



BR0645207

BR0645207



AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

563

**POTENCIAL DE INIBIÇÃO DA PROGRESSÃO DE CÁRIE
ARTIFICIAL POR IRRADIAÇÃO SUB-ABLATIVA COM LASER
DE CO₂ PULSADO EM ESMALTE DENTAL BOVINO**

MARCELLA ESTEVES OLIVEIRA

Dissertação apresentada como parte
dos requisitos para obtenção do Grau
de Mestre em Ciências na Área de
Tecnologia Nuclear - Materiais.

Orientadora:
Profa. Dra. Denise Maria Zezell

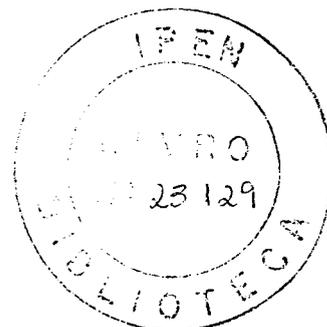
**São Paulo
2005**



INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia Associada à Universidade de São Paulo

**POTENCIAL DE INIBIÇÃO DA PROGRESSÃO DE CÁRIE ARTIFICIAL POR
IRRADIAÇÃO SUB-ABLATIVA COM LASER DE CO₂ PULSADO EM ESMALTE
DENTAL BOVINO.**

MARCELLA ESTEVES OLIVEIRA



**Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
Mestre em Ciências na Área de Tecnologia
Nuclear – Materiais.**

Orientadora: Profa. Dra. Denise Maria Zezell

**SÃO PAULO
2005**

DEDICATÓRIAS

Ao **Cadu**, meu companheiro de tantos anos, com amor e admiração por ter sido sempre a pessoa que mais me incentivou neste caminho, pelo seu exemplo, por todo seu apoio e incansável compreensão. Por ser a pessoa que eu amo e por saber que "o mundo gira e nos espera numa boa".

À minha família, meu pai **John Straus**, minha mãe **Sandra**, meu irmão **Danilo**, pelo amor e carinho com que estiveram sempre ao meu lado e por terem me apoiado e me dado condições para conquista dessa vitória.

À minha avó **Celina** e minha tia **Maria das Graças** por terem me acolhido com tanto carinho e por terem sido fundamentais na trilha dos meus primeiro passos profissionais.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A minha orientadora, **Profa. Dra. Denise Maria Zezell**, por ser em primeiro lugar uma pessoa que eu admiro muito, por ter me aberto as portas da pós-graduação, por ter sempre acreditado no meu trabalho, por ter ficado ao meu lado nos momentos difíceis e pelo carinho com que incentivou minha carreira. Também por sua participação fundamental na conquista da bolsa de doutorado sanduíche, sua visão e seus ensinamentos.

Ao **Prof. Dr. Carlos de Paula Eduardo**, por ter sido um exemplo de pioneirismo no estudo dos lasers em odontologia, por ter me permitido participar do primeiro intercâmbio de pesquisa com a Universidade de Aachen e por ter me aceitado como sua aluna de doutorado.

Ao **Prof. Christian Apel**, por toda atenção dedicada durante a minha estadia em Aachen, pelo acompanhamento de perto, pela maneira gentil com que proveu condições para realização dos experimentos e por seus conselhos e orientações durante todo o trabalho.

Ao **Prof. Norbert Gutknecht**, por juntamente com o Prof. Carlos ter permitido a minha participação no primeiro intercâmbio de pesquisa com a Universidade de Aachen, por ser um exemplo na área de lasers em odontologia e por ter nos permitido condições para realização dos experimentos.

AGRADECIMENTOS

À pesquisadora **Marycel Elena Barboza Cotrim** responsável pelo laboratório de Química Inorgânica do Centro de Química e Meio Ambiente (CQMA) do IPEN, pelas análises em espectrometria de emissão óptica com plasma de argônio.

Às químicas **Cristina Sisti, Augusta e Cleide** do CQMA, pelo auxílio no preparo da solução tampão utilizada, mas acima de tudo pelo carinho com que me receberam.

À técnica **Neuza**, pela ajuda com a vidraria.

À Profa. Dra. **Martha Simões Ribeiro**, por todas as vezes que me ajudou no período noturno e por ter se tornado uma pessoa tão querida.

À Profa Dra. **Sônia Licia Baldochi**, pelas importantes contribuições na discussão deste trabalho.

Ao Prof. Dr. **Luciano Bachmann**, pela maneira gentil com que fez grandes contribuições na discussão deste trabalho e por seu exemplo profissional.

Ao **Nildemar** e ao **Celso**, pela realização das imagens em microscópio eletrônico de varredura.

À **Patrícia Buttler**, responsável pelo laboratório de histologia do Departamento de Odontologia Conservadora, Periodontia e Odontologia Preventiva da Universidade RWTH Aachen, pela atenção e confiança durante a realização dos experimentos em seu laboratório.

À minha amiga **Karen Muller Ramalho**, pela ajuda com os primeiros experimentos em Aachen, por todo o incentivo nos momentos difíceis e por sua uma grande amizade.

Às minhas amigas **Claudia Emilio, Patrícia da Ana e Renata Rocha**, por terem sido grandes companheiras, pelas diversas vezes em que me ajudaram, pelas idéias e pelo apoio.

Ao meu amigo **Renato Prates**, por todas as vezes que me ajudou neste último semestre.

Aos meus amigos do Centro de Lasers e Aplicações (CLA) do IPEN, **Adriana, Dani, Luiz Cláudio, Aécio, Cassius, Ilka, Edu e Thiago**

Aos meus sogros **Carlos Ronaldo e Tânia Regina**, por tudo que já fizeram por mim e pelo incentivo na realização deste trabalho.

As minhas amigas de sempre **Koga, Teca, Dri, Di, Dê, Mi, Jú, Má** e em especial a **Ana Elisa e Beta** que contribuíram de forma direta com este trabalho.

À secretária **Elza** pelas orientações prestadas.

À **Ilze, Vera, Ana e Fernando** pela valiosa ajuda em todos os momentos do curso.

Ao estatístico **Kim Samejima Lopes**, pelos serviços prestados.

Ao **Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN)** e em especial ao **Centro de Lasers e Aplicações (CLA)** pela infra-estrutura para realização deste trabalho.

Ao **Departamento de Dentística e ao Laboratório Especial de Lasers em Odontologia (LELO)** da **Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP)** pelo uso dos laboratórios em algumas etapas do experimento.

À **Universidade RWTH Aachen** e em especial ao **Departamento de Odontologia Conservadora, Periodontia e Odontologia Preventiva** por terem autorizado a minha matrícula, acesso aos laboratórios e a realização dos experimentos.

Ao **PROCAD/CAPES** e ao **CEPOF/FAPESP**.

À **CAPES** pela bolsa de mestrado concedida

"O que nos impede na maioria das vezes de ter o que queremos, de ser o que sonhamos, de fazer o que pensamos é aceitar com o coração, é a ousadia que não cultivamos".

(Clarice Lispector)

POTENCIAL DE INIBIÇÃO DA PROGRESSÃO DE CÁRIE ARTIFICIAL POR IRRADIAÇÃO SUB-ABLATIVA COM LASER DE CO₂ PULSADO EM ESMALTE DENTAL BOVINO.

MARCELLA ESTEVES OLIVEIRA

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar se a irradiação sub-ablativa de esmalte bovino com laser de CO₂ (10,6µm) pulsado é capaz de produzir redução da susceptibilidade do esmalte à desmineralização, tendo assim um potencial efeito preventivo de cárie. As coroas de 51 incisivos bovinos, incluídas em resina e lixadas até exposição de superfície plana de esmalte, foram utilizadas. As amostras foram cortadas em blocos de 10x10 mm e recobertas com esmalte de unha ácido resistente deixando-se exposta apenas uma janela de 16mm². Três grupos (n=17) foram formados: grupo controle (GC) em que as amostras não foram irradiadas; grupo laser A (LA) e grupo laser B (LB) em que os dentes foram irradiados. As condições foram: para LA 60 mJ, 100Hz, 0,3 J/cm² e 135 mJ, 74 Hz e 0,7 J/cm² para LB. Duas amostras de cada grupo foram submetidas à análise em MEV e quinze foram submetidas à desmineralização em 3 ml de solução de acetato tampão (0,1 mol/l) de pH 4,5 a 37°C por 24h, sob agitação constante. Removidas as amostras da solução, o conteúdo de cálcio e fósforo dissolvido foi medido em espectrometria de emissão óptica com plasma de argônio e mais duas amostras de cada grupo foram submetidas à análise em MEV. As médias das concentrações cálcio e fósforo em µg/ml e a razão molar Ca/P obtidas foram: GC (367,88 ± 33,47; 168,91 ± 14,55; 1,70 ± 0,07), LA (372,70 ± 41,70; 161,46 ± 15,26; 1,79 ± 0,07) e LB (328,87 ± 24,91; 145,02 ± 11,04; 1,77 ± 0,05). A análise estatística ANOVA revelou haver diferença estatística entre os grupos para as medidas de [Ca], [P] e Ca/P (p<0,05). O teste de Tukey mostrou que tanto para as quantidades de cálcio quanto de fósforo, as médias do grupo LB foram estatisticamente menores que dos demais grupos (p<0,001), e entre LA e controle não existe diferença significativa. Já a comparação da razão molar Ca/P, revela que as médias dos grupos LA e LB são estatisticamente maiores que a do grupo controle (p<0,01) não havendo diferença significativa entre os dois grupos irradiados. As observações em MEV revelaram nas amostras irradiadas, superfícies mais lisas e menos porosas que as do grupo controle. Após desmineralização, as superfícies controle e irradiada com 0,3 J/cm² apresentaram nitidamente um aumento da porosidade do esmalte e maior dissolução dos prismas. Na superfície irradiada com 0,7 J/cm² a dissolução dos cristais se mostra mais branda e com poucas porosidades, porém apresentando aparentemente a formação de cristais de apatitas deficientes em cálcio. A partir dos resultados obtidos é possível concluir que a irradiação de esmalte bovino com laser de CO₂ (10,6 µm) pulsado com 0,7 J/cm² é capaz de reduzir a solubilidade ácida do esmalte, com ausência de danos na superfície, sendo portanto um potencial método de inibição da cárie.

POTENTIAL OF SUB-ABLATIVE PULSED CO₂ LASER IRRADIATION ON INHIBITION OF ARTIFICIAL CARIES-LIKE LESION PROGRESS IN BOVINE DENTAL ENAMEL

MARCELLA ESTEVES OLIVEIRA

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate whether sub-ablative pulsed CO₂ laser (10,6 μm) irradiation is capable of reducing the susceptibility of the dental enamel to demineralization, and thus achieving a potential caries-protective effect. The crowns of 51 bovine front teeth, embedded in acrylic resin and polished until exposure of flat enamel surface, were used. The samples were cut in cubes of 10x10 mm, and totally coated with acid-resistant nail varnish, except for an enamel exposed window of 16 mm square. Three groups (n=17) were obtained: control group (CG) not irradiated; group laser A (LA) and group laser B (LB) where the samples were irradiated. The conditions were 60mJ, 100 Hz, 0,3 J/cm² for LA and 135 mJ, 10 Hz, 0,7 J/cm² for LB. Two samples of each group were submitted to SEM analysis and fifteen to demineralization in 3 ml acetate buffer solution (0,1mol/L) with pH 4,5 for 24h at 37 °C, with regular agitation. After the specimens were removed from the solution, the calcium and phosphorous content were measured with an inductively coupled plasma optical emission spectrometer and 2 more samples of each were submitted to SEM analysis. The obtained Ca and P means in μg/ml and the calculated Ca/P molar ratio were: CG (367,88 ± 33,47; 168,91 ± 14,55; 1,70 ± 0,07) ; LA (372,70 ± 41,70; 161,46 ± 15,26; 1,79 ± 0,07) e LB (328,87 ± 24,91; 145,02 ± 11,04; 1,77 ± 0,05). The ANOVA statistical test revealed statistically significant difference for [Ca], [P] e Ca/P content between the groups (p<0,05). The Tukey test results showed that LB had significantly lower means of Ca and P content in demineralization solution than the other groups (p<0,01), and between LA and control there wasn't statistically significant difference. For the Ca/P molar ratio LA and LB means were significantly higher than the control (p<0,01) and there wasn't statistical difference between the two irradiated groups. SEM observations of the irradiated samples showed less porous and smoother surfaces than the control. After demineralization the control and LA samples showed greater porosity and higher enamel rods dissolution. At the LB mild surface dissolution, presenting less porosity and with formation of crystals suggesting the presence of Ca-deficient apatites. In summary, it can be concluded that the 0,7J/cm² pulsed CO₂ laser irradiation of bovine enamel was capable of reducing the enamel acid solubility without causing damage to the surface and therefore is a potential method of caries prevention.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVOS	16
3 REVISÃO DA LITERATURA	17
3.1 O dente	17
3.1.1 Composição e estrutura do esmalte	17
3.2 A cárie dental	19
3.2.1 Cárie de subsuperfície de esmalte	21
3.2.2 Produção de ácidos na placa bacteriana	21
3.2.3 Fenômeno de desmineralização – remineralização	23
3.3 Prevenção da cárie	25
3.3.1 Métodos de prevenção da cárie	27
3.4 Interação <i>laser</i> tecido	27
3.4.1 <i>Lasers</i> de CO ₂	29
3.4.2 <i>Lasers</i> de CO ₂ na Prevenção da Cárie	30
4. MATERIAIS E MÉTODOS	38
4.1 Amostras	38
4.2 Parâmetros <i>laser</i>	39
4.3 Desmineralização das amostras	40
4.4 Análise das concentrações de cálcio e fósforo	41
4.5 Microscopia eletrônica de varredura	43
4.6 Cálculos de temperatura na superfície	44
5. RESULTADOS	45
5.1 Resultados análise das concentrações cálcio e fósforo	45
5.2 Resultados Microscopia Eletrônica de Varredura	53
5.3 Resultados das estimativas de temperatura de superfície	58
6. DISCUSSÃO	59
7. CONCLUSÕES	68
APÊNDICE A – Microscopia de luz polarizada de esmalte bovino	69
ANEXO A – Gráfico da dispersão das leituras de cálcio e fósforo	70
ANEXO B – Análise estatística descritiva de pontos discrepantes	71
ANEXO C – Análise estatística removendo-se pontos discrepantes	72
ANEXO D – Análises de resíduos das leituras	73
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

GaAs	Arseneto de gálio
GAAIAs	Arseneto de gálio alumínio
bar	bar – unidade de pressão (10^5 Pascals)
Ca	cálcio
Ca/P	razão cálcio fósforo
°C	graus Celsius ou graus centígrados
Cl	cloro
cm	centímetros
cm ⁻¹	1 por centímetro
cm ²	centímetros quadrados
CO ₂	dióxido de carbono
CO ₃	carbonato
DP	desvio-padrão
Er:YAG	óxido de ítrio e alumínio dopado com érbio (Y ₃ Al ₅ O ₁₂)
Er,Cr:YSGG	óxido de ítrio escândio gálio dopado com érbio e codopado com cromo (Y ₃ Sc _x Ga _{x-1} O ₁₂)
EUA	Estados Unidos da América
F	flúor
g	grama
Hz	hertz
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
J	joule
J/cm ²	joule por centímetro quadrado
ICP-OES	espectrometria de emissão óptica com plasma de argônio
K	potássio
λ	lâmbda
l	litro
Mg	magnésio
mJ	milijoule
m	metros
μg/ml	micrograma por mililitro
μm	micrometro
MEV	microscopia eletrônica de varredura
μs	microssegundo
mg	miligrama
ml	mililitro
mm	milímetro
m ⁻¹	1 por minuto
mol	mol – unidade de quantidade de matéria
mol/l	mol por litro
Na	sódio
Nd	neodímio
NIST	<i>National Institute of Standard and Technology</i> . Agência federal norte-americana que desenvolve medidas, padrões e tecnologia para a indústria.

P	fósforo
pH	logaritmo negativo da concentração hidrogeniônica ($-\log[H^+]$)
ppm	partes por milhão
PO ₄	fosfato
%	porcentagem
rpm	rotação por minutos
s	segundos
W	watts
≈	aproximadamente

1. INTRODUÇÃO

A cárie dental é uma doença infecciosa complexa que afeta uma larga porção da população mundial, independente de gênero, idade e etnia, com tendência a afetar mais indivíduos com um status sócio-econômico baixo. Além disso continua sendo o maior problema de saúde oral, na maioria dos países industrializados, afetando de 60 a 90% das crianças e a grande maioria dos adultos^{1,2}.

A doença vem apresentando um forte declínio em crianças e adolescentes, porém o mesmo não tem sido observado em adultos e idosos. O percentual de idosos edêntulos está sofrendo uma considerável redução, porém os dentes remanescentes acabam apresentando maior o risco de desenvolvimento de novas lesões de cárie, principalmente na superfície radicular³.

Muito se avançou no conhecimento da doença e de sua etiologia, com o estabelecimento de seu caráter infeccioso e multifatorial. Porém, mesmo com o conhecimento deste conjunto de fatores que, se presentes de forma concomitante e com certa freqüência no tempo, levam ao aparecimento de lesões, ainda não foi possível a erradicação da doença⁴.

Diante desta etiologia multifatorial, muitos métodos preventivos têm sido propostos. Alguns atuando no fator bacteriano, portanto tentando reduzir ou eliminar a microbiota cariogênica (controle químico da placa), outros com foco na dieta, objetivando introduzir adoçantes menos cariogênicos que a sacarose e, por fim, os que tem como alvo o aumento da resistência do hospedeiro (dente), através da diminuição da solubilidade do esmalte. Entre estes últimos, pode-se citar o uso do flúor, das recentemente sugeridas pastas de hidroxiapatita sintética, e dos *lasers*^{5, 6, 7}.

O *laser* como método preventivo atua no fator hospedeiro susceptível (dente), buscando mudanças na estrutura do esmalte que possam torná-lo menos susceptível à desmineralização, que em última instância é o que provoca a cavitação.

Os primeiros estudos avaliando o uso dos *lasers* na prevenção da cárie foram realizados na década de 60^{8, 9, 10}. Neste período os *lasers* utilizados foram os *lasers* de rubi e de CO₂, porém mais tarde outros comprimentos de onda como

os dos *lasers* de neodímio, argônio e holmio foram testados com o mesmo intuito^{11, 12, 13}. Atualmente, os *lasers* de érbio (Er:YAG e Er,Cr:YSGG) e os de CO₂ pulsados tem sido os mais intensamente pesquisados, devido a maior afinidade destes pelos componentes do esmalte^{14,15, 16, 17, 18}.

Sabe-se que para que o *laser* promova efeitos no tecido é preciso que parte da sua energia seja absorvida, e no caso dos efeitos de alta fluência, transformados em calor¹⁹. Portanto, quanto maior a absorção maiores serão os efeitos. Por esse motivo, acredita-se que os *lasers* de CO₂, que têm comprimentos de onda (9.3, 9.6, 10.3 e 10.6 μm) altamente absorvidos pela hidroxiapatita e água, possam promover com uma maior efetividade os efeitos preventivos desejados.

Os efeitos das alterações térmicas na solubilidade ácida do esmalte dental são bastante estudados, e também explicam os efeitos do *laser*. O aquecimento do esmalte entre 300 e 400°C, revela diminuição da solubilidade do esmalte e menores profundidades de desmineralização^{20, 21}. Porém, o efeito ótimo de inibição de cárie pode ser atingido entre 600-1000°C ou em torno de 800°C, pelo aquecimento da superfície de esmalte por *laser*^{22, 23}.

Existem várias possibilidades para se obter a redução da solubilidade ácida do esmalte após aquecimento. Uma delas é a redução da permeabilidade do esmalte, justificada por evidências de menor permeabilidade do esmalte à água após aquecimento²¹. Outra forma pode se dar, pela ocorrência de alterações químicas que tornam o esmalte menos solúvel. Neste caso, a presença de alguns íons está alterada, com uma maior presença de hidróxidos e pirofosfatos e menor de carbonatos, após a irradiação *laser*^{24, 26}. Esta perda de carbonato tem sido diretamente correlacionada redução da solubilidade ácida, em esmalte irradiado por *laser*.

Embora, o mecanismo exato pelo qual a irradiação *laser* pode reduzir a susceptibilidade do esmalte à desmineralização ainda esteja em fase de estudo, os *lasers* podem representar uma excelente ferramenta na prevenção da doença cárie. Uma vez que o flúor, principal agente utilizado na prevenção da doença, foi capaz de promover um forte declínio na prevalência de cáries, mas não foi capaz de erradicá-la. Além disso, nem todos os sítios de desenvolvimento da doença tem sido igualmente afetados por esse declínio, sendo que as cáries oclusais tem mostrado um declínio mais lento, que as de superfícies lisas^{4, 25}. Portanto,

parece razoável que a utilização dos *lasers* possa vir a contribuir com a redução do índice de cáries, principalmente nestes locais menos protegidos pela utilização do flúor.

O *laser* escolhido para este propósito foi o *laser* de CO₂ devido à sua grande absorção pela hidroxiapatita e, portanto pela maior possibilidade de produzir os efeitos desejados. O aparelho escolhido permite a emissão de um feixe pulsado da ordem de centenas de microsegundos, que pode trazer grandes vantagens no que diz respeito à segurança de sua utilização *in vivo*. Dado que o intervalo entre seus pulsos podem permitir o relaxamento térmico do tecido, limitando o aquecimento às camadas superficiais²⁶.

Apesar da absorção da hidroxiapatita no comprimento de 10,6 μm ser cerca de 10 vezes menor (800 cm^{-1}), que em 9,6 μm (8000 cm^{-1}), comprimento mais absorvido do espectro eletromagnético, e de a maior parte dos estudos de prevenção de cáries com *laser* ter se concentrado neste comprimento de onda mais absorvido, alguns estudos já relataram melhores resultados de diminuição da solubilidade do esmalte com a irradiação em $\lambda=10,6\text{ }\mu\text{m}$. Dessa forma, tanto pela menor exploração dos possíveis efeitos deste comprimento, quanto pelos indícios de melhor efetividade, o comprimento de 10,6 μm do *laser* de CO₂ foi escolhido para este estudo^{27, 28, 29}.

O equipamento utilizado ainda não apresenta configurações próprias para condições clínicas, pois foi inicialmente desenvolvido com propósitos industriais. Portanto, estes são os primeiros passos na busca de parâmetros que permitam sua utilização clínica.

2. OBJETIVOS

O objetivo deste estudo foi avaliar se a irradiação sub-ablativa de esmalte dental bovino com um protótipo de *laser* de CO₂ (10,6 μm) pulsado é capaz de produzir redução na susceptibilidade do esmalte à desmineralização.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 O dente

O dente é uma estrutura composta, que apresenta em sua composição tecidos duros e tecidos moles. Dentre os tecidos duros estão o esmalte, camada mais externa que recobre a coroa, a dentina que se situa sob o esmalte na região da coroa e sob o cemento na região da raiz e o cemento, camada mais externa que recobre a raiz. Na porção mais interna do dente está localizada a polpa, tecido vivo em que estão presentes vasos sanguíneos e nervos.

3.1.1 Composição e estrutura do esmalte

Dentre os tecidos mineralizados atualmente conhecidos, o esmalte é o mais densamente mineralizado, apresentando em sua constituição cerca de 95% de mineral, 2% material orgânico e 3% de água em peso^{30, 31}. Esse conteúdo mineral constitui-se basicamente de cristais de hidroxiapatita, também encontrados em ossos, cartilagens calcificadas, dentina e cemento.

Os cristais presentes no esmalte estão dispostos de maneira muito organizada em longos prismas na forma de bastões. Esses bastões apresentam formato aproximadamente cilíndrico e a maior parte dos cristais no seu interior, se apresenta disposta paralela ao eixo longitudinal do bastão. Na região entre os bastões, os cristais são orientados em uma direção diferente daquela do bastão. Em corte transversal estas estruturas têm uma aparência de "buraco de fechadura"^{32, 33}.

Os prismas são a maior unidade deste tecido, apresentando diâmetro de aproximadamente 5 μm , enquanto os cristais, que o formam, possuem aproximadamente 1000 nm de comprimento e 40 nm de diâmetro³⁴. Entre os cristais existem estreitos espaços preenchidos com material orgânico e água, que formam uma fina rede para difusão e trocas³⁰.

Os prismas tendem, em geral, a seguir uma trajetória perpendicular tanto à superfície do dente quanto ao limite amelo-dentinário. Na região central da parte superior do cilindro (cabeça do prisma) os cristais encontram-se paralelos entre si e ao longo eixo do prisma. Já na porção inferior do cilindro ("cauda" do prisma) esses cristais se inclinam desviando-se do alinhamento com o eixo.

Sendo assim, os cristais da região da cabeça, são dirigidos perpendicularmente à superfície do esmalte enquanto que na região da cauda eles se posicionam obliquamente à superfície do esmalte.

A apatita é o nome genérico para uma classe de minerais com arranjo cristalino característico. Por consequência, a hidroxiapatita é apenas um exemplo da classe desses minerais de apatita.

Genericamente, os cristais de fosfato de cálcio presentes na estrutura do esmalte tem sido denominados de hidroxiapatita e representados pela fórmula básica $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, porém a estrutura do esmalte não é composta puramente de hidroxiapatita, mas também de outras fases, como as hidroxiapatitas carbonatadas, ou seja, apatitas que apresentam carbonato (CO_3^{-2}) substituindo o grupo OH, $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6 \text{CO}_3]$ ^{31, 35}.

Além do carbonato, maior impureza que representa cerca de 3,5% da hidroxiapatita, outros íons podem atuar como substituintes na sua fórmula química. Os íons sódio, potássio e magnésio podem ser observados como substituintes do cálcio e os íons flúor, HPO_4^{-2} , cloro e água podem ser observados como substituintes do fosfato^{24, 36}.

Como o esmalte apresenta quantidade considerável de carbonato em sua composição, o que pode ser visto na Tabela 1, alguns autores preferem caracterizar sua estrutura mineral como uma hidroxiapatita carbonatada. Além disso, a denominação hidroxiapatita pode levar a distorções simplistas e de homogeneidade de composição que não condizem com a complexa estrutura química desses minerais^{35, 36}.

A composição do esmalte na maturidade vai depender da concentração dos íons presentes nas várias etapas do seu desenvolvimento. Sendo um sistema quimicamente ativo, o esmalte participa de uma série de reações, incluindo troca de íons com a saliva, que fazem com que sua composição varie tanto de indivíduo para indivíduo quanto dentro de um mesmo dente³⁷.

A distância da superfície dentária também pode provocar variações na composição da estrutura, sendo, por exemplo, a concentração de flúor maior nas camadas mais próximas da superfície e, inversamente, a concentração de carbonato menor à medida que se dirige da junção amelo-dentinária para a superfície do dente³⁷.

Tabela 1- Comparação entre a composição do esmalte e a das apatitas puras.
Adaptado de ³¹

<i>Cristal</i>	% em Peso					<i>Ca/P Molar</i>
	<i>Ca</i>	<i>Mg</i>	<i>Na</i>	<i>P</i>	<i>CO₃</i>	
Hidroxiapatita carbonatada	37,78	0,30	0,83	18,00	3,3	1,65
Hidroxiapatita pura	38,84	0,0	0,0	18,52	0,0	1,67

A presença do carbonato leva a alterações importantes da estrutura cristalina do esmalte, pois, sendo o conteúdo de carbonato na apatita inversamente proporcional ao tamanho do cristal, quanto maior for o conteúdo de carbonato, menor será o tamanho do cristal de apatita formado. Além disso, também ocorre um aumento da solubilidade dessas apatitas frente aos ácidos, o que é relevante do ponto de vista clínico, pois pode levar a uma maior susceptibilidade deste esmalte à desmineralização^{31, 38}.

A hidroxiapatita carbonatada após desmineralização pode se remineralizar formando a hidroxiapatita pura, ou, na presença de íons flúor, fluorapatita. Essas remineralizações tornam a estrutura cada vez mais ácido resistente, pois a hidroxiapatita pura é mais resistente à dissolução ácida do que a carbonatada e a fluorapatita é mais resistente do que as duas anteriores. Cabe ressaltar, que a fluorapatita também forma cristais maiores e mais estáveis quimicamente que ambas hidroxiapatitas. Fica claro, dessa forma, que o carbonato e o flúor apresentam efeitos antagonistas tanto na estrutura cristalina como na solubilidade do esmalte^{31, 35, 39,40}.

3.2 A cárie dental

A doença cárie é de natureza infecciosa, porém multifatorial e dinâmica. O processo de cárie depende da interação entre quatro fatores: microorganismos (bactérias acidogênicas), hospedeiro susceptível (característica da estrutura dental, saliva e hospedeiro), substratos (carboidratos fermentáveis da dieta) e o tempo. Portanto, a presença isolada de qualquer um dos fatores não é capaz de levar ao desenvolvimento da doença. Mesmo, a existência dos três primeiros

fatores concomitantemente, não resulta em perda mineral instantânea, pois ainda assim, é necessário que essa situação perdure por algum tempo para que ocorra desmineralização^{32, 41}.

A desmineralização em si é provocada pela simples presença de ácidos na placa, que causa queda de pH e perda de mineral dos dentes para a saliva. No entanto, o conceito atual com relação à formação de cárie é que a lesão, clinicamente visível ou detectável, é o resultado do acúmulo de inúmeros episódios de desmineralização e remineralização, ao invés de um processo unidirecional de desmineralização^{42,43}.

A colonização bacteriana é fundamental para que se instale a cárie. Animais totalmente livres de microorganismos, mesmo na presença de dieta altamente cariogênica, e em ausência de remoção da placa, não desenvolvem cárie. As bactérias capazes de fermentar carboidratos, produzir ácidos como subproduto e ainda sobreviver no meio ácido criado, são os *Streptococcus mutans* e os *Lactobacillus*. Em lesões de cárie ativas, estes microorganismos são encontrados em grande número^{44, 45, 46, 47}.

Uma grande variedade de microorganismos, incluindo os acima citados, coloniza a superfície do dente formando uma massa mole, concentrada e aderente, chamada placa dental. Na placa também estão presentes proteínas, lipídeos, água e alguns minerais, como Ca, P, K, Mg, Na, Zn, Cu, Pb, Fe, Li, Sr, F, Al. Do ponto de vista da sobrevivência bacteriana, as superfícies duras preferencialmente colonizáveis são aquelas que não estão continuamente expostas ao desgaste mecânico e as forças de cisalhamento durante a função oral. Portanto, os acúmulos acontecem preferencialmente no esmalte ao longo da gengiva e nos sulcos e fissuras da oclusal dos dentes, sendo estes últimos também os locais mais susceptíveis a ocorrência de lesões cariosas^{48, 49}.

Os carboidratos da dieta são a principal fonte de energia das bactérias (via de produção de ATP) e se constituem em substratos essenciais para a síntese de polissacarídeos extracelulares utilizados como material de reserva. Tanto os carboidratos de resíduos alimentares que permanecem na cavidade oral quanto aqueles liberados por glicoproteínas salivares podem ser facilmente utilizados pelas bactérias para obtenção de energia. As bactérias metabolizam a glicose e frutose através de vias fermentáveis, devido ao meio ambiente anaeróbio no qual a maioria dessas bactérias cresce^{45, 48}.

Atualmente, o mecanismo de formação da cárie é bem conhecido, apesar dos diversos aspectos envolvidos. Visto que essa é uma doença multifatorial e que ainda não pode ser completamente evitada, o estudo sobre qualquer um dos principais fatores envolvidos permite que novos métodos de prevenção sejam explorados.

3.2.1 Cárie de subsuperfície de esmalte

A primeira evidência de cárie pode ser vista, macroscopicamente, no esmalte sob o aspecto de uma mancha branca. A superfície do esmalte, nestes casos encontra-se intacta, não sendo possível distingui-la do esmalte sadio adjacente, a não ser pela opacidade aumentada. Porém, abaixo dessa superfície o esmalte já se encontra desmineralizado⁵⁰.

Esse tipo de lesão apresenta quatro zonas. A zona translúcida (40 μ m espessura), primeira região a apresentar alterações em relação ao esmalte sadio, apresentando 1% de porosidades; zona escura, onde o volume dos poros presentes na zona anterior já está aumentado, perfazendo um total de 5%; a zona denominada corpo da lesão, em que é observada maior desmineralização (25%) e aumento da parte orgânica; por fim a zona de superfície intacta, que corresponde ao esmalte superficial intacto apenas com seu índice de birefringência alterado⁵¹.

Esse tipo lesão é reprodutível em laboratório através de protocolos de desmineralização ácida, seguidos ou não de remineralização. Neste estudo, este será o tipo de lesão utilizado, lesões incipientes. Como, mesmo as grandes lesões de cárie, se iniciam como uma lesão incipiente, este estudo se concentrará na prevenção deste tipo de lesão.

3.2.2 Produção de ácidos na placa bacteriana

É comprovado que a produção de íons hidrogênio (ácido), pelas bactérias da placa, apresenta um papel essencial na etiologia da cárie. Entretanto, a natureza dos ácidos formados é importante para a compreensão do processo carioso, pois se sabe que quanto maior a constante de dissociação do ácido formado (KA) maior será a taxa de dissolução do esmalte⁵².

Algumas das bactérias da placa, presente na superfície dos dentes, produzem ácidos como subprodutos do seu metabolismo, e são conhecidas como

bactérias acidogênicas. Os ácidos produzidos por elas, quando metabolizam carboidratos fermentáveis são, predominantemente, ácido láctico, acético e propiônico^{39, 53, 54, 55}.

Na verdade, a placa em repouso, não exposta a alimentos pelo menos por duas horas, contém principalmente os ácidos voláteis, acético e propiônico, apresentando pH levemente ácido. Ambos isômeros do ácido láctico representam 10% do total de ácidos detectáveis. Porém, cinco minutos após exposição à sacarose ou glicose, as concentrações de ácido láctico aumentam consideravelmente, perfazendo 60% do total de ácidos detectáveis^{56, 57}.

Os três ácidos citados são particularmente os causadores da cárie, porque se difundem para dentro do esmalte e então se dissociam em íons hidrogênio. A quantidade real de ácido dependerá da rapidez pela qual ele é removido pelas espécies *Veillonella*, bactérias consumidoras do mesmo, e que também podem estar presentes na placa. O íon hidrogênio interage com o bicarbonato, e bases salivares e se ainda fica em excesso, causa queda do pH. Um pH baixo seleciona bactérias acidogênicas, como o *S. mutans* e *Lactobacillus*, e promove a solubilização do esmalte⁵⁸.

A presença destes microorganismos capacita a placa a continuar gerando ácido em pHs que são inibidores de membros da flora não-cariogênica. Portanto, forma-se um ciclo vicioso, onde quanto mais cai o pH, maior é o favorecimento das bactérias que mais produzem ácido⁵⁹.

O pH reduzido cria condições para o ácido não dissociado de se difundir para dentro do esmalte onde solubiliza a hidroxiapatita, liberando íons cálcio e fosfato. O íon lactato forma complexos com o cálcio, nas camadas da superfície do esmalte, enquanto os íons menores de hidrogênio se difundem para as camadas mais profundas, causando a desmineralização característica da lesão incipiente⁵².

O conteúdo de ácido na interface esmalte-placa-saliva é regulado pela frequência da ingestão da sacarose, pela composição da microbiota da placa, por agentes neutralizantes presentes na saliva e pelo próprio dente. É somente quando os mecanismos homeostáticos da saliva e do dente são sobrepujados por uma produção elevada de íons hidrogênio, que a perda mineral do dente progride para o estágio de cavitação.

Os cristais de hidroxiapatita dissolvem-se no ácido segundo a seguinte reação:



3.2.3 Fenômeno de desmineralização – remineralização

A integridade físico-química do esmalte dental dentro do ambiente oral depende totalmente da composição e do comportamento químico dos fluidos adjacentes. Os principais fatores que controlam a estabilidade da apatita do esmalte são o pH e as concentrações ativas livres de cálcio, fosfato e flúor em solução.

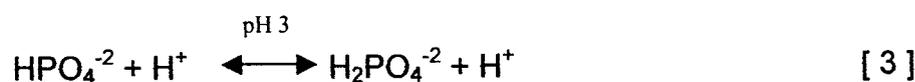
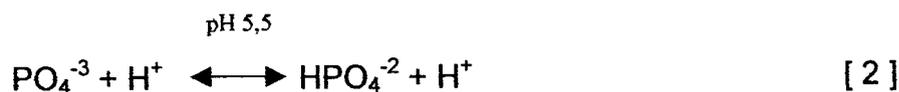
A saliva e o fluido da placa, em condições normais, ficam supersaturados em relação à apatita, do esmalte, o que não evita apenas que o esmalte se dissolva, mas tende até a precipitar a apatita, parte na forma de cálculo e parte em crescimento de cristal na superfície do esmalte das lesões cariosas. Apesar da supersaturação da saliva, o depósito mineral no esmalte intacto e livre de placa não ocorre normalmente. Isso porque proteínas salivares, como a estaterina, inibem a precipitação espontânea e a provocada pela saliva supersaturada⁴⁰.

Em condições de equilíbrio existe uma saturação normal da saliva. Porém ocorrendo desequilíbrio duas situações podem acontecer: a subsaturação e a supersaturação. A subsaturação da saliva em relação à apatita promoverá a dissolução do dente. Já a supersaturação levará ao crescimento de cristais⁶⁰.

Outro aspecto importante com relação ao processo de des e remineralização é o pH da placa. A medida que o pH diminui a solubilidade do fosfato de cálcio aumenta, sendo que na faixa de pH entre 4 e 7, a solubilidade da apatita do esmalte aumenta aproximadamente 10 vezes cada vez que o pH é reduzido em uma unidade³⁹.

O pH crítico, ou seja, aquele no qual a saliva é exatamente saturada no que se refere a apatita do esmalte, se situa em torno de 5,3-5,5. A queda do pH abaixo do pH crítico, pode levar a dissolução do esmalte enquanto que o aumento, acima do valor crítico, tende a promover a remineralização do esmalte⁴².

A presença dos íons fosfato e cálcio na saliva apresenta um papel importante no processo de des-remineralização. Em pH normal, de 6 a 8, a saliva está supersaturada em relação à hidroxiapatita, porém abaixo do pH crítico de 5,5 os íons PO_4^{-3} se juntam ao hidrogênio livre formando HPO_4^{-2} e, assim, o fosfato abandona a superfície do esmalte para que o equilíbrio químico seja mantido, como pode ser observado nas equações [2] e [3] ⁶¹.



O estado de equilíbrio é atingido quando o ácido produzido pela metabolização dos polímeros de reserva é neutralizado pelos tampões salivares e o mineral que deixa o dente. À medida que o pH retorna à neutralidade, o fluxo de íons cálcio e fosfato do dente é favorecido ⁵.

Nesta fase de remineralização, a produção de ácido na placa é mínima ou inexistente, de modo que estas condições favorecem a difusão contínua de íons de cálcio e fosfato para o dente. O íon fluoreto, encontrado invariavelmente em baixos níveis na placa, migra com os íons de cálcio e fosfato e aumenta a formação de hidroxiapatita e fluorapatita na camada superficial do esmalte. Ciclos sucessivos de desmineralização – remineralização levam a um fortalecimento da camada superficial do esmalte com fluorapatita, que, por sua vez, confere a esta camada uma resistência adicional à desmineralização ácida. Se os períodos de remineralização predominam em relação aos períodos de desmineralização, a lesão da subsuperfície se mineralizará e a lesão de cárie será interrompida. Entretanto, se a frequência de consumo de sacarose é grande e o *S. mutans* e/ou *Lactobacillus* vêm a dominar a flora da placa, o processo de desmineralização predomina e ocorre a cavitação ^{32, 43}.

3.3 Prevenção da cárie

Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) a cárie continua sendo o maior problema de saúde oral, afetando cerca de 60 a 90% das crianças e maior parte dos adultos, nos países industrializados, Ásia e América latina².

No Brasil o último levantamento das condições de saúde bucal da população brasileira realizado pelo Ministério da Saúde com o apoio do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), 60% das crianças de até cinco anos de idade, 70% das crianças de 12 anos e cerca de 90% dos adolescentes (15 a 19 anos) apresentam pelo menos um dente permanente com cárie⁶².

Dentre a população idosa, a cárie também tem apresentado uma alta prevalência, sendo considerada o principal problema de saúde bucal das pessoas com mais de 60 anos⁶³. O acentuado declínio da cárie em crianças e adolescentes não tem sido observado em adultos e idosos. Pois, apesar do porcentual de idosos edêntulos estar sofrendo uma considerável redução, os dentes remanescentes acabam apresentando maior o risco de desenvolvimento de novas lesões de cárie, principalmente na superfície radicular. Com isso, não ocorre uma redução do índice CPOD, que passa a ter menor participação do componente "Perdido" e maior participação do(s) componente(s) "Cariado" e/ou "Obturado"^{3,4}.

Para que se chegasse a esses níveis mais baixos de prevalência de cárie muitas posturas e filosofias anteriormente consagradas tiveram que ser alteradas. Desde de que foi demonstrado que a cárie era uma doença bacteriana infecciosa e transmissível, na década de 60, começou a ocorrer uma mudança na filosofia de tratamento dessa patologia^{64, 65}. Praticamente ao mesmo tempo, foi identificado o caráter infeccioso das duas doenças bucais mais prevalentes, o que abalou os alicerces da Odontologia puramente curativa/restauradora.

Percebeu-se a necessidade de identificação e controle das verdadeiras causas, isto é, dos agentes etiopatogênicos. Ficou claro que a mera remoção física do tecido afetado, seguida de sua substituição por um material restaurador, não era um procedimento com força suficiente para controlar os níveis de infecção e a atividade cariogênica presente no ecossistema da boca⁶⁶.

Também a idéia, equivocada, de que uma vez iniciada uma lesão cariosa, ela continuaria a se desenvolver inexoravelmente até que fosse feita uma restauração ou, em último caso, uma extração, foi derrubada. Os conhecimentos atualmente disponíveis sobre o processo cariioso demonstram que o desenvolvimento de uma lesão depende do nível de atividade metabólica das bactérias cariogênicas e também dos vários fatores que podem afetar o sistema saliva-placa-dente ^{42, 44}.

Ainda que, a maioria desses fatores esteja comumente presente na boca dos indivíduos, é preciso que haja uma interação em condições críticas entre eles, por um dado período de tempo, para que possam dar origem a lesões de cárie. Sob esse aspecto, a freqüência e a duração dos episódios de desmineralização são os fatores que, em última análise, vão determinar se as superfícies dentárias permanecerão intactas, se sofrerão lesões cariosas ou se terão paralisadas as lesões previamente desenvolvidas ^{32, 42, 43, 66}. Portanto, fica clara a natureza infecciosa, multifatorial e dinâmica do processo saúde-doença cárie, que também é fortemente influenciado pelas condições sociais, econômicas e culturais dos indivíduos.

Além disso, já foi demonstrado em diversos estudos epidemiológicos, inclusive em países industrializados, que a tentativa de melhorar a saúde bucal da população optando-se por técnicas puramente "curativas", resulta somente na produção de mais restaurações, próteses, cirurgias periodontais e extrações, levando a um ciclo restaurador repetitivo, onde cada vez são maiores as "necessidades" de tratamento, e as reais causas da doença permanecem intocadas ^{67, 68, 69, 70}.

Como conseqüência de todas essas evidências, a Odontologia brasileira e mundial passam por mudanças filosóficas, que estão permitindo a transição de uma abordagem fortemente concentrada em procedimentos invasivos (que se convencionou chamar de "tratamento curativo") para uma abordagem cada vez mais voltada à promoção de saúde e a prevenção de doenças ^{44, 74}.

Pautados nessa filosofia de maior ênfase a prevenção da doença cárie, cresce a idéia de se utilizar, também os *lasers* com essa finalidade.

3.3.1 Métodos de prevenção da cárie

Apesar de haver controvérsias, grande parte dos especialistas acredita que a atual tendência de queda na prevalência e incidência da doença cárie se deve, pelo menos em parte, ao aumento da disponibilidade de flúor tanto na água fluoretada, como em cremes dentais e/ou em aplicações clínicas⁷¹.

O conceito que prevalecia no passado era de que o efeito inibitório do flúor se devia basicamente à sua incorporação na estrutura mineral do dente durante os estágios de desenvolvimento ou anteriormente à sua erupção. Porém, atualmente é sabido que o principal efeito do flúor na prevenção da cárie é pós-eruptivo, acontecendo através das aplicações tópicas, que interferem no equilíbrio dinâmico da interface dente/fluidos orais^{42,72}.

Em soluções supersaturadas, em que o flúor está disponível juntamente com íons cálcio e fósforo, os íons flúor são prontamente incorporados na estrutura da apatita, através de precipitação. A substituição do OH^- pelo F^- , provoca um forte aumento na estabilidade química da estrutura, reduzindo a sua solubilidade. Porém tem sido demonstrado, que os íons flúor do meio induzem apenas curtos períodos de aumento de remineralização, sendo seu principal efeito preventivo obtido pela proteção à desmineralização durante desafios ácidos⁷³.

No entanto, atenção deve ser dada ao fato, de pesquisas epidemiológicas terem demonstrado que a ingestão de água fluoretada é capaz de reduzir a incidência cáries, mas não de erradicá-la⁷⁴.

Atualmente, as cáries de sulcos e fissuras representam a maior parte das cáries observadas nos países ocidentais. Essa ocorrência tem sido relacionada ao fato de o flúor, tanto utilizado em água como em outros produtos fluoretados, não ser tão efetivo em superfície oclusais como em superfícies lisas⁷.

Sendo assim, um método de prevenção, tal como a utilização dos *lasers*, que pudesse atuar especificamente nestes sítios, poderia trazer grandes contribuições para um maior declínio da incidência de cáries.

3.4 Interação *laser* tecido

A luz *laser* ao atingir o tecido alvo pode sofrer quatro fenômenos, reflexão, transmissão, espalhamento e absorção. Na reflexão, a luz ao atingir o tecido alvo é refletida, sem penetrar ou interagir com a superfície. Na transmissão,

a luz atravessa o tecido, sem causar nenhum efeito, como se este fosse totalmente transparente. No espalhamento, ocorre a penetração e o espalhamento da luz no tecido, sem que produza efeitos notáveis. Por fim, na absorção a luz é absorvida por algum componente do tecido e a energia da mesma é transferida⁷⁵.

Apesar de no diagnóstico de cáries por tomografia de coerência óptica o efeito necessário ser o espalhamento (retro espalhamento) na maior parte das aplicações clínicas dos *lasers* o efeito desejado é a absorção⁷⁶.

A ocorrência de absorção promove uma atenuação da intensidade da onda eletromagnética incidente. A absorção ocorre devido à conversão parcial da energia da luz em calor ou em certas vibrações moleculares no tecido. Um meio em que a radiação incidente é praticamente reduzida a zero é chamado de opaco. Contrariamente, um meio que permite que a radiação da luz penetrando e saindo do tecido sejam praticamente a mesma é chamado de transparente^{27, 77}.

A possibilidade de um tecido absorver a radiação eletromagnética depende de vários fatores tais como a constituição da estrutura, o comprimento de onda, a espessura da camada de absorção e a concentração dos absorvedores. A lei que descreve o efeito da espessura do tecido na absorção é Lei de Beer-Lambert que é expressa pela seguinte equação⁷⁷:

$$I(z) = I_0 \exp(-\alpha z) \quad [4]$$

Nesta equação z corresponde ao eixo óptico, $I(z)$ a intensidade na distância z , I_0 a intensidade incidente, α é o coeficiente de absorção do meio. Resolvendo esta equação tem-se:

$$\alpha = \frac{1}{z} \quad [5]$$

Como z é expresso em unidades de distância, o coeficiente de absorção dos tecidos pode ser expresso por cm^{-1} . Portanto, da equação [5] é possível observar que quanto maior o coeficiente absorção de um dado tecido menor a profundidade de penetração da luz no mesmo.

No caso dos *lasers* de alta intensidade, atuando por efeitos fototérmicos uma alta absorção é extremamente desejável, pois permite que grande quantidade de calor possa ser gerada, mas restrita a pequenas

profundidades no tecido, o que pode garantir segurança da sua utilização. Dentre os efeitos fototérmicos nos tecidos incluem-se a vaporização, utilizada em cirurgias, a ablação, utilizada para realização de preparos cavitários e o condicionamento da superfície, com intuito de prevenção da cárie^{35, 78, 79, 80}.

No caso específico da aumento da resistência do esmalte com intuito de prevenção da cárie, a maior absorção de um dado comprimento de onda no esmalte permite que as altas temperaturas necessárias para promoção deste efeito (entre 400 e 1200°C) sejam produzidas, mas apenas em camadas superficiais, permitindo mínima elevação da temperatura pulpar (< 5°C)^{99, 109}.

Os efeitos fototérmicos são observados em fluências elevadas (1 a 10.000 J/cm²) e tempos de exposição curtos (1 a 10⁻⁶ s). As interações fototérmicas podem ser atingidas através da utilização dos *lasers* de alta intensidade, dos mais variados comprimentos de onda. Porém, o coeficiente de absorção de cada comprimento de onda no tecido deve ser inicialmente observado, para que os demais parâmetros que influenciam na interação da irradiação, tais como a densidade de energia, densidade de potência, modo de operação, largura de pulso e frequência possam ser devidamente ajustados e os efeitos obtidos^{77, 78}.

Alguns dos *lasers* de alta intensidade capazes de interagir com o tecido através de efeitos fototérmicos, disponíveis comercialmente para uso em odontologia são: os *lasers* de diodo (arseneto de gálio alumínio e arseneto de gálio - GaAlAs e GaAl)*, Nd:YAG (óxido de ítrio e alumínio dopado com neodímio - Y₃Al₅O₁₂), Er:YAG (óxido de ítrio e alumínio dopado com érbio - Y₃Al₅O₁₂), Er:YSGG (óxido de ítrio escândio gálio dopado com érbio e codopado com cromo Y₃Sc_xGa_{x-1}O₁₂) e CO₂ (dióxido de carbono)⁸¹.

3.4.1 Lasers de CO₂

O *laser* de CO₂ é um *laser* gasoso, que tem no seu meio ativo o gás dióxido de carbono, e que possui várias aplicações em odontologia. Esse *laser* pode emitir, nos comprimentos de onda 9.3, 9.6, 10.3 e 10.6µm, situados na região do infravermelho distante do espectro eletromagnético.

* Os *lasers* de diodo podem emitir desde o ultravioleta até infravermelho próximo, porém os comprimentos disponíveis comercialmente para uso em odontologia emitem na região do vermelho e do infravermelho próximo, sendo os mais comuns os de GaAlAs e GaAs.

Esses comprimentos de onda são altamente absorvidos pela água e hidroxiapatita (Figura 1). Por esse motivo, as primeiras aplicações dos *lasers* de CO₂ em odontologia, foram testadas tanto em tecidos moles, como em tecidos duros. Contudo, devido aos riscos de danos térmicos na polpa as aplicações em tecidos duros permaneceram em estudo enquanto que as aplicações cirúrgicas em tecidos moles foram, já na década de 80, utilizadas clinicamente^{82, 83, 84}.

Na interação do *laser* de CO₂ com os tecidos moles, a alta absorção faz com que a maior parte da energia do feixe seja absorvida em algumas centenas de micrometros da superfície. A energia do feixe quando absorvida pela água do tecido é transformada em calor. Nesse processo, temperaturas acima de 65°C causam coagulação sanguínea e acima de 100°C, o tecido é vaporizado⁸⁵. Apesar do *laser* de CO₂, junto com o *laser* de Nd:YAG terem sido os mais utilizados inicialmente em procedimentos cirúrgicos, atualmente vários outros comprimentos de onda têm sido utilizados com este propósito.

A aplicação dos *lasers* de CO₂ em tecidos duros será abordada de maneira mais detalhada no item número 3.4.2.

3.4.2 *Lasers* de CO₂ na Prevenção da Cárie

A idéia da utilização do *laser* na prevenção da cárie, ao contrário do que se pode pensar, é contemporânea à própria invenção do equipamento. O primeiro *laser* foi desenvolvido em 1960, e já em 1965, Sognnaes e Stern, publicaram o primeiro estudo relatando aumento da resistência ácida do esmalte, após irradiação com *laser* de rubi^{8, 86}.

Como o primeiro *laser* produzido foi um *laser* de rubi, também os primeiros estudos em prevenção foram realizados com este tipo de equipamento. Porém, em 1972 pesquisadores introduzem a utilização de um *laser* de CO₂ pulsado^{9,10}.

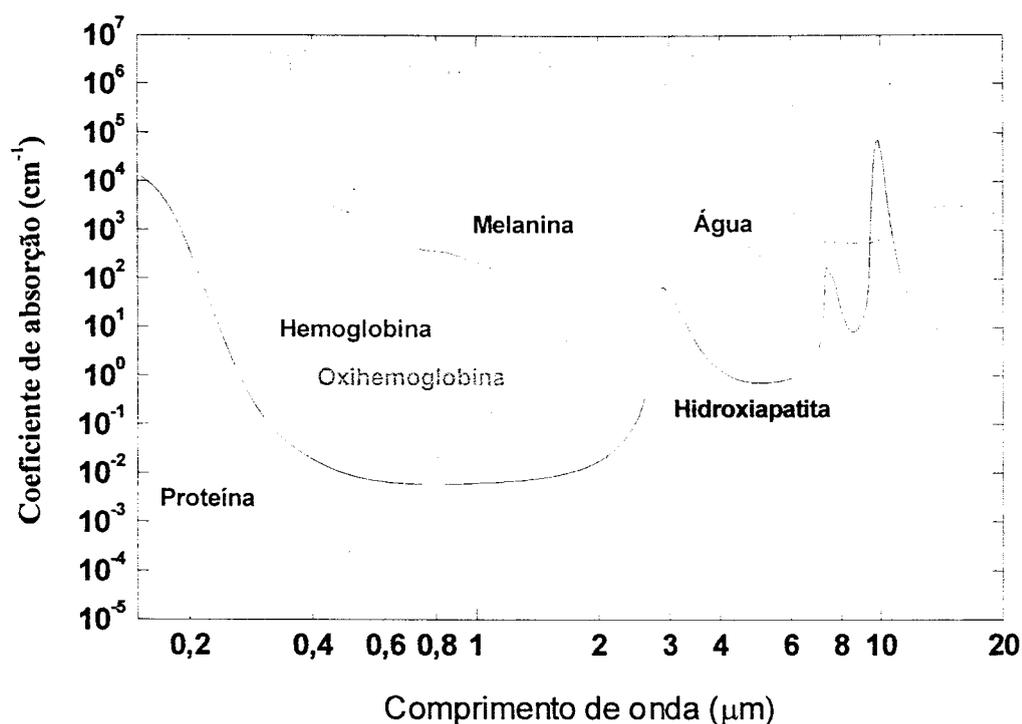


Figura 1 - Espectro de absorção de dos diversos componentes dos tecidos biológicos. A água e a hidroxiapatita apresentam picos de absorção que coincidem com o comprimento de onda dos *lasers* de CO_2 ⁸⁷.

Nessa época já se sabia, que o esmalte dental humano possuía um pico de absorção que se aproximava bastante do comprimento de onda dos *lasers* de dióxido carbono. Fato importante do ponto de vista da redução da quantidade de energia, necessária para provocar o mesmo efeito, ou seja, neste comprimento de onda há uma maior absorção em superfície, portanto menor perda de energia, através de reflexão ou transmissão. Dessa forma, os primeiros estudos com *laser* CO_2 puderam utilizar densidades de energia que eram apenas um décimo das utilizadas com o *laser* de rubi¹⁰.

A fim de avaliar o potencial dos *lasers* na prevenção da cárie, muitos estudos optaram pela utilização de *lasers* de CO_2 operando no modo contínuo. Avaliando a utilização de *lasers* de CO_2 no selamento de sulcos e fissuras, com irradiações de 2 a 5 W ($1,27$ a $2,55 \text{ J/cm}^2$) foi observado fusão das fissuras oclusais na maioria dos espécimens sadios, porém a irradiação em sulcos e

fissuras já cariados revelou em maior aumento, a presença de pequenos poros, no limite entre o esmalte não irradiado e o irradiado⁸⁸.

A temperatura pulpar atingida com irradiações deste tipo, contínuas, se mantém em mesmo nível ou menores que 2°C, quando a potência utilizada é de até 10 W em irradiações de meio segundo (636 J/cm²)⁸⁹.

Segundo trabalho clássico de Zach e Cohen⁹⁰, a elevação da temperatura pulpar acima de 11 °C e 5,5 °C causa danos irreversíveis à polpa em 60% e 18% dos casos respectivamente. No entanto, com elevações de até 2,2°C não existe evidência de danos pulpares irreversíveis. Portanto irradiações que elevem a temperatura pulpar até este nível (2,2°C) são consideradas seguras.

A irradiação com *lasers* de CO₂ contínuos, em dentes humanos, demonstra redução da desmineralização do esmalte em diversos estudos. Entretanto as densidades de energias são geralmente muito elevadas, entre 636 e 1911 J/cm², estando na faixa em que o risco de ocorrência de danos pulpares irreversíveis é elevado^{91, 92, 93}.

O modo de operação contínuo tende a causar aumentos de temperatura no tecido, maiores do que o modo pulsado. Isso porque, à medida que a energia do feixe é depositada no esmalte, ela causa um aumento de temperatura na superfície que se dissipa para o interior do tecido. A chegada contínua de mais calor não permite que a temperatura de superfície diminua muito, pois as camadas subjacentes que poderiam resfriá-la já estão quentes. Sendo assim, aumenta o calor dissipado para o interior do tecido, que tende a atingir uma profundidade cada vez maior⁹⁴.

Essa temperatura elevada de superfície que também se estende para as camadas mais internas aumenta muito o risco desse aquecimento ser elevado em camadas profundas, como no interior da câmara pulpar²⁶. Dessa forma, a utilização de *lasers* pulsados, com centenas de μ s de largura de pulso, parece ser mais segura, pois permite o relaxamento térmico do tecido e, portanto, uma menor dissipação do calor para o interior da estrutura⁹⁵.

Na década de 80, dois estudos utilizando *lasers* de CO₂ pulsados apresentaram resultados conflitantes. O primeiro demonstrou que nas densidades de energia necessárias para promover fusão, não houve redução da permeabilidade do esmalte a diversos íons⁹⁶. Porém, Nelson e colaboradores

(1986) observaram que a irradiação com *laser* de CO₂, 9,3 μm, promoveu redução de 50% de desmineralização do esmalte em relação ao controle ⁹⁷.

Atualmente, sabe-se que a irradiação com *lasers* de CO₂ operando no modo pulsado, com qualquer um dos quatro principais comprimentos de onda, é capaz de inibir a desmineralização do esmalte quando em soluções ácidas ^{5, 22, 28, 29, 98, 99, 100, 101, 102, 103}. Porém, a porcentagem dessa inibição varia para cada comprimento.

O comprimento de 9,3μm e 9,6μm tem demonstrado redução de desmineralização do esmalte entre 50 e 70%, em irradiações com de 5 J/cm² de densidade de energia. Já as irradiações com 10,6μm produzem redução de 85 a 87%, embora com uma densidade de energia cerca de duas vezes maior (12,5 J/cm²), que tende a aumentar a temperatura pulpar ^{28, 29}.

O melhor resultado do comprimento de 10,6μm tem sido observado com cautela, pois nesta fluência (12,5 J/cm²), a temperatura 2 mm abaixo da superfície indica aumento em torno de 10°C. Em fluências mais baixas, nas quais o riscos de elevação da temperatura pulpar é menor, este comprimento de onda ainda é capaz de reduzir a susceptibilidade do esmalte à desmineralização, porém em níveis mais baixos, cerca de 42% para uma fluência de 5 J/cm² ^{26, 104}.

Com fluências ainda mais baixas, 0,3 J/cm², apesar de não existir a identificação do comprimento de onda utilizado, outros autores encontraram cerca de 98% de redução de perda mineral e 93% de redução de profundidade de lesão, após irradiação com *laser* de CO₂ ²².

Contrariamente, estudo recente utilizando fluências muito maiores, 83 J/cm², com comprimento de 10,6μm, também observaram redução da dissolução ácida do esmalte e da profundidade das lesões formadas (46%). Porém com esta fluência alta, foi possível observar em microscopia, sinais de ablação ¹⁰⁵.

Não foram localizados na literatura até a data da defesa desta dissertação, trabalhos específicos, avaliando o aumento de temperatura pulpar após irradiação do esmalte com *lasers* de CO₂ 10,6μm, operando no modo pulsado, em parâmetros subablativos. A maior parte dos trabalhos observa o aumento de temperatura em *lasers* de CO₂ operando no modo contínuo, ou em parâmetros de preparos cavitários ^{106, 128}.

Modificações da microcirculação pulpar, foram observadas, *in situ*, utilizando o comprimento de onda de 10,6 μm , mas com densidades de energia muito superiores as que serão utilizados neste estudo. Com irradiações de 304 a 1440 J/cm^2 , foi possível observar aumento transitório da microcirculação pulpar, sem evidência de danos pulpares irreversíveis ¹⁰⁷.

A avaliação histológica, dos possíveis danos na polpa após irradiação da superfície oclusal de terceiros molares humanos, *in vivo*, com *laser* de CO_2 9,6 μm (1,5 J/cm^2) revelou ausência de sinais de inflamação em todos os cortes histológicos, e em todos os períodos observados, imediato, após uma semana e um mês. Além disso, nenhum paciente tratado relatou sensibilidade após irradiação ¹⁶.

Os possíveis mecanismos pelos quais o *laser* é capaz de aumentar a resistência ácida do esmalte a desmineralização estão fortemente relacionados com a interação da luz com o tecido de maneira eficiente. Sendo assim, quanto maior a absorção da luz pelo tecido maior a probabilidade de se produzirem os efeitos desejados.

A hidroxiapatita, principal mineral do esmalte, apresenta um pico de absorção entre 9-11 μm que coincide com a faixa de comprimento de onda de emissão dos *lasers* de CO_2 . Portanto na faixa de emissão destes *lasers* a luz tende a ser predominantemente absorvida e a conversão em calor, na região superficial pode ser esperada (Figura 2) ¹⁰⁸.

Os efeitos das alterações térmicas na solubilidade ácida do esmalte dental já foram estudados, e também explicam os efeitos de *laser* ¹⁰⁹. O aquecimento do esmalte entre 300 e 400°C, revela diminuição da solubilidade do esmalte e a menores profundidades de desmineralização, e entre 600-1000°C um efeito ótimo de inibição pode ser atingido ^{20, 21}. A temperatura de 400°C em que já há menor desmineralização do esmalte, é a mesma em que tem início a perda de carbonato, e a faixa de efeito ótimo compreende a temperatura em que se tem a completa eliminação do carbonato da estrutura 800°C ^{22, 23}. Portanto a perda de carbonato, que também leva a formação de cristais maiores e mais estáveis quimicamente, tem sido um dos fatores fortemente correlacionados com o aumento da resistência ácida do esmalte ^{26, 31}.

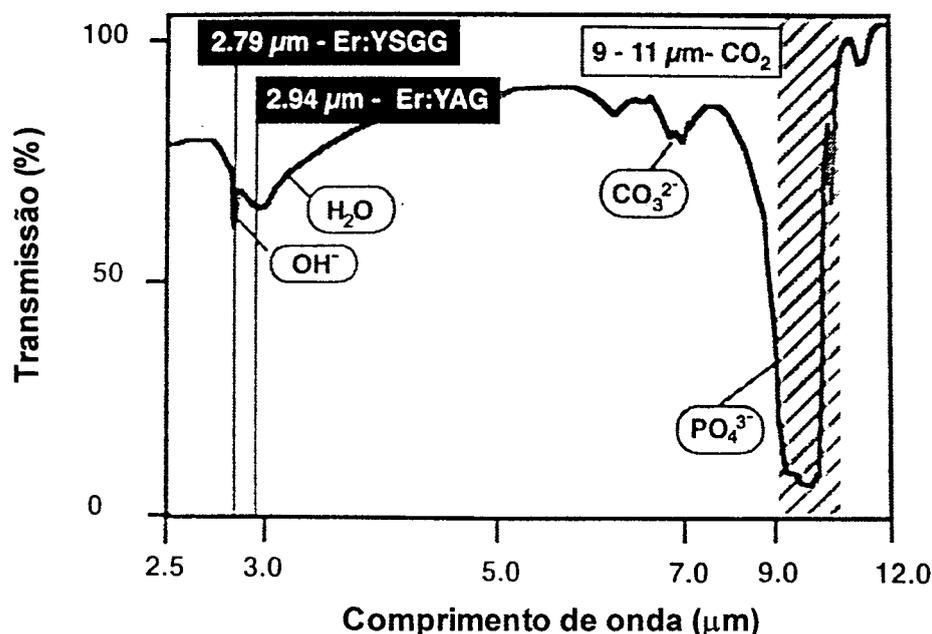


Figura 2 - Espectro de transmissão do esmalte dental, mostrando as bandas de absorção da água, radical hidroxila, carbonato e fosfato. A posição dos *lasers* de dióxido de carbono coincide com as bandas de absorção dos íons fosfato presentes na hidroxiapatita ¹¹⁰.

Existem vários possíveis mecanismos para a redução da solubilidade ácida do esmalte após aquecimento. Podendo ser pela redução da permeabilidade do esmalte, justificada por evidências de menor permeabilidade do esmalte à água após aquecimento ²¹. De outra forma pode se dar, pela ocorrência de alterações químicas que tornam o esmalte menos solúvel. Sendo que, neste caso, a presença de alguns íons está alterada, com uma maior presença de hidróxidos e pirofosfatos e menor de carbonatos, após irradiação *laser* ^{24, 26}.

Porém, existe uma outra possibilidade baseada na alteração da matriz orgânica. Como a matriz orgânica está localizada basicamente, nos espaços inter e intraprismático, e sendo este o exato caminho percorrido pelos íons no processo de desmineralização, a irradiação *laser* pode levar a destruição dessa matriz e os produtos da sua decomposição podem bloquear a passagem dos íons durante o processo de desmineralização ²².

No entanto, embora não esteja completamente claro o mecanismo pelo qual os *lasers* podem reduzir a susceptibilidade do esmalte à desmineralização, estes podem representar uma excelente ferramenta na prevenção desta doença. Visto que, nem todos os sítios de desenvolvimento da doença tem sido igualmente afetados pelo seu declínio e as cáries oclusais tem mostrado um declínio mais lento, que as de superfícies lisas²⁵. Portanto, parece razoável que a utilização dos *lasers* possa vir a contribuir com a redução do índice de cáries, principalmente nestes locais, menos protegidos pela utilização do flúor.

Nas irradiações com intuito de prevenção de cáries, espera-se que a largura de pulso ideal seja próxima ao tempo de relaxamento térmico do tecido. Como, no esmalte, este tempo é de aproximadamente 80 μs , larguras de pulso entre 50 e 100 μs tem sido sugeridas como efetivas e, por esse motivo, foram escolhidas para este estudo^{23, 111}.

Dentro do espectro eletromagnético, apesar do comprimento de onda do *laser* de Er:YAG também apresentar elevada absorção, os comprimentos de onda emitidos pelos *lasers* de CO₂ são os mais absorvidos na hidroxiapatita. Pela Tabela 2 e Figura 3 é possível observar, que dentre esses *lasers*, o comprimento de onda mais absorvido é o de 9,6 μm (8000 cm^{-1}) e o menos absorvido o de 10,6 μm (825 cm^{-1})¹¹².

Porém, o comprimento de 10,6 μm que é cerca de dez vezes menos absorvido, também apresenta uma perda de energia por reflexão, cerca de três vezes menor que o de 9,6 μm ⁹⁴. Além disso, a perda de carbonato, fortemente relacionada com maior resistência do esmalte à desmineralização, se mostra maior no esmalte irradiado com o comprimento de 10,6 μm do que com 9,6 μm ^{27, 28, 26}.

Pelos motivos citados acima e pelo fato de a maior parte dos estudos da literatura se concentrar nos comprimentos de 9,3 e 9,6 μm , o comprimento de 10,6 μm do *laser* de CO₂ foi escolhido para ser testado, neste estudo.

Tabela 2 – Coeficientes de absorção do esmalte nos diversos comprimentos de onda que compreendem a emissão de *lasers*. Refletância dos comprimentos de onda dos *lasers* de CO₂. Adaptado de ^{35, 113}.

Região do Espectro Eletromagnético	Comprimento de Onda	Coefficiente de Absorção (cm ⁻¹)	Refletância esmalte (%)
Visível	450-700 nm	<1	-
	Nd:YAG = 1064 nm	<1	-
Infravermelho próximo	Ho:YAG = 2,10 μm	<20	-
	Er:YSGG = 2,79 μm	450	-
	Er:YAG = 2,94 μm	770	-
	CO ₂ = 9,3 μm	5500	37,7
Infravermelho distante	CO ₂ = 9,6 μm	8000	49,4
	CO ₂ = 10,3 μm	1125	15,8
	CO ₂ = 10,6 μm	825	13,2

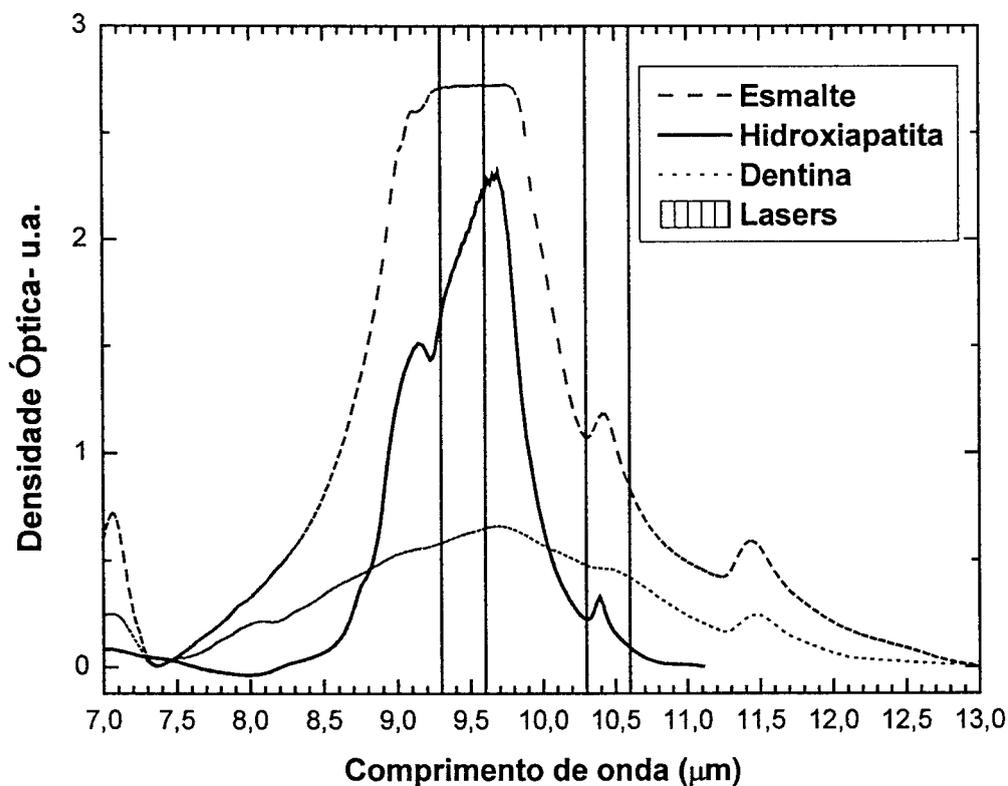


Figura 3 – Espectros de absorção de esmalte, dentina e hidroxiapatita nos comprimentos de onda dos *lasers* de CO₂ ¹¹⁴.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Amostras

Foram utilizados 51 dentes incisivos bovinos recém extraídos, armazenados em água destilada (pH= 6,6) logo após a extração e durante todo o estudo. Todos os dentes tiveram as raízes cortadas com um disco diamantado sob refrigeração. As coroas, devidamente limpas, foram visualmente inspecionadas a fim de assegurar a ausência de cáries e de defeitos estruturais.

Todos os dentes foram incluídos individualmente em resina acrílica e lixados em politriz (Ecomet 3, Buehler Ltd., EUA) até exposição de superfície plana e lisa de esmalte com a seqüência de lixas nº 240, 400 e 600, sob refrigeração com água.

Para a delimitação da área a ser irradiada foram confeccionados perfuradores de papel circulares de inox, com diâmetro de 5 mm. Estes dispositivos permitiram que sessenta e seis etiquetas de papel circulares já com o diâmetro padronizado fossem obtidas e então coladas nas superfícies de esmalte. A área ao redor da etiqueta foi recoberta com esmalte cosmético vermelho. Com o esmalte já seco, todas as etiquetas foram removidas, de forma que em todas as amostras havia apenas uma janela circular de 5 mm de diâmetro, de esmalte exposto.

Em estudo piloto verificou-se não haver diferença no conteúdo de cálcio e fósforo, na solução de desmineralização, de superfícies de esmalte limpas com algodão ou com álcool. Por esse motivo e pelo fato de o álcool ser mais agressivo ao esmalte cosmético, todas as superfícies foram limpas apenas com algodão, a fim de remover possíveis resíduos da cola da etiqueta.

Essa área de irradiação foi determinada a partir do diâmetro do feixe *laser* na amostra, na distância escolhida para irradiação, que neste caso era de 5 mm de diâmetro.

As amostras foram divididas em três grupos de 17 dentes cada, sendo que duas de cada grupo foram utilizadas apenas para observação em microscopia eletrônica de varredura (MEV). As amostras do controle (GC), não foram irradiadas, as dos grupos *laser* A (LA) e as do grupo *laser* B (LB) foram irradiadas pelo *laser* de CO₂ 10,6µm pulsado, parâmetros descritos no item número 4.2 .

Depois de irradiados todas as amostras foram cortados em blocos de 10 x 10 x 2 mm (largura, altura e espessura), sendo que todas as superfícies, excetuando-se a superfície de esmalte vestibular, foram recobertas com esmalte cosmético incolor (Figura 4).

A superfície vestibular novamente recoberta com etiquetas de papel circulares, porém dessa vez com 4,5 mm de diâmetro, foi recoberta com nova camada de esmalte vermelho. Isso permitiu que a área de esmalte anteriormente exposta fosse reduzida, e assim a desmineralização poderia ocorrer em uma área semelhante à utilizada na literatura internacional. Assim como na primeira delimitação de área, depois de removidas as etiquetas todas as superfícies foram limpas com algodão.

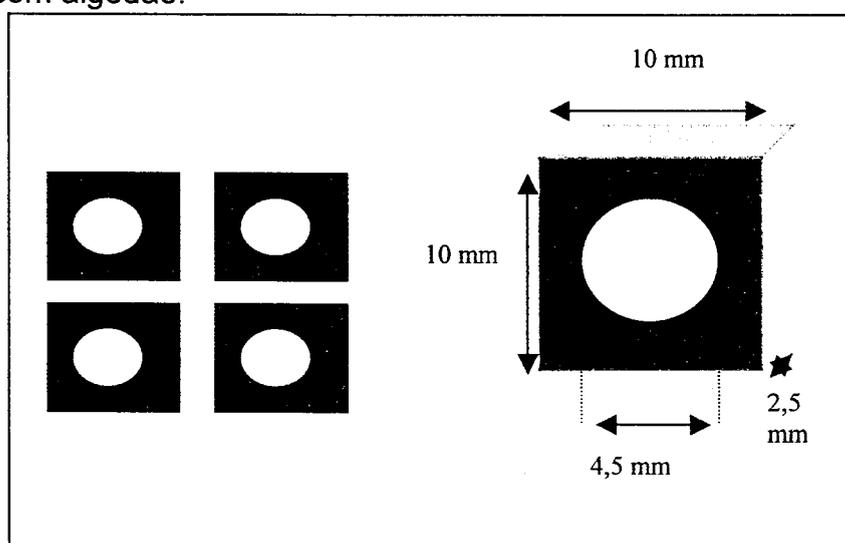


Figura 4 – Representação dos blocos de esmalte obtidos dos dentes bovinos incluídos em resina

4.2 Parâmetros laser

O *laser* utilizado foi um *laser* gasoso de CO₂ emitindo em 10,6 μ m (modelo Rofin SC x 30, Rofin-Sinar Laser GmbH, Hamburgo, Alemanha). As condições de irradiação estão descritas na Tabela 3.

A irradiações foram feitas com 70 cm de distância de trabalho, o que determinava um feixe de 5 mm de diâmetro incidindo nas amostras. A densidade de energia do feixe *laser*, no local das irradiações foi determinada previamente ao início do experimento, utilizando-se medidor de potência (Coherent FieldMaster GS + Detetor LM45; Coherent, USA).

Tabela 3- Dados técnicos do *laser* e parâmetros utilizados nos respectivos grupos

	<i>Laser</i> de CO ₂	
	Grupo LA	Grupo LB
Comprimento de onda	10,6 μm	10,6 μm
Frequência	100 Hz	74 Hz
Largura de pulso	50 μs	100 μs
Energia por pulso (medida)	60 mJ	135 mJ
Potência Média	6 W	10 W
Fluência (calculada)	0,3 J/cm ²	0,7 J/cm ²
Diâmetro do feixe na amostra	5 mm	5 mm
Perfil do feixe	TEM ₀₀	TEM ₀₀

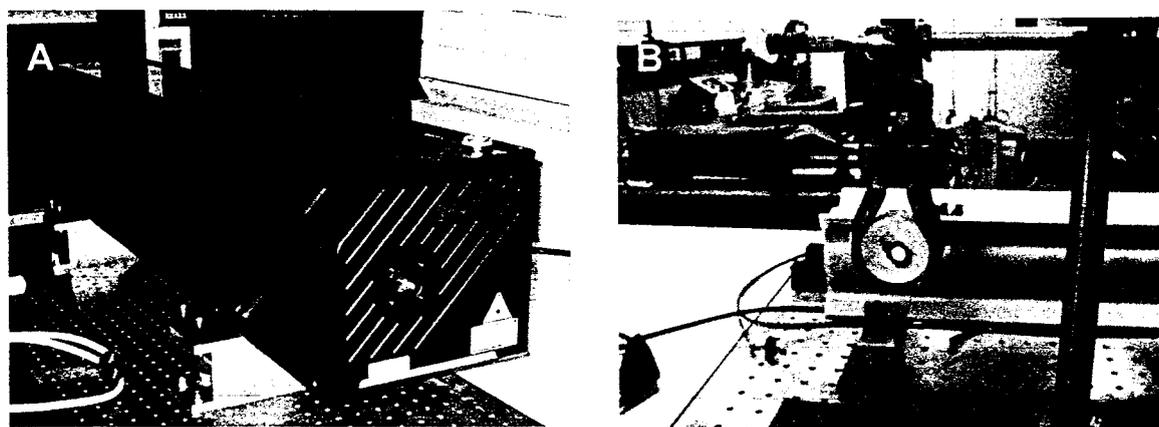


Figura 5 – A - Equipamento laser de CO₂ (10,6μm) utilizado na irradiação das amostras; B – amostra sendo irradiada, presa em suporte de mesa.

4.3 Desmineralização das amostras

As amostras de esmalte bovino foram desmineralizadas em 3 ml de solução de acetato tampão (0,1 mol/L), possuindo pH 4,5.

O preparo da solução foi feito utilizando-se 5,5 ml ácido acético glacial 100% (Merck & Co., Inc., NJ, EUA) e 8,203 g acetato de sódio anidro p.a. (Merck & Co., Inc, NJ, EUA).

A vidraria utilizada para o experimento foi limpa da seguinte forma, para garantir ausência de contaminação:

- Lavagem com detergente Extran 0,1% (15 min) em ultrassom
- Lavagem com água comum

- Lavagem com ácido nítrico 1:1 por 30 min
- Lavagem com água bidestilada
- Lavagem com água Mili Q
- Secagem

Todas as amostras, depois de inseridas nos potes de vidro contendo 3 ml da solução tampão, permaneceram em incubadora (Incubadora Refrigerada com Agitação Orbital, Marconi LTDA, Brasil) por 24 horas a 37°C, sob agitação constante de 300 rpm.

Terminado este período, todas foram retiradas dos vidros, sendo estas então enviadas para análise de cálcio e fósforo. A fim de se saber quanto do conteúdo destes elementos era realmente proveniente dos dentes desmineralizados, também foram feitas cinco análises somente da solução tampão, submetidas às mesmas condições. Estas soluções foram chamadas de branco.

4.4 Análise das concentrações de cálcio e fósforo

A análise da quantidade de cálcio e fósforo liberados pelo esmalte dental na solução desmineralizante foi realizada por Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma de Argônio – ICP OES* (modelo Spectro Flame M 120, *Spectro Analytical Instruments GmbH & Co. KG*, Kleve, Alemanha).

Neste espectrômetro, a amostra em solução, por meio de nebulização, transforma-se em aerossol o qual, após desolvatação, passa a partícula seca que, por volatilização-dissociação, vai para a forma de vapores-atômicos vapores-iônicos, os quais são excitados na forma de átomos-íons. O mecanismo de excitação é colisional. A tendência dos elétrons excitados é de voltarem ao estado fundamental e ao fazerem-no, devolvem a energia por emissão. Como os comprimentos de onda são característicos da cada elemento, e a intensidade da linha de emissão é proporcional à concentração do mesmo consegue-se determinar se os elementos procurados estão presentes, e em quais quantidades

115

Para introdução das soluções no espectrômetro foi utilizado um nebulizador do tipo Meinhard. A solução era introduzida por um tubo capilar para

* ICP – OES, é uma sigla da língua inglesa para *Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry*

uma região de baixa pressão criada pelo fluxo rápido do gás no fim do capilar. A baixa pressão e alta velocidade do gás permitiam a transformação da solução em aerosol.

Para a determinação dos dois elementos de interesse foram, inicialmente, elaborados programas analíticos. O equipamento utilizado dispõe de recursos em seu programa que permitem fazer uma escolha criteriosa das linhas de emissão a serem utilizadas para cada elemento.

Utilizou-se o método da curva analítica na determinação dos elementos, através do uso de soluções-padrão (Merck & Co., Inc, NJ, EUA) de cálcio e fósforo rastreáveis a um padrão da NIST**. Os coeficientes de correlação, limite de detecção utilizados para análise dos metais estão descritos na Tabela 4, assim como as curvas analíticas, na Figura 6. Ressalta-se que para cada amostra o equipamento realizou três leituras de cálcio e três de fósforo a fim de assegurar a segurança das medidas.

O limite de detecção instrumental é definido com a concentração do elemento que fornece uma resposta igual a três vezes o valor do desvio padrão do branco, o qual, no presente trabalho, foi calculado pelo software do equipamento. Para maior segurança, foram usados valores de limite de detecção práticos ou limites de quantificação, que diferem de 3,7 vezes do limite de detecção instrumental ¹¹⁶.

Tabela 4- Coeficiente de correlação, limite de detecção e de quantificação dos analitos.

Elemento	λ (nm)	Faixa de concentração ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Coeficiente de Correlação	Limite de Detecção ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Limite de Quantificação ($\mu\text{g ml}^{-1}$)
Ca	370,603	0,007 – 60,0	0,999	0,0069	0,02553
P	177,500	0,002 – 12,0	1	0,0017	0,00629
Condições de operação do sistema					
Gás refrigerante			14 l min ⁻¹		
Gás auxiliar			0,5 l min ⁻¹		
Pressão do Nebulizador			3,2 bar		
Potência do plasma			1200 W		
Fluxo da amostra			1 ml min ⁻¹		

** NIST – Sigla de *National Institute of Standard and Technology*. Agência federal norte-americana que desenvolve medidas, padrões e tecnologia para a indústria.

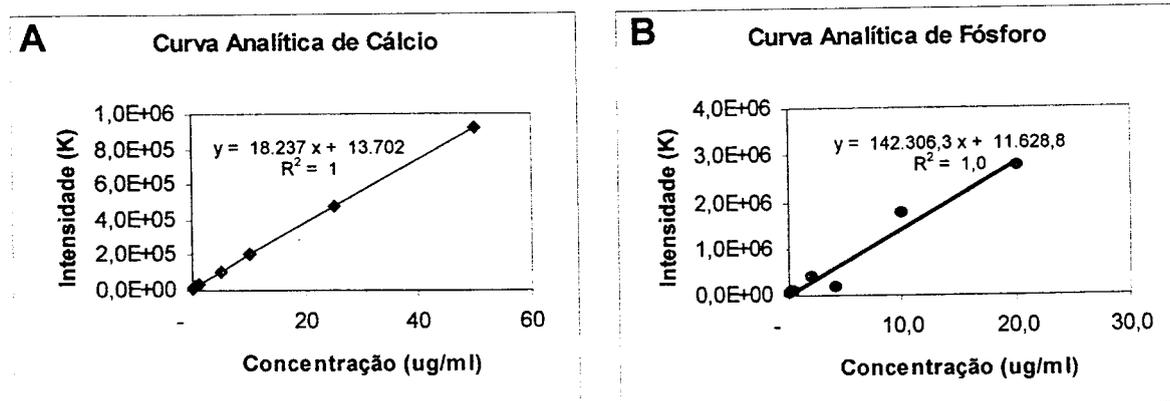


Figura 6 – A - Curva analítica de cálcio; B – curva analítica e de fósforo.

4.5 Microscopia eletrônica de varredura

Dois dentes bovinos de cada grupo foram preparados somente para análise em microscopia eletrônica de varredura (MEV), com o intuito de se observar as possíveis alterações provocadas pelo *laser* na superfície do esmalte e compará-las com a estrutura do esmalte normal, não irradiado.

Além disso, após o processo de desmineralização descrito na seção 3.3, mais duas amostras de cada grupo foram aleatoriamente, escolhidas para observação em MEV. O protocolo de preparo das amostras para estas observações foi o seguinte:

1. Fixação dos dentes em glutaraldeído 2,5%, por duas horas
2. Três lavagens de 5 minutos cada, com Tampão Fosfato 0,1 M
3. Desidratação das amostras na seqüência de álcoois:
 - Álcool 30%, duas lavagens de 5 minutos
 - Álcool 50%, duas lavagens de 5 minutos
 - Álcool 70%, duas lavagens de 5 minutos
 - Álcool 90%, duas lavagens de 5 minutos
 - Álcool 96%, duas lavagens de 5 minutos
4. Álcool absoluto, quatro lavagens de 5 minutos
5. Fixação em Hexametil-Disilazane (HMDS) por 20 minutos
6. Evaporação do HMDS em capela por 2 horas

Depois de desidratadas as amostras foram coladas em *stubs* metálicos, identificadas e cobertas por uma fina camada de ouro.

4.6 Cálculos de temperatura na superfície

Com intuito de estimar a temperatura produzida pelas irradiações na superfície do esmalte, foram feitos cálculos utilizando a equação 6,

$$\Delta T = \frac{E}{\rho A z c} \quad [6]$$

onde, E é a energia depositada no tecido, ρ é densidade do esmalte = 2,9 g/cm³, A é área da superfície, z é a profundidade de penetração da luz no tecido e c é capacidade térmica do esmalte = 0,75 J/g . °C²⁶.

Para os cálculos, assumiu-se o coeficiente de absorção do esmalte como sendo 825 cm⁻¹ para laser de CO₂ 10,6µm e irradiação de pulso único com 0,3 ou 0,7 J/cm². A profundidade de absorção foi então calculada levando-se em consideração a Lei de Beer-Lambert (Equação 4).

5. RESULTADOS

5.1 Resultados análise das concentrações cálcio e fósforo

Os resultados, de conteúdo de cálcio e fósforo liberados pelas 45 amostras de esmalte na solução desmineralizante, foram obtidos em microgramas por mililitros ($\mu\text{g/ml}$) e representam uma média das três leituras realizadas pelo equipamento mais o desvio padrão (Tabela 5).

Tabela 5 – Médias (desvio-padrão) das três leituras de Ca e P ($\mu\text{g/ml}$) e razão Ca/P molar calculada por grupos.

	Controle			Laser A			Laser B		
	Ca	P	Razão Ca/P	Ca	P	Razão Ca/P	Ca	P	Razão Ca/P
1	317,1 (4,3)	147,8 (1,7)	1,66	392,5 (3,9)	165,2 (1,8)	1,84	353,5 (1,6)	159,8 (1,0)	1,71
2	318,8 (3,1)	147,2 (1,7)	1,94	370,1 (2,1)	158,3 (1,5)	1,82	302,6 (1,4)	138,9 (1,8)	1,83
3	314,5 (3,4)	148,2 (1,5)	1,64	330,5 (1,8)	137,8 (1,1)	1,86	355,7 (1,8)	159,4 (0,7)	1,73
4	405,3 (3,5)	185,5 (1,8)	1,69	413,0 (2,5)	179,1 (2,1)	1,79	333,7 (1,1)	146,7 (0,4)	1,76
5	352,5 (0,9)	165,9 (0,7)	1,65	449,5 (0,4)	184,5 (1,7)	1,89	331,0 (1,4)	146,8 (0,6)	1,75
6	384,3 (2,4)	180,3 (0,7)	1,65	446,3 (1,3)	183,4 (0,2)	1,89	336,7 (1,8)	150,6 (0,8)	1,73
7	395,0 (3,5)	176,4 (0,2)	1,74	338,6 (1,6)	156,0 (1,4)	1,68	315,3 (3,5)	142,3 (0,1)	1,72
8	335,8 (3,1)	154,0 (0,3)	1,69	318,1 (2,4)	134,7 (1,2)	1,83	307,7(1,8)	138,1 (1,0)	1,73
9	392,0 (2,5)	176,0 (0,3)	1,73	357,1 (3,7)	154,0 (1,9)	1,80	316,3 (2,9)	139,5 (1,4)	1,76
10	403,0 (3,5)	184,3 (2,4)	1,69	327,5 (2,9)	152,2 (0,8)	1,67	353,0 (0,3)	151,8 (1,4)	1,80
11	401,3 (3,4)	184,9 (2,4)	1,68	338,0 (4,2)	150,0 (1,7)	1,75	335,0 (2,3)	150,0 (1,4)	1,73
12	401,7 (0,4)	187,1(2,9)	1,66	409,1 (3,8)	178,7 (1,7)	1,77	332,5 (2,5)	144,5 (3,2)	1,78
13	373,1(1,3)	168,1 (1,0)	1,72	359,5 (2,5)	158,6 (1,7)	1,76	265,1(2,9)	114,0 (0,3)	1,80
14	361,3 (1,8)	162,6 (0,3)	1,72	377,6 (3,1)	166,8 (1,8)	1,75	361,6 (3,3)	152,9 (1,4)	1,83
15	362,5 (2,9)	165,3 (1,5)	1,70	362,6 (17)	162,6 (1,6)	1,73	333,4 (3,3)	140,0 (1,3)	1,85
Média	367,9	168,9	1,70	372,7	161,5	1,79	328,9	145,0	1,77
D.P.	33,5	14,6	0,07	41,7	15,3	0,07	24,9	11,0	0,05

A partir das médias de conteúdo de cálcio e fósforo obtidas, a relação entre esses dois elementos foi calculada. Todos estes dados foram então submetidos à análise estatística, que segue abaixo descrita.

5.1.1 Análise descritiva

Há, uma preocupação com a acurácia das medidas realizadas para a contagem de cálcio e fósforo (em $\mu\text{g/ml}$) nas unidades amostrais. Sendo assim, temos nas Figura 7 e Figura 8 os gráficos das médias das três medições e seus respectivos desvios-padrão. Observa-se que a magnitude dos desvios das medições é praticamente nulo, se comparado com a magnitude de variabilidade

dos dados, o que nos leva a concluir – embora por inspeção gráfica – que o impacto da variabilidade das medições na variabilidade dos dados não é significativo, ou seja, não é significativa a propagação de erros por conta da sensibilidade do aparelho de medição.

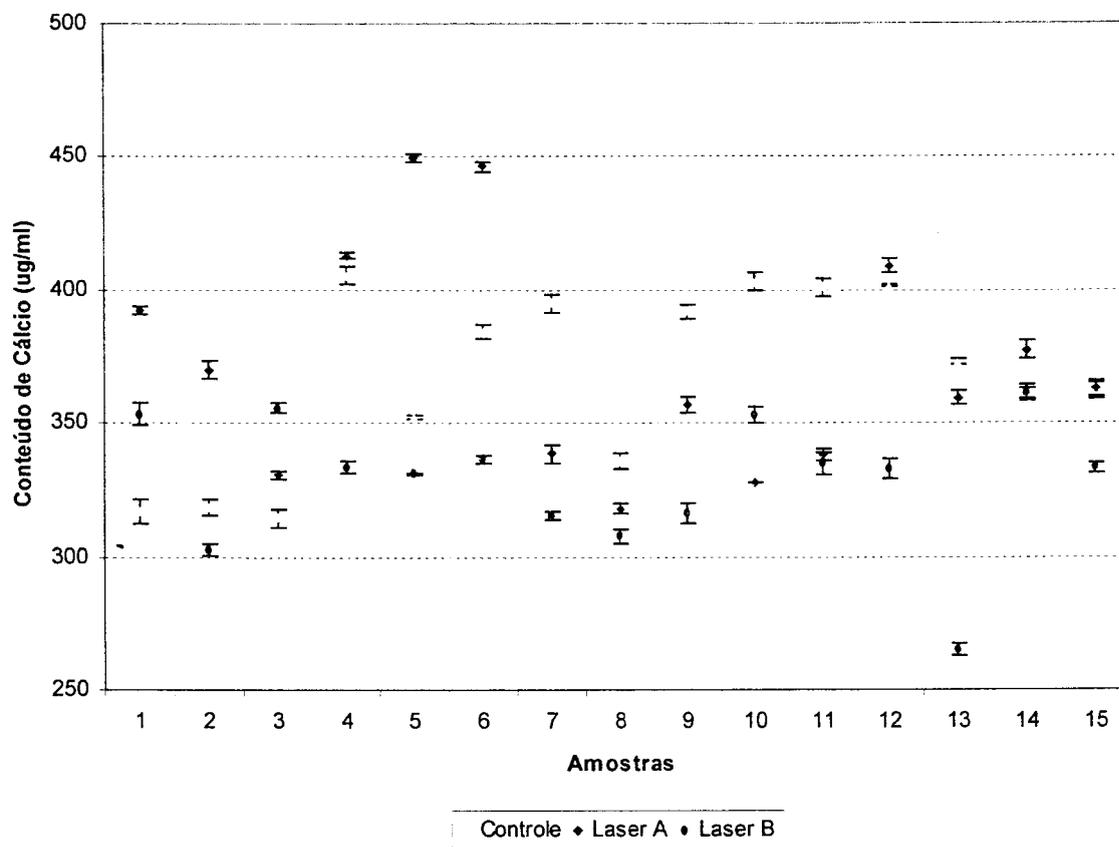


Figura 7 - Gráfico representando a média das três medidas de cálcio feitas em cada amostra e seus respectivos desvios –padrão, para os três grupos.

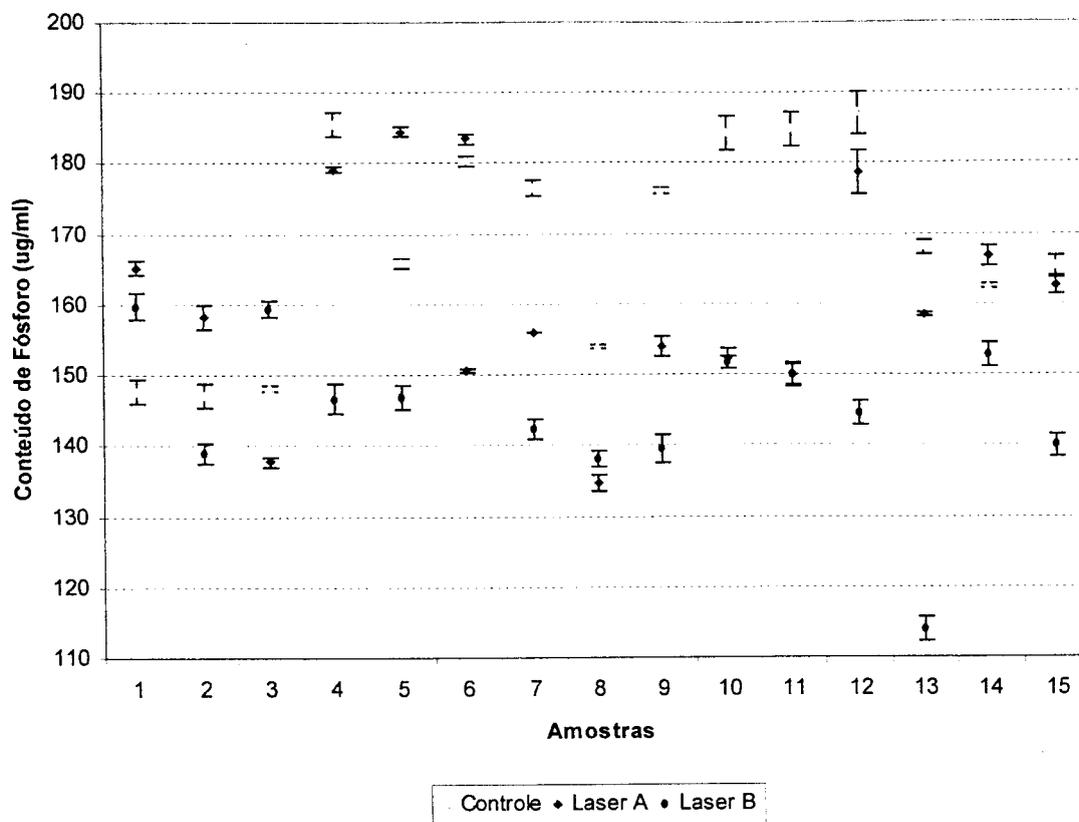


Figura 8 - Gráfico representando a média das três medidas de fósforo feitas em cada amostra e seus respectivos desvios -padrão, para os três grupos.

Dessa forma, prosseguiu-se com as análises das médias das medições e, para efeito de simplificação da escrita, suprimiremos o termo *média* quando nos referirmos novamente às respostas envolvidas.

A Figura 9 representa os boxplots dos dados da quantidade de cálcio em $\mu\text{g/ml}$ separados por grupos. Analogamente, os mesmos gráficos para a quantidade de fósforo e para a razão molar Ca/P estão representados nas Figura 10 e Figura 11. A Tabela 6 apresenta as estatísticas descritivas para as respostas, separadas por grupos.

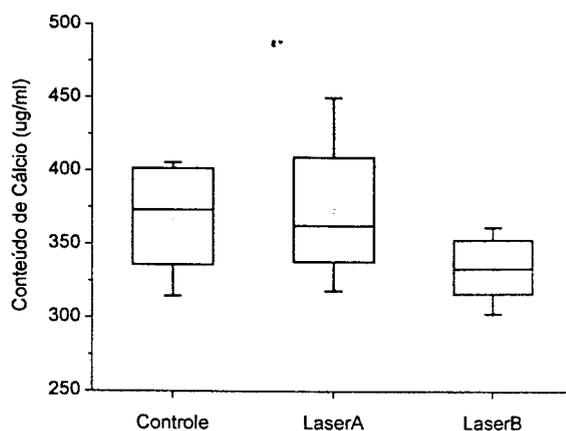


Figura 9 – Gráfico representando a variação das medidas de cálcio e a mediana de cada grupo.

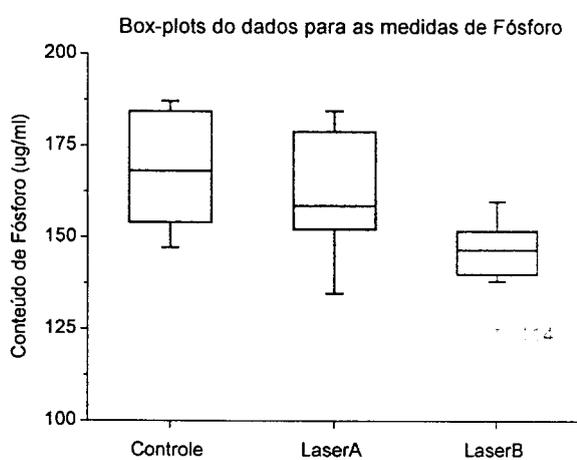


Figura 10 - Gráfico representando a variação das medidas de fósforo e a mediana de cada grupo.

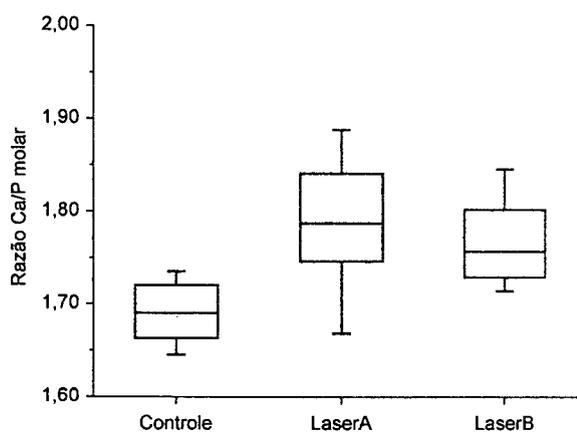


Figura 11 - Gráfico representando a variação dos valores calculados da razão molar cálcio e fósforo e da mediana de cada grupo.

Tabela 6 – Estatísticas descritivas para as respostas Ca, P, Ca/P

Variável	Grupo	N	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Mediana	Máximo
P	Controle	15	168,91	14,55	147,20	168,10	187,10
	Laser A	15	161,46	15,26	134,70	158,60	184,50
	Laser B	15	145,02	11,04	114,00	146,70	159,80
Ca	Controle	15	367,88	33,47	314,50	373,10	405,30
	Laser A	15	372,70	41,70	318,10	362,60	449,50
	Laser B	15	328,87	24,91	265,10	333,40	361,60
Ca/P	Controle	15	1,70	0,07	1,64	1,69	1,74
	Laser A	15	1,79	0,07	1,67	1,79	1,89
	Laser B	15	1,77	0,05	1,71	1,76	1,85

Observa-se que, tanto para as respostas de cálcio quanto para as respostas de fósforo, o grupo que possui maior assimetria nos dados é o grupo Laser A. Além disso, identifica-se, na Figura 10, uma unidade amostral com quantidade de fósforo muito abaixo dos demais valores. Nos Anexos - A (Figura 22) está o gráfico com a dispersão das respostas de cálcio por fósforo, em que observa-se que a medida em que a quantidade de fósforo aumenta, há uma tendência de aumento também na quantidade de cálcio. O ponto com valor baixo de fósforo foi identificado e percebe-se que seu correspondente valor para cálcio também foi baixo e que ele pertence ao grupo LB.

O impacto desse ponto foi observado em análise específica (regressão linear univariada) apenas com o caráter descritivo. Com isso foi possível observar que as conclusões, assim como as estimativas, sobre os parâmetros do modelo não sofrem alterações, com ou sem a unidade amostral discrepante (Anexos B - Tabela 8 e Tabela 9, Figura 23 e Figura 24). Por esse motivo, optou-se pela não exclusão dos dados discrepantes.

Como introdução ao que será feito na análise inferencial, foram construídos gráficos das médias de cálcio e fósforo, com o intuito de comparar os grupos, ainda que de forma descritiva (Figura 12).

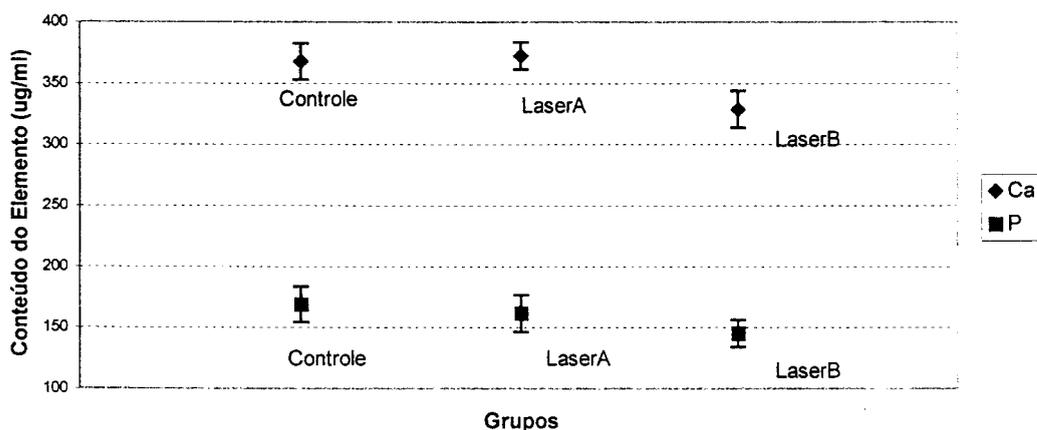


Figura 12 – Gráfico do comportamento das médias e desvios-padrão das leituras de cálcio e fósforo nos grupos.

Da Figura 12 vemos que a redução de cálcio no grupo LB sugere ser estatisticamente diferente, o que aparentemente não ocorre na quantidade de fósforo. O comportamento das médias e desvios-padrão, com relação a razão Ca/P podem ser observados na Figura 13 indicando que a quantidade proporcional de cálcio perdido, em relação ao fósforo, é menor, à medida que a fluência do feixe aumenta.

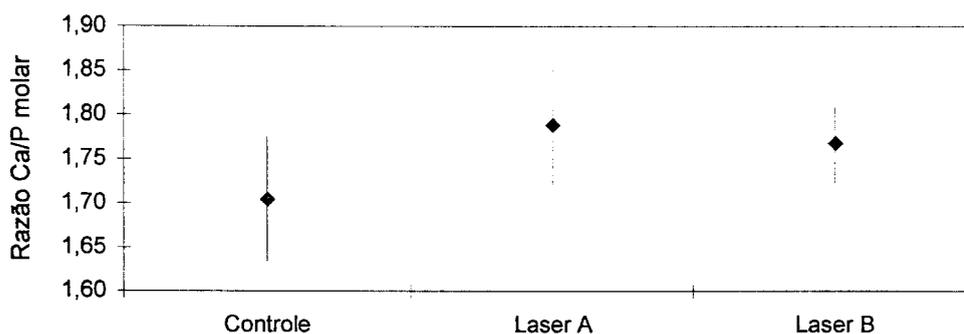


Figura 13 – Gráfico das médias e desvios-padrão dos grupos para a razão molar Ca/P.

5.1.2 Análise Inferencial

As comparações entre as médias das respostas dos grupos foram feitas com base em testes estatísticos paramétricos e com coeficiente de confiança

fixado em 95%. Para cada uma das respostas de cálcio, fósforo e da razão Ca/P separadamente, foi utilizada a técnica de análise de variância univariada homocedástica. A verificação da homocedasticidade dos valores se encontra descrita nos anexos - Figura 25, Figura 26, Figura 27.

Os resultados dessa análise mostraram que houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos e estão descritos na Tabela 7.

Tabela 7 – Análises de variância para o conteúdo de Ca e P medidos em $\mu\text{g/ml}$ e da razão Ca/P calculada.

		G.L.	Soma Quadrados	Quadrado Médio	F	Nível Descritivo
Cálcio	Grupo	2	17311	8656,0	7,457	0,002
	Resíduos	42	48749	1161,0		
Fósforo	Grupo	2	4481,5	2240,7	11,864	<0,001
	Resíduos	42	7932,6	188,9		
Ca/P	Grupo	2	0,057	0,0285	7,3363	<0,001
	Resíduos	42	0,163	0,0039		

Para verificação da influência dos pontos discrepantes, observados na análise descritiva, nos resultados também foi realizada uma análise de variância removendo-se estes pontos (Anexos C - Tabela 10). Os resultados desta análise mostraram as mesmas conclusões da análise acima. Portanto, a remoção das observações discrepantes não influencia na conclusão do teste.

Foi possível observar, ao nível de significância 95% que há diferenças entre as respostas dos grupos *Controle*, LA e LB, nas respostas de quantidade de cálcio, quantidade de fósforo e razão Ca/P. Comparando-se os grupos pelo teste de Tukey, em nível de 1% de significância, verifica-se que, para as quantidades de cálcio e fósforo, a média das respostas do grupo LB são estatisticamente menores que dos demais grupos (p -valores 0,002 e <0,001), e entre os grupos LA e controle não existe diferença significativa. Já a comparação da razão Ca/P, revela que as médias dos grupos LA e LB são estatisticamente maiores que a do grupo controle ($p < 0,01$) não havendo diferença significativa entre os dois grupos irradiados. Nas Figura 14 e Figura 15 são apresentados os contrastes para as respostas de cálcio e fósforo nos grupos.

Grupo	N	Média	D.P.
Controle	15	367,88	33,46
Laser B	15	328,87	24,91
Laser A	15	372,67	41,72

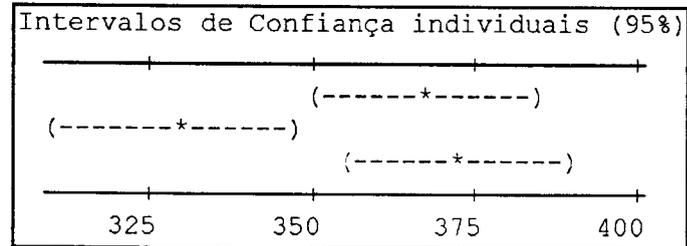


Figura 14 – Intervalos de Confiança (95%) para as quantidade de cálcio

Grupo	N	Média	D.P.
Controle	15	168,91	14,55
Laser B	15	145,02	11,04
Laser A	15	161,46	15,26

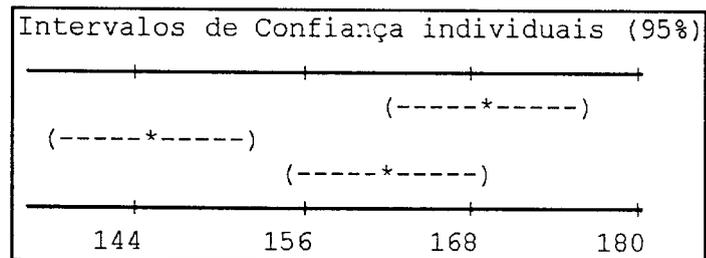


Figura 15 – Intervalos de Confiança (95%) para as quantidade de fósforo

5.2 Resultados Microscopia Eletrônica de Varredura

5.2.1 Amostras Antes da Desmineralização

A análise em microscopia eletrônica de varredura (MEV), da superfície de esmalte controle (não irradiado), antes da desmineralização, mostra em menor aumento (Figura 16-A) aparência característica de esmalte lixado. Do lado esquerdo, dessa mesma figura, é possível observar uma faixa de esmalte não lixado devido à convexidade do dente. Em maior aumento, a área lixada, revela somente grandes estriações, porém a área de esmalte natural, não lixada, (Figura 16-B) mostra características inerentes ao tecido como irregularidades e pequenos poros (menores que $2\mu\text{m}$), provenientes dos esforços mecânicos e químicos aos quais os dentes são submetidos quando estão em função.

As micrografias das superfícies de esmalte irradiadas com $0,3$ e $0,7$ J/cm^2 em menor aumento (aumento original $20\times$ - Figura 16 - C e E) mostram superfícies lisas com ausência de sinais de fusão, ablação ou trincas, indicando que as alterações, provocadas pela irradiação com laser de CO_2 , foram bastante discretas. Nestas imagens é possível observar quase toda a área irradiada e, portanto é interessante notar que as superfícies se encontram bastante homogêneas, inexistindo áreas, visivelmente, mais afetadas do que outras, pela irradiação. Em maior aumento, (aumento original $2000\times$ - Figura 16 - D e F) essas superfícies se mostram mais regulares e com maior oclusão dos poros que a superfície controle, não irradiada.

Apesar de na micrografia da superfície irradiada com $0,3$ J/cm^2 , na Figura 16 -D, ser possível observar que a superfície, de um modo geral, se apresenta ligeiramente mais lisa que a irradiada com $0,7$ J/cm^2 (Figura 16 -F), existe pouca diferença entre as alterações ocorridas nessas duas superfícies. Além disso, é possível observar um padrão bastante diferente das superfícies comumente observadas após irradiação com laser em densidades de energia mais altas (acima de 10 J/cm^2)^{29,93, 125}.

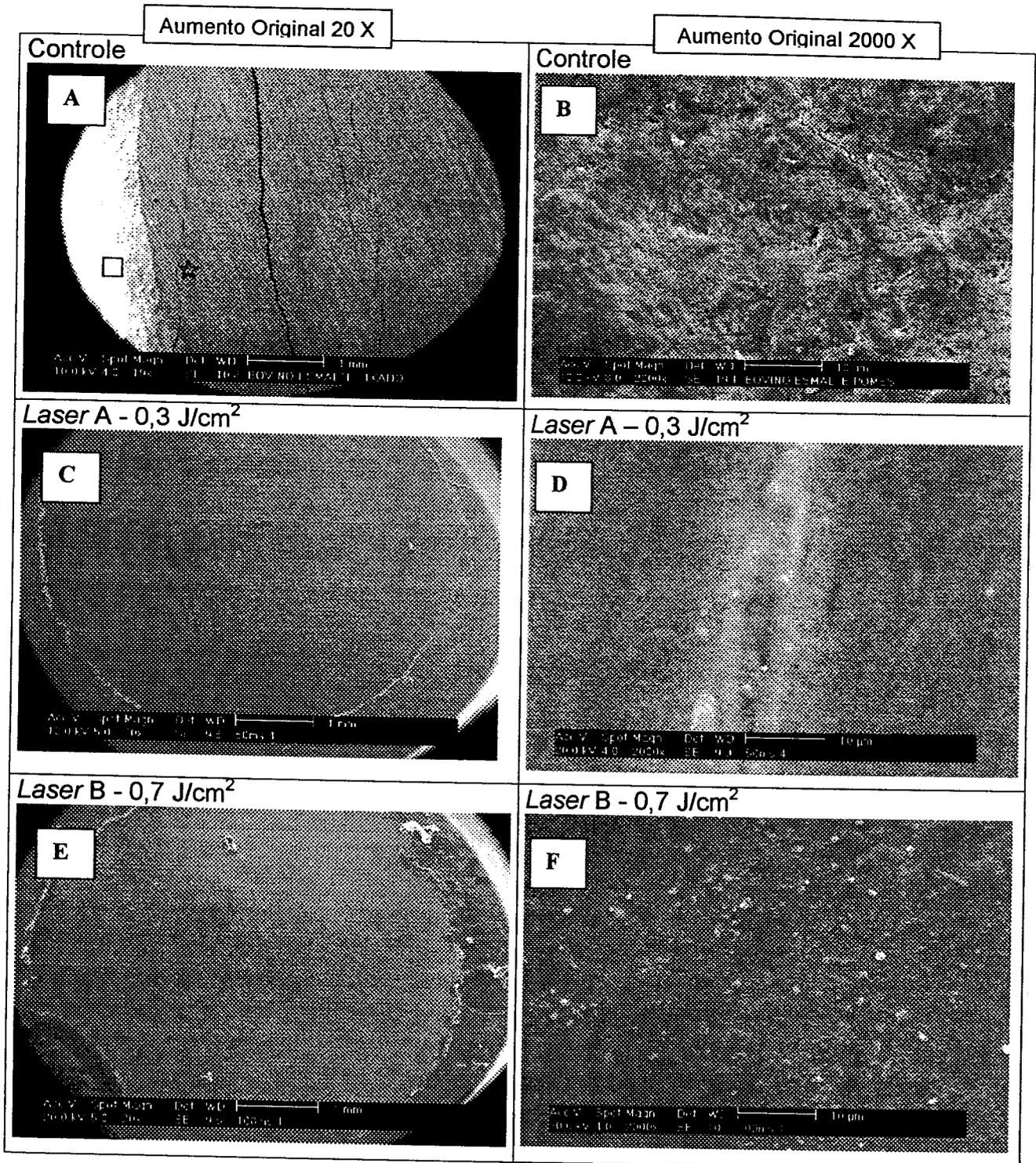


Figura 16 - Micrografias eletrônicas de esmalte não irradiado e irradiado com *laser* de CO₂ $\lambda=10,6\mu\text{m}$ com fluências de 0,7 e 0,3 J/cm². As respectivas superfícies se mostram lisas, com pouca alteração em relação ao controle. Em maior aumento, parece haver nas superfícies irradiadas uma diminuição da rugosidade do esmalte e maior oclusão dos microporos, indicando que a irradiação promoveu alterações bastante discretas destas superfícies. Na micrografia A, ☆ indica o esmalte lixado e □ indica esmalte natural, não lixado.

5.2.2 Amostras Após a Desmineralização

As micrografias eletrônicas das amostras após desmineralização revelam padrões diferentes de dissolução do esmalte. Nas superfícies controle (Figura 17 – A e B, Figura 18 - A e B) e irradiada com $0,3 \text{ J/cm}^2$ (Figura 17 – C e D, Figura 18 – C e D) é nítido, um aumento da porosidade do esmalte e maior dissolução dos prismas.

Porém, a superfície que se mostra, de modo geral, mais porosa é a do esmalte não irradiado (Figura 17 – A e B, Figura 18 e A e B). Na micrografia eletrônica da Figura 17 –B, o esmalte não irradiado parece ter sofrido uma dissolução seletiva, levando a uma maior dissolução do centro do que da periferia dos prismas e mais da dos espaços intra do que interprismáticos. Na periferia dos prismas, os cristais parecem preservar uma orientação paralela, enquanto que nos espaços interprismáticos eles se apresentam desorganizados.

Ainda com relação ao esmalte controle, as porosidades aparentemente mais extensas observadas em menor aumento (Figura 18 – A), foram confirmadas em maior aumento pela presença de poros com mais de $5 \mu\text{m}$ (Figura 18 –B).

As micrografias eletrônicas do esmalte irradiado com $0,3 \text{ J/cm}^2$ apresentam algumas áreas em que houve forte aumento de porosidades, observado tanto em menor quanto em maior aumento (Figura 17 - C e D). Porém, também apresentam áreas em que a dissolução foi mais discreta se assemelhando ao padrão de esmalte condicionado (para procedimentos adesivos), apresentando dissolução mais superficial, maior no centro do que na periferia dos prismas(Figura 18 C e D) .

O esmalte irradiado com $0,7 \text{ J/cm}^2$ revelou, em microscopia eletrônica de varredura, superfícies menos porosas (Figura 17 E e F, Figura 18 E e F). Em maior aumento, a micrografia eletrônica da Figura 17 F, mostra a presença de cristais em formato de agulha dispostos de maneira intercruzada, diferentes da formação característica dos cristais de hidroxiapatita. As características desses cristais formados são muito semelhantes aos cristais de apatitas deficientes em cálcio e de fosfato de tricálcio na forma β (β -TCP)³¹. A presença desses cristais não foi observada em todas as regiões do esmalte irradiado com $0,7 \text{ J/cm}^2$, como pode ser observado na Figura 18 F. Porém a prevalência de uma superfície com menos e menores porosidades, se manteve.

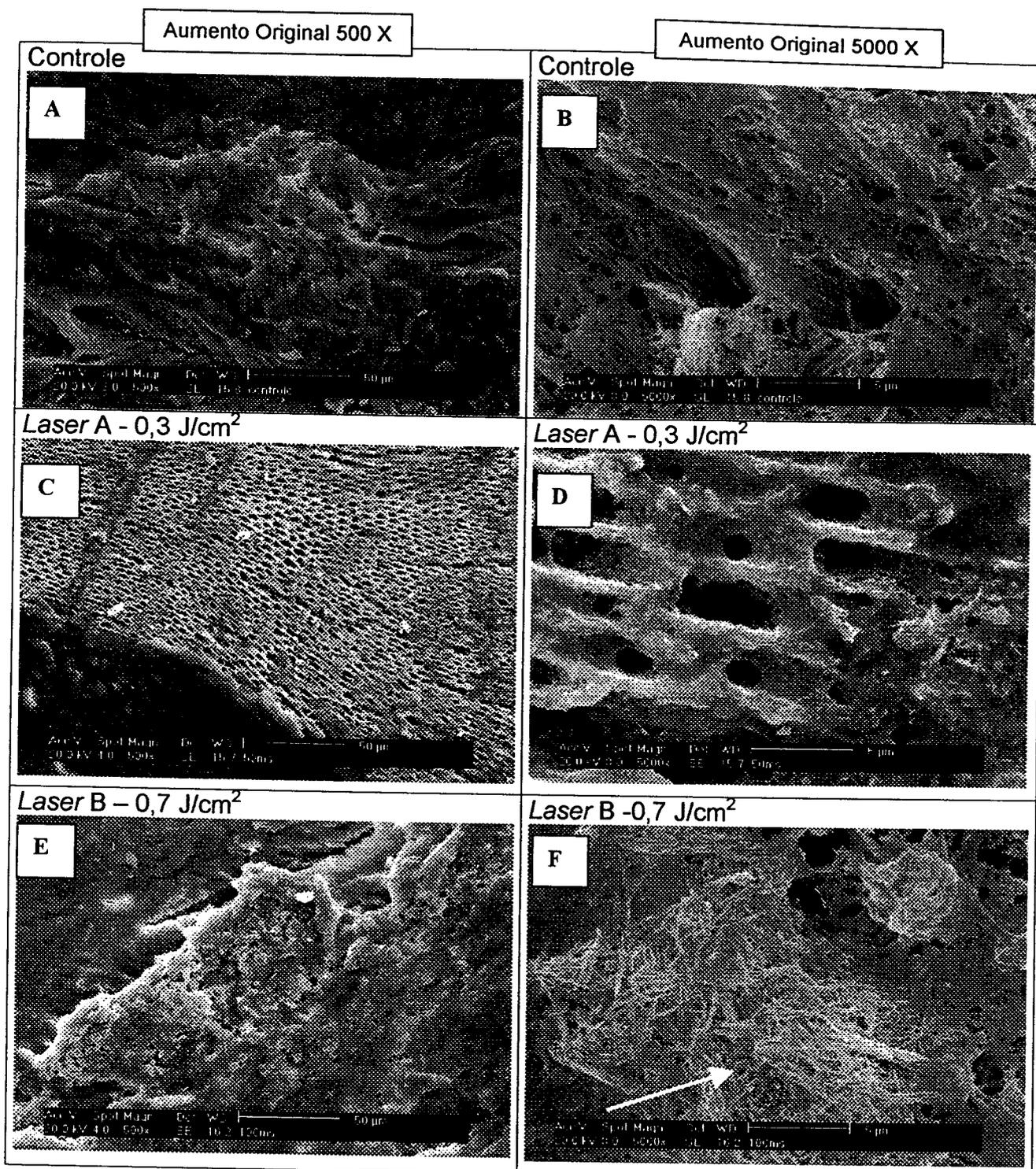


Figura 17 - Micrografias eletrônicas de esmalte não irradiado e irradiado com *laser* de CO_2 $\lambda=10,6\mu\text{m}$ com fluências de 0,7 e 0,3 J/cm^2 , após desmineralização em acetato tampão. As superfícies controle e irradiada com 0,3 J/cm^2 apresentam nitidamente um aumento da porosidade do esmalte e maior dissolução dos prismas de esmalte. Na superfície irradiada com 0,7 J/cm^2 a dissolução dos cristais se mostra mais branda e com poucas porosidades, porém apresentando aparentemente a formação de cristais de apatitas deficientes em cálcio ou de $\beta\text{-TCP}$ (seta).

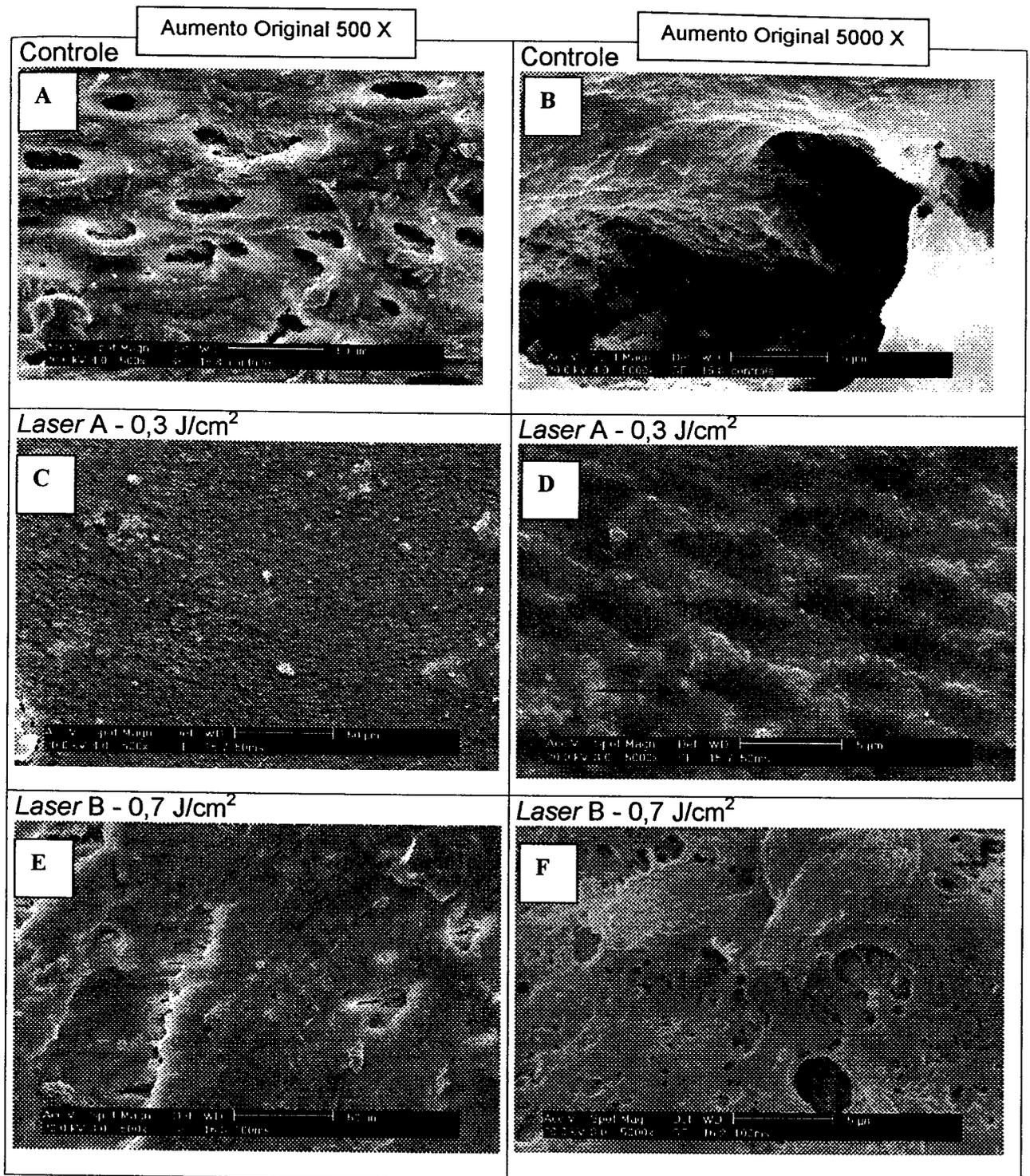


Figura 18 – Micrografias eletrônicas de esmalte não irradiado e irradiado com *laser* de CO₂ $\lambda=10,6\mu\text{m}$ com fluências de 0,7 e 0,3 J/cm², após desmineralização em acetato tampão. A superfície controle se mostra bastante porosa com poros maiores que 5 μm . O esmalte irradiado com 0,3 J/cm² apresenta padrão característico de maior dissolução do centro dos prismas. Na micrografia B a seta indica a periferia dos prismas preservada. No esmalte irradiado com 0,7 J/cm² (E), observa-se novamente superfície menos poros, porém, em maior aumento (F), esta região não revela ocorrência de cristais como pôde ser observado na Figura 17 F.

5.3 Resultados das estimativas de temperatura de superfície

As temperaturas de superfície calculadas para um pulso nas duas condições de irradiação, em função da profundidade de penetração da luz no tecido foram plotadas em um gráfico (Figura 19).

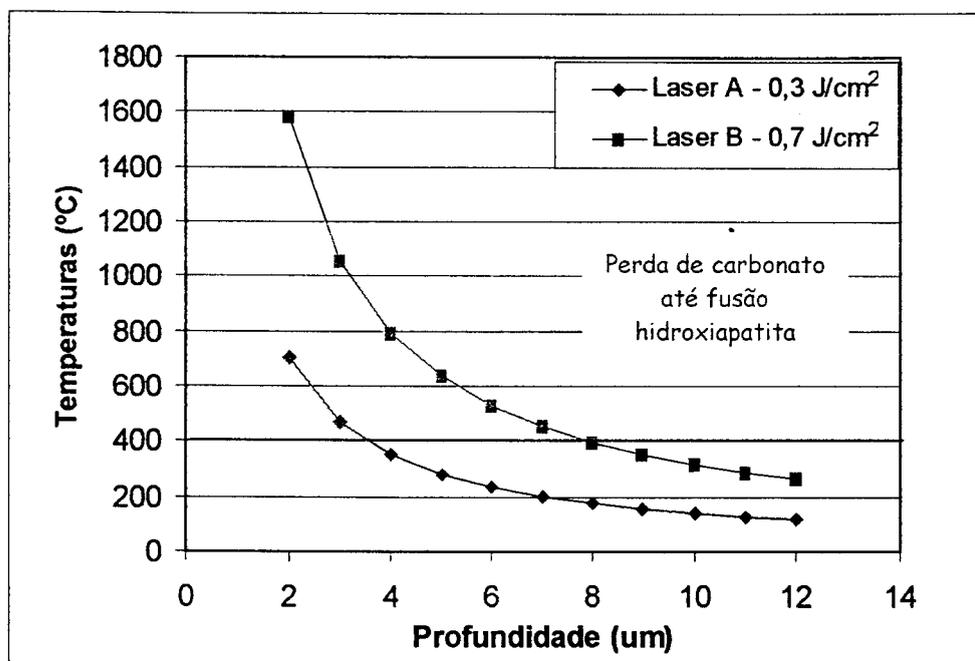


Figura 19 - Temperaturas calculadas em função da profundidade de penetração da luz no tecido, assumindo $\alpha = 825 \text{ cm}^{-1}$ para laser de CO_2 10,6um, em irradiações de pulso único com 0,3 (laser A) e 0,7 J/cm^2 (laser B). A faixa destacada em azul compreende as temperaturas relacionadas à perda de carbonato da estrutura do esmalte.

O aumento de temperatura 2 mm abaixo da superfície também foi estimado e foi de aproximadamente 0,7 °C e 1,5 °C para as irradiações com 0,3 e 0,7 J/cm^2 respectivamente. Portanto, estima-se que a temperatura na polpa tenha se mantido em níveis seguros ($<5,5^\circ\text{C}$)⁹⁰.

6. DISCUSSÃO

Diversos estudos têm utilizado dentes bovinos em simulação de cáries, *in vitro*. As vantagens observadas na utilização destes são a possibilidade de obtenção de maiores áreas planas de esmalte e a maior disponibilidade dos mesmos em relação aos dentes humanos. Além disso, estes dentes apresentam estrutura e propriedades ópticas bastante semelhantes aos seus similares humanos^{96, 117, 118}.

Porém, deve-se observar que, apesar do mecanismo de formação de cáries ser o mesmo, a taxa de progressão das desmineralizações é comprovadamente maior¹¹⁹. Por essa razão, o protocolo de desmineralização estabelecido para dentes humanos¹²⁰, testado em estudo piloto com dentes bovinos (Apêndices A - Figura 21), provocou desmineralizações excessivas e, portanto precisou ser substituído por um mais adequado indicado pela literatura recente¹²¹.

O fator determinante, da maior velocidade de progressão das lesões em esmalte bovino, parece ser o maior volume de poros presentes na junção dos prismas. Isso porque, nestes dentes, o espaço interprismático (outra área sugerida como caminho para desmineralização) apresenta grande concentração de prismas e os cristais se mostram agrupados de forma tão densa quanto no corpo dos mesmos¹¹⁸.

No processo de desmineralização dos dentes utilizado, com intuito de se produzir lesões de cárie artificiais, semelhantes as que ocorrem *in vivo*, foi utilizado acetato tampão. Essa solução apresenta em sua composição ácido acético, que é um dos três principais ácidos produzidos pela placa cariogênica e portanto tende a preservar o padrão de desmineralização desejado^{53, 55}.

Segundo dados da literatura, o acetato tampão (0,1 mol/l) em pH=4,5 produz, após 24 horas de desmineralização, lesões de subsuperfície com profundidade entre 50 e 100 μm , no esmalte humano⁵³. Como no esmalte bovino a progressão das lesões é cerca de três vezes mais rápida, é provável que as lesões formadas, no presente trabalho, sejam da ordem de 150-300 μm de profundidade, apesar de não terem sido medidas¹¹⁹.

Os resultados de menor desmineralização do esmalte observados neste estudo sugerem um efeito benéfico do *laser* de CO₂ ($\lambda = 10,6\mu\text{m}$ – pulsado, largura temporal = 100 μs) na prevenção de cáries, de forma similar a outros estudos utilizando-se outras metodologias^{9, 29, 98, 28}. Um dos parâmetros *laser* testados foi capaz de diminuir a perda de íons cálcio e fósforo, do dente, na presença de solução ácida, apesar da redução ter sido de apenas 10% para o cálcio e 14% para o fósforo.

Os recentes estudos avaliando a perda de mineral de esmalte irradiado por *laser* de CO₂ também observaram redução da desmineralização após irradiação, apesar das fluências utilizadas não terem sido mencionadas. Além disso, estes utilizaram os *lasers* operando no modo contínuo, o que *in vivo*, pode trazer complicações devido ao maior risco de elevação da temperatura pulpar^{91, 92, 93}.

Estudo utilizando um *laser* de CO₂ com mesmo comprimento de onda e mesmo modo de operação utilizados no presente trabalho, porém com uma densidade de energia muito superior, cerca de 83,33 J/cm², demonstrou, no grupo irradiado com *laser*, uma redução significativa tanto no conteúdo cálcio quanto na profundidade de lesão formada. A redução média do conteúdo de cálcio dissolvido foi de 12,6% e de profundidade de lesão foi de 46,1%, ambos em relação ao grupo controle. Porém, apesar de ter sido alcançada uma menor desmineralização do esmalte no grupo tratado com *laser*, os parâmetros utilizados revelaram em microscopia, sinais de ablação do tecido, efeito indesejado quando se pensa em prevenção de cárie e, portanto, preservação de estrutura intacta¹⁰⁵.

A ocorrência da diminuição da solubilidade, somente em um dos grupos tratados com *laser*, parece estar relacionada à maior densidade de energia e largura de pulso (0,7 J/cm² e 100 μs , respectivamente) utilizadas neste grupo. Tem sido demonstrado que o aumento da densidade de energia até o limiar de ablação ($\approx 8\text{J/cm}^2$)¹²² aumenta a temperatura de superfície e a inibição de cáries^{112, 28}.

Além disso, pulsos mais longos (até 100 μs), apesar de proporcionarem temperatura pico menor, fazem com que a temperatura permaneça por mais tempo em um patamar alto (entre 400 e 1200°C) interessante para a perda de carbonato. Neste caso, também o calor e os efeitos decorrentes, se estendem a

uma profundidade maior (máximo 20 μ m), o que pode aumentar a faixa de esmalte modificada e, possivelmente, a resistência à dissolução ácida. No entanto, pulsos mais longos, muito acima do tempo de relaxamento térmico do esmalte (maiores que 100 μ s) tendem a aumentar o calor residual no tecido, o que pode ser danoso caso este aquecimento se difunda até a polpa. A amplitude dos picos de temperatura atingidos também parece aumentar com o aumento de pulsos incidentes, no mesmo local da amostra^{122, 123}.

Apesar do aumento de temperatura na superfície, medido com este comprimento de onda em outros estudos, chegar a ultrapassar por alguns instantes o ponto de fusão da hidroxiapatita (1200°C), a temperatura média fica abaixo deste ponto e o aumento de temperatura na polpa se mantém dentro dos limites seguros¹⁶. Isto acontece, pois este comprimento de onda é altamente absorvido pela hidroxiapatita, fazendo com que as camadas superficiais (12 μ m - profundidade de absorção para o CO₂ 10,6 μ m²⁶) absorvam a maior parte da energia proveniente do feixe e também porque este aquecimento ocorre apenas em pequenas frações de segundos, permitindo assim o relaxamento térmico da estrutura¹⁰⁴.

Muito embora, o mecanismo pelo qual o *laser* promove aumento da resistência ácida do esmalte dental não esteja completamente claro, a teoria mais aceita atualmente, relaciona os efeitos do *laser*, aos ocorridos quando do aquecimento do esmalte por outros métodos.

O que acontece é que com o aquecimento do esmalte a temperaturas em torno de 400°C tem início da perda de carbonato presente na hidroxiapatita, e ao atingirem-se temperaturas acima de 800°C este composto pode ser totalmente eliminado da estrutura^{21, 26}. A perda de carbonato tende a tornar o esmalte menos solúvel, devido a formação de cristais maiores e mais estáveis quimicamente^{31, 109}. Como foi mencionado anteriormente, temperaturas dessa ordem ou mesmo maiores, são facilmente atingidas com a irradiação com *laser* de CO₂, mesmo em baixas fluências (<4 J/cm²)³⁵.

A estimativa das temperaturas atingidas na superfície do esmalte irradiado, mostraram que o grupo que apresentou maior redução da solubilidade ácida do esmalte foi também o que apresentou maior aumento de temperatura e temperaturas na faixa interessante para perda de carbonato, entre 400 e 1200°C

(Figura 19). Já a estimativa do aumento de temperatura 2 mm abaixo da superfície foi de apenas 0,7 °C e 1,5 °C para as irradiações de pulso único com 0,3 e 0,7 J/cm² respectivamente. Portanto, estima-se que a temperatura na polpa tenha se mantido em níveis seguros (<2,2 °C).

Os *lasers* de CO₂ emitem em diversos comprimentos de onda, porém os principais são 9,3; 9,6; 10,3; 10,6 μm. Os comprimentos de 9,3 e 9,6 μm são os absorvidos em maior intensidade pelo esmalte. Porém, apesar do coeficiente de absorção em λ=9,6μm ser cerca de dez vezes maior que em λ=10,6μm, Zuerlein e colaboradores (1999) utilizando espectrômetro de transformada de Fourier observaram maior perda de carbonato no esmalte irradiado com *laser* de CO₂ emitindo em 10,6μm. Isso se deu, provavelmente devido à irradiação neste comprimento de onda ter mantido a temperatura de superfície acima do ponto de fusão da hidroxiapatita por mais tempo. Ao contrário da irradiação em 9,6 μm que promoveu um aumento inicial cerca de duas vezes maior (≈ 2400°C), mas que decaiu para temperaturas abaixo do ponto de fusão em menos de 15μs²⁶.

Neste trabalho o aumento da relação Ca/P medido nos dois grupos tratados com *laser*, se deu de forma diferente nos dois grupos. No grupo irradiado com 0,7 J/cm² houve uma diminuição maior do conteúdo de fósforo do que o de cálcio em relação ao controle. No grupo irradiado com 0,3 J/cm² o aumento maior da relação Ca/P, apesar de não ter sido estatisticamente diferente do grupo anterior, se deu por ter ocorrido tanto um aumento na quantidade de cálcio, como uma diminuição na quantidade fósforo perdido em relação ao controle.

Como o grupo irradiado com a menor fluência não apresentou diferença significativa em relação ao controle, quando comparadas, separadamente, as medidas de cálcio e fósforo presentes na solução, a relação Ca/P estatisticamente maior provavelmente se deve ao comportamento inverso do conteúdo de cálcio (+1,3%) e de fósforo (- 4%) neste grupo. No grupo irradiado com a maior fluência houve uma menor perda de cálcio (-10,6%) em relação à perda de fósforo (-14,4%).

No entanto, as variações encontradas na razão Ca/P (molar) neste estudo (1,7 a 1,8) variaram dentro de valores bastante próximos e dentro dos valores comumente encontrados na literatura, para a razão molar de diversas apatitas biológicas o que indica que houve desmineralização destes compostos,

porém não permite identificação exata de quais cristais de apatita permaneceram no esmalte ^{1,31}.

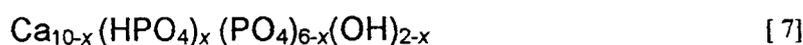
As imagens feitas através de microscopia eletrônica de varredura revelaram ausência de sinais de fusão, ablação ou microfissuras nas amostras tratadas com *laser*. Nos dois parâmetros de irradiação *laser* testados, as superfícies se apresentaram bastante regulares e muito semelhantes ao esmalte não irradiado. Porém, no grupo irradiado com $0,7 \text{ J/cm}^2$ algumas amostras apresentavam, a olho nu, ligeiros escurecimentos do tecido indicando perda de compostos orgânicos, mudança no índice de refração e eventual carbonização (Figura 16 E e F).

Apesar das poucas alterações morfológicas da superfície, a irradiação com $0,7 \text{ J/cm}^2$, foi capaz de provocar redução da desmineralização do esmalte, o que se comprovou morfológicamente pela presença de menos porosidades na superfície após a desmineralização (Figura 17- E e F, Figura 18 - E e F). Estes resultados estão de acordo com outro trabalho da literatura, em que nas amostras irradiadas com o comprimento de onda de $10,6 \mu\text{m}$ (12 J/cm^2) que não apresentavam, em MEV, alterações de superfície tais como fusão e resolidificação, houve uma alta porcentagem de inibição de cáries de 60 a 86%. Já nas irradiadas com $9,6\mu\text{m}$ (5 J/cm^2), que apresentaram em MEV, sinais de fusão, houve uma inibição de apenas 47-59% ²⁹.

O aspecto do esmalte natural, não irradiado e não lixado (Figura 16-A e B) é semelhante ao observado por outros autores ^{34, 29, 124, 125}. A desmineralização das amostras irradiadas com $0,3 \text{ J/cm}^2$ ocorreu de duas formas diferentes. Em algumas regiões, apresentando uma desmineralização acentuada, com presença de muitas porosidades (Figura 17 C e D) e, em outras (Figura 18 C e D), apenas uma desmineralização parcial, com dissolução seletiva do centro dos prismas. Esses padrões de desmineralização podem ser comumente observados na literatura, sendo que, o último, reflete o padrão de desmineralizações mais brandas, como as observadas em condicionamento de esmalte com finalidade adesiva, ou preparações específicas para observação dos prismas ^{51, 126, 127}. Nesta região é provável que, devido à distribuição desigual de energia no feixe, o *laser* tenha interagido mais com o tecido e, portanto, o esmalte se apresentou mais resistente à desmineralização.

O surgimento de cristais em formato de agulha, como mostrado na Figura 17-F pôde ser observado também por Malmström e colaboradores (2001), após irradiações de $2,6 \text{ J/cm}^2$, $200 \mu\text{s}$ e 200 Hz de $0,5 \text{ s}$ de duração. Os cristais também apareceram em aumento original de $5.000 \times$ e puderam ser encontrados tanto em esmalte oclusal quanto apical e em dentina. Porém, as amostras de esmalte não foram desmineralizadas, apenas irradiadas com *laser* de CO_2 , o que poderia indicar que a formação destes cristais seja um efeito do *laser* ¹²⁸.

A estrutura desses cristais formados, nas amostras irradiadas com $0,7 \text{ J/cm}^2$, após desmineralização, se assemelha bastante à observada nas apatitas sintéticas deficientes em cálcio (cristais inter cruzados em formato de agulha - Figura 20-A) e ao fosfato de tricálcio na forma β (β -TCP) ³¹. As apatitas deficientes em cálcio apresentam grande variabilidade na sua razão molar Ca/P, (entre 1,21- 1,64) e a sua estrutura pode ser representada pela seguinte fórmula:



O cristal de β -TCP geralmente se forma no esmalte aquecido a aproximadamente 600°C , apresenta uma relação Ca/P molar de 1,5 e pode se formar como resultado da pirólise (decomposição térmica) de apatitas deficientes em cálcio. A estrutura do β -TCP é representada pela fórmula:



O processo de desmineralização e remineralização do esmalte pode ser regulado por muitos fatores, entre eles as propriedades físicas e químicas de sua fase mineral. Neste sentido, quanto maior o produto de solubilidade dos minerais presentes no esmalte, maior será a sua dissolução ácida ¹²⁹. Os cristais de β -TCP apresentam um produto de solubilidade próximo ao da hidroxiapatita sintética, em torno de $3,6 \times 10^{-58}$ que é menor que o do esmalte natural (produto de solubilidade = $5,5 \times 10^{-55}$) ¹³⁰. Sendo assim, na presença de β -TCP o processo de desmineralização tem início apenas em presença de pH mais ácido do que o necessário para desmineralização do esmalte natural ¹⁰⁹. Dessa forma, a formação

destes cristais também sob o aspecto químico está fortemente relacionada a uma menor solubilidade do esmalte frente aos ácidos.

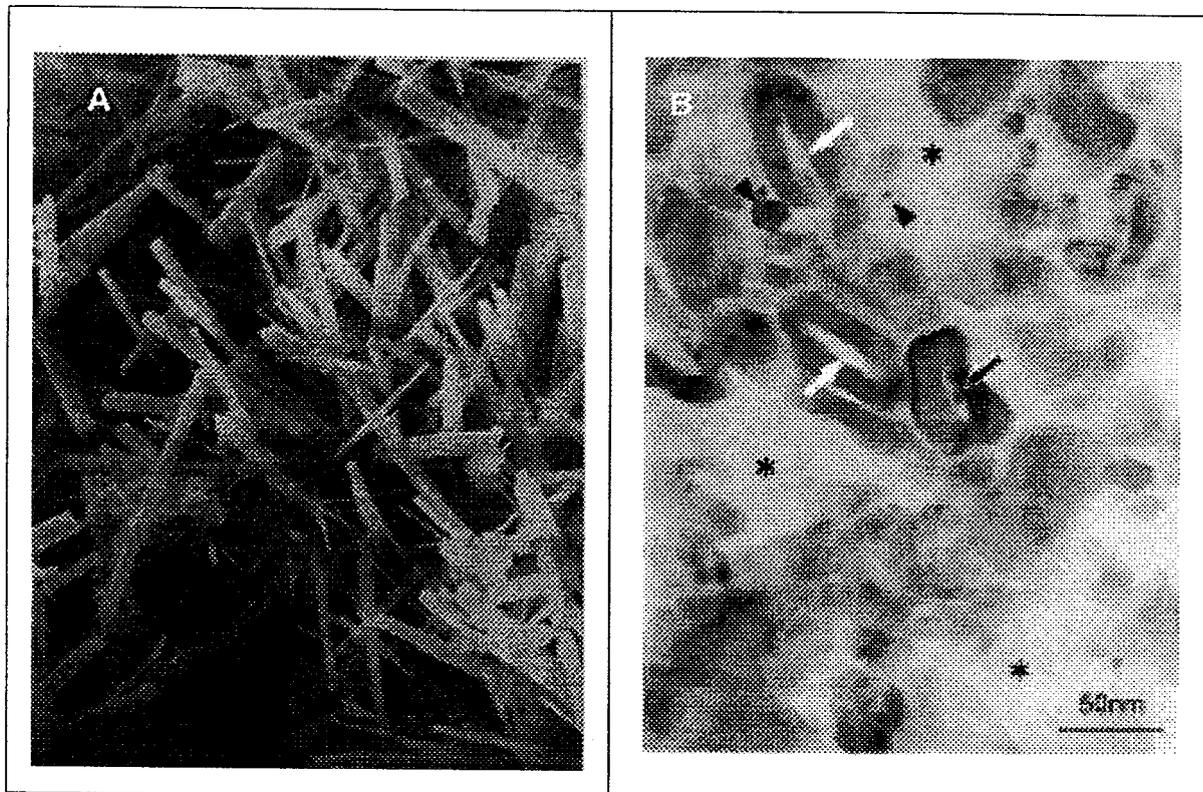


Figura 20 – A-Micrografia de apatita deficiente em cálcio produzida sinteticamente, mostrando cristais em formato de agulha e com disposição inter cruzada, produzida por LeGEROS, 1991³¹. B-Microscopia eletrônica de alta resolução, mostrando desmineralização e remineralização de cristais de esmalte, ocorrendo no mesmo campo de observação. Podem ser observados muitos pequenos cristais recém-formados (indicados por ▲) e centro de cristais, inicialmente dissolvidos, sendo restaurados (indicados por →), nas proximidades de cristais desmineralizados (indicados por ⇨). Os asteriscos indicam áreas completamente desmineralizadas, com ausência de cristais. Micrografia realizada por YANAGISAWA e MIAKE, 2003¹²⁷.

Porém, é sabido que durante o processo de remineralização de lesões cariosas pode haver crescimento de cristais, por pelo menos três maneiras. Recentemente, foi demonstrado que esse crescimento de cristais pode ser observado mesmo em amostras de esmalte, sofrendo desmineralização (solução de ácido acético, pH=4,0), para produção de cáries artificiais (Figura 20 – B). Os cristais resistentes produzidos em simulações de cáries, assim como os cristais

produzidos na desmineralização natural do esmalte, são mais espessos e mais extensos do que os cristais de esmalte sadio ¹²⁷.

A remineralização dos cristais de esmalte requer um aporte de íons cálcio e fósforo, normalmente provenientes da saliva. No entanto, em lesões artificiais, esses íons necessários, são supridos não pelo ambiente externo, mas sim pelos íons cálcio e fósforo liberados na desmineralização ¹²⁷.

Essas recentes descobertas, também podem explicar a presença dessas formações cristalinas, características de apatitas deficientes em cálcio e β -TCP, que puderam ser observadas nas amostras irradiadas com $0,7\text{J}/\text{cm}^2$ (Figura 18-F), e também a estrutura cristalina observada ao redor das grandes desmineralizações do esmalte controle.

Os resultados deste trabalho, parecem indicar que o aumento da resistência ácida do esmalte, após irradiação com *laser*, esteja mais relacionado com perda de carbonato, transformações de fase ou alterações na matriz orgânica do que com alterações de superfície do tipo fusão ^{26, 125}.

No grupo LB, tanto a maior densidade de energia, quanto a maior largura de pulso podem ter contribuído para a maior resistência do esmalte à solubilidade ácida. Apesar deste grupo também apresentar uma menor frequência, esta parece estar dentro de um valor razoável, visto que os melhores efeitos neste grupo não foram inibidos, com a utilização deste parâmetro.

No entanto estes resultados devem ser interpretados com cautela e nenhuma variável pode ser considerada, por si só, responsável pela menor desmineralização, ocorrida no grupo LB. Para que os efeitos de cada variável possam ser melhor observados, novas condições precisam ser testadas, variando-se apenas um dos parâmetros e avaliando seu efeito na inibição de cáries.

Como a largura de pulso utilizada neste grupo está mais próxima do tempo de relaxamento térmico do tecido ($\approx 80\mu\text{s}$), inicialmente esta poderia ser uma das variáveis fixada para permitir a observação do comportamento das demais.

A escolha dos parâmetros utilizados nesta dissertação foi feita observando-se os parâmetros relacionados aos melhores efeitos de redução de solubilidade do esmalte observados na literatura ^{23, 111}.

O parâmetro que apresentou o melhor resultado ($0,7 \text{ J/cm}^2$ de densidade de energia, $100\mu\text{s}$ de largura de pulso e 74 Hz de frequência) parece apresentar uma possível indicação clínica, pois além de reduzir a susceptibilidade do esmalte à desmineralização, apresentou superfície livre de sinais de ablação, fusão ou trincas.

Atualmente, existem diversos estudos avaliando o potencial dos *lasers* de CO_2 pulsados para prevenção de cáries, porém o efeito das muitas variações possíveis dentro dos parâmetros de irradiação e da sua associação com o flúor ainda não foram completamente explorados. Novas condições de irradiação devem ser testadas assim como seus efeitos na elevação da temperatura pulpar e no conteúdo mineral do esmalte. Além disso, os efeitos da interação desta luz com o tecido ainda precisam ser aprofundados, para que fique clara a ausência de efeitos deletérios, tais como trincas de subsuperfície, que possam ser incongruentes com uma aplicação em prevenção de lesões cariosas.

Portanto, novos estudos devem ter como foco os parâmetros de emissão do *laser* e a observação mais aprofundada do tecido irradiado, a fim de se estabelecer um protocolo que possa ser testado clinicamente com resultado eficiente e, ao mesmo tempo, seguro.

7. CONCLUSÕES

A seguinte conclusão pode ser feita a partir deste estudo:

A irradiação com *laser* de CO₂ emitindo em 10,6 μm com 0,7 J/cm² de densidade de energia, 100μs de largura de pulso e 74 Hz de freqüência é capaz de diminuir a solubilidade ácida do esmalte dental bovino.

APÊNDICE A – Microscopia de luz polarizada de esmalte bovino



Figura 21 – Amostras de esmalte bovino vistas em microscopia de luz polarizada, revelando que o protocolo de desmineralização comumente utilizado em dentes humanos²⁸, produz nestes dentes perda de superfície de esmalte intacta e cavitação. Portanto, inviabilizando a sua utilização para observação de lesões de cárie incipientes ou de subsuperfície.

ANEXO A – Gráfico da dispersão das leituras de cálcio e fósforo.

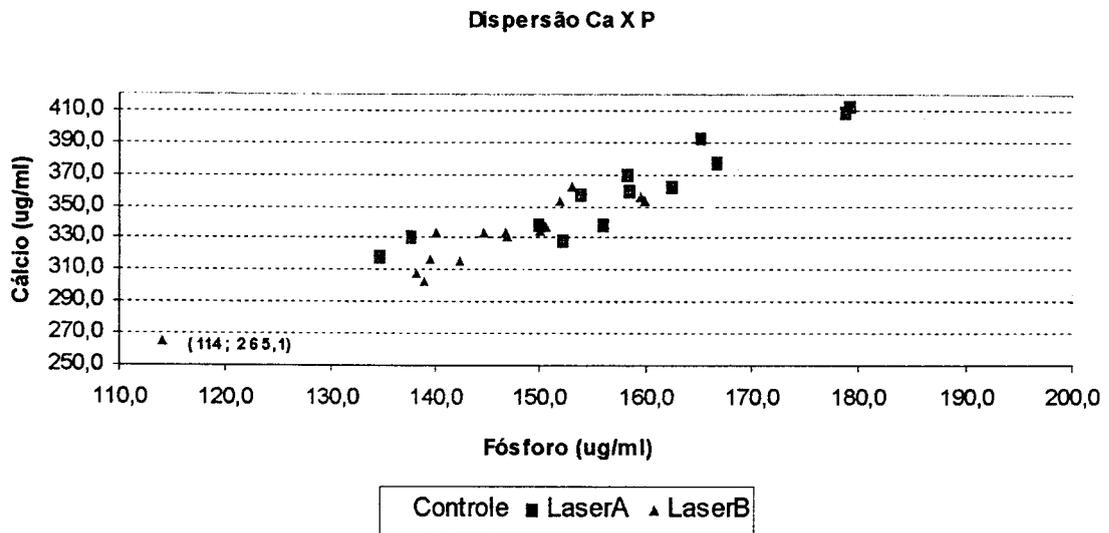


Figura 22 – Gráfico da dispersão das leituras de cálcio e fósforo dissolvidos na solução desmineralizante, em que observa-se que a medida que a quantidade de fósforo aumenta também há uma tendência no aumento das medidas de cálcio.

ANEXO B – Análise estatística descritiva de pontos discrepantes

Tabela 8 – Regressões lineares ajustadas para quantidade de Cálcio em função da quantidade de fósforo

		Coefficiente	Desvio Padrão	T	Nível Descritivo
Regressão 1	Constante	13,909	19,560	0,711	0,481
	Fósforo	2,162	0,123	17,610	<0,01
Regressão 2	Constante	10,4898	21,7133	0,483	0,632
	Fósforo	2,1826	0,1355	16,104	<0,001
Regressão 3	Constante	40,7124	18,4866	2,202	0,0335
	Fósforo	1,9809	0,1163	17,036	<0,001

Tabela 9 – Identificação dos pontos influente e de alavanca

Obs	P	Ca	Ajustado	Erro Padrão	Resíduo	
28	114	265,1	260,35	5,83	4,75	X
35	185	449,5	412,76	3,79	36,74	R
36	183	446,3	410,38	3,68	35,92	R

X: Ponto supostamente influente
R: Pontos supostamente de alavanca

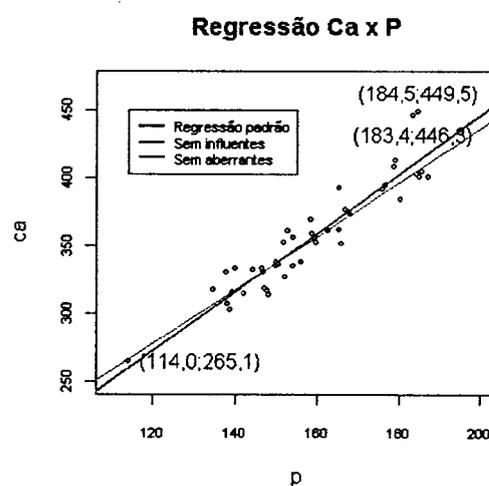
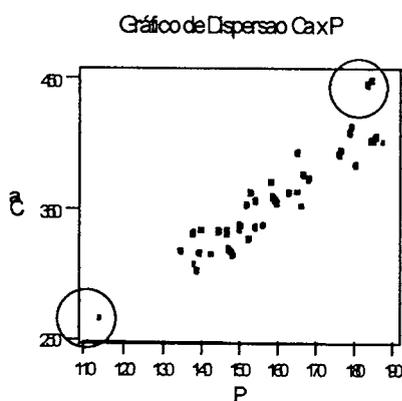


Figura 23 - Diagrama de dispersão das médias de cálcio e fósforo

Figura 24 - Representação gráfica do ajuste dos pontos das três regressões.

ANEXO C – Análise estatística removendo-se pontos discrepantes

Tabela 10 – Análises de variância para cálcio e fósforo removendo as observações influente (2) e influente e de alavanca (3), mostrando que as observações discrepantes não influenciam na conclusão do teste.

		G.L.	Soma Quadrados	Quadrado Médio	F	Nível Descritivo
Ca2	Grupo	2	13130,0	6565,0	6,064	0,005
	Resíduos	41	44392,0	1083,0		
Ca3	Grupo	2	9464,6	4732,3	5,892	0,006
	Resíduos	39	31325,0	803,2		
P2	Grupo	2	3490,6	1745,3	10,368	<0,001
	Resíduos	41	6901,6	168,3		

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 HICKS, J.; GARCIA-GODOY, F.; FLAITZ, C. Biological factors in dental caries enamel structure and the caries process in the dynamic process of demineralization and remineralization. *J. Clin Pediatr. Dent.*, v.28, n.2, p. 119-124, 2004.
- 2 PETERSEN, P.E. *Continuous improvement of oral health in the 21st century- the approach of World Health Organization Global Oral Health Program Current oral health situation*. The World Oral Health Report, Genebra, Suíça, 2003. Disponível em: <http://www.who.int/oral_health/media/en/orh_report03_en.pdf>. Acesso em 26 maio. 2005.
- 3 Organização Mundial da Saúde. **Levantamentos Básicos em Saúde Bucal**. 4 ed. São Paulo: Santos; 1999.
- 4 WHELTON, H. Overview of the impact of changing global patterns of dental caries experience on caries clinical trials. *J.Dent. Res.*, v. 83, spec. iss. C, p. C29-C34, 2004.
- 5 FEATHERSTONE, J.D.B. Prevention and reversal of dental caries: role of low level fluoride. *Community. Dent. Oral. Epidemiol.*, v. 27, n. 1, p. 31-40, 1999.
- 6 YAMAGISHI, K.; ONUMA, K.; SUZUKI, T.; OKADA, F.; TAGAMI, J.; OTSUKI, M.; SENAWANGSE, P. A synthetic enamel for rapid tooth repair. *Nature*, v. 24, n. 433 (7028), p. 819, 2005.
- 7 FEATHERSTONE, J.D.B. The continuum of dental caries – evidence for a dynamic process. *J. Dent. Res.*, v. 83, n. spec iss. C, p. C39-C42, 2004.
- 8 SOGNAES, R. F.; STERN, R.H. Laser effect on resistance of human enamel to demineralization in vitro. *J. S. Calif. Dent. Assoc.*, v. 33, p. 328-329, 1965.
- 9 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, 1966.
- 10 STERN, R.H.; SOGNAES, R.F. Laser inhibition of dental caries suggested by first tests in vivo. *J. Am. Dent. Assoc.*, v. 85, p. 1087-1090, 1972.
- 11 ZECELL, D.M.; CECHINNI, S.C.; EDUARDO, C.P.; MATSUMOTO, K.; DE ROSSI, W., NOGUEIRA, G.E.; BERETTA, J.R. VIEIRA JUNIOR, N.D.; MORATO, S.P. Experimental studies of the applications of the holmium laser in dentistry. *J Clin Laser Med Surg.*, v. 13, n. 4, p. 283-289, 1995.
- 12 YAMAMOTO H, SATO K. Prevention of dental caries by Nd:Yag laser irradiation. *J Dent Res.*, v. 59, p. 2171-2177, 1980

-
- 13 WESTERMAN GH, HICKS MJ, FLAITSZ CM, BLANKENAU RJ, POWELL GL. Argon laser irradiation in root surface caries: In vitro study examines laser's effect. *J. Am. Dent. Assoc.*, v.125, p. 401-407, 1994.
 - 14 APEL, C.; MEISTER, J.; GÖTZ, H.; DUSCHNER, H.; GUTKNECHT, N. Structural changes in human dental enamel after subablative erbium laser irradiation and its potential use for caries prevention. *Caries Res.*, v.39, p. 65-70, 2005.
 - 15 APEL, C.; MEISTER, J.; SCHMITT, N.; GRÄBER, H.G.; GUTKNECHT, N. Calcium solubility of dental enamel following sub-ablative Er:YAG and Er:YSGG laser irradiation in vitro. *Caries Res.*, v. 37, n. 1, p. 34-37, 2003.
 - 16 GOODIS, H.E.; FRIED, D.; GASNKY, S.; RECHMANN, P.; FEATHERSTONE, J.D.B. Pulpal safety of 9.6 μm TEA CO₂ laser used for caries prevention. *Lasers Surg. Med.*, v. 35, p. 104-110, 2004.
 - 17 NAMMOUR S, RENNEBOOG-SQUILBIN C, NYSSSEN-BEHETS C. Increased resistance to artificial caries-like lesions in dentin treated with CO₂ laser. *Caries Res.*, v.26, p. 170-175, 1992
 - 18 FOX JL, YU D, OTSUKA M, HIGUCHI WI, WONG J, POWELL GL. Initial dissolution rate studies on dental enamel after CO₂ laser irradiation. *J. Dent. Res.*, v. 71, p. 1389-1398, 1992.
 - 19 FEATHERSTONE, J.D.B.; NELSON, D.G.A. Laser effects on dental hard tissues. *Adv. Dent. Res.*, v. 1, p. 21-26, 1987.
 - 20 HSU, J.; FOX, J.L.; HIGUCHI, W.I.; OTSUKA, M.; YU, D.; POWELL, G.L. Heat-treatment-induced reduction in the apparent solubility of human enamel. *J. Dent. Res.*, v. 12, p. 1848-1848, 1994.
 - 21 SATO, K. Relation between acid dissolution and histological alteration of heated tooth enamel. *Caries Res.*, v.17, p. 490-495, 1983.
 - 22 HSU, C.Y.S.; JORDAN, T.H.; DEDERICH, D.N.; WEFEL, J.S. Effects of low-energy CO₂ laser irradiation and the organic matrix on inhibition of enamel demineralization. *J. Dent. Res.*, v. 79, n.9, p. 1725-1730, 2000.
 - 23 FEATHERSTONE, J.D.B.; BARRETT-VESPONE, N.A.; FRIED, D.; KANTOROWITZ, Z.; LOFTHOUSE, J.; SEKA, W. **Rational choice of laser conditions for inhibition of caries progress.** In: Lasers in dentistry. Bellingham, WA: SPIE, v.2394, p.57-67, 1995.
 - 24 BACHMANN, L.; ZECELL, D.M. **Estrutura e composição do esmalte e da dentina – tratamento térmico e irradiação laser.** São Paulo: Física, 2005.

- 25 RIPA, L.W.; LESKE, G.S., VARNA, A.O. Longitudinal study of the caries susceptibility of occlusal and proximal surfaces of first permanent molars. *J. Public. Health Dent.*, v. 48, p.8-13, 1998.
- 26 ZURELEIN, M.J.; FRIED, D.; FEATHERSTONE, J.D.B. Modeling the modification depth of carbon dioxide laser-treated dental enamel. *Lasers Surg. Med.*, v. 25, p. 335-347, 1999.
- 27 ZUERLEIN, M.J.; FRIED, D.; SEKA, W.; FEATHERSTONE, J.D.B. **Adsorption coefficients of dental enamel in the infrared: a solution to a seemingly straightforward problem.** In: Lasers in dentistry IV, Bellingham, WA: Proceedings of SPIE, v. 3248, p. 136-145, 1998.
- 28 FEATHERSTONE, J.D.B; BARRET-VEPONE, N.A.; FRIED, D.; KANTOROWITZ, Z.; SEKA, W. CO₂ laser inhibition of artificial caries-like lesion progression in dental enamel. *J. Dent. Res.*, v. 77, n. 6, p. 1397-1403, 1998.
- 29 KANTOROWITZ, Z.VI.; FEATHERSTONE, J.D.B; FRIED, D. Caries prevention by CO₂ laser treatment: dependency on the number of pulses used. *J. Am. Dent. Assoc.*, v. 129, n.5, p. 585-591, 1998.
- 30 TEN CATE, A.R. **Histologia bucal: desenvolvimento, estrutura e função.** 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 439 p. Título original: Oral histology: development, structure and function.
- 31 LeGEROS, R.Z. **Calcium phosphates in oral biology and medicine.** In: MYERS, H.M.(Ed.). Monographs in Oral Science. Basel: Karger, 1991, v.15.
- 32 HICKS, J.; GARCIA-GODOY, F.; FLAITSZ, C. Biological factors in dental caries enamel structure and the caries process in the dynamic process of demineralization and remineralization. *J. Clin Pediatr. Dent.*,v.28, n.2, p. 119-124, 2004.
- 33 RIPA I.W.; GWINETT, A.J.; BUONOCORE, M.G. The "prismless" outer layer of deciduous and permanent enamel. *Arch. Oral Biol.*, v. 11, p.41, 1966.
- 34 EINSPAHR, H.M.; BUGG, C.E. **Enamel, apatite and caries – A crystallographic view.** In: MENAKER, L. (Ed.) The biologic basics of dental caries. Maryland: Harper & Row, 1980. cap. 7, p.170-184.
- 35 FEATHERSTONE, J.D.B. Caries detection and prevention with laser energy. *Dent. Clin. North. Am.*, v. 44, n.4, p. 955-969, 2000.
- 36 AOBA, T.; MORENO, E.C.The enamel fluid in the early secretory stage of porcine amelogenesis. Chemical composition and saturation with respect to enamel mineral. *Calcif. Tissue Int.*,v. 41, p. 86-94, 1987.
- 37 YOUNG R.A. Implications of atomic substitutions and other structural details in apatites. *J. Dent. Res.*, v.53, p. 193-205, 1974.

-
- 38 TEN CATE, J. M, FEATHERSTONE, J.D.B. Mechanistic aspects of the interactions between fluoride and dental enamel. *CRC Crit. Rev. Oral Biol.* v. 2, p. 283-296, 1991.
- 39 LOESCHE, W.J. Produção de ácidos na placa. In: LOESCHE, W.J. *A doença cárie: uma infecção tratável*. Springfield: Thomas, 1982, p.128-150.
- 40 LARSEN, M.J.; BRUUN, O. A química da cárie dentária e o flúor - mecanismo de ação. In: THYLSTRUP, A.; FEJERSKOV *Cariologia Clínica* 3.ed. São Paulo: Santos, 2001. cap. 11 p. 231-257.
- 41 THYLSTRUP, A.; FEJERSKOV *Cariologia Clínica* 3.ed. São Paulo: Editora Santos, 2001.
- 42 AOBA, T. Solubility properties of human tooth mineral and pathogenesis of dental caries. *Oral Diseases*, v.10, n. 5, p. 249-257, 2004.
- 43 LARSEN, M.J.; FEJERSKOV, O. Chemical and structural challenges in remineralization of dental enamel lesions. *Scand. J. Dent. Res.*, v.97, n. 285-296, 1989.
- 44 CAUFIELD, P.W. Dental caries: an infectious and transmissible disease where have we been and where are we going? *N Y State Dent. J.*, v.71, n. 2, p. 23-27, 2005.
- 45 SVENSATER, G.; BORGSTROM, M.; BOWDEN, G.H.; EDWARDSSON, S. The acid-tolerant microbiota associated with plaque from initial caries and healthy tooth surfaces. *Caries Res.*, v.37, n. 6, p. 395-403, 2003.
- 46 EDWARDSON, S. Bacteriological studies on deep areas of carious dentine. *Odontol Revy* v.25, n.32, 7-43, 1974.
- 47 FITZGERALD, R.J. Dental caries research in gnotobiotic animals. *Caries Res.*, v. 2, p. 139-146, 1968.
- 48 NAVIA, J.M. *Plaque biochemistry*. In: MENAKER, L. (Ed.) The biologic basics of dental caries. Maryland: Harper & Row, 1980. cap. 14, p.276-292.
- 49 ZAURA, E.; BUIJIS, M.J.; TEN CATE, J.M. The effects of the solubility of artificial fissures on plaque pH. *J. Dent. Res.*, v. 81, p.567-571, 2002.
- 50 KIDD, E.A.M.; FEJERSKOV, O. What constitutes dental caries? Histopathology of carious enamel and dentin related to the action of cariogenic biofilms. *J. Dent. Res.*, v.83, spec. iss. C, p. C35- C38, 2004.
- 51 SILVERSTONE, L.M. The structure of carious enamel, including the early lesion. *Oral Science Rev.*, v.3, p. 100-160, 1973.

- 52 GRAY, J.A. Kinetics of enamel dissolution during formation of incipient caries-like lesions. **Arch. Oral Biol.**, v.11, p.397-421, 1966.
- 53 FEATHERSTONE J.D.B.; RODGERS B.E. Effect of acetic, lactic and other organic acids on the formation of artificial carious lesions. **Caries Res.**, v.15, p. 377-385, 1981.
- 54 BORGSTROM, M.K.; EDWARDSON, S.; SVENSATER, G. TWETMAN, S. Acid formation in sucrose-exposed dental plaque in relation to caries incidence in schoolchildren. **Clin. Oral Investig.**, v. 4, n. 1, p. 9-12, 2000.
- 55 DAMEN, J.J.; BUIJIS, M.J.; TEN CATE, J.M. Acidogenicity of buccal plaque after a single rinse with amine fluoride - stannous fluoride mouthrinse solution. **Caries Res.**, v. 36, n. 1, p. 53-7, 2002.
- 56 GEDDES, D.A.M. Acids produced by human dental plaque metabolism *in situ*. **Caries Res.**, v. 9, p. 98-109, 1975.
- 57 COLE, M.F.; BOWDEN, G.H.; KORST, D.C.; BOWEN W.H. The effect of pyridoxine, phytate and invert sugar on production of plaque acids *in situ* in the monkey. **Caries Res.**, v. 12, p. 190, 1978.
- 58 FEATHERSTONE, J.D.B.; RODGERS, B.E. The effect of acetic, lactic and other organic acids on the formation of artificial carious lesions. **Caries Res.**, v. 15, p.377-385, 1981.
- 59 LOESCHE, W.J. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. **Microbiol. Rev.** v. 50, p.353-380, 1986.
- 60 HAY, D.I.; SCHLUCKBIR, S.K.; MORENO, E.C. Equilibrium dialysis and ultrafiltration studies of calcium and phosphate binding by human salivary proteins. Implications for salivary supersaturation with respect to calcium phosphates salts. **Calcif. Tissue Int.**, v.34, p. 531-538, 1982.
- 61 CURZON, M.E.J. CROCKER, D.C. Relationship of trace elements in human tooth enamel to dental caries. **Arch. Oral Biol.**, v.23, p. 647-653, 1978.
- 62 Ministério da Saúde. Projeto SB Brasil 2003: condições de saúde bucal da população brasileira 2002-2003- resultados principais. Disponível em: <http://www.saude.rio.rj.gov.br/saude/pubsms/media/relatorio_brasil_sorridente.pdf>. Acesso em 25 maio 2005.
- 63 ETTINGER, R.L. Oral health needs of the elderly – an international review. **Int. Dental Journal.**, v. 43, n. 4, p. 348-54, 1993
- 64 KEYES, P.H. The infectious and transmissible nature of dental caries. Findings and implications. **Arch. Oral Biol.**, v.1, p.304-320, 1960.

-
- 65 KEYES, P.H.; FITZGERALD, R.J. Dental caries in the Syrian hamster X – Natural history of the disease in a single family. *Int. Dent. J.* v.13, p. 86-109, 1963.
- 66 LOESCHE, W.J. The sintomatic treatment of dental decay. In: LOESCHE, W.J. *Dental decay – a treatable infection*. Springfield: Thomas, 1982, p.288-313.
- 67 BROWN, R.H. Evidence of decrease in prevalence of dental carie in New Zeland. *J. Dent. Res.*, v.61, Special Issue, p. 1327-1330, 1982.
- 68 BROWN, R.H; TREASURE, E.T. Inequities in oral health: implications for delivery of care and health promotion. *N. Z. Dent. J.*, v.88, p. 132-138, 1992.
- 69 FEHR, F. Caries status in nordic countries and predictions of future trends. In: MARTHALER, T.M. Caries status in europe and predictions of future trends. *Caries Res.*, v. 24, p. 381-396, 1980.
- 70 WINN, D.M.; BRUNELLE, J.A.; SELWITZ, R.H.; KASTE, L.M.; OLDAKOWSKI, R.J.; KINGMAN, A.; BROWN, R.J. Coronal and root caries in the dentition of adults in the United States, 1988-1991. *J Dent Res.*, v.75, Special Issue, p. 642-651, 1996.
- 71 BRATTHALL, D.; PETERSON, H; SUNDBERG, H. Reasons for the caries decline: what do the experts belive? *Eur. J. Oral Sci.*, v. 104, p. 416-422, 1996.
- 72 SILVERSTONE, L.M. The effect of fluoride in the remineralizatio of enamel caries and caries-like lesions in-vtro. *J. Public. Health Dent.*, v.42, n. 1, p. 42-53, 1982.
- 73 TEN CATE, J.M.; BUIJS, M.J.; DAMEN, J.J.M. pH-cycling of enamel and dentin lesions in the presence of low concentrations of fluoride. *Eur. J. Oral Sci.*, v.103, p 362-367, 1995
- 74 ANUSAVICE, K.J. Present and future approaches for the control of caries. *J. Dent. Educ.*, v. 69, n. 5, p. 538-554.
- 75 BIRNGRUBER, R. Laser output characteristics. *Health Phys.*, v. 56, n. 5, p. 605-611, 1989.
- 76 ZECELL, D.M.; ANA, P.A.; RIBEIRO, A.C.; FREITAS, A.Z.; ROCHA, R.M.M.; OLIVEIRA, M.E.; BACHMANN, L. Lasers in caries diagnosis and prevention. *Lasers Surg. Med.*, v. 56, suppl. 17, p. 19, 2005.
- 77 NIEMZ, M.H. *Laser-tissue interactions:fundamentals and applications*. Berlin:Springer-Verlag, 1996.
- 78 MISERENDINO, L.J., PICK, R.M. *Lasers in dentistry*. Chicago: Quintessence, 1995.

-
- 79 GUTKNECHT, N.; EDUARDO, C.P. A odontologia e o laser. São Paulo: Quintessence editora, 2004, 320 p. Título original: *Lasertherapie in der zahnärztlichen praxis*.
- 80 TUNÉR, J.; HODE, L. **Low level laser therapy: clinical practice and scientific background**. Grandesberg: Prima Books, 1999.
- 81 KAMINSKII, A.A. **Laser crystals: their physics and properties**. Berlin: Springer-Verlag, 1981.
- 82 PICK, R.M.; PECARO, B.C.; SILBERMAN, C.J. The laser gingivectomy: the use of the CO₂ laser for the removal of phenytoin hyperplasia. **J Periodontol.**, v. 56, n.8, p. 492-496, 1985.
- 83 PICK, R.M.; PECARO, B.C. Use of the CO₂ laser in soft tissue dental surgery. **Lasers Surg. Med.**, v. 7, n. 2, p. 207-213, 1987.
- 84 MARRACCINI, T.M.; WIGDOR, H.A.; TURBINO, M.L.; STABHOLTZ, A.; ZECELL, D.M. Laser-etched conditioning of dental hard tissues using the Er : YAG laser and the CO₂ laser. **Lasers Surg. Med.**, v. 30, n. S14, p. 73-74, 2002.
- 85 PICK, R.M.; COLVARD, M.D. Current status of lasers in soft tissue dental surgery. **J. Periodontol.**, v. 64, p. 589-602, 1993.
- 86 MAIMAN, T. H. Stimulated optical radiation in ruby. **Nature**, v.187, n. 4736, p.493-494,1960.
- 87 ZECELL, D.M.; RIBEIRO, M.S.; MALDONADO, E.P. Apostila Interação da luz laser com tecidos biológicos: aplicações. Curso Mestrado Profissionalizante "Lasers em Odontologia", 2005.
- 88 WALSH, L.J.; PERHAM, S. Enamel fusion using a carbon dioxide laser: a technique for sealing pits and fissures. **Clin. Prevent. Dent.**, v. 13, n. 3, p. 16-20, 1991.
- 89 MISERENDINO, L.J.Ç NEIBURGER, E.J.; WALIA, H.; LUEBKE, N.; BRANTLEY, W. Thermal effects of continuous wave CO₂ laser exposure on human teeth: an in vitro study. **J. Endod.**, v. 15, n. 7, 302-305, 1989.
- 90 ZACH, L.; COHEN, G. Pulp response to externally applied heat. **Oral Surg. Oral Méd, Oral Pathol.**, v.19, n.4, p. 515-530, 1965.
- 91 TEPPER, S.A.; ZEHNDER, M.; PAJAROLA, G.F.; SCHMIDIN, P.R. Increased fluoride uptake and acid resistance by CO₂ laser-irradiation through topically applied fluoride on human enamel in vitro. **J. Dent.**, v. 32, p. 635-641, 2004.

- ⁹² HOSSAIN, M.M.I.; HOSSAIN, M.; KIMURA, Y.; KINOSHITA, J.I.; YAMADA, Y.; MATSUMOTO, K. Acquired acid resistance of enamel and dentin by CO₂ laser irradiation with sodium fluoride solutions. *J. Clin. Laser Med. Surg.*, v.20, n. 2, p. 77-82, 2002.
- ⁹³ HOSSAIN, M.; NAKAMURA, Y.; KIMURA, Y.; ITO, M.; YAMADA, Y.; MATSUMOTO, K. Acquired acid resistance of dental hard tissues by CO₂ laser irradiation. *J. Clin. Laser Med. Surg.*, v.17, n. 5, p. 223-226, 1999.
- ⁹⁴ RAGADIO, J.; LEE, C.; FREID, D. **Residual energy deposition in dental enamel during IR laser ablation at 2.79, 2.94, 9.6 and 10.6 μm .** In: Lasers in dentistry VI Bellinghan, WA: SPIE, v.2973, p.112-116, 2000.
- ⁹⁵ FEATHERSTONE, J.D.B. Caries detection and prevention with laser energy. *Dent. Clin. North. Am.*, v. 44, n.4, p. 955-969, 2000.
- ⁹⁶ BORGGREVEN, J.D.B.; MELBERG, J.R. Effect of laser irradiation on the permeability of bovine dental enamel. *Arch. Oral Biol.*, v.25, p. 109-114, 1980.
- ⁹⁷ NELSON, D.G.A.; GLENA, M.S.; 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. 3, p. 289-299, 1986.
- ⁹⁸ TAKAHASHI, K.; KIMURA, Y.; MATSUMOTO, K. Morphological and atomic analytical changes after CO₂ laser irradiation emitted at 9.3 μm on human dental hard tissues. *J. Clin. Laser Med. Surg.*, v.16, n.3, 1998.
- ⁹⁹ FEATHERSTONE, J.D.B.; FRIED, D.; BITTEN, E.R. **Mechanism of laser induced solubility reduction of dental enamel.** In: Lasers in dentistry III. Bellinghan, WA: SPIE, v.2973, p.112-116, 1997.
- ¹⁰⁰ FEATHERSTONE, J.D.B.; FRIED, D.; DUHN, C.W.; **Surface dissolution kinetics of dental hard tissue irradiated over a fluence range of 1 to 8 J/cm^2 .** In: Lasers in dentistry IV. Bellinghan, WA: SPIE, v.3248, p.146-151, 1998.
- ¹⁰¹ TAGLIAFERRO, E. P. S. **Avaliação *in vitro* da associação de laser de co2 e flúor fosfato acidulado na inibição da progressão de cárie em esmalte de dentes decíduos.** 2004. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade de Campinas, Piracicaba.
- ¹⁰² KLEIN, A.L.L.; RODRIGUES, L.K.A; EDUARDO, C.P.; NOBRE DOS SANTOS, M.; CURY, J.A. Caries inhibition around composite restorations by pulsed carbon dioxide laser application. *Eur. J. Oral. Sci.*, v. 113, p. 239-244, 2005.
- ¹⁰³ TAGLIAFERRO, E.P.S. **Avaliação *in vitro* da associação de laser de CO2 e flúor fosfato acidulado na inibição da progressão de cárie em esmalte de**

- dentes decíduos**. 2004. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Odontologia da Universidade de Campinas UNICAMP, Piracicaba.
- ¹⁰⁴ FRIED, D.; SEKA, W. GLENA, R.E.; FEATHERSTONE, J.D.B. Thermal response of hard dental tissues to 9 through 11 μm CO₂ laser irradiation. *Opt. Eng.*, v.35, n. 7, p. 1976-1984, 1996.
- ¹⁰⁵ TSAI, C.H.; LIN, Y.T.; HUANG, S.T.; CHANG, H.W. In vitro acid resistance of CO₂ and Nd:YAG laser-treated human tooth enamel. *Caries Res.*, v. 36, n. 6, p. 423-429, 2002.
- ¹⁰⁶ NICCOLI-FILHO, W.; FURLANI, J.C.; SCHWAB, C.; RALDI, F.V.; EDUARDO, C. P. Intrapulpar temperature during continuous CO₂ laser irradiation in human molars: an in vitro study. *J Laser Appl.*, v. 9, n.6, p. 291-294, 1997.
- ¹⁰⁷ FRIEDMAN, S.; LIU, M.; DORSCHER-KIM, J.; KIM, S. In situ testing of CO₂ laser on dental pulp function: effects on microcirculation. *Lasers Surg. Med.*, v. 11, n. 4, p. 325-330, 1991.
- ¹⁰⁸ FEATHERSTONE, J.D.B.; NELSON, D.G.A. Laser effects on dental hard tissue. *Adv. Dent. Res.*, v. 1, p. 21-26, 1987.
- ¹⁰⁹ FOWLER, B.O.; KURODA, S. Changes in heated and in laser-irradiated human tooth enamel and their probable effects on solubility. *Calcif. Tissue Int.*, v. 38, p. 197-208, 1986.
- ¹¹⁰ NELSON D.G.A; FEATHERSTONE, J.D.B. Preparation, analysis, and characterization of carbonated apatites. *Calcif. Tissue Int.*, v. 34, p. s89-s81, 1982.
- ¹¹¹ FEATHERSTONE, J.D.B.; FRIED, D.; McCOMARCK, S.M.; SEKA, W. **Effect of pulse duration and repetition rate on CO₂ laser inhibition of caries progression**. In: Lasers in dentistry II Bellinghan, WA: SPIE, v.2672, p.79-87, 1996.
- ¹¹² FRIED, D.; ZUERLEIN, M.; FEATHERSTONE, J.D.B.; SEKA, W.; DUHN, C.; McCOMARCK, S.M. IR laser ablation of dental enamel: mechanistic dependence on the primary absorber. *Appl. Surf. Sci.*, v.127-129, p. 852-856, 1998.
- ¹¹³ FRIED, D.; GLENA, R.W.; FEATHERSTONE, J.D.B.; SEKA, W. Permanent and transient changes in the reflectance of CO₂ laser-irradiated dental hard tissues at $\lambda = 9.3, 9.6, 10.3$ and $10.6 \mu\text{m}$ and at fluences of 1-20 J/cm². *Laser Surg. Med.*, v. 20, p. 22-31, 1997.
- ¹¹⁴ BACHMAN, L. dados ainda não publicados.
- ¹¹⁵ LEMES, M.J.L.; **Avaliação de metais e elementos-traço em águas e sedimentos das bacias hidrográficas dos rios Mogi-Guaçu e Pardo, São**

-
- Paulo.** 2001. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.
- ¹¹⁶ THOMPSON, T. Analytical performance of inductivity coupled plasma atomic emission spectrometry. In: MONTASER, A.; GOLIGHTLY, D. **Inductively coupled plasma in analytical spectrometry**, New York, N.Y: VHC Publishers, 1997, p. 163-199.
- ¹¹⁷ ARENDS, J.; SCHUTHOF, J.; HONGEBLOED, W.G. Lesion depth and microhardness indentations on artificial white spot lesions. **Caries Res.**, v. 14, p.190-195, 1980.
- ¹¹⁸ SHELLIS, R.P. Relationship between human enamel structure and the formation of caries-like lesions in vitro. **Arch. Oral Biol.**, v.29, n.12, p.975-81, 1984.
- ¹¹⁹ FEATHERSTONE, J.D.B.; MELBERG, J.R. Relative rates of progress of artificial carious lesions in bovine, ovine and human enamel. **Caries Res.**, v. 15, p. 109-114, 1981.
- ¹²⁰ FEATHERSTONE, J.D.; GLENA, R.; SHARIATI, M.; SHIELDS, C.P. Dependence of in vitro demineralization of apatite and remineralization of dental enamel on fluoride concentration . **J. Dent. Res.**, v.69, p.620-625, 1990.
- ¹²¹ APEL, C.; MEISTER, J.; SCHMITT, N.; GRÄBER, H.G.; GUTKNECHT, N. Calcium solubility of dental enamel following sub-ablative Er:YAG and Er:YSGG laser irradiation in vitro. **Lasers Surg. Med.**, v. 30, p.337-341, 2002.
- ¹²² FRIED, D.; RAGADIO, J.; CHAMPION, A. Residual heat deposition in dental enamel during IR laser ablation at 2.79, 2.94, 9.6 an 10.6 μ m. **Lasers Surg. Med.**, v.29, p. 221-229, 2001.
- ¹²³ FRIED, D.; ZURELEIN, M.J.; LE, C.Q.; FEATHERSTONE, J.D.B. Thermal and chemical modification of dentin by 9-11 μ m CO2 laser pulses of 5-100 μ s duration. **Lasers Surg. Med.**, v. 31, p. 275-282, 2002.
- ¹²⁴ STERN, R.; VAHL, J.; SOGNAES, R.F. Lased enamel: ultrastructural observations of pulsed carbon dioxide laser effects. **J. Dent. Res.**, v.51, p. 455-460, 1972.
- ¹²⁵ McCORMACK, S.M.; FRIED, D.; FEATHERSTONE, J.D.B.; GLENA, R.E.; SEKA, W. Scanning electron microscope observations of CO2 laser effects on dental enamel. **J. Dent. Res.**, v. 74, n. 10, p. 1702-1708, 1995.
- ¹²⁶ TOHDA, H.; TAKUMA, S.; TANAKA, N. Intracrystalline structure of enamel crystals affected by caries. **J Dent Res.**, v. 66, n. 11, p. 1647-1653, 1987.

-
- ¹²⁷ YANAGISAWA, T.; MIAKE, Y. High-resolution electron microscopy of enamel-crystal demineralization and remineralization in carious lesions. ***J Electron Microsc.***, v. 52, n. 6, p. 605-13, 2003.
- ¹²⁸ MALMSTRÖM, H.S.; McCORMACK, S.M; FRIED, D.; FEATHERSTONE, J.D.B. Effect of CO2 laser on pupal temperature and surface morphology an in vitro study. ***J. Dent.***, v. 29, n. 8, p. 521-529, 2001.
- ¹²⁹ SHELLIS, R.P.; WILSON, R.M. Apparent solubility distributions of hydroxyapatite and enamel aptite. ***J. Colloid Interface Sci.***, v. 278, p. 325-332, 2004.
- ¹³⁰ MARGOLIS, H.C.; MORENO, E.C. Kinetics and thermodynamic aspects of enamel demineralization. ***Caries Res.***, v.29, p. 22-35, 1985.



M23129



Ministério
da Ciência
e Tecnologia



Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares
Diretoria de Ensino & Informação Científica e Tecnológica
Av. Prof. Lineu Prestes, 2242 - Cidade Universitária CEP: 05508-000
Fone/Fax(0XX11) 3816 - 9148
SÃO PAULO - São Paulo - Brasil
<http://www.ipen.br>

O Ipen é uma autarquia vinculada à Secretaria de Ciência, Tecnologia e Desenvolvimento Econômico e Turismo do Estado de São Paulo, gerida técnica, administrativa e financeiramente pela Comissão Nacional de Energia Nuclear, órgão do Ministério da Ciência e Tecnologia, e associada à Universidade de São Paulo.