UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC

HELENICE YUMI YOSHIKAWA

EFEITOS ÓPTICOS DA IRRADIAÇÃO LASER EM ALTA INTENSIDADE ASSOCIADA A UM VITROCERÂMICO BIOATIVO NA REMINERALIZAÇÃO DE LESÕES DE CÁRIE RADICULAR

São Bernardo do Campo - SP

2017

HELENICE YUMI YOSHIKAWA

EFEITOS ÓPTICOS DA IRRADIAÇÃO LASER EM ALTA INTENSIDADE ASSOCIADA A UM VITROCERÂMICO BIOATIVO NA REMINERALIZAÇÃO DE LESÕES DE CÁRIE RADICULAR

Trabalho submetido à Universidade Federal do ABC como parte dos requisitos para a aprovação na disciplina de Trabalho de Graduação III.

Profª Dra. Patrícia Aparecida da Ana

Orientadora

Profª Dra. Carolina Benetti

Coorientadora

São Bernardo do Campo - SP

2017

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Hélio e Margareth, que sempre comemoraram minhas vitórias e me ofereceram consolo nos momentos de dificuldade.

Dedico ao meu irmão, Daniel, ex-aluno da UFABC, que me mostrou sua faculdade e me incentivou a cursar Engenharia Biomédica.

Dedico também a todos os meus amigos e professores que acompanharam minha trajetória na UFABC e contribuiram, cada um de uma forma diferente, para minha formação acadêmica e para o meu desenvolvimento pessoal.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, que foram sempre compreensivos e nunca mediram esforços para me ajudar.

Ao meu irmão, por sempre me acompanhar e por sua empatia diante minhas angústias.

As minhas orientadoras, profª Patrícia e Carol, pelo conhecimento e material fornecido, além de sua atenção e paciência..

Aos meus amigos Wesley, Paula, Renata e Camila, meus maiores companheiros. Por me darem forças, por nossas conversas e momentos de descontração. Por tudo que enfrentamos juntos.

Aos meus amigos Roberto e Wagner, que além de amigos, foram conselheiros e sempre me ajudaram com muita boa vontade.

A todos os funcionários, professores e amigos da UFABC que, de alguma forma, contribuiram para que este momento fosse possível.

“A verdadeira viagem de descobrimento não consiste em procurar novas paisagens, mas em ter novos olhos”. (Marcel Proust)

RESUMO

Tendo em vista o envelhecimento da população, a maior exposição das superfícies radiculares e o maior risco de cárie nestas superfícies, o presente projeto objetiva avaliar o potencial de remineralização de lesões de cárie radicular promovido por um novo vitrocerâmico bioativo (Biosilicato®), de tecnologia nacional, assim como sua associação com um laser em alta intensidade (Er,Cr:YSGG,λ = 2,78 μm). Desta maneira, foram preparados 60 blocos de dentina radicular bovina com lesão incipiente de cárie, os quais foram aleatoriamente distribuídos em 6 grupos experimentais (n = 10), os quais foram tratados com irradiação laser, aplicação do biovitrocerâmico ou associação de ambos. Após os tratamentos, as amostras foram submetidas à ciclagem de pH por 8 dias, buscando-se avaliar a ativação da remineralização promovida pelos tratamentos e, em seguida, foram avaliadas por tomografia por coerência óptica (OCT) e microscopia eletrônica de varredura, buscando-se verificar os efeitos na remineralização da dentina. Os dados foram analisados estatisticamente ao nível de significância de 5%. Observou-se que o vitrocerâmico bioativo e a irradiação laser isoladamente propiciaram a remineralização da dentina radicular de forma similar à promovida pela aplicação tópica de flúor fosfato acidulado, pois todos os grupos apresentaram coeficiente de atenuação óptica similares entre si. A associação do biovitrocerâmico com a irradiação laser apresentou coeficiente de atenuação óptica significativamente maior que os demais grupos experimentais. Assim, conclui-se que a associação do biovitrocerâmico com a irradiação laser promoveu um efeito sinérgico, potencializando a remineralização da dentina radicular de forma significativa e impedindo a progressão da cárie.

Palavras-chaves: vitrocerâmico bioativo, remineralização, laser, dentina, cárie.

Lista de Figuras

Figura 1: Anatomia dentária anterior e posterior. 13
Figura 2: Lesão ativa classe 1 e 2, respectivamente 17
Figura 3: Lesão ativa classe 3 e 4, respectivamente 17
Figura 4: Lesão inativa classe 5 e 6, respectivamente 17
Figura 5: Lesão inativa classe 7 e 8, respectivamente 18
Figura 6: Interação da luz com a matéria. 25
Figura 7: Por ser translúcido, o esmalte permite a visualização da dentina subjacente (evidenciada pela variação dos tons de bege). 25
Figura 8: Opacidades resultadas de lesão cariosa (seta) e de fluorose (cabeça de seta). 26
Figura 9: Esquema dos diferentes tipos de reflexão: regular (a), com superfície polida e difusa (b), com superfície rugosa. 26
Figura 10: As setas em vermelho indicam onde foi realizado o escameamento para obtenção do A-scan 31
Figura 11: Representação das imagens A-scan, B-scan e C-scan. 32
Figura 12: Imagens B-scan obtidas através do OCT e suas respectivas A-scan, obtidas a partir do software ImageJ. As linhas em amarelho indicam onde foi adquirido o A-scan e os círculo em vermelho delimitam a região onde deve se fazer análise: o alto relevo representa a cera rosa da amostra e o relevo baixo e plano, o dente. 32
Figura 13: Gráfico obtido a partir da média de três leituras A-scan. O software OriginPro8 fornece também o coeficiente do decaimento exponencial. 33
Figura 14: OCT (do grupo controle) e A-scan obtido. 35
Figura 15: Gráfico de atenuação com os diferentes coeficientes a uma intensidade inicial de 255 pixels. 38
Figura 16: Valores médios do coeficiente de atenuação óptica total de cada grupo experimental. As barras indicam erro padrão. Letras distintas evidenciam médias estatisticamente diferentes de acordo com o teste de Student-Newman-Keuls. 40

Figura 17: Eletromicrografias representativas das superfícies das amostras do grupo sem tratamento e não submetido à ciclagem de pH. Magnificações originais: 44
Figura 18: Eletromicrografias representativas das superfícies das amostras do grupo sem tratamento, pós ciclagem de pH. Magnificações originais: 45
Figura 19: Eletromicrografias representativas das superfícies das amostras do grupo Flúor, pós ciclagem de pH. Magnificações originais: 45
Figura 20: Eletromicrografias representativas das superfícies das amostras do grupo Biovitrocêramico, pós ciclagem de pH. Magnificações originais: 46
Figura 21: Eletromicrografias representativas das superfícies das amostras do grupo Laser, pós ciclagem de pH. Magnificações originais: 46
Figura 22: Eletromicrografias representativas das superfícies das amostras do grupo Laser + Biovitrocêramico, pós ciclagem de pH. Magnificações originais: . 47

Lista de Tabelas

Tabela 1: Classificação das lesões cariosas 16

Tabela 2: pH do meio, efeitos físico-químicos e consequências para a estrutura do dente com a presença e ausência do flúor. 19

Tabela 3: Valores do coeficiente médio, desvio-padrão e o variação para cada amostra. 36

Tabela 4: Média e Desvio Padrão médio de cada grupo 37

Tabela 5: Resultados obtidos na análise estatística de Kruskal-Wallis e Student-Newman-Keuls. 39

Sumário

1 INTRODUÇÃO **10**

2 OBJETIVO **12**

3 REVISÃO DE LITERATURA **13**

3.1 Anatomia e composição do dente 13

3.2 O que é a cárie 14

3.3 Métodos de prevenção da cárie 18

3.3.1 Flúor 18

3.3.2 Irradiação laser 19

3.4 Bioatividade e capacidade mecânica 20

3.5 Biovidros para remineralização óssea 22

3.6 Influência da irradiação laser e biovidro para a obstrução de túbulos dentário 22

3.7 Física Ótica na Análise dos Tecidos Dentais 24

4 METODOLOGIA **27**

4.1 Delineamento experimental 27

4.2 Preparo das amostras 27

4.3 Tratamentos 28

4.4 Simulação da progressão da lesão de cárie 29

4.5 Análise do coeficiente de atenuação óptica 29

4.6 Avaliação morfológica 34

5 RESULTADO E DISCUSSÃO **35**

6 CONCLUSÃO **48**

7 REFERÊNCIAS **49**

8 ANEXO **52**

1 INTRODUÇÃO

Mesmo de etiologia, formas de tratamento e prevenção bastante conhecidos, as doenças que envolvem os tecidos duros da cavidade oral ainda são bastante prevalentes, o que demonstra a necessidade de se continuar a busca por novos métodos preventivos. Dentre as lesões que mais acometem os dentes, encontra-se, em primeiro lugar, a cárie dental [MARTHALER, 2004], a qal trata-se de um processo patológico que ocasiona a perda de mineral dos tecidos duros dentais. A cárie radicular é definida como aquela que ocorre nas superfícies radiculares que ficaram expostas ao ambiente bucal devido à recessão da margem gengival [LARSEN; BRUN, 1995].

Dentre as novas alternativas empregadas para prevenção das lesões de cárie, a literatura mostra possibilidades promissoras relacionadas à utilização dos lasers de alta intensidade [DELBEM et al., 2003] [ANA et al., 2012]. Dependendo do comprimento de onda e da densidade de energia aplicados, a irradiação dos tecidos duros pode promover modificações morfológicas, químicas e estruturais na superfície, reduzindo o conteúdo orgânico, removendo íons carbonato e água [KURODA, 1984] [BACHMANN et al., 2009]. Sugere-se que tais modificações promovam um aumento na resistência do esmalte dental à desmineralização [RECHMANN et al., 2011]. Embora resultados promissores sejam evidenciados para prevenção de lesões de cárie em esmalte com lasers em alta intensidade, são escassos os trabalhos que estudem a paralização das lesões da dentina [COLUCCI et al., 2012].

Levando-se em consideração que a cárie radicular apresenta desenvolvimento e progressão rápidos em comparação com o desenvolvimento de cárie em esmalte, também pode se fazer necessário o desenvolvimento de materiais que, colocados na superfície destes tecidos, possam minimizar o acúmulo de placa bacteriana e, ao mesmo tempo, propiciar a paralização e o reparo das lesões de cárie formadas. Para tanto, os materiais bioativos, aqueles que são capazes de se ligar aos tecidos vivos por meio da formação de uma camada de hidroxiapatita carbonatada (HAC) biologicamente ativa (isto é, quimicamente e estruturalmente semelhante àquela encontrada no tecido ósseo) tem se mostrado como uma alternativa promissora. Atualmente, dentre estes materiais bioativos, os biovidros e biovitrocerâmicos estão em destaque [DAGUANO et al., 2013], uma vez que estes materiais apresentam excelentes propriedades osteocondutora e osteoindutora e a sua taxa de degradação é elevada, diferenciando-os das cerâmicas comuns à base de fosfato de

cálcio [RENNO et al., 2011].

Embora a literatura relate que o uso de vitrocerâmicos bioativos seja eficiente na redução da hipersensibilidade dentinária, é comprovado que os mesmos podem não obliterar totalmente os túbulos dentinários expostos; assim, tem sido sugerida a associação destes materiais com a irradiação com laser em alta intensidade [LEE et al., 2005].

Tal associação possibilitaria o derretimento do vitrocerâmico bioativo sobre a superfície dentinária, favorecendo a obliteração e percolação do material pelos túbulos dentinários, assim como a manutenção de uma camada mais uniforme de material formado [LEE et al., 2005]. Contudo, não há trabalhos que evidenciem se a camada de material formado após a aplicação de vitrocerâmico bioativo mantém-se retida após um período prolongado, o que motiva a realização deste trabalho.

2 OBJETIVO

O objetivo deste estudo é verificar *in vitro* a possibilidade de remineralização de lesões incipientes de cárie radicular promovidas por um vitrocerâmico bioativo em associação com um laser em alta intensidade.

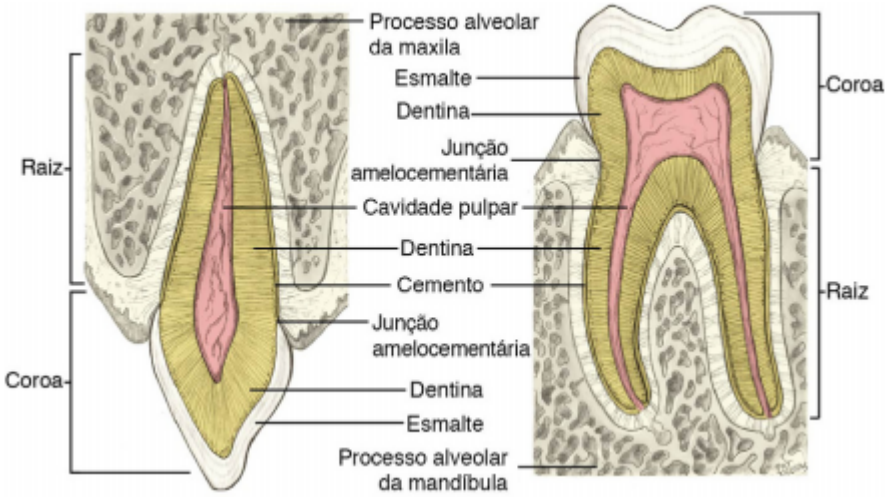
3 REVISÃO DE LITERATURA

Atualmente, muito se tem investigado sobre biomateriais. Apesar de ser de fundamental importância que esses sejam bioinertes no corpo humano, apenas essa característica já não é suficiente. É importante também que neles haja a capacidade de bioatividade e, mais recentemente, tem-se trabalhado com o conceito de biomimética (esta consiste em participar de reações específicas do organismo) [PIRES et al., 2015]. No caso em questão, espera-se que biomaterial induza a restauração celular e assim, restabelecer de forma ágil as funções fisiológicas da área afetada
.

3.1 Anatomia e composição do dente

Cada dente é constituído por uma coroa com uma ou mais raízes. A coroa, por sua vez, é composta por dentina coberta por esmalte e a raiz constitui-se de dentina recoberta por cemento. A parte interna da dentina da coroa e da raiz recobre a cavidade pulpar do dente, dividida em: câmara pulpar, canais radiculares e forame apical (Figura 1) [BATH-BALOGH; FEHRENBACH, 2011].

Figura 1: Anatomia dentária anterior e posterior.



Fonte: [BATH-BALOGH; FEHRENBACH, 2011]

A coroa anatômica é a porção coronária que permanece constantemente coberta pelo esmalte durante toda vida do dente (exceto em casos atrição ou outra forma de desgaste físico). A

coroa clínica é a porção não coberta pela gengiva, variando conforme o posicionamento da gengiva marginal. Esta se difere principalmente na presença de recessão gengival, onde a margem da gengiva retrai em direção à raiz. De maneira análoga, a raiz anatômica é a parte da raiz coberta por cemento e a raiz clínica é a porção visível da raiz anatômica, também sujeita a variação conforme à recessão gengival. Em relação a sua composição, os tecidos duros do dente (assim como os ossos no geral) são constituído por células e matriz parcialmente mineralizada. Este material apresenta uma composição formada principalmente por hidroxiapatita, $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$, que proporciona rigidez a estes tecidos [BATH-BALOGH; FEHRENBACH, 2011].

O esmalte maduro é composto por 96% de material inorgânico ou mineralizado; 1% de material orgânico e 3% de água. Tal composição cristalina baseia-se principalmente em hidroxiapatita carbonatada, similar à encontrada na dentina, no cemento e no osso alveolar (tendo nestes menor percentagem). O esmalte também proporciona o aspecto branco ao sorriso saudável. Este possui várias gradações de um branco-azulado, o qual pode ser observado na crista incisal de dentes incisivos, porém, apresenta tonalidades branco-amareladas em outras regiões devido à dentina subjacente. A dentina, por sua vez, possui dureza menor do que a do esmalte, e é formada basicamente por 70% de matéria inorgânica; 20% de matéria orgânica e 10% de água. A hidroxiapatita carbonatada encontrada na dentina é semelhante a mesma encontrada em outras porções do dente (como esmalte e cemento); entretanto, além de diferentes percentuais, os cristais encontrados nesta apresentam formato distintos e dimensões menores que aqueles presentes no esmalte [BATH-BALOGH; FEHRENBACH, 2011].

Os diferentes níveis de mineralização encontrados em diversas porções de um dente podem ser obtidos através de métodos de análise de imagens, como em radiografias [SOUZA et al., 2012]. Nesta, por exemplo, a dentina aparece mais radiolúcida (escura) do que o esmalte, uma vez que é menos densa que este por possuir menor quantidade de hidroxiapatita, porém mais radiopaca (clara) que a polpa, que possui menor a densidade se comparada aos outros dois tecidos, por ser um tecido mole [BATH-BALOGH; FEHRENBACH, 2011].

3.2 O que é a cárie

O processo de lesão de cárie se inicia com a presença do biofilme (como comunidades microbianas sésseis depositadas sobre os tecidos duros dentais, ou seja, esmalte, dentina e ce-

mento). Os microrganismos que compõem o biofilme são envolvidos por uma matriz extracelular (majoritariamente composta por polissacarídeos), os quais interagem com componentes da saliva e fluido periodontal, que banham este biofilme[GONCALVES et al., 2002]. O biofilme dentário possui comunidades bacterianas que consomem os nutrientes do meio, liberando ácido que influencia em seu pH [CURY, 2002].

As variações do pH podem causar perda do mineral do dente quando este está abaixo de um limiar crítico, podendo promover o ganho de mineral conforme o pH vai aumentando e se posiciona acima deste limiar. O resultado dessas variações então podem levar à perda de mineral, causando a dissolução dos tecidos duros e formação da lesão de cárie [TEIXEIRA et al., 2010]. Desta forma, constatou-se que a retirada parcial ou total do biofilme resulta na diminuição de perda material, ou em alguns casos, pode levar ao ganho do mesmo dependendo da composição da saliva [CURY, 2002].

O biofilme, entretanto, está sempre metabolicamente ativo e em constante formação, levando a crer que o processo de cárie é um fenômeno natural que não pode ser evitado, mas sim controlado de forma que a lesão não se desenvolva a ponto de promover perdas estruturais nos tecidos. Estudos ultra-estruturais mostraram que o desgaste da microestrutura externa, por processos de abrasão ou polimento da mesma (através de escovação), levam a perturbações do biofilme, o que está diretamente relacionado com a diminuição da lesão dentária [CURY, 2002].

O desenvolvimento de cáries pode ser ocasionado pelo acúmulo de bactérias nos dentes e frequente ingestão de carboidratos fermentáveis. Isso ocorre pois, uma vez ingerido, os carboidratos penetram no biofilme, sendo metabolizados pelas bactérias acidogênicas, o que diminui o pH do meio, causando a desmineralização do dente [TEIXEIRA et al., 2010]. Após esta queda, o meio retorna ao pH normal em um período que varia de 20 minutos a horas, dependendo da forma como o açúcar é ingerido e da presença ou não da saliva, dentre outros fatores. Assim, se este for consumido na forma líquida, sabe-se que o pH do meio retorna ao estado inicial mais rapidamente do que no consumo de alimentos sólidos [OLIVEIRA, 2007].

Na saliva há presença majoritaria de íons cálcio e fosfato, sendo estes os principais minerais que compõem a estrutura cristalina do dente (hidroxiapatita), protegendo tanto o esmalte quanto a dentina de ataques ácidos. Sabe-se que tal propriedade biológica está diretamente relacionada com o pH, ou seja, a variação desse no meio, devido a produtos originados da dieta, ou

da conversão de açúcar em ácido, determinarão o limite da capacidade da saliva em proteger os dentes, exercendo um efeito tampão. Por sua composição mais abundante de material orgânico e menor quantidade de hidroxiapatita quando comparada ao esmalte, a dentina então é muito mais sensível à variação do pH, ou seja, a dentina é muito mais susceptível à desmineralização que o esmalte [CURY, 2002].

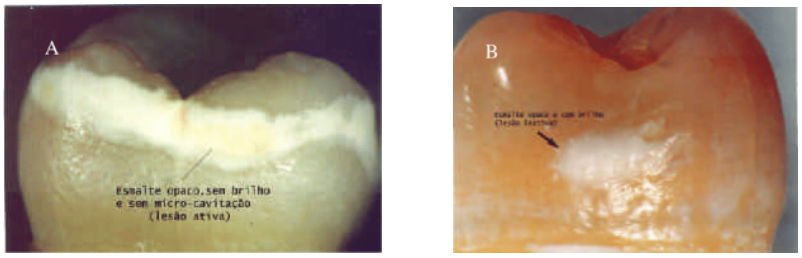
Uma vez desenvolvida a desmineralização superficial, se esta não for controlada, a mesma pode evoluir de forma que a invasão bacteriana seja conduzida até a dentina, atingindo posteriormente a polpa do dente, o que pode ocasionar severas perdas estruturais, além de necrose pulpar [CURY, 2002].As lesões cariosas podem ser classificadas de acordo com o tecido envolvido e sua atividade. A classificação a seguir (descrita na Tabela 1 e ilustradas na Figura 1-4) não abrange todas as fases de surgimento da lesão cariosa, uma vez que alguns destes só são visíveis através de microscopia eletrônica de varredura [SOUSA, 2000].

Tabela 1: Classificação das lesões cariosas

Classe	Descrição	Atividades
0	Transluscência normal do esmalte	Não há atividade, não há lesão
1	Esmalte opaco e sem brilho	Lesão ativa
2	Destruição localizada do esmalte circundada por área opaca sem brilho	
3	Cavidade no esmalte opaco e sem brilho com envolvimento superficial de dentina	
4	Cavidade expondo dentina amarela e amolecida	
5	Esmalte opaco com brilho, com ou sem descoloração amarronzada, visto após secagem	Lesão Inativa
6	Destruição localizada da superfície circundada por esmalte amarronzado	
7	Cavidade no esmalte envolvendo dentina, sendo ambos amarronzados	
8	Cavidade expondo dentina dura e amarronzada/escura	

Fonte: [SOUSA, 2000]

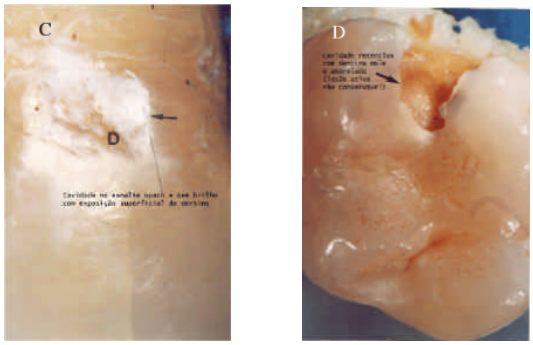
Figura 2: Lesão ativa classe 1 e 2, respectivamente



(a) Lesão classe 1 (b) Lesão classe 2

Fonte: [SOUSA, 2000]

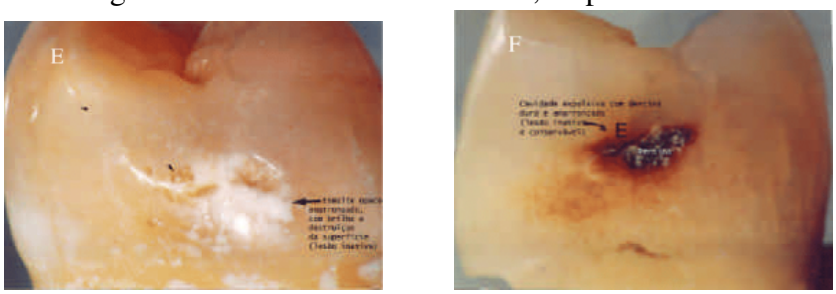
Figura 3: Lesão ativa classe 3 e 4, respectivamente



(a) Lesão classe 3 (b) Lesão classe 4

Fonte: [SOUSA, 2000]

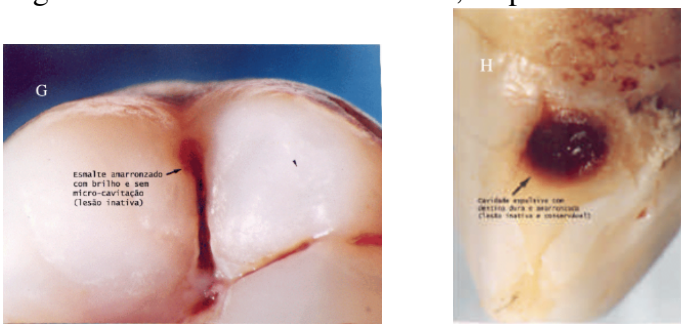
Figura 4: Lesão inativa classe 5 e 6, respectivamente



(a) Lesão classe 5 (b) Lesão classe 6

Fonte: [SOUSA, 2000]

Figura 5: Lesão inativa classe 7 e 8, respectivamente



(a) Lesão classe 7 (b) Lesão classe 8

Fonte: [SOUSA, 2000]

3.3 Métodos de prevenção da cárie

3.3.1 Flúor

O flúor possui um papel importante na atividade bucal. Este é capaz de interferir no processo de cárie diminuindo a quantidade de minerais perdidos durante a desmineralização, ativando uma notável resposta: a remineralização salivar. É importante ressaltar que o mesmo não interfere no fator responsável pela formação de placa dental ou transformação do açúcar em ácido, evidenciando a importância do controle de placa e de dieta para otimização do efeito [CURY, 2002].

O flúor é então, eficiente na redução da manifestação da doença em termos de sinais essencialmente físico-químicos. Quando o açúcar é convertido em ácido pelo biofilme dental, atinge um pH crítico ocasionando na dissolução dos minerais à base de apatita (hidroxiapatita – HA); no entanto, na presença do flúor, uma parte deste material pode ser transformada sob a forma de fluorapatita (FA) ou hidroxiapatita fluoretada (HAF). Assim, em determinado pH, apesar do meio ser subsaturante (quantidade deficiente) em relação um tipo de mineral (HA), é supersaturante (quantidade excessiva) em relação a outro (FA), formando este último. Quando o pH retorna ao normal, a saliva tende a repor os minerais perdidos pelo dente, sendo esta propriedade ativada pela presença do flúor no meio [CURY J.A.; SAAD, 1993] [ODONTOLOGIA, 2010]. Para que isto ocorra, essencialmente o íon fluoreto reage com o cálcio do meio, originando o principal produto decorrente de uma aplicação tópica de um agente fluoretado: o fluoreto de cálcio (CaF_2) [CURY J.A.; SAAD, 1993].

Como resultado do efeito, o flúor auxilia na remineralização, reduzindo uma perda considerável do mineral comparado à situação em que este não está presente, como evidenciado na Tabela 3.3.1 [CURY, 2002]. O fluoreto também possui uma atividade antimicrobiana, de menor escala, mas também importante no processo de prevenção do surgimento de lesões de cárie [GONCALVES et al., 2002].

Tabela 2: pH do meio, efeitos físico-químicos e consequências para a estrutura do dente com a presença e ausência do flúor.

pH	Efeito Físico-Químico					Consequência para	
	Flúor no meio	Dissolução de minerais mais solúveis*	Dissolução de HA e AF	Formação de FA	Dissolução de FA	Esmalte	Dentina
7,0	Não	Não	Não	Não	Não	Re	Re
7,0	Sim	Não	Não	Sim	Não	Re+	Re+
6,5 - 5,5	Não	Sim	Não	Não	Não	Re	Des
6,5 - 5,5	Sim	Sim	Não	Sim	Não	Re+	Des-
5,5 - 4,5	Não	Sim	Sim	Não	Não	Des	Des+
5,5 - 4,5	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Des-	Des
¡4,5	Indiferente	Sim	Sim	Não	Sim	Cárie aguda/ Erosão	
* Apatita carbonatada e fosfato de cálcio amorfo; Re:Remineralização; Re+: Remineralização ativada; Des: Desmineralização; Des-: Desmineralização Reduzida; Des+: Desmineralização aumentada.							

Fonte: Adaptado de Cury, 2002

3.3.2 Irradiação laser

Sabe-se, através de diversos estudos realizados nas últimas décadas, que a irradiação laser vêm sendo um método alternativo eficaz para a prevenção da cárie, aumentando a resistência dos tecidos duros à desmineralização [OLIVEIRA, 2007].

Entretanto, pesquisas posteriores indicaram que além desse efeito, o tratamento com o laser em determinadas intensidades proporcionam aumento da permeabilidade do esmalte, superaquecimento da superfície e superaquecimento do tecido pulpar, o que pode contra indicar o seu uso se não forem respeitadas as densidades de energia adequadas para cada aplicação clínica [OLIVEIRA, 2007]. Assim, ao se trabalhar com laser em tecido vivo deve-se utilizá-lo em baixa intensidades, respeitando o limia de sobrevivência do tecido onde está localizado [CAVALCANTI et al., 2011].

Muitos trabalhos têm sido realizados empregando-se laser de diferentes comprimentos de onda para otimizar o método de prevenção da cárie, quando então foi evidenciado que a redução

da solubilidade dental, assim como a obliteração de túbulos dentinários, é favorável em casos de hipersensilidade dentinária [OLIVEIRA, 2007].

Para que os efeitos promovidos pelos lasers não causem danos ao tecido irradiado, assim como em regiões adjacentes, é importante que sejam empregados em comprimentos de onda que sejam absorvidos pela estrutura do tecido duro dental [CAVALCANTI et al., 2011], composto majoritariamente por cristais de hidroxiapatita, proteína e água. Assim, analisa-se o coeficiente de absorção de um comprimento de onda pelo tecido a fim de se otimizar este, pois quanto maior tal coeficiente, maior o seu potencial para causar aquecimento do tecido [OLIVEIRA, 2007].

O coeficiente de absorção é inversamente proporcional à penetração do laser no tecido, o que pode ser mensurado através da relação de Lambert-Beer, sendo que, quanto maior a irradiação absorvida menor a profundidade de penetração [CAVALCANTI et al., 2011]. Assim, em lasers que emitem comprimento de onda em torno de 3 micrometros, na região do infravermelho, ou próximo a 9 micrometros apresentaram-se mais favoráveis a prevenção da cárie pois são absorvidos pelos radicais OH- da água e hidroxiapatita (lasers emitidos em 3 μm) ou pelos radicais fosfato da hidroxiapatita (lasers emitidos em 9,3 μm) [OLIVEIRA, 2007] [PERITO et al., 2009].

Um mecanismo proposto para explicar a ação da irradiação laser no processo de retardação da progressão da cárie seria a remoção de componentes orgânicos, água e carbonato de esmalte, causada pela irradiação. Esta última cria espaços que posteriormente tornam-se sítios para deposição dos íons liberados na remineralização (como exemplo, o cálcio da saliva ou o fluoreto, no caso de uma aplicação tópica de flúor) [FRANKE, 2003].

Dentre os lasers em alta intensidade mais estudados para esta finalidade encontram-se CO_2, Nd:YAG, Argônio, Ho:YLF, Er:YAG, Er,Cr:YSGG e de Diodo[PERITO et al., 2009]. Diversas análises, usando o laser de CO_2, demonstraram que resultados diferentes são obtidos quando se utiliza o laser antes ou após a aplicação tópica de flúor; contudo, os reais mecanismos onde isto ocorre ainda precisam ser mais profundamente estudados [OLIVEIRA, 2007].

3.4 Bioatividade e capacidade mecânica

Para aplicação em tecidos ósseos, uma atenção especial é dada para materiais vítreos, pois estes apresentam um índice maior de bioatividade, se comparado com os demais. No entanto, neles há baixa capacidade mecânica sendo inviável em implantes onde essa característica é muito

solicitada. Em contrapartida, materiais cerâmicos e vitrocerâmicos bioativos apresentam maior propriedade mecânica, mas a introdução de cristalinidade (ou seja, aumento da proporção relativa de matéria cristalina) neste diminui drasticamente seu índice de bioatividade [SOUSA, 2000].

Assim, muito tem se procurado a cerca de tentativas de minimizar essas limitações dos vidros bioativos. Um caminho promissor tem sido a formulação de materiais híbridos organoinorgânicos, combinando-se materiais vítreos com polímeros (como álcool polivinílico, polimetilmetacrilato, quitosana ou mesmo o colágeno, que confere resistência à tração e dureza para tecidos, inclusive ósseos) [SOUSA, 2000].

Também houve estudos que comprovaram que o Biovidro ativo 45S5, quando aplicado com laser de CO_2 para tratamentos de hipersensibilidade dentária, aumenta sua propriedade mecânica, fazendo com que este resista a abrasões. O biovidro ativo 45S5 possibilita o desenvolvimento de uma camada de cálcio-fosfato que se adere ao dente para mineralizar tecidos duros [SIQUEIRA; ZANOTTO, 2011] [FRAZAO et al., 2015]. Resultados de estudos mostram que o biovidro consegue obstruir os orifícios dos túbulos dentinários responsáveis pela hipersensibilidade dentária e a sua aplicação com o laser de CO_2 potencializa a organização mecânica desses cristais, uma vez que a temperatura do laser evapora a umidade presente na região, aumentando suas propriedades mecânicas [BRITO, 2014] [SIQUEIRA; ZANOTTO, 2011].

Outra forma, encontrada pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Materiais Vítreos da Universidade Federal de São Carlos, coordenado pelo Prof. Dr. Edgar D. Zanotto – contando inicialmente com a colaboração do Prof. Dr. Larry L. Hench – foi a produção vitrocerâmica a partir de composições próximas à do Biovidro 45S5, com microestrutura muito bem controlada, que garantia melhoria das propriedades mecânicas em relação aos vidros de partida, e na qual o mecanismo de bioatividade fosse idêntico ao dos vidros bioativos. Basicamente, se pretendia formar hidroxiapatita (HA, $(Ca)_{10}(PO_4)_6(OH)_2$) somente via reações químicas superficiais entre o material e os tecidos vivos, e, portanto, não cristalizar nenhuma fase à base de fosfato de cálcio durante a produção da vitrocerâmica [SIQUEIRA; ZANOTTO, 2011].

Assim, o biomaterial produzido, denominado Biossilicato possui características mecânicas satisfatórias e elevada capacidade bioativa, demonstrando grande potencialidade para tratamentos de hipersensibilidade dentária [SOUSA, 2000] [SIQUEIRA; ZANOTTO, 2011]. Contudo, a sua associação com a irradiação laser ainda não foi investigada.

3.5 Biovidros para remineralização óssea

A dentina é uma estrutura permeável tubular, composta por túbulos que contém, em seu interior, prolongamentos de odontoblastos e água e, no seu exterior, matriz orgânica e inorgânica em diferentes proporções, dependendo da região considerada. Apesar de nela haver todo um equilíbrio fisiológico entre a remineralização e desmineralização, algumas vezes tal equilíbrio é abalado pelo aumento da acidez causada pelo biofilme ou por uma dieta ácida. Quando o nível de desmineralização ultrapassa o de remineralização, ocorre a excessiva perda de mineral nos tecidos duros [SIQUEIRA; ZANOTTO, 2011].

Como forma de alcançar o equilíbrio novamente, pesquisas focaram na reincorporação do mineral na área afetada através do Biovidro ativo, e percebeu-se que este possui um grande potencial para aumentar a remineralização da dentina. Isto foi concluído a partir de estudos que analisaram a sua capacidade de formarhidroxiapatita carbonatada, quando submerso em um fluído semelhante ao do corpo. Isto ocorre pois tal biomaterial atua como meio de transporte para Ca^{2+}, $(PO_4)_3$, Na^+ e Si_4 que mineraliza o colágeno tipo 1, aumentando a formação mineral nos túbulos dentários [SIQUEIRA; ZANOTTO, 2011].

Assim, também se observou que o Biovidro pode ser utilizado para tratamentos de cáries em um experimento usando uma pasta composta do mesmo com ácido fosfórico em superfícies dentárias simuladamente cariadas in vitro (através de uma solução de descalcificante) e percebeu se que a camada cristalina formada pelo biovidro converteu-se em cristais de hidroxiapatita e que estas se aderiram bem, resistindo ao teste de escovagem-abrasão [SIQUEIRA; ZANOTTO, 2011].

3.6 Influência da irradiação laser e biovidro para a obstrução de túbulos dentário

No interior da dentina madura, são encontrados os túbulos dentinários. Estes componentes são tubos pequenos e longos que se estendem desde a coroa ou raiz até a periferia da polpa. Após a justaposição de pré-dentina e decorrente maturação em dentina, os odontoblastos (células encarregadas da síntese da matriz da pré-dentina) permanecem no interior do dente, mais precisamente ao longo da periferia da polpa [LEE et al., 2005] [CURY, 2002].

Da mesma forma que o esmalte, a dentina é avascular; assim, a nutrição dos odontoblastos ocorre através do fluido tissular que passa pelo túbulo. Este é originado dos vasos sanguíneos que estão localizados no tecido pulpar próximos a este. Dentro dos túbulos dentinários se encontra um espaço (de tamanho variável) que contém fluido, um processo odontoblástico e, provavelmente, um axônio. Acredita-se que o fluido dentinário presente no túbulo seja um líquido que envolve a membrana celular do odontoblasto. O processo odontoblástico é um componente de extensão celular longa localizada no interior do túbulo dentinário e presa à maior parte do corpo da célula odontoblástica localizada na polpa. Um axônio sensitivo (ou aferente) mielinizado está adjunto a uma porção deste componente em certos túbulos, enquanto que o corpo do neurônio pode ser encontra na polpa, junto com o corpo do odontoblasto. É importante ressaltar que este axônio está envolvido apenas na sensibilidade para dor [CURY, 2002].

Dentre as teorias que vêm sendo propostas para explicar o mecanismo de hipersensibilidade dentária, a mais aceita é a teoria hidrodinâmica, onde aplicação de estímulos induzem a variação de pressão através do toda a dentina. Como resultado a variação de pressão, ocorre a movimentação dos fluidos nos túbulos dentinários, causando a sensação de dor [BAKRY et al., 2011].

Assim, a aplicação de agentes químicos e físicos, lasers e biovidros, usados separadamente, vem mostrando grande potencial para o tratamento da hipersensibilidade. Se um material altamente biocompatível, como o biovidro, pudesse ser derretido por irradiação laser para obter uma melhor profundidade de vedação para os túbulos dentinários, ele poderia posteriormente se unir às estruturas da dentina sob um ambiente fisiológico e oferecer um efeito terapêutico prolongado [BAKRY et al., 2011] [LEE et al., 2005].

A utilização de diferentes tipos de laser vem sendo estudadas como, por exemplo, a aplicação do laser Nd:YAG (1,064 μm) de energia por pulso de 30mJ que derrete a superfície da dentina e oclui os túbulos expostos, é sugerida como uma ferramenta satisfatória. O laser de CO_2(10,3 μm) com potência de 1W para uma irradiação de 5 a 10s pode tratar a hipersensibilidade da dentina sem danos adversos à polpa. O laser Er:YAG também vem sendo útil para efeitos de dessensibilização atribuídos à formação de uma camada menos solúvel durante a exposição dos túbulos dentinários [BAKRY et al., 2011] [FRAZAO et al., 2015] [LEE et al., 2005].

O biovidro vem demonstrando ser um material adequado para tratamento da hipersen-

sibilidade, entretanto, quando utilizada sozinho, não se distribui homogeneamente cobrindo todo o orifício do túbulo dentinário. Assim, a aplicação do laser Nd:YAP em combinação com componentes modificados do biovidro pode derreter o biomaterial e otimizar a vedação dos túbulos dentinários [BAKRY et al., 2011] [FRAZAO et al., 2015] [LEE et al., 2005]. Os autores usaram quatro diferentes parâmetros de energia para derreter o biovidro modificado por composição: 30 Hz, 330 mJ/pulso (modo G +), 30 Hz, 160 mJ/pulso (modo G), 10 Hz, 400 mJ/pulso (modo D +) e 10 Hz, 200 mJ/pulso (Modo D). A elevação da temperatura, a profundidade oclusiva de biovidro e as mudanças de fase nos biovidro após irradiação a laser foram avaliadas por meio de microscópio eletrônico de varredura (MEV), termografia no infravermelho e difractômetro de raios X (XRD). As profundidades oclusivas de 2 e 10 m nos túbulos dentinários foram obtidas quando o biovidro foi irradiado com 30 Hz, 160 mJ/pulso (modo G) e 30 Hz, 330 mJ/pulso (modo G +). Foi observado um aumento de temperatura inferior a 600 °C, e nenhuma transformação de fase foi observada após a irradiação com laser de Nd:YAP.Desta forma, os autores concluíram que o ponto de fusão de um biovidro modificado por composição pode ser reduzido e seu uso mais o laser Nd:YAP tem potencial em uso clínico para tratar hipersensibilidade dentinária [BAKRY et al., 2011] [LEE et al., 2005].

3.7 Física Ótica na Análise dos Tecidos Dentais

Para a realização de todos os exames clínicos, as informações coletadas pela análise visual se dão devido à interação das células do corpo com a luz, produzindo cores que, por sua vez, formam as imagens analisadas. Em um exame clínico dos dentes, as imagens obtidas dos tecidos duros a fim de diagnosticar as lesões cariosas presentes durante o preparo cavitário refletem fenômenos da física ótica. Deve-se então, ressaltar a importância do conhecimento de alguns mecanismos básicos de interação da luz com os tecidos dentais duros [SOUSA, 2000].

A luz incidente nos tecidos do dente obedece os mesmos princípios de interação desta com qualquer outra matéria: uma parte da luz é refletida, outra é absorvida, outra é espalhada e outra parte é transmitida (Figura 6) [SOUSA, 2000] [SERWAY; JEWETT, 2004].

Figura 6: Interação da luz com a matéria.

Fonte: Adaptado de Sousa (2000)

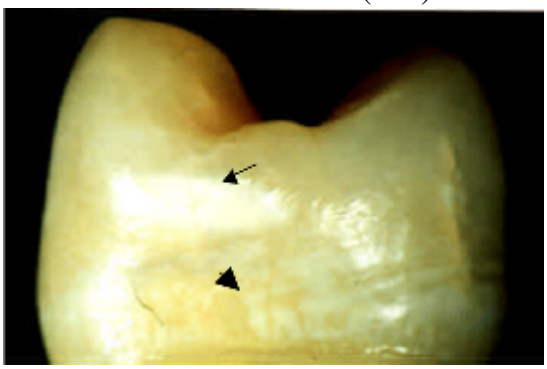
O esmalte dental é composto por milhares de cristalitos com alto grau de compactação e espaços intercristalinos microscópicos. Em um esmalte totalmente formado, a luz se comporta conforme o índice de refração do componente principal deste, a hidroxiapatita (com índice de refração de 1,6), resultando em um material translúcido (Figura 7) [SOUSA, 2000] .

Figura 7: Por ser translúcido, o esmalte permite a visualização da dentina subjacente (evidenciada pela variação dos tons de bege).

Fonte: [SOUSA, 2000]

Se os espaços intercristalinos aumentarem (devido à dissolução dos cristais causada pela cárie, por exemplo), aumenta-se a quantidade de água (com índice de refração 1,33) e ar (com índice de refração 1,0) contida neles, o que, por sua vez, influenciará na interação da luz com a matéria onde tais elementos irão frear a passagem da luminosidade. Em um esmalte maduro, os espaços intercristalinos não são grandes o suficiente para produzir opacidade; porém, tal fenômeno ocorre quando há lesão cariosa ou fluorose (mancha causada pelo excesso de flúor), como se pode observar na Figura 8 [SOUSA, 2000].

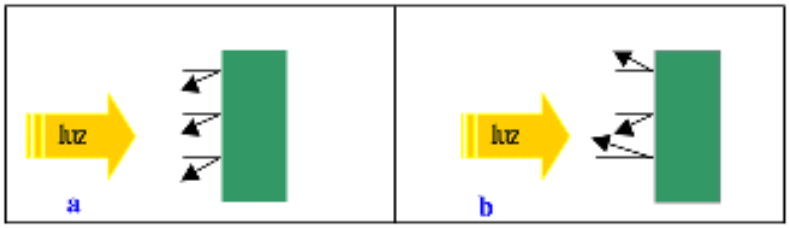
Figura 8: Opacidades resultadas de lesão cariosa (seta) e de fluorose (cabeça de seta).



Fonte: [SOUSA, 2000]

A luz incidente se comporta de maneira semelhante na lesão e na dentina, ou seja, não é translúcida. O material ao redor dos túbulos é mineralizado, e entre eles há água e matéria orgânica. Como resultado, tem-se a opacidade, uma vez que a luz não consegue atravessar [SOUSA, 2000]. A presença ou não de brilho nos tecidos dentais duros varia de acordo com lisura da superfície: a luz que incide sobre uma superfície rugosa apresenta uma reflexão difusa (não produzindo brilho), enquanto que nas superfícies lisas propiciam uma reflexão regular, produzindo brilho (Figura 9) [SOUSA, 2000] [SERWAY; JEWETT, 2004].

Figura 9: Esquema dos diferentes tipos de reflexão: regular (a), com superfície polida e difusa (b), com superfície rugosa.



Fonte: [SOUSA, 2000]

4 METODOLOGIA

4.1 Delineamento experimental

Foi realizado um estudo *in vitro* cego randomizado, no qual foram utilizados 60 blocos de dentina radicular bovina com lesão incipiente de cárie para se estudar os efeitos da irradiação laser, de um vitrocerâmico bioativo ou da associação de ambos na remineralização de lesões de cárie. Estes blocos foram aleatoriamente distribuídos em 6 grupos experimentais de 10 amostras cada para a realização dos tratamentos propostos: **Grupo 1**: amostras sem tratamento (grupo controle negativo) que não foram submetidas à posterior ciclagem de pH;**Grupo 2**: amostras sem tratamento (grupo controle negativo) mas que foram submetidas à posterior ciclagem de pH; **Grupo 3**: amostras com aplicação tópica de flúor fosfato acidulado (grupo controle positivo); **Grupo 4**: amostras irradiadas com laser em alta intensidade; **Grupo 5**: amostras tratadas com aplicação do vitrocerâmico bioativo; **Grupo 6**: amostras tratadas com vitrocerâmico bioativo, seguidas da irradiação laser. A simulação da progressão das lesões de cárie foi efeita por meio de ciclagem de pH com duração de 8 dias. A avaliação dos efeitos dos tratamentos na remineralização foi efetuada por meio do coeficiente de atenuação óptica, assim como as alterações morfológicas foram avaliadas. Os resultados foram avaliados estatisticamente empregando-se o teste de Kruskal-Wallis e Student-Newman-Keuls, ao nivel de significância de 5%.

4.2 Preparo das amostras

Foram utilizados 60 dentes incisivos inferiores bovinos, os quais foram obtidos em frigoríficos após aprovação do presente projeto pela Comissão de Ética de Uso Animal da Universidade Federal do ABC (CEUA-UFABC). Após cessão, os dentes foram lavados com água corrente e detergente aniônico.

Da superfície vestibular radicular de cada dente, foi obtido um bloco de 4 x 2 x 2 mm de dentina radicular por meio de seccionamento com disco de corte diamantado sob refrigeração. A superfície do bloco de dentina foi planificada e polida. Após o corte, as superfícies posterior e lateral das amostras foram recobertas com duas camadas de verniz ácido-resistente. Logo após, as amostras foram mantidas individualizadas em frascos hermeticamente fechados em ambiente

úmido sob refrigeração a +4o C, com algodão estéril levemente umedecido com água destilada e deionizada e cristais de timol, até o momento das fases posteriores.

Após o preparo dos blocos de dentina, foi induzida uma lesão de cárie subsuperficial inicial. Assim, cada amostra foi mantida individualmente em solução desmineralizadora (2 mL de solução/mm2 de substrato exposto) durante 32 horas a 37 oC, de acordo com o protocolo estabelecido por Queiroz (2004). A solução desmineralizadora foi constituída de 1,4 mM de cálcio, 0,91 mM de fosfato e 0,06 μg F-/mL, em tampão acetato 0,05 M com pH 5,0. Após a desmineralização, as amostras foram lavadas com água destilada e deionizada, secas com papel absorvente e mantidas em ambiente úmido sob refrigeração até o momento da realização dos tratamentos [QUEIROZ, 2005].

4.3 Tratamentos

As amostras obtidas foram aleatoriamente distribuídas em 6 grupos de tratamento de 15 amostras cada, a saber:

- **Grupo 1**: amostras sem tratamento (grupo controle negativo) que não foram submetidas à posterior ciclagem de pH;
- **Grupo 2**: amostras sem tratamento (grupo controle negativo) mas que foram submetidas à posterior ciclagem de pH;
- **Grupo 3**: amostras com aplicação tópica de flúor fosfato acidulado (grupo controle positivo);
- **Grupo 4**: amostras irradiadas com laser em alta intensidade;
- **Grupo 5**: amostras tratadas com aplicação do vitrocerâmico bioativo;
- **Grupo 6**: amostras tratadas com vitrocerâmico bioativo, seguidas da irradiação laser.

As amostras do grupo 3 foram tratadas com gel de fluor fosfato acidulado (FFA), empregando-se o Flúor Gel Maquira (Maquira, Maringá, Paraná, Brasil), 1,23% de flúor, 0,1 M de ácido fosfórico e pH 3,6 a 3,9. Este foi aplicado na superfície das amostras com auxílio de cotonetes abundantemente e deixado em repouso por 4 minutos. O flúor foi retirado, após esse período, com enxague em água deionizada por um minuto, sendo as amostras secas com lenços de papel.

As amostras do grupo 4 foram irradiadas com laser de Er,Cr:YSGG (λ = 2078 nm), potência média de 0,25W, taxa de repetição de 20 Hz, energia por pulso de 8,67 mJ e densidade de energia de 6 J/cm2, sob a forma de varredura manual, sem refrigeração. Antes da irradiação de cada amostra, a energia por pulso emitida pelo laser foi aferida com um medidor de potência e energia (FieldMaster GS + Detetor LM45, Coherent, USA).

As amostras do grupo 5 foram tratadas empregando-se o vitrocerâmico Biosilicato®, patente WO/1997/041079. O Biosilicato® foi fornecido pelo Laboratório de Materiais Vítreos da Universidade Federal de São Carlos (UFSCAR-LAMAV) na forma particulada com granulometria menor que 3 μm. No momento dos tratamentos, cada amostra foi friccionada com 20 mg de Biosilicato® diluído em água deionizada por 30 segundos.

As amostras do grupo 6 foram tratadas aplicando-se o vitrocerâmico bioativo, conforme descrito para o grupo 5, seguida da irradiação laser, conforme descrito para o grupo 4.

4.4 Simulação da progressão da lesão de cárie

A simulação da ativação da remineralização foi efetuada por meio de ciclagem de pH com duração de 8 dias, de acordo com o modelo proposto por Queiroz et al. (2008). Para tal, as amostras ficaram submersas individualmente por 2 horas em solução desmineralizante (6,25 mL/mm2), composta por 1,4 mM de cálcio, 0,91 mM de fosfato, 0,06 μg F-/mL, 0,1 M de tampão Tris e pH 5,0. Após este período, as amostras foram lavadas com água destilada e deionizada e submersas individualmente (3,12 mL/mm2) por 22 horas em solução remineralizante, composta por 1,5 mM de cálcio, 0,9 mM de fosfato, 150 mM de KCl, 0,05 μg F-/mL, 0,1 M de tampão Tris e pH 7,0. Toda a ciclagem foi efetuada em temperatura constante de 37°C, sendo as soluções trocadas no 4° dia de ciclagem [QUEIROZ, 2005].

4.5 Análise do coeficiente de atenuação óptica

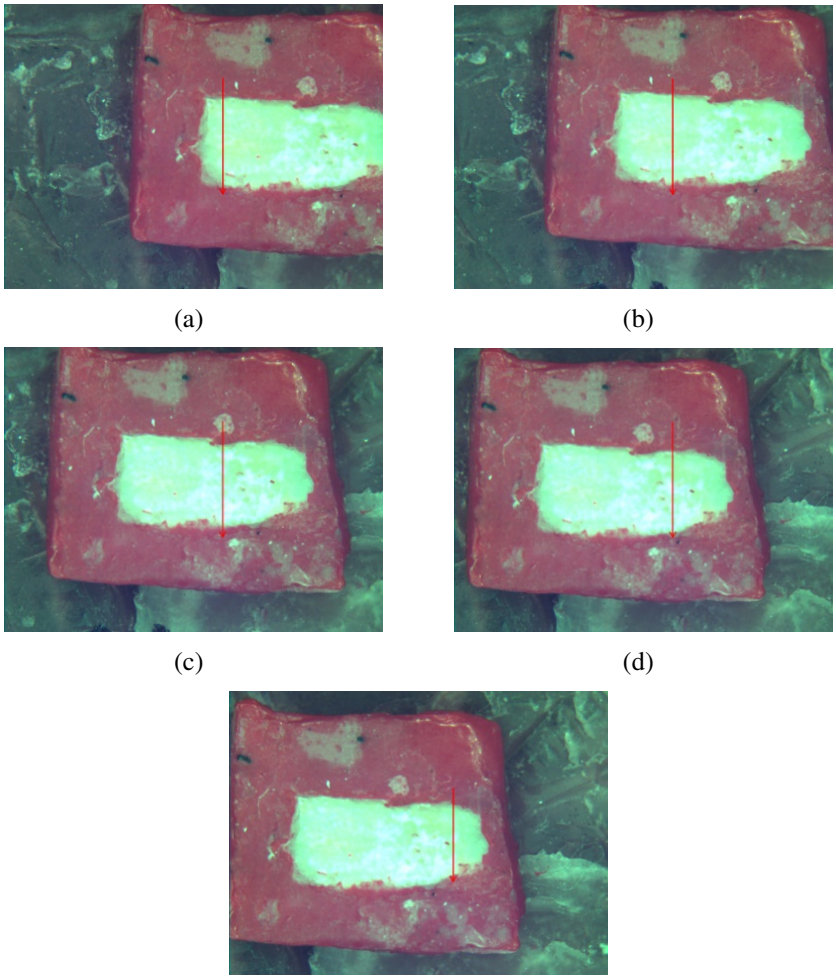
A avaliação do coeficiente de atenuação óptica trata-se de uma medida que tem relação direta com a desmineralização de um tecido, pois a desmineralização altera o espalhamento da luz e, com isso, a atenuação desta pela matéria, neste caso, o dente. Com isso, trata-se de uma técnica que tem relação direta com a perda de mineral [CARA et al., 2014], podendo-se estimar os efeitos

dos tratamentos propostos na remineralização da dentina.

Neste trabalho, tal avaliação foi efetuada por Tomografia por coerência óptica (optical coherence tomography, OCT) com os dados coletados do equipamento OCT CALLISTO (Thorlabs Inc., New Jersey, USA), propriedade da Central Experimental Multiusuário localizada na Universidade Federal do ABC (CEM-UFABC). O equipamento em questão possui as seguintes especificações: comprimento de onda de excitação de 930 nm (domínio spectral), 1,2 kHz, resolução lateral de 8 µm, resolução axial ¡ 7,0 µm, profundidade máxima de imageamento de 1,6 mm e probe para obtenção de imagens 3D.

Para obtenção dos dados, as amostras foram posicionadas no local específico de análise do equipamento, sob uma pequena quantidade de massa de modelar a fim de planificar o dente perante a câmera. Para cada amostra, foi realizado 5 escaneamentos, em regiões espaçadas entre elas (Figura 10). As imagens foram salvas em arquivo tipo TIFF, com 25 dpi de resolução horinzontal e vertical.

Figura 10: As setas em vermelho indicam onde foi realizado o escameamento para obtenção do A-scan



(a) (b)

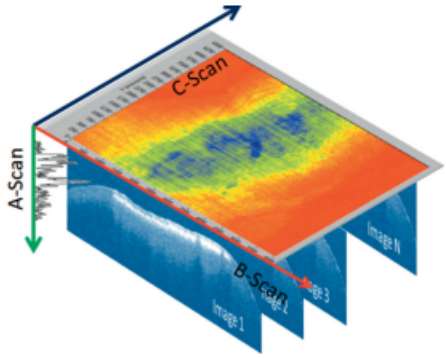
(c) (d)

(e)

Fonte: produção do próprio autor, 2017.

Foi então obtido uma A-scan, que consiste em uma representação espectral das amplitudes obtidas ao longo da profundidade de um único ponto da linha escaneada. Desta forma, ao se alinhar lado a lado as A-scans obtidas dos pontos ao longo da seta, pode-se ter uma imagem transversal da amostra (como se pode observar no esquema representado na Figura 11) [MAIA et al., 2015].

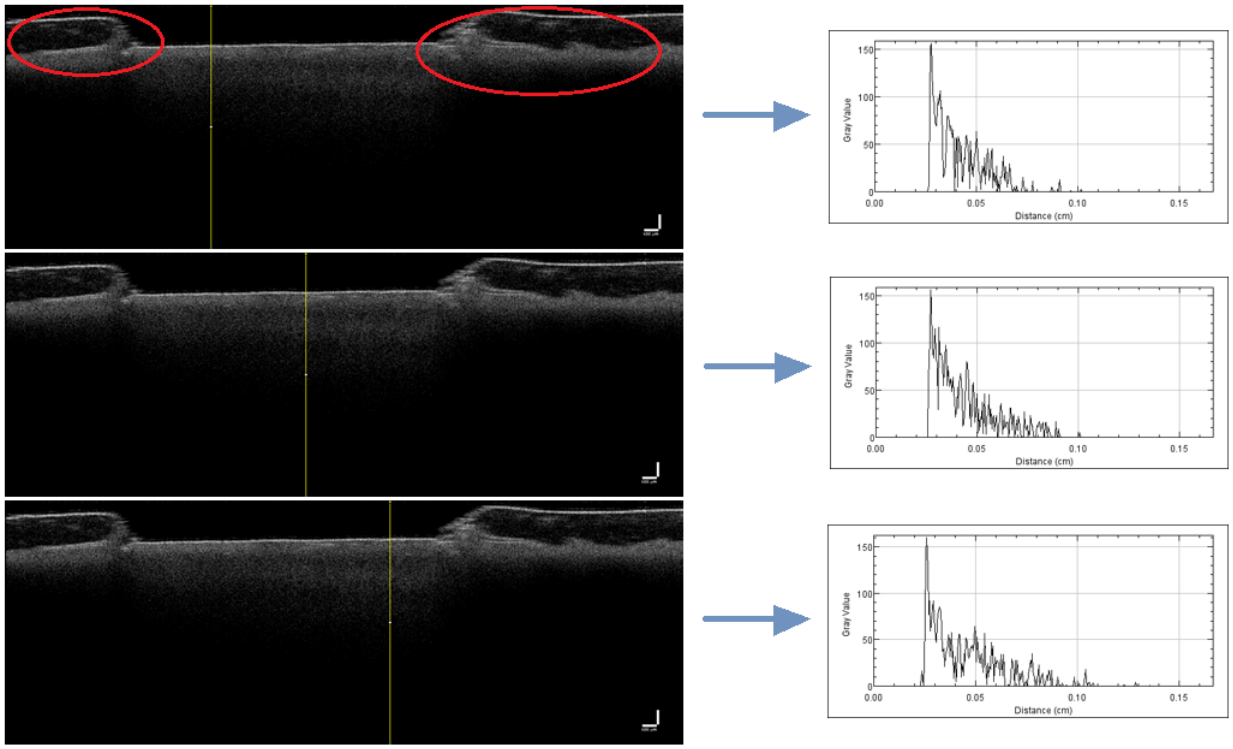
Figura 11: Representação das imagens A-scan, B-scan e C-scan.



Fonte: [MAIA et al., 2015]

Realizaram-se 3 leituras (A-scan) em cada imagem (B-scan) para obter os x e y da região, onde o x equivale ao número de pixels e enquanto o y corresponde à escala de cinza, que variou entre 0 e 255 (Figura 12).

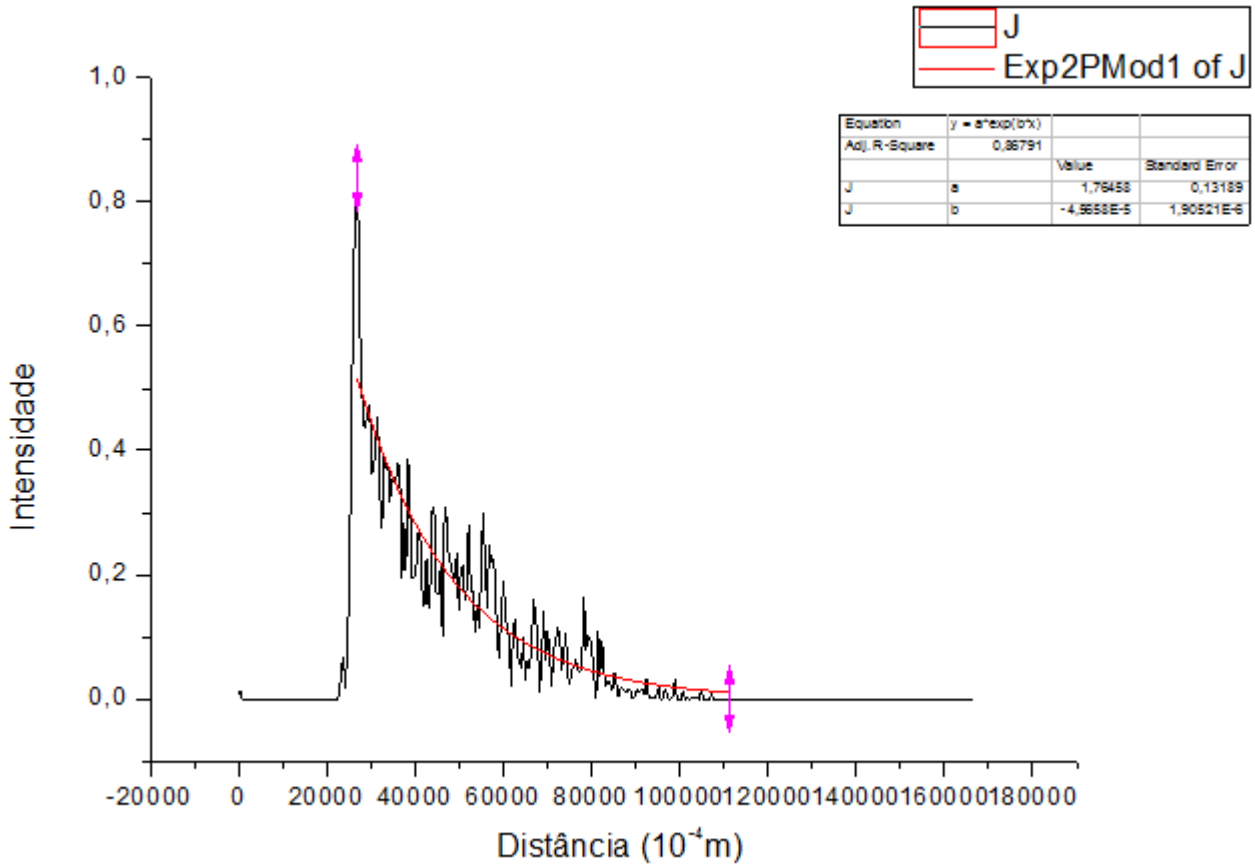
Figura 12: Imagens B-scan obtidas através do OCT e suas respectivas A-scan, obtidas a partir do software ImageJ. As linhas em amarelho indicam onde foi adquirido o A-scan e os círculo em vermelho delimitam a região onde deve se fazer análise: o alto relevo representa a cera rosa da amostra e o relevo baixo e plano, o dente.



Fonte: produção do próprio autor, 2017.

As 3 leituras obtidas de cada imagem foram exportadas para o software OriginPro8. Estas foram normalizadas a partir do pico máximo e então obtida a média. Um gráfico obtido a partir da média de três leituras A-scan (normalizadas) pode ser observado abaixo (Figura 13).

Figura 13: Gráfico obtido a partir da média de três leituras A-scan. O software OriginPro8 fornece também o coeficiente do decaimento exponencial.



Fonte: produção do próprio autor, 2017.

A partir das imagens obtidas, foram feitos os cálculos dos coeficientes de atenuação óptica. O gráfico da média foi plotado e, sendo conhecida a intensidade final, intensidade inicial e distância, foi possível obter o coeficiente de absorção através da Lei de Lambert-Beer (Equação 1):

$$I(z) = I_0 e^{-2.\mu.z} \tag{1}$$

4.6 Avaliação morfológica

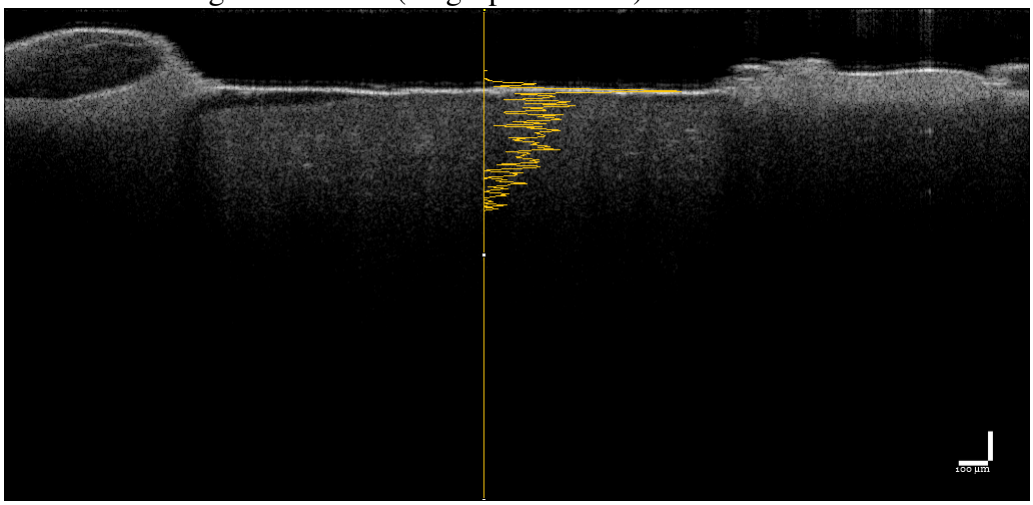
A avaliação da morfologia da superfície foi efetuada empregando-se o microscópio eletrônico de varredura FEI-QUANTA 250, da Central Multiusuário da UFABC. Para tal, as amostras foram recobertas com uma camada fina de ouro (20 nm), mantidas em desumidificador por 3 dias e observadas imediatamente.

Para as análises, foram empregadas 3 amostras de cada grupo experimental, escolhidas de forma aleatória, e tomadas imagens em 3 pontos equidistantes de cada amostra, com magnificação padronizada.

5 RESULTADO E DISCUSSÃO

A Figura 14 ilustra uma imagem representativa de OCT de uma amostra, escolhida aleatoriamente, de cada grupo experimental, onde foi traçado o A-scan. É possível observar o aumento abrupto da intensidade do sinal de retroespalhamento na interface ar-dentina, e depois o decaimento exponencial do mesmo com o aumento da profundidade da amostra até sua total extinção.

Figura 14: OCT (do grupo controle) e A-scan obtido.



Fonte: produção do próprio autor, 2017.

Após o traçado de 3 A-scans de cada uma das imagens, obteve-se o coeficiente de atenuação óptica médio de cada imagem e, em seguida, o coeficiente de atenuação óptica médio de cada amostra. Os valores médios obtidos de cada amostra, com seus respectivos valores de desvio-padrão e coeficiente de variação (desvio padrão relativo) estão apresentados na Tabela 3. Por esta tabela, é possível observar que todos os coeficientes de variação obtidos para cada amostra são inferiores a 30%, o que é um valor aceitável quando se trabalha com amostras biológicas. Isto indica uma homogeneidade dos valores obtidos para cada amostra e valida a metodologia empregada.

Tabela 3: Valores do coeficiente médio, desvio-padrão e o variação para cada amostra.

Laser + Biovidro										
	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4	Amostra 5	Amostra 6	Amostra 7	Amostra 8	Amostra 9	Amostra 10
Média	-6,22E-05	-1,31E-04	-1,55E-04	-8,78E-05	-1,52E-04	-7,91E-05	-1,32E-04	-8,81E-05	-6,38E-05	-7,43E-05
DP	1,29E-05	1,88E-05	2,30E-05	1,51E-05	1,54E-05	1,12E-05	1,84E-05	7,72E-06	4,33E-06	4,13E-06
EP	5,79E-06	8,40E-06	1,03E-05	6,77E-06	6,90E-06	4,99E-06	8,23E-06	3,45E-06	1,93E-06	1,85E-06
CV	-20,80	-14,39	-14,83	-17,23	-10,14	-14,10	-13,98	-8,76	-6,78	-5,57
Sem tratamento										
	Amostra 11	Amostra 12	Amostra 13	Amostra 14	Amostra 15	Amostra 16	Amostra 17	Amostra 18	Amostra 19	Amostra 20
Média	-3,80E-05	-5,70E-05	-5,04E-05	-5,70E-05	-5,09E-05	-4,49E-05	-4,45E-05	-3,89E-05	-5,37E-05	-7,98E-05
DP	2,98E-06	3,66E-06	7,90E-06	2,03E-06	2,75E-06	7,84E-06	5,42E-06	2,41E-06	3,61E-06	9,99E-06
EP	1,33E-06	1,64E-06	3,53E-06	9,07E-07	1,23E-06	3,51E-06	2,42E-06	1,08E-06	1,62E-06	4,47E-06
CV	-7,84	-6,43	-15,67	-3,56	-5,41	-17,47	-12,18	-6,20	-6,73	-12,52
Cárie inicial apenas										
	Amostra 21	Amostra 22	Amostra 23	Amostra 24	Amostra 25	Amostra 26	Amostra 27	Amostra 28	Amostra 29	Amostra 30
Média	-1,04E-04	-1,00E-04	-5,49E-05	-1,10E-04	-6,93E-05	-5,68E-05	-5,11E-05	-6,81E-05	-5,55E-05	-3,50E-05
DP	9,89E-06	7,79E-06	7,37E-06	7,69E-06	1,02E-05	4,01E-06	6,19E-06	7,59E-06	7,90E-06	2,85E-06
EP	4,42E-06	3,49E-06	3,29E-06	3,44E-06	4,57E-06	1,80E-06	2,77E-06	3,39E-06	3,53E-06	1,27E-06
CV	-9,49	-7,76	-13,42	-7,02	-14,74	-7,07	-12,10	-11,14	-14,22	-8,15
Laser										
	Amostra 31	Amostra 32	Amostra 33	Amostra 34	Amostra 35	Amostra 36	Amostra 37	Amostra 38	Amostra 39	Amostra 40
Média	-5,07E-05	-9,91E-05	-6,49E-05	-6,24E-05	-6,63E-05	-7,63E-05	-6,77E-05	-9,09E-05	-4,61E-05	-7,43E-05
DP	1,40E-05	5,09E-06	6,99E-06	8,48E-06	4,85E-06	1,27E-05	9,16E-06	4,44E-06	6,74E-06	9,69E-06
EP	6,25E-06	2,28E-06	3,13E-06	3,79E-06	2,17E-06	5,70E-06	4,10E-06	1,98E-06	3,01E-06	4,33E-06
CV	-27,57	-5,14	-10,77	-13,59	-7,31	-16,71	-13,54	-4,88	-14,61	-13,03
Flúor										
	Amostra 41	Amostra 42	Amostra 43	Amostra 44	Amostra 45	Amostra 46	Amostra 47	Amostra 48	Amostra 49	Amostra 50
Média	-5,77E-05	-5,26E-05	-1,12E-04	-5,01E-05	-5,24E-05	-5,72E-05	-6,03E-05	-4,19E-05	-1,17E-04	-5,02E-05
DP	1,54E-05	9,22E-06	3,27E-05	6,08E-06	6,79E-06	1,15E-05	1,00E-05	2,40E-06	2,29E-05	2,00E-06
EP	6,89E-06	4,12E-06	1,46E-05	2,72E-06	3,04E-06	5,13E-06	4,47E-06	1,08E-06	1,03E-05	8,93E-07
CV	-26,69	-17,54	-29,151	-12,15	-12,95	-20,05	-16,59	-5,74	-19,61	-3,98
Biovidro										
	Amostra 51	Amostra 52	Amostra 53	Amostra 54	Amostra 55	Amostra 56	Amostra 57	Amostra 58	Amostra 59	Amostra 60
Média	-7,12E-05	-5,24E-05	-5,51E-05	-5,64E-05	-5,67E-05	-4,49E-05	-8,48E-05	-5,81E-05	-5,94E-05	-5,40E-05
DP	6,99E-06	8,80E-06	7,15E-06	7,90E-06	7,38E-06	9,31E-06	1,64E-05	1,14E-05	1,79E-05	3,99E-06
EP	3,13E-06	3,93E-06	3,20E-06	3,53E-06	3,30E-06	4,16E-06	7,32E-06	5,10E-06	8,01E-06	1,79E-06
CV	-9,81	-16,80	-12,81	-14,01	-13,00	-20,72	-19,30	-19,64	-30,12	-7,40

Fonte: produção do próprio autor, 2017.

A Tabela 4 apresenta os valores do coeficiente de atenuação óptica total médio de

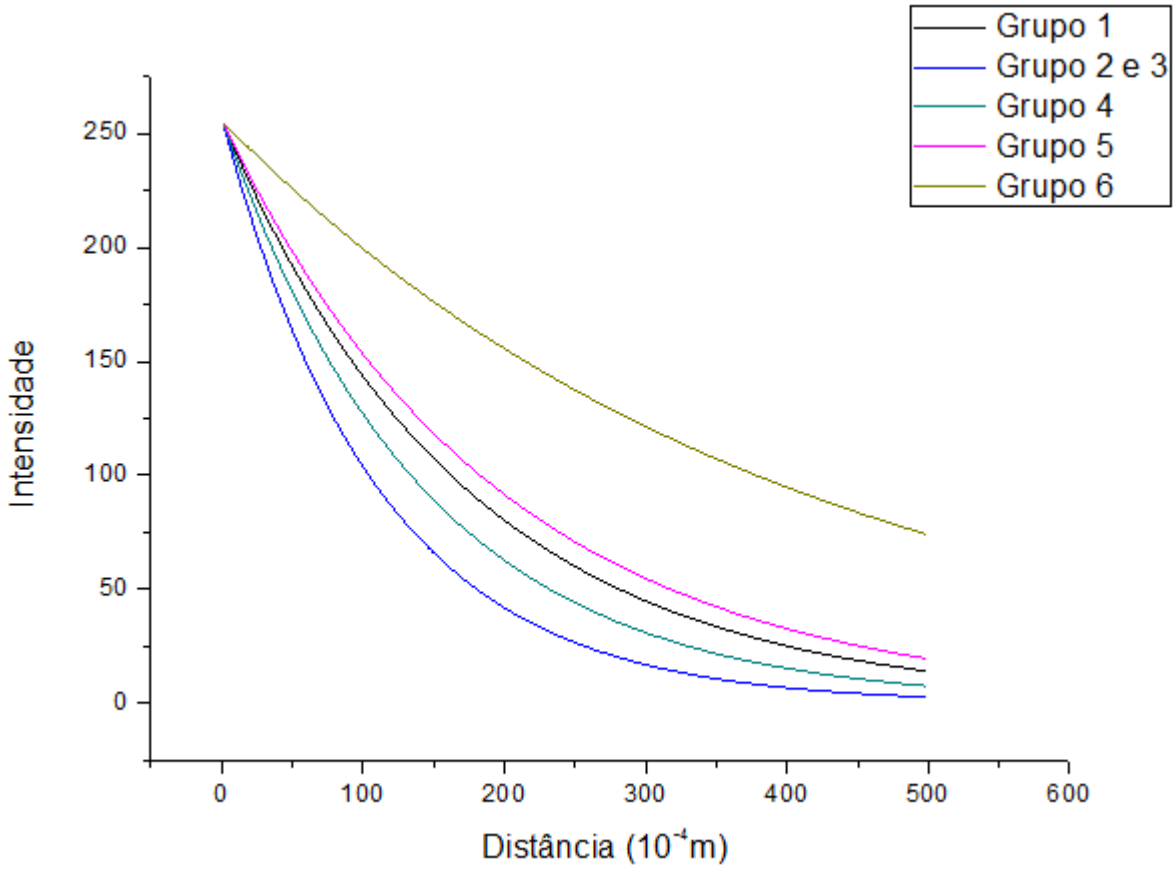
cada grupo experimental, assim como os valores de desvio-padrão obtidos. A Figura 15 ilustra a comparação entre os coeficientes de atenuação óptica médios em função da profundidade para cada grupo experimental.

Tabela 4: Média e Desvio Padrão médio de cada grupo

	Cárie inicial apenas	Sem tratamento	Flúor	Laser	Biovitro-cerâmico	Biovitro-cerâmico + laser
	-1,04E-04	-3,80E-05	-5,77E-05	-5,07E-05	-7,12E-05	-6,22E-05
	-1,00E-04	-5,70E-05	-5,26E-05	-9,91E-05	-5,24E-05	-1,31E-04
	-5,49E-05	-5,04E-05	-1,12E-04	-6,49E-05	-5,51E-05	-1,55E-04
	-1,10E-04	-5,70E-05	-5,01E-05	-6,24E-05	-5,64E-05	-8,78E-05
	-6,93E-05	-5,09E-05	-5,24E-05	-6,63E-05	-5,67E-05	-1,52E-04
	-5,68E-05	-4,49E-05	-5,72E-05	-7,63E-05	-4,49E-05	-7,91E-05
	-5,11E-05	-4,45E-05	-6,03E-05	-6,77E-05	-8,48E-05	-1,32E-04
	-6,81E-05	-3,89E-05	-4,19E-05	-9,09E-05	-5,81E-05	-8,81E-05
	-5,55E-05	-5,37E-05	-1,17E-04	-4,61E-05	-5,94E-05	-6,38E-05
	-3,50E-05	-7,98E-05	-5,02E-05	-7,43E-05	-5,40E-05	-7,43E-05
Média	-7,05E-05	-5,15E-05	-6,52E-05	-6,99E-05	-5,93E-05	-1,02E-04
DP	2,55E-05	1,20E-05	2,66E-05	1,63E-05	1,11E-05	3,61E-05
EP	8,07E-06	3,81E-06	8,41E-06	5,15E-06	3,51E-06	1,14E-05

Fonte: produção do próprio autor, 2017.

Figura 15: Gráfico de atenuação com os diferentes coeficientes a uma intensidade inicial de 255 pixels.



Fonte: produção do próprio autor, 2017.

A Tabela 5 apresenta os resultados da análise estatística efetuada, onde é possível visualizar a comparação estatística grupo a grupo. Considerando-se o nível de significância adotado neste estudo ($p < 0{,}05$), é possível observar que houve diferença estatisticamente significante na comparação entre os grupos 1 e 2, 1 e 6, 2 e 5, 2 e 6, 3 e 6, e 4 e 6 (destacados em vermelho na Tabela 5).

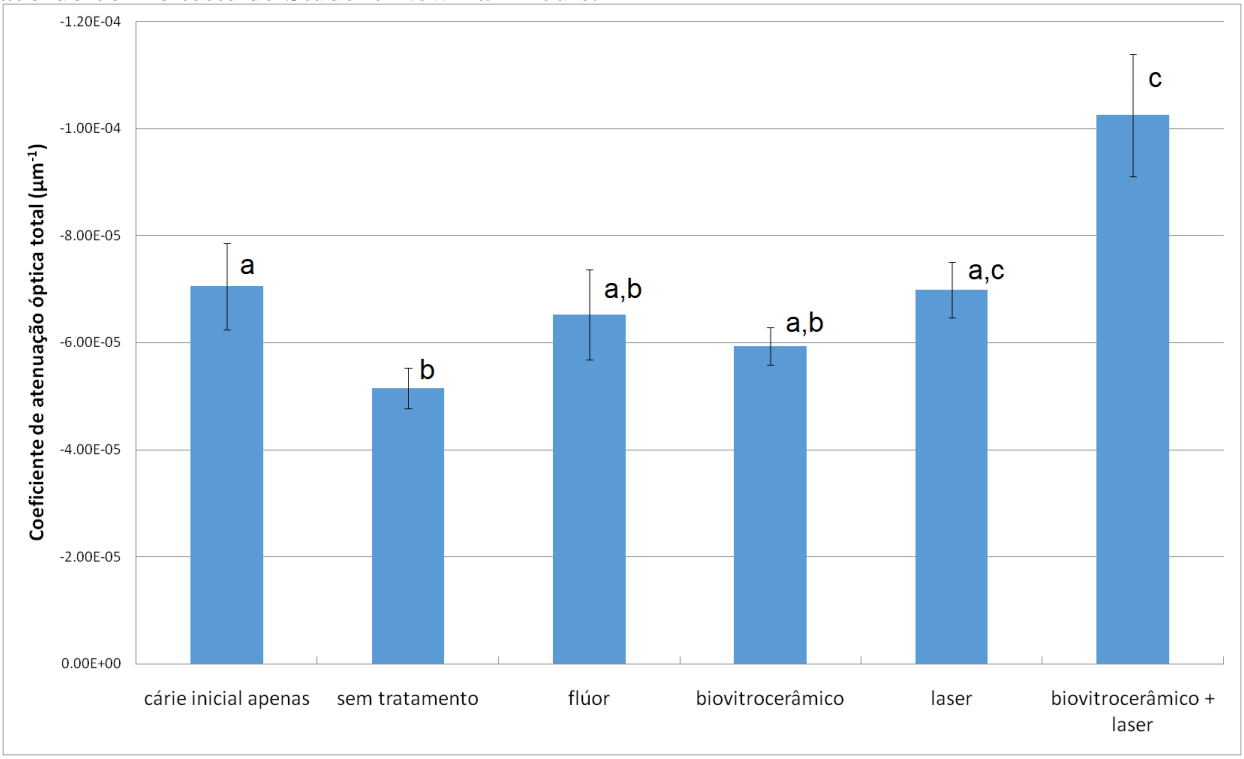
Tabela 5: Resultados obtidos na análise estatística de Kruskal-Wallis e Student-Newman-Keuls.

H =	20.2636	
Graus de liberdade =	5	
(p) Kruskal-Wallis =	0.0011	
G 1 (posto médio) =	29	
G 2 (posto médio) =	45.3	
G 3 (posto médio) =	35.4	
G 4 (posto médio) =	35.2	
G 5 (posto médio) =	25.7	
G 6 (posto médio) =	12.4	
Comparações Student-Newman-Keuls	textbf Dif. Postos	p-valor
Grupos (1 e 2) =	16.3	0.0369
Grupos (1 e 3) =	6.4	0.4125
Grupos (1 e 4) =	6.2	0.4273
Grupos (1 e 5) =	3.3	0.6726
Grupos (1 e 6) =	16.6	0.0336
Grupos (2 e 3) =	9.9	0.205
Grupos (2 e 4) =	10.1	0.196
Grupos (2 e 5) =	19.6	0.0121
Grupos (2 e 6) =	32.9	<0.0001
Grupos (3 e 4) =	0.2	0.9796
Grupos (3 e 5) =	9.7	0.2143
Grupos (3 e 6) =	23	0.0032
Grupos (4 e 5) =	9.5	0.2239
Grupos (4 e 6) =	22.8	0.0035
Grupos (5 e 6) =	13.3	0.0886

Fonte: produção do próprio autor, 2017.

A Figura 16 ilustra os valores médios do coeficiente de atenuação óptica para cada grupo experimental, com seus respectivos valores de erro padrão.

Figura 16: Valores médios do coeficiente de atenuação óptica total de cada grupo experimental. As barras indicam erro padrão. Letras distintas evidenciam médias estatisticamente diferentes de acordo com o teste de Student-Newman-Keuls.



Fonte: produção do próprio autor, 2017.

Por estes resultados, é possível observar que o grupo sem tratamento (grupo 2) apresentou uma significativa diminuição no coeficiente de atenuação óptica (em valores absolutos, desconsiderando-se o sinal negativo do decaimento exponencial da intensidade do sinal de OCT) em relação ao grupo apenas com cárie inicial. De fato, o grupo G2 apresenta maior perda mineral em relação ao grupo G1 pois foi submetido à ciclagem de pH posterior à desmineralização inicial, o que representa a progressão da lesão de cárie. Este fenômeno condiz com o esperado pois, durante a perda de mineral que ocorre durante o processo de cárie, cria-se espaços vazios na micro-estrutura dos tecidos duros (a dentina, no caso deste estudo), o que origina porosidades maiores, havendo maior probabilidade da luz percorrer o interior desses poros sem que interaja com centros espalhadores. Com isso, a luz percorre mais no interior da amostra, o que justifica o menor coeficiente de atenuação óptica para as amostras com maior desmineralização.

Os resultados obtidos neste estudo corroboram o evidenciado por Popescu et al. (2008), Sowa et al. (2011) e Maia et al. (2015) os quais avaliaram o coeficiente de atenuação óptica

em amostras de esmalte dentário desmineralizadas in vitro, e observaram uma diminuição deste coeficiente com o aumento da perda mineral. Contudo, os resultados deste trabalho diferem dos resultados reportados por Mujat et al. (2003) e Cara et al. (2014), os quais relataram uma relação positiva entre a perda mineral e o coeficiente de atenuação óptica. Estes últimos autores alegam que a desmineralização gera aumento do número de interfaces para que ocorra o espalhamento da luz, o que aumenta o mesmo. Além disso, o desenvolvimento da lesão de cárie propicia também a desorganização do material remanescente (da matriz inorgânica e exposição de material orgânico), o que também resulta em maior espalhamento da luz.

A aplicação tópica de flúor, efetuada no grupo controle positivo, também apresenta efeitos ópticos esperados, pois aumenta o coeficiente de atenuação óptica total em relação ao grupo G2 (sem tratamento), igualando-se aos efeitos ópticos promovidos pelo desenvolvimento da lesão incipiente, representados aqui pelo grupo G1. Assim, evidencia-se um menor espalhamento da luz devido à ação de remineralização do fluoreto, cuja ação principal é a formação de glóbulos de CaF_2 que estiveram dissolvidos nas soluções de ciclagem de pH, mas presentes em todo o experimento. Estes glóbulos favoreceram a formação de hidroxiapatita fluoretada ou mesmo fluorapatita em menor quantidade sobre a superfície da dentina, diminuindo o espalhamento da luz e, com isso, aumentando o coeficiente de atenuação óptica. Com isso, observa-se que a ação de remineralização do fluoreto inibiu a progressão da lesão de cárie.

A aplicação do biovitrocerâmico e da irradiação laser, ambos isoladamente, propiciou a inibição da progressão das lesões de cárie de forma similar à promovida pelo fluoreto, cujos valores de coeficiente de atenuação óptica total não diferiram estatisticamente entre si. Desta forma, observa-se que os efeitos químicos dos tratamentos, seja na formação de hidroxiapatita carbonatada para o caso do vitrocerâmico bioativo, como na alteração morfológica e composicional promovida pela irradiação laser, não alteram o comportamento óptico da dentina, sendo possível avaliar o grau de desmineralização, cujo efeito é preponderamentemente maior, para ambos os tratamentos.

Contudo, vale a pena enfatizar que a aplicação do biovitrocerâmico não apresentou diferença estatisticamente significante em relação ao grupo sem tratamento (G2), o que sugere que parte do material formado pode ter sido perdido durante a ciclagem de pH, o que não propiciou uma atividade tão expressiva do biomaterial. Em relação à irradiação laser, observou-se um efeito contrário, ou seja, as amostras apenas irradiadas apresentaram coeficiente de atenuação óptica sig-

nificativamente maior do que o grupo G2. Este efeito é esperado, considerando que a irradiação laser age na prevenção da progressão da cárie por meio de efeito térmico, alterando a morfologia e a composição química do tecido irradiado, por meio da evaporação de água e carbonato, além da decomposição da matriz orgânica e alterações na cristalinidade superficial da dentina. Como estes efeitos ocorrem no tecido em si, não há perda de material para as soluções de ciclagem, o que garante o efeito preventivo por um maior tempo. Estes resultados corroboram achados anteriores realizados pelo grupo [BACHMANN et al., 2009].

O grupo tratado com a associação de tratamentos (biovitrocerâmico seguido da irradiação laser) foi o que apresentou maior coeficiente de atenuação óptico total. Sendo estatisticamente diferente de todos os grupos experimentais, exceto o grupo tratado apenas com irradiação laser. Isso evidencia um ganho de mineral expressivo, sendo maior até mesmo que o grupo G1 (apenas com cárie incipiente). Esta atividade de remineralização observada reflete a possibilidade de maior retenção do biovitrocerâmico pela ação térmica promovida pela irradiação laser, o que pode ter culminado na maior formação de hidroxiapatita carbonatada, tal como relatado em estudos anteriores. Outrossim, o efeito da ação da irradiação laser em si (alteração da dentina por meio do calor) pode ter sido somado ao efeito do vitrocerâmico em si, sendo desencadeado um efeito sinérgico.

Embora a literatura tenha mostrado a possibilidade de sinergia entre a irradiação laser em alta intensidade e um biovidro, ressalta-se que o presente estudo difere em relação ao biomaterial empregado, assim como ao laser empregado.

Em biovidros, suas cujas composições são adquiridas a partir combinações do sistema $Na_2O-CaO-MgO-P_2O_5-SiO_2$ sendo estes amorfos, ou seja, não apresentam estrutura atômica definida e baixa cristalinidade, o que acarreta em baixo desempenho mecânico, tendo sua utilidade limitada na engenharia de tecidos. Entretanto, estes possuem alta bioatividade, sendo então utilizados em diversas aplicações ortopédicas. Já as vitrocerâmicas bioativas, são materiais alcançados a partir da cristalização controlada de biovidros, apresentando um grau de cristalinidade (em torno de 0,5 e 99,5%), entretanto, a presença de fases cristalinas em vitrocerâmicas acarreta na redução de sua bioatividade, se comparado aos biovidros. Porém, as vitrocerâmicas bioativas apresentam elevada resistência mecânica e maior tenacidade à fratura se comprados aos biovidros [FIGUEIREDO, 2016].

Em relação ao laser, a literatura evidencia o uso de lasers de Nd:YAG ou CO_2 em

associação aos materiais bioativos. Neste trabalho empregou-se um laser de Er,Cr:YSGG em baixa densidade de energia, altamente absorvido por água e hidroxiapatita. Isso não requer a aplicação de substância fotoabsorvedora (como no caso do laser de Nd:YAG),o que apresenta vantagens. A substância fotoabsorvedora é aplicada previamente à irradiação com lasers pouco absorvidos pela água e hidroxiapatita, o que restringe a absorção do fóton na superfície mas pode originar manchamentos, pois o fotoabsorvedor empregado é sempre de cor preta. Em relação ao laser de CO_2, deve-se ter cautela quanto ao uso clínico de um laser emitido no comprimento de onda de 10,6 μm principalmente em relação à largura temporal do pulso, o que pode gerar diferentes danos térmicos na dentina, tais como carbonizações, trincas ou desidratação excessiva. O laser de Er,Cr:YSGG empregado neste estudo já demonstrou segurança e potencial uso para prevenção da cárie em esmalte e dentina, não apresentado efeitos colaterais expressivos [SILVA, 2016] [ANA et al., 2012].

As Figuras 17-22 ilustram as eletromicrografias superficiais representativas de cada grupo experimental, nas magnificações originais de 1000 X e 16000 X, respectivamente. É possível observar, no grupo sem tratamento e não submetido à ciclagem de pH, a obtenção de superfície parcialmente plana, com poucos túbulos dentinários abertos em decorrência do processo de desmineralização inicial promovido. Em maior aumento, observa-se uma camada desorganizada na superfície, consequência da desmineralização parcial. A ciclagem de pH promoveu maior exposição dos túbulos dentinários e a formação de uma superfície mais irregular.

As amostras tratadas com flúor fosfato acidulado, após ciclagem de pH, apresentaram superfície com maior irregularidade quando comparada ao grupo sem tratamento, com a presença de túbulos dentinários abertos, elevações e algumas superfícies globulares, o que pode indicar a retenção de fluoreto de cálcio formado após aplicação tópica. As irregularidades formadas na superfície podem ser consequência da pequena quantidade de ácido fosfórico presente no gel de flúor fosfato acidulado, responsável por aumentar a área de contato com o fluoreto.

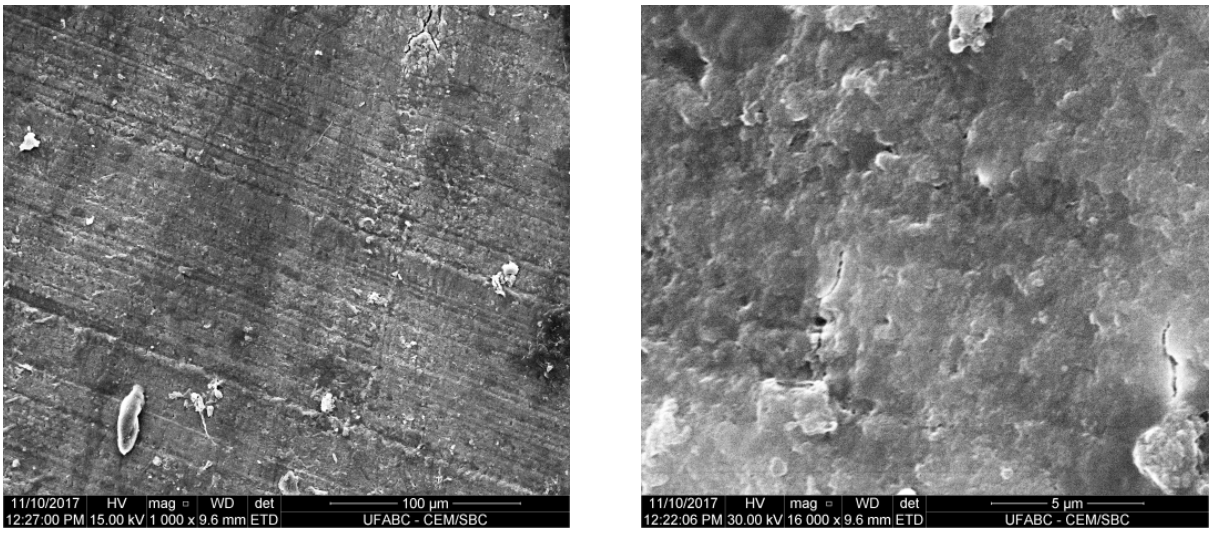
A aplicação do biovitrocerâmico também promoveu a formação de uma superfície desorganizada mesmo após ciclagem de pH, com a presença de túbulos abertos e formação de depósitos, porém de menores elevações quando comparadas às amostras tratadas com fluoreto. Isso indica os efeitos do desafio cariogênico em si, mas também a provável retenção de biomaterial sobre a superfície.

A irradiação laser promoveu a formação de uma superfície bem mais irregular, com crateras mais profundas e ausência de depósitos mesmo após ciclagem de pH. Tal aspecto é característico do fenômeno de ablação promovido pelo laser de Er,Cr:YSGG na superfície da dentina, já demonstrado em estudos anteriores realizados pelo grupo [SILVA, 2016], o qual se manteve mesmo depois da ciclagem de pH.

A associação de biovitrocerâmico seguida da irradiação laser, contudo, promoveu a formação de uma camada mais homogênea, que recobre toda a superfície das amostras e mantem-se após ciclagem de pH. Ao maior aumento, observa-se superfícies sobrelevadas, com aspecto de derretimento e recristalização. Tal aspecto sugere que o efeito térmico promovido pela irradiação laser tenha promovido o derretimento do biomaterial, favorecendo sua retenção mesmo após a ciclagem de pH, o que corrobora os achados obtidos por tomografia por coerência óptica.

Desta forma, este trabalho, embora preliminarmente, indica que a associação de tratamentos parece ser a melhor maneira de paralisar e remineralizar uma lesão de cárie radicular incipiente. Ressalta-se ainda a necessidade de outras análises, tais como quantificação da perda mineral por microdureza, composicional e cristalográfica, para de fato comprovar a formação e retenção de hidroxiapatita carbonatada mesmo após irradiação laser e, com isso, indicar esta terapia para uso clínico.

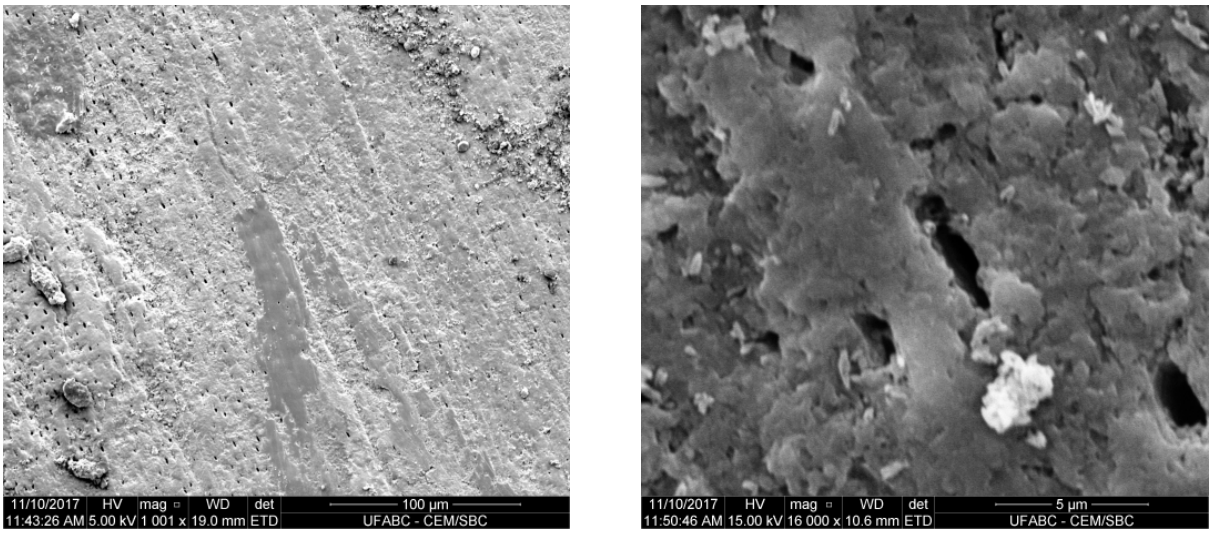
Figura 17: Eletromicrografias representativas das superfícies das amostras do grupo sem tratamento e não submetido à ciclagem de pH. Magnificações originais:



(a) = 1000x (b) = 16000x

Fonte: produção do próprio autor, 2017.

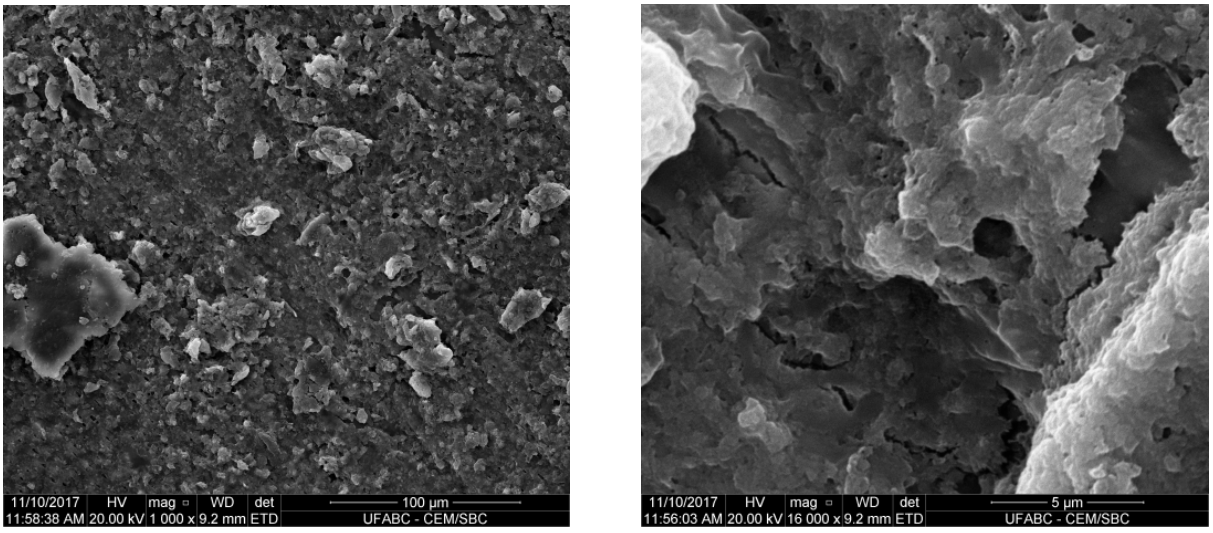
Figura 18: Eletromicrografias representativas das superfícies das amostras do grupo sem tratamento, pós ciclagem de pH. Magnificações originais:



(a) = 1000x (b) = 16000x

Fonte: produção do próprio autor, 2017.

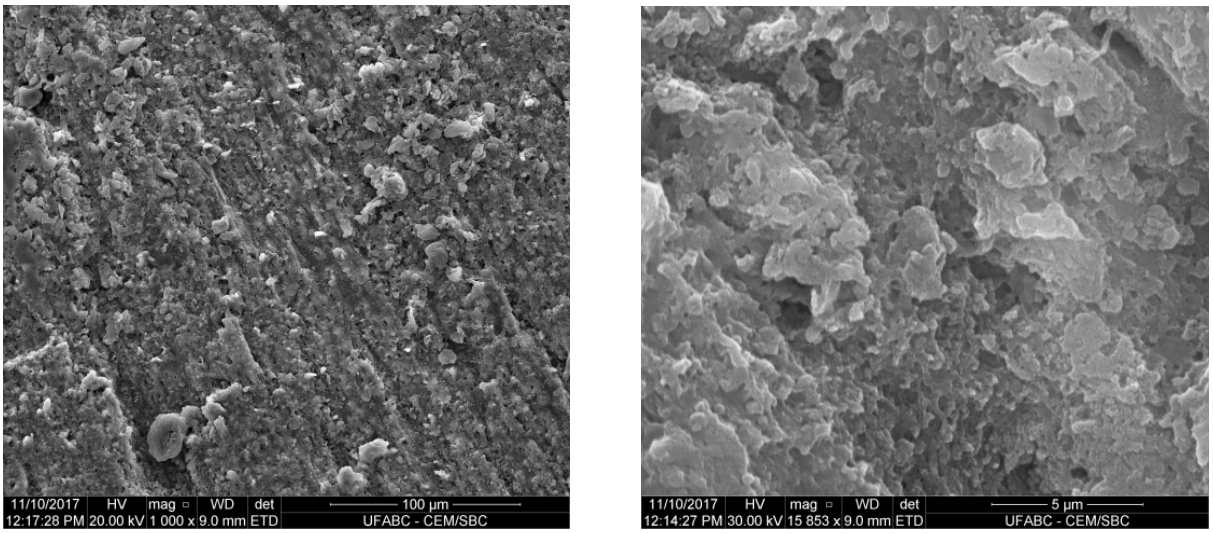
Figura 19: Eletromicrografias representativas das superfícies das amostras do grupo Flúor, pós ciclagem de pH. Magnificações originais:



(a) = 1000x (b) = 16000x

Fonte: produção do próprio autor, 2017.

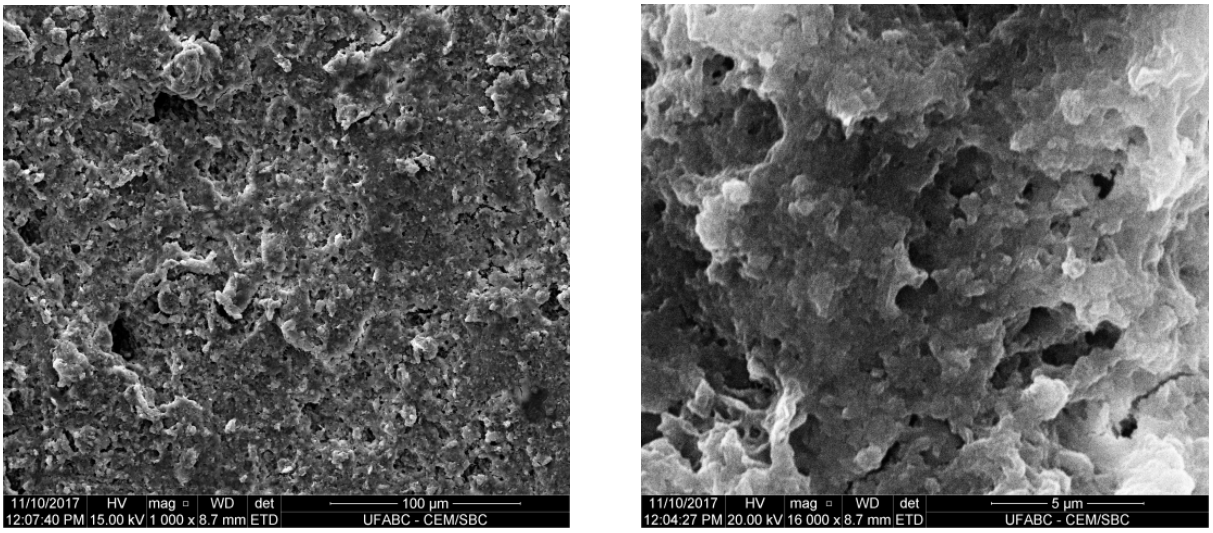
Figura 20: Eletromicrografias representativas das superfícies das amostras do grupo Biovitrocêramico, pós ciclagem de pH. Magnificações originais:



(a) = 1000x (b) = 16000x

Fonte: produção do próprio autor, 2017.

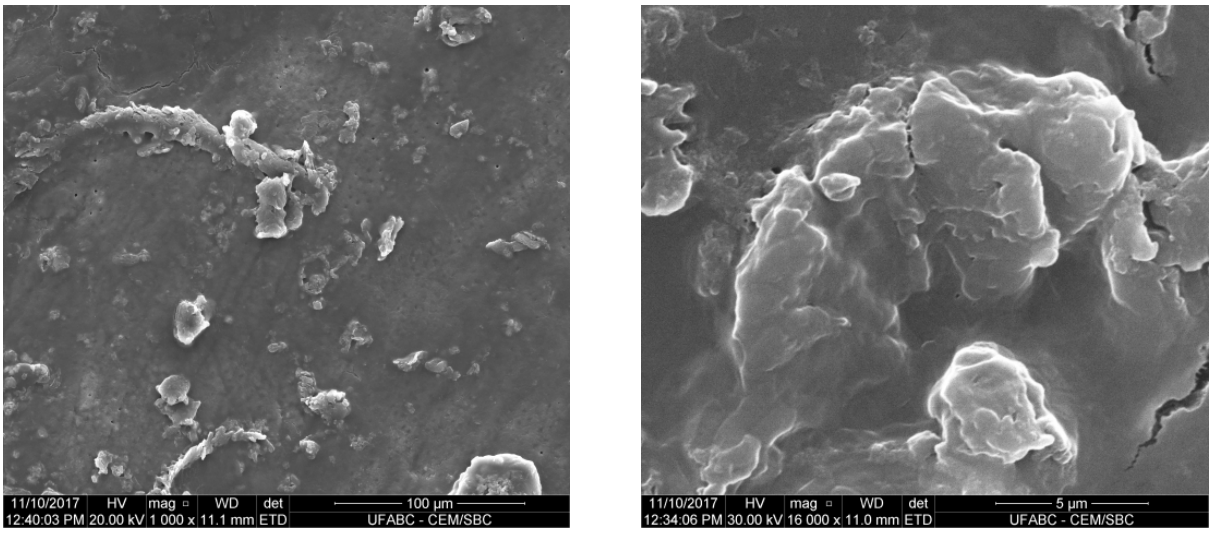
Figura 21: Eletromicrografias representativas das superfícies das amostras do grupo Laser, pós ciclagem de pH. Magnificações originais:



(a) = 1000x (b) = 16000x

Fonte: produção do próprio autor, 2017.

Figura 22: Eletromicrografias representativas das superfícies das amostras do grupo Laser + Biovitrocêramico, pós ciclagem de pH. Magnificações originais:



(a) = 1000x (b) = 16000x

Fonte: produção do próprio autor, 2017.

6 CONCLUSÃO

De acordo com a metodologia empregada e os resultados obtidos neste estudo, é possível concluir que o tratamento da dentina radicular com o vitrocerâmico bioativo ou a irradiação com laser de Er,Cr:YSGG isoladamente propiciam a remineralização da lesão incipiente de cárie, impedindo sua progressão. A associação dos tratamentos apresentou um efeito sinérgico, promovendo uma remineralização ainda maior deste tecido quando avaliado pelo seu coeficiente de atenuação óptica.

7 REFERÊNCIAS

ANA, P. A.; TABCHOURY, C. P. M.; CURY, J. A.; ZEZELL, D. M. Effect of er,cr:ysgg laser and fluoride application on enamel demineralization. **Caries Research**, v. 46, n. 5, p. 441–451, 2012. Disponível em: ⟨http://www.karger.com/Article/PDF/333603⟩. Acesso em: 3 mar. 2017.

BACHMANN, L.; ROSA, K.; ANA, P. A.; ZEZELL, D. M. Craievich af, kellermann g. crystalline structure of human enamel irradiated with er,cr:ysgg laser. laser physletters. **Weinheim**, v. 6, n. 2, p. 159–162, 2009. Disponível em: ⟨http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/lapl.200810104/abstract⟩. Acesso em: 3 mar. 2017.

BAKRY, A. S.; TAKAHASHI, H.; SADR, A.; YAMASHITA, K.; TAGAMI, J. Co2 laser improves 45s5 bioglass interaction with dentin. **J Dent Res**, v. 90, n. 2, p. 246–250, 2011.

BATH-BALOGH, M.; FEHRENBACH, M. J. **Anatomia, Histologia e Embriologia dos Dentes e Estruturas Orofaciais**. 3. ed. [S.l.]: Washington: Elsevier, 2011.

BRITO, A. M. M. **Efeitos químico-estruturais promovidos pelo laser de Nd:YAG, associado ou não ao fluoreto, quando empregado para prevenção da progressão de lesões de cárie radicular**: Tese (doutorado) - curso de biotecnociência. Dissertação (Mestrado) — Universidade Federal do Abc, Santo André, 2014. Disponível em: ⟨http://propg.ufabc.edu.br/biotecnociencia/Dissert_Defendidas/2014/AdrianneMarliseMendesBrito.pdf⟩. Acesso em: Acesso em: 04 ago. 2017.

CARA, A. C.; ZEZELL, D. M.; ANA, P. A.; MALDONADO, E. P.; FREITAS, A. Z. Evaluation of two quantitative analysis methods of optical coherence tomography for detection of enamel demineralization and comparison with microhardness. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 46, p. 666–671, 2014.

CAVALCANTI, T. M.; ALMEIDA-BARROS, R. Q. de; CATãO, M. H. C. de V.; FEITOSA, A. P. A.; LIN, R. D. A. U. Conhecimento das propriedades físicas e da interação do laser com os tecidos biológicos na odontologia. **An. Bras. Dermatol.**, v. 86, n. 5, p. 955–960, 2011.

COLUCCI, V.; MESSIAS, D. C.; SERRA, C. M.; CORONA, S. A.; TURSSI, C. Fluoride plus co2 laser against the progression of caries in root dentin. **Am J Dent**, v. 25, n. 2, 2012. Disponível em: ⟨http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22779286⟩. Acesso em: 3 mar. 2017.

CURY, J. A. Uso do flúor e controle da cárie como doença. 2002.

CURY J.A.; SAAD, J. R. A. Liberação de flúor de selante na água, saliva e soluções desmineralizante-remineralizante. **Rev. Gaúcha Odont.**, v. 45, n. 4, 1993.

DAGUANO, J. K. M. F.; ROGERO, S. O.; CROVACE, M. C.; PEITL, O.; STRECKER, K.; SANTOS, C. Bioactivity and cytotoxicity of glass and glass–ceramics based on the 3caop2o5–sio2–mgo system. **J MaterSci: MaterMed**, v. 24, n. 9, p. 2171–2180, 2013. Disponível em: ⟨http://link.springer.com/article/10.1007\%2Fs10856-013-4972-8⟩. Acesso em: 3 mar. 2017.

DELBEM, A. C.; CURY, J. A.; NAKASSIMA, C. K.; GOUVEIA, V. G.; THEODORO, L. H. Effect of er:yag laser on caf2 formation and its anti-cariogenic action on human enamel: an in vitro

study. **J Clin Laser MedSurg**, v. 21, n. 4, p. 197–201, 2003. Disponível em: ⟨http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13678456⟩. Acesso em: 3 mar. 2017.

FIGUEIREDO, D. **Efeitos químico-estruturais promovidos pelo laser de Nd:YAG, associado ou não ao fluoreto, quando empregado para prevenção da progressão de lesões de cárie radicular**. Santo André: [s.n.], 2016. Monografia (Engenharia de Materiais), UFABC (Universidade Federal do ABC), Santo André, Brasil.

FRANKE, M. **Influência do tratamento da dentina com laser Nd:Yag no processo restaurador adesivo**. Dissertação (Mestrado) — Universidade Federal de Santa Catarina, 2003.

FRAZAO, M. C. A.; SILVA, G. V. da; LINHARES, T. S.; LAGO, A. D. N.; LIMA, D. M. Biovidro 45s5: um avanço biotecnológico nos materiais restauradores da odontologia. **FOL: Faculdade de Odontologia de Lins/Unimep**, v. 25, n. 2, p. 47–55, 2015.

GONCALVES, N. C. L. A. V.; ASSAF, A. V.; MIALHE, F. L.; ZANIN, L.; KOZJOWSKI, F. G.; PARDI, V.; FLóRIO, F. M. **Odontologia em Saúde Coletiva**. Dissertação (Mestrado) — FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA, Piracicaba, 2002.

KURODA, B. O. F. S. Compositional, structural, and phase changes in in vitro laser-irradiated human tooth enamel. **CalcifTissue Int.**, v. 36, n. 4, p. 361–369, 1984. Disponível em: ⟨http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/643583⟩. Acesso em: 3 mar. 2017.

LARSEN, M. J.; BRUN, C. **A química da cárie dentária e o flúor – mecanismo de ação**. 2. ed. São Paulo: Cariologia Clínica, 1995.

LEE, B. S.; CHANG, C. W.; CHEN, W. P.; LAN, W. H.; LIN, C. P. In vitro study of dentin hypersensitivity treated by nd:yap laser and bioglass. **DentMater**, v. 21, n. 6, p. 511–519, 2005. Disponível em: ⟨http://www.demajournal.com/article/S0109-5641(04)00157-5/abstract⟩. Acesso em: 3 mar. 2015.

MAIA, A. M. A.; FREITAS, A. Z. de; CAMPELLO, S. de L.; GOMES, A. S. L.; KARLSSON, L. Evaluation of dental enamel caries assessment using quantitative light induced fluorescence and optical coherence tomography. **J. Biophotonics**, p. 1–7, 2015.

MARTHALER, T. M. Changes in dental caries. **Caries Research**, v. 38, n. 3, p. 173–181, 2004.

ODONTOLOGIA. **O uso do Flúor na Odontologia**. 2010. Disponível em: ⟨http://odontomaxima.blogspot.com.br/2010/10/o-uso-do-fluor-na-odontologia.html⟩. Acesso em: 03 nov. 2017.

OLIVEIRA, M. E. **Avaliação de Diferentes Parâmetros para Irradiação do Esmalte Dental com o Laser de CO2 Visando a Redução da Desmineralização**: Tese (doutorado) - curso de odontologia. Dissertação (Mestrado) — Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

PERITO, M. A. M.; JORGE, A. C. T.; CASSONI, A.; RODRIGUES, J. A. Uso do laser na prevenção da cárie. **Revista Dentística**, v. 86, n. 18, 2009.

PIRES, A. L. R.; BIERHALZ, A. C. K.; MORAES Ângela M. Biomateriais: tipos, aplicações e mercado. **Quím. Nova**, v. 7, n. 38, 2015.

QUEIROZ, C. S. **Modelos de estudos in vitro para avaliar o efeito do fluoreto na desmineralização e remineralização do esmalte e dentina**. Piracicaba: [s.n.], 2005.

RECHMANN, P.; FRIED, D.; LE, C. Q.; NELSON, G.; RAPOZO-HILO, M.; FEATHERSTONE, J. D.; RECHMANN, B. M. J. d. caries inhibition in vital teeth using 9.6-m co2-laser irradiation. **J BiomedOptics**, v. 16, n. 7, 2011. Disponível em: ⟨http://biomedicaloptics.spiedigitallibrary.org/article.aspx?articleid=1166931⟩. Acesso em: 3 mar. 2017.

RENNO, A. C. M.; BOSSINI, P. S.; CROVACE, M. C.; RODRIGUES, A. C. M.; ZANOTTO, E. D.; PARIZOTTO, N. A. Characterization and in vivo biological performance of biosilicate. **BioMed Res Int**, v. 97, n. 1, p. 139–47, 2011. Disponível em: ⟨http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21290592⟩. Acesso em: 3 mar. 2015.

SERWAY, R. A.; JEWETT, J. J. W. **Princípios de Física - Óptica e Física Moderna**. 3. ed. [S.l.]: Cengage Learning, 2004. v. 4.

SILVA, E. dos S. F. **"EFEITOS DA IRRADIAÇÃO COM LASER DE Er,Cr:YSGG NA TEMPERATURA PULPAR E SUPERFICIAL DA DENTINA RADICULAR"**. Dissertação (Mestrado) — Universidade Federal do Abc, Santo André, 2016.

SIQUEIRA, R.; ZANOTTO, E. D. Biosilicato: histórico de uma vitrocerêmicabrasileira de elevada bioatividade. **Química Nova**, v. 34, n. 7, p. 1231–1241, 2011.

SOUSA, F. B. de. **Cariologia: Bases histopatológicas para decisões clínicas**. [S.l.]: Autor, 2000.

SOUZA, P. R.; PURGER, F. P. de C.; VASCONCELLOS, A. B. de; RIBEIRO, A. A. Métodos de detecção de cárie. **Revista Brasileira de Odontologia**, v. 69, n. 1, p. 84–89, 2012.

TEIXEIRA, K. I. R.; BUENO, A. C.; CORTES, M. E. Processos físico-químicos no biofilme dentário relacionados à produção da cárie. **Química Nova na Escola**, v. 32, n. 3, 2010.

8 ANEXO

Anexo A – Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFABC

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

Santo André, 13 de novembro de 2017
CEUAx N 9246160915

IImo(a). Sr(a).
Responsável: Patricia Aparecida Da Ana
Área: Centro De Engenharia, Modelagem E Ciências Sociais Aplicadas - Cecs
Equipe envolvida: Helenice Yumi Yoshikawa - colaborador (ufabc); A Mesma (orientador)

Título do projeto: "EFEITOS DA IRRADIAÇÃO LASER ASSOCIADA A VIDROS BIOATIVOS NA REMINERALIZAÇÃO DA DENTINA ".

Parecer Consubstanciado da CEUA UFABC

O protocolo está em acordo com a legislação vigente e a Comissão recomenda a aprovação do mesmo.

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Fundação Universidade Federal do ABC, na reunião de 22/10/2015, **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.

Valéria Lima Fabrício Borghesi
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Fundação Universidade Federal do ABC

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

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

Santo André, 13th November 2017

CERTIFIED

We certify that the Research "Effects of laser irradiation and bioglasses on dentin remineralization", protocol number CEUAx 9246160915, under the responsibility Patricia Aparecida Da Ana, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Ethic Committee in the Use of Animals of Federal University of ABC, and was approved in the meeting of day October 22, 2015.

Certificamos que o protocolo do Projeto de Pesquisa intitulado "EFEITOS DA IRRADIAÇÃO LASER ASSOCIADA A VIDROS BIOATIVOS NA REMINERALIZAÇÃO DA DENTINA ", protocolado sob o CEUAx nº 9246160915, sob a responsabilidade de Patricia Aparecida Da Ana, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais da Fundação Universidade Federal do ABC, e foi aprovado na reunião de 22 de outubro de 2015.

Valéria Lima Fabrício Borghesi
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Fundação Universidade Federal do ABC

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