

Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

**UM ESTUDO IN VITRO SOBRE OS EFEITOS DA IRRADIAÇÃO PELO
LASER DE Er:YAG COMBINADO COM A TERAPIA COM FLÚOR NA
RESISTÊNCIA ÁCIDA DO ESMALTE DE DENTES SUBMETIDOS A
APARELHO ORTODÔNTICO FIXO.**

ROSELI Y. A. YOSHIYASU

Dissertação apresentada ao IPEN e a FOU SP
como parte dos requisitos para a obtenção do
título de Mestre, pelo curso de Mestrado
Profissionalizante “Lasers em Odontologia”.

Orientador: Prof.Dr. Edison Puig Maldonado

Co-orientador: Prof. Dr. Edmir Matson

SÃO PAULO 2001

Aos meus pais, **Nelson Seigi Akiyoshi** e **Youko Akiyoshi**, por serem pessoas excepcionais, as quais vou sempre seguir como exemplo.

Ao Prof. **Edson Puig Maldonado** pela honra de sua Orientação neste Trabalho de Pesquisa.

Ao **Prof. Edimir Matson** por sua colaboração neste Trabalho de Pesquisa.

À **Profª Dra. Denise Maria Zezell** por seu enorme incentivo e contribuição na elaboração da parte escrita e discussão deste Trabalho de Pesquisa.

Ao **Prof. Dr. Nilson Dias Vieira Jr.** Por sua dedicação e eficiência sempre dispensadas.

Ao **Departamento de Microbiologia da UFPR** e particularmente a **Profª Vânia Aparecida Vicente** por sua orientação na área de microbiologia.

Ao **Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Paraná** e particularmente à **Prof.ª Daura Regina Eiras-Stofella** por seu auxílio nas análises de microscopia eletrônica.

Ao **Prof. José Eduardo Pelizon Pelino** por sua paciência e colaboração neste Trabalho de Pesquisa.

À colega **Andréa Calmon** por sua ajuda prestada na obtenção da matriz de *S. mutans*.

À **Sandra Regina Agostini Cruz** por sua amizade, ajuda e incentivo durante todo este período do mestrado.

Às colegas **Eleonora, Fernanda e Neusa** pela compreensão e companheirismo no percorrer desta jornada.

E a todas as pessoas que colaboraram direta ou indiretamente para o desenvolvimento e êxito desta pesquisa.

UM ESTUDO IN VITRO SOBRE OS EFEITOS DA IRRADIAÇÃO PELO LASER DE Er:YAG COMBINADO COM A TERAPIA COM FLÚOR NA RESISTÊNCIA ÁCIDA DO ESMALTE DE DENTES SUBMETIDOS A APARELHO ORTODÔNTICO FIXO.

Roseli Y. A. Yoshiyasu

RESUMO

Várias pesquisas têm demonstrado um aumento na resistência ácida da superfície de esmalte quando irradiada por alguns tipos de lasers como o de Nd:YAG, CO₂,Er:YAG, e outros,principalmente quando combinada a terapia com flúor logo após a irradiação pelo laser.Este estudo *in vitro* utilizou o laser Er:YAG a uma densidade de energia aproximada de 8,1J/cm² sobre o esmalte ao redor de *brácktes* ortodônticos de dentes pré-molares recém extraídos.estes dentes foram então submetidos a um meio rico em *S. mutans* por vinte e um dias.Foram analisados os casos: (1) superfície de esmalte sem nenhum tratamento, (2) superfície de esmalte sem nenhuma irradiação laser,mas com terapia com flúor fosfato ácido, (3) superfície de esmalte irradiada com laser de Er:YAG e (4) superfície de esmalte irradiada com laser Er:YAG e com aplicação de flúor fosfato ácido.Os resultados foram analisados através de microscopia óptica e microscopia de varredura.As mudanças morfológicas observadas ao microscópio eletrônico de varredura sugerem um aumento de resistência ácida da superfície do esmalte.Entretanto,ao microscópio óptico,ainda foi possível visualizar indesejáveis manchas brancas na superfície do esmalte.

ABSTRACT

Several researches have been demonstrating an increase in the resistance acid of the enamel surface when irradiated by some lasers types as Nd:YAG, CO₂, Er:YAG, and others, mainly when combined with the fluoride therapy after the irradiation of the laser. This study in vitro used the laser of Er:YAG which a density of energy of 8.1 J/cm² on the enamel about of brackets orthodontics of teeth extracted pré-molars. These teeth were then submitted to a rich way in *S. mutans* for twenty one days. The cases were analyzed: (1) enamel surface without any treatment, (2) enamel surface without any irradiation laser, but with therapy with acidulated phosphate fluoride, (3) enamel surface irradiated with laser of Er:YAG and (4) enamel surface irradiated by laser ER:YAG and with application of acidulated phosphate fluoride. The results were analyzed through optical microscopy and scanning electron microscopy. The morphologic changes observed to the scanning electron microscopy suggest increase in the acid resistance of the enamel surface. However, to the optical microscopy, it was still possible to visualize undesirable white stains in the surface of the enamel.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO:	1
1.1 Prevenção a carie em ortodontia	1
1.2 Cariologia	2
1.3 Fundamentos físicos da luz laser	3
1.4 Interação da irradiação da luz laser com os tecidos biológicos	9
2. OBJETIVO	15
3. REVISÃO DE LITERATURA	16
4. MATERIAL E MÉTODO	35
4.1 Material	35
4.1.1. Material utilizado para preparo das amostras	35
4.1.2. Equipamento	36
4.1.3. Meio de cultura Gibbons & Nygaard (1968)	37
4.1.4. Meio de cultura de Agar mitis-salivaris	37
4.1.5. Coloração de Gram	38
4.1.6. Material para a escala de MacFarland	38
4.2 Método	38
4.2.1. Método de preparo das amostras	38
4.2.2. Método de preparo do inóculo	40
4.2.3. Método de preparo do meio de cultura Agar mitis salivaris	42
4.2.4. Método de preparo da escala de MacFarland	42

4.2.5. Método de preparo do meio de cultura de Gibbons & Nygaard (1968)	43
4.2.6. Método de preparo e troca dos dentes da cultura:	43
4.2.7. Método de controle de culturas:	44
4.2.8. Método de coloração de Gram	44
4.2.9. Método de preparo das amostras para avaliação microscópica	45
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
6. CONCLUSÃO	57
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Processos de interação entre luz e a matéria	4
Figura 2	Interação laser-tecido	10
Figura 3	Gráfico com os principais cromóforos em relação ao coeficiente de absorção e o comprimento da onda	11
Figura 4	Gráfico dos Mecanismos de Interação Laser-Tecido	12
Figura 5	Efeito tecidual conforme a elevação de temperatura	13
Figura 6	Quatorze coroas híidas de PM	35
Figura 7	Laser de Er:YAG	36
Figura 8	Peça de mão 2055	36
Figura 9	Ponta 50/10	36
Figura 10	Coroa dos PM com os bracktes	38
Figura 11	Coroa dos PM pintadas com esmalte	39
Figura 12	Amostra autoclavada	40
Figura 13	S. mutans em meio Agar-mitis-salivarius	41
Figura 14	Jarra de Gaspack	42
Figura 15	Colônia de S. mutans	44
Figura 16	Amostra controle	52
Figura 17	Amostra com apenas terapia com flúor fosfato acidulado	52
Figura 18	Amostra que recebeu apenas tratamento por laser Er:YAG	52
Figura 19	Amostra com tratamento por laser de Er:YAG e terapia com flúor fosfato acidulado	53
Figura 20	Superfície de esmalte híida em MEV	53
Figura 21	Amostra controle em MEV	54
Figura 22	Amostra com apenas tratamento por laser de Er:YAG	54

Figura 23	Amostra com tratamento por laser de Er:YAG e terapia com flúor fosfato acidulado	55
Figura 24	Amostra com tratamento por laser de Er:YAG e terapia com flúor fosfato acidulado	55
Figura 25	Amostra com apenas terapia com flúor fosfato acidulado	56
Figura 26	Amostra com apenas terapia com flúor fosfato acidulado	56

Lista de Abreviaturas e Siglas:

Å: ângstrom

Ag(NH₃)₂F: diamino fluoreto de prata

APF: flúor fosfato acidulado

°C: grau Celsius

CaCl₂: cloreto de cálcio

Cc/min: centímetros cúbicos por minuto

Cm: centímetro

CPOD: dentes cariados perdidos e obturados

CO₂: dióxido de carbono

CW: continue wave (onda contínua)

Er:YAG: érbio diluído em granada de ítrio-alumínio

EPM: micro analisador de elétrons

HeNe: hélio-nêonio

Ho:YLF: hólmio diluído em cristal de fluoreto de ítrio e lítio

Hz: hertz

J: joule

J/cm²: joule por centímetro quadrado

LILT: low intensity laser therapy

M: mol

MEV: microscópio eletrônico de varredura

mJ: milijoule]

mm: milímetro

mM: milimol

MO: microscópio óptico

ms: milissegundo

NAF: fluoreto de sódio

Nd:YAG: neodímio diluído em granada de ítrio alumínio

Nm: nanômetro

Ns: nanossegundo

OMS: Organização Mundial de Saúde

pH: potencial hidrogeniônico

PM: pré-molar

%: porcentagem

PPM: partes por milhão

s: segundo

S. mutans: Streptococcus mutans

TEA: Transversely Excited Atmosphere Pressure

W: watt

W/cm: watt por centímetro quadrado

Λ: lambda (comprimento de onda)

>: maior

<: menor

μ: micra

μm: micrômetro

μs: microssegundo

1. INTRODUÇÃO

1.1. Prevenção à cárie em ortodontia

A ortodontia é responsável pelo tratamento de muitas disfunções do aparelho estomatognático. Entretanto, atualmente, o tratamento ortodôntico tem sido bastante procurado pela população, não só devido às alterações funcionais mas principalmente pela preocupação com a estética. Apesar de a população brasileira possuir uma cultura estética que estabelece o sorriso branco e dentes alinhados como o ideal, o Brasil ainda apresenta um dos maiores índices de CPOD (Índice de Dentes Obturados, Perdidos e Cariados) do mundo. Verifica-se, portanto, que pouca evolução ocorreu em termos de prevenção neste país. Por este motivo, os ortodontistas muitas vezes se vêem fadados a obter resultados pouco satisfatórios na manutenção da higiene oral de seus pacientes, apesar das sessões de orientação sobre higiene bucal e hábitos alimentares.

Sendo o tratamento ortodôntico relativamente longo e por promover áreas de retenção de placa e de difícil higienização, o aparecimento de manchas brancas e cáries durante o tratamento ou após a remoção do aparelho ortodôntico acaba sendo muito comum.

Julga-se então oportuno ressaltar a necessidade de buscar novas estratégias que possam auxiliar na prevenção a fim de evitar o desenvolvimento de tais lesões, tão indesejáveis ao paciente quanto ao profissional.

Algumas pesquisas nesta área têm sido realizadas com o uso do laser. Segundo a literatura, a irradiação do laser pode alterar a superfície do esmalte tornando-o mais ácido resistente, principalmente quando combinado à aplicação tópica de flúor.

Baseado nessas pesquisas, o propósito deste trabalho será avaliar *in vitro* a resistência ácida da superfície do esmalte ao redor de *brackets* ortodônticos através de Microscopia Ótica (MO) e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) de pré-molares hígidos irradiados com laser de Er:YAG combinado ou não à terapia com flúor e submetidos a um meio de cultura rico em *Streptococcus mutans*.

1.2. Cariologia:

Do ponto de vista epidemiológico, a cárie e as periodontopatias continuam a formar, junto com o resfriado comum, o grupo das doenças mais prevalentes no ser humano. Os mais recentes relatos mostram que a doença cárie afeta indistintamente homens e mulheres de todas as idades, grupos étnicos e classes sociais.

A OMS (Organização Mundial de Saúde) utiliza como critério, a média de cárie em dentes permanentes em crianças de 12 anos de idade, para determinar a condição da doença cárie nos diversos países. Este critério, denominado de índice de CPOD (Dentes Cariados, Perdidos ou Obturados), corresponde a uma provável situação, pois não consideram os sintomas da doença e suas lesões iniciais (mancha branca ativa).

Segundo a OMS o Brasil faz parte do grupo de países com as 10 maiores prevalências de cárie no mundo (Medeiros³¹, 1998). Verificando-se, assim, que a doença cárie ainda continua a merecer uma atenção destacada devido ao seu potencial destrutivo e ao fato de ainda não termos conseguido um controle efetivo.

A doença cárie dentária pode ser definida como uma doença infecciosa multifatorial cuja coleção de fatores que contribuem para a sua instalação e progressão interagem modificando o equilíbrio existente entre os elementos do esmalte dentário e o meio bucal, modulado pela saliva (Medeiros³¹, 1998). E seu aparecimento é dependente da interação de três fatores essenciais: o hospedeiro representado pelo dente e a saliva, a microbiota e a dieta (Bartieri³, 1989).

Vários microorganismos têm sido descritos como capazes de induzir a doença cárie, dos quais os principais são os estreptococos do grupo mutans, os lactobacilos e os actinomicetos. Os *Streptococcus mutans* são os microorganismos de maior potencial cariogênico, tendo a capacidade de

formar, a partir de carboidratos metabolizados, um polímero extracelular à base de glicose, denominado dextrano. O dextrano os auxiliam no processo de adesão

e permanência junto ao esmalte dentário, enquanto os estreptococos do grupo *mutans* continuam a produzir descargas ácidas que diminuem a espessura da película adquirida, impedindo a ação das forças de atração e repulsão que impediam a colonização. Os lactobacilos são considerados invasores secundários, contribuindo para o avanço das lesões cavitadas e os actinomicetos possuem uma preferência por colonizar as superfícies radiculares dos dentes.

Clinicamente, a primeira evidência da doença é a mancha branca não cavitada do esmalte. Mas até chegar a este ponto, a doença cárie causadora desta lesão, já teria causado muitas alterações microscópicas (bioquímicas e estruturais).

Após esse processo, se nada for feito para deter o avanço da doença, a zona superficial apresentará uma porosidade muito grande, incapaz de manter-se estruturada, sendo rompida, produzindo o que conhecemos como cavidade de cárie, ou lesão cavitada.

Para se determinar o risco à doença cárie do indivíduo torna-se necessário verificar uma série de fatores relacionados ao hospedeiro humano, ao agente causal e ao meio bucal.

Embora se trate de uma doença multifatorial, alguns fatores diretamente relacionados ao paciente pode ser trabalhado pelo profissional, tais como: análise da microbiota bucal, controle de placa e dieta, remineralização de lesões iniciais de cárie, adequação do meio bucal, terapia com fluoretos e “tratamento laser”.

1.3. Fundamentos físicos da luz laser

A palavra LASER é formada pelas iniciais de “Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation”. A tradução significa: Amplificação da Luz por Emissão Estimulada de Radiação.

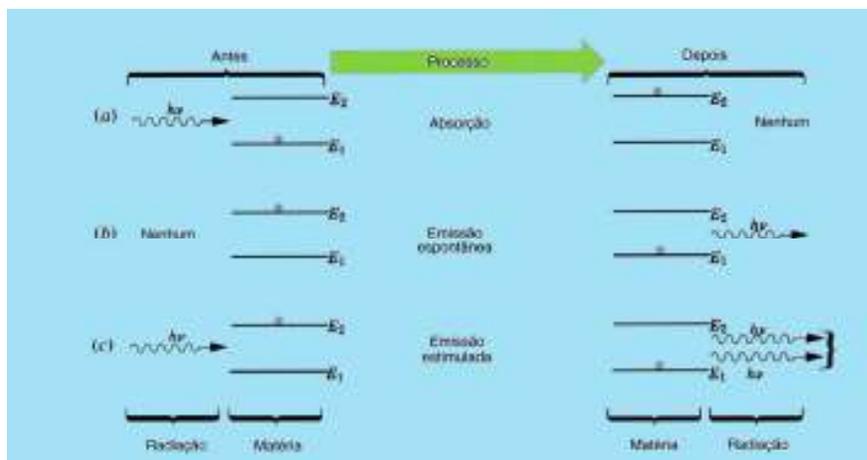


Figura 1 – Processos de interação entre a luz e a matéria (Resnick, Halliday⁵⁷ *et al*, 1996)

Para que um laser possa funcionar, devem ser satisfeitas três condições básicas. Primeiro, é necessário dispor de um meio ativo, ou seja, de uma coleção de átomos e moléculas, ou íons que emitam radiação na parte óptica do espectro. Segundo, deve ser possível a inversão de população para transformar o meio ativo em meio amplificador de radiação. E terceiro, é indispensável dispor de uma reação óptica para que o sistema, em conjunto com o meio ativo, seja a sede de oscilação laser.

Transições entre estados de energia

Segundo a mecânica quântica, o sistema atômico possui uma estrutura bem definida, estabelecida pelas órbitas dos elétrons em torno do núcleo. Essas órbitas possuem energias discretas através de valores determinados para cada átomo.

O átomo é dito em estado fundamental quando, em configuração estável, apresenta-se em estado de energia mínima. Frente à incidência de radiação, esse átomo pode absorver energia (**absorção do fóton**) e ter um de seus elétrons transitado para uma camada de energia maior, transformando-se em um átomo de estado excitado. Tal energia só é capaz de mudar o elétron de nível, caso

possua valores iguais à diferença de energia entre os níveis envolvidos, ou seja, a energia deve ser ressonante.

O átomo em estado excitado tende a voltar à sua configuração original de menor energia através do retorno do elétron ao nível fundamental, causando uma **emissão espontânea** de energia através de um fóton.

Esta emissão também possui comprimentos de onda correspondentes às diferenças de energia entre os níveis envolvidos. Apesar de os níveis serem discretos, existem infinitos comprimentos de onda que podem ser emitidos pelo átomo. Devemos lembrar que a emissão espontânea não depende da presença de nenhuma radiação.

Se incidirmos uma radiação sobre o sistema atômico em estado fundamental, este absorverá as energias ressonantes, passando para o estado excitado até o momento em que o número de elétrons em estado excitado for maior que a quantidade em estado fundamental levando ao que se denomina inversão de população.

A **emissão estimulada** é um processo no qual, em presença de um campo eletromagnético, um fóton de energia ressonante induz o átomo a emitir outro fóton com as mesmas características do fóton indutor. A emissão estimulada, descrita teoricamente por Einstein⁴ em 1917, corresponde a um átomo em presença de um campo eletromagnético, em que um fóton induz um elétron a efetuar sua transição de um estado excitado para um nível de energia inferior, emitindo outro fóton com as mesmas características do fóton indutor, como mostra a figura 1. Ocorre, assim, a amplificação de uma luz que apresenta propriedades diferenciadas, tais como: coerência temporal (dada por sua característica de monocromaticidade) e coerência espacial (presença de uma frente unifásica).

O meio ativo laser deve ser capaz de sofrer o processo de inversão de população e, conseqüentemente, em presença de energia ressonante, amplificar esta radiação. Este meio pode ser sólido, líquido ou gasoso e determina os sistemas laser.

SISTEMAS LASER

Lasers em estado sólido: São lasers que apresentam um íon laser ativo incorporado a um cristal, vidro ou cerâmica. Exemplos: laser de rubi, laser de neodímio, laser de érbio, etc.

Lasers em estado gasoso: São lasers que apresentam um gás como meio laser ativo. Exemplos: laser de hélio-neônio, laser de argônio, laser de dióxido de carbono, laser de TEA CO₂, laser de excimer, etc.

Lasers Líquidos: São aqueles que apresentam, como meio, soluções de corantes orgânicos dissolvidos em álcool etílico, álcool metílico ou água. Exemplo: lasers de corante.

Lasers de semicondutores: Nos lasers de semicondutores ou de diodo, a estrutura do nível de energia que satisfaz a condição para transição laser é encontrada por portadores de carga em um semicondutor. É um sistema extremamente compacto. Exemplos: laser de arseneto de gálio e laser de arseneto de gálio alumínio.

Mecanismos de excitação

A excitação ou bombeamento nada mais é que o fornecimento de energia ao meio ativo a fim de destruir o equilíbrio termodinâmico, criar uma inversão de população e, conseqüentemente, o predomínio da emissão estimulada sobre a absorção.

O bombeamento pode ser:

- óptico: através de lâmpadas flash, lâmpadas de arco ou um outro laser.
- eletrônico: feito por meio de descargas elétricas e feixes de elétrons.

- químico: realizado por reações químicas que irão formar moléculas diretamente em seus estados excitados, com posterior emissão de radiação laser.
- térmico: por expansão hidrodinâmica
- partículas pesadas: por feixe de íons
- radiação ionizante, etc.

Observa-se que a energia fornecida para o bombeamento é muito maior que a utilizada pelo processo de ação laser, e a energia restante é transformada em calor e deve ser eliminada através de um sistema de resfriamento pela circulação de ar ou de líquido. Por isso os sistemas lasers que necessitam de maior resfriamento para se manterem estáveis tornam-se aparelhos de grandes dimensões.

O mecanismo de excitação determina o modo de funcionamento do laser, ou seja, os lasers de emissão contínua possuem excitação de forma contínua através de descarga elétrica ou de uma fonte de emissão contínua de bombeamento óptico; já o laser pulsado é bombeado de forma pulsada por lâmpadas de *flash* por exemplo; e o funcionamento desencadeado ou destravado (*Q-Switched*) nada mais é que o laser pulsado que utiliza um dispositivo capaz de obturar ou atenuar a passagem da radiação na cavidade a fim de produzir pulsos de muito maior energia.

Ressonador óptico

A cavidade óptica ressonante ou ressonador óptico constitui-se de dois espelhos refletivos paralelos com o meio ativo colocado entre eles. Tais espelhos refletem a onda eletromagnética ressonante em múltiplas passagens de ida e volta pelo meio ativo, amplificando o campo eletromagnético. Este sistema age como um elemento altamente seletivo, pois retorna ao meio ativo em fase, uma parte do sinal óptico emitido por este. Um dos espelhos deve ser semitransparente ou conter um orifício para que a radiação laser se exteriorize da cavidade.

O interferômetro de *Fabry-Pérot* (ressonador passivo, sem o meio ativo) deve ter um comprimento determinado pela equação $L = q(\lambda / 2)$ (onde L corresponde à distância entre os espelhos, q um número inteiro qualquer e λ o

comprimento de onda desejado) para que as interferências entre as ondas sejam construtivas e permitam ressonância para tal comprimento de onda (Maillet²⁸.1999)

Quando um meio atômico submetido a um bombeamento exterior é colocado no interior dessa cavidade, transforma o ressonador de passivo em ativo, e seu comprimento deve satisfazer à relação descrita acima.

Tipos de ressonadores:

Existem vários tipos de ressonador de estruturas complexas. Aqui estão os mais comuns, formados por dois espelhos planos ou esféricos voltados um para o outro.

O ressonador de plano paralelo, ao contrário do que possa parecer, provoca uma leve curvatura na frente da onda devido a perdas por difração nas bordas dos espelhos ou do elemento ativo. Espelhos com raios de curvaturas iguais possuem a cintura do feixe no centro do ressonador. Ressonadores com um dos espelhos planos apresenta a cintura do feixe na superfície desse espelho.

A maioria dos espelhos curvos feitos para laser apresenta a outra superfície plana, assim, esse espelho comporta-se como uma lente divergente (no caso de espelhos côncavos) ao ser atravessado pelo feixe laser.

Limiar de oscilação laser

A oscilação laser tem seu início a partir do limiar de inversão mínima de população necessária para o laser funcionar, considerando o equilíbrio que se estabelece entre o ganho do ressonador ativo e a totalidade das perdas do sistema.

As perdas podem ser por dissipação, que resultam de imperfeições do conjunto meio ativo e ressonador, tais como a difração, a absorção e a difusão pelas inhomogeneidades do meio ativo, etc.; e podem ser por perdas por reflexões a nível de espelhos. Estas perdas compreendem, por um lado, as perdas por difusão nas faces dos espelhos, bem como aquelas

resultantes da absorção residual do substrato construtivo do espelho. E, para alguns ressonadores, as perdas por difração resultantes do tamanho e da forma geométrica de tais espelhos. Por outro lado, essas perdas consideram as perdas úteis devido à passagem do feixe laser através do espelho da cavidade ou “perdas de acoplamento”.

Devido aos efeitos de difração sobre as bordas dos espelhos, um feixe perfeitamente colimado não pode ser mantido com espelhos planos de dimensões finitas, levando a perdas excessivas. Para evitá-las, utilizam-se espelhos esféricos, cujo alinhamento angular é menos sensível, o que permite o confinamento quase total do feixe na cavidade. O confinamento refere-se à estabilidade da cavidade, porém leva conseqüentemente a um baixo preenchimento do ressonador.

Modos de operação

Existem dois modos fundamentais de operação laser: o contínuo e o pulsado.

Na operação contínua, a emissão se dá na forma de um feixe de potência constante, que não varia com o tempo (a inversão de população é estacionária),

O regime de emissão pulsada pode ser utilizado pela maioria das aplicações de laser. Este tipo de emissão é dirigido pelo modo de bombeamento e depende da duração média dos pulsos e de sua frequência. O laser pulsado tem duração que varia entre centenas de microssegundos e dezenas de milissegundos.

A técnica de chaveamento Q, também chamada de *Q-Switching*, permite produzir oscilações laser muito intensas e muito rápidas, chamadas de pulsos gigantes.

Outra técnica para produzir pulsos de alta energia e ultracurta duração é a técnica do *mode locking*, também chamado de travamento de modos ou modos acoplados.

1.4. A interação da irradiação da luz laser com os tecidos biológicos

Segundo Myers⁴¹ (1991), os lasers têm sido propostos para inúmeras aplicações odontológicas. Pesquisas sobre a irradiação laser sobre o esmalte tem demonstrado alterações estruturais que resultaram em uma diminuição da dissolução ácida do esmalte.

A radiação laser interage com a matéria viva através dos processos ópticos de reflexão, transmissão, espalhamento e absorção. Ou seja, ao incidir no tecido biológico, parte da luz não penetra, sendo refletida. A porção de luz que penetra no tecido, será dividida em uma parte que será absorvida, outra será espalhada e outra transmitida.

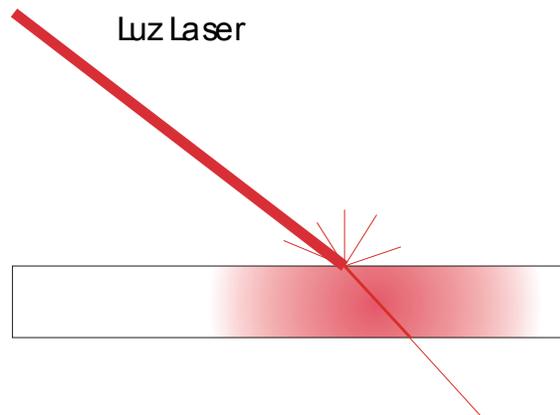


Figura 2: interação laser-tecido

Uma medida de profundidade de penetração da luz laser nos tecidos biológicos bastante usada é o comprimento de absorção, que corresponde à distância x na qual a intensidade cai para $1/e$ do seu valor de incidência (Lei de Beer). (Zezell, Maldonado e Ribeiro⁸⁰, 1999)

$$I_1 = I_0 e^{-\alpha_0 t}$$

Ao desenvolver esta fórmula da “Lei de Beer” chegamos ao resultado de trinta e sete por cento (37%) de luz transmitida, ou seja, sessenta e três por cento (63%) de luz absorvida. Outra medida de profundidade de penetração da luz conhecida é o comprimento de extinção onde noventa por cento (90%) da luz incidente já foi absorvida.

Para que a luz provoque o efeito desejado sobre o tecido vivo, é necessário que sua energia seja absorvida. E este processo só ocorrerá frente a energias ressonantes, tornando-se importante a determinação do coeficiente de absorção óptica dos vários tecidos do corpo em função do comprimento de onda.

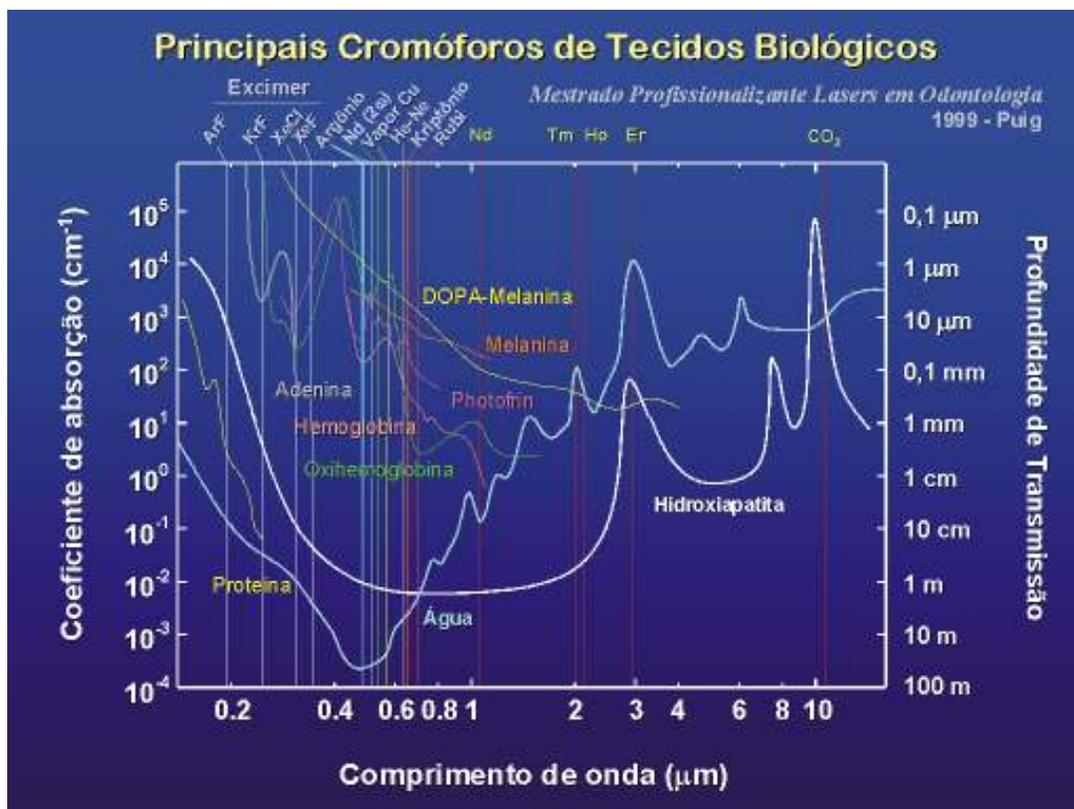


figura 3 – gráfico com os principais cromóforos em relação ao coeficiente de absorção e o comprimento de onda. (Zezell, Maldonado e Ribeiro⁷, 1999)

Uma vez que todos os tecidos do corpo humano possuem uma porcentagem de água em sua constituição, a absorção da luz pela água é de fundamental importância para as aplicações do laser nesta área. Outros elementos do tecido que exibem um alto coeficiente de absorção de um particular comprimento de onda ou por uma região do espectro são chamados de cromóforos. São eles: melanina, hemoglobina, proteínas, hidroxiapatita, etc. A figura 3 mostra um gráfico com os principais lasers na literatura com seus respectivos comprimentos de onda em relação ao coeficiente de absorção dos cromóforos.

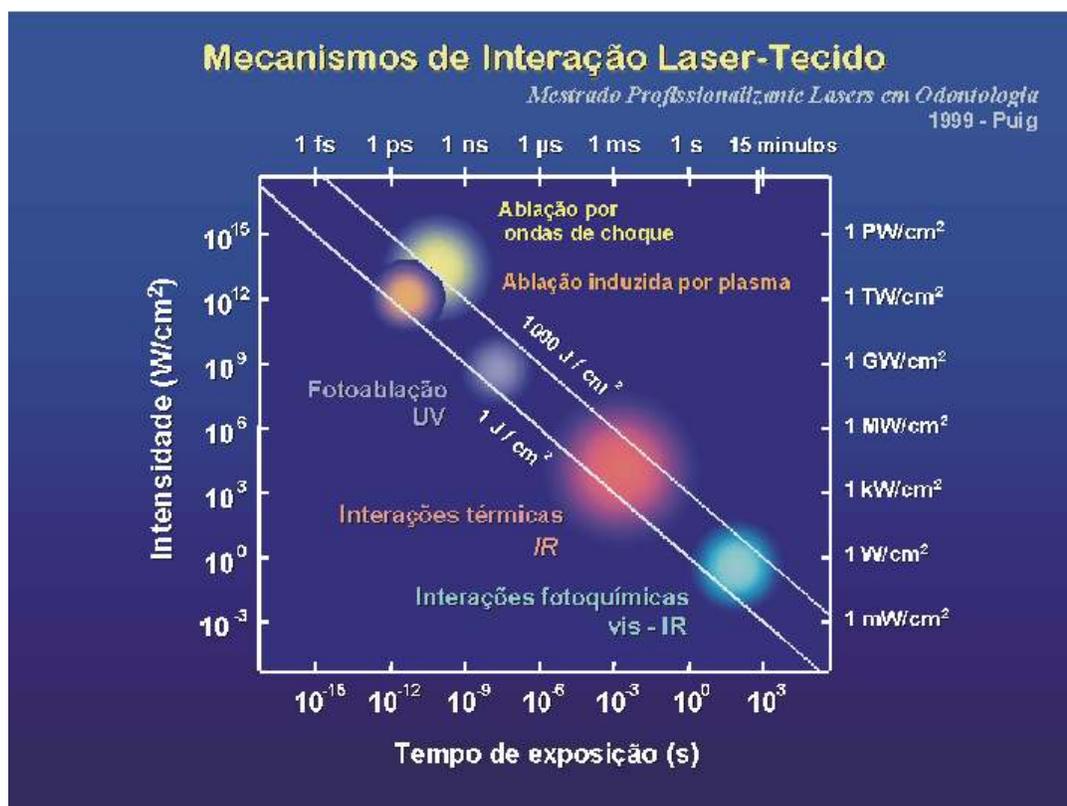


Figura 4 - Gráfico dos Mecanismos de Interação Laser-Tecido. (Zezell, Maldonado e Ribeiro7, 1999)

Os mecanismos de **interação laser-tecido** dependem das propriedades ópticas (coeficiente de reflexão, absorção e espalhamento) e propriedades térmicas (condutibilidade térmica e capacidade térmica) do **tecido**; e do comprimento de onda, energia aplicada, potência pico, área focalizada (densidade de energia e de potência) e tempo de exposição da luz **laser**.

A interação laser-tecido pode ser: fotoquímica, térmica, por fotoablação, por ablação induzida por plasma e ainda por fotodisrupção. Como mostra a figura 4.

Efeitos térmicos

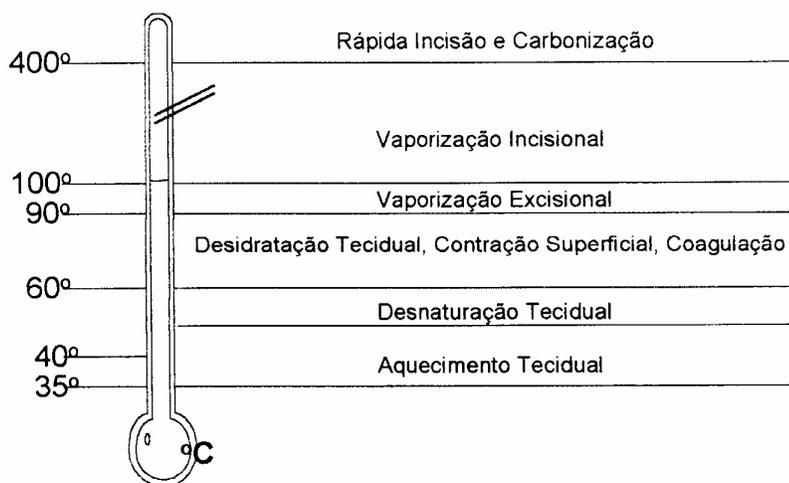


Figura 5 – Efeito tecidual conforme a elevação de temperatura. (Zezell, Maldonado e Ribeiro⁷, 1999)

Considerando os dados aferidos anteriormente e a partir de equações fundamentais da termodinâmica, definiu-se uma profundidade de penetração óptica, onde a variação de temperatura tem trinta e sete por cento (37%).

$$Z_{\text{térmico}} = \sqrt{4kt}$$

Onde k (kappa) corresponde a difusividade térmica do material e t corresponde ao tempo de exposição.

Igualando-se a profundidade de penetração óptica com a profundidade de penetração térmica defini-se um parâmetro importante que é o tempo de relaxação térmica.

$$Z_{\text{térmico}} = \sqrt{4kt}$$

Quando a duração do pulso laser é menor que o tempo de relaxação térmica, o transporte de calor é insignificante durante o pulso laser. Neste caso o efeito térmico é produzido predominantemente na região de penetração óptica.

A interação laser-tecido dentário, deve considerar que o esmalte dentário é formado por 85 a 90% de hidroxiapatita carbonada, 8 a 12% de água e 2 a 3% de lipídios e proteínas. O mineral tem uma absorção máxima em torno de $2.8\mu\text{m}$ devido a força simétrica da (OH-) em uma banda de absorção centrada em $3.0\mu\text{m}$ devido à água intersticial. A emissão do laser de Er:YAG sobrepõe a ampla absorção da água centrada em $3\mu\text{m}$. O esmalte contém apenas 8 a 12% de água, contudo, acredita-se que seja o responsável pela absorção e ablação do comprimento de onda do laser de érbio.

É geralmente aceito que a expansão sub-superficial da água seja o mecanismo primário para a indução do stress de esfoliação do esmalte mineral durante a irradiação laser de $3\mu\text{m}$. Imagens de MEV mostraram que a ablação ocorre entre as temperaturas de ponto de fusão do esmalte (1200°C). uma temperatura abaixo do limiar de ablação é desvantajoso, porque o subsequente calor transferido para o interior do dente durante a remoção de tecido é mínimo, reduzindo então o risco de dano pulpar, um risco geralmente associado a ablação laser convencional ou desgaste mecânico. A fim de evitar os efeitos térmicos (figura 5) danosos ao tecido biológico é necessário depositar uma quantidade de energia suficiente para vaporizar o volume absorvedor em menos tempo que o

calor leva para difundir-se. Assim como considerar que, altas taxas de repetição de pulsos laser promoverão um aumento cumulativo da temperatura produzindo danos ao tecido irradiado.

De qualquer maneira, o propósito do tratamento de inibição à cárie, é desejável para limitar a fluência de irradiação para um nível que não resulte em remoção tecidual, apenas uma modificação superficial.

2. OBJETIVO:

Baseados em dados de pesquisas existentes na literatura, dispusemo-nos a realizar um estudo *in vitro* sobre a resistência ácida do esmalte de dentes sujeitos a *brackets* ortodônticos frente a microorganismos acidogênicos. Nesta pesquisa foram utilizados quatorze dentes pré-molares humanos hígidos recém-extraídos, comparando grupos: controle com e sem aplicação tópica de flúor, e dentes irradiados com laser de Er:YAG com e sem aplicação tópica de flúor. Nos resultados, após vinte e um (21) dias, foi analisada por microscopia óptica (MO) e microscopia eletrônica de varredura (MEV), a possibilidade de diminuir a incidência ou mesmo a intensidade de lesões de manchas brancas do esmalte dentário.

2. REVISÃO DA LITERATURA

Conforme descrito anteriormente, a emissão estimulada que corresponde à base do funcionamento laser, foi descrita teoricamente em 1917 por Einstein¹⁰.

Em 1960, nos Estados Unidos, Maiman²⁹ desenvolve a primeira ação laser pulsada proveniente de um cristal de rubi, cujo comprimento de onda é de 69 μ m.

Quatro anos depois, em 1964, Stern e Sognnaes⁶¹ e Goldman¹⁸ *et al*, já realizavam pesquisas com o laser de rubi para preparos cavitários. Utilizando energias de 5-20 J em um grupo e 2-5 J em outro grupo e um tempo de aplicação de um milissegundo, não obtiveram o êxito esperado devido ao superaquecimento dos espécimes,. O laser de rubi causou fusão e vidrificação do esmalte dentário.

Em 1965, Goldman, Gray¹⁹ *et al*, fizeram uma experiência *in vitro* com um laser pulsado de rubi, com comprimento de onda de 6.943 Å e densidade de energia variando de 4.000 a 13.400 J/cm², obtiveram alterações significantes do esmalte irradiado com destruição profunda seletiva pelo feixe laser.

Stern e Sognaes⁶³, em 1965, realizaram um estudo *in vitro* sobre os efeitos da irradiação laser sobre os tecidos duros dentários e certos materiais restauradores. Observando crateras muito maiores em restaurações a ouro que nas superfícies de esmalte e dentina.

Desde então, os lasers têm evoluído muito. A criação de vários outros tipos de lasers, seja de meio sólido, líquido, gasoso e de semi-condutores. Assim como as pesquisas dos vários tipos de interações entre a irradiação laser e os tecidos biológicos.

A luz laser, com seus respectivos comprimentos de onda, tem sido estudada em várias áreas da odontologia, como em preparos cavitários, periodontia, redução bacteriana em condutos radiculares, bioestimulação de tecidos moles, condicionamento de esmalte, etc.

Pesquisas sobre os efeitos da irradiação a laser na resistência ácida da superfície de esmalte dentário:

Os primeiros a pesquisar os efeitos da irradiação laser sobre a superfície do esmalte dentário foram, em 1965, Sognaes e Stern⁶², que, em um estudo *in vitro*, observaram uma perda mineral bem menor dos dentes irradiados a laser comparados aos não irradiados quando expostos a um meio desmineralizante. Nesta pesquisa os autores irradiaram o esmalte dental do grupo experimental com laser de rubi a uma energia de 12 J e tempo de exposição de 500 µs. Após este procedimento os dentes foram armazenados em uma solução desmineralizante a um pH 4.5 e temperatura de 37°C. Tão logo a opacidade superficial se tornou aparente os dentes foram avaliados por micrografia de alta-resolução. Os resultados mostraram que no grupo controle a desmineralização foi do tipo subsuperficial, semelhante às cáries incipientes de esmalte. No esmalte irradiado, a perda mineral foi muito pequena devido a vitrificação do tecido superficial.

Outro estudo *in vitro* feito em 1966 por Stern e Sognnaes⁶⁴ concluiu que a irradiação laser confere um grau de permeabilidade à superfície do esmalte capaz de reduzir a desmineralização sub-superficial. O laser usado ainda era o de rubi a 12 J de energia e tempo de exposição de 500 μ s. Os dentes foram submetidos a cinco dias de solução desmineralizante a uma temperatura de 37°C. Os resultados foram avaliados através de microscopia óptica.

Em 1969, Mannerberg, Kantola e Schenin³⁰, em um estudo *in vitro* com laser de rubi, relataram que as alterações microestruturais estavam invariavelmente associadas à formação de crateras.

Em 1972, Stern, Vahl e Sognnaes⁶⁵, observando os efeitos do laser de CO₂ pulsado na ultraestrutura do esmalte, concluíram que este laser seria muito mais efetivo que o laser de rubi na redução da desmineralização do esmalte *in vitro*. Este estudo fez uso do laser de CO₂ a uma densidade de energia de 10 a 15 J/cm² sobre o esmalte de dentes íntegros.

Em 1974, Yamamoto e Ooya⁷², usando o laser de Nd:YAG pulsado a uma densidade de energia de 10 a 20 J/cm² encontraram um grau de alteração na superfície de esmalte que reduziu a desmineralização sub-superficial. O laser utilizado nesta pesquisa *in vitro* foi o de Nd:YAG *Q-Switched* com energia de 85 mJ, pulsos de 30 ns de duração, frequência de 10 Hz e diâmetro focal de 5 mm. A densidade de energia variou de 10 a 20 J/cm². Após a irradiação do laser, houve uma indução de formação de placa bacteriana artificial por um período de três dias. Os resultados foram analisados através de microscopia eletrônica de varredura. Sendo que as superfícies irradiadas a uma densidade de energia de 10 J/cm² apresentaram uma leve desmineralização e os dentes irradiados com 20J/cm² não mostraram nenhuma desmineralização quando comparados ao grupo controle.

Em 1980, analisando a permeabilidade do esmalte dental bovino, Borggreven⁴ *et al.*, usaram o laser de CO₂ com densidade de energia de 10J/cm², pulsos com duração de 1 μ s, que variavam de um a quarenta em intervalos de cerca de três segundos, a uma distância focal de 20 cm e foco de 3 mm de diâmetro. Relataram que o transporte de compostos iônicos não foi diminuído após a irradiação do laser.

Em 1980, Yamamoto e Sato⁷⁴, estudando a prevenção de cáries por irradiação de três diferentes modos de operação do laser de Nd:YAG, concluíam que o acústico-óptico *Q-switched* seria o mais efetivo na prática clínica. Em um grupo usaram o laser de Nd:YAG *Pockels cell Q-switched* com densidade de energia de 20 J/cm², pulsos de 30 ns de duração e frequência de 10 Hz, após a irradiação os dentes foram divididos em dois subgrupos: um foi exposto a placa artificial e outro funcionou como controle. Em um segundo grupo, utilizaram o laser de Nd:YAG pulsado normal em uma densidade de energia de 3.4 J/cm²/pulso, frequência de 20 Hz durante 3 minutos com uma ponta de 2.5 mm de diâmetro; os dentes deste grupo foram divididos em três subgrupos: um foi tratado com diamino fluoreto de prata, outro exposto somente ao laser e o terceiro tratado pela combinação do diamino fluoreto de prata mais a irradiação laser. O terceiro modo de operação laser usado foi pelo laser de Nd:YAG *Acousto-optically Q-switched*, com potência de 10 W, tempos de irradiação de 0.4, 0.8 e 1.2 segundos, frequência de 1.0 Hz, pulso com duração de 100ns e ponta com 3.5 mm de diâmetro; todos os dentes foram expostos a uma solução desmineralizante.

Em 1981, Tagomori e Morioka⁶⁷, utilizando um laser de Nd:YAG e aplicação tópica de fluoretos (NaF e APF), chegaram a conclusão que o uso da irradiação laser antes da terapia com flúor tivera uma eficiência maior assim como a incorporação do flúor teria sido maior com o uso do flúor fosfato acidulado.

Em 1983, Sato⁵⁸, pesquisando sobre a relação entre a dissolução ácida e a alteração histológica no esmalte irradiado, relatou que a quantidade de cálcio dissolvida e alterações na estrutura histológica da superfície do esmalte irradiado depende do aumento de temperatura ao qual esse tecido é exposto. Estas variações são explicadas, em termos, pela permeabilidade da área interna da superfície de esmalte. O autor utilizou um forno elétrico para aquecer os espécimes, sendo que as temperaturas variavam de 100 a 60°C.

Em 1984, Hargreaves e Dubiensi²⁰ usando os lasers de Nd:YAG pulsado normal, Nd:YAG *Q-switched* e CO₂ observaram uma superfície alterada pela aplicação do laser. Esta superfície quando avaliada através de microscopia eletrônica de varredura mostrou-se mais resistente à desmineralização ácida quando condicionada a ácido fosfórico à 37%.

Em 1985, Morioka, Tagomori e Tsutsumi³⁹ realizaram um experimento em hamsters. Observaram uma aumento da resistência ácida do esmalte irradiado com laser de Nd:YAG pulsado variando a densidade de energia de 10 a 50 mJ. Entretanto, em densidades de energia superiores a 15 mJ, verificaram-se alterações pulpare irreversíveis.

Em 1986, Nelson, Jongebloed e Featherstone⁴⁴, usando o laser de CO₂ pulsado, confirmaram o efeito inibitório da radiação de baixa energia do laser infravermelho sobre cáries artificiais de esmalte. Os autores utilizaram o laser de CO₂ com pulsos de 100 a 200 ns, com pulso máximo de energia de 5.0 J e frequência de 1.0 Hz, com uma ponta variando de 2 a 5 mm de diâmetro, obtendo desta forma densidades de energia que variaram de 10 a 50 J/cm². Os dentes foram armazenados em solução desmineralizante para a formação de lesões de cáries artificiais e em seguida submetidos a testes de microdureza. Através dos resultados concluíram que a irradiação por laser de CO₂ causou inibição significativa na formação de lesões de cárie, principalmente frente a densidades de energia mais elevadas.

Em 1986, Morioka, Tagomori e Tsutsumi⁴⁰ desenvolveram uma pesquisa sobre os efeitos da irradiação laser sobre a deposição de flúor no esmalte. Verificou-se que houve uma grande deposição de flúor em uma profundidade de até 100 µm quando os dentes foram expostos ao flúor fosfato acidulado após a irradiação do laser de Nd:YAG pulsado com densidade de energia de 50 J/cm².

Em 1986, Nelson, Shariati, Glana⁴⁵ *et al*, estudando os efeitos da baixa energia da irradiação de laser infravermelho (9.32, 9.57, 10.27 e 10.59 µm) sobre a formação de lesões de cáries artificiais, obtiveram significativa inibição das cáries principalmente nas mais altas energias de pulso e com o comprimento de onda de 9.32 µm.

Em 1988, Oho e Morioka⁴⁷ utilizaram os lasers de argônio e Nd:YAG e observaram que o esmalte irradiado apresenta espaços no interior de seus cristais e entre essas estruturas e que a redução do carbonato pode levar à resistência ácida devido a um aumento da cristalização do tecido. Os resultados foram analisados em microscopia de luz polarizada e espectroscopia de infravermelho. Os autores concluíram que o cálcio

liberado era incorporado e depositado nos pequenos espaços produzidos pelo laser.

Em 1988, Morioka, Tagomori e Nara³⁷ apresentaram um estudo sobre a aplicação do laser de Nd:YAG na prevenção de cáries dentárias. Eles conseguiram um resultado inédito de 90% de inibição da dissolução de cálcio e verificaram que a terapêutica com flúor fosfato acidulado obteve melhor resultado que com o fluoreto de sódio, quando combinado ao tratamento laser.

Em 1988 e 1991, Morioka e Tagomori^{34,35} realizaram um estudo *in vitro*, sobre a aplicação tópica de flúor antes e depois da irradiação do laser de Nd:YAG. Observaram uma grande redução da descalcificação ácida do esmalte e aumento da deposição do flúor no esmalte, quando o fluoreto era aplicado após a irradiação laser. Os autores utilizaram o laser de Nd:YAG pulsado com densidade de energia que variava de 0 a 100J/cm², freqüência de 20 Hz e tempo de irradiação de 0.5 segundos. A terapia a base de fluoreto de sódio a 2% antes ou depois da irradiação laser. A determinação da resistência ácida do esmalte foi pela determinação da quantidade de cálcio dissolvida da superfície do esmalte após as amostras terem sido expostas a solução desmineralizante. Além disso as amostras foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura e a distribuição de cálcio, fosfato e flúor foi determinada pelo uso de EPM. Foi notado que dos vários tratamento utilizados, com aplicação da luz laser isolada, aplicação de flúor isolada, aplicação de flúor após a irradiação da luz laser e aplicação de flúor antes da irradiação de luz laser, o que apresentou melhores resultados foi a aplicação de flúor após a irradiação laser com densidade de energia maior que 30 J/cm². por outro lado a aplicação tópica de fluoreto de sódio a 2% produziu resultados bem menos expressivos do que o uso do flúor fosfato acidulado. Ao microscópio eletrônico de varredura, foi observada a fusão do esmalte com profundidade de aproximadamente 5.0 µm, em densidades de energia maiores do que 30 J/cm², bem como a formação de fendas com profundidade variando entre 10 a 100 µm. as análises ao EPM revelaram que com a aplicação tópica de flúor fosfato acidulado após a irradiação da luz laser, houve uma grande elevação na quantidade de flúor e uma pequena elevação na quantidade de cálcio em uma profundidade de 20 µm.

Em 1990, Oho e Morioka⁴⁸ defenderam um possível mecanismo de aquisição de resistência ácida pelo esmalte dentário exposto à radiação laser,

sugerindo a formação de microespaços no interior do esmalte irradiado que manteriam presos os íons liberados pela descalcificação ácida.

Em 1990, Peters , Zakariasen, Boran⁵¹ *et al*, estudando os efeitos do laser de CO₂ pulsado e não pulsado sobre a desmineralização artificial do esmalte *in vitro*, observaram uma redução da desmineralização da camada sub-superficial do esmalte em lesões de cárie produzidas artificialmente.

Em 1991, Morioka, Tagomori e Oho³⁸ desenvolveram um estudo *in vitro* sobre os efeitos da irradiação do laser de Er:YAG em dentes cobertos de tinta preta e tinta branca obtendo melhores resultados na resistência ácida da superfície do esmalte nos dentes pintados de preto e menores danos à superfície do esmalte nos dentes pintados de branco. Neste estudo foi utilizado um laser de Er:YAG (NEC –Japan) o qual possui pulsos de 0,2ms e energia de 0,39-0,92 J/pulso. O spot foi desfocado a 3mm de distância. O esmalte dentário foi irradiado com taxa de repetição de 10, 2 e 1 pps. A superfície do esmalte foi coberta com uma tinta a prova d'água preta para examinar os efeitos da tinta. A superfície do esmalte foi coberta por um verniz exceto uma janela de 3mm de diâmetro. As amostras foram então desmineralizadas em 1ml de ácido cloroso 0,5 M por 30 segundos. A resistência ácida da superfície do esmalte foi determinada pelo cálcio dissolvido da superfície. A redução de desmineralização da sub-superfície do esmalte irradiado foi examinada por microradiografia. As amostras de esmalte foram expostas a uma solução de pH 4,5 a 37° C. depois de alguns dias de exposição, cáries artificiais foram produzidas. As superfícies de esmalte foram examinadas por MO e MEV.

Em 1991, Tagomori, Inai⁶⁸ *et al*, usando incisivos de bovinos com lesões de cárie artificiais, concluíram que o esmalte tratado com laser de Nd:YAG pulsado obteve uma maior resistência ácida e remineralização da superfície de esmalte. E ainda, os grupos tratados com flúor obtiveram uma extensão de remineralização da superfície ao fundo da lesão. O laser utilizado neste estudo foi um Nd:YAG pulsado com pulsos de 0.3 segundos com uma energia de 0.2 J por pulso. O esmalte foi irradiado com uma taxa de repetição de pulso de 20 pps, tempo de irradiação de 0.5 segundos e uma densidade de energia total de 30 J/cm². A superfície do esmalte foi coberta por tinta preta à prova d'água antes da irradiação para

aumentar a absorção da luz laser. As lesões foram novamente expostas a um ácido-gel por sete dias. A remineralização foi produzida através de um fluido contendo CaCl_2 a 2.0 mM, KH_2PO_3 a 1.2 mM a um pH de 7.0 por 14 dias a 37°C. Os resultados foram avaliados por meio de “Elétron Probe Analysis” e microradiografias.

Em 1991, Morioka, Tagomori e Inai³⁶, produziram lesões de cárie artificiais em esmalte humano e as trataram com laser de Nd:YAG e aplicação tópica de flúor fosfato acidulado. O laser de Nd:YAG foi irradiado em uma densidade de energia total de 40 mJ/cm² e taxa de repetição de 20 pps. A resistência ácida do esmalte foi determinada pela média de cálcio dissolvido da superfície do esmalte em solução ácida. A deposição de flúor foi determinada eletronicamente por uma sonda. Os resultados mostraram uma menor dissolução de cálcio além de maior deposição de flúor no esmalte cujo tratamento laser foi combinado a terapia com o flúor fosfato acidulado.

Em 1991, Shirazuka, Kodaka⁵⁹ *et al*, visando a prevenção a cáries secundárias, usaram o laser de Nd:YAG pulsado junto a aplicação tópica de flúor e também concluíram que a terapia com flúor após o tratamento laser apresentou-se mais eficiente. A potência pico utilizada foi de 1.5 W, taxa de repetição de 30 pps e tempo total de irradiação de 20 segundos. Os dentes foram então submetidos a uma solução desmineralizante de pH 4.5 por um a quatro dias. Os resultados mostraram que os grupos tratados com laser e flúor obtiveram uma maior deposição de flúor e resistência ácida quando comparada ao grupo controle.

Ainda em 1991, Myers⁴¹ revisa todos os estudos feitos até então dos efeitos da irradiação dos lasers de rubi, CO_2 , HeNe, Nd:YAG e Argônio nos tecidos orais, discutindo suas aplicações e indicações para cada uso. Comenta que os lasers têm sido propostos para numerosas aplicações dentais e também que pesquisas sobre a irradiação laser do esmalte demonstram mudanças estruturais que resultaram em uma diminuição na dissolução ácida do esmalte. Tais mudanças são a fusão e recristalização da superfície do esmalte, diminuição em sua permeabilidade por consequência da fusão, esbranquiçamento da

superfície e alterações na forma e no tamanho dos cristais de hidroxiapatita. A utilização de lasers de alta densidade de potência provoca efeitos morfológicos indesejáveis nas estruturas como fendas e rachaduras por causa da quantidade de calor produzida. Sobre a irradiação da dentina comenta que ocorre alterações na morfologia superficial a qual melhora a adesão de restaurações com resinas compostas. Outras aplicações comentadas por Myers dizem respeito à fusão da hidroxiapatita dentro das fôssulas e fissuras dentais, remoção de cáries incipientes e selamento das paredes dentinárias para procedimentos endodônticos. O autor conclui que mais estudos e pesquisas sobre o laser são necessários para que este possa ser aplicado rotineiramente na prática clínica.

Em 1992, Morioka³² em um resumo sobre as pesquisas envolvendo lasers, conclui ser o laser de Nd:YAG o mais efetivo na aquisição de resistência ácida pelo esmalte dentário humano. Afirma que os efeitos do feixe laser sobre a estrutura dentária é principalmente devido a aquisição de resistência ácida contra a descalcificação ácida do esmalte dentário. Cita que dentre os 3 fatores causais de cárie, o laser de He-Ne pode ser efetivamente usado sobre a bactéria cariogênica, o laser de Nd:YAG pode também ser usado sobre a estrutura do dente.

A superfície vidrificada do esmalte foi observada igualmente depois do condicionamento em uma solução ácida. Isto significa que a estrutura superficial do esmalte ainda persiste depois do tratamento ácido. De qualquer maneira quando a superfície de esmalte foi irradiada com uma densidade de energia de 20J/cm², a camada superficial do esmalte dissolvido pelo ataque ácido, e a estrutura terminal dos prismas de esmalte ficaram claramente evidentes. Em outras palavras, o esmalte o qual foi irradiado com densidade de energia insuficiente falharam ao mostrar resistência contra a descalcificação ácida. A aplicação tópica de fluoretos tem sido usada como um dos agentes preventivos de cárie. Nós estávamos interessados em examinar o uso do laser combinado a fluoretos para propor o desenvolvimento de um procedimento mais efetivo para prevenção de cárie. De qualquer maneira o esmalte tratado com APF antes do laser obteve muito menos resistência que o resultado do tratamento de APF depois do laser como mostra a curva média.

Em 1992, Iwase, Tagomori²³ *et al*, em um estudo *in vitro* com laser de Nd:YAG sobre fóssulas e fissuras combinada a terapia com flúor, observaram um aumento de cerca de 40% na resistência ácida do esmalte irradiado. A densidade de energia usada foi de 40 J/cm² e a avaliação feita através de microscopia eletrônica de varredura e pelo cálculo da perda de cálcio dissolvido no meio ácido. Em mãos dos resultados conclui-se que a combinação da irradiação laser com a terapia com flúor fosfato acidulado revelou um aumento da resistência ácida muito maior que a irradiação laser sozinha.

Em 1993, Morioka³³, em uma pesquisa *in vivo*, usando laser de Nd:YAG com densidade de energia de 47 J/cm², encontrou um resultado de 90% de inibição da dissolução de cálcio do esmalte nunca obtido anteriormente. A superfície vitrificada foi observada imediatamente depois da irradiação laser. Observou ainda as respostas de sensibilidade onde, dos onze (11) pacientes tratados, nove (9) sentiram uma sensação de calor durante a irradiação laser, um (1) sentiu uma dor passageira e (1) sentiu uma dor forte; e que nenhuma expansão visível da lesão foi observada durante dois (2) anos após o tratamento.

Em 1993, Powell, Yu⁵³ *et al* compararam os efeitos *in vitro* da irradiação do laser de argônio, CO₂ e Nd:YAG sobre a desmineralização do esmalte dentário e concluíram que o laser de argônio e CO₂ obtiveram uma redução significativa na desmineralização e perda de estrutura do esmalte dentário humano. A densidade de energia utilizada foi de 60-65J/cm² ou de 120-130J/cm² e a avaliação foi feita através de quantificação de perda de estrutura de esmalte perdida.

Em 1994, Rensburg e Wiltshire⁵⁶ pesquisaram os efeitos da irradiação do LILT sobre a deposição de flúor de dois materiais de cimentação ortodôntica que contêm flúor em sua composição e concluíram, através de avaliação por MEV, que a irradiação laser não mostrou nenhum efeito na estrutura física do material. A diferença de liberação de flúor dos dois materiais após a irradiação laser pode ser devido às diferenças na composição dos mesmos, mas não puderam ser explicadas.

Em 1996, Kakade, Damle²⁵ *et al*, usando o laser de CO₂ e terapia com flúor antes e depois da irradiação laser, relataram que as amostras tratadas com NaF 2% neutro após a irradiação laser causavam um extraordinário aumento na

resistência ácida do esmalte comparadas àquelas tratadas com NaF 2% neutro antes da irradiação laser.

Em 1996, um estudo *in vitro* do condicionamento da superfície dentinária com laser de Er:YAG por Tanji, Matsumoto e Eduardo⁶⁹, conclui que a irradiação por laser de Er:YAG poderia promover um aumento da resistência ao ácido na dentina remanescente, prevenindo recidivas de cárie, e que a energia de 100 mJ, densidade de energia de 14,11 J/cm² promoveria um melhor padrão de microrretenção mecânica aos materiais restauradores. Usando o laser de Er:YAG em três diferentes densidades de energia (8.46 J/cm²; 11.29 J/cm² e 14.11 J/cm²), observou-se em MEV que a densidade de energia de 14.11 J/cm² produziu maiores áreas de ablação, e que o condicionamento ácido após as irradiações provocaram o aspecto similar ao grupo controle somente em áreas onde a dentina fora removida pela ablação.

Em 1996, Fried, Featherstone¹⁶ *et al*, em uma pesquisa *in vitro* do potencial de inibição de cárie pela irradiação dos lasers de Er:YAG e Er:YSGG e concluíram que o laser de Er:YSGG ($\lambda = 2.79 \mu\text{m}$) mostrou uma efetividade maior que o laser de Er:YAG ($\lambda = 2.94 \mu\text{m}$). Inibição à cárie de 60 e 40% respectivamente. As amostras de tecido foram irradiadas em fluências que variaram de 1-50 J/cm² a uma frequência de 5 Hz. Seus resultados mostram-se de particular interesse do ponto de vista mecânico por sugerirem que altas temperatura (>1200°C) que derretem e recristalizam o esmalte formando cristais mais largos (observados após a irradiação do laser de CO₂) pode não ser necessário ao tratamento preventivo de cárie. Sugere ainda que, as alterações químicas e estruturais ocorridas, tais como a perda de água e carbonato, síntese e fusão do cristal, mudança de permeabilidade e cristalinidade do esmalte seriam as responsáveis pela resistência ácida do esmalte irradiado.

Em 1997, Featherstone, Fried e Bitten¹³, estudando *in vitro* os mecanismos de indução a laser da redução da solubilidade do esmalte dentário com quatro diferentes comprimentos de onda de lasers de CO₂ (9.3, 9.6, 10.3 e 10.6 μm), verificaram que a irradiação do esmalte dentário pelo comprimento de onda e fluência específica (9.6 μm e 4J/cm²) altera a composição química dos

cristais, decompondo o componente CO_3 e reduzindo grandemente sua reatividade. Este estudo testou a hipótese de que a irradiação laser de comprimento de onda específico é absorvido pelo mineral, convertendo eficientemente em calor na superfície causando uma decomposição térmica da hidroxiapatita carbonada do cristal de esmalte para uma forma menos solúvel. Amostras de 5X5 mm de esmalte foram irradiadas pelo laser de CO_2 pulsado com comprimentos de onda de 9.3, 9.6, 10.3 e 10.6 μm , a uma duração de pulso de 10 μs , com uma fluência de 0-6 J/cm^2 .

No 6º. Congresso Internacional de Lasers em Odontologia, realizado em 1998, Watanabe, Yamamoto⁷¹ *et al*, em seus achados *in vitro*, sugeriram que o laser de Er:YAG é adequado no tratamento odontológico preventivo por promover resistência ácida da superfície do esmalte. Neste estudo a superfície do esmalte de dentes extraídos foram irradiados por laser de Er:YAG com energia de 25, 50, 100 e 150 mJ, com irrigação com água (4 cc/min) usando modo contato. Depois estes espécimes foram submetidos a quatro dias de imersão em solução ácida pH 4.5 e seus graus de desmineralização foram avaliados através de micrografias e através de MEV.

Neste mesmo Congresso, em 1998, Luomanen, Meurman²⁷ *et al*, demonstraram a transformação da hidroxiapatita em fluorapatita pela irradiação do Laser de CO_2 e terapia com NaF . Trabalhando com densidades de energia variando entre 21 a 500 J/cm^2 , concluíram que a densidade de energia considerada ideal foi de 38 J/cm^2 .

Em 1998, Zezell, Bonk⁷⁹ *et al* utilizaram o laser de Ho:YLF em suas pesquisas *in vitro* e encontraram um aumento na microdureza do esmalte, maior incorporação de flúor pela hidroxiapatita e menor perda de cálcio quando as amostras foram expostas ao ácido. Os possíveis benefícios do laser de Ho:YLF no tecido duro está principalmente associado com seu comprimento de onda de 2,065 μm emissão absorvida pela água com profundidade rasa de penetração no tecido. Neste estudo, a proposta é investigar a possibilidade de usar o laser de Er:Tm:Ho:YLF4, com energia de 500 mJ/pulso, 250 μs de duração do pulso e diâmetro do foco de 0.2mm, para alterar as propriedades físicas do esmalte dental, que possa promover resistência contra a desmineralização do esmalte causada por bactérias cariogênicas, e por esta razão possa ser útil para prevenção de cáries dentais.

Em 1998, Nagai, Fukuda⁴² *et al* utilizaram o método de prevenção à cárie baseado em tratamento com laser de Nd:YAG combinado a terapia com fluoreto para cáries de raiz durante o tratamento de doenças periodontais.

Em 1998, Pelino⁵⁰ *et al* pesquisaram as características ultraestruturais do esmalte dentário humano irradiados com laser de Nd:YAG pulsado e posterior permanência por 15 e 21 dias em meio de cultura contendo *S. mutans*. Neste estudo os autores utilizaram três diferentes parâmetros do mesmo laser de Nd:YAG. O grupo 1 com densidade de energia de 83.75 J/cm², o grupo 2 com 166.25 J/cm² e o grupo 3 com 187.50 J/cm². Os resultados foram analisados por microscopia óptica e eletrônica e concluíram que a irradiação do laser de Nd:YAG promoveu fusão e recristalização do esmalte, rearranjo dos cristais desta superfície, diminuindo a solubilidade da mesma, e conseqüentemente diminuição da dissolução de cálcio frente ao meio desmineralizante de *S.mutans*.

Em 1998, Cecchine, Pelino e Zezell⁶, realizaram uma pesquisa envolvendo tratamento laser com Nd:YAG (a uma energia de 80 mJ, frequência de 15 Hz e densidade de energia de 99.5 J/cm², terapia com flúor fosfato ácido e permanência por 15 a 21 dias em cultura com *S. mutans*. Através de microscopia eletrônica de varredura observaram fusão e recristalização do esmalte dentário em todos os grupos que receberam irradiação laser, maior resistência no grupo tratado com laser e flúor e nenhuma cavitação ou *melting* parcial foram observados nas superfícies tratadas com laser e submetidas a cultura com *S. mutans*. Nestas superfícies foi observada uma diminuição na solubilidade do esmalte.

Em 1998, Zennyu, Shiraishi⁷⁸ *et al* realizaram uma pesquisa *in vitro* sobre a influência da direção de irradiação sobre o tecido de laser de Er:YAG e observaram somente diferenças morfológicas em esmalte e não no tecido dentinário. Usando o laser de Er:YAG a uma energia de 180 mJ e 10 pps de taxa de repetição com 10 segundos de duração para o esmalte e 2 segundos para a dentina, alterando a direção de incidência da irradiação da luz laser.

Em 1999, Phan, Fried e Featherstone⁵², em uma pesquisa testando a hipótese de que a irradiação por laser de CO₂ (com 2 μs de tempo de duração do pulso e 1 J/cm² de fluência), inibe a dissolução ácida do esmalte por meio da transformação da hidroxiapatita carbonada em fluorapatita, encontraram um resultado de redução de dissolução do esmalte de 49% no grupo tratado com

flúor, 73% no grupo tratado com laser e 87% no grupo com tratamento combinado de laser com flúor.

Em 1999, Fried, Murray¹⁵ *et al*, em um estudo sobre o laser de TEA CO₂ na remoção e modificação do tecido duro dental observaram várias vantagens em relação a diminuição de calor transmitido e conseqüente risco ao tecido pulpar. Lasers TEA convencionais produzem um pulso laser com 100-200 ns. A duração do pulso é bem equilibrado para 1-2 μ s de tempo de relaxação térmica da energia laser depositada de 9.6 μ m e efetivamente aquece o esmalte para temperaturas necessárias a modificação superficial para a prevenção de cárie em fluências absorvidas de menos que 0.5 J/cm², então, reduzindo marcadamente a deposição de calor no dente e o risco correspondente a necrose pulpar do calor excessivo acumulado. De qualquer maneira, a altas fluências a alta potência pico do avançado chaveamento rapidamente inicia um plasma que reduz marcadamente a taxa e eficiência de ablação, dificilmente limitando a aplicabilidade para ablação em tecido duro. Pela desprezível força do pulso para reduzir a energia distribuída no inicial 100-200 ns do pulso laser, o plasma formado pode ser aumentado o suficiente para aumentar a taxa de ablação por ordem de magnitude. Isto resulta na pratica e eficiente sistema laser de CO₂ para ablação de cáries dentárias e modificação de superfície.

Em 1999, Eguro, Maeda¹¹ *et al* pesquisando as alterações do esmalte frente a irradiação por laser de Er:YAG verificaram uma alteração do esmalte dentário humano semelhante a um parcial derretimento do mesmo em dez disparos de irradiação. Esta pesquisa usou o laser de Er:YAG a 300 mJ de energia, frequência de 1 Hz, distância focal de 12mm. As observações por MEV mostraram que a superfície da cratera do esmalte irradiado por 10 tiros foi parcialmente derretido.

Em 2000, Anderson, Ellis¹ *et al*, em um estudo *in vitro* com Laser de Argônio e terapia com flúor observaram um significativo aumento na resistência do esmalte no tratamento combinado de laser de Argônio com terapia com NaF 2.0%. Este estudo utilizou o laser de Argônio à fluência de 11.5J/cm² e irradiação por 10 segundos.

Em 2000, Hossain, Nakamura, Kimura²² *et al* realizaram uma investigação *in vitro* para avaliar os efeitos da irradiação do laser de Er:YAG na aquisição de resistência ácida dos tecidos duros dentário hígidos para a formação de cáries

artificiais por espectrofotômetro, e a ultraestrutura da área irradiada foi investigada por MEV. Utilizando um laser de Er:YAG para irradiar amostras de esmalte e dentina de 20 molares com energia de pulso de 400mJ com e sem irrigação. As amostras foram submetidas a 2 µL de 0.1M de solução de ácido láctico (pH4.8) por 24 horas a 36°C. As partes por milhão (ppm) de íons Ca dissolvidos em cada solução foi determinada por espectrofotometria atômica de absorção e as alterações morfológicas foram investigadas por MEV. Seus resultados mostraram que a menor média de íons calcio ppm foi encontrada na amostra irradiada sem irrigação. Desta forma os autores concluíram que seus resultados sugeriram que a irradiação de laser de Er:YAG com e sem irrigação parece ser mais efetivo na prevenção de cáries.

Outro estudo, de Yu, Kimura e Kinoshita⁷⁶ agora com o Er, Cr:YSGG, ainda em 2000, sobre alterações morfológicas no esmalte e dentina *in vitro*. Usando fatias de 3mm de molares permanentes extraídos irradiados por laser de Er, Cr:YSGG com irrigação a 6.0W e 20Hz por 5 segundos para o esmalte e 5.0W e 20Hz por 5 segundos para a dentina. Os resultados mostraram áreas de ablação com paredes lisas e nenhum derretimento ou carbonização das amostras concluindo este laser ser bastante efetivo para o corte do tecido sem carbonização.

Em 2001, Yokohama, Kimura, Kinoshita⁷⁵ *et al* realizaram um estudo a fim de avaliar as alterações morfológicas da superfície de dentina irradiada pelo laser de Er,Cr:YSGG em combinação ou não com solução de Ag(NH₃)₂F a 38% através de MEV. Utilizando como amostras, dez dentes molares humanos extraídos verticalmente bissecionados, e um lado da superfície cortada foi coberta por solução de Ag(NH₃)₂F a 38% e o outro lado foi irradiado com laser de Er,Cr:YSGG (Millenium) a um parâmetro de 2W e 20Hz depois cobertos por solução de Ag(NH₃)₂F a 38%. Os resultados mostraram que as superfícies dos dentes do grupo irradiados a laser mostraram maior deposição de componentes de prata em comparação com o grupo de só solução de Ag(NH₃)₂F a 38%. Os túbulos dentinários do grupo irradiado a laser foram obliterados com componentes de prata fundidos. Assim os autores concluíram que o método de irradiação com laser de Er, Cr:YSGG depois de cobrir com solução de Ag(NH₃)₂F a 38% sobre a superfície de dentina mostraram uma maior efetividade no tratamento sobre prevenção de cárie e dentes fraturados em comparação ao tratamento de solução de Ag(NH₃)₂F a 38% somente.

Em 2001, Quinto Jr, Oliveira, Wetter⁵⁴ *et al*, realizaram um estudo *in vitro* sobre a re-solidificação do esmalte após a irradiação pelo laser de diodo a um comprimento de onda de 960nm. Os autores utilizaram 6 W de potência pico, 10ms de duração de pulso, diferentes ciclos e 340microns de diâmetro da fibra em modo contato. A morfologia das amostras foram analisadas por MEV e seus resultados mostraram uma homogeneidade na camada re-solidificada de esmalte, concluindo que altas potências do laser de diodo pode promover fusão da superfície de esmalte.

Em 2001, Tanous, Vieira, Pelino⁷⁰ *et al*, estudando as alterações morfológicas superficiais do esmalte e cimento dentário humano após a irradiação de laser de Er:YAG em diferentes ângulos. Os resultados foram avaliados através de MEV e mostraram que há uma grande variação nas características da interação laser-tecido em função da alteração do ângulo de incidência do feixe laser.

Em 2001, Zezell, Boari e Eduardo⁸¹, avaliaram clinicamente a eficiência do laser de Nd:YAG associado com flúor fosfato acidulado na prevenção de cáries em fôssulas e fissuras de crianças entre 7-12 anos. As condições de irradiação foram as seguintes: 60mJ de energia por pulso, 10Hz de frequência, 300mm de fibra óptica em modo contato resultando uma densidade de energia de 84.9J/cm². depois de um ano de controle os resultados mostraram diferenças significante estatisticamente (p<0.01) entre o grupo tratado a laser e flúor fosfato acidulado em relação ao grupo que não submeteu-se a irradiação do laser de Nd:YAG.

Em 2001, Strefezza, Bachmann, Bauer⁶⁶ *et al*, em um estudo prévios *in vitro*, demonstraram que o laser de Ho:YLF é capaz de induzir alterações químicas e físicas sobre a superfície dental para prevenção à cárie. A alteração de temperatura na câmara pulpar foi primeiramente avaliado *in vitro* para determinar as condições limites de energia de irradiação. O propósito deste trabalho foi para verificar a ocorrência de inflamação pulpar sob aquelas condições de irradiação em coelhos. Dez coelhos (NZB) foram divididos em 5 grupos de acordo com o período de sacrifício (controle, imediatamente após a irradiação, 6, 24 e 72 horas após a irradiação). A região posterior dos dentes dos coelhos foram irradiados com 10 pulsos de um protótipo de laser de Ho:YLF operando a 0.5 Hz e 300mJ/pulso no lado esquerdo e 500mJ/pulso sobre o lado direito. Após os sacrifícios, as amostras foram preparadas para análise

patológica. A monitoração da temperatura *in vitro* revelou um aumento de 1°C para energia de 300mJ e 4.5°C para energia de 500mJ. A análise em MEV mostrou que ocorreu fusão e re-solidificação. Para a análise *in vivo* é possível concluir que houve um baixo grau de inflamação para as mais altas energias e nenhuma alteração pulpar para as mais baixas.

Em 2001, Rajab, Tilfah e Ali⁵⁵, em uma pesquisa para avaliação do potencial preventivo de cárie dos vários parâmetros do laser de CW CO₂, e para explorar os efeitos da densidade de potência do laser e o tempo de exposição sobre a inibição da atividade de cárie usaram dentes pré-molares extraídos irradiados com três diferentes densidades de potência 7.95, 15.9 e 31.8 W/cm² para três diferentes tempos de exposição 0.2, 0.4 e 0.8 s de laser de CW CO₂ (10.6µm). todos os dentes foram submetidos a formação de lesões de cárie por ácido láctico a pH 3.5 por 21 dias. Os dentes depois disso foram seccionados e a profundidade da lesão foi medida usando um microscópio graduado. Seus resultados demonstraram que o tratamento preventivo do laser de CW CO₂ inibiu a progressão de lesões artificiais de cárie acima de 44%. E suas conclusões foram: 1. menor tempo de exposição do laser de CW CO₂ resulta em uma significativa diminuição na formação de cáries artificiais. 2. o efeito de inibição depende da densidade de potência e do tempo de exposição do feixe laser. 3. o melhor parâmetro laser para a proposta inibição de cárie foi achado com aproximadamente densidade de potência de 30W/cm² e tempo de exposição de 0.2 segundos.

Em 2001, Ferreira e Zezell¹⁴, avaliando os efeitos da irradiação do laser de Nd:YAG pulsado (1064nm) sobre a fusão da hidroxiapatita e pó de esmalte. Por este comprimento de onda do feixe laser não ser bem absorvido por estes dois componente, foram misturados ao carvão vegetal para aumentar a absorção da irradiação laser. Quinze amostras de esmalte foram cobertas com 3 diferentes substâncias: 1. hidroxiapatita misturada com carvão vegetal (3:1 em peso); 2. esmalte em pó misturado com carvão vegetal (3:1) 3. carvão vegetal. Superfícies lisas foram usadas para determinar a fusão da hidroxiapatita e do esmalte em pó. Todas as amostras foram irradiadas com laser de Nd:YAG com os seguintes parâmetros: 80mJ, 15Hz, 1.2W, 100ms, 131J/cm². E o feixe laser foi dirigido às amostras através de uma fibra óptica de 300mm em modo contato. A morfologia

das superfícies irradiadas foram examinadas por MEV e os resultados demonstraram que os componentes hidroxiapatita e esmalte em pó foram fundidos à superfície de esmalte.

Em 2001, Antunes, Rossi, Salvador², *et al*, em um estudo *in vitro* avaliando o uso do laser de Nd:YAG *Q-switched* no tratamento preventivo à cárie. Os autores utilizaram trinta amostras de esmalte dentário humano foram divididas em 2 grupos. O laser usado emitia em 1064nm de comprimento de onda, energia de 73 mJ por pulso e 10ns de duração de pulso. Analisados, os resultados obtidos foram consistentes com outros estudos e indicaram maior proporção de Ca/P no grupo irradiado em comparação com o grupo não irradiado. O presente estudo sugere que o uso do laser de Nd:YAG *Q-switched* na superfície de esmalte contribui ao aumento de dureza e diminui a perda mineral pelo ataque ácido da bactéria.

4. MATERIAL E MÉTODO

4.1. Material

4.1.1. Material utilizado para preparo das amostras:

- 14 dentes pré-molares humanos com as faces vestibulares e linguais hígidas, extraídos por indicações ortodônticas. Como mostra a FIG. 6.
- soro fisiológico
- *Brackets* para pré-molares
- Ionômero de vidro OrthoFuji
- escovas de Robson
- pedra pomes S.S.White.
- Flúor fosfato ácido a 1.23% da S.S.White
- Ponta diamantada nº. 3215
- Esmalte de unha vermelho
- Fio dental
- Placas de Petri
- Papel manteiga



Figura 6- coroas de quatorze dentes pré-molares hígidos

4.1.2. Equipamento

- Laser de Er:YAG, modelo KaVo Key (KaVo Co- Biberach – Alemanha), emitindo em comprimento de onda de $2,94 \mu\text{m}$, energia por pulso ajustável entre 60 e 500 mJ, taxa de repetição ajustável entre 1 a 15 Hz e duração de pulso variável de 250 a 500 μs , apresentado na FIG.- 7. Possui um sistema de resfriamento tecidual através de um fino jato de água destilada ou deionizada. Um laser de diodo com comprimento de onda de 635 nm (vermelho) age como feixe guia do feixe principal de Er:YAG, cujo comprimento de onda não se localiza dentro do espectro visível. Seu sistema de entrega de feixe é através de fibra óptica à qual pode ser acoplada três tipos de peça de mão. A peça de mão escolhida para esta pesquisa foi a 2055 com a ponta 50/10, apresentada na FIG. 8 e FIG. 9, respectivamente.
- óculos de proteção específico ao comprimento de onda do laser de Er:YAG.
- Equipo e caneta de alta rotação Kavov
- Caneta de baixa rotação e contra ângulo Kavov





Figura 8 - Peça de mão KaVo 2055 para Endodontia e Cirurgia



Figura 9 - Ponta 50/10 - comprimento 10 mm (3 anéis)

Figura 7 – Laser de Er:YAG modelo KavoKey

- Autoclave
- Estufa a 38°C

4.1.3. Meio de cultura Gibbons & Nygaard⁵⁸ (1968): cujos componentes apresentam-se na tabela 1

Trypticase Soy Broth	80 g
NaCl (cloreto de sódio)	8.0 g
K ₂ HPO ₄ (Fosfato de Potássio Dibásico)	12.0 g
K ₂ H ₂ PO ₄ (Fosfato de Potássio monobásico)	2. 8.0 g
K ₂ CO ₃ (Carbonato de Potássio)	1.0 g
MgSO ₄ (Sulfato de Magnésio)	480 mg
MnSO ₄ (Sulfato de Manganês)	60 mg
Sacarose	200 g
Água destilada	1000ml

Tabela 1 – Componentes do meio de cultura Gibbons & Nygaard⁵⁸ (1968)

4.1.4. Meio de cultura de ágar mitis-salivaris (Jorge⁵⁹,1995): cujos componentes são apresentados na tabela 2.

triptose	10.0
proteose peptona nº. 3	5.0
proteose peptona	5.0
glicose	1.0
sacarose	50.0
fosfato dipotássico	4.0
azul trypan	0.075
violeta cristal	0.0008
agar	15.0

Tabela 2 – componentes do meio de cultura específico para S.mutans (agar mitis-salivarius)

4.1.5. Coloração de Gram

Lâminas de vidro para microscopia

Violeta de Giemnsa

Lugol

Álcool

Fuccina

4.1.6. Material para a escala de MacFarland:

solução de cloreto de bário a 1%

solução de ácido sulfúrico a 1%

pipetas

10 tubos de ensaio

4.2. Método

4.2.1. Método de preparo das amostras:

Os dentes extraídos foram mantidos em soro fisiológico com trocas semanais. Tiveram suas coroas separadas da raiz com o auxílio de pontas

diamantadas nº.3215 em alta rotação no sentido méso-distal. A profilaxia foi feita através de escovas de Robson e pasta de pedra pomes e água e, posteriormente, lavados e secos com uma seringa tríplice.



Figura 10 – Coroa de pré-molar com os *brackets* fixados por lingual e vestibular

Na superfície vestibular e lingual de cada dente foi fixado um *bracket*, através do ionômero de vidro OrthoFuji, como mostra a FIG.10.

Os dentes tiveram sua face vestibular irradiada com laser de Er:YAG numa área de aproximadamente um milímetro ao redor do *bracket*. Foi utilizada uma energia por pulso de 80 mJ, frequência de 4 Hz, com a peça de mão 2055 com a ponta 50/10 em modo desfocado em aproximadamente 2 mm, a uma densidade de energia aproximada de 15J/cm² (calculada por uma atenuação da fibra de 25% e considerando a mesma área pela mínima divergência do feixe de irradiação*).

Todos os dentes foram então cobertos com um esmalte de unha de cor vermelha deixando uma janela de aproximadamente um milímetro ao redor do *bracket*., como pode ser observado na FIG.11.

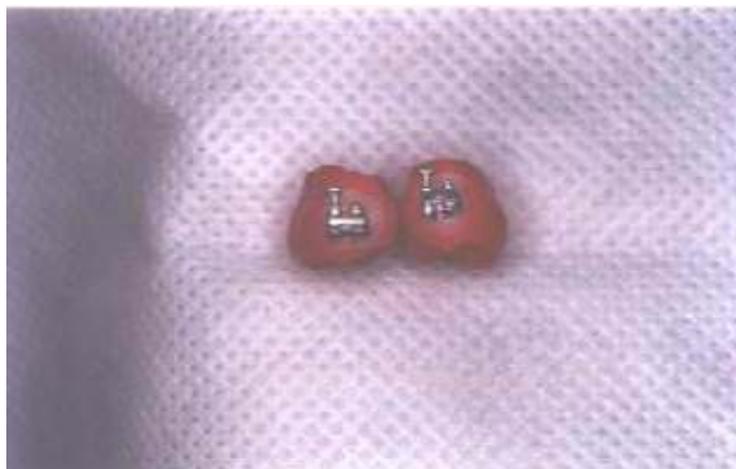


Figura 11 – coroas dos dentes já pintadas com o esmalte de unha

Sete (07) dentes receberam tratamento com Flúor Fosfato Acidulado a 1.23% durante quatro (04) minutos e depois foram lavados com seringa tríplice durante um (01) minuto.

(*) Comunicação privada com o Prof. Dr. Niklaus Ursus Wetter.

Em cada dente foi amarrado um fio dental no *bracket* vestibular e outro no *bracket* lingual, a fim de facilitar sua manipulação de um meio para outro e para mantê-lo em uma mesma posição. Os dentes foram então acondicionados em placas de Petri forradas com papel manteiga e, esterilizados em autoclave por vinte (20) minutos a 121°C e uma atmosfera. Na FIG.12, é possível visualizar bem o dente dentro da placa de Petri, com os fio dentais amarrados aos *brackets*.



Figura 12 – o espécime autoclavado individualmente em placas de Petri forradas com papel manteiga

4.2.2. Método de preparo do inóculo (cultura mãe)

A linhagem de *Streptococcus mutans* ATT foi repicada (0.1ml) em diferentes meios de culturas de estoque: dois tubos com 10 ml de meio de cultura de Gibbons & Nygaard⁵⁸ e duas (02) placas de agar-mitis-salivarius. Todas essas culturas foram incubadas a 37°C por 48 horas, sendo que um dos tubos foi cultivado em aerobiose e o restante em anaerobiose. O cultivo em anaerobiose foi realizado através de uma jarra de Gaspak (Koneman, Allen⁶⁰, 1986), (mostrada na FIG.14) onde o oxigênio é removido por intermédio de uma reação química entre o hidrogênio e um catalizador. No caso foi utilizado o ácido clorídrico e cloreto de sódio. A FIG.13 mostra o crescimento da cultura de *S. mutans* depois de 48 horas em anaerobiose em meio de agar-mitis-salivarius.

Os dentes foram divididos em dois grupos como mostra a tabela 3.

	tratamento	controle
Grupo 1: sete dente sem terapia com flúor.	face vestibular com irradiação de laser de Er:YAG a uma energia por pulso de 80 mJ,	face lingual sem irradiação laser

	freqüência de 4 Hz	
Grupo 2: sete dentes com terapia com flúor.	face vestibular com irradiação de laser de Er:YAG a uma energia por pulso de 80 mJ, freqüência de 4 Hz	face lingual sem irradiação laser

Tabela 3 – Divisão dos grupos de tratamento

Figura 13 – Cultura do *S.mutans* em meio de agar-mitis salivarius

4.2.3. Método de preparo do meio de cultura agar mitis salivarius

Suspender 90 g em 1000 ml de água destilada. Aquecer até a fervura para dissolução completa. Esterilizar em autoclave por 15 minutos a 121°C. após esfriar a 50-55°C. adicionar 1 ml de Telunito de potássio a 1%.



Figura 14 – Jarra de Gaspack

4.2.4. Método de preparo da escala de MacFarland:

Selecione dez tubos de diâmetro uniforme e adicione 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9 e 1,0 ml de solução de cloreto de bário a 1%. A seguir complete 10,0 ml com solução de ácido sulfúrico a 1%. Obtém-se deste modo, uma escala de turbidez correspondente a quantidade de sulfato de bário formado. Esta escala pode ser comparada a concentração bacteriana de estafilococos, estreptococos, neisserias e enterobactérias.

4.2.5. Método de preparo do meio de cultura de Gibbons & Nygaard¹⁷ (1968):

Este meio de cultura foi confeccionado através da diluição dos componentes do meio de Gibbons & Nygaard¹⁷ (1968) conforme a tabela 1 em 1000mL de água destilada, sendo renovado a cada semana. Após sua manipulação, meio era dividido em tubos de ensaio com 10mL cada, fechados com um chumaço de algodão, autoclavados e mantidos em geladeira.

4.2.6. Método de preparo e troca dos dentes em cultura:

Depois de esterilizados, quinze tubos contendo o meio de Gibbons & Nygaard¹⁷ foram semeados com 0,1mL da cultura mãe (item 4.2.2), a qual apresentava, em torno de 10^7 células de *S. mutans*, cuja a concentração era aferida de acordo com a escala de turbidez de McFarland (item 4.2.4) , e a colocação de um dente em cada tubo. Um tubo era mantido sem o dente para que funcionasse como cultura mãe, com o mesmo crescimento bacteriano. Os tubos eram então colocado em anaerobiose através da Jarra de Gaspack e mantidos em estufa a 37° C por 48 horas.

Após este período e antes de cada troca, primeiramente era feito um esfregão em lâmina do tubo n°. 15 (cultura mãe), e verificada através de coloração de Gram (item 4.2.8.) se esta cultura não havia sido contaminada por outro microorganismo, e confirmada a sua pureza os dentes eram então trocados de tubos com novo inóculo, a fim de fornecer substrato a bactéria e a manutenção da produção de ácido pelas mesmas (Soet⁶⁰ *et al*, 1996).

Estas trocas a cada 48 horas foram realizadas até um período de 21 dias. Quando então os dentes foram preparados para análise me microscópio óptico e microscópio eletrônico.

4.2.7. Método de controle das culturas:

A cada troca, foi realizado um esfregaço em lâmina de cada meio dispensado, para então receberem a Coloração de Gram (item 4.2.8.) e serem analisadas ao microscópio de imersão num aumento de 1000x para a verificar a presença de somente *S. mutans* . Se houvesse outro tipo de bactéria a amostra teria que ser dispensada.

4.2.8. Método de coloração de Gram

Este esfregaço foi realizado através de uma alça de platina flambada e sua fixação através da chama. Depois de esfriar realizamos a coloração de Gram que consiste em: cobrir o esfregaço com o corante violeta de Giemnsa durante 1 minuto e em seguida, escorrer e acrescentar a solução de lugol por um minuto, escorrer novamente, diferenciar com álcool por quinze segundos, lavar em água corrente, corar com fuccina por trinta segundos, lavar em água corrente, secar e observar em microscópio óptico.

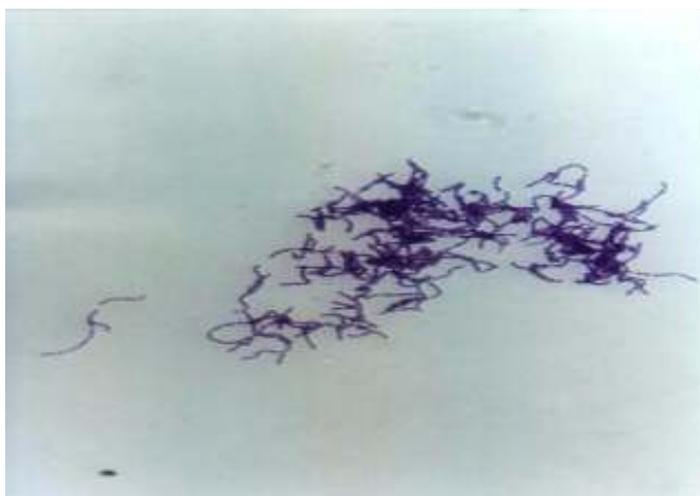


Figura 15 – Colônia de *S. mutans* corada por coloração de Gram em 1000x de aumento em M.O.

4.5. Método de preparo das amostras para avaliação microscópica

As amostras foram retiradas do meio de cultura e limpas cuidadosamente para a remoção do esmalte de unha. Uma pequena frenestração através de ponta diamantada foi feita a fim de auxiliar na localização da área desejada à visualização por microscópio eletrônico.

A seguir os espécimes foram fixados em bases metálicas (*stubs*) por uma cola de carbono e , após sua secagem total receberam uma cobertura de ouro (*sputtering*), em um aparelho metalizador (BALZERS SCD-030).

Após estes procedimentos as amostras foram então visualizadas em Microscópio Eletrônico de Varredura (PHILIPS SEM -050) a um aumento padronizado de 1000x. Realizamos fotos da superfície de esmalte que não havia recebido nenhum tratamento e das superfície de esmalte dos grupos anteriormente relacionados.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Estudos prévios têm demonstrado os efeitos da irradiação laser sobre a superfície do esmalte dentário em aumentar a resistência ácida através de alterações morfológicas capazes de diminuir a dissolução do esmalte frente a ataques ácidos. Os primeiros estudos sobre os efeitos da irradiação laser sobre a superfície do esmalte dentário foram de Sognaes e Stern^{61,62} (1965 e 1966) e Mannerberg, Kantola e Schenin³⁰, (1969) utilizando o laser de rubi.

Vários tipos de lasers têm sido estudados usando método *in vitro* e soluções desmineralizantes. O laser de Nd:YAG é aquele que apresenta maior número de pesquisas nesta área de prevenção, como relatados nos estudos de Yamamoto e Ooya⁷² (1974); Yamamoto e Sato⁷³ (1980); Tagomori e Morioka⁶⁷(1981); Morioka, Tagomori e Tsutsumi⁴⁰(1986); Morioka, Tagomori e Nara³⁷ (1988); Morioka e Tagomori^{34,35} (1988 e 1991); Morioka, Tagomori e Inai³⁶(1991); Shirazuka, Kodaka⁵⁹ *et al* (1991); Morioka³²(1992); Iwase, Tagomori²³ *et al* (1992); Cecchine, Pelino e Zezel⁶(1998) e Pelino ⁵⁰ (1998).

Os lasers de CO₂, argônio e hólmio também têm sido descritos como eficazes na prevenção de cárie pelo aumento da resistência ácida do esmalte. Luomanen, Meurman²⁷ *et al* (1998); Anderson, Ellis¹ *et al* (2000), Zezell, Bonk⁷⁹ *et al*(1998).

Assim como, em muitos estudos anteriores que pesquisaram sobre a aquisição de resistência ácida pelo esmalte dentário através da irradiação da luz laser (Sognaes e Stern⁶², 1965; Stern e Sognaes⁶⁴, 1966; Peters , Zakariasen, Boran⁵¹, 1990; Morioka, Tagomori e Inai³⁶, 1991; Tagomori, Inai⁶⁸ , 1991; Zezell, Bonk⁷⁹ *et al* , 1998; Pelino⁵⁰ *et al* ,1998; Cecchine, Pelino e Zezell⁶, 1998; Anderson, Ellis¹ *et al*, 2000; Hossain, Nakamura, Kimura²² *et al*, 2000, Yokohama, Kimura, Kinoshita⁷⁵ *et al*, 2001) foi utilizado um meio desmineralizante para provocar cáries artificiais, que no caso específico deste trabalho foi usado o meio de Gibbons & Nygaard¹⁷, 1968 (Yamamoto e Sato⁷³ , 1980, Pelino⁵⁰ *et al*, 1998; Cecchine, Pelino e Zezell⁶, 1998) inoculado com *S.mutans*.

Com o intuito de verificarmos a acidez do meio de cultura Gibbons & Nygaard¹⁷ (1968) utilizado nesta pesquisa, aferimos o pH do meio de cultura ainda sem a inoculação do *S.mutans*, porém já autoclavado e encontramos o valor de pH7, e após a inoculação pudemos observar uma queda para pH4.3. O que evidencia a grande acidez do meio em que iriam ficar expostos os espécimes. Assim como Pelino⁵¹ (1998), a verificação da presença exclusiva dos *S.mutans* nos meios de culturas contendo os espécimes foi muito importante para definirmos a causa direta deste baixo pH de 4.3. Através de repetidas lâminas de Gram de cada meio-espécime pudemos controlar esta cultura, como mostra a FIG. 15.

A escolha do ionômero de vidro para a fixação dos *brackets*, também não foi por acaso, , pois estudos comprovam a sua ação inibitória de cárie pela liberação de íons flúor deste material para a estrutura dentária (Boskman⁵ , 1987; Croll⁸, 1992; Erlenbaugh¹², 1994, Czochrowska⁹ *et al*, 1998).

Sendo a terapia com fluoretos tópicos um tratamento bastante efetivo na prevenção de cáries dentárias, algumas pesquisas foram feitas em relação ao melhor tipo de flúor tópico a ser aplicado junto ao tratamento preventivo de cárie a laser. Os resultados destas pesquisas mostraram o flúor fosfato acidulado ser de maior efetividade que o fluoreto de sódio (Tagomori e Morioka⁶⁷, 1981; Morioka, Tagomori e Tsutsumi⁴⁰, 1986; Morioka, Tagomori e Nara³⁷,1988; Morioka e Tagomori^{34,35} , 1988 e 1991). Por essa razão, o fluoreto escolhido para este trabalho de pesquisa foi o flúor fosfato acidulado que foi aplicado após ao tratamento laser apoiado em outras pesquisas que afirmam terem tipo

resultados mais promissores desta forma (Tagomori e Morioka⁶⁷,1981; Shirazuka, Kodaka⁵⁹ *et al* , 1991; Morioka³², 1991; Kakade, Damle²⁵ *et al*, 1996).

Assim, nesta pesquisa, os resultados observados após os espécimes tratados ou não, quando mantidos nesta solução desmineralizante de baixo pH encontram-se desta forma:

A figura 16 mostra a superfície de esmalte de uma amostra controle, ou seja que não recebeu nenhum tratamento laser ou terapia com flúor fosfato acidulado. Como resultado de sua permanência por 21 dias em meio de cultura rico em *S.mutans* pode se observar uma superfície bem branca com aspecto poroso e cavitações principalmente ao redor do *bracket* que foi removido.

A figura 17 mostra a superfície de esmalte que não recebeu nenhum tratamento laser, mas foi submetido à terapia com flúor fosfato acidulado por quatro minutos e permaneceu os 21 dias em meio de cultura rico em *S.mutans*. Podemos observar que a superfície encontra-se esbranquiçada porém não perdeu o seu brilho e não ocorreu nenhuma cavitação.

A figura 18 mostra a superfície de esmalte de uma amostra que recebeu o tratamento pelo laser de Er:YAG a uma densidade de energia de 15 J/cm², mas que não sofreu a terapia com flúor fosfato acidulado, e permaneceu por 21 dias em meio rico em *S.mutans*. Podemos observar que a superfície encontra-se esbranquiçada e em algumas áreas houve perda do brilho superficial do esmalte.

Em relação ao laser de Er:YAG, alguns estudos foram realizados na área de prevenção dos autores, Nara, Tagomori e Numata⁴³ (1990) Tanji, Matsumoto e Eduardo⁶⁹ (1996); Fried, Featherstone¹⁶ *et al* (1996); Watanabe, Yamamoto⁷¹ *et al* (1998); Zennyu, Shiraishi⁷⁸ *et al* (1998), utilizaram o laser de Er:YAG obtendo resultados positivos em relação ao aumento da resistência ácida do esmalte.

A figura 19 mostra os resultados obtidos das amostras de superfície de esmalte que receberam o tratamento pelo Laser de Er:YAG a uma densidade de energia de 15 J / cm² e depois sofreu a terapia com flúor fosfato acidulado por quatro minutos e permaneceu por 21 dias em meio rico em *S.mutans*. Pode se observar que o esmalte apresentou-se manchado porém manteve o seu brilho e

não apresentou cavitações. Confirmando os resultados de muitas outras pesquisas envolvendo o tratamento por irradiação a laser combinado a aplicação tópica de flúor na prevenção de cáries tais como: Yamamoto e Sato⁷⁴, 1980; Tagomori e Morioka⁶⁷, 1981; Morioka, Tagomori e Tsutsumi⁴⁰, 1986; Oho e Morioka⁴⁷, 1988; Morioka, Tagomori e Nara³⁷, 1988; Morioka e Tagomori^{34,35}, 1988 e 1991; Tagomori, Inai⁶⁸ *et al*, 1991; Morioka, Tagomori e Inai³⁶, 1991; Morioka³², 1992; Morioka³³, 1993; Luomanen, Meurman²⁷ *et al*, 1998; Zezell, Bonk⁷⁹ *et al*, 1998; Nagai, Fukuda⁴², 1998; Cecchine, Pelino e Zezell⁶, 1998; Phan, Fried e Featherstone⁵² 1999; Anderson, Ellis¹ *et al*, 2000; Yokohama, Kimura, Kinoshita⁷⁵ *et al*, 2001; Zezell, Boari e Eduardo⁸¹, 2001.

Ao observarmos em Microscopia eletrônica de varredura obtivemos os seguintes resultados:

A figura 20 refere-se a uma superfície de esmalte hígida de uma amostra que não recebeu nenhum tratamento e nem foi submetida ao meio de cultura desmineralizante e foi tirada a nível de comparação com as outras amostras.

Nas amostras controle que não receberam nenhum tratamento mas permaneceram no meio de cultura rico em *S.mutans* exemplificadas na figura 21 é possível observar claramente uma superfície de esmalte totalmente destruída pela ação ácida do meio de cultura rico em *S.mutans*, a superfície do tecido apresenta-se toda desorganizada e com a presença de crateras.

Nas amostras cujo tratamento restringiu-se ao laser de Er:YAG a uma densidade de energia de 15 J / cm² e permaneceram em meio de cultura rico em *S.mutans* como mostra a figura 22, podemos observar uma superfície de esmalte alterada com os túbulos dentinários abertos (foto tirada de dentro da cratera formada pela irradiação pelo laser de Er:YAG) mas ainda com alguma destruição superficial do tecido dentário pelo meio ácido da cultura rica em *S. mutans*.

Nas figuras 23 e 24 que mostram os espécimes tratados com irradiação pelo laser de Er:YAG e terapia com flúor fosfato acidulado, podemos observar a superfície de esmalte com seus prismas totalmente expostos de maneira relativamente regular sem a presença de crateras.

A justificativa do aumento da resistência ácida pelo esmalte dentário através da irradiação pela luz laser tem sido sugerida em alguns trabalhos como: Oho e Morioka⁴⁸ (1990) que defenderam um possível mecanismo

de aquisição de resistência ácida pelo esmalte dentário exposto à radiação laser, sugerindo a formação de microespaços no interior do esmalte irradiado que manteriam presos os íons liberados pela descalcificação ácida; ou Myers⁴¹ (1991) em um resumo sobre seus trabalhos declara as alterações estruturais na superfície de esmalte se tratem de fusão e recristalização da superfície do tecido dentário, diminuição em sua permeabilidade por consequência da fusão, esbranquiçamento da superfície e alterações na forma e no tamanho dos cristais de hidroxiapatita; já, Morioka³² (1992) conclui ser o laser de Nd:YAG o mais efetivo na aquisição de resistência ácida pelo esmalte dentário humano. Afirma que os efeitos do feixe laser sobre a estrutura dentária é principalmente devido a aquisição de resistência ácida contra a descalcificação ácida do esmalte dentário. E que a aplicação tópica de fluoretos combinado ao tratamento laser representaria um procedimento mais efetivo para prevenção de cárie.

As figuras 25 e 26 mostram amostras que receberam apenas a terapia com flúor fosfato acidulado por 4 minutos e depois foram submetidas ao meio de cultura de pH4.3. Podemos observar uma organização melhor da superfície de esmalte com áreas bastante semelhantes a superfície de esmalte hígida mostrada na figura 20, mas já com áreas apresentando destruição e crateras.

Embora alguns estudos afirmem que a terapia com fluoretos tópicos independente até da higiene ideal (Powell⁵³) possa promover prevenção às cáries, e que outros estudos que afirmam ser o laser capaz de aumentar a resistência ácida do esmalte e, mais ainda, que estes tratamentos combinados aumente extraordinariamente sua efetividade, o processo inicial de cárie, representada pela mancha branca não pode ser completamente descartada.

Após a infecção cariogênica, sob a ação do tempo, e na presença de substrato adequado, os microorganismos prosseguem atuando, produzindo a redução do diâmetro dos cristais de esmalte, que abrem espaço para a ocupação de água e matéria orgânica. Na medida em que esses cristais têm o seu diâmetro reduzido são seqüestrados para o meio ambiente bucal e aparece, clinicamente a primeira evidência da doença,

que é a mancha branca não cavitada. Essa lesão não cavitada, que representa a patogênese precoce, evidencia que a doença se instala muito antes da lesão, visto que, até chegar a esse ponto, muitas alterações microscópicas, bioquímicas e estruturais ocorreram. A análise ultraestrutural da lesão branca não cavitada mostra zonas com características específicas: zona superficial composta por um filtro de microporos, em contato direto com o meio ambiente bucal e onde ocorre as trocas iônicas entre o esmalte e a saliva, e que no processo de desmineralização apresenta um aumento da porosidade; corpo da lesão, onde se observa redução de cerca de 25% da proporção de minerais, aumentando, conseqüentemente, a quantidade de água e compostos orgânicos; zona escura, rica em espaços ou poros em conseqüência da perda de substância mineral e zona translúcida, na qual ocorrem as primeiras alterações no esmalte, que se apresenta menos estruturado e mineralizado. Após esse processo, se nada for feito para deter o avanço desta doença, a zona superficial apresentará uma porosidade muito grande, incapaz de manter-se estruturada sendo rompida, produzindo o que conhecemos como lesão cavitada ou cavidade de cárie. (Medeiros³¹, 1998)

Baseado nessa análise ultraestrutural da lesão branca podemos sugerir que as alterações ocorridas na superfície de esmalte afetem apenas as primeiras camadas mais superficiais da mancha branca evitando a progressão da doença cárie e, conseqüentemente a cavitação do tecido dentário. Mas mais estudos deveriam ser feitos nesta área para determinar qual seria o melhor parâmetro de irradiação laser para conseguir evitar a mancha branca por completo.



Figura 16- corresponde a superfície controle que não recebeu nenhum tratamento a laser ou terapia com flúor fosfato acidulado e que permaneceu em meio de cultura rico em *S.mutans* por 21 dias. Pode se observar uma superfície bem branca com aspecto poroso e cavitações principalmente ao redor do *bracket* que foi removido.



Figura 17 - face lingual do pré-molar, corresponde a superfície que não recebeu irradiação por laser mas foi submetido a terapia com flúor fosfato acidulado e que permaneceu em meio de cultura rico em *S.mutans* por 21 dias. O dente apresenta a mancha branca delimitando o *bracket* removido porém não houve perda do brilho do esmalte.



Figura 18 - superfície de esmalte tratado com irradiação por laser de Er:YAG mas sem a terapia com flúor fosfato acidulado e que permaneceu em meio de cultura rico em *S.mutans* por 21 dias. A superfície apresenta manchas brancas e em algumas áreas seu aspecto é poroso.



Figura 19 – superfície de esmalte que foi tratado com irradiação por laser de Er:YAG e terapia com flúor fosfato acidulado e que permaneceu em meio de cultura rico em *S.mutans* por 21 dias. Pode se observar que o esmalte apresentou-se manchado porém manteve o seu brilho e não apresentou cavitações.

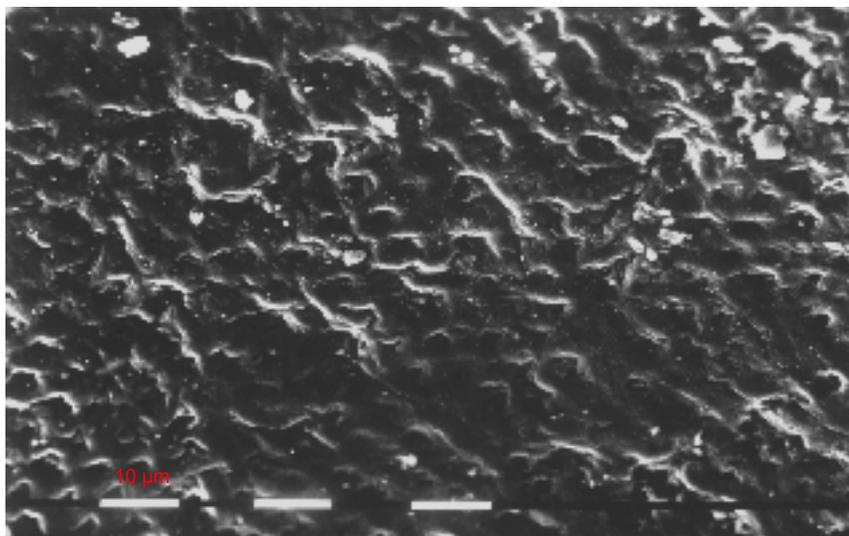


Figura 20 – superfície de esmalte hígida -MEV, de um dente que não sofreu nenhum tratamento e não foi submetido aos 21 dias de meio de Gibbons & Nygaard¹⁷ (1968) rico em *S.mutans*.

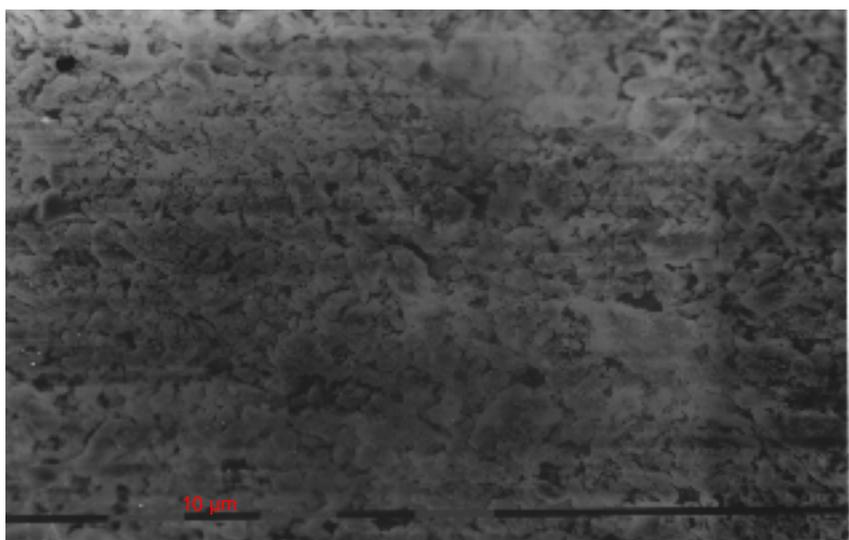


Figura 21 – superfície de esmalte sem nenhum tratamento laser ou terapia com flúor mas que permaneceu em meio de cultura rico em *S.mutans* por 21 dias. É evidente a destruição do tecido dentário nesta região.

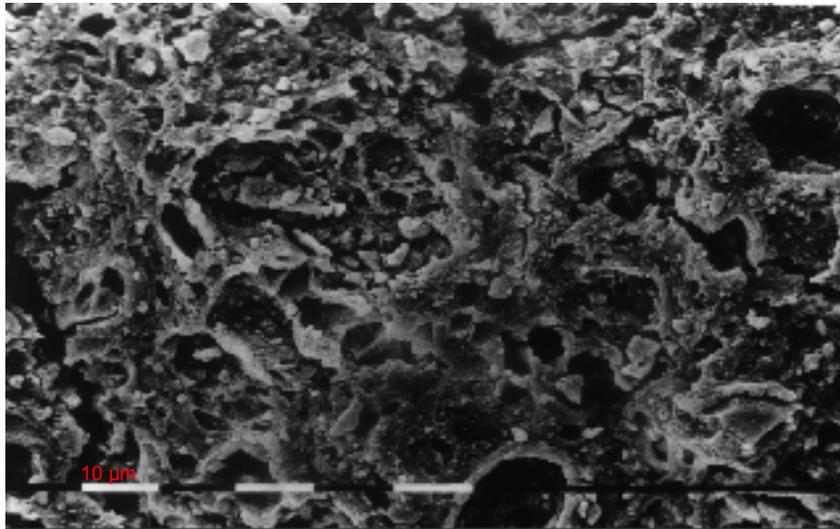


Figura 22 -superfície de esmalte em MEV irradiada pelo laser de Er:YAG, sem terapia com flúor fosfato acidulado que permaneceu por 21 dias em meio de cultura rico em *S.mutans*. Observa-se uma alteração morfológica bastante grande desta superfície.

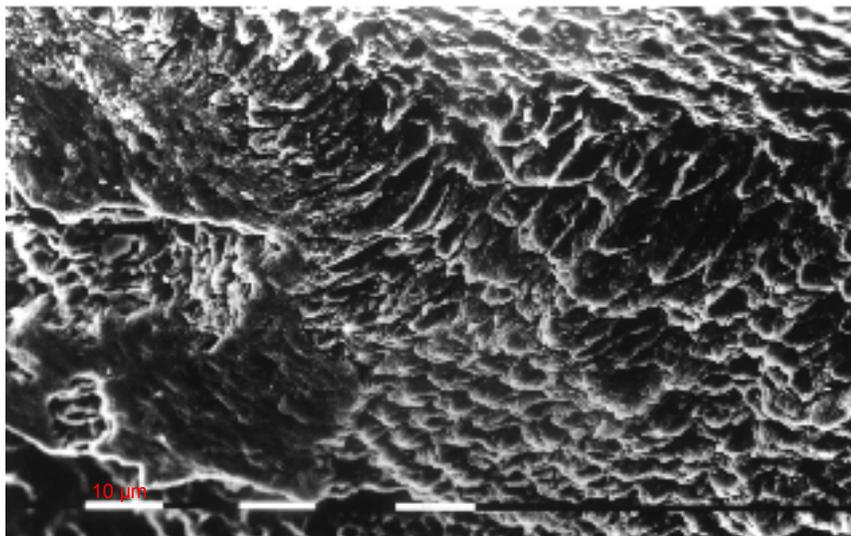


Figura 23 – superfície de esmalte irradiada pelo laser de Er:YAG e com terapia com flúor fosfato acidulado que permaneceu em meio de cultura rico em *S.mutans* por 21 dias. Observa-se os prismas de esmalte expostos de uma maneira tridimensional

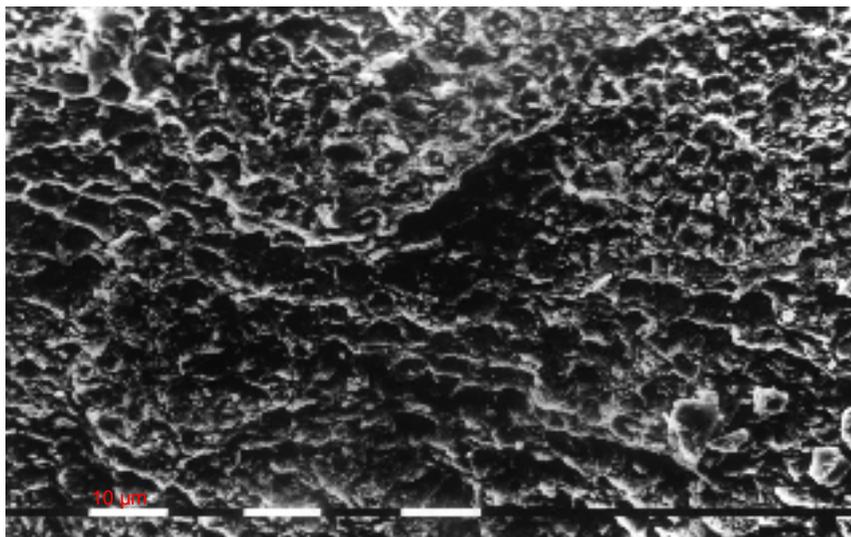


Figura 24 – superfície de esmalte irradiada pelo laser de Er:YAG e com terapia com flúor fosfato acidulado que permaneceu em meio de cultura rico em *S.mutans* por 21 dias.

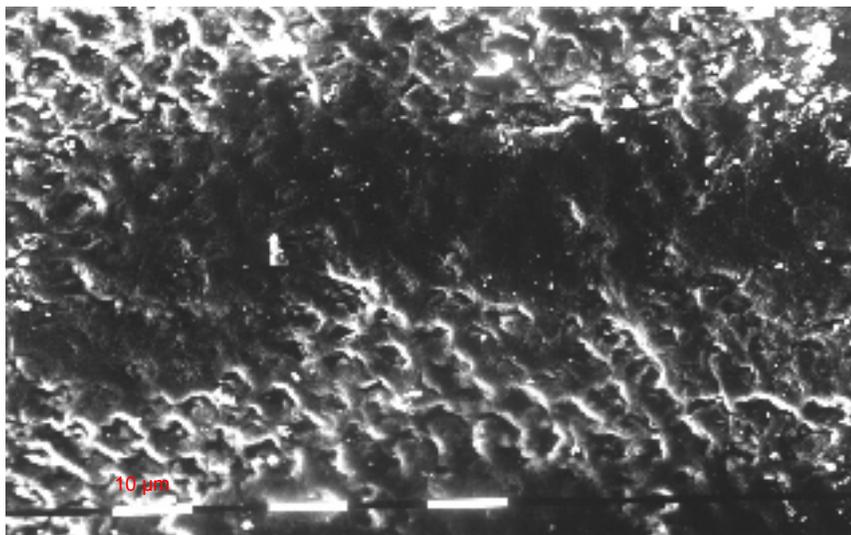


Figura 25 – superfície de esmalte que não recebeu irradiação por laser mas submeteu-se a terapia com flúor fosfato acidulado e que permaneceu em meio de cultura rico em *S.mutans* por 21 dias. Pode-se observar uma desorganização superficial do tecido dentário.

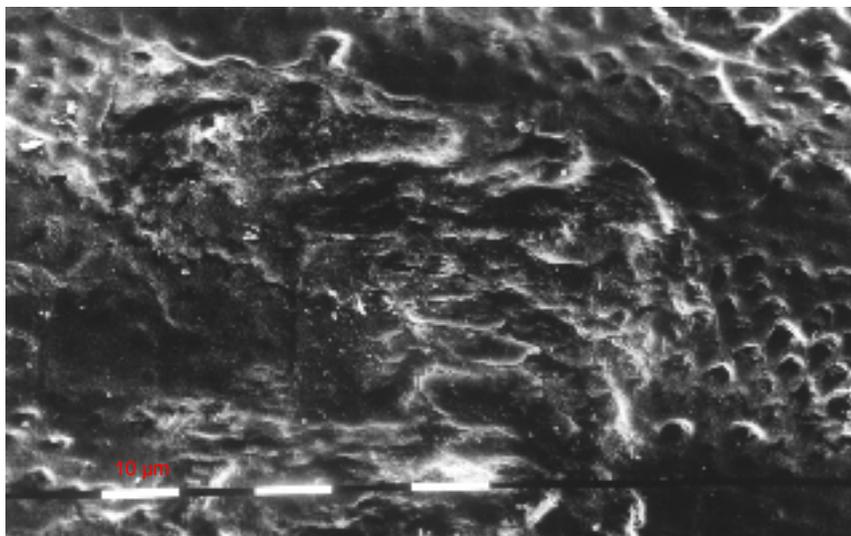


Figura 26 – superfície de esmalte que não recebeu irradiação por laser mas submeteu-se a terapia com flúor fosfato acidulado e que permaneceu em meio de cultura rico em *S.mutans* por 21 dias. Pode-se observar uma desorganização superficial do tecido dentário.

6. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos nesta pesquisa, concluímos que:

1. Em nossos achados podem ser evidenciadas crateras a um aumento de 1000x em Microscópio Eletrônico de varredura concluindo assim que muitas vezes não corresponde a cavitações no esmalte dentário.
2. As superfícies de esmalte irradiadas com o laser de Er:YAG mostraram alterações morfológicas significativas ao microscópio eletrônico de varredura porém quando vistas ao microscópio óptico ainda apresentava manchas brancas. Muito embora apresentassem menor perda do brilho do esmalte e menor quantidade de cavitações superficiais.

3. As superfícies de esmalte tratadas com o flúor fosfato ácido apresentaram um resultado melhor em relação a formação de cavitações, as manchas brancas ainda estavam presentes porém sem a perda do brilho do esmalte.
4. Os espécimes controle que não receberam nenhum tratamento laser ou pelo flúor apresentaram cavitações visíveis a olho nu e uma evidente perda do brilho do esmalte.
5. Nossos resultados concordaram com os de muitas pesquisas com vários tipos de lasers que têm apresentado resultados estimuladores em relação ao aumento da resistência ácida do esmalte e conseqüentemente resistência à ação ácida do processo cariosos.
6. Podemos concluir acima de tudo que as superfícies de esmalte tratadas por irradiação por laser de Er:YAG e terapia com flúor fosfato acidulado foram as que apresentaram melhores resultados quando comparadas ao grupo controle por não apresentarem cavitações e pela atenuação da mancha branca.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 ANDERSON, J. N. R. ; ELLIS, R. W.; BLANKENAU, R.D. J.; BEIRAGHI, S. M.; WESTERMAN, G.Y H. Caries resistance in enamel by Laser irradiation and topical fluoride treatment. **Journal of Clinical Laser Medicine e Surgery**, v. 18, n.1, p. 33-36, 2000.
- 2 ANTUNES, A.; ROSSI, W.; SALVADOR, V.; ZECELL, D.M. Relationship between Mineral Composition and Hardness of the Human Dental Treated with Short Pulsed Nd:YAG Laser in Caries Prevention. . Supplement to the first edition of **J. of Oral Laser Applications**, v. 1, p.45, May 2001. (abstract P15).

- 3 BARATIERI, L.N.; ANDRADA,M.A.C.; MONTEIRO Jr, S. Dentística- Procedimentos Preventivos e Restauradores. Ed. Quintessence books e Ed. Santos, 1.ed., 1990.
- 4 BORGGREVEN, J.M.P.M.; VAN DUCK, J.W.E.; DRIESSENS, F.C.M. Effect of laser irradiation on the permeability of bovine dental enamel. **Arch. Oral Biol.**, v. 25, n. 11/12, p. 831-2, 1980.
- 5 BOSKMAN, L; GRATTON,D.R.; McCUTCHEON,E. Clinical evaluation of glass ionomer cements as a fissure sealant. **Quintess. Int.**, v.18, p. 707-9, 1987.
- 6 CECCHINI, R. C.; PELINO, J. E.; ZECELL, J. E.; MELLO, D. M., CARDOSO, J. B.; SALVADOR, A. O.; EDUARDO, V. L.; C. P. Acid resistance of enamel treated with Nd:YAG Laser associated with fluoride and exposed to a *S. mutans* Culture Media. 6th. International Congress on Laser in Dentistry, July 28-30, 1998. Maui, Hawaii, USA.
- 7 CECCHINI, S.C.M. Estudo *in vitro* das aplicações do laser de Hólmio:YLF em esmalte e dentina, visando a realização de cirurgia de acesso endodôntico e preparo cavitário. São Paulo, 1995. Dissertação (Mestrado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear) –Universidade de São Paulo.
- 8 CROLL, T.P. Glass ionomers/resins preventive restoration. **J. Dent. Child.**, v.59, n.3, p. 272-79, 1992.

- 9 CZOCHROWSKA, E.; OGAARD, B.; DUSCHNER, H.; RUBEN, J.; ARENDS, J. Cariostatic effect of a light-cured, resin-reinforced glass- ionomer for bonding orthodontic brackets in vivo. A combined study using microradiography and confocal laser scanning microscopy. **J. Orofac Orthop.**, p.265-73, 1998.
- 10 EINSTEIN, A. Zur quantum theorie der strhlung. **Phys Z**, v.18, p.121, 1917, apud CARRUT, J.A.S.; McKENZIE, A.L. **Medical Lasers**. England: Adam Hilger,p. 1, 1986.
- 11 EGURO, T.; MAEDA, T.; OGAWA,M.; NISHIMURA, Y.; OTSUKI, M.; e TANAKA, H. Human enamel changes by the Er: YAG laser irradiation. **J. Dent Res.**v.78, p. 498, 1999.
- 12 ERLLENBAUGH,A.; DONLY, K.J. Enamel de/remineralization on teeth adjacent to fluoride releasing materials with and without dentifrice exposure. **J. Den. Res.**, v. 73, p. 314 (abstr. 1969), 1994.
- 13 FEATHERSTONE, J. D. B.; FRIED, D.; BITTEN, E. R. Mechanism of Laser Induced Solubility Reduction of Dental Enamel. University of California San Francisco, p. 112-16, 1997.(Abstract).
- 14 FERREIRA, M.V. e ZECELL, M.D. In vitro Study of Hydroxyapatite and Enamel Powder Fused in human enamel by Nd:YAG laser. . Supplement to the first edition of **J. of Oral Laser Applications**, v. 1, p.18, May 2001. (abstract 46).

- 15 FRIED, D.; MURRAY, M. W.; FEATHERSTONE, J. D. B.; AKRIVOU, M.; DICKENSON, C. D.; OJEDA, O.P. Dental hard tissue modification and removal using sealed TEA lasers operating at $\lambda=$ 9.6 and 10.6 μm . **SPIE**, v. 3593, p.196-203, 1999.
- 16 FRIED, D.; FEATHERSTONE, J.D.B.; VISURI S.R.; SEKA, W.; WALSH, J.T. The Caries Inhibition Potential of Er: YAG and Er: YSGG Laser Radiation. **SPIE**, Abstract v. 2672 p.73-78, 1996.
- 17 GIBBONS, R. J.; NYGAARD, M. Synthesis of insoluble dextran and its significance in the formation of gelatinous deposits by plaque forming streptococci. **Arch. Oral Biol.**, v.13, n.10, p.1249-62, Oct., 1968.
- 18 GOLDMAN, L.; HORNBY, P.; MEYER, R. E.; GOLDMAN, B. Impact of the laser on dental caries. **Nature**, v.203, n.4943, p.417, July 1964.
- 19 GOLDMAN, L.; GRAY, J. A.; GOLDMAN, J.; GOLDMAN, B.; MEYER, R. Effect of laser beam impacts on teeth. **J. Am. Dent. Assoc.**, v.70, n.3, p.601-6, Mar. 1965.
- 20 HARGREAVES, J.A.; PISKO-DUBIENSKI, R. P. Changes in surface enamel using three different methods of laser application. **J. Dent. Res.**,v.63, n.4, p.506, Apr. 1984. (Abstract 151).
- 21 HOSSAIN, M.; KIMURA, Y.; YAMADA, Y.; SUZUKI, N.; NAKAMURA, Y.; MATSUMOTO, K. Acquired Acid Resistance of Enamel and Dentin

- Irradiated by Er, Cr:YSGG Laser. Supplement to the first edition of **J. of Oral Laser Applications**, v. 1, p.15, May 2001. (abstract 36).
- 22 HOSSAIN, M.; NAKAMURA, Y.; KIMURA, Y.; YAMADA, Y.; ITO, M.; MATSUMOTO, K. Caries-Preventive Effect of Er:YAG Laser Irradiation with or without Water Mist. **J. Of Clinical Laser Medicine & Surgery**, v.18, n.2, p. 61-65, Feb. 2000.
- 23 IWASE T.; TAGOMORI S.; BAHAR .; MORIOKA T. Effect of Nd:YAG laser on pit and fissure of enamel. Department of Preventive Dentistry, Faculty of Dentistry Kyushu University, Fukuoka, Japan. (Divisional Abstracts 12) v. 71, n. 4, p.103, 1992.
- 24 JORGE, A.O.C. Microbiologia Bucal. Ed. Santos, 121p, 1995.
- 25 KAKADE, A.; DAMLE, S.G.; BHAVSAR, J.P.; CHATTERJEE, V. DEB, P. Combined effect of carbodioxide laser and neutral 2% NaF on acid resistance of human tooth enamel. **J. Indian Soc.** v. 14, n.1, p. 26-30, Mar. 1996.
- 26 KONEMAN, E.W.; ALLEN, F.D.; DOWELL,V.R. ; SOMMERS, H.M. **Diagnóstico Microbiológico: Texto e Atlas Colorido**. 2. ed. , Ed. Medicina Panamericana do Brasil, 520p,1986.
- 27 LUOMANEN, M.; MEURMAN, J.H.; HEMMERLÉ, J.; VOEGEL, J.C.; RAUHAMAA-MAKINEN,R. Transformation of hydroxyapatite to fluorapatite with CO₂ laser irradiation. Proceedings of 6th. International Congress on Lasers in Dentistry, Hawai, USA, p.42, july, 1998.

- 28 MAILLET, H. Primeiras Noções. Apud VIEIRA Jr, N.D. Mestrado profissionalizante “Lasers em Odontologia”- Introdução aos Lasers. P. 1-11, 1999.
- 29 MAIMAN, T.H. Stimulated optical radiation in ruby. **Nature**, v.187, n. 4736, p. 493-4, Aug. 1960.
- 30 MANNERBERG, F.; KANTOLA, S.; SCHEININ, A. Laserinduced effects on tooth structure in single pulse impacts on surface enamel as observed in shadowed replicas. **Acta Odontol. Scand.**, v.27, n. 5, p. 467-76, Oct. 1969.
- 31 MEDEIROS, U.V. Controle clínico da doença cárie. In: GALAN Jr, J.; NAMEN, F.M.; *Dentística Restauradora – O essencial para o clínico*. Ed. Santos, 1.ed., p.7-19, 1998.
- 32 MORIOKA, T. Present laser studies with future prospects. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON LASER IN DENTISTRY, Salt Lake City. *Proceedings*. Salt Lake City: ISLD, p. 15-9, 1992.
- 33 MORIOKA, T. Lasers in preventive dentistry- Prevention of dental caries. P.247-50, Ogaki, 1993.
- 34 MORIOKA, T.; TAGOMORI, S. Applicability of Nd: YAG laser on prevention of dental caries. **SPIE.**, v. 907, p.94-95, 1988.
- 35 MORIOKA, T.; TAGOMORI, S. Combined of Nd:YAG laser irradiation and fluoride application on the acid-resistance of dental enamel. 1, 1991, Fukuoka. *Proceedings: Third International Nd:YAG Laser Symposium*, p. 487-90, 1991.

- 36 MORIOKA, T.; TAGOMORI, S.; INAI, Y. Na incremental effect of acid resistance and remineralization on incipient caries of enamel with laser irradiation. Accepted for Publication, Feb.,1991.
- 37 MORIOKA,T.; TAGOMORI, S.; NARA, Y. Aplication of Nd:YAG laser and fluoride in the prevention of dental caries. Proceedings of the International Congress of Laser in Dentistry, p.55-61, Tokyo, Japan, August 1988.
- 38 MORIOKA, T.; TAGOMORI, S.; OHO, T. Acid resistance of lased human enamel with erbium:Yag laser. **J. Clinical Laser Medicine Surgery**, p.215-17, June, 1991.
- 39 MORIOKA, T.; TAGOMORI, S.; TSUTSUMI, H. Increase in acid resistance of hamster enamel by using a normal pulse Nd-YAG Laser. Departament of Preventive Dentistry, p. 49-53, Japan, 1985.
- 40 MORIOKA, T.; TAGOMORI, S.; TSUTSUMI, H. Effect of laser irradiation on fluoride uptake in enamel-by EPM Surface Scanning. Department of Preventive Dentistry, p.235, 1986.
(Abstract)

- 41 MYERS, L.; MICHAEL, D.M.D. The effect of laser irradiation on oral tissues. **The Journal of Prosthetic Dentistry**, v. 66, n.3, p. 395-397, 1991.
- 42 NAGAI, N.; FUKUDA, M.; ISHIKAWA, K.; MINOURA, S.; YAMADA, Y.; NIIMI T.; NOGUCHI T.; IMADA S.; TAKO, J.; NOGUTI, T.; TSUBOI, S.; NAKAGAKI, H. New method for the prevention of dentin caries using Nd: YAG laser and fluoride combinations. Aichi- Gakuin Univ. Nagoya Japan, p.70, 1998.
- 43 NARA, Y.; TAGOMORI, Y.; NUMATA, T.; MORIOKA, T. Effect of erbium: YAG laser irradiation on acid resistance of human tooth enamel. **Surgical and Medical Lasers**, v. 3, n.4, p. 205-7, Dec. 1990.
- 44 NELSON, D.G.A.; JONGEBLOED, W.L.; FEATHERSTONE, J.D.B. Laser irradiation of human dental enamel and dentine. **N.Z., Dent. J.**, v. 82, n.369, p. 74-7, July, 1986.
- 45 NELSON, D.G.A.; SHARIATI, M.; GLENA, R.; SHIELDS, C.P.; FEATHERSTONE, J.D.B. Effect of pulsed low energy infrared laser irradiation on artificial caries-like lesion formation. **Caries Res.**, v.20, n.4, p.289-99, July/Aug. 1986.
- 46 NELSON, D.G.A. et al. Morphology, histology and cristallography of human dental enamel treated with pulsed low-energy infrared laser irradiation. **Caries Res.**, v.21, n.5, p.411-26, 1987.

- 47 OHO, T.; MORIOKA, T.A. Compositional and structural changes of human lased enamel. **J. Jpn. Soc. Laser Dent.**, v. 9, n. 3, p. 205-9, Dec. 1988.(Abstract).
- 48 OHO, T.; MORIOKA, T.A. A possible mechanism of acquired acid resistance of human dental enamel by laser irradiation. **Caries Res.**, v. 24, n. 2, p. 86- 92, Mar./Apr. 1990.
- 49 PAGHDIWALA, A.F. Does the laser work on hard dental tissue? **J. Am. Dent. Assoc.**, v.122, n.1, p.79-80, Jan. 1991.
- 50 PELINO, J. E. P., Estudo *in vitro* do efeito da laser de Nd: YAG sobre o esmalte dental humano: Análise por microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura. São José dos Campos, 1998. 155p. Dissertação (Curso de Pós Graduação em ODONTOLOGIA) – Universidade Estadual Paulista.
- 51 PETERS, J.F.M.; ZAKARIASSEN, K.L.; BORAN, T.L.; BARRON, J.R. Effects of pulsed/non pulsed CO₂ laser energy on enamel demineralization. **J. Dent. Res.**, v.69, p.302, 1990. (Abstract 1550).
- 52 PHAN, N.D.; FRIED, D.; FEATHERSTONE, J.D.B. Laser-induced transformation of carbonated apatite to fluorapatite on bovine enamel. **SPIE Conference on lasers in Dentistry V**, v. 3593, p. 233-40,1999.
- 53 POWELL, G.L.; YU, D.; HIGUCHI, W.I.; FOX, J.L. Comparison of

- three lasers on desmineralization of human enamel. University of Utah, Salt Lake City, 1993. (Abstract).
- 54 QUINTO Jr, J.; OLIVEIRA, M.V.; WETTER, N.U.; RATTICHERI, F.; ZECELL, D.M.; EDUARDO, C.P. Morphological and Thermal Analysis os Resolidified Dental Enamel Surface after DYE assisted Irradiation with a 960nm Diode Laser. Supplement to the first edition of **J. of Oral Laser Applications**, v. 1, p.9, May 2001. (abstract 22).
- 55 RAJAB, M.Sh.; TIFAH, N.A.; ALI, U.A. Carieslike Lesion Initiation in Sound Enamel following CW CO₂ laser Irradiation: an in vitro Study. . Supplement to the first edition of **J. of Oral Laser Applications**, v. 1, p.18, May 2001. (abstract 45).
- 56 RENSBURG VAN, S.D.; WILTSHIRE, W.A. The effect of soft laser irradiation on fluoride release of two fluoride-contining orthodontic bonding materials. **J. Dent. Assoc. S. Afr.** P.127-31, Mar, 1994.
- 57 RESNICK, R.; HALLIDAY,D.; KRANE, K.S. Fisica 4. Ed. Livros Técnicos e Científicos, 388p., 4.ed., 1996.
- 58 SATO, K. Relation between acid dissolution and histological alteration of heated tooth enamel. **Caries Res.**, v. 17, p.490-5, 1983.

- 59 SHIRAZUKA, T.; KODAKA, T.; DEBARI, K.; MATSUMOTO, K. Acid resistance on human dental enamel by laser irradiation and fluoride treatment. **J. Dent. Res.**, v.70, p.350. 1991. (Abstract 67)
- 60 SOET, J.J. Acid production by oral streptococci. **Caries Res.**, v.30, n.4, p.288, July/Aug. 1996. (Abstract 64).
- 61 STERN, R.H.; SOHNNAES, R.F. Laser beam effect on dental tissues. **J. Dent. Res.**, v.43, n.5, p.873. 1964. (Abstract 307).
- 62 SOGNAES, R.F.; STERN, R.H. Laser effect on resistance of human dental enamel to demineralization in vitro. **J. So. Cal. Dent. Assoc.**,v.33, n.8, p.328-9, Aug. 1965.
- 63 STERN, R.H.; SOGNAES, R.F. Laser effect on dental hard tissues. A preliminary report. School of dentistry, University of California Los Angeles, California. p. 17-19, Jan. 1965.
- 64 STERN, R.H.; SOGNAES, R.F.; GOODMAN, F. Laser effect on in vitro enamel permeability and solubility. **J. Am. Dent. Assoc.**, v.73, n.4, p.838- 43, Oct. 1966.
- 65 STERN, R.H.; VAHL, J.; SOGNAES R.F. lased enamel:
Ultrastructural observations of pulsed carbon dioxide laser effects. **J. Dent. Res.** v. 51, n.2, p. 455-60, March/April 1972.
- 66 STREFEZZA, C.; BACHMANN, L.; BAUER, J.A.; ANTONIAZZI, J.H.; EDUARDO, C.P.; ZECELL, D.M. Effects of Holmium Laser on Dental

Structure in vivo. . Supplement to the first edition of **J. of Oral Laser Applications**, v. 1, p17, May 2001. (abstract 44).

- 67 TAGOMORI, S.; MORIOKA, T. Combined effects of laser and fluoride on acid resistance of human dental enamel. **Caries Res.** v.23 p. 225-31 1981.
- 68 TAGOMORI, S.; INAI, Y.; NUMATA, Y.; MORIOKA, T. The effect of laser irradiation on remineralization of artificial enamel lesion. Department of Preventive Dentistry, p.132-34, Fukuoka, Japan, 1991.(Abstract).
- 69 TANJI, E.Y.; MATSUMOTO, K.; EDUARDO, C.P. Estudo do condicionamento da superfície dentinária com o Er:YAG laser. Depto. Dentística, Faculdade de Odontologia da U.S.P., S. e S e Showa University, Scholl of Dentistry, Tokyo, Japan, p.142, 1996.
- 70 TANOUS, J.T.; VIEIRA, M.; PELINO, J.E.P; EDUARDO, C.P. Study os the Superficial Morphologic Changes of the Human Dental Enamel an Cement after the Er:YAG laser Irradiation in Different Angulations. Supplement to the first edition of **J. of Oral Laser Applications**, v. 1, p.14, May 2001. (abstract 33)

- 71 WATANABE, H.; YAMAMOTO, H.; KAWAMURA, M.; OKAGAMV,Y.; KATAOKA, K.;ISHUIKAWA, I. Acid resistance of the human teeth enamel irradiated by Er:YAG laser. 6th. International Congress On Lasers In Dentistry, Hawai, USA, p. 68-9, July 1998.
- 72 YAMAMOTO, H.; OOYA, K. Potencial of yttrium-alluminium-garnet laser in caries prevention. **J. Oral Pathol.**, v.3 n.1, p.7-15, Jan./Feb. 1974.
- 73 YAMAMOTO, H.; SATO, K. Prevention of dental caries by accousto-optically Q-switched Nd:YAG laser irradiation. **J. Dent. Res.**, v.59, n.2, p.137, Feb. 1980.
- 74 YAMAMOTO, H.; SATO, K. Prevention of dental caries by Nd:YAG laser irradiation. **J. Dent. Res.**, v.59, n.12, p.2171-7, Dec. 1980.
- 75 YOKOHAMA, K.; KIMURA, Y.; KINOSHITA, J.; MATSUMOTO, K. SEM Observation of Irradiation with the Er, Cr:YSGG Laser after Coating by 38% Ag(NH₃)₂F Solution. . Supplement to the first edition of **J. of Oral Laser Applications**, v. 1, p.17, May 2001. (abstract 43).
- 76 YU, D.G.; KIMURA, Y.; KINOSHITA, J.I.; MATSUMOTO, K. Morphological and Atomic Analytical Studies on Enamel and Dentin Irradiated by na Er:, Cr: YSGG Laser. **J. Of Clinical Laser Medicine & Surgery**, v.18, n.2, p. 139-143, Feb. 2000.

- 77 ZANG, S. et al. Inhibition of demineralization of enamel fissures by combined laser/fluoride treatment. Abstract 1691 of **J. Dent. Res.**, v.71, p.727, 1992.
- 78 ZENNYU, K.; SHIRAIISHI, M.;INOUE, M.;INOUE,M.;KUMAZAKI, M. Influences of Irradiating Directions of Er:YAG Laser on Morphology of Hard Dental Tissues. 6TH International Congress on Lasers in Dentistry, p.197-8, 1998.
- 79 ZEZELE, D.M.; BONK, P. A.; SALVADOR, V.L.R.; VIEIRA JR., N.D., EDUARDO, C.P. Potencial of Ho: YLF and Fluoride in Prevention of Sental Caries. 6th. International Congress on Laser in Dentistry, Maui, Hawaii, USA, p.28-30, July, 1998.
- 80 ZEZELE, D.M.; MALDONADO, E.P. e RIBEIRO, M.S. Mestrado Profissionalizante “Lasers em Odontologia” – Interação da Luz Laser com tecidos Biológicos: Aplicações. 1999.
- 81 ZEZELE, M.D.; BOARI, H.G.D.; EDUARDO, C.P. Nd:YAG Laser in Caries Prevention: a Clinical Study. . Supplement to the first edition of **J. of Oral Laser Applications**, v. 1, p.16, May 2001.(abstract 37).

