivo foi retirado com uso de água destilada e explorador expondo 8 mm<sup>2</sup> de dentina [114].

Ainda para simulação da cárie, as amostras foram posicionadas com cera 7 em suportes confeccionados com fio ortodônticos de 0,08 mm de diâmetro (Morelli, SP, Brasil). Esses suportes de fio ortodôntico foram presos às tampas de tubos tipo Falcon de 50 ml (Cralplast, SP, Brasil) enumeradas para a identificação das amostras. Os fios ortodônticos foram regularizados para que as amostras ficassem imersas totalmente nas soluções de ciclagem de pH, sendo assim possível que cada amostra fosse submetida a ciclagem de pH individualmente e toda área delimitada exposta igualmente. As tampas dos tubos tipo Falcon foram perfuradas com brocas diamantadas (KG Sorensen 1111F, SP, Brasil); os fios ortodônticos passaram por essas perfurações e foram atados a uma haste de aço, o que permitiu que grupos de amostras fossem trocados de solução ao mesmo tempo Figura 13.

Figura 13: Esquema dos tubos tipo Falcon preparados para ciclagem de pH.



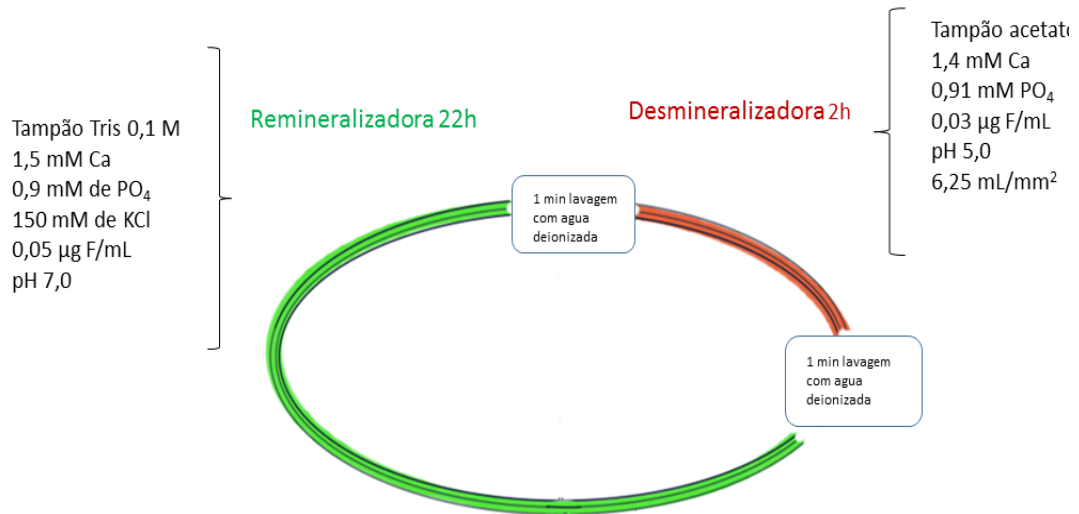
Fonte: próprio autor.

Para a ciclagem de pH, foram preparados 4 litros de solução desmineralizadora e 2 litros de solução remineralizadora de acordo com o modelo de Ten Cate & Duijsters (1982) [118] modificada por Queiroz *et al.* (2004) [119]. A solução desmineralizadora é constituída de 1,4 mM de cálcio, 0,91 mM de fosfato, 0,06 $\mu$ g F<sup>-</sup>/mL, tampão acetato 0,05 M e pH 5,0 e a solução remineralizada a constituída de 1,5 mM de cálcio, 0,9 mM de fosfato, 150 mM de KCl, 0,05  $\mu$ g F<sup>-</sup>/mL, 0,1 M de tampão Tris, pH 7,0 e timol a 0,1%.

Os blocos de dentina foram submersos em solução desmineralizadora (DES) por um período de 2 horas (6,25 mL/mm<sup>2</sup> de amostra); depois, cada amostra foi lavada por 10 segundos com água deionizada, seca suavemente com lenços de papel e posteriormente submersa em uma solução remineralizadora (RE) por um período de 22 horas (3,12 mL/mm<sup>2</sup> de amostra). Depois de cada ciclo, as amostras retornaram às mesmas soluções. A ciclagem durou 8 dias, sendo que, no quarto dia de ciclagem, as soluções foram trocadas e, no último dia, as amostras ficam 24h na solução remineralizadora (Ten Cate & Duijsters, 1982 [118] modificada por Queiroz *et al.*, 2004 [119]). Em todo o período, as amostras permaneceram em estufa com temperatura controlada de 37°C e só foram retiradas para troca de solução Figura 14.



Figura 14. Esquema da ciclagem de pH empregada no presente estudo.



Fonte: próprio autor.

Após a ciclagem de pH, as amostras foram armazenadas em ambiente úmido sob refrigeração a 4 °C.

#### 5.4.5. Análise do coeficiente de atenuação óptico (OCT)

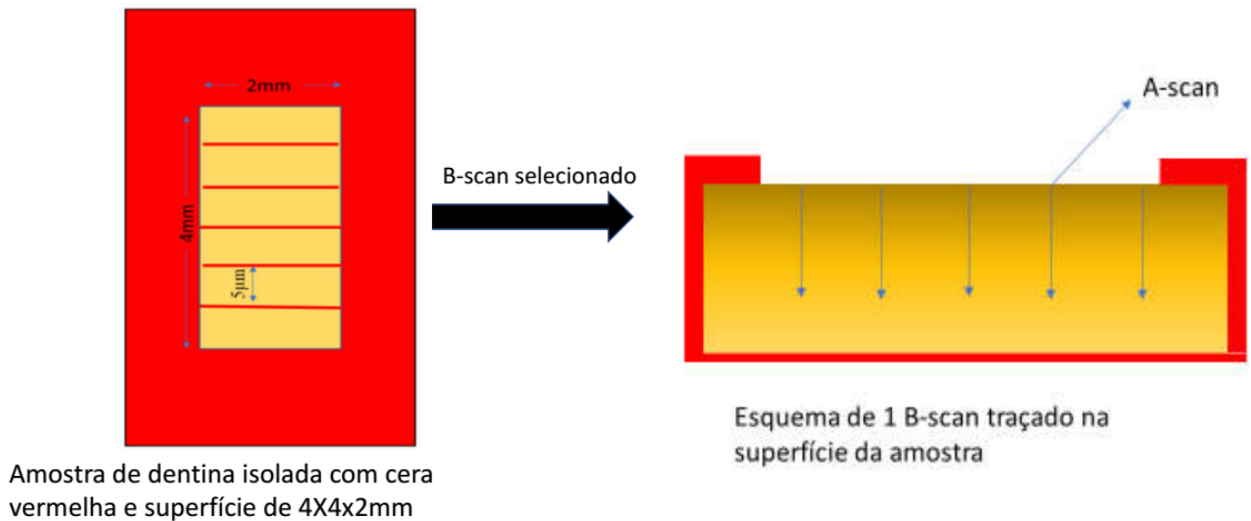
A avaliação óptica das amostras foi efetuada em dois momentos distintos: após os tratamentos e após ciclagem de pH. Contudo, a análise de coeficiente de atenuação óptico foi realizada nas amostras de dentina bovina apenas após ciclagem de pH. Foi utilizado o equipamento de OCT Callisto (Thorlabs, New Jersey, USA) da Central Multiusuário da Universidade Federal do ABC de São Bernardo do Campo. Esse equipamento identifica detalhes diminutos em áreas pequenas, características de sistemas biológicos, e permite o mapeamento destas áreas sem danos para as amostras. Este tipo de análise é conseguido devido ao comprimento de onda de excitação (domínio spectral: 930nm que tem menor penetração no tecido biológico que os de excitação na faixa de 800nm), 1,2 kHz, resolução lateral de 8µm, resolução axial de 7,0 µm, profundidade máxima de imageamento de 1,6 mm e probe para imagem 3D. Com o intuito de padronizar os resultados as imagens foram adquiridas sob os mesmos parâmetros que se encontram na Tabela 3a seguir.

Tabela 3 Parâmetros de *scan* utilizados no OCT para aquisição das imagens.

<b>Parâmetros de scan</b>			
	<b>X</b>	<b>Z</b>	unidade
<b><i>Tamanho</i></b>	2000	300	pixel
<b><i>FOV</i></b>	3,04	1	mm
<b><i>Tamanho de pixel</i></b>	1,52	3,34	$\mu\text{m}$

As amostras foram posicionadas no equipamento com uso de material posicionador, o qual permitiu que as amostras ficassem paralelas ao *probe* do OCT e imóveis durante a captação das imagens. Foram realizadas 5 varreduras por amostra a uma distância de 500  $\mu\text{m}$  entre elas, como representado na Figura 15.

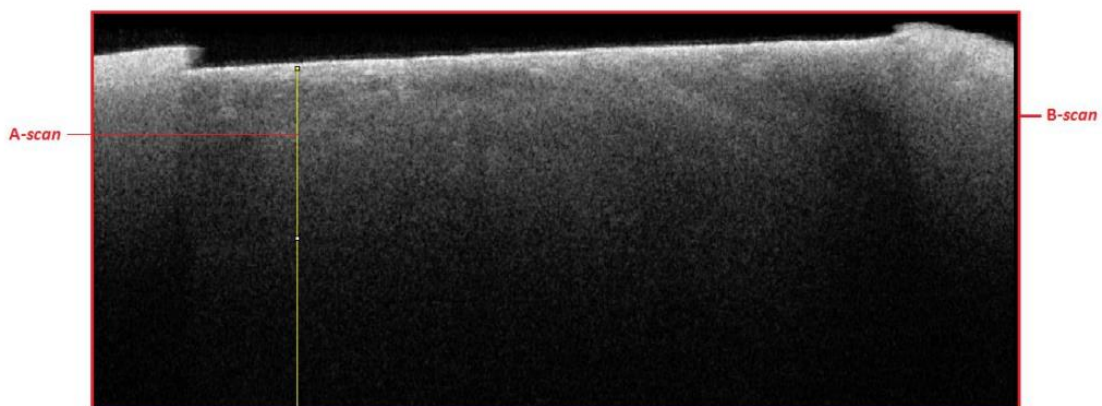
Figura 15: Representação do B-scan e do A-scan



Fonte: próprio autor

Cada um desses 5 escaneamentos selecionados corresponde a um B-scan da amostra de dentina, e em cada imagem adquirida de B-scan foram capturadas 5 A-scan, com o auxílio do *software* ImageJ (JAVA based image processing, National Institutes of Health), que foi utilizado para visualização e análise das imagens. Durante a delimitação da região A-scan, para que não fossem capturados os pixels negros do ar, foi delimitado apenas a imagem da amostra conforme pode ser observado no Figura 16.

Figura 16: B-scan representativo do experimento, demonstrando a captura de A-scan.



O *software* ImageJ, de cada região delimitada, forneceu um gráfico (Tons de cinza x Distância (pixels)) e uma Tabela com os dados organizados. Considerando que existem 256

tons de cinza, indo do branco até o preto, o programa *ImageJ* plota gráficos e tabelas a partir dos dados coletados, onde X representa o pixel e Y o tom de cinza atribuído para este pixel. O valor de Y está compreendido entre 255 (pixel branco) e 0 (pixel preto). Para que os dados pudessem ser analisados no *software* Origin Pro 8 (Copyright 1991 –2007, OriginLab Corporation, Version 8E), manteve-se a mesma resolução para todas as imagens para que os valores dos *pixels* fossem convertidos para uma escala de profundidade, de tal forma que a cada pixel a profundidade aumentava em  $3,34 \times 10^{-3}$  mm processado com o Microsoft Excel 2016. Os dados obtidos e convertidos para unidades de profundidade x tons de cinza foram analisados no *software* Origin Pro 8. Utilizando a função Exp2PMod1, representada pela Equação 1, foi realizado um ajuste exponencial dos dados.

$$Y = ae^{bx} \quad (\text{Equação 1})$$

Segundo Maia *et al* (2015) [120], o coeficiente de atenuação óptica pode ser calculado por uma equação (Equação 2) similar à Lei de Beer-Lambert, onde  $I(z)$  representa a intensidade do pixel em função da profundidade  $z$  e  $\mu$  representa o coeficiente de atenuação óptica.

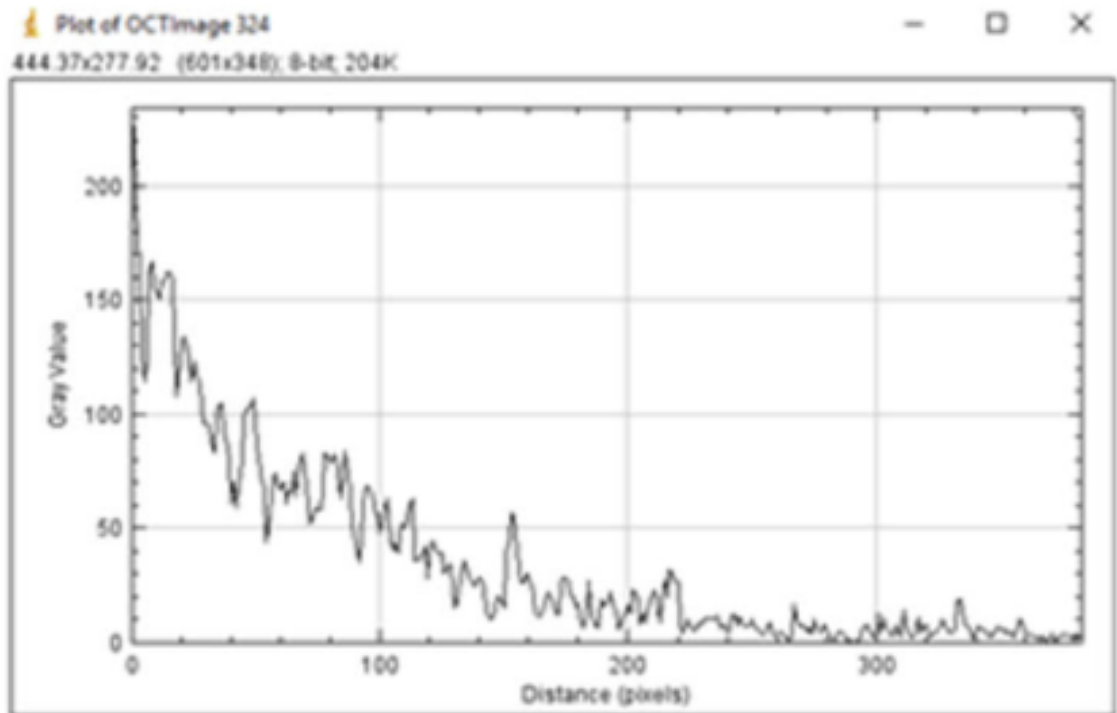
$$I(z) = I_0 e^{-2\mu z} \quad (\text{Equação 2})$$

Comparando as equações 1 e 2, observa-se que ambas são similares, a não ser pelo exponencial da equação 2 ser  $-2\mu z$ , ou seja, o detector do OCT encontra-se acima da amostra, paralelamente a fonte do laser. Portanto o feixe do laser percorre a amostra na ida e volta. Para a obtenção do coeficiente de atenuação óptica foi necessário dividir b da equação 1 por -2, como está na equação 3.

$$\mu = b/-2 \quad (\text{Equação 3})$$

Na Figura 17 é observado um exemplo do ajuste exponencial em um *A-scan* obtido no experimento processado pelo Origin Pro 8 após o ajuste exponencial.

Figura 17: Gráfico apresentado pelo software Origin Pro 8 ao ser solicitado o ajuste exponencial dos dados utilizando a equação  $\exp(2PMod1)$ .



Desta forma, cada valor de  $b$  é capturado e copiado para uma tabela elaborada no software Microsoft Excel 2016 para organizar e calcular o coeficiente de atenuação óptica resultante para cada imagem *B-scan*, assim como seu desvio padrão. Para cada amostra foram obtidos 5 *B-scan* e de cada *B-scan* obtido foi coletado outros 5 *A-scan*. O coeficiente de atenuação médio para cada amostra foi obtido calculando a média dos coeficientes obtidos de cada *A-scan*. A análise estatística foi obtida utilizando o software Biostat 5.0.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. FASE 1: DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS SEGUROS DE IRRADIAÇÃO

#### 5.1.1. AVALIAÇÃO DE TEMPERATURA SUPERFICIAL

As amostras de dentina foram irradiadas com Laser Er,Cr:YSGG e suas temperaturas monitoradas com o uso da câmera de termografia no infravermelho, as imagens obtidas geraram gráficos e tabelas de cada amostra de dentina testada. Esses dados foram analisados e transformados em tabelas e gráficos.

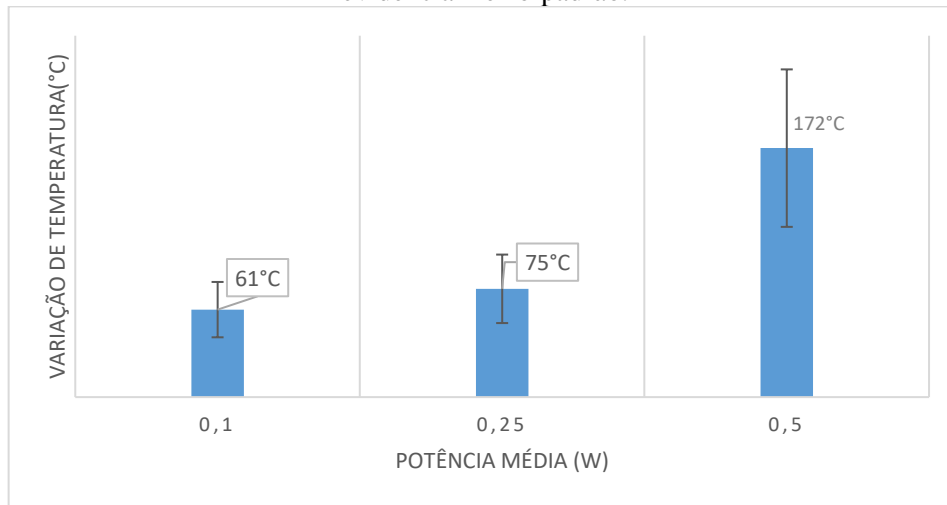
A Tabela 4 evidencia os valores médios de elevação de temperatura superficial obtidos durante a irradiação da dentina com Laser de Er,Cr:YSGG. É possível evidenciar que o grupo irradiado com 0,50 W aumentou significativamente a temperatura superficial da dentina quando comparado aos demais grupos experimentais ( $p < 0,01$ ). As elevações de temperatura promovidas quando a dentina é irradiada com 0,1 W e 0,25 W não diferem entre si ( $p > 0,05$ ). Tais valores e seus respectivos erros-padrão estão ilustrados na Figura 18.

Tabela 4: Valores médios de variação de temperatura ( $\Delta T$ , °C) da dentina irradiada e respectivos valores de desvio-padrão (DP) para cada grupo experimental\*.

Potência média	$\Delta T \pm DP$
0,1 W	$61 \pm 26^a$
0,25 W	$75 \pm 34^a$
0,50 W	$172 \pm 36^b$

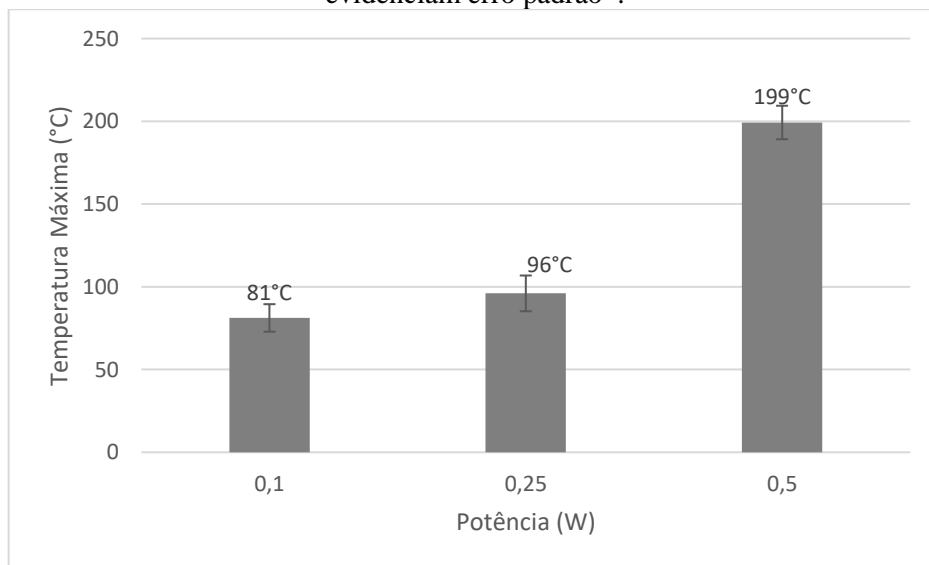
\* Letras diferentes evidenciam médias estatisticamente distintas de acordo com o teste de Tukey. Dados não transformados.

Figura 18: Médias das variações de temperatura superficiais obtidas durante as irradiações. As barras evidenciam erro-padrão.



A Figura 19 ilustra as médias de valores máximos de temperatura (picos de temperatura) obtidos durante as irradiações, em que é possível notar que as irradiações realizadas com potência média de 0,5 W promoveram temperaturas máximas significativamente maiores ( $199 \pm 32^{\circ}\text{C}$ ) que os demais grupos experimentais ( $81 \pm 26^{\circ}\text{C}$  e  $96 \pm 34^{\circ}\text{C}$ , para os grupos irradiados com 0,1 W e 0,25 W, respectivamente). Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes na comparação entre as temperaturas máximas promovidas pelas irradiações com potência média de 0,1W e 0,25 W.

Figura 19: Média das temperaturas superficiais máximas obtidas durante as irradiações. As barras evidenciam erro padrão\*.



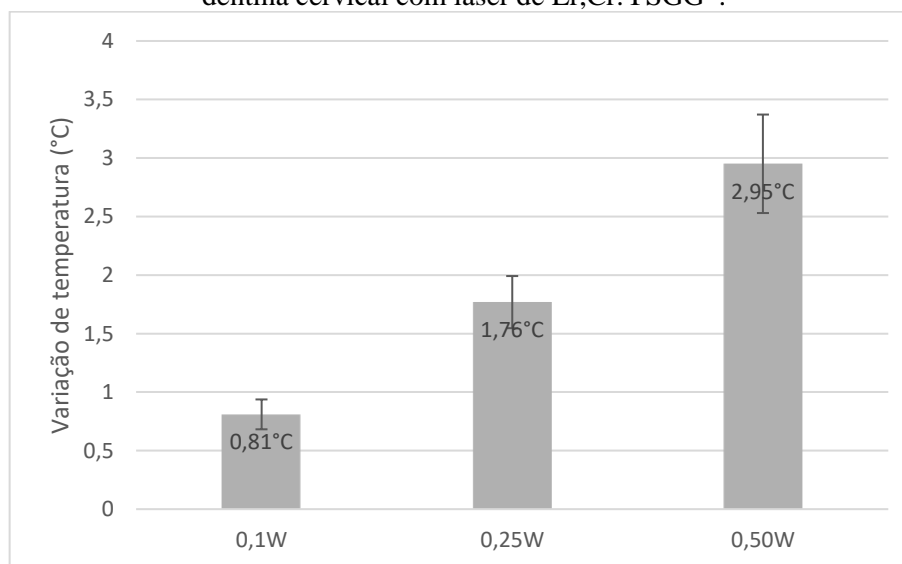
\*Letras diferentes evidenciam médias estatisticamente distintas de acordo com o teste de Tukey. Dados não transformados.

### 5.1.2. ANÁLISE DE TEMPERATURA PULPAR

Os dentes incisivos inferiores humanos foram irradiados com Laser Er,Cr:YSGG na região cervical e as temperaturas da câmara pulpar foram aferidas com o uso de termopares de resposta rápida inseridos no seu interior. Esses dados foram analisados e transformados em tabelas e gráficos.

A Figura 20 ilustra os valores médios de elevação de temperatura pulpar durante a irradiação da dentina radicular com *laser* de Er,Cr:YSGG. Foram registradas elevações médias de temperatura pulpar de  $0,81 (\pm 0,4^{\circ}\text{C})$ ,  $1,76 (\pm 0,7^{\circ}\text{C})$  e  $2,95 (\pm 1,33^{\circ}\text{C})$ , para os grupos irradiados com potência média de 0,1 W, 0,25 W e 0,50 W, respectivamente. É possível observar que o grupo irradiado com potência média de 0,10 W promoveu elevações de temperatura significativamente menores ( $p < 0,05$ ) que os demais grupos experimentais. Entretanto, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes na comparação entre as elevações de temperatura observadas nos grupos irradiados com 0,25 W e 0,50 W.

Figura 20: Médias das elevações de temperatura pulpar com termopares promovidas pela irradiação da dentina cervical com laser de Er,Cr:YSGG\*.



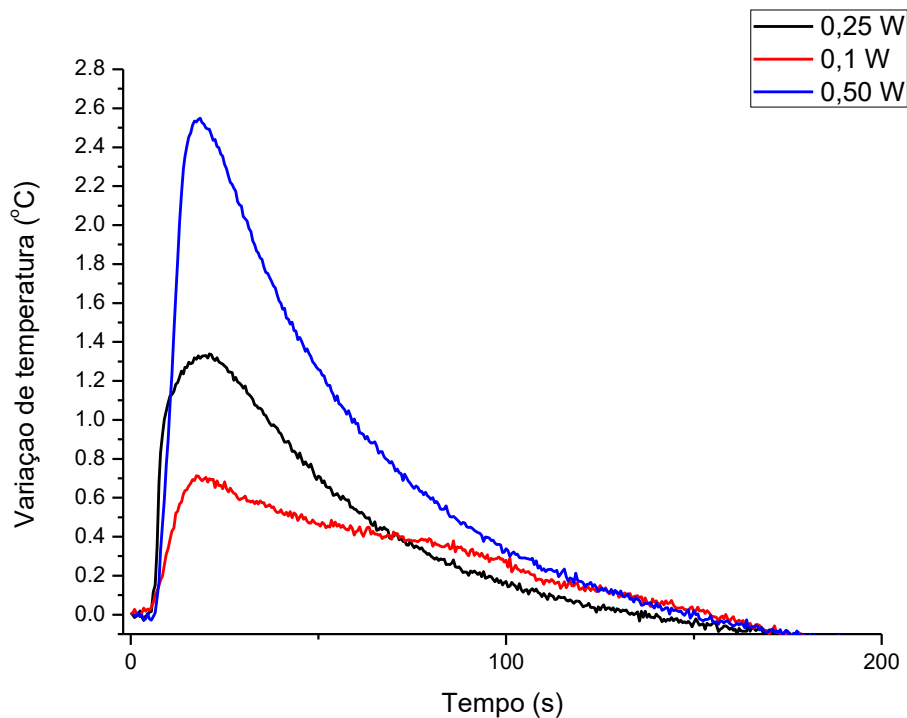
\*As barras evidenciam erro padrão. Letras diferentes evidenciam médias estatisticamente distintas de acordo com o teste de Kruskal-Wallis. Dados não transformados.

A Figura 21 mostra o perfil médio das variações temporais de temperatura pulpar promovidos durante as irradiações. Evidencia-se a elevação rápida da temperatura durante as



irradiações, e o decaimento exponencial da mesma após a parada das irradiações, decorrente da perda de calor. Observa-se, também, que as elevações de temperatura apresentam relação positiva com a potência média do laser empregada e que o grupo que foi irradiado com 0,10 W apresentou uma pequena elevação de temperatura.

Figura 21: Curvas médias representativas das elevações de temperatura pulpar registradas durante as irradiações para todos os grupos experimentais do presente estudo.



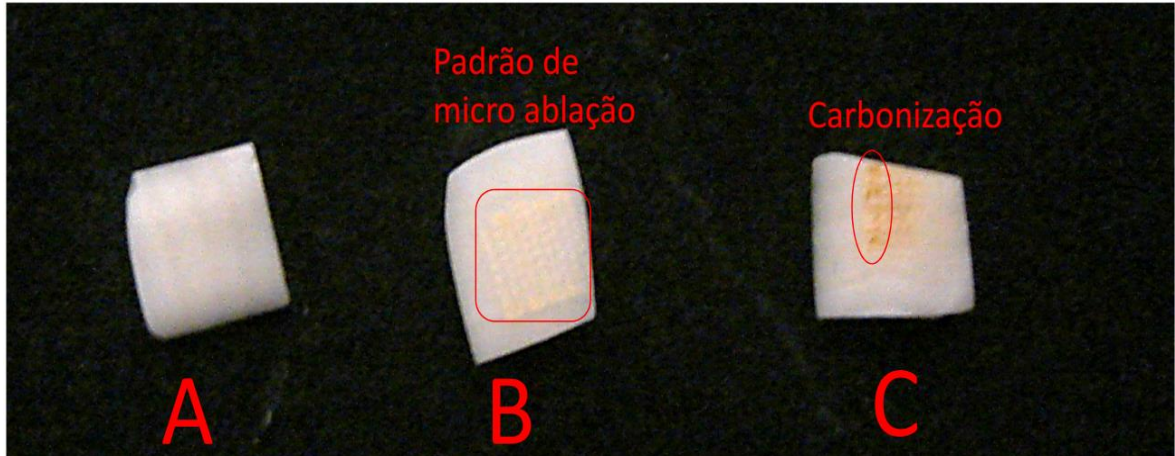
### 5.1.3. ANÁLISE MORFOLÓGICA

Antes das amostras serem preparadas para análise morfológica, foram efetuadas imagens com uma câmera digital, com o intuito de observar macroscopicamente as amostras de dentina radicular bovina após a irradiação com diferentes parâmetros utilizados no experimento.

A Figura 22 apresenta o aspecto morfológico macroscópico das amostras irradiadas com os diferentes valores de potência média: (A) 0,10 W, (B) 0,25 W e (C) 0,50 W. Observa-se que em A e B não ocorreu mudança significativa da coloração da amostra, em C fica bem evidente a alteração de cor de amostra. A amostra B apresenta o padrão de pontos de micro

ablação efetuado pela irradiação laser, cujo aspecto pode ser oriundo da desidratação da mesma.

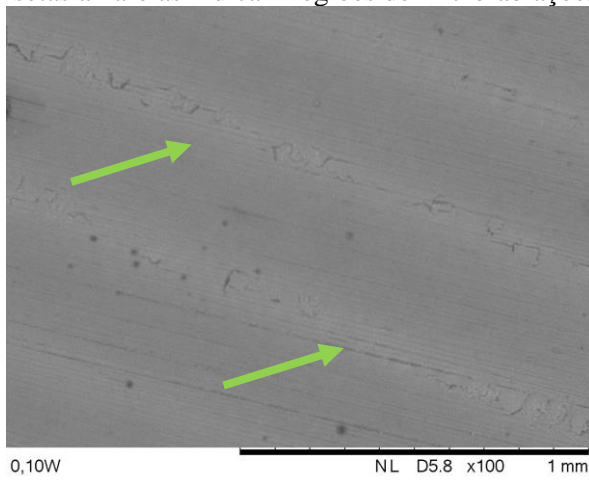
Figura 22: Aspecto macroscópico das amostras irradiadas com as seguintes potências médias:(A) 0,10 W, (B)0,25 W e (C)0,50 W.



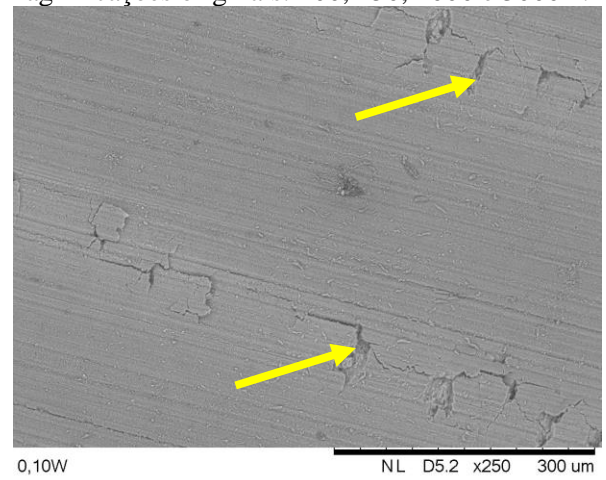
As eletromicrografias representativas das amostras de cada grupo desta primeira fase experimental são mostradas nas Figuras 23, 24 e 25. Em todas elas, é possível evidenciar o padrão de irradiação efetuado durante os experimentos, observando-se as linhas de irradiação promovidas pelo uso de motor de passo. No centro destas linhas, observa-se um efeito térmico mais forte dos pulsos laser, ocasionado principalmente pelo perfil gaussiano do feixe.

Na Figura 23, em que as amostras são irradiadas com potência média de 0,1 W, evidenciar-se desidratação promovida pela irradiação laser na região de maior elevação de temperatura (região mais clara na imagem com magnificação original de 100X). Em maiores magnificações, observa-se um padrão de micro-ablações, com remoção de tecido superficial e pequenas micro-trincas causadas pelo fenômeno de ablação explosiva.

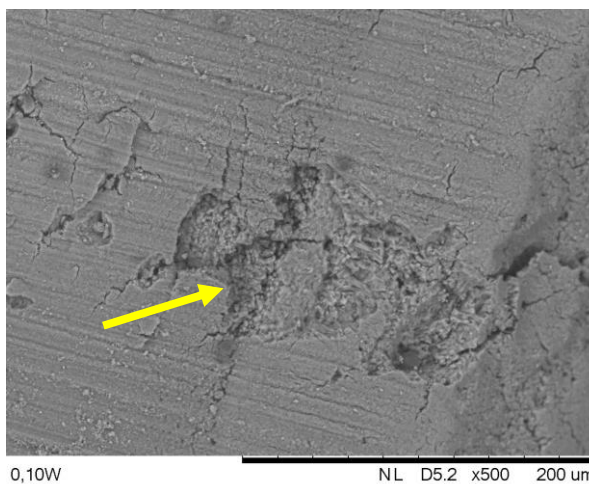
Figura 23 – Eletromicrografias representativas de amostras irradiadas com potência média de 0,10 W. As setas verdes indicam regiões de desidratação da dentina promovidas pela irradiação, enquanto as setas amarelas indicam regiões de micro-ablações. Magnificações originais: 100, 250, 1000 e 3000X.



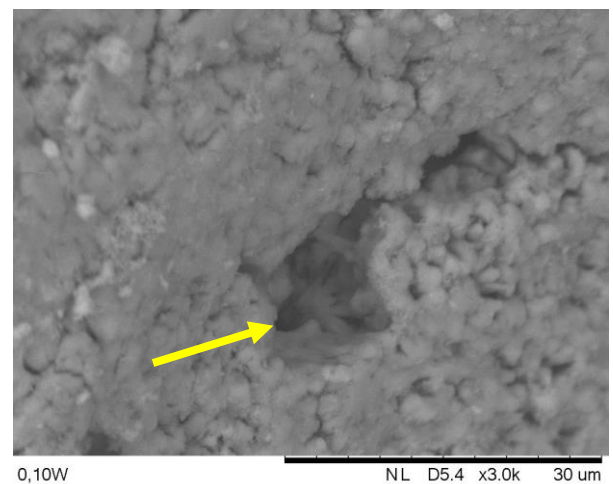
100 X



250 X



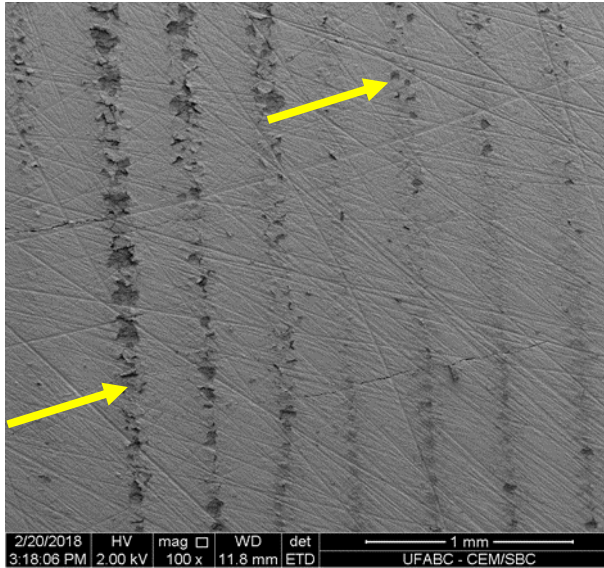
1000 X



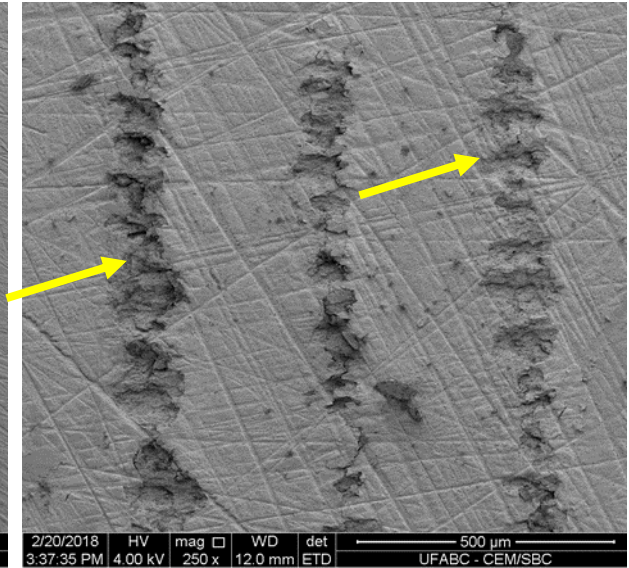
3000 X

Na Figura 24, as amostras foram irradiadas a potência média de 0,25 W, observam-se linhas de irradiação, decorrentes do uso de motor de passo, com áreas de microablação. Não são observados trincas ou sinais de carbonização. Nas crateras de ablação, assim como fora delas, notam-se túbulos dentinários abertos. Nas crateras, observa-se um padrão de irregularidade superficial típica de ablação explosiva, com maior profundidade e extensão quando comparadas às crateras observadas na Figura 19.

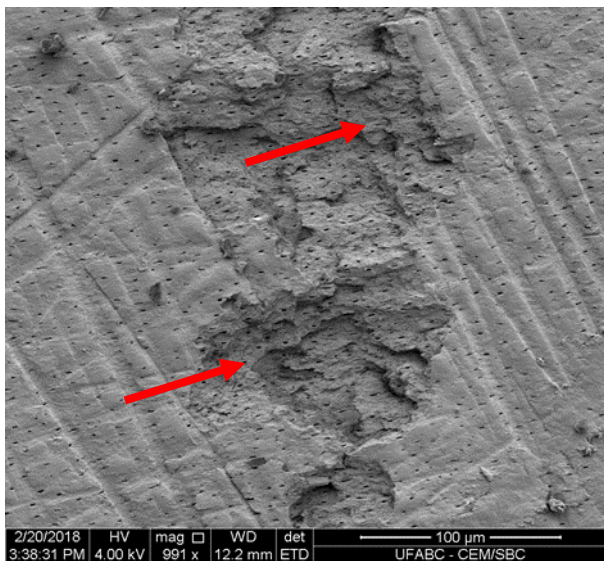
Figura 24 - Eletromicrografias representativas de amostras irradiadas com potência média de 0,25 W. As setas amarelas indicam as linhas de micro-ablações, enquanto que as setas vermelhas evidenciam aberturas de túbulos dentinários no interior destas micro-ablações. Magnificações originais: 100, 250, 1000 e 3000X.



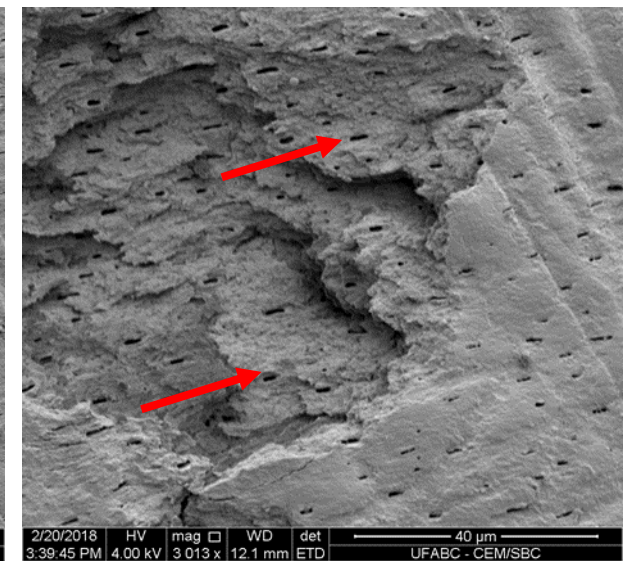
100 X



250 X



1000 X

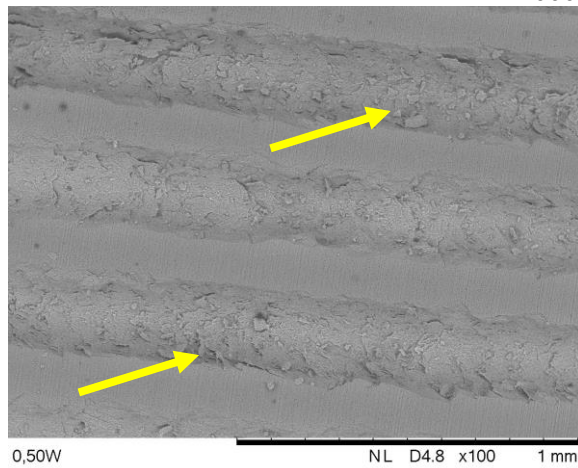


3000 X

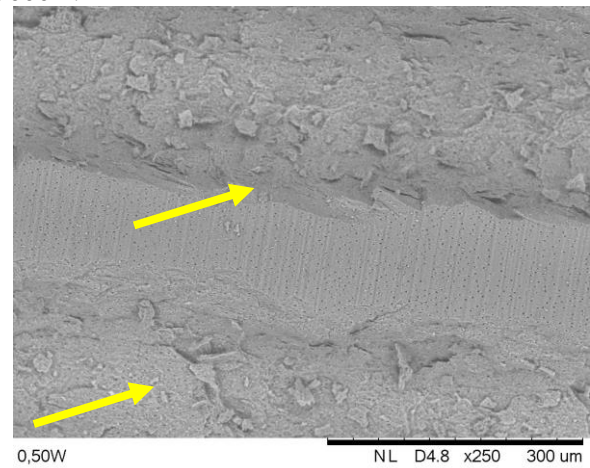
Na Figura 25, as amostras foram irradiadas com potência média de 0,50 W, observam-se linhas pronunciadas de ablação do tecido, com crateras de maior profundidade e extensão (setas amarelas) que as demais imagens das figuras anteriores, e ausências de trincas ou evidências de carbonização. No interior das crateras, observa-se padrão irregular,

característico da ablação, com exposição de túbulos dentinários abertos (setas vermelhas) e projeção da dentina peritubular.

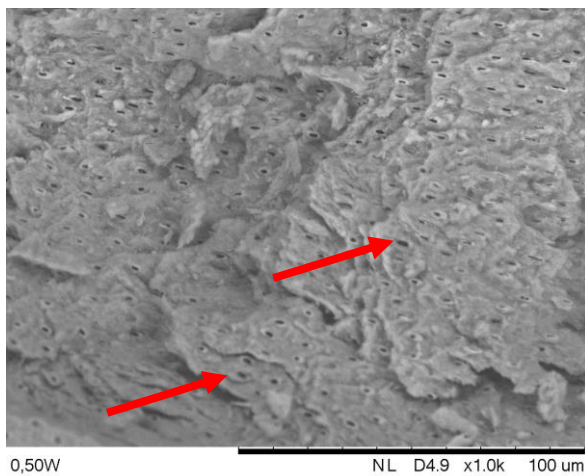
Figura 25- Eletromicrografias representativas de amostras irradiadas com potência média de 0,50 W. As setas amarelas indicam as linhas de micro-ablações, enquanto que as setas vermelhas evidenciam aberturas de túbulos dentinários no interior destas micro-ablações. Magnificações originais: 100, 250, 1000 e 3000X.



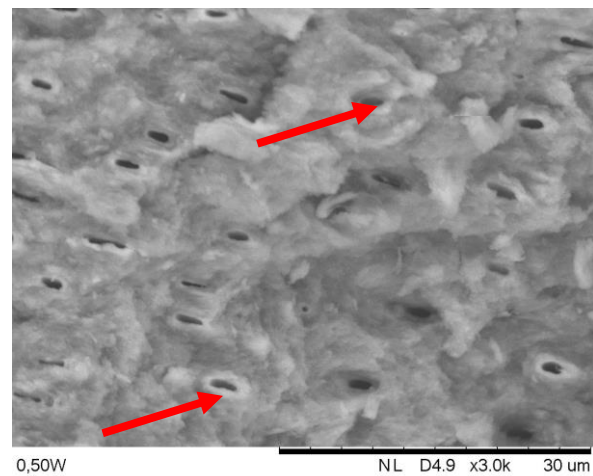
100 X



250 X



1000 X



3000 X

## 5.2. FASE 2: AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA IRRADIAÇÃO LASER DURANTE APÓS CARIOGÊNICO *IN VITRO*

### 5.2.1. AVALIAÇÃO COMPOSICIONAL

Os espectros médios obtidos por meio de análise de ATR-FTIR de todos os grupos experimentais do presente estudo estão ilustrados na Figura 26. Evidenciam-se mudanças no conteúdo orgânico e inorgânico da dentina, dependendo do tratamento aplicado. As Figuras 27 mostram a análise semi-quantitativa desses componentes, evidenciando que a proporção de  $\nu_2$  carbonato foi significativamente reduzida devido à aplicação de FFA, com ou sem irradiação laser (Figura 28). A irradiação laser por si só não alterou o conteúdo de carbonato de dentina (Figuras 29,30,31).

Quanto ao conteúdo orgânico da dentina, foi possível observar que a irradiação a laser não alterou a proporção de amida I, II e III em relação ao fosfato; no entanto, a aplicação de FFA aumenta significativamente a proporção de amidas I, II e III, mesmo quando aplicado sozinho ou quando associado à irradiação laser.

Figura 26 Espectros médios de absorção no infravermelho das amostras tratadas no presente estudo.

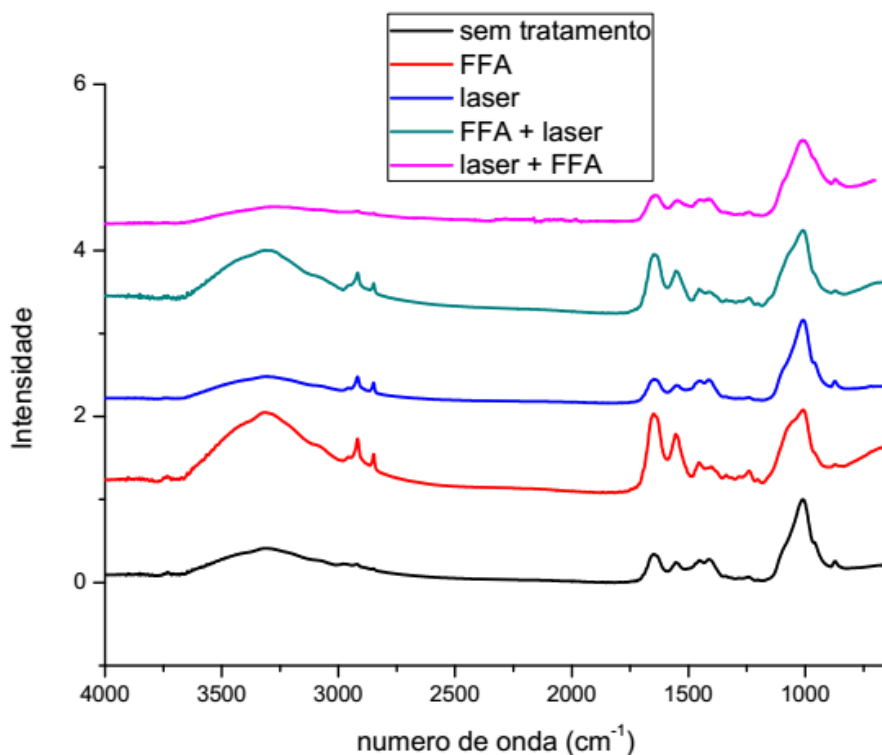


Figura 27 Médias das razões entre as bandas de  $\nu_2$  carbonato/fosfato obtidas a partir das amostras dentinárias submetidas aos tratamentos experimentais do presente estudo. As barras indicam desvios padrão. Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas de acordo com o teste Student-Newman-Keuls.

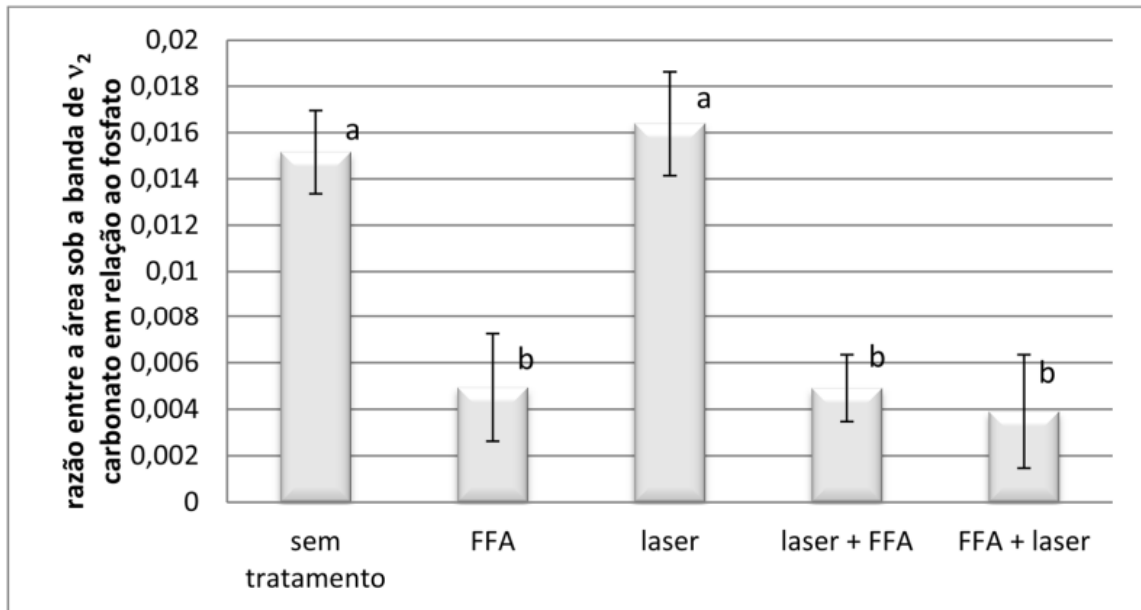


Figura 28: Médias das razões entre as bandas de  $\nu_3\nu_4$  carbonato/fosfato obtidas a partir das amostras dentinárias submetidas aos tratamentos experimentais do presente estudo. As barras indicam desvios padrão. Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas de acordo com o teste Student-Newman-Keuls.

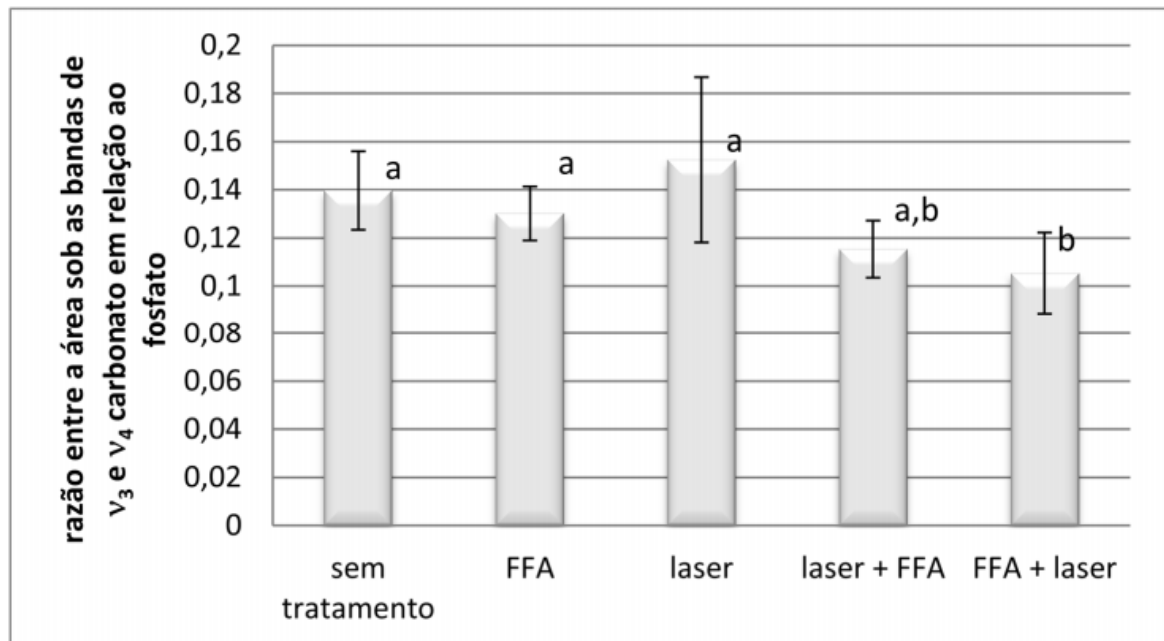


Figura 29: Médias das razões entre as bandas de amida I/fosfato obtidas a partir das amostras dentinárias submetidas aos tratamentos experimentais do presente estudo. As barras indicam desvios padrão. Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas de acordo com o teste Student-Newman-Keuls.

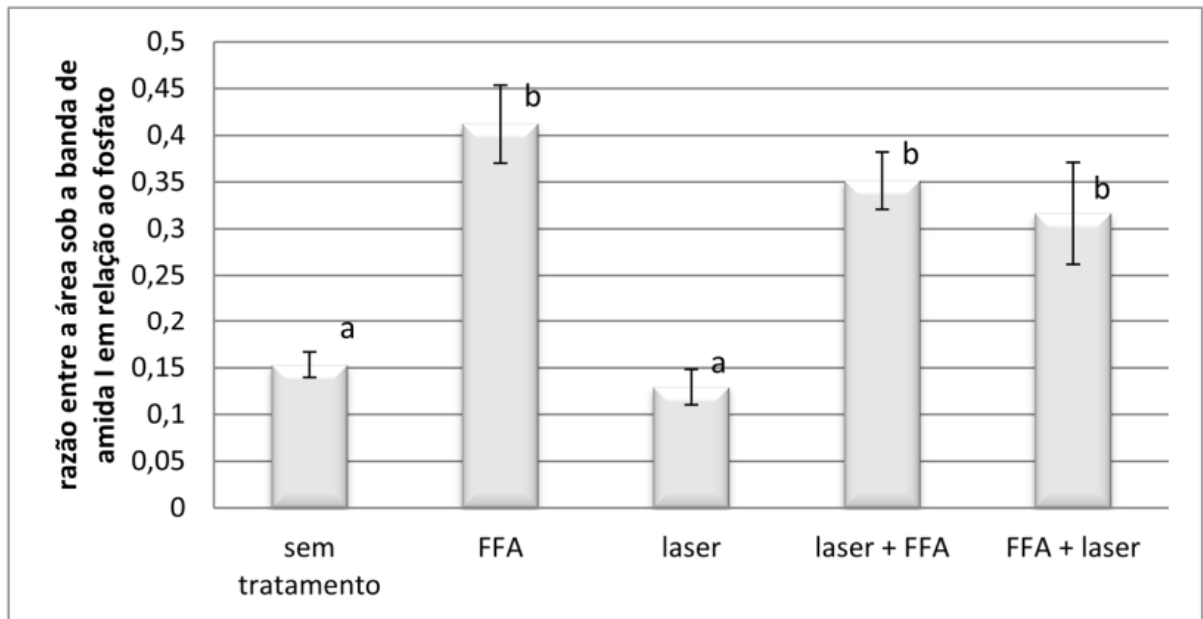


Figura 30: Médias das razões entre as bandas de amida II/fosfato obtidas a partir das amostras dentinárias submetidas aos tratamentos experimentais do presente estudo. As barras indicam desvios padrão. Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas de acordo com o teste Student-Newman-Keuls.

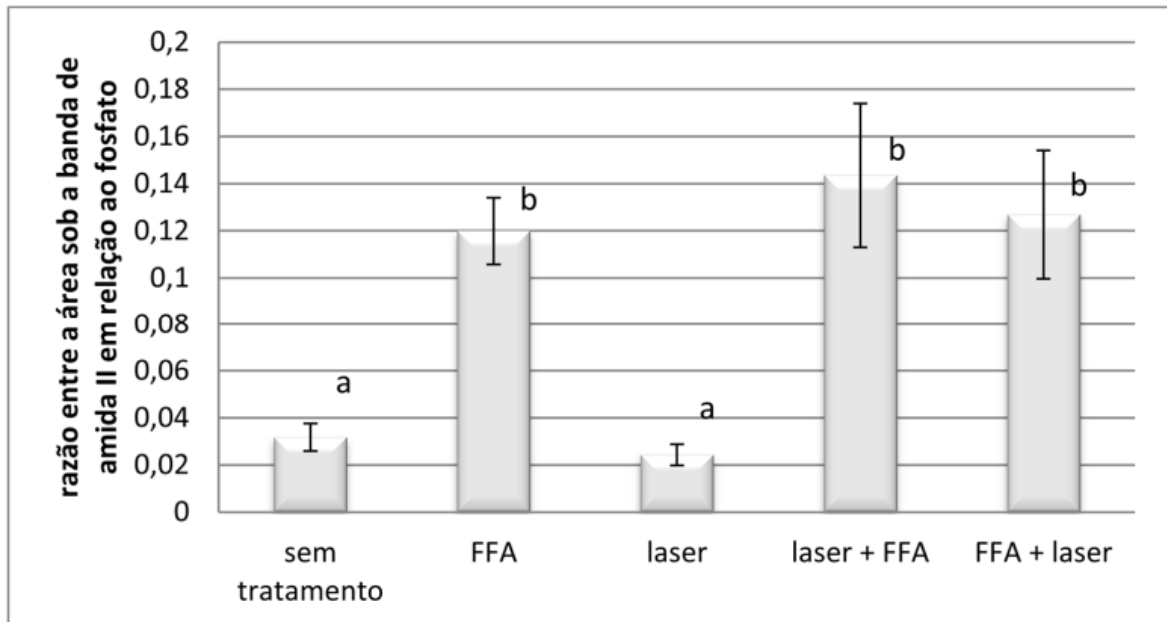
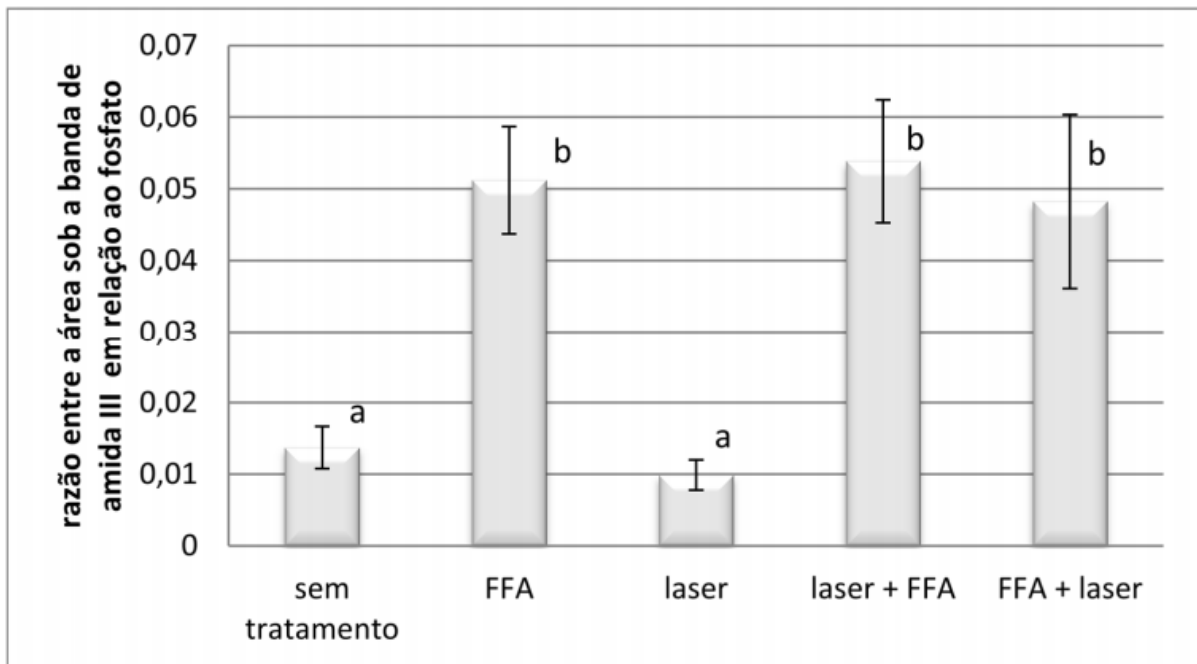




Figura 31: Médias das razões entre as bandas de amida III/fosfato obtidas a partir das amostras dentinárias submetidas aos tratamentos experimentais do presente estudo. As barras indicam desvios padrão. Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas de acordo com o teste Student-Newman-Keuls.



### 5.2.2. AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA

Nas Figuras 32 e 33 são apresentadas eletromicrografias representativas de amostras de dentina após os diferentes tratamentos propostos para a segunda fase experimental deste estudo. A análise das imagens revelou diferentes padrões morfológicos que variaram conforme o tratamento empregado.

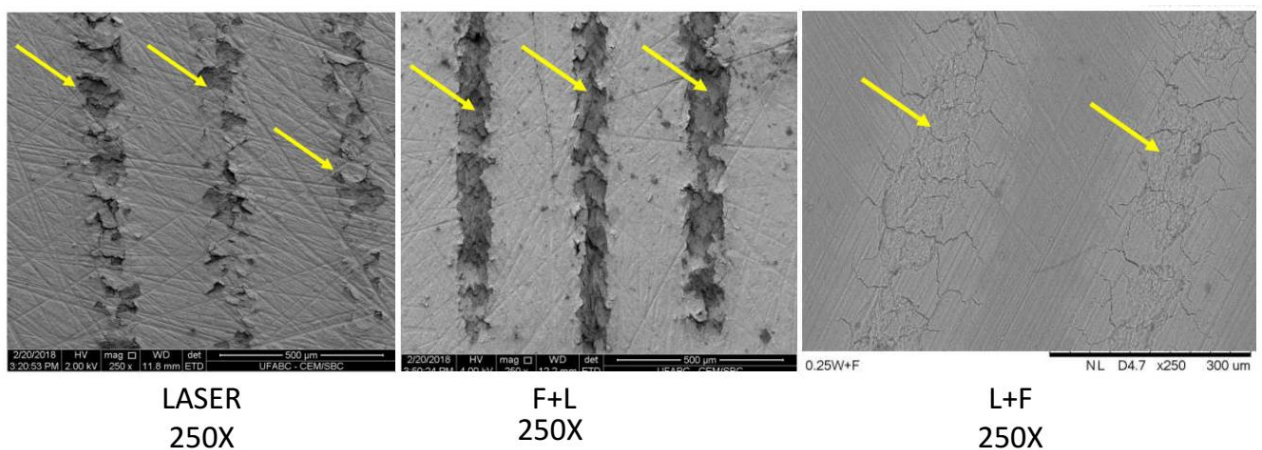
Nas amostras não tratadas (grupo controle negativo) foi observada uma superfície regular, com túbulos dentinários abertos em toda a superfície (setas vermelhas) e presença de sulcos causados pelo polimento da amostra. Por outro lado, as amostras tratadas com flúor fosfato acidulado (grupo controle positivo) apresentaram túbulos dentinários parcialmente ocluídos (setas vermelhas).

Nas amostras irradiadas com potência média de 0,25 W observam-se alterações morfológicas que demonstram a regularidade do padrão de irradiação e que são compatíveis com a distribuição dos pulsos do laser na amostra. A superfície da dentina irradiada apresenta cavidades típicas de micro ablações (setas amarelas) intercaladas por áreas sem alteração

morfológica. No interior das crateras foram observados túbulos dentinários abertos. Não foram observadas evidências de danos estruturais como trincas ou carbonização da dentina.

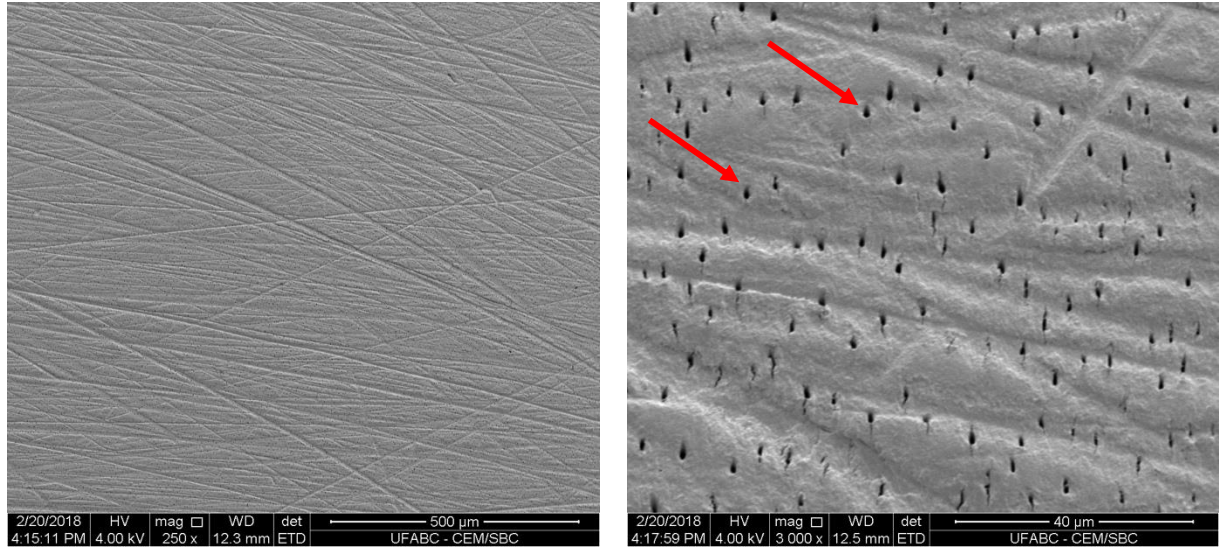
Nas amostras irradiadas e tratadas com flúor fosfato acidulado foram observadas trincas distribuídas regularmente pela superfície da amostra e áreas de desidratação. Em maior magnificação observa-se presença de cavidades menores de micro-ablações, e exposição de túbulos dentinários. Por outro lado, as amostras tratadas com flúor fosfato acidulado e irradiadas apresentaram cavidades compatíveis com micro ablações e túbulos dentinários abertos no interior das crateras. Observou-se uma maior quantidade de área ablacionada, com cavidades contínuas e mais profundas.

Figura 32: Eletromicrografias dos diferentes tratamentos realizados nas amostras, sendo que, foi utilizada a mesma potência média do laser a 0,25W aferidas no powermeter antes de cada irradiação. Setas amarelas evidenciam as alterações provocadas pela passagem do laser.

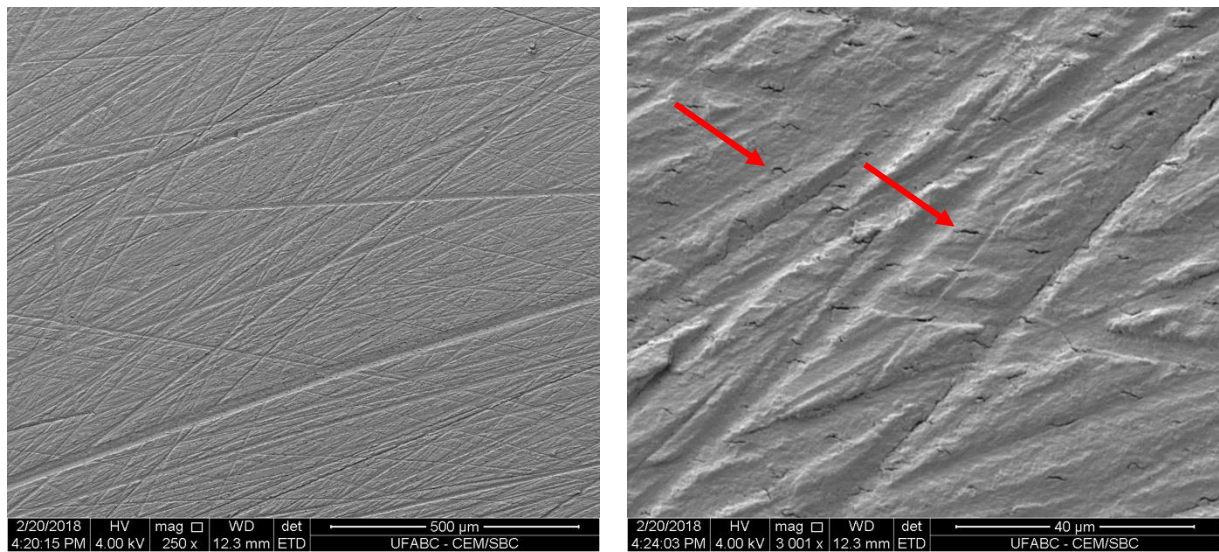


➤ Potencia media do laser 0,25W em todas as amostras

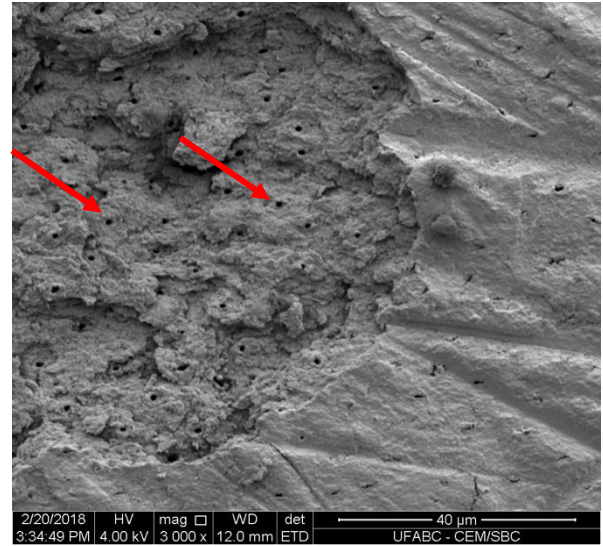
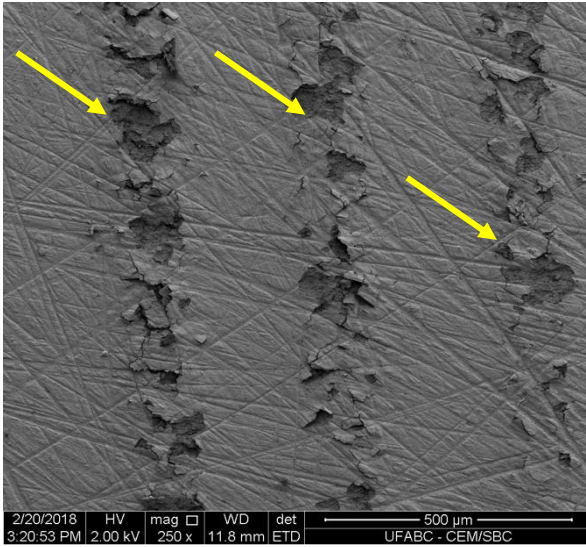
Figura 33 – Eletromicrografias representativas de amostras de cada um dos grupos experimentais da segunda fase do presente estudo. Setas amarelas indicam micro-ablações promovidas pela irradiação laser; setas vermelhas indicam aberturas de túbulos dentinários. Magnificações originais: imagens do lado esquerdo = 250 X; imagens do lado direito = 3000 X.



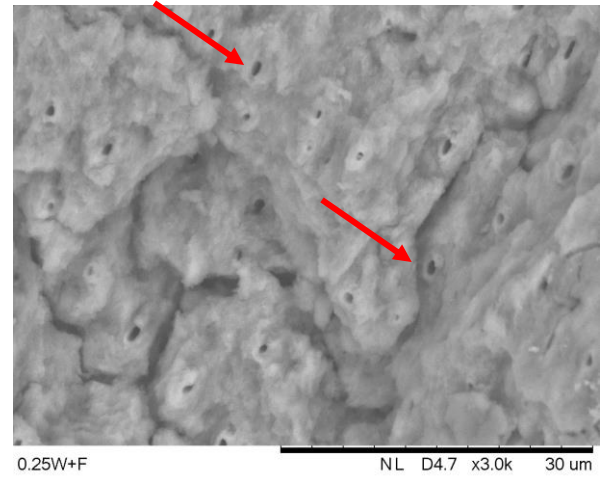
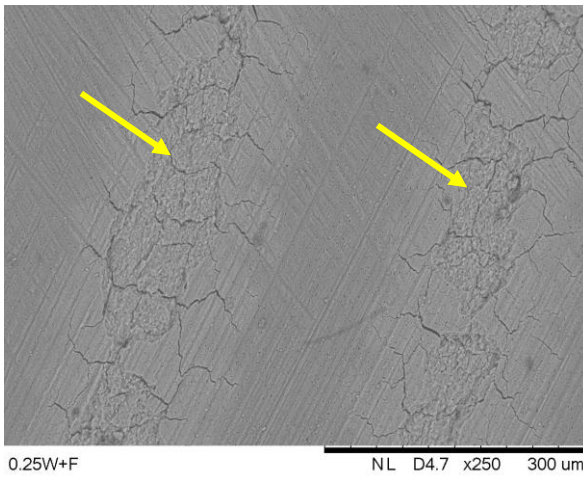
Imagens acima: grupo controle negativo



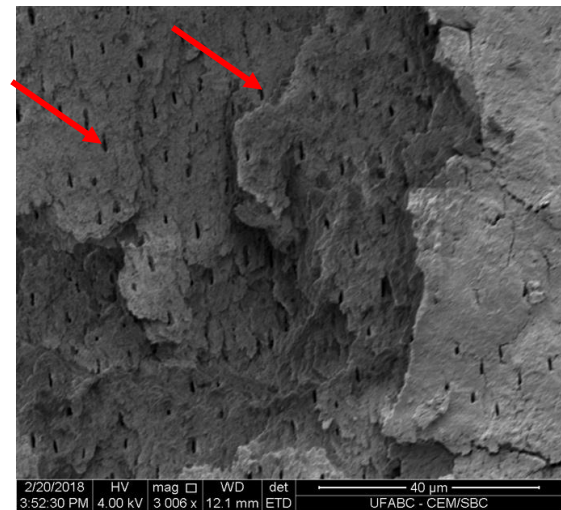
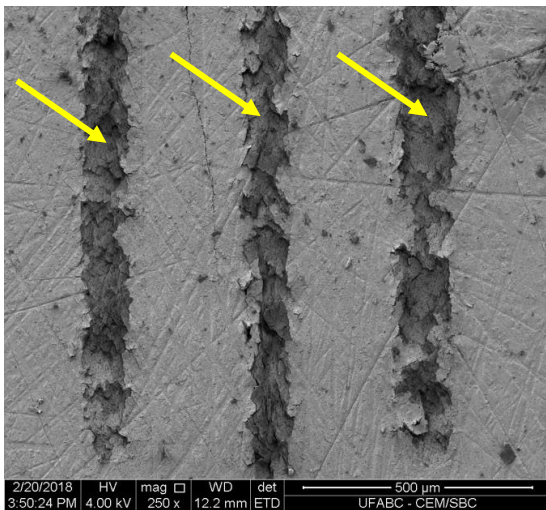
Imagens acima: grupo FFA



Imagens acima: grupo laser



Imagens acima: grupo laser + FFA



Imagens acima: grupo FFA + laser

### 5.2.3. AVALIAÇÃO DO COEFICIENTE DE ATENUAÇÃO ÓPTICO

As Figuras 34, 35, 36, 37, 38 apresentam uma imagem representativa obtida por tomografia por coerência óptica (*B-scan*) de uma amostra por grupo dos tratamentos realizados.

Figura 34: Imagem representativa de tomografia por coerência óptica (*B-scan*) de uma amostra do grupo sem tratamento, antes da ciclagem de pH, com a identificação das áreas de ar e amostra, as quais se repetem nas imagens posteriores.

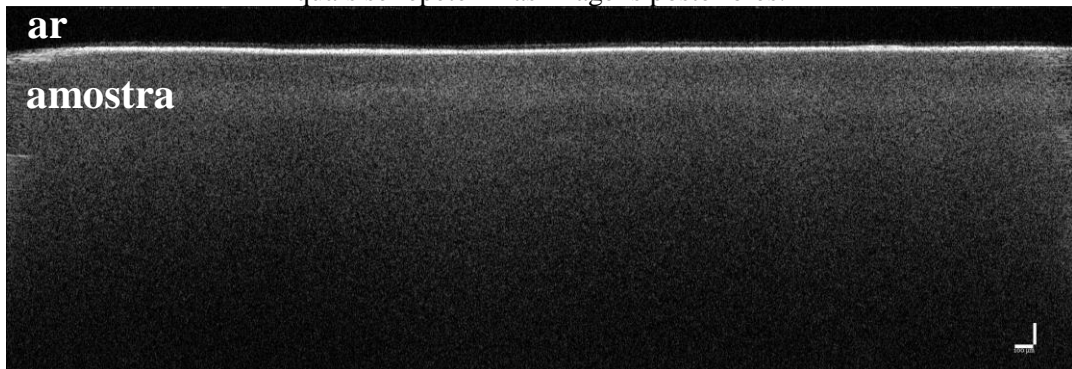


Figura 35: Imagem representativa de tomografia por coerência óptica (*B-scan*) de uma amostra do grupo tratado com FFA, antes da ciclagem de pH.

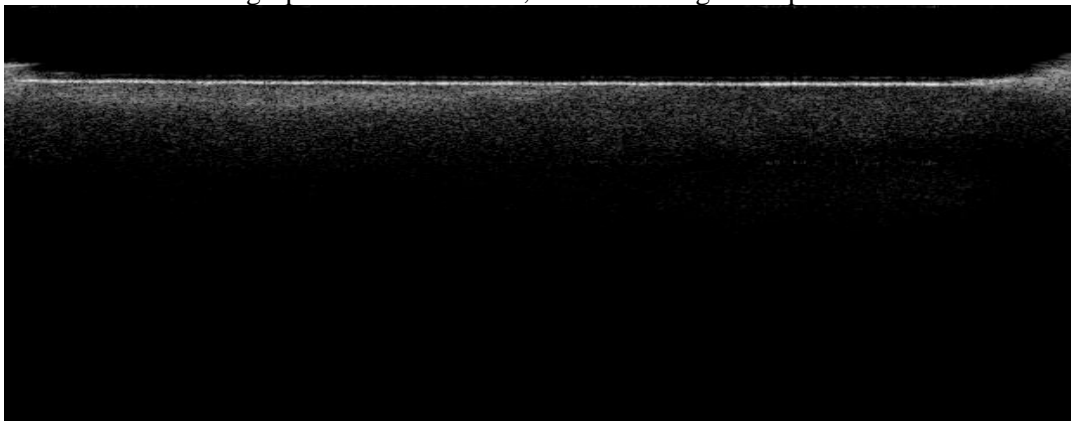


Figura 36: Imagem representativa de tomografia por coerência óptica (B-scan) de uma amostra do grupo laser, antes da ciclagem de pH.

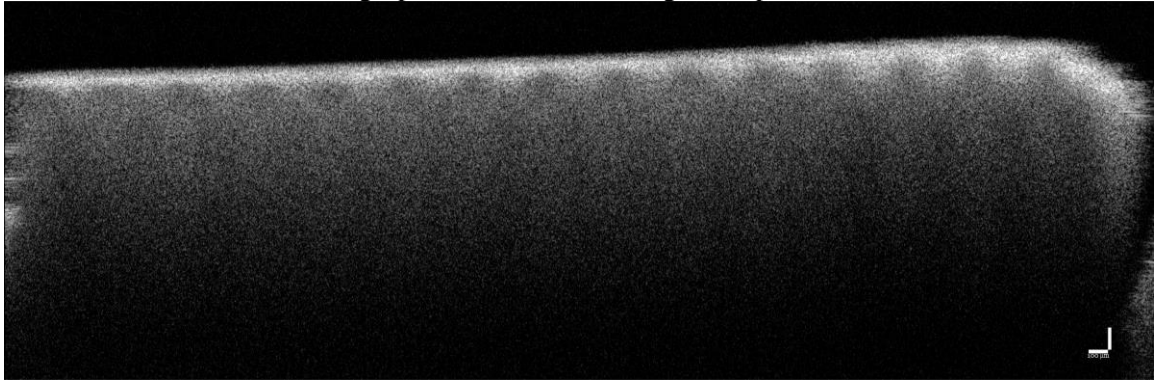


Figura 37: Imagem representativa de tomografia por coerência óptica (B-scan) de uma amostra do grupo tratado com laser + FFA, antes da ciclagem de pH.

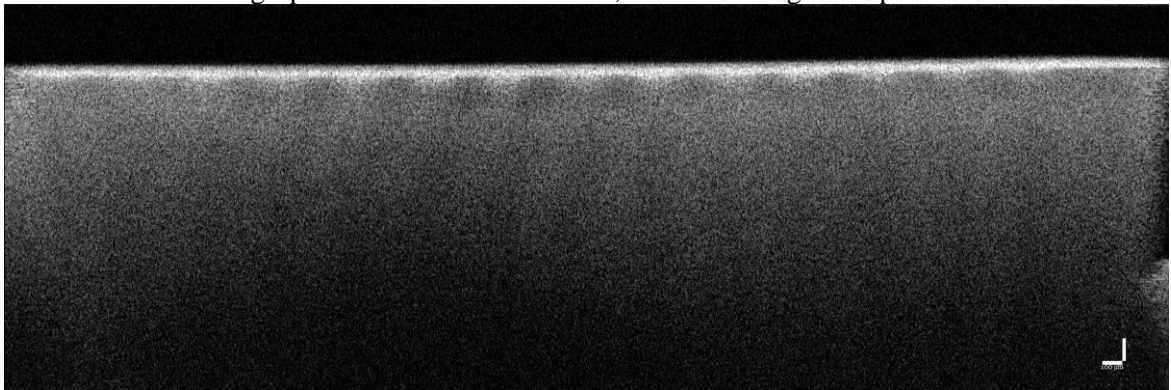
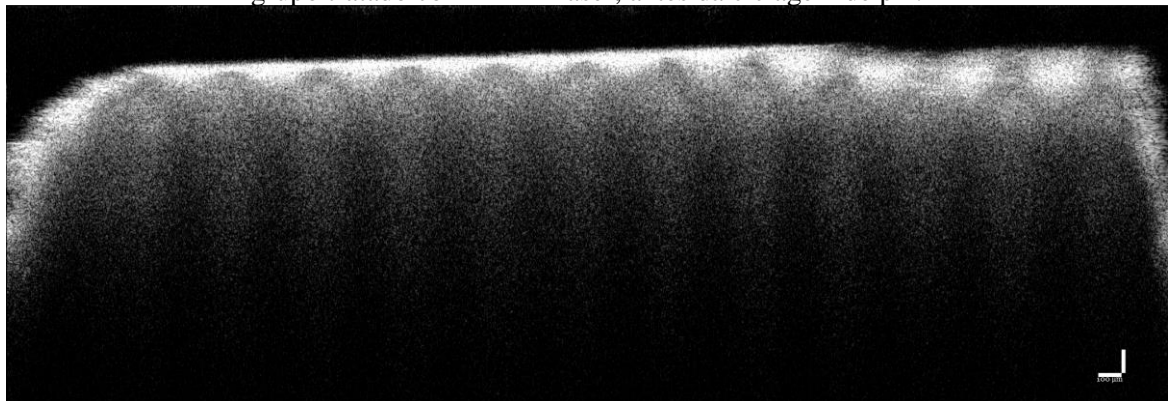


Figura 38: Imagem representativa de tomografia por coerência óptica (B-scan) de uma amostra do grupo tratado com FFA + laser, antes da ciclagem de pH.



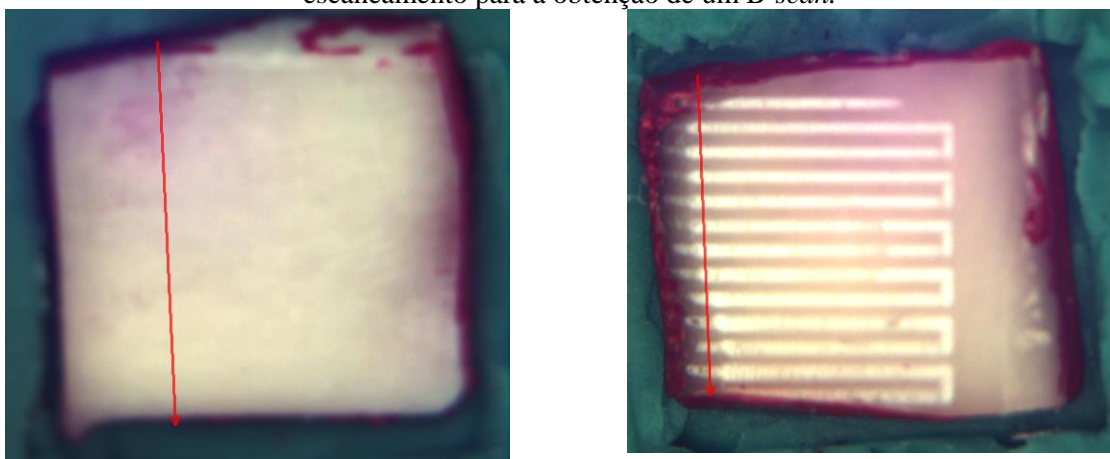
As imagens obtidas das amostras dos grupos sem tratamento e tratadas com FFA evidenciam superfície lisa, com maior refletividade na interface ar-amostra (veja Figura 34). Nas amostras do grupo sem tratamento (Figura 34), é possível observar um padrão uniforme de tons de cinza, evidenciando uma penetração mais homogênea da luz nas amostras e,

consequentemente, maior retroespalhamento. Nas amostras tratadas com FFA (Figura 35), observa-se uma menor penetração da luz em profundidade e maior retroespalhamento na superfície, quando comparadas com o grupo sem tratamento.

As amostras dos grupos os quais foram irradiados (Figuras 36, 37 e 38) apresentam ondulações na superfície, resultado do modo pulsado do laser usado no experimento. As imagens também demonstram que o efeito da radiação não é homogêneo por toda área irradiada, sendo evidenciadas imagens de maior brilho superficial de forma semicircular, entremeadas por imagens planas. Nota-se, também, que o brilho, em profundidade, apresenta padrão semi-oval, sendo mais evidente nas imagens das amostras tratadas com FFA + laser, denotando maior retroespalhamento em decorrência das micro-rugosidades superficiais.

A Figura 39 mostra uma imagem representativa de uma amostra sem irradiação (podendo ser dos grupos controle ou FFA) e de uma amostra com irradiação (podendo ser dos grupos laser, laser + FFA ou FFA + laser), obtidas pela câmera do equipamento de OCT. Pode-se observar o padrão evidente de irradiação com o motor de passo na amostra irradiada, com áreas de micro-ablação, assim como o padrão de escaneamento adotado (setas vermelhas) para obtenção de um *B-scan*, o qual cruza as linhas de irradiação, as quais podem ser claramente visualizadas nas imagens *B-scan* (Figuras 36, 37 e 38).

Figura 39: Fotografias representativas de uma amostra sem irradiação e de uma amostra com irradiação laser, evidenciando as linhas de ablação. As setas vermelhas indicam os locais de escaneamento para a obtenção de um *B-scan*.



Sem irradiação

Com irradiação

As Figuras 39, 40, 41, 42 e 43 apresentam uma imagem representativa de OCT das amostras após ciclagem de pH.

Figura 39: Imagem representativa de tomografia por coerência óptica (*B-scan*) de uma amostra do grupo sem tratamento, após da ciclagem de pH.

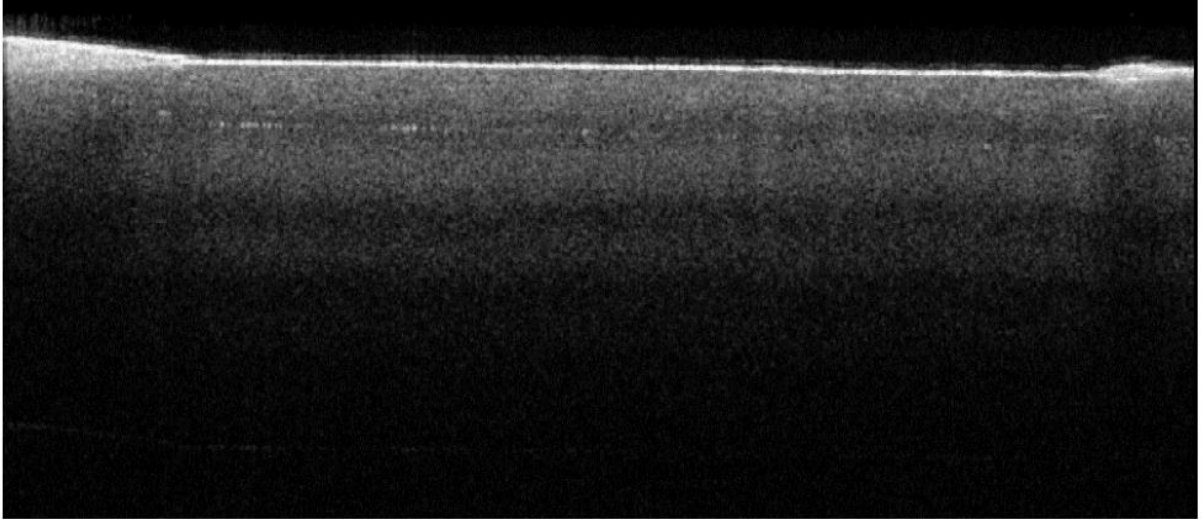


Figura 40: Imagem representativa de tomografia por coerência óptica (*B-scan*) de uma amostra do grupo FFA, após da ciclagem de pH.

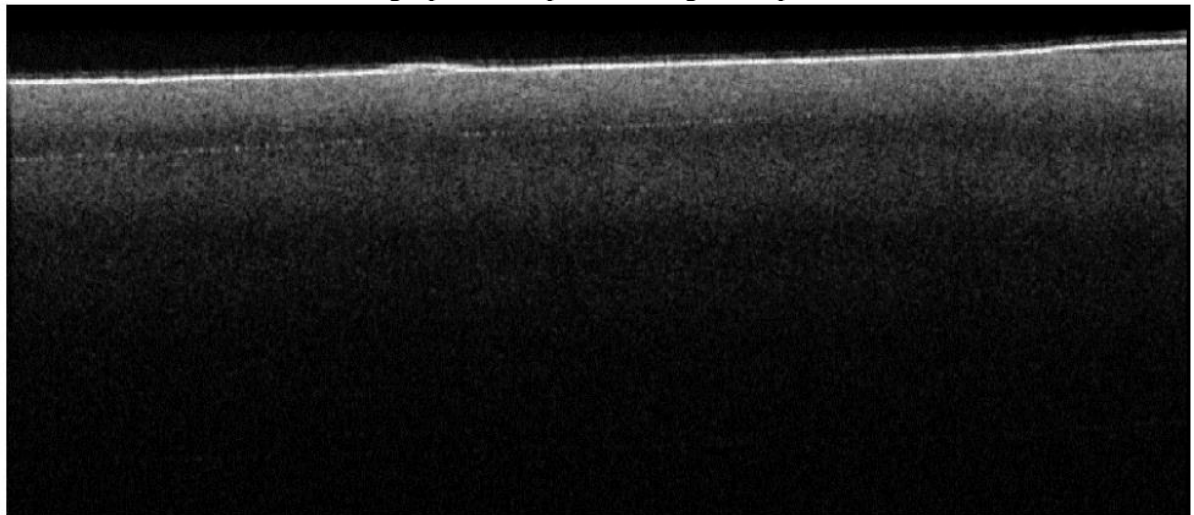




Figura 41: Imagem representativa de tomografia por coerência óptica (B-scan) de uma amostra do grupo laser, após da ciclagem de pH.

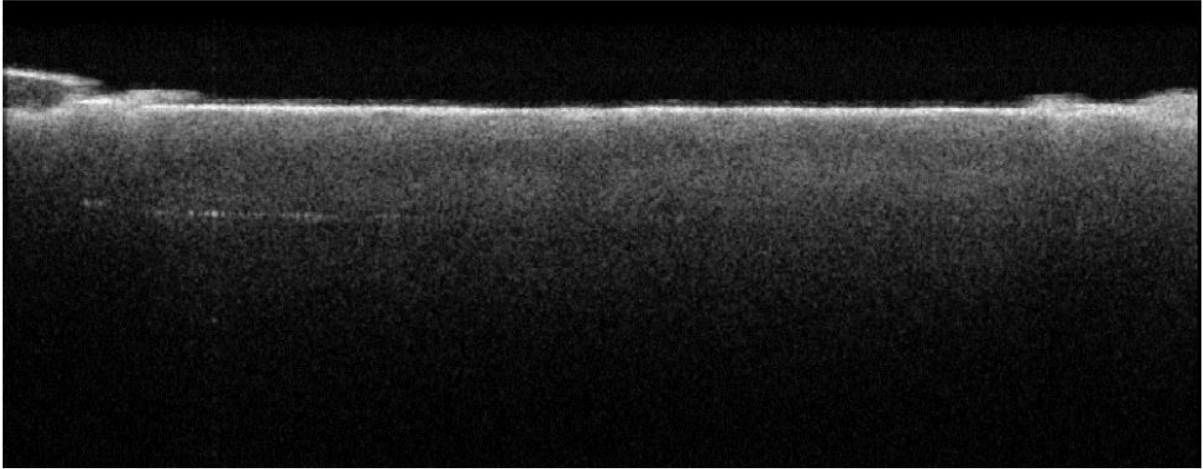


Figura 42: Imagem representativa de tomografia por coerência óptica (B-scan) de uma amostra do grupo laser + FFA, após da ciclagem de pH.

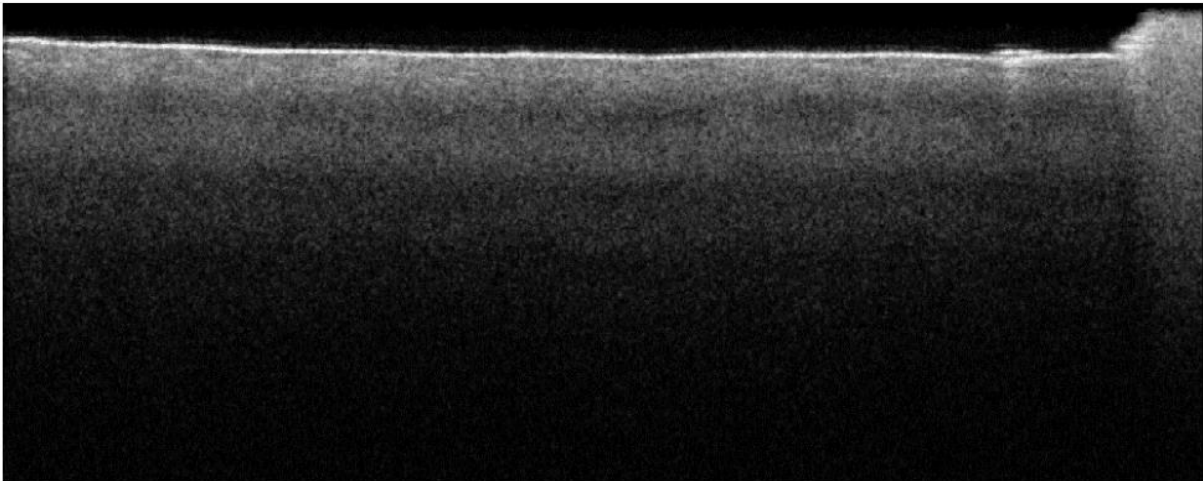
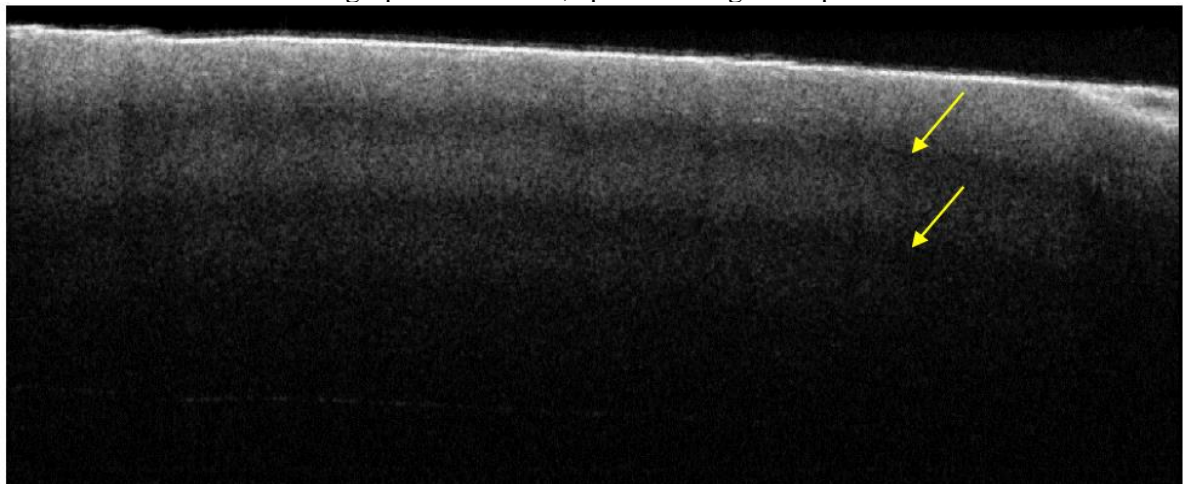


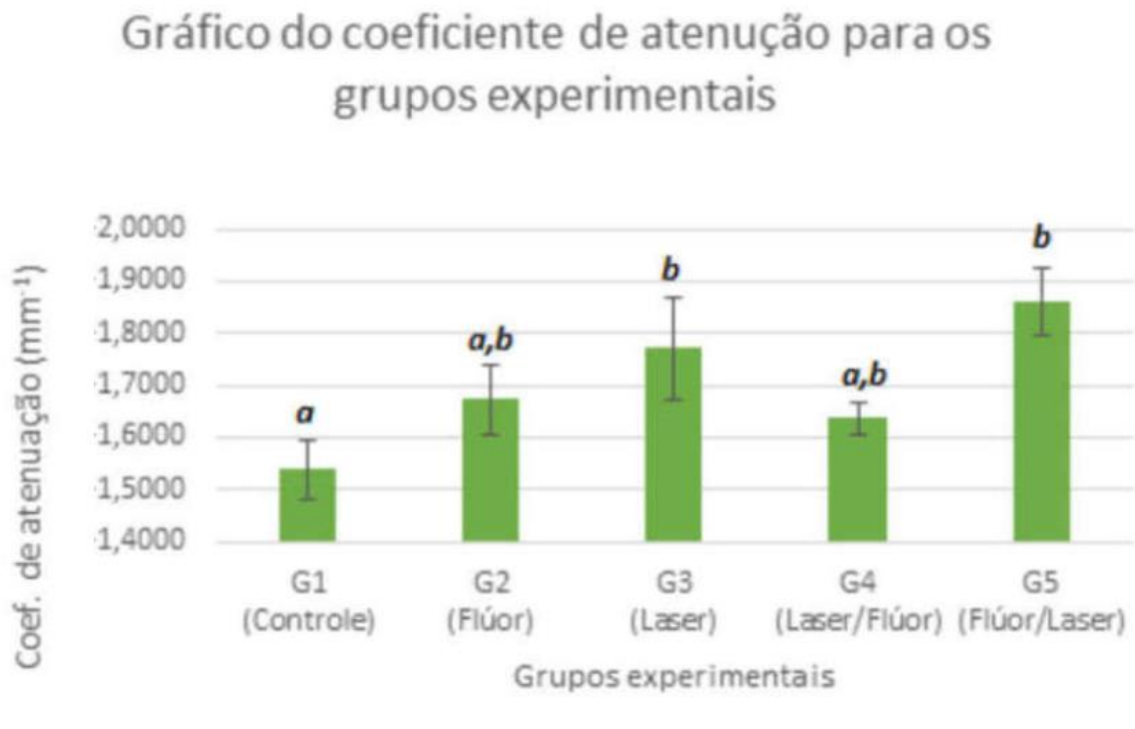
Figura 43: Imagem representativa de tomografia por coerência óptica (B-scan) de uma amostra do grupo FFA + laser, após da ciclagem de pH.



Analisando as imagens obtidas após a ciclagem de pH, verificou-se que, em algumas amostras, são observadas interfaces na imagem do interior da dentina, conforme pode ser percebido pelas setas amarelas na Figura 43.

Como em todas as imagens percebe-se a presença de um pico de sinal na parte mais superficial das amostras, ocasionado pela alta refletividade da luz ao atravessar do meio externo (ar) para o meio interno (dentina), esta região não foi considerada no cálculo do coeficiente de atenuação óptica. Após os cálculos, foram obtidos os coeficientes de atenuação óptica para os diferentes grupos experimentais após a ciclagem de pH, conforme apresentado na Figura 44. Para realização da análise estatística foram removidos os *outliers* de cada grupo experimental, caso eles existissem, e executaram-se os testes de normalidade e homogeneidade das variâncias, de tal forma que fosse possível executar as análises de ANOVA e TUKEY.

Figura 44: Valores médios dos coeficientes de atenuação óptica para os diferentes grupos experimentais após a realização da ciclagem de pH. Barras evidenciam erro padrão. Letras distintas evidenciam médias estatisticamente diferentes de acordo com o teste de Tukey.



Os valores da média e desvio-padrão dos coeficientes de atenuação óptica são representados na Tabela 5. Em módulo (sem considerar o sinal negativo do decaimento

exponencial) o grupo que apresentou o menor coeficiente de atenuação após a ciclagem de pH foi o Controle, enquanto que o grupo que apresentou o maior módulo de coeficiente de atenuação foi o grupo Flúor+Laser.

Tabela 5 Valores médios dos coeficientes de atenuação óptica obtidos para os grupos experimentais e seus respectivos valores de desvio padrão, o sinal negativo indica o decaimento exponencial.

<i>Grupo</i>	<b>Coeficiente de atenuação óptica</b>	<b>Desvio padrão</b>
<i>Controle</i>	1,5381 mm <sup>-1</sup>	±0,0548
<i>Flúor</i>	1,6730 mm <sup>-1</sup>	±0,0685
<i>Laser</i>	1,7706 mm <sup>-1</sup>	±0,0987
<i>Laser+fluor</i>	1,6370 mm <sup>-1</sup>	±0,0302
<i>Flúor+Laser</i>	1,8609 mm <sup>-1</sup>	±0,0666

## 6. DISCUSSÃO

Considerando que os lasers em alta intensidade atuam nos tecidos duros dentais mediante efeito térmico, as densidades de energia empregadas durante a irradiação *laser* devem ser seguras para manutenção da saúde pulpar e periodontal [108,121,46] e evitando danos a estes tecidos. Desta forma, o presente estudo investigou densidades de energia do laser de Er,Cr:YSGG que poderiam ser aplicadas em futura finalidade preventiva em dentina radicular, considerando principalmente aspectos de segurança em relação ao tecido pulpar, cuja variação de temperatura limiar para inflamação irreversível encontra-se em 5,6°C [75]. Vale a pena mencionar que o tecido cariado apresenta uma maior quantidade de água [46,90,91,92] em relação ao tecido hígido; portanto, a transferência de calor para a polpa pode ser mais excessiva em dentes cariados [46], o que exige cautela para utilização da irradiação laser, principalmente em dentina radicular, tecido que apresenta maior quantidade de água do que o esmalte [84,86,87,88,89]. Portanto, ainda são necessários estudos *in vivo* para que os parâmetros de irradiação sejam utilizados clinicamente com segurança.

No presente estudo, observou-se que a ação do laser no modo pulsado sem arrefecimento com água fez com que a temperatura pulpar aumentasse imediatamente, porém foram registradas elevações médias de temperatura pulpar de  $0,81 \pm 0,4^{\circ}\text{C}$ ,  $1,76 \pm 0,7^{\circ}\text{C}$  e  $2,95 \pm 1,33^{\circ}\text{C}$  (figura 20); para os grupos irradiados com potência média de 0,1 W; 0,25 W e 0,50 W, respectivamente. O limite preconizado por Zach e Cohen de 5,6°C [75] não foi excedido para nenhuma das potências médias testadas neste estudo. Na literatura, estudos similares efetuados com esmalte reportaram que elevação de temperatura entre 0,60°C e 3,3°C [51], enquanto que Freitas *et al.* (2008)[53] usando a frequência de 20Hz e a potência média de 0,25 W, 0,50 W e 0,75 W obtiveram o aumento de temperatura entre 0,025 e 0,1°C. Mesmo para os estudos em dentina e esmalte [46,52,73,74,81] de elevação da temperatura pulpar, porém com outros comprimentos de onda laser, os resultados são igualmente promissores, a variação da temperatura pulpar não excedeu 5,6°C [75]. No presente estudo, foi observado que ocorreu um aumento positivo de temperatura nos grupos de acordo com o aumento de densidade de energia, e uma dissipação de calor pelas amostras com decaimento exponencial de temperatura (Figura 21), similar ao representado por Diaci *et al.* (2012) [107]. Há de se notar que, no presente estudo, em algumas amostras irradiadas com a potência de 0,50 W, a elevação da temperatura pulpar média chegou a 4,28°C. Para escolha de parâmetros para a continuidade do experimento, levando-se em conta que a espessura de dentina na

região cervical radicular é muito variável e que a dentina cariada apresenta uma quantidade maior de água [46] que a dentina sadia, concluímos que o uso da potência média de 0,50 W em dentina radicular sem refrigeração seria perigoso. Portanto, essa potência média foi descartada para uso na próxima fase do experimento.

A investigação da temperatura na superfície dos tecidos durante as irradiações objetiva verificar o potencial de indução de mudanças químicas nos tecidos durante as irradiações, o que pode trazer benefício em uma atividade preventiva. Neste estudo, observou-se que a temperatura média do grupo de amostras irradiado com a potência média de 0,10 W alcançou  $61 \pm 26^\circ\text{C}$ , ou seja, no máximo  $87^\circ\text{C}$  (figura 18). Na literatura, a partir de  $100^\circ\text{C}$  [66,67,68], começam a ocorrer algumas mudanças físico-químicas na dentina como perda de carbonato, evaporação da água, alteração de colágeno e alteração da cristalinidade da dentina. Segundo Bachmann e Zezell (2005) [71], o colágeno sofre alterações irreversíveis em temperaturas maiores que  $200^\circ\text{C}$ , e entre  $80\text{-}160^\circ\text{C}$  o colágeno sofre alterações que são reversíveis quando reidratado. Portanto o uso da potência média de 0,10 W pode não ter produzido alterações composicionais na amostra, o que precisa ser futuramente investigado em novos estudos. Durante a determinação da potência média a ser usada para a próxima fase do experimento, a de 0,10 W foi também descartada pelos motivos descritos aqui.

Contudo, se observarmos as temperaturas medias superficiais atingidas durante as irradiações empregando-se as potências médias de 0,25 W e 0,50 W (Figura 18), é possível inferir que ambas as irradiações têm potencial de indução de mudanças químicas na dentina. Vale a pena ressaltar que a câmera termográfica empregada neste estudo, embora de altíssima resolução ( $0,01^\circ\text{C}$ ) e utilizando-se frequência de gravação da câmera de 180 Hz, ainda assim detecta valores de temperatura médios dos pulsos laser (de largura temporal de  $60 \mu\text{s}$ ), e não os picos de temperatura, o que requer equipamentos de medição de maior resolução. Com isso, estima-se que podem ter sido atingidos valores maiores de temperatura do que os relatados aqui, sugerindo, assim, maiores mudanças químicas na dentina decorrentes das irradiações.

Nesse estudo as médias de valores máximos das temperaturas alcançadas para os grupos de 0,25 W e 0,50 W ficaram entre  $96 \pm 34^\circ\text{C}$ , e  $199 \pm 32^\circ\text{C}$  respectivamente (figura 19). Considerando a similaridade composicional entre os tecidos dentinário e ósseo (enquanto que a dentina tem 20% em peso de matriz orgânica, o tecido ósseo e esmalte tem 25% em peso e 1,5% em peso, respectivamente [122]), também é válida a comparação dos resultados obtidos no presente estudo com os resultados de Benetti *et al.* (2015) [111] que observaram,

para densidade de energia de  $6 \text{ J/cm}^2$  e  $12 \text{ J/cm}^2$ , as temperaturas máximas alcançadas de  $213 \pm 17^\circ\text{C}$  e  $284 \pm 17^\circ\text{C}$  respectivamente. A pequena diferença de temperatura máxima entre os estudos se dá pela diferença de conteúdo orgânico destes tecidos (ósseo e dentina).

Estudos anteriores empregando o laser de Er,Cr:YSGG para prevenção de cárie em esmalte evidenciaram aumento de temperatura de  $79,6^\circ\text{C}$  quando as amostras foram irradiadas com  $2,8 \text{ J/cm}^2$ ;  $184,1^\circ\text{C}$  quando eles foram irradiados com  $5,6 \text{ J/cm}^2$  e  $247,6^\circ\text{C}$  quando eles foram irradiadas com  $8,5 \text{ J/cm}^2$ [51]. Os autores observaram que as temperaturas mais elevadas promoveram alterações morfológicas mais significativas na superfície do esmalte (ablação) [83], demonstrando uma relação positiva com a densidade de energia. O mesmo fato é observado no presente estudo, conforme análises efetuadas por MEV.

O tratamento proposto com o uso do laser de Er,Cr:YSGG neste estudo objetivou tratar a dentina radicular para torná-la mais resistente à desmineralização; portanto, não é desejado que ocorra a ablação deste tecido, tendo em vista que o processo de ablação aumenta a rugosidade da dentina, o que pode interferir no processo de formação e retenção do biofilme, além de poder ocasionar efeitos estéticos indesejáveis. Por esta razão, e considerando os efeitos da água no processo de ablação explosiva[123], as irradiações realizadas no presente estudo foram realizadas com ausência de spray de água, no mesmo modelo que o efetuado em estudos anteriores [49,51,108,109,124]. No presente estudo, contudo, foram observadas alterações de cor e indícios de carbonização superficial observados macroscopicamente empregando-se a potência média de  $0,50 \text{ W}$  (Figura 22), justificando a não escolha desta potência média para uso em atividade preventiva. Nas amostras irradiadas com as potências médias de  $0,10 \text{ W}$  e  $0,25 \text{ W}$  foram observadas micro-ablações na superfície com restos de material explodido pela ablação, túbulos dentinários abertos pela ação do laser apresentando uma superfície sugestiva de degradação do colágeno (figura 23-24), similar aos achados de Shi Lin *et al.* (2010)[83] e de Hossain *et al.*(2001)[45]. As amostras de  $0,50 \text{ W}$  apresentaram ablação (figura 25) como ocorreu nas amostras do estudo de Hossain *et al.* (2001) [45] com a mesma potência média e sem refrigeração a água. Na literatura, o limite de densidade de energia do laser de Er,Cr:YSGG para ablação da dentina está entre  $2,69\text{-}3,66 \text{ J/cm}^2$  segundo Shin Lin *et al.* (2010) [83], o que corrobora os achados na análise morfológica do presente estudo.

O presente estudo evidenciou que as densidades de energia empregadas promovem aumentos de temperatura superficiais que indicam haver mudanças químicas na superfície da dentina, principalmente se empregarmos as potências médias de  $0,25 \text{ W}$  e  $0,5 \text{ W}$ . Contudo, ao

analisarmos as temperaturas pulpares, observamos que a potência média de 0,5 W pode ocasionar elevações próximas ao limiar de danos irreversíveis (5,6°C) estabelecido por Zach e Cohen (1965) [75]. Desta forma, para a fase 3 deste estudo, foi selecionada a potência média de 0,25 W para avaliação da ação anticariogênica do laser de Er,Cr:YSGG em dentina, principalmente em associação ao fluoreto, o que tem demonstrado efetividade em estudos anteriores efetuados em esmalte [51, 53, 65].

A avaliação composicional efetuada neste estudo foi realizada através da análise semiquantitativa dos espectros das bandas dos componentes da dentina após os tratamentos e antes da ciclagem de pH. A área sob a banda corresponde à quantidade de seus componentes na amostra. Uma comparação semiquantitativa dos componentes da dentina é feita normalizando a área sob cada uma das bandas e se compara proporcionalmente com a banda do componente mais estável com o aumento de temperatura do laser durante o tratamento das amostras. Neste estudo, a normalização foi feita utilizando-se área da banda do fosfato ( $1300-900\text{ cm}^{-1}$ ), referente aos modos de vibração  $\nu_1$  e  $\nu_3$ , que é o componente mais estável da dentina frente ao aumento de temperatura. Os resultados desse estudo demonstraram que o laser de Er,Cr:YSGG não alterou significativamente a proporção de carbonato, pois o carbonato da parte mineral foi retirado, mas o carbonato presente na matriz orgânica não foi retirado, corroborado com os estudos de Zzell *et al.* (2015)[116]. Contudo, a Figura 28 evidencia que o tratamento com FFA previamente à irradiação laser promoveu significativa redução das bandas de  $\nu_3\nu_4$  carbonato, evidenciando destruição de colágeno decorrente da elevação de temperatura. De fato, ao observarmos os achados morfológicos, observa-se maior efeito ablativo nas amostras tratadas com FFA+laser, provavelmente favorecido pela hidratação decorrente da aplicação de FFA e lavagem da amostra (figura 32). Esta maior ablação é a responsável pelo efeito de diminuição de  $\nu_3\nu_4$  carbonato observado nas análises de FTIR (figura28).

Nas amostras que foram tratadas com laser + flúor, flúor +laser e flúor isoladamente, foi observada diminuição do carbonato e aumentos nas proporções de amidas. Esse resultado não significa que houve crescimento de proteína na dentina, apenas significa que o espessante presente na composição do flúor gel mascarou os resultados. O espessante do flúor gel tem a função de facilitar a aplicação do flúor pelo profissional de saúde. Porém para o FTIR a presença do espessante encobre as bandas de amida e carbonato dificultando a quantificação do seu efeito no tratamento. Em um estudo posterior poderia ser testada a eficiência do flúor depois da ciclagem de pH com o FTIR.

Na figura 33 morfológicamente, observou-se que, nos grupos irradiados, ocorreram micro-ablações, com túbulos abertos, e ausência de trincas ou carbonizações, o que corrobora com os achados de Shin Lin *et al.*(2010)[83] e Hossain *et al.*(2001)[45]. O grupo tratado com flúor apresentou túbulos parcialmente abertos pela ação do FFA, devido á provável formação de fluoreto de cálcio. Neste trabalho, contudo, não foi possível observar a formação de glóbulos de fluoreto de cálcio devido à resolução do equipamento de microscopia empregado. Contudo, espera-se que as ablações promovidas pela irradiação laser favoreça a formação e retenção de fluoreto de cálcio, conforme os achados de Zamataro *et al.* (2013) [65], o que poderá ser verificado em estudos posteriores.

Na análise óptica efetuada por OCT, foram observadas superfícies lisas nas amostras sem tratamento, com uma nítida interface ar-amostra, característica do aplainamento das amostras no momento do preparo das mesmas. Após a aplicação de FFA, observou-se uma região de maior retroespalhamento da luz imediatamente abaixo da superfície das amostras, o que sugere efeitos do FFA, com formação de fluoreto de cálcio que pode interferir na passagem da luz. Nas amostras irradiadas, observou-se um padrão irregular superficial, característico do modo pulsado do laser, cujos centros dos pulsos promoveram áreas de maior micro-ablação, o que interferiram no espalhamento da luz. Além disso, conforme já explicado anteriormente na revisão bibliográfica, os lasers são capazes de promover alterações químicas e estruturais na dentina devido ao efeito térmico, alterando assim a forma com que a luz irá se espalhar e refletir quando em contato com a região.

Após a ciclagem de pH, foram observadas interfaces escuras no interior da dentina, de todas as amostras avaliadas. Isso ocorre devido ao processo de desmineralização provocado pelo desafio cariogênico, uma vez que ele cria espaços vazios na estrutura da dentina, fazendo com que haja um menor retroespalhamento de luz [125].

Após a ciclagem de pH, o grupo que apresentou o menor coeficiente de atenuação óptico foi o Controle. Isto ocorre porque o ácido da ciclagem de pH penetra pelos túbulos dentinários abertos, o que leva a formação de espaços vazios na estrutura da dentina, devido à perda mineral. A presença de espaços faz com que ocorra uma maior penetração do feixe laser na amostra, sem que ele interaja com os centros espalhadores. Desta forma, é observado um menor retroespalhamento de luz na superfície e uma maior penetração da luz em profundidade na amostra, como foi visto na Figura 38. Resultados semelhantes foram encontrados por Mujat *et al.* (2003) [126] em esmalte.



O grupo que apresentou o maior módulo de coeficiente de atenuação foi o grupo Flúor+Laser, indicando uma menor perda mineral neste grupo conforme sugerido por De Cara *et al.* 2012[125], de forma similar à observada no uso da irradiação laser isoladamente. Tal resultado corrobora as análises morfológica e composicional, evidenciando um melhor efeito térmico da irradiação laser após aplicação de FFA e lavagem das amostras, alterando composicionalmente a dentina devido à ablação potencializada pela água decorrente deste tratamento. Estudos posteriores com análise de flúor fracamente e fortemente ligado poderão evidenciar se houve maior retenção de fluoreto com a irradiação posterior. Os demais grupos com aplicação de FFA não evidenciaram diferenças estatisticamente significativas no coeficiente de atenuação óptico quando comparados ao grupo sem tratamento, sugerindo que o fluoreto de cálcio formado pode ter sido removido nas soluções de ciclagem de pH e, assim, não resultaram em redução significativa na desmineralização da dentina. Estudos posteriores das soluções de ciclagem, assim como de formação e retenção de flúor fracamente ligado podem confirmar esta hipótese.

Devido à escassez de estudos que quantifica o coeficiente de atenuação óptica para a desmineralização da dentina, a comparação dos resultados é feita com estudos efetuados em esmalte. Mesmo assim, observa-se uma divergência na literatura sobre a diminuição do coeficiente de atenuação óptica de amostras desmineralizadas quando comparadas com amostras sadias. Os resultados apresentados neste estudo condizem com os apresentados por Sowa *et al.*(2001)[127] e por Maia *et al.* (2015)[120], porém são contrários aos apresentados por Mujat *et al.* 2003[126] e De Cara *et al.* 2012[125].

O estudo demonstrou que a associação do FFA com uma posterior irradiação laser sob potência média de 0,25 W e sem arrefecimento ar/água apresentou melhores resultados. Estudos sugerem que a irradiação laser aumenta a difusibilidade do flúor, deixando-o mais favorável a absorção deste íon pelo tecido dentário [127][128]. Na literatura temos estudos que sugerem a possibilidade de que a irradiação laser forma microespaços na superfície, que estes funcionam como depósitos de íons que serão liberados pela desmineralização, os quais participariam do processo de remineralização do dente [129]. Outros estudos sugerem que a irradiação laser é capaz de promover maior retenção de fluoreto e, conseqüentemente, aumentado o efeito cariostático por um maior período de tempo [45]. Na literatura é sugerido que o laser potencializa o efeito do FFA quando aplicado topicamente na superfície do dente, quando a irradiação ocorre antes da aplicação do FFA [130]. Este estudo é divergente, visto que o coeficiente de atenuação óptico em valor absoluto foi maior quando a irradiação laser

ocorre posteriormente à aplicação do FFA, sendo necessários mais estudos posteriores, tais como a avaliação da perda mineral, para se determinar a eficácia deste tratamento na prevenção da desmineralização.

## 7. CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos, pode-se concluir que o laser de Er,Cr:YSGG promove elevações de temperatura superficiais que indicam a ocorrência de transformações químicas na superfície da dentina radicular; contudo, dos parâmetros testados, se considerarmos as elevações de temperatura pulpar e as alterações morfológicas promovidas, a potência média de 0,25 W é a que se apresenta mais promissora. Quando associada ao fluoreto, observa-se que a irradiação laser efetuada após a aplicação tópica de flúor apresenta-se como a alternativa mais promissora, pois este tratamento promoveu alterações composicionais, morfológicas e de coeficiente de atenuação óptico que indicam maior resistência da dentina à desmineralização.

## 11. ANEXOS

### Anexo A

Especificações do equipamento laser e cálculo da dosimetria usada:

*Laser* de Er,Cr:YSGG, classe IV – equipamento WaterLase MD (Biolase Inc., Irvine, EUA):

Comprimento de onda	2,78 $\mu\text{m}$ (2780 nm)
Frequência	5-100 Hz
Potencia	0,01-10,0 W
Energia por pulso	0-600 mJ
Duração de pulso no modo H	60 $\mu\text{s}$
Duração de pulso no modo S	700 $\mu\text{s}$
Ângulo da peça de mão	70° contra angulo
Diâmetro do foco	500-1100 $\mu\text{m}$

Taxa de repetição empregada no presente estudo = 20 Hz

Ponta tipo MZ6

Diâmetro da ponta = 600  $\mu\text{m}$

Diâmetro útil da ponta = 516  $\mu\text{m}$  (0,0516 cm)

$$d \cdot \left(1 - \frac{1}{e^2}\right) = d \cdot 0,86 = 0,0516 \text{ cm}$$

Cálculo da área do *spot*:

$$A = \pi \cdot \frac{d^2}{4}$$

$$A = 3,14 \cdot \frac{(0,0516)^2}{4} = 0,00209 \text{ cm}^2$$

Cálculo das densidades de energia:

- 1) Potencia média de 0,10 W

$$E = P \cdot t$$

$$E = 0,1 \cdot \left(\frac{1}{20}\right) = 5 \text{ mJ} = 0,005 \text{ J}$$

$$DE = \frac{E}{A} = \frac{0,005}{0,00209} = 2,4 \text{ J/cm}^2$$

- 2) Potencia média de 0,25 W

$$E = P \cdot t = 0,25 \cdot \left(\frac{1}{20}\right) = 0,0125 \text{ J}$$

$$DE = \frac{E}{A} = \frac{0,0125}{0,00209} = 6 \text{ J/cm}^2$$

- 3) Potencia média de 0,50 W

$$E = P \cdot t = 0,50 \cdot \left(\frac{1}{20}\right) = 0,025 \text{ J}$$

$$DE = \frac{E}{A} = \frac{0,025}{0,00209} = 12 \text{ J/cm}^2$$

**ANEXO B****Parecer da Comissão de Ética em Uso de Animais da Fundação Universidade Federal do ABC**

**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO**  
**Fundação Universidade Federal do ABC**  
**Comissão de Ética em Uso de Animais**



Santo André, 23 de setembro de 2015  
CEUAx N 3055120915

Ilmo(a). Sr(a).  
Responsável: Patricia Aparecida Da Ana  
Disc ou Centro: Cecs  
Equipe envolvida: Elizabete Dos Santos Ferreira Silva - **executor** (ufabc); Ilka Tiemy Kato Prates - colaborador (ufabc); N/a (orientador)

Título do projeto: "Estudo in vitro dos efeitos do laser de Er,Cr:YSGG na dentina quando empregado para prevenção da cárie radicular".

**Parecer Consubstanciado da CEUA UFABC**

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Fundação Universidade Federal do ABC, na reunião de 22/09/2015, **ANALISOU** e **APROVOU** o protocolo de estudo acima referenciado. A partir desta data, é dever do pesquisador:

1. Comunicar toda e qualquer alteração do protocolo.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do protocolo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.
4. **Relatórios parciais** de andamento deverão ser enviados **anualmente** à CEUA até a conclusão do protocolo.

Atenciosamente,

Profa. Dra. Renata Simões  
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal do ABC

## ANEXO C

## Parecer da Comissão de Ética em Pesquisa da Fundação Universidade Federal do ABC



**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** Estudo in vitro dos efeitos do laser de Er,Cr:YSGG na dentina quando empregado para prevenção da cárie radicular

**Pesquisador:** Patricia Aparecida da Ana

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 49456715.0.0000.5594

**Instituição Proponente:** FUNDACAO UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC - UFABC

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 1.334.133

**Apresentação do Projeto:**

Trata-se de um projeto de mestrado em qual a equipe coletará dentes incisivos de humanos e os submeterá à irradiação a laser, durante qual serão monitoradas temperaturas na superfície da dentina e no interior da câmara pulpar.

**Objetivo da Pesquisa:**

O objetivo do estudo é determinar se o tratamento com o laser específico (Er,Cr:YSGG) é uma opção viável para prevenção de cárie.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

O experimento ocorre 'in vitro' após a extração dos dentes dos pacientes submetidos a exodontia como parte de tratamento odontológico. A pesquisadora aponta que todos os riscos envolvidos decorrem da extração como parte do tratamento, e não do estudo. Não há benefícios diretos para os pacientes que forneceram o material biológico. Eventuais benefícios à sociedade se darão no futuro como parte do desenvolvimento de tratamento anti-cárie.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Com uma orientanda e uma co-orientadora, parece que seria o caso de incluir um equipe de pesquisa no protocolo.

O estudo não traz riscos específicos aos voluntários. A metodologia é adequada para a questão

**Endereço:** Avenida dos Estados, 5001, Bloco A, Torre I, 1º andar  
**Bairro:** Santa Terezinha **CEP:** 09.210-580  
**UF:** SP **Município:** SANTO ANDRE  
**Telefone:** (11)3356-7632 **E-mail:** cep@ufabc.edu.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
ABC



Continuação do Parecer: 1.334.133

sob investigação, que é importante.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) é objetivo. A ausência de endereço foi sanada.

**Recomendações:**

Nota-se que a co-orientadora não consta na equipe de pesquisa. Favor notificar a eventual mudança de equipe ao incluir pesquisadores além da equipe de pesquisa relatada no protocolo.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

A pesquisadora respondeu a um número de questionamentos pelo CEP-UFABC, e corrigiu algumas pendências que foram levantadas no último parecer ético.

Favor enviar relatório parcial seis meses após a aprovação pelo CEP.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_580065.pdf	26/10/2015 19:54:45		Aceito
Outros	Carta_respostas.pdf	26/10/2015 19:54:31	Patricia Aparecida da Ana	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO.pdf	26/10/2015 19:54:06	Patricia Aparecida da Ana	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	26/10/2015 19:53:47	Patricia Aparecida da Ana	Aceito
Folha de Rosto	FR_erbio.pdf	16/09/2015 17:29:34	Patricia Aparecida da Ana	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Endereço:** Avenida dos Estados, 5001, Bloco A, Torre I, 1º andar  
**Bairro:** Santa Terezinha **CEP:** 09.210-580  
**UF:** SP **Município:** SANTO ANDRE  
**Telefone:** (11)3356-7632 **E-mail:** cep@ufabc.edu.br





UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
ABC



Continuação do Parecer: 1.334.133

SANTO ANDRE, 23 de Novembro de 2015

---

**Assinado por:**  
**Andre Mascioli Cravo**  
**(Coordenador)**

**Endereço:** Avenida dos Estados, 5001, Bloco A, Torre I, 1º andar  
**Bairro:** Santa Terezinha **CEP:** 09.210-580  
**UF:** SP **Município:** SANTO ANDRE  
**Telefone:** (11)3356-7632 **E-mail:** cep@ufabc.edu.br

## 12. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 
- [1]. R.L. Ettinger, “Oral health needs of the elderly – an international review”, *Int. Dent. J.*, Vol.43, n. 4, pp. 348-54, 1993.
- [2].J.D. Beck, “The epidemiology of root surface caries: north american studies”, *Adv. Dent. Res.*,Vol. 7, n.1, pp. 42-51, July, 1993.
- [3].,M.C. Meneghim, A.C. Pereira, F.R.B.Silva, "Prevalence of root caries and periodontal conditions in an elderly institutionalized population from Piracicaba – SP”, *Pesqui. Odontol.Bras.*,Vol. 16, n. 1, pp. 50-56,jan./mar.,2002.
- [4].C.F.Colussi, S.F.T.Freitas, “Epidemiological aspects of oral health among the elderly in Brazil”, *Cad.Saúde Pública*, Rio de Janeiro, Vol.18, n.5, pp.1313-1320, set-out, 2002.
- [5].L.B. Rihs, M.L.R. Sousa, R.S. Wada, “Dental root surface caries prevalence among adults and senior citizens in southeast São Paulo State, Brazil”, *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, Vol.21, n.1, pp.311-316, jan-fev, 2005.
- [6].C. Henriques, R.TelarolliJr.,L.C.M. Loffredo, A.A.B. Montandon, J.A.D. Campos, “ Self-perception of oral health status by elderly in Araraquara – SP city”, *CiencOdontol Bras.*Vol.10, n.3,pp.67-73, jul./set. 2007.
- [7] P.E. Petersen, D. Kandelman, S. Arpin, H. Ogawa, “Global oral health of older people – Call for public health action ”, *Community Dental Health*, Vol.27,n. 2,pp. 257–268 ,2010.
- [8]. R.A.A. Marques, J.L.F. Antunes, M.L.R. Sousa, M.A. Peres, P. Frazão, “Root caries prevalence and severity in Brazilian adults and elderly”, *Rev. SaúdePública*, Vol.47, n. 3, pp.59-68, 2013.
- [9].R. Gluzman,R.V. Katz, B.J. Frey, R. McGowan, “Prevention of root caries: a literature review of primary and secondary preventive agents”, *Spec. Care Dentist.*,Vol.33,n.3, pp.133-140, 2013.

- 
- [10].I. Bignozzi, A. Crea, D. Capri, C. Littarru, C. Laiolo, D.N. Tatakis,“Root caries: a periodontal perspective”, *J. Periodont. Res.* Vol.49, pp. 143–163, 2014.
- [11].M. Hayes, F. Burke, P. F. Allen, “Incidence, Prevalence and Global Distribution of Root Caries” , *Monogr. Oral Sci. Basel.*, Vol. 26, pp. 1–8,2017.
- [12].WORLD HEALTH ORGANIZATION. Number of people over 60 years set to double by 2050[on line]. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs404/en/>. Acesso em: 26/11/2015.
- [13].Projeção da população do Brasil por sexo e idade – 1980 – 2050 (Revisão 2008). INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, IBGE.,[online]. [http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/projecao\\_da\\_populacao/2008/projecao.pdf](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/projecao_da_populacao/2008/projecao.pdf). Acesso em 26/11/2015.
- [14].MINISTÉRIO DA SAÚDE, PESQUISA NACIONAL DE SAÚDE BUCAL, PROGRAMA SBBRASIL 2010, Resultados principais,[online]. Disponível em [http://www.bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/pesquisa\\_nacional\\_saude\\_bucal.pdf](http://www.bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/pesquisa_nacional_saude_bucal.pdf). Acesso em 26/11/2015.
- [15].G.H. Gilbert, R.P. Duncan, T.A. Dolan, U. Foerster,“Twenty-four month incidence of root caries among a diverse group of adults”, *Caries Res.*,Vol. 35,pp.366-375, 2001.
- [16].E.D. Beltrán-Aguilar, L.K. Barker, M.T. Canto, B.A. Dye, B.F. Gooch, S.O. Griffin, J. Hyman, F. Jaramillo, A. Kingman, R. Nowjack-Raymer, R.H. Selwitz, T. Wu,“Surveillance for dental caries, dental sealants, tooth retention, edentulism and enamel fluorosis”, *MMWRSurveillSumm. Centers for Disease Control and Prevention (CDC)*, Vol.54,n. 3, pp.1-43, 2005.
- [17].T.M.Marthaler, “Cariostatic Efficacy of the Combined Use of Fluorides”,*J. Dent. Res.*,Vol. 69, pp.797-800, February, 1990.

---

[18].O.Fejerskov, V. Baelum, E.S. Ostergaard, “Root caries in Scandinavia in the 1980's and future trends to be expected in dental caries experience in adults”, *Adv.Dent. Res.*,Vol. 7,n.1,pp.4-14, July, 1993.

[19].R.L. Ettinger, “The Development of Geriatric Dental Education Programs in Canada: An Update”, *J. Can. Dent. Assoc.*, Vol. 76, n. 1, pp. 45-48, 2010.

[20].C. Mata, G. Mckenna, F.M. Burke, “Caries and the older patient”, *Dent.Update.*, Vol.38, n.6, pp. 376-8, pp.381, 2011.

[21].C. Scully, R.L. Ettinger, “The influence of systemic diseases on oral health care in older adults”, *JADA*, Vol. 138, pp. 7S-14S, September, 2007.

[22].J.M. Chalmers, K.D.Carter, A.J.Spencer, “Caries experience and increments in community-living older adults with and without dementia”, *Gerodontology*, Vol.19,n.2,pp.80-94, 2002.

[23].W.M. Thomson, J.M. Chalmers, A.J. Spencer, G.D. Slade, “ Medication and dry mouth: findings from a cohort study of older people”, *J Public Health Dent.*, Vol.60,n.1, pp.12-20, 2000.

[24].R.L. Ettinger, R. Mulligan, “The future of dental care for the elderly population”, *J Calif Dent Assoc.*, Vol.27,n.9, pp.687-92, 1999.

[25] Ten cate “Review on fluoride, with special emphasis on calcium fluoride mechanisms in caries prevention”, *Eur J Oral Sci.*,Vol. 105, pp.461-465,1997.

[26].J.M. ten Cate, J.D.B. Featherstone, “Mechanistic Aspects of the Interactions Between Fluoride and Dental Enamel”, *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*, Vol. 2,n.2,pp.283-296, 1991.

[27].L.M.A. Tenuta, J.A. Cury, “Fluoride: its role in dentistry”, *Braz OralRes.*,Vol.24,n.(Spec Iss 1),pp.9-17,2010.

- 
- [28].P.C. Narvai, P. Frazão, A.G. Roncalli, J.L.F. Antunes, “Cárie dentária no Brasil: declínio, iniquidade e exclusão social,” *Rev Panam Salud Publica*.Vol.19, n.6, pp. 385–93,2006.
- [29].J.R. Mellberg, P.V. Laakso, C.R. Nicholson “The Acquisition and Loss of Fluoride by Topically Fluoridated Human Tooth Enamel”, *Archs oral Biol*. Vol.11, pp.1213-1220, 1966.
- [30].J. Arends, J.Christoffersen, “Nature and Role of Loosely bound Fluoride in dental Caries”, *J.Dent Res.*, Vol69, pp.601-605, February, 1990.
- [31].D. Gregory, S. Hyde, “Root Caries in Older Adults”, *J Calif Den Assoc*. Vol..43,n.8, pp.439-45, 2015.
- [32].Cruz 1992.R. Cruz, B. Ogaard, G. Rolla, “Acquisition of alkali-soluble fluoride by enamel through treatment with NaF-containing toothpastes in vitro”, *Scand JDent Res.*,Vol.100, pp81–87,1992
- [33].P. Tschoppe, D.L. Zandim, J.E.C. Sampaio, A.M. Kielbassa “Saliva substitute in combination with high-concentrated fluoride toothpaste: Effects on demineralised dentin in vitro”, *J. of Dent.*,Vol.38, pp. 207–213, 2010.
- [34].H.C. Margolis, E.C. Moreno, B.J. Murphy “Effect of Low Levels of Fluoride in Solution on Enamel Demineralization in vitro”, *J Dent Res.*, Vol.65, n.1,pp.23-29, January, 1986.
- [35].R.J.M. Lynch, U. Mony, J.M. ten Cate, “The Effect of Fluoride at Plaque Fluid Concentrations on Enamel De- and Remineralisation at Low pH”, *CariesRes.*,Vol.40, pp.522-529, 2006.
- [36].S. Mendes, I.P.Souza, J.A.Cury, “Formação in vitro de fluoreto de cálcio e fluorapatita em esmalte humano hígido após a aplicação de gel flúor-fosfato acidulado durante 1 a 4 minutos”, *Rev Odontol Univ São Paulo.*,Vol.10,n.4. pp.281-285,out./dez.,1996.

- 
- [37].G.C. Vale, C.P.M. Tabchoury, A.A. Del Bel Cury, L.M.A. Tenuta, J.M. ten Cate, J.A. Cury, “APF and Dentifrice Effect on Root Dentin Demineralization and biofilm”, *J.Dent Res.*,Vol.90, n.1,pp.77-81, 2011.
- [38] .J.M. ten Cate, J.J.M. Damen, M.J. Buijs, “Inhibition of Dentin Demineralization by Fluoride in vitro”,*Caries Res*,Vol.32, pp.141–147, 1998.
- [39].R.J. Wierichs, H. Meyer-Lueckel, “Systematic review on noninvasive treatment of root caries lesions”, *J Dent Res.*,Vol.94,n.2,pp.261-71, 2015.
- [40].A.C.Magalhaes,“Conventional Preventive Therapies (Fluoride) onRoot Caries Lesions”, *Monogr Oral Sci. Basel*, Karger,Vol 26, pp 83–87,2017.
- [41].I.Diamanti, H.Kolestsi-Kounari, E.Mamai-Homata, G. Vougiouklakis, “In vitro evaluation of fluoride and calcium sodiumphosphosilicate toothpastes, on root dentine caries lesions”, *J.of Dent.*,Vol.39, pp.619-628,2011.
- [42]I. Diamanti, H. Koletsi-Kounari,E. Mamai-Homata,G. Vougiouklakis Effect of fluoride and of calcium sodium phosphosilicatetoothpastes on pre-softened dentindemineralization andremineralization in vitro”, *J of Dent.*,Vol.38, pp.671-677, 2010.
- [43]V.R. Geraldo-Martins, C.P. Lepri, J.J.Faraoni-Romano, R.G. Palma-Dibb, “The combined use of Er,Cr:YSGG and fluoride to prevent root dentin demineralization” *.J.Appl.Oral Sci.* Vol.22, n.5, pp.459-64, 2014.
- [44].Qiao Liyan,YUJing Tao, JIA Xingya,“A study on acquired acid resistance of enamel and dentine irradiated by Er, Cr: YSGG laser in vitro”, *J Stomatol*, Vol. 40, n. 1, pp.34-37, January, 2005.
- [45].M. Hossain, Yuichi Kimura, Yukio Nakamura, Yoshishige Yamada, Jun-Ichiro Kinoshita, Koukichi Matsumoto, “A Study on Acquired Acid Resistance of Enamel and Dentin Irradiated by Er,Cr:YSGG Laser”,*J. of Clin.Laser Med &Surg*,Vol. 19, n. 3, pp. 159–163, 2001.

- 
- [46].C. B. Brandão, M.M.M.G. CONTENTE, F.A. de Lima, R. Galo, A. M.Corrêa -Afonso, L. Bachmann, M.C.Borsatto “Thermal Alteration and Morphological Changes of Sound and Demineralized Primary Dentin After Er:YAG Laser Ablation”,*Microsc Res and Tech.*,Vol.75, pp.126–132, 2012.
- [47].A.C.T. Jorge, A.Cassoni, P.M. de Freitas, A.F. Reis, A.Brugnera Jr, J.A. Rodrigues, “Influence of Cavity Preparation with Er,Cr:YSGG Laser and Restorative Materials on In Situ Secondary Caries Development”,*Photomed and Laser Surg.*,Vol.33, n.2, pp. 98–103, 2015.
- [48].R. Fekrazad, L. Ebrahimpour, “Evaluation of acquired acid resistance of enamel surrounding orthodontic brackets irradiated by laser and fluoride application” *Lasers Med Sci*, Vol.29, pp.1793–1798, 2014.
- [49].P.M. de Freitas, M. Rapozo-Hilo, C. de P. Eduardo, J.D.B Featherstone,“In vitro evaluation of erbium, chromium:yttrium–scandium–gallium–garnetlaser-treated enamel demineralization”,*Lasers Med Sci*,Vol.25, pp.165–170, 2010.
- [50].K.M.Ramalho, Chin-ying Stephen Hsu,P.M. de Freitas,A.C.C.Aranha, M.Esteves-Oliveira, R.G. Rocha, C.de P. Eduardo, “Erbium Lasers for the Prevention of Enamel and Dentin Demineralization: A Literature Review”,*Photomed and Laser Surg.*, Vol.33, n.6, pp. 301–319, 2015.
- [51].P.A. Ana, A. Blay, W. Miyakawa, D.M. Zezell, “Thermal analysis of teeth irradiated with Er,Cr:YSGG at low fluences” *Laser Phys.Lett.*, Vol.4, n.11, pp.827–834, 2007.
- [52].H.G.D. Boari, P.A. Ana, C.P. Eduardo, G.L. Powell, D.M. Zezell, “Absorption and Thermal Study of Dental Enamel when Irradiated with Nd:YAG Laser with the Aim of Caries Prevention”, *Laser Physics*, Vol. 19, n. 7, pp. 1463–1469, 2009.
- [53].P.M. Freitas, D. Soares-Geraldo, A.C. Biella-Silva, A.V. Silva, B.L.Silveira, C.P. Eduardo, “Intrapupal Temperature Variation During Er,Cr:YSGG Enamel Irradiation on Caries Prevention”, *J Appl Oral Sci.*,Vol.16, n.2,pp.95-9, 2008.

- 
- [54]. V.R. Geraldo-Martins, C.P. Lepri, R.G. Palma-Dibb, “Influence of Er,Cr:YSGG laser irradiation on enamel caries prevention”, *Lasers Med Sci*, Vol.28, pp.33–39, 2013.
- [55]. Glenn van As, “Erbium lasers in dentistry”, *Dent Clin N Am*, Vol.48, pp.1017–1059, 2004.
- [56]. J.J. Beltrano, L. Torrisi, E. Campagna, E. Rapisarda, I. Finocchiaro, G. Olivi “Er,Cr:YSGG Pulsed laser applied to medical dentistry”, *Radiation Effects & Defects in Solids*, Vol.163, n.4–6, pp.331–338, April–June 2008.
- [57]. D. Fried, J.D.B. Featherstone, S.R. Visuri, W. Seka, J.T. Walsh, “The Caries Inhibition Potential of Er:YAG and Er:YSGG Laser Radiation”, *SPIE*, Vol.2672, pp. 73-78, 1996.
- [58]. J.D.B Featherstone, D.G.A. Nelson, “Laser Effects on Dental Hard Tissues”, *Adv Dent Res.*, Vol.1, n.1, pp.21-26, October, 1987.
- [59]. M. Moslemi, R. Feitrazad, N. Tadayon, M. Ghorbani, H. Torabzadeh, M.M. Shadkar, “Effects of Er,Cr:YSGG Laser Irradiation and Fluoride Treatment on Add Resistance of the Enamel”, *Pediatric Dentistry*, Vol. 31, n.5, pp.409-413, 2009.
- [60]. Y. Liu, C.-Y.S. Hsu, C.M.J. Teo, S.H. Teoh, “Potential Mechanism for the Laser-Fluoride Effect on Enamel Demineralization”, *J Dent Res*, Vol.92, n.1, pp.71-75, 2013.
- [61]. P. Ekwarapoj, S. K. Sidhu, J.F. McCabe, “Effect of different power parameters of Er,Cr:YSGG laser on human dentine”, *Lasers Med Sci*, Vol.22, pp.175–182, 2007.
- [62]. M. Al-Omari, J. E. Palamara “Effect of Er,Cr:YSGG laser on human dentin fluid flow”, *Lasers Med Sci* Vol.28, pp.1445–1451, 2013.
- [63]. G.J.P.L. Oliveira, F.E. Pinotti, H.L. Carvalho, C.R. Scardueli, R.A.C. Marcantonio, “Influence of diferente Proportions of External Irrigation During the Er,Cr:YSGG laser



---

Irradiation on Wear and Roughness of Root Surface”, *J Lasers Med Sci*, Vol.7, n.1, pp.51-55, 2016.

[64].R.M. Oliveira, V.M. Souza, C.M. Esteves, Y.B.O. Lima-Arsati, A. Cassoni, J.A. Rodrigues, A. Brugnera Jr., “Er,Cr:YSGG Laser Energy Delivery Pulse and power Effects on Enamel Surface and Erosive Resistance”, *Photomed And Laser Surg*, Vol.35, n.11, pp.639-646, 2017.

[65].C.B. Zamataro, P.A. Ana, C. Benetti, D.M. Zezell, “Influence of Er,Cr:YSGG Laser on CaF<sub>2</sub>-Like Products Formation Because of Professional Acidulated Fluoride or to Domestic Dentifrice Application”, *Microsc.Res.Tech.*, Vol.76, pp.704–713, 2013.

[66].S. Kuroda, B.O. Fowler, “Compositional, structural, and phases changes in *in vitro* laser-irradiated human tooth enamel”, *Calcif.Laser Tissue. Int.*, Vol.36, pp. 361-369, 1984.

[67].B.O.Fowler, S. Kuroda, “Changes in heated and in *laser* irradiated human tooth enamel and their probable effects on solubility”, *Calcif Tissue Int.*, Vol.38, pp.197–208, 1986.

[68].D.WHolcomb, R.A. Young, “Thermal decomposition of human tooth enamel”, *Calcif Tissue Int.*, Vol.31, pp.189–201, 1980.

[69].L.Bachmann, K. Rosa, P.A. da Ana, D.M. Zezell, A.F. Craievich, G. Kellermann, “Crystalline structure of human enamel irradiated with Er,Cr:YSGG laser”, *Laser Phys. Lett.*, Vol.6, n. 2, pp.159-162, 2009.

[70].D.M. Zezell *et al.* “Compositional and crystallographic changes on enamel when irradiated by Nd:YAG or Er,Cr:YSGG *lasers* and its resistance to demineralization when associated with fluoride”, *Proc SPIE.*, pp. 7549;7549G-1 -7549G-12, 2010.

[71].D.M. Zezell, L. Bachmann, “*Estrutura e composição do esmalte e da dentina: tratamento térmico e irradiação com lasers emissores no infravermelho*”, 1.ed. São Paulo: Livraria da Física, 2005.

---

[72]M.A. Frigo, L.; Favero, G.M. Lopes-Martins, R.A.B.Brugnera Junior, “A.*In vitro* analysis of human tooth pulp chamber temperature after low-intensity *laser* therapy at different power outputs”, *Lasers Med. Sci.*, Vol. 26, pp.143–147,2011.

[73]J M. White, M.C. Fagan, H.E. Goodis, “Intrapulpal Temperatures During Pulsed Nd:YAG *Laser* Treatment of Dentin, *In vitro*”. *J. Periodontol.*, Vol.. 65, pp. 255-259,1994.

[74].R. Franzen, B. Rashidisangary, S. Ozturan, L. Vanweersch, N. Gutknecht, “Intrapulpal temperature changes during root surface irradiation with dual-wavelength *laser* (2780 and 940 nm): *in vitro* study”, *J. of Biomedical Optics*, Vol.20, n.1, pp. 018002-1-6, 2015.

[75].L. Zach, G Cohen,“Pulp response to externally applied heat,”*OralSurg.Oral Med. Oral Pathol.*,Vol..19, pp.515–530, 1965.

[76].A. Promklay, P. Fuangtharnthip,R. Surarit, P. Atsawasuwan, “Response of Dental Pulp Cells to Er:YAG Irradiation”, *Photomed and Laser Surg*, Vol.28, n.6, pp. 793–799, 2010.

[77].U. Keller, R. Hibst“Tooth pulp reaction following Er:YAG laser application” *Lasers in Orthopedic, Dental, and Veterinary Medicine*, SPIE, Vol. 1424, pp.127-133, 1991.

[78].I.W.M.Jeffrey, B. Lawrenson , E. M. Saunders, C. Longbottom,“Dentinal temperature transients caused by exposure to CO\* laser irradiation and possible pulpal damage”,*J. Dent.*; Vol.18, pp.31-36, 1990.

[79].K. Kodonas, C. Gogos, D. Tziafas “Effect of simulated pulpal microcirculation on intrapulpal temperature changes following application of heat on tooth surfaces”,*International Endodontic Journal*, Vol.42, pp.247–252, 2009.

[80].B.N.Cavalcanti,J.L. Lage-Marques, S. M. Rode, “Pulpal temperature increases with Er:YAG laser and high-speed handpieces”, *J Prosthet Dent*, Vol.90, pp.447-51, 2003.

- 
- [81].S.J. Krmek, I. Miletic, P. Simeon, G.P. Mehicic, I. Anic, B. Radisic, “The Temperature Changes in the Pulp Chamber During Cavity Preparation with the Er:YAG Laser Using a Very Short Pulse”, *Photomedicine and Laser Surgery*, Vol.27, n.2, pp. 351–355, 2009.
- [82].V. Srimaneepong, J.E.A. Palamara, P.R. Wilson, “Pulpal space pressure and temperature changes from Nd:YAG laser irradiation of dentin”, *Journal of Dentistry*, Vol.30, pp. 291–296, 2002.
- [83].Shi Lin, Qinghua Liu, Qiming Peng, Mingguang Lin, Zhenlin Zhan, Xianzeng Zhang, “The ablation threshold of Er:YAG laser and Er,Cr:YSGG laser in dental dentin” *Sci. Res. Essays*, Vol. 5, n.16, pp. 2128-2135, 2010.
- [84]. M. Bath-Balogh, M.J. Fehrenbach, “Anatomia, Histologia e embriologia dos dentes e das estruturas orofaciais,” editora Elsevier, 3ª edição, 2011.
- [85].M.C, Madeira “Anatomia do dente” editora Elsevier, 3ª edição, 2010.
- [86].A. De Nanci, “Ten Cate’s Oral Histology, Development, Structure and Function” editor Elsevier, 8ª edição, 2009.
- [87].M. Goldberg, A. B. Kulkarni, M.Young, A.Boskey, ”Dentin: Structure, Composition and Mineralization: The role of dentin ECM in dentin formation and mineralization,” *FrontBiosci (Elite Ed)*, Vol.3, pp. 711–735, 2012.
- [88].L.C. Junqueira, J.Carneiro, “Histologia Básica”, Editora Guanabara Koogan, 12ª Edição, 2013.
- [89].E.Katchburian;V. Arana, “Histologia e embriologia oral,” editora Guanabara Koogan, 3ª edição, 2012.
- [90] R.Z. Le Geroz 1990, “Chemical and Crystallographic Events In the Caries Process”, *J Dent Res*, Vol. 69(Spec 155), pp. 567-574, February, 1990

- 
- [91] R.M. Frank, “Structural Events in the Caries Process in Enamel, Cementum, and Dentin”, *J Dent Res*, Vol. 69(Spec 155), pp.559-566, February, 1990
- [92] E.A.M. Kidd, O. Fejerskov “What Constitutes Dental Caries? Histopathology of Carious Enamel and Dentin Related to the Action of Cariogenic Biofilms”, *J Dent Res*, Vol. 83(Spec Iss C), pp.C35-C38, 2004
- [93] J.E.O.Lima, “Cárie dentária: um novo conceito”, *R Dental Press OrtodonOrtop Facial*, Vol. 12, n. 6, pp. 119-130, nov./dez. 2007
- [94] M. Maltz, L. S. Alves, J. E. A. Zenknerb “Biofilm Control and Oral Hygiene Practices”, *Monogr Oral Sci. Basel*, Vol 26, pp 76–82, 2017.
- [95] E. Newbrun, “Cariology”, 2nd ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1983
- [96] S. M. Costa, A. K. Adelário, M. Vasconcelos, M. H. N. G. Abreu, “Explanatory Models for Dental Caries: From the Organismic to Ecosystemic Model”, *Pesq Bras Odontoped Clin Integr*, Vol.12, n.2, pp. 285-91, abr./jun., 2012.
- [97] N. Damé-Teixeira, C. C. F. Parolo, M. Maltz, “Specificities of Caries on Root Surface”, *Monogr Oral Sci. Basel*, Vol 26, pp 15–25, 2017.
- [98] T. Aoba, “Solubility properties of human tooth mineral and pathogenesis of dental caries”, *Oral Diseases*, Vol.10, pp. 249–257, 2004.
- [99] J.A Cury, “Uso do flúor e controle da cárie como doença”, in: L.N. Baratieri *et al.*, *Odontologia restauradora - Fundamentos e possibilidades*, pp. 33-68, São Paulo, Santos, 2001.
- [100] T. Do, N. Damé-Teixeira, M. Naginyte, P.D. Marsh, “Root Surface Biofilms and Caries”, *Monogr Oral Sci. Basel*, Vol 26, pp 26–34, 2017.

- 
- [101].C.Chaussain-Miller, F. Fioretti, M. Goldberg, S. Menashi, “The Role of Matrix Metalloproteinases (MMPs) in Human Caries”, *J Dent Res.*, Vol.85, n.1, pp.22-32, 2006.
- [102].L. Tjäderhane, M.A. R. Buzalaf, M. Carrilho,C. Chaussain, “Matrix Metalloproteinases and OtherMatrix Proteinases in Relation to Cariology: The Era of ‘Dentin Degradomics’”,*Caries Res*,Vol.49,pp.193–208, 2015.
- [103].M. A. R. Buzalaf, S. Charone, L. Tjäderhane, “Role of Host-Derived Proteinases inDentine Caries and Erosion”,*Caries Res*,Vol. 49(suppl 1), pp.30–37, 2015.
- [104] P.A Ana, “Estudo in vitro da resistência à desmineralização e da retenção de flúor em esmalte dental irradiado com laser de Er,Cr:YSGG”., Tese (Doutorado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear - Materiais). Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2007
- [105] R. Z. Le Geroz,, “Calciumphosphates in demineralization/remineralization processes”, *J. Clin. Dent*, Vol..10, 1999.
- [106].T.sakae, H. Mishima,Y.Kozawa, “changes in bovine dentin mineral with sodium hypochlorite treatment”, *Journ. of Dent. Res.*, Vol.67, n.9, pp.1229-1234, 1988.
- [107].J. Diaci, B. Gaspirc, “Comparison of Er:YAG and Er,Cr:YSGG lasers used in dentistry”, *Journal of Lasers and Health Academy*, Vol. 2012, n.1; pp. **1-13**, 2012.
- [108] P.A.Ana, L. Bachmann, D.M. Zezell, “*Laser effects on enamel for caries prevention*”, *LaserPhys*, Vol..16, n.5, pp.865 – 875, 2006.
- [109].P A Ana, C M F Kauffmann, L Bachmann, L E S Soares, A A Martin, A S L Gomes, D M Zezell, “FT-Raman spectroscopic analysis of Nd:YAG and Er,Cr:YSGG laser irradiated enamel for preventive purposes”, *Laser Phys.*, Vol.24, n.035603,pp 1-8, 2014.

---

[110] P.A. Ana, C.P.M. Tabchoury, J.A. Cury, D.M. Zezell, "Effect of Er,Cr:YSGG Laser and Professional Fluoride Application on Enamel Demineralization and on Fluoride Retention" *Caries Res*, Vol.46, pp.441-451,2012.

[111].C. Benetti, P.A. Ana, L. Bachmann D.M. Zezell,. "Effects of the Er,Cr:YSGG laser irradiation on mineral and organic components of the bone tissue: analysis by Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy", *Appl Spectrosc*, Vol..69, pp.1496-1504,2015.

[112] FLIR Systems, "Therma CAM SC 3000 Operator's manual, boston:FLIR Systems AB,n. 557379, 1999

[113]D.C. Attrill.; R.M. Davies, T.A. King, M.R. Dickinson, A.S. Blinkhorn, "Thermal effects of the Er:YAG laser on a simulated dental pulp: a quantitative evaluation of the effect of a water spray", *J. of Dent.*, Vol.32, pp. 35-40, 2004.

[114]C. S. Queiroz, A. T. Hara, A. F. Paes Leme, J. A. Cury "pH-Cycling Models to Evaluate the Effect of Low Fluoride Dentifrice on Enamel De- and Remineralization", *Braz Dent J*, Vol.19, n.1, pp.21-27, 2008.

[115]D.J. White, "Reactivity of fluoride dentifrices with artificial caries". *Caries Res.*;Vol.21, pp.126-40,1987.

[116].D. M. Zezell, C. Benetti, M. N. Veloso, P. A. A. Castro, P. A. Ana, "FTIR Spectroscopy Revealing the Effects of Laser and Ionizing Radiation on Biological Hard Tissues" *J. Braz. Chem. Soc.*, Vol. 00, n. 00, pp.1-12, 2015.

[117] R.M. Argenta, C.P.;Tabchoury, J.A.A Cury, "modified pH-cycling model to evaluate fluoride effect on enamel demineralization",*Pesqui Odontol Brás.*, Vol.17, n.3,pp.241-6, 2003.

[118]J.M.;Ten Cate, P.P.E. Duijsters, "Alternating Demineralization and remineralization of artificial enamel lesions" *Caries Res.*, Vol. 16; pp.201-210, 1982.

- 
- [119]C.S. Queiroz, “Modelos de estudos *in vitro* para avaliar o efeito do fluoreto na desmineralização e remineralização do esmalte e dentina”, Tese(Doutorado em Odontologia - Área de concentração em Cariologia). Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba,2004
- [120]A. M. A Maia, A. Z., Freitas, “Evaluation of dental enamel caries assessment using Quantitative Light Induced Fluorescence and Optical Coherence Tomography”, Wiley Online Library, Journal of Biophotonics, 2015.
- [121]S. Nammour, K. Kowalyk, C. Valici, T. Zeinoun, J.P.Rocca, G.L.Powell, J. Van Reck, “Safety parameters for pulp temperature during selective ablation of caries by KTP *laser in vitro*”, *J Clin Laser Med Surg*, Vol.22, n.2, pp. 99-104, 2004.
- [122]S.V. Dorozhkin,. “Calcium Orthophosphates in Nature, Biology and Medicine”. *Materials (Basel)*, Vol. 2,n.2, pp. 399–498, 2009.
- [123] D. Fried, N. Ashouri, T.Breunig, R. Shori. “Mechanism of water augmentation during IR laser ablation of dental enamel”,*Lasers Surg Med.*,Vol. 31,n.3, pp.186-93, 2002.
- [124] F.M. Bevilacqua, D.M. Zezell, R. Magnani, P.A. da Ana, C.de P. Eduardo. “Fluoride uptake and acid resistance of enamel irradiated with Er:YAG laser”, *Lasers Med Sci.*, Vol.23, n.2, pp.141-7. 2008.
- [125]A.C. De Cara, “Avaliação do processo de desenvolvimento de desmineralização em esmalte dental humano utilizando a técnica de Tomografia por Coerência Óptica”, Dissertação de Mestrado do Curso de Engenharia Biomédica, Universidade Federal do ABC,São Paulo, 2012
- [126] C. Mujat, M.H.Van Der Veen, J.L. Ruben,. J.J.Ten Bosch, A.Dogariu, “Optical path-length spectroscopy of incipient caries lesions in relation to quantitative light induced fluorescence and lesions characteristics”, *Appl. Opt.*, Vol.42, n.16, pp. 2079-2086, 2003.

---

[127] M.G. Sowa, D.P. Popescu, J.R. Friesen, M. D Hewko, L P. Choo-Smith; “A comparison of methods using optical coherence tomography to detect demineralized regions in the teeth”, *J. Biophotonics*, Vol.4, n.11-12, pp.814-823, 2001.

[128] J. Hicks, D. Winn, “In vivo caries formation in enamel following argon laser irradiation and combined fluoride and argon laser treatment: a clinical pilot study”, *Quintessence Int.*, Vol.. 35, 2004.

[129] K. Yokoyama, Y. Kimura, “Preventive effects of tooth fracture by pulsed Nd:YAG laser irradiation with diamine silver fluoride solution”, *J. Clin. Laser Med. Surg.*, Vol. 19, 2001.

[130] S.Tagomori, T. Morioka,;“Combined effects of laser and fluoride on acid resistance of human dental enamel”, *Caries Res.*, Vol.54, 1989.