



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José dos Campos
Instituto de Ciência e Tecnologia

MATEUS RODRIGUES SILVA

**AVALIAÇÃO DA IRRADIAÇÃO DO *Nd:YAG LASER* SOBRE
ESMALTE DENTAL, ASSOCIADA OU NÃO A UM
FOTOABSORVEDOR, NA REDUÇÃO DA DESMINERALIZAÇÃO POR
CÁRIE ARTIFICIAL**

2018

MATEUS RODRIGUES SILVA

AVALIAÇÃO DA IRRADIAÇÃO DO *Nd:YAG LASER* SOBRE *ESMALTE DENTAL*, ASSOCIADA OU NÃO A UM FOTOABSORVEDOR, NA REDUÇÃO DA DESMINERALIZAÇÃO POR CÁRIE ARTIFICIAL

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para a obtenção do título de MESTRE, pelo Programa de Pós-Graduação em ODONTOLOGIA RESTAURADORA.

Área: Dentística. Linha de Pesquisa: Avaliação clínica e laboratorial de alterações da estrutura dental, de materiais e de técnicas de prevenção e tratamento em dentística.

Orientador: Prof.Tit. Sérgio Eduardo de Paiva Gonçalves

São José dos Campos

2018

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2019]. Disponível em <http://www.ict.unesp.br/biblioteca/normalizacao>

Apresentação gráfica e normalização de acordo com as normas estabelecidas pelo Serviço de Normalização de Documentos da Seção Técnica de Referência e Atendimento ao Usuário e Documentação (STRAUD).

Silva, Mateus Rodrigues

Avaliação da irradiação do ND:YAG laser sobre esmalte dental, associada ou não a um fotoabsorvedor, na redução da desmineralização por cárie artificial / Mateus Rodrigues Silva. - São José dos Campos : [s.n.], 2018.
65 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Odontologia Restauradora) - Pós-Graduação em Odontologia Restauradora - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2018.
Orientador: Sérgio Eduardo de Paiva Gonçalves.

1. Esmalte. 2. Desmineralização. 3. Cárie. 4. Laser. 5. Fotoabsorvedor. I. Gonçalves, Sérgio Eduardo de Paiva, orient. II. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. III. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. IV. Universidade Estadual Paulista (Unesp). V. Título.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Tit. Sérgio Eduardo de Paiva Gonçalves (Orientador)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Prof. Dr. Ricardo Scarparo Navarro

Universidade Anhanguera

Faculdade de Odontologia

Campus de São Paulo

Profa. Dra. Taciana Marco Ferraz Caneppele

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

São José dos Campos, 19 de dezembro de 2018.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, **Maria Gorette Rodrigues Lima** e **Renato Ferreira da Silva**, minhas referências de caráter, conduta e dedicação. Sua dedicação e amor incondicional por mim e meu irmão nos inspira a buscarmos nossos sonhos.

Ao meu irmão **Felipe Rodrigues Silva**, pelos momentos de companheirismo, alegria e descontração, mesmo nos momentos mais desafiadores.

À minha querida avó materna, **Magnólia Lauro de Lima**, que tanto de seu tempo, amor e carinho dedicou a mim desde minha mais tenra idade.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Unesp, na pessoa do diretor do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos, Prof. Dr. Estevão Tomomitsu Kimpara e da vice-diretora Profa. Dra. Rebeca Di Nicoló.

Ao Programa de Pós-graduação em Odontologia Restauradora, na pessoa do coordenador Prof. Tit. Sérgio Eduardo de Paiva Gonçalves. O qual, mais que meu orientador, se mostrou, em muitos momentos, um amigo. Obrigado pela dedicação, paciência e muito conhecimento, transmitidos.

À Profa. Dra. Taciana Marco Ferraz Caneppele, por todo o apoio, dedicação e paciência ao longo do curso de mestrado e, especialmente na execução deste trabalho.

À Profa. Dra. Tânia Mara da Silva, pela inestimável ajuda em momentos cruciais na pós-graduação.

Ao Prof. Tit. Álvaro José Damião, por me orientar em áreas do conhecimento pouco comuns à minha profissão.

Ao Prof. Dr. Ricardo Scarparo Navarro, por gentilmente ter aceito participar da minha banca examinadora.

A todos os colegas que, ao meu, lado vivenciaram essa jornada no programa de pós-graduação do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da Bolsa de Mestrado no período de 05/06/2017 a 05/12/2018.

À equipe da Biblioteca pela ajuda na elaboração deste trabalho, contribuindo com o acesso ao material bibliográfico e na orientação das normas.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	8
RESUMO	9
ABSTRACT.....	10
1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 Processo de desmineralização e formação da lesão de cárie em esmalte ..	13
2.2 Prevenção da desmineralização e emprego dos lasers	14
2.3 Textura superficial	21
3 PROPOSIÇÃO	24
4 MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1 Delineamento experimental	25
4.2 Preparo das amostras	26
4.3 Determinação dos grupos amostrais.....	27
4.4 Análise química do esmalte por espectroscopia – FTIR.....	30
4.5 Análise da Microdureza Knoop (KHN).....	31
4.6 Determinação da topografia de superfície por Interferometria de Luz Branca	32
4.8 Planejamento estatístico.....	36
5 RESULTADOS.....	38
5.1 Análise química dos substratos em espectroscopia – FTIR.....	38
5.2 Análise de microdureza superficial (KHN).....	44
5.2.1 Estatística descritiva da análise de microdureza superficial (KHN).....	44
5.2.2 Estatística inferencial da análise de microdureza superficial (KHN).....	45
5.3 Análise da rugosidade superficial por meio de interferometria de luz branca 48	
5.3.1 Estatística descritiva da análise de rugosidade superficial (nm).....	48
5.3.2 Estatística inferencial da análise de rugosidade superficial (nm).....	49
6 DISCUSSÃO	53
6.1 Da Metodologia.....	53
6.2 Dos Resultados.....	55

7 CONCLUSÃO.....	60
REFERÊNCIAS.....	61
ANEXO.....	65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFP	Aplicação tópica de flúorfosfato acidulado
<i>Er:YAG</i>	Laser de érbio
FTIR	Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier
LMB	Lesão de mancha branca
<i>Nd:YAG</i>	Laser de neodímio

Silva MR. Avaliação da irradiação do *Nd:YAG laser* sobre esmalte dental, associada ou não a um fotoabsorvedor, na redução da desmineralização por cárie artificial [dissertação]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2018.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia de diferentes parâmetros de energia do *Nd:YAG laser*, associados ou não a um fotoabsorvedor na redução da desmineralização por cárie artificial, sobre a superfície de esmalte dental. De coroas de incisivos bovinos foram obtidos 80 espécimes circulares com 6 mm de diâmetro e 2 mm de altura (1 mm de esmalte e 1 mm de dentina), o esmalte foi polido com lixas de carbetto de silício. Em cada espécime foi delimitada uma metade na qual o esmalte ficou exposto. As amostras foram avaliadas em Microdurômetro e FTIR para verificação inicial, e distribuídas de forma aleatória em oito grupos (n=10), que receberam os seguintes tratamentos de superfície sobre o esmalte: G1 (controle negativo): não recebeu tratamento de superfície; G2 (controle positivo): aplicação tópica de fluorfosfato acidulado 1,23% gel por 4 min; G3 (*Nd:YAG* 60 mJ / pulso, 10Hz, 48 J/cm², não contato); G4 (fotoabsorvedor + *Nd:YAG* 60 mJ); G5 (*Nd:YAG* 80 mJ / pulso, 10Hz, 64 J/cm², não contato); G6 (fotoabsorvedor + *Nd:YAG* 80 mJ); G7 (*Nd:YAG* 100 mJ / pulso, 10Hz, 80 J/cm², não contato); G8 (fotoabsorvedor + *Nd:YAG* 100 mJ). Após os tratamentos as amostras foram submetidas ao ciclo de des-remineralização para indução artificial de cárie, sendo então avaliadas em Interferômetro de luz branca, Microdurômetro e FTIR. Os resultados de microdureza foram submetidos à Análise de variância (ANOVA) sob 2 fatores (laser e fotoabsorvedor); ao teste de Tukey e ao teste de Dunnett, com nível de significância de 5% ($\alpha=0,05$). Diferenças estatisticamente significantes foram obtidas no fator fotoabsorvedor individualmente e na interação entre os fatores laser e fotoabsorvedor. Houve menor porcentagem de perda de microdureza nos grupos com fotoabsorvedor comparados aos grupos sem fotoabsorvedor e no grupo G8 comparado aos demais grupos experimentais, o qual apresentou ainda média de microdureza semelhante ao grupo G2. Os dados do FTIR foram submetidos ao Teste T, com nível de significância de 5% ($\alpha=0,05$). Comparadas com G2 foram encontradas maiores concentrações de carbonato em G4, G6 e G8; de fosfato em G8; menor concentração de Amida I em G8 e maior relação Carbonato/Fosfato em G4 e G6. Os resultados de interferometria foram submetidos à ANOVA a três fatores de medidas repetidas, com nível de significância de 5% ($\alpha=0,05$). Houve diferenças estatisticamente significantes no fator fotoabsorvedor individualmente e no fator tempo. Concluiu-se que o emprego de fotoabsorvedor diminuiu a desmineralização, os parâmetros de *Nd:YAG laser* sem fotoabsorvedor foram menos efetivos que o flúor na prevenção da desmineralização, o parâmetro de 100 mJ do *Nd:YAG laser* com fotoabsorvedor foi tão efetivo quanto o flúor na redução da desmineralização e a aplicação do *Nd:YAG laser*, associado ou não ao fotoabsorvedor, não foi mais eficaz que o flúor na redução da desmineralização por cárie artificial.

Palavras-chave: Esmalte. Desmineralização. Cárie. Laser. Fotoabsorvedor.

Silva MR. *Evaluation of the application of different parameters of the Nd:YAG laser, associated or not to the application of a photoabsorber, on the enamel surface, in the reduction of caries demineralization [dissertation]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2018*

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effectiveness of different energy parameters of the Nd:YAG laser, associated or not to a photoabsorber in the reduction of demineralization by artificial caries, on the surface of dental enamel. From the crowns of bovine incisors, 80 circular specimens with 6 mm diameter and 2 mm height (1 mm of enamel and 1 mm of dentin) were obtained, the enamel was polished with silicon carbide sandpapers. In each specimen surface was delimited a half in which the enamel was exposed. The samples were evaluated in Microdurometer and FTIR for initial verification, and randomly distributed in eight groups ($n = 10$), which received the following surface treatments on the enamel: G1 (negative control): no surface treatment; G2 (positive control): topical application of acidulated fluorophosphate 1.23% gel for 4 min; G3 (Nd:YAG 60 mJ / pulse, 10 Hz, 48 J / cm², non-contact); G4 (photoabsorber + Nd:YAG 60 mJ); G5 (Nd:YAG 80 mJ / pulse, 10 Hz, 64 J / cm², non-contact); G6 (photoabsorber + Nd:YAG 80 mJ); G7 (Nd:YAG 100 mJ / pulse, 10 Hz, 80 J / cm², non-contact); G8 (photoabsorber + Nd:YAG 100 mJ). After the treatments, the samples were submitted to the remineralization cycle for artificial induction of caries, and were then evaluated in White Light Interferometer, Microdurometer and FTIR. The microhardness results were submitted to Analysis of Variance (ANOVA) under 2 factors (laser and photoabsorber); to the Tukey test and the Dunnett test, with a significance level of 5% ($\alpha = 0.05$). Statistically significant differences were obtained in the photoabsorber factor individually and in the interaction between the laser and photoabsorber factors. There was a lower percentage of microhardness loss in the photoabsorber groups compared to the non-photoabsorber groups and in the G8 group compared to the other experimental groups, which also presented a microhardness average similar to the G2 group. The FTIR data were submitted to the T test, with a significance level of 5% ($\alpha = 0.05$). Compared with G2, higher concentrations of carbonate were found in G4, G6 and G8; phosphate in G8; lower Amide I concentration at G8 and higher Carbonate / Phosphate ratio at G4 and G6. The interferometry results were submitted to ANOVA under three factors of repeated measures, with a significance level of 5% ($\alpha = 0.05$). There were statistically significant differences in the photoabsorber factor individually and in the time factor. It was concluded that the use of photoabsorber decreased the demineralization, the non-photoabsorber Nd:YAG laser parameters were less effective than fluoride in the prevention of demineralization, the parameter of 100 mJ of the Nd:YAG laser with photoabsorber was as effective as fluoride in the reduction of demineralization and the application of Nd:YAG laser, associated or not to the photoabsorber, was no more effective than fluoride in the reduction of artificial caries demineralization. 5% ($\alpha = 0.05$).

Keywords: Enamel. Demineralization. Caries. Laser. Photoabsorber.

1 INTRODUÇÃO

O aspecto branco das lesões cariosas iniciais é devido a um fenômeno óptico causado pela perda mineral, onde a desmineralização superficial ou subsuperficial cria poros entre os prismas, alterando o índice de refração e de reflexão do esmalte, provocando a perda do seu brilho (Øgaard, 1989).

O desenvolvimento inicial da cárie na forma de lesões de mancha branca (LMB) nas superfícies vestibulares dos dentes é um efeito colateral grave do tratamento ortodôntico com acessórios fixos (Behnan et al., 2010; Hadler-Olsen et al., 2012; Seino et al., 2015).

A ocorrência da LMB pode ser atribuída principalmente ao acúmulo do biofilme por longos períodos, em função da dificuldade de higienização bucal ao redor dos acessórios ortodônticos (Hadler-Olsen et al., 2012). Apesar dos esforços intensivos para educar os pacientes sobre procedimentos eficazes de higiene bucal, a desmineralização do esmalte associada a aparelhos ortodônticos fixos continua sendo um problema clínico significativo (Chapman et al., 2010). As principais medidas preventivas contra essas lesões são: boa higiene bucal e o uso de cremes dentais fluoretados (Stangler et al., 2013). Outras medidas preventivas incluem o uso de enxaguatórios bucais, vernizes e adesivos (Stangler et al., 2013). Uma maneira de evitar a LMB é aplicar selantes de fósulas e fissuras na superfície do esmalte ao redor dos bráquetes ortodônticos (Stangler et al., 2013). Abordagens preventivas convencionais incluem aplicação de fluoreto, que tem um efeito positivo bem estabelecido na prevenção da doença cárie, por proporcionar a formação de fluorapatita, menos solúvel que a hidroxiapatita convencional, na superfície de esmalte exposta ao biofilme (Lussi et al., 2012).

Tais abordagens, no entanto, não parecem ser capazes de prevenir efetivamente o aparecimento da doença cárie em pacientes submetidos à terapia ortodôntica, uma vez que o tratamento é paciente dependente e a superfície de esmalte pode perder a fluorapatita, formada pela aplicação tópica de flúor, ao longo de um período de dias a semanas, como resultado de escovação e mastigação diárias (Raucci Neto et al., 2015). Além disso, a prevalência de lesões de mancha branca continua a variar entre 50% e 97% em pacientes tratados com ortodontia fixa

(Behnan et al., 2010; Hadler-Olsen et al., 2012).

Assim, novas abordagens terapêuticas voltadas à prevenção e controle de lesões de mancha branca durante o tratamento ortodôntico têm sido propostas (Behnan et al., 2010). Dentre essas abordagens está a irradiação do esmalte com lasers, como o *Nd:YAG laser* (Azevedo et al. 2012; Corrêa-Afonso et al. 2015; João-Souza et al. 2015; Paulos et al. 2017; Pereira et al. 2017; Raucci Neto et al. 2015; Tavares et al. 2012; Valério et al. 2015), de argônio (Tavares et al., 2012), de érbio (Shahabi et al., 2016) e de CO₂ (Paulos et al., 2017; Seino et al., 2015; Stangler et al., 2013). O uso de lasers oferece uma nova possibilidade de melhorar o tratamento de cáries e técnicas de prevenção (Tavares et al., 2012), pois têm a capacidade de alterar a morfologia da superfície do esmalte, gerando uma aparente fusão (Seino et al., 2015), bem como de alterar sua composição química, gerando concentrações significativamente maiores de fosfato (Raucci Neto et al. 2015), e reduzindo a quantidade de matriz orgânica (Shahabi et al., 2016). Além disso, a utilização de fotoabsorvedores com cor escura favorece a absorção do comprimento de onda do *Nd:YAG laser*, causando um aumento adicional na temperatura limitado à superfície, protegendo a polpa de temperaturas mais elevadas por transmissão dessa energia (Cunha et al., 2017).

O conhecimento do comportamento da desmineralização do esmalte dentário, frente a novas interações de parâmetros do *Nd:YAG laser* com fotoabsorvedores que não promovam pigmentações, é de extrema importância para a prática clínica atual. Por isso, este estudo espera contribuir para a compreensão dos fatores que possam prevenir a desmineralização do esmalte dentário e conseqüentemente as lesões de mancha branca.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A revisão de literatura apresentada a seguir, sem a pretensão de esgotar o assunto, teve por finalidade apresentar os artigos científicos de maior relevância, utilizados como referência para a escrita desse trabalho. Essa, por sua vez, foi dividida em assuntos com a finalidade de torná-la mais didática.

2.1 Processo de desmineralização e formação da lesão de cárie em esmalte

Segundo Featherstone (1999), o material predominante no esmalte dentário é a hidroxiapatita, um sal de fosfato de cálcio, representada pela fórmula $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, apresentando um arranjo cristalino em configuração hexagonal, com átomos de cálcio e fósforo na parte externa, e grupamentos hidroxila no centro, circundados por três átomos de cálcio. Na constituição do esmalte, os cristais estão arranjados em prismas medindo entre 4 e 5 μm de diâmetro. Os prismas são permeados por uma matriz orgânica composta por água, lipídeos e proteína, tornando porosa a superfície do esmalte, e possibilitando a passagem de íons como magnésio, sódio, flúor e potássio. A solubilidade da hidroxiapatita está relacionada a fatores como o pH, a temperatura e as ligações iônicas do solvente no qual o cristal está inserido. Como a saliva é supersaturada de cálcio e fosfato, o estado cristalino do esmalte é favorecido. Entretanto, na cavidade bucal, o esmalte se encontra em um estado de equilíbrio dinâmico, em constante desmineralização e mineralização, com cálcio e fosfato supersaturados e pH 6,8. Quando o pH 5,5 (pH crítico) é atingido, a solubilidade aumenta e ocorre dissolução do cristal.

De acordo com Cury (2001), o esmalte é a estrutura dental que primeiro se expõe na cavidade bucal, ficando sujeita às variações do meio ambiente. Cálcio e fosfato estão, em relação ao esmalte, supersaturados na saliva, a qual possui um efeito protetor para o esmalte até o pH 5,5. Mudanças na dieta podem ocasionar a conversão de carboidratos em ácidos pela ação de bactérias presentes no biofilme, levando a variações no pH. Se os períodos de redução do pH são intercalados por

períodos mais longos de retorno ao pH fisiológico (6,8), o equilíbrio entre os íons da saliva e do esmalte dentário é restabelecido. Caso períodos de pH crítico se tornem mais frequentes, a perda de íons pelo dente pode predominar, levando ao desenvolvimento de uma lesão de cárie.

Behnan et al. (2010) afirmam que lesões incipientes de cárie (manchas brancas) são caracterizadas por sua opacidade e perda mineral em relação ao esmalte saudável.

De acordo com Thylstrup e Fejerskov (1995), o aspecto clínico observado na cárie em esmalte, como uma LMB, se deve ao aumento da rugosidade superficial, e à mudança no índice de refração da região onde ocorreu perda mineral, na qual os poros de diferentes zonas da lesão são preenchidos por ar (índice de refração = 1,0), quando da secagem do dente, em comparação com o índice de refração do esmalte hígido adjacente (índice de refração = 1,62).

2.2 Prevenção da desmineralização e emprego dos lasers

Campos et al. (2011) compararam, *in vitro*, o efeito de um selante de fósulas e fissuras na prevenção da desmineralização do esmalte ao redor dos bráquetes ortodônticos após exposição dos dentes à solução desmineralizadora. O estudo empregou noventa dentes incisivos bovinos, divididos aleatoriamente em três grupos. GI: as superfícies vestibulares dos dentes foram condicionadas e cobertas com adesivo ortodôntico ao redor do bráquete. GII: as superfícies vestibulares também foram condicionadas, e o adesivo ortodôntico foi aplicado apenas no local onde o bráquete foi colado. Foi aplicado o selante de fósulas e fissuras ao redor do bráquete cobrindo toda a face vestibular exposta. GIII: houve aplicação do ácido e colagem do bráquete sem proteção ao seu redor. Após a colagem, os dentes foram imersos em solução desmineralizadora durante 14 dias. Os autores concluíram que o tratamento da superfície dentária vestibular com selante resultou em significativa redução da desmineralização do esmalte.

Hadler-Olsen et al. (2012), investigando a incidência de lesões de mancha branca e cárie durante o tratamento ortodôntico, compararam oitenta pacientes, dos

quais 40 foram submetidos a tratamento com aparelho ortodôntico fixo em ambos os maxilares, e outros 40 compuseram um grupo não ortodôntico de controle pareado. Os resultados encontrados pelos autores mostraram que pessoas tratadas ortodonticamente têm risco significativamente maior de desenvolver LMB durante o tratamento ortodôntico do que pessoas não tratadas.

Lussi et al. (2012), em artigo discutindo a importância do flúor na prevenção da cárie, observaram que vários autores demonstraram que a redução da cárie nos países industrializados é baseada na aplicação de flúor. No entanto, a aplicação local de flúor e principalmente o uso de creme dental fluoretado, são os métodos de proteção de maior relevância. A apatita de flúor tem um baixo potencial de proteção, enquanto fluoretos fracamente ligados no ambiente do esmalte não são apenas ativos na promoção da remineralização, mas também na inibição da desmineralização. Os autores concluíram que a aplicação regular de fluoretos tem um efeito cariostático.

De acordo com Tavares et al. (2012), o uso de lasers oferece uma nova possibilidade de melhorar as técnicas de tratamento e prevenção de cáries. Especificamente, o *Nd:YAG laser* parece modificar a estrutura cristalina do esmalte, tornando-o mais ácido resistente e, portanto, dificultando o desenvolvimento de lesões de desmineralização. As alterações na superfície do esmalte são diferentes para cada tipo de laser, enquanto o *Nd:YAG laser* causa fusão e ressolidificação dos prismas, o laser de argônio produz uma superfície granular com inúmeras microporosidades, que parecem funcionar como depósitos minerais, protegendo contra desafios ácidos. Investigando o efeito das irradiações de *Nd:YAG laser* e laser de argônio na desmineralização do esmalte dentário humano, em um experimento cujo foco foi observar se a luz do laser por si só seria capaz de impedir o desenvolvimento das lesões cariosas, os autores afirmam que é possível que as alterações no esmalte superficial causadas pelo *Nd:YAG laser* podem não protegê-lo contra o desafio ácido a longo prazo, e que a aplicação do laser de argônio no esmalte seria mais efetiva. Além disso, supõe-se que talvez a diferença entre os resultados do *Nd:YAG laser* e do laser de argônio tenha mostrado a inferioridade do *Nd:YAG laser* pelo aumento da temperatura durante a ressolidificação da superfície do esmalte, o que poderia produzir uma alteração química, induzindo a formação de compostos menos ácido resistentes e, portanto, mais solúveis aos desafios ácidos

que foram usados *in vitro*. A conclusão dos autores é de que, em comparação com o *Nd:YAG laser*, o laser de argônio foi mais efetivo na prevenção de lesões de cárie, mostrando menores áreas de desmineralização no esmalte.

Ainda em 2012, Azevedo et al., estudaram o efeito do *Nd:YAG laser*, com fibra de 300 µm de diâmetro e tempo de irradiação de 15 s, combinado com fluoreto, na prevenção da desmineralização do esmalte em dentes humanos primários após a indução de lesões de cárie artificiais. Os autores concluíram que o *Nd:YAG laser*, com os parâmetros de 50 mJ de energia, 70,7 J / cm² de fluência, 10 Hz de taxa de repetição e 0,5 W de potência, combinado ou não com gel / verniz fluoretado, não foi mais eficaz que o flúor isoladamente para prevenir a desmineralização do esmalte no período experimental.

Stangler et al. (2013), avaliando a eficácia do laser de CO₂, associado ou não à aplicação de flúor na microdureza superficial do esmalte dentário adjacente a bráquetes ortodônticos, dividiram 30 espécimes em 3 grupos (n=10), onde: Grupo C - controle, Grupo L - irradiado com laser de CO₂ em uma potência de saída de 0,5 W por 20 s e Grupo FL - aplicação tópica de flúorofosfato acidulado gel 1,23% com cotonetes por 1 min, seguido da remoção do excesso de flúor com uma toalha de papel e irradiação com laser de CO₂ na potência de saída de 0,5 W por 20 s. Na mensuração final, com microdurômetro calibrado para uma carga de 25 g por 10 s, o grupo FL obteve maior valor de microdureza que os grupos C e L (p<0,05). Os grupos L e FL foram estatisticamente superiores ao grupo C (p<0,05). Desta forma, os autores concluíram que, a irradiação com laser de CO₂ em torno de bráquetes ortodônticos, combinados ou não com a aplicação tópica de flúor, foi eficaz para aumentar a microdureza superficial do esmalte.

Raucci Neto et al. (2015), em estudo objetivando avaliar quaisquer modificações químicas e morfológicas a longo prazo no esmalte primário irradiado por *Nd:YAG laser*, relatam que a reduzida permeabilidade do esmalte, provocada pela fusão e recristalização da sua superfície, é considerada um fator essencial que contribui para sua maior resistência ao ácido. O uso de um agente fotossensibilizador foi proposto como uma tentativa de concentrar altos níveis de energia na superfície e melhorar a absorção do *Nd:YAG laser* pelo esmalte dental, reduzindo os possíveis efeitos térmicos, minimizando a possibilidade de lesão pulpar. Além disso, o emprego de um laser na prevenção da cárie dentária também

está relacionado ao seu efeito sinérgico com tratamentos com flúor, uma vez que o esmalte irradiado pode reter íons de flúor por mais tempo que o esmalte não irradiado. De acordo com os autores, dentro das limitações do estudo, foi possível concluir que a irradiação com *Nd:YAG laser*, utilizando fibra óptica com diâmetro de 300 μm , nos parâmetros de 100 mJ de energia, 5 Hz de taxa de repetição e 0,5 W de potência no modo contato por 30 s, independentemente do tratamento com flúor, modificou a microdureza e a composição química, com concentrações mais altas de fosfato e carbonato, da superfície do esmalte nos grupos irradiados, em comparação com os grupos controle, inibindo com sucesso a desmineralização durante um período de 1 ano.

De acordo com Valério et al. (2015), os parâmetros utilizados durante a irradiação das estruturas dentárias, com *Nd:YAG laser*, devem estar de acordo com as características dos tecidos, uma vez que a variação na temperatura superficial do esmalte irradiado pode levar a uma maior condução de calor e, portanto, se espalhar para o tecido pulpar, causando danos irreversíveis. A temperatura dentro da câmara pulpar não deve exceder 5,5°C além da temperatura homeostática humana, pois esse aquecimento pode levar à perda de vitalidade (Zach, Cohen, 1965). Buscando avaliar a mudança de temperatura em espécimes de esmalte primário irradiados com diferentes tempos de pulso do *Nd:YAG laser* no modo contato, Valério et al. (2015) encontraram, dentro das condições experimentais do estudo, que a duração do pulso de *Nd:YAG laser* nos parâmetros de 80 mJ de energia, 10 Hz de taxa de repetição e 0.8 W de potência, aumentou a temperatura do esmalte primário, mas não foi influenciada por diferentes durações de pulso (pulso extra longo (10.000 μs), pulso longo (700 μs) e pulso curto (350 μs) utilizados na irradiação.

João-Souza et al. (2015) avaliando a progressão da erosão do esmalte após o tratamento com géis contendo fluoreto de sódio (NaF; 9047 ppm F) e cloreto estânico (SnCl_2 ; 3000 ppm Sn), associados ou não à irradiação com *Nd:YAG laser* (50 mJ, 10 Hz, 0,5 W; $\sim 41,66 \text{ J} / \text{cm}^2$; 40 s), em sessenta amostras de esmalte preparadas a partir de incisivos bovinos, encontraram resultados que demonstraram que o *Nd:YAG laser* foi capaz de melhorar o efeito protetor do gel F + Sn. No entanto, a proteção de ambos os géis testados associada à irradiação com laser não foi diferente do gel de NaF apenas. Além disso, a irradiação com *Nd:YAG laser* nos

parâmetros utilizados não foi capaz de proteger o esmalte contra a erosão dentária.

Ainda em 2015, Corrêa-Afonso et al., utilizaram espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) e microscopia eletrônica de varredura (MEV) para avaliar se a irradiação com *Nd:YAG laser*, associada a um fotoabsorvedor, causaria ou não alteração da constituição química do esmalte. Quatorze espécimes de esmalte foram divididos aleatoriamente em dois grupos: (1) *Nd:YAG* e (2) fotoabsorvedor + *Nd:YAG*. Primeiro, as superfícies de esmalte não tratadas foram analisadas por FTIR para adquirir o espectro de absorção do controle. Em seguida, o Grupo 2 recebeu uma camada de carvão inativado diluído em água deionizada antes do tratamento com laser. Amostras de esmalte pertencentes aos grupos 1 e 2 foram então irradiadas com *Nd:YAG laser* com energia de pulso de 80 mJ e taxa de repetição de 10 Hz, no modo contato; a banda de absorção de carbonato e a faixa de absorção de água foram medidas em cada amostra após a irradiação. Essa irradiação, segundo os autores, causa aquecimento na superfície, levando à liberação da água e do carbonato presentes no esmalte, seguido pela condensação de íons ácidos, que deve culminar em uma estrutura mais resistente à dissolução ácida. A banda de água foi medida novamente 24 h, 48 h e 7 dias após a irradiação. O grupo 1 apresentou conteúdo estatisticamente similar de água e carbonato antes e após a irradiação. O grupo 2 apresentou teor de água significativamente menor ($p < 0,05$) após a irradiação, que permaneceu constante ao longo do tempo às 24 e 48 h. Após 7 dias, o conteúdo de água aumentou ligeiramente, sendo estatisticamente maior que nos demais períodos experimentais, com exceção do controle. A relação carbonato / fosfato foi medida apenas no início, e após a irradiação, diminuiu apenas no Grupo 2, indicando perda de carbonato ($p < 0,05$). Os autores concluíram que a irradiação com o *Nd:YAG laser* associado a um fotoabsorvedor reduziu o teor de carbonato e água estrutural no esmalte.

Seino et al. (2015) compararam, *in vitro*, os efeitos dos lasers de CO₂ (0,5 W, 28,6 J / cm², 50 Hz, 5 μs e distância focal de 10 mm) e *Nd:YAG* (0,6 W, 84,9 J / cm², 10 Hz, 110 μs, modo de contato), associados ou não à aplicação tópica de flúor, na prevenção de lesões de cárie ao redor de bráquetes colados ao esmalte de 65 pré-molares humanos. Os resultados obtidos permitiram aos autores concluir que, a irradiação com laser de CO₂, isoladamente, foi capaz de controlar a perda mineral do esmalte submetido a um desafio de ciclagem de pH nos mesmos níveis obtidos

com a aplicação isolada de flúor. O *Nd:YAG laser* sozinho, no entanto, não foi capaz de controlar o processo de desmineralização.

Shahabi et al. (2016), com o objetivo de avaliar as possíveis alterações químicas ocorridas na estrutura do esmalte irradiado com os lasers *Nd:YAG* e *Er:YAG*, utilizando a análise espectroscópica de Raman, realizaram um estudo no qual foram empregados 15 molares humanos hígidos, recém-extraídos, distribuídos aleatoriamente em três grupos (n=5), da seguinte forma: nenhum tratamento foi realizado no grupo A (grupo controle); o grupo B foi irradiado com o *Er:YAG laser* com comprimento de onda de 2,940 nm, 0,5 W de potência, energia de pulso de 50 mJ, taxa de repetição de 10 Hz, e duração do pulso de 230 μ s. A irradiação foi realizada a 4 mm da superfície dentária e foi acompanhada por pulverização de água / ar por 10 s; e o grupo C foi irradiado com *Nd:YAG laser* com comprimento de onda de 1064 nm, potência de 0,5 W, duração do pulso de 100 μ s, fibra de 300 μ m. A irradiação foi realizada a 1 mm de distância da superfície do esmalte, em movimento de varredura, por 10 s, sob jato de ar e água. Os resultados obtidos pelos autores evidenciaram redução significativa de carbonato e matriz orgânica ocorrida após a aplicação de ambos os lasers (*Nd:YAG* ou *Er:YAG*), podendo indicar que este tratamento é uma estratégia adequada para a prevenção da cárie. Os resultados mostram que a técnica Raman pode ser apropriada para pesquisar mudanças na composição e estrutura do esmalte irradiado.

Comparando os efeitos do laser de CO₂ e do *Nd:YAG laser* na prevenção da desmineralização em camadas mais profundas do esmalte por meio de sucessivos ciclos de desafio com ácido, Paulos et al. (2017), em estudo envolvendo sessenta e cinco amostras de esmalte humano, divididas em cinco grupos (n=12), onde, (G1): aplicação tópica de flúorofosfato acidulado 1,23% gel, (AFP - controle); (G2): irradiação com *Nd:YAG laser* (0,6 W, 84,9 J / cm², 10 Hz, 110 μ s, modo contato); (G3): irradiação *Nd:YAG laser* associada à AFP; (G4): irradiação com laser de CO₂ (0,5 W, 28,6 J / cm², 50 Hz, 5 μ s e distância focal de 10 mm); e (G5) irradiação com laser de CO₂ associada à AFP. De acordo com os autores, os grupos irradiados com laser de CO₂, associados (G5) ou não (G4) com flúor, mostraram percentuais de perda mineral significativamente menores do que aqueles observados em todos os outros grupos. Os grupos submetidos à irradiação com o *Nd:YAG laser* (G2 e G3), apresentaram perdas minerais semelhantes às do grupo fluoreto (G1).

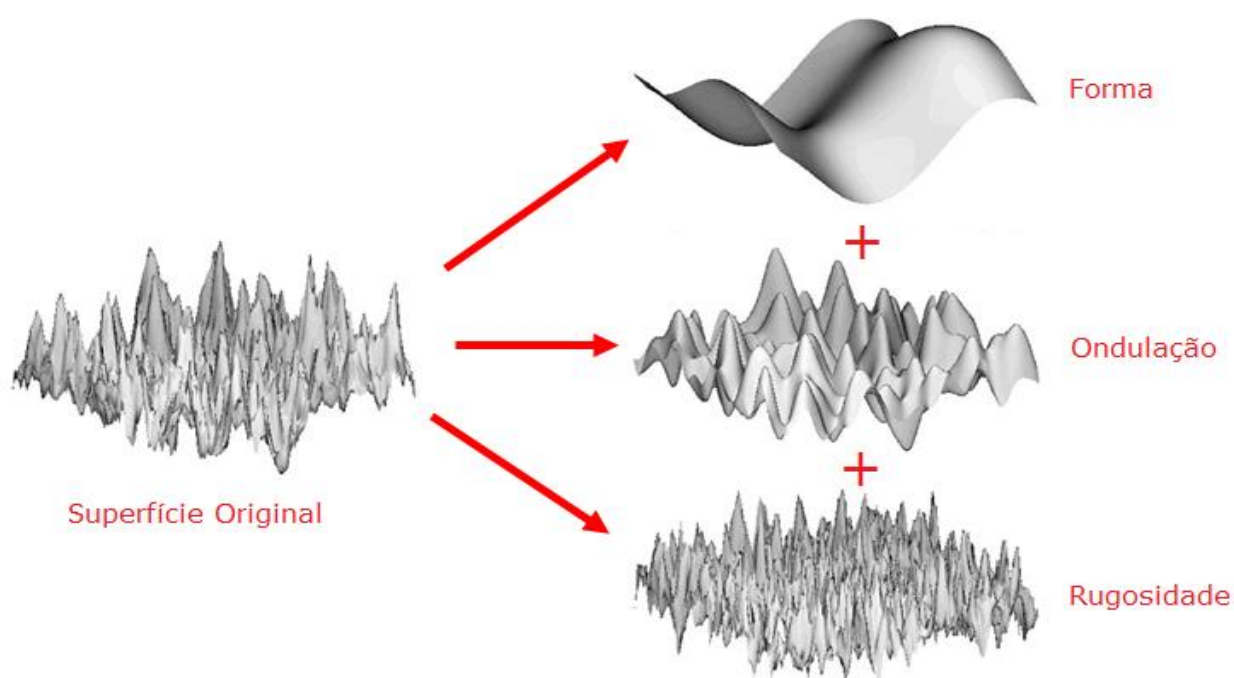
De acordo com Pereira et al. (2017), a irradiação da estrutura dental pelo *Nd:YAG laser* promove aumento da temperatura dos tecidos duros, causando seu derretimento e posterior ressolidificação, o que, presume-se, promova várias mudanças químicas e físicas, algumas das quais são responsáveis por diminuir a desmineralização do esmalte. Além disso, como os fótons de *Nd:YAG laser* são melhor absorvidos por alguns pigmentos, um fotoabsorvedor concentraria, na superfície dentária, o calor promovido pela absorção do laser. Assim, a hipótese do estudo conduzido pelos autores foi de que a adição de fotoabsorvedores a géis fluoretados durante a irradiação com *Nd:YAG laser* (50 mJ, 0,5 W, ~ 41,66 J / cm², 10 Hz, duração de pulso de 120 µs, 40 s ,em contato) concentraria a ação do laser na superfície do esmalte, aumentando a retenção de flúor, reduzindo assim a perda de esmalte diante de desafios erosivos. Os resultados obtidos, entretanto, levaram os autores a concluir que, a adição de fotoabsorvedores aos géis fluoretados não influenciou o efeito antierosivo da combinação de laser e flúor.

Feitosa et al. (2017) afirmam que o uso do *Nd:YAG laser* demonstrou-se eficaz como um método alternativo de vedação de fósulas e fissuras, pois seu uso no modo pulsado parece aumentar a resistência à descalcificação ácida do esmalte. Sua ação está relacionada a alterações químicas e físicas na estrutura do esmalte, com a vantagem de reduzir a porcentagem de dissolução de íons cálcio do esmalte quando aplicado isoladamente (44%), e em uma proporção ainda maior quando aplicado em combinação com flúor (53%). Buscando avaliar a eficácia de diferentes tratamentos para o selamento de fósulas e fissuras, os autores compararam 30 espécimes de esmalte humano, divididos em seis grupos (n=5) da seguinte forma: C, controle (sem tratamento); L, irradiação com *Nd:YAG laser* (80 mJ, 10 Hz, 1064 nm, 60 s); F, FluroShield (Dentsply); F + L, FluroShield + *Nd:YAG laser*; HA + A, pó de hidroxiapatita ligado ao sistema adesivo (Universal Single Bond, 3M ESPE); e HA + A + L, mistura de hidroxiapatita associada à irradiação com laser. E, concluíram que, dentre os tratamentos realizados, a irradiação do esmalte com *Nd:YAG laser* sobre o adesivo não polimerizado, foi o mais efetivo para o selamento de fósulas e fissuras.

2.3 Textura superficial

Por mais plana e polida que pareça, a superfície de um material é composta por diversos picos e vales, que constituem o que é conhecido como rugosidade. Uma superfície é composta por três componentes: forma, ondulação e rugosidade. Forma é a componente mais fácil de observar, uma superfície pode ter diferentes formas (esférica, cilíndrica, plana etc). Se chegarmos mais próximos dessa superfície, veremos que ela também possui diversas ondulações, as quais são constituídas de estruturas ainda menores, pequenos picos e vales, representando a rugosidade (Figura 1) (Josso et al., 2002).

Figura 1- Esquema representativo das estruturas que compõem uma superfície

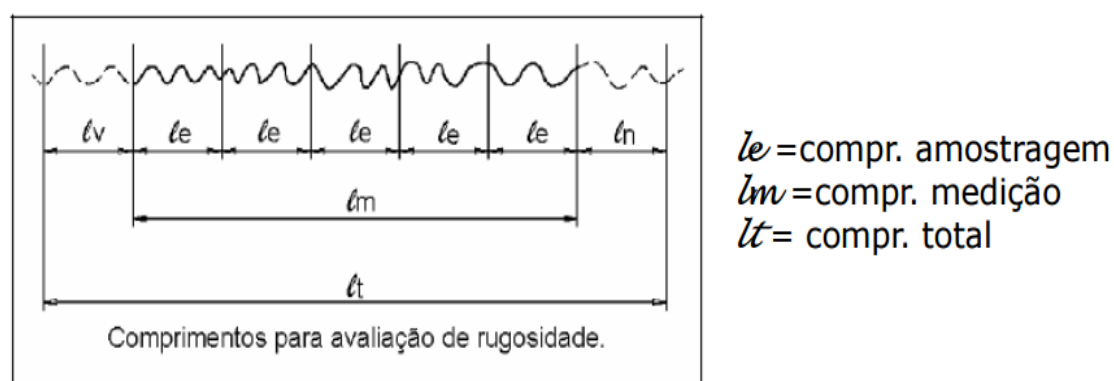


Fonte: Josso et al. (2002).

A rugosidade pode ser medida de forma mecânica ou óptica, dividindo-se a região medida (l_m) em cinco ou mais subregiões (l_e) e calculando uma linha média para o perfil, para a qual a área dos picos acima e abaixo da linha é igual, como

exemplificado na figura 2. Esses comprimentos de medição são definidos por normas e dependem do valor da rugosidade encontrada. Quando menor a rugosidade, menor é o comprimento de apalpação exigido pela norma (Josso et al., 2002).

Figura 2 - Esquema representativo da divisão em subregiões para avaliação da rugosidade

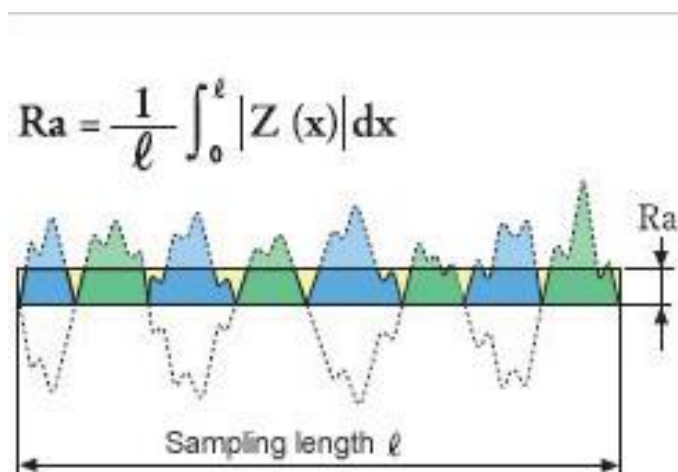


Fonte: Josso et al. (2002).

A partir dessas medidas, é possível calcular diversos parâmetros para representar a rugosidade da superfície, sendo os principais:

- Rugosidade média (R_a): este é o parâmetro mais comumente utilizado na análise da textura superficial. Matematicamente, a rugosidade média é a média aritmética absoluta (em módulo) dos picos ao longo do comprimento da área de superfície a partir de uma linha média. A superfície que se encontra abaixo dessa linha de referência é projetada para cima da mesma e a média é calculada com base nesses valores (Josso et al., 2002) (Figura 3).

Figura 3 - Esquema representativo da obtenção dos valores de rugosidade média (Ra), calculados a partir dos valores dos picos (verdes e azuis)



Fonte: Josso et al. (2002).

No caso da medição de uma área, como ocorre na interferometria de luz branca, a medição é bem mais completa. Através do parâmetro Sa, ao invés de medir uma única linha, ou medir várias linhas paralelas, por razões estatísticas, a medição da rugosidade é feita sobre toda a área estudada. Isto traz resultados muito mais completos, pois pode ser entendido como um conjunto de medições de muitas (as vezes mais de mil) linhas paralelas.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo foi: avaliar, *in vitro*, por meio de: microdureza, interferometria de luz branca, e espectroscopia (FTIR), o efeito da aplicação de diferentes parâmetros do *Nd:YAG laser*, associados ou não a um fotoabsorvedor, sobre a superfície de esmalte, na redução da desmineralização por cárie artificial,.

As hipóteses de nulidade testadas foram:

- H₀1) A aplicação tópica de flúor, sobre a superfície de esmalte, não influencia na redução da desmineralização por cárie;
- H₀2) A aplicação de diferentes parâmetros do *Nd:YAG laser* ou de *fotoabsorvedor*, sobre a superfície de esmalte, não é mais eficaz que a aplicação tópica de flúor na redução da desmineralização por cárie;
- H₀3) A aplicação de diferentes parâmetros do *Nd:YAG laser*, sobre a superfície de esmalte, não influencia na redução da desmineralização por cárie;
- H₀4) A aplicação de diferentes parâmetros do *Nd:YAG laser*, associados a um fotoabsorvedor, sobre a superfície de esmalte, não influencia na redução da desmineralização por cárie.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Delineamento experimental

Unidades experimentais:

- Esmalte bovino (n=80)

Grupos controle:

- Negativo (nenhum tratamento de superfície)
- Positivo (aplicação tópica de flúor)

Variável parâmetro do laser (3 níveis):

- *Nd:YAG* 60 mJ (experimental);
- *Nd:YAG* 80 mJ (experimental);
- *Nd:YAG* 100 mJ (experimental).

Variável fotoabsorvedor (2 níveis):

- Com fotoabsorvedor;
- Sem fotoabsorvedor.

Variáveis resposta:

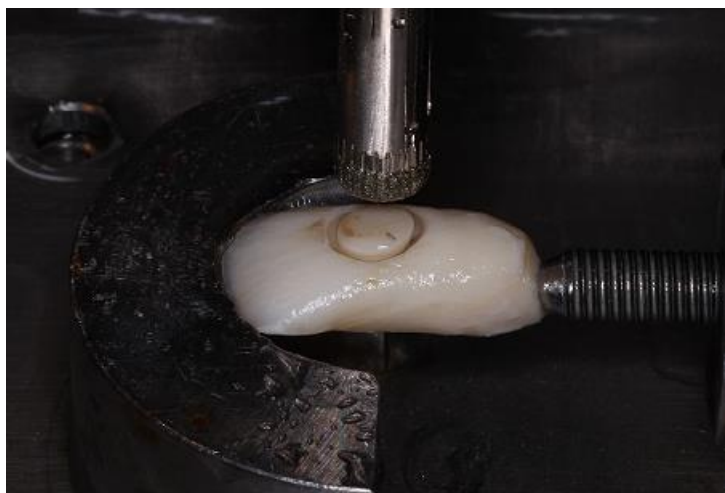
- Variação da microdureza (KHN);
- FTIR: alteração nos picos de fosfato, carbonato e amidas I e II;
- Interferometria: valor médio da rugosidade superficial (S_a) - a média aritmética da amplitude dos picos e vales de toda uma área, (nm).

4.2 Preparo das amostras

O estudo foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo Animais do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos (Parecer nº 03/2018) (em anexo). Foram adquiridos 80 incisivos bovinos hígidos recém extraídos, que foram imersos em solução aquosa de timol a 0,1%, a 4°C com a finalidade de prevenir a desidratação e contaminação da amostra, trocada diariamente até o momento da experimentação (Campos et al., 2011).

As raízes dos 80 incisivos bovinos foram seccionadas a 2 mm da junção amelo-cementária, com auxílio de um disco diamantado (Dremel – Campinas, SP, Brasil) adaptado em torno de alta rotação (Nevoni – Duque de Caxias, RJ, Brasil). A partir dos centros das faces vestibulares das coroas, foram obtidos 80 espécimes circulares com 6 mm de diâmetro e, após o polimento, 2 mm de altura (1 mm de esmalte vestibular e 1 mm de dentina), com auxílio de uma broca trefina adaptada ao equipamento específico para obtenção de amostras circulares (Micro Mill – Washington, EUA) (Figura 4).

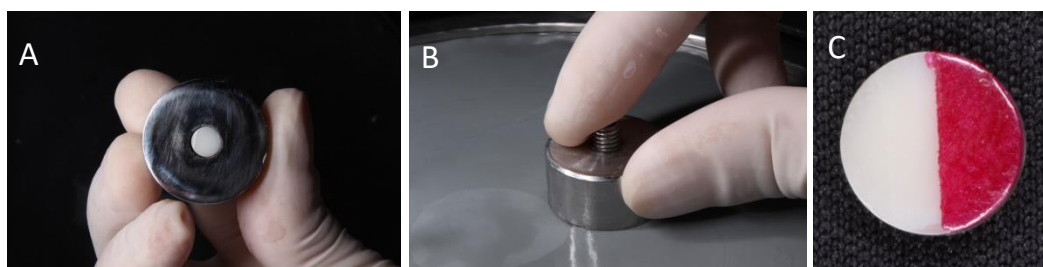
Figura 4- Fotografia representativa da obtenção de uma amostra circular de esmalte, a partir do centro da face vestibular da coroa



Fonte: Elaborado pelo autor.

O polimento do esmalte foi feito com lixas de carbeto de silício de granulação #1.200, #2.400 e #4.000 (Erios Equipamentos Técnicos e Científicos – São Paulo, SP, Brasil) em uma politriz circular DP-10 (Panambra – São Paulo, SP, Brasil) a 300 rpm, sob refrigeração com água, por 30 s, 60 s e 2 min, respectivamente, para a obtenção de uma superfície plana, lisa e polida, necessária à avaliação no microdurômetro. Após o polimento, as amostras foram mantidas em água destilada a 4°C. Em cada disco obtido, para os grupos experimentais, foi delimitada, com esmalte de unhas (Colorama, São Paulo, SP, Brasil), uma metade na qual o esmalte dentário ficou exposto (Figura 5).

Figura 5- Fotografias representativas do polimento do esmalte, e do vedamento da superfície de esmalte



Legenda: A) Posicionamento da amostra na matriz metálica para polimento; B) Polimento da amostra; C) Superfície de esmalte dental vedada com esmalte de unhas, deixando a metade de esmalte dental exposta para receber os tratamentos.

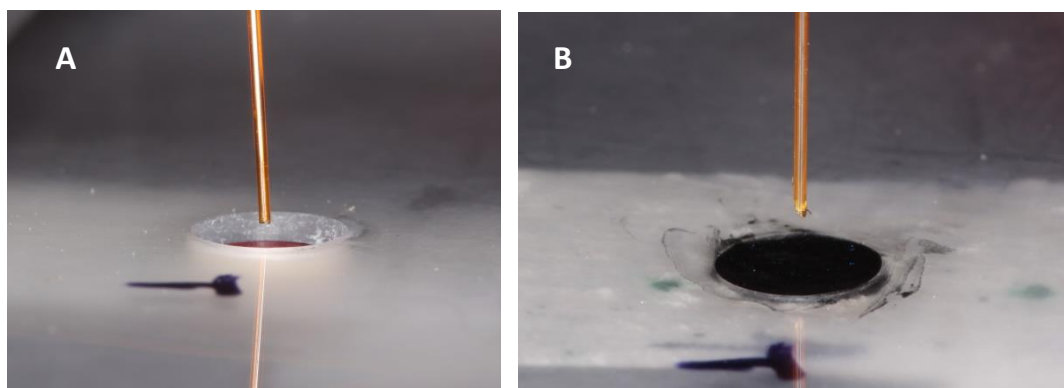
Fonte: Elaborado pelo autor.

4.3 Determinação dos grupos amostrais

As amostras foram então distribuídas de forma aleatória em oito grupos (n=10), de acordo com diferentes tratamentos de superfície para prevenção de cárie a serem aplicados ao esmalte exposto, como exemplificado no fluxograma (Figura 6)

onda de 1.064 nm e fibra óptica de 320 μm de diâmetro. Foi empregada a frequência de 10 Hz. A irradiação laser foi realizada na forma não-contato e com a varredura da superfície por 60 s. Durante a irradiação, a ponta da fibra do laser foi posicionada a 90° , perpendicular à superfície da amostra, a uma distância de aproximadamente 1 mm da superfície, empregando uma placa de acetato de 1 mm de espessura (Bio Art – São Carlos, SP, Brasil), para padronizar a quantidade de fotoabsorvedor sobre a amostra (Zezell et al., 2015) (Figura 7). A irradiação foi sempre realizada por um mesmo operador calibrado.

Figura 7- Fotografia representativa da irradiação da superfície da amostra com laser



Legenda: A) sem fotoabsorvedor; B) na presença de fotoabsorvedor.
Fonte: Elaborado pelo autor.

- G3 (*Nd:YAG* 60 mJ): o esmalte exposto recebeu 60 mJ / pulso do laser *Nd:YAG*, equivalendo a uma densidade de energia de 48 J / cm^2 ;
- G4 (fotossensibilizador + *Nd:YAG* 60 mJ): o esmalte exposto foi recoberto por uma camada de 1 mm de espessura do creme dental Black is White (CURADEN International AG, Kriens, Suíça), e recebeu 60 mJ / pulso do *Nd:YAG laser*, equivalendo a uma densidade de energia de 48 J / cm^2 ;
- G5 (*Nd:YAG* 80 mJ): o esmalte exposto recebeu 80 mJ / pulso do *Nd:YAG laser*, equivalendo a uma densidade de energia de 64 J / cm^2 ;
- G6 (fotossensibilizador + *Nd:YAG* 80 mJ): o esmalte exposto foi recoberto por uma camada de 1 mm de espessura do creme dental Black is White

(CURADEN International AG, Kriens, Suíça), e recebeu 80 mJ / pulso do *Nd:YAG laser*, equivalendo a uma densidade de energia de 64 J / cm²;

- G7 (*Nd:YAG* 100 mJ): o esmalte exposto recebeu 100 mJ / pulso do *Nd:YAG laser*, equivalendo a uma densidade de energia de 80 J / cm²;
- G8 (fotossensibilizador + *Nd:YAG* 100 mJ): o esmalte exposto foi recoberto por uma camada de 1 mm de espessura do creme dental Black is White (CURADEN International AG, Kriens, Suíça), e recebeu 100 mJ / pulso do *Nd:YAG laser*, equivalendo a uma densidade de energia de 80 J / cm².

Após os tratamentos de superfície os espécimes foram submetidos ao processo de indução de lesões artificiais de cárie, no qual foi utilizado o modelo de ciclo dinâmico de desmineralização e remineralização proposto por (Queiroz et al., 2008).que consiste em imergir individualmente os espécimes em uma solução de desmineralização contendo 3 mM de CaCl₂ 2H₂O, 3 mM de KH₂PO₄ e 50 mM de CH₃COOH (pH 5,0) (Buskes et al., 1985), durante 6 h, então lavagem em água deionizada, secagem com jatos de ar e imersão em uma solução de remineralização (pH 7,0) (Göhring et al., 2004), durante 18 h a 37°C. Todo o procedimento foi repetido diariamente por 8 dias consecutivos e as soluções foram trocadas após 4 dias para manter os pH constantes (Queiroz et al., 2008).

4.4 Análise química do esmalte por espectroscopia – FTIR

A espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) é uma técnica de amostragem rápida que praticamente não requer preparação de amostras, permitindo em alguns casos, a coleta de sinais com uma fibra em técnicas complementares como a reflexão total atenuada (ATR). O FTIR pode ser usado para caracterizar tecidos biológicos e fornecer informações sobre conteúdo orgânico e inorgânico que podem ser relacionados à resistência mecânica ou química da amostra, direcionando a escolha correta das condições de irradiação para alguma terapia específica (Zezell et al., 2015).

Após a padronização da superfície de esmalte, previamente aos tratamentos

de superfície, e ao ciclo de des - remineralização, as amostras de cada grupo foram submetidas à análise das possíveis mudanças na composição química. As mesmas amostras foram novamente submetidas à novas análises após os tratamentos de superfície e processo de des - remineralização, respectivamente.

A análise química foi realizada por meio de espectroscopia de infravermelho por Transformada de Fourier (FT-IR, PerkinElmer Waltham, Massachusetts, EUA), equipado com um acessório de reflexão total atenuada (ATR). A superfície de esmalte de cada amostra foi posicionada sobre a superfície do ATR e pressionada com auxílio de célula de carga plana de aço inoxidável (100 gf), a fim de obter o máximo contato da amostra com o cristal de diamante do ATR.

Os espectros de infravermelho foram registrados automaticamente no equipamento, por um computador acoplado para mapeamento do ensaio, utilizando o software Spectrum (versão 10.4.3, PerkinElmer Waltham, Massachusetts, EUA). Os espectros foram adquiridos no modo de absorbância, com faixa de transmissão entre 4000 e 650 cm^{-1} , 80 varreduras, a uma resolução de 4 cm^{-1} . As bandas de absorção consideradas para este estudo são as superposições dos modos de vibração ν_1 e ν_3 de fosfato (1300-900 cm^{-1}), amida I (1680-1600 cm^{-1}), amida II (1580-1480 cm^{-1}), o ν_2 modo de vibração do carbonato (cerca de 870 cm^{-1}) e superposição do alongamento ν_3 e flexão ν_4 modo vibração de carbonato (entre 1600-1300 cm^{-1}) (Zezell et al., 2015).

4.5 Análise da Microdureza Knoop (KHN)

As análises de microdureza superficial foram realizadas seguindo o mesmo protocolo, que foi o de realizar avaliações antes e após os respectivos tratamentos de superfície e processo de desmineralização e remineralização. Sendo que, após os respectivos tratamentos de superfície e processo de desmineralização e remineralização, as análises de microdureza foram feitas na metade superior dos espécimes, abrangendo as áreas controle e tratadas. As análises de microdureza superficial foram realizadas utilizando um microdurômetro (FM-ARS 900, Future Tech Company, Tóquio, Japão), acoplado ao software para análise de imagem (FT-

ARS 900 HDPS-ARS, versão 1.31.4). Com uma ponta diamantada piramidal tipo Knoop, aplicando carga estática de 25 g por 10 s (Stangler et al., 2013). Em cada espécime analisado, três leituras foram realizadas em diferentes pontos. Esses pontos estavam a 1,5 mm da margem superior do esmalte com um espaço de 0,5 mm um do outro na direção vertical (Stangler et al., 2013). Assim, uma média dos valores das três leituras foi obtida para cada amostra. Os valores de microdureza foram expressos em Knoop Hardness Number (KHN). Para análise estatística foi utilizada a porcentagem da perda de microdureza, representada pela seguinte fórmula:

$$[(\text{MICRODUREZA FINAL} - \text{MICRODUREZA INICIAL}) / \text{MICRODUREZA INICIAL}] \times 100$$

4.6 Determinação da topografia de superfície por Interferometria de Luz Branca

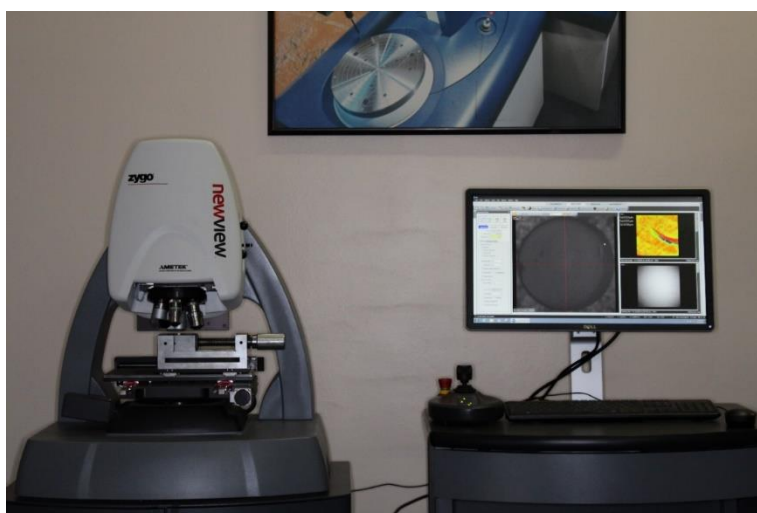
A avaliação da quantidade de esmalte superficial perdida foi realizada com um interferômetro de luz branca (NewView 8300, Zygo Corporation, Santa Clara, CA, EUA) (Figura 8). Interferômetro de luz branca é um microscópio óptico computadorizado de interferência, que opera em modo de varredura vertical, capaz de produzir uma imagem digital tridimensional de alta resolução espacial, mostrada como um mapa topográfico, onde várias cores denotam diferentes alturas para os elementos da imagem. A análise de amostras por meio de perfilometria óptica sem contato, como é exemplo a interferometria de luz branca, não requer preparação de qualquer tipo de superfície, seja ela áspera, lisa, escalonada, angulada, plana ou curva, com alta precisão e independente de ampliação (Field et al., 2010). A resolução da imagem é de 1.024×1.024 pixels, alcance de varredura 1×1 mm e resolução vertical 0,1 nm usando lente objetiva $\times 10$. Após o processo de desmineralização e remineralização, o esmalte de unhas foi removido. O posicionamento das amostras de esmalte para análise, sobre a mesa móvel do equipamento, foi definido utilizando marcações previamente realizadas na lateral de cada amostra, essas marcações delimitavam os limites da porção previamente coberta por esmalte e coincidiam com marcações de referência presentes na mesa

móvel do equipamento (Figura 9). As áreas de medição nas superfícies dos espécimes foram definidas pelo posicionamento das lentes de foco automático do equipamento sobre o centro da amostra. A imagem projetada no centro da tela do computador foi então usada para gravar os valores numéricos das coordenadas x, y e z para cada amostra individualmente, possibilitando posicionamento repetitivo e máxima precisão nas medições. Foram realizadas três leituras equidistando, na direção da coordenada x, 1,5 mm da linha divisória entre as áreas tratada e não tratada; e, na direção da coordenada y distando 1,5 mm entre uma leitura e a leitura seguinte, tanto na área que recebeu tratamento de superfície (faixa de esmalte exposta), como na área de referência (porção que estava coberta por esmalte de unhas); totalizando assim, seis leituras por amostra (Figura 10). As leituras foram digitalizadas em uma região de interesse de 800 μm \times 800 μm . A perda média da superfície foi calculada ao longo da região de interesse, como a diferença média na localização axial da superfície de referência e da superfície que recebeu tratamento. As características 3D / mudanças morfológicas, além da rugosidade superficial, foram avaliadas usando interferometria de luz branca (Tsuda et al., 2016).

A interferometria de luz branca é um método comprovado para análise sem contato do perfil de superfície, que é aprovado na ISO / DIS 25178 Part 604 (International Organization for Standardization) (Ferreira et al., 2017). Pode ser aplicado a uma ampla gama de tipos de superfície com refletividade de 0,05% a 100%. A técnica permite medições rápidas e não destrutivas, e nenhuma preparação de amostra é necessária. Além disso, apenas pequenas áreas podem ser medidas de cada vez, o que impede a avaliação repetida de áreas superficiais semelhantes em momentos diferentes (Field et al., 2010; Ferreira et al., 2014). O perfilador óptico 3D (NewView TM 8300, Zygo Corp.) utilizado tem uma faixa de varredura estendida para medir alturas de perfil de <1 nm até 20000 μm , independente da textura e ampliação da superfície, com alta resolução óptica vertical (eixo z) (0,01 nm) e resolução lateral de 0,4 - 0,6 μm (eixos x e y). Uma repetibilidade de 0,02 nm (escaneamento Z) é um requisito importante para a metrologia de alta precisão, porque permite que análises confiáveis sejam feitas em momentos diferentes. Os dados de medição foram processados usando o software Talymap Gold 5.1 TM (Zygo Corp.) para fornecer uma reprodução precisa das características da superfície, permitindo imagens com mais de 1.900 milhões de pontos de dados. As ferramentas

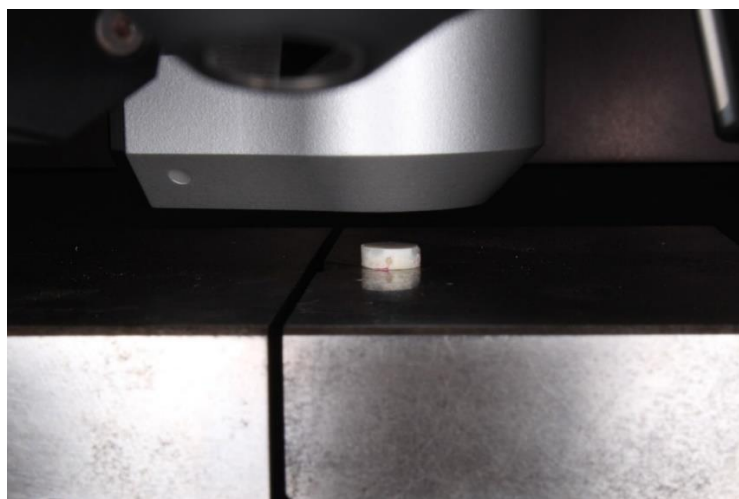
de software possibilitam a caracterização e quantificação de características topográficas da superfície, como rugosidade, alturas de passos e outras dimensões críticas (Figura 11) (Ferreira et al., 2017).

Figura 8- Fotografia representativa do interferômetro NewView 8300, Zygo Corporation



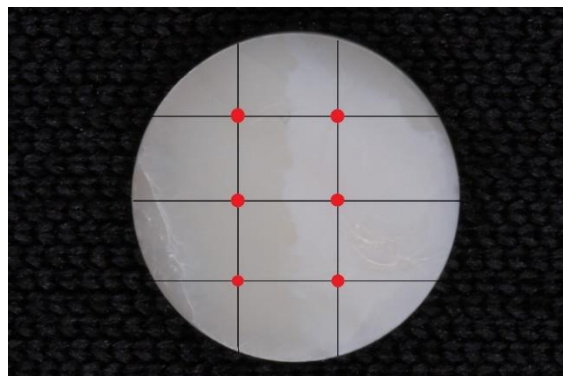
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 9- Fotografia representativa do posicionamento de uma amostra circular de esmalte, sobre a mesa móvel do interferômetro



Fonte: Elaborado pelo autor.

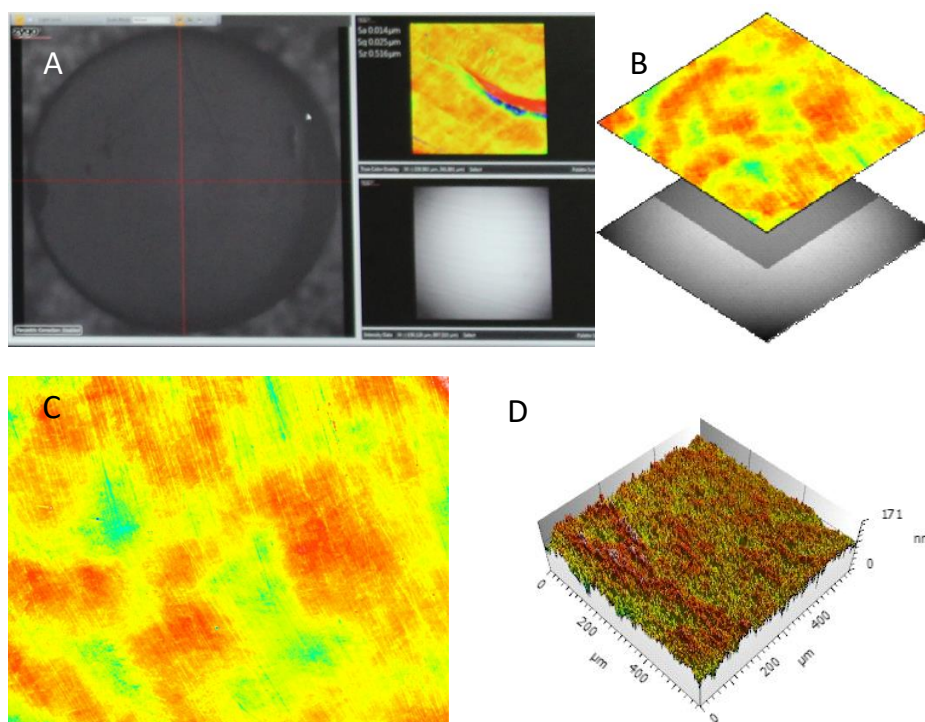
Figura 10- Fotografia representativa das áreas de leitura superfície de esmalte



Legenda: cada círculo vermelho representa uma área de leitura medindo 800 μm x 800 μm , nos lados tratado (direito) e não tratado (esquerdo)

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 11- Fotografia representativa da sequência de passos para a obtenção de dados de rugosidade da superfície de esmalte



Legenda: A) análise da superfície do espécime pelo software; B) obtenção da camada topográfica; C) camada topográfica; D) imagem 3D resultante da análise.

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.8 Planejamento estatístico

Para análise química do esmalte em espectroscopia (FTIR), os picos de absorvância do grupo fosfato (entre 1300 e 900 cm^{-1}), do grupo amida I (entre 1680 e 1600 cm^{-1}), do grupo amida II (entre 1580 e 1480 cm^{-1}) e do grupo carbonato (entre 1600 e 1300 cm^{-1}), presentes na estrutura do esmalte foram comparados antes e após os tratamentos de superfície por meio do teste T de Student par a par, com as médias e desvios padrão das áreas das bandas Fosfato ν_3 , Carbonato ν_2 , Carbonato ν_3 e superposição do alongamento ν_3 e flexão ν_4 , modo vibração de carbonato, com nível de significância de 5% ($\alpha=0,05$).

Para os dados de microdureza de superfície, uma média foi obtida a partir das três leituras realizadas em cada amostra de esmalte antes e após os tratamentos. A análise descritiva consistiu nos valores de média e desvio-padrão. Para a análise inferencial foram utilizados os valores de perda de microdureza em relação a microdureza inicial, obtidos por meio do teste de Análise de variância (ANOVA) sob 2 fatores (laser e fotoabsorvedor); o teste de múltiplas comparações de Tukey; e o teste de comparação múltipla de Dunnett, com nível de significância de 5% ($\alpha=0,05$).

Para análise dos resultados da interferometria, uma média foi obtida a partir de três leituras no plano vertical distando, 1,5 mm entre a leitura realizada e a próxima leitura, realizadas na metade esquerda de cada uma das amostras – inicialmente coberta por esmalte de unhas –, representando a porção da amostra que não sofreu tratamento. E uma média obtida a partir de outras três leituras realizadas na metade direita de cada amostra – porção exposta aos tratamentos de superfície; realizadas da mesma forma que na metade esquerda. Totalizando assim, seis leituras por amostra. A análise descritiva consistiu nos valores de média e desvio-padrão para os lados esquerdo (não tratado) e direito (tratado) dos espécimes de cada grupo; na análise inferencial os efeitos dos fatores primários (laser, fotoabsorvedor e tempo) e sua interação, foram submetidos à análise de variância (ANOVA) a três fatores de medidas repetidas, com nível de significância de 5% ($\alpha=0,05$).

Os dados foram submetidos à análise estatística por meio dos programas computacionais: Minitab for Windows (versão 17, 2010, College State, PA, EUA) e GraphPad Prism (versão 6, 2010; La Jolla, CA, EUA).

5 RESULTADOS

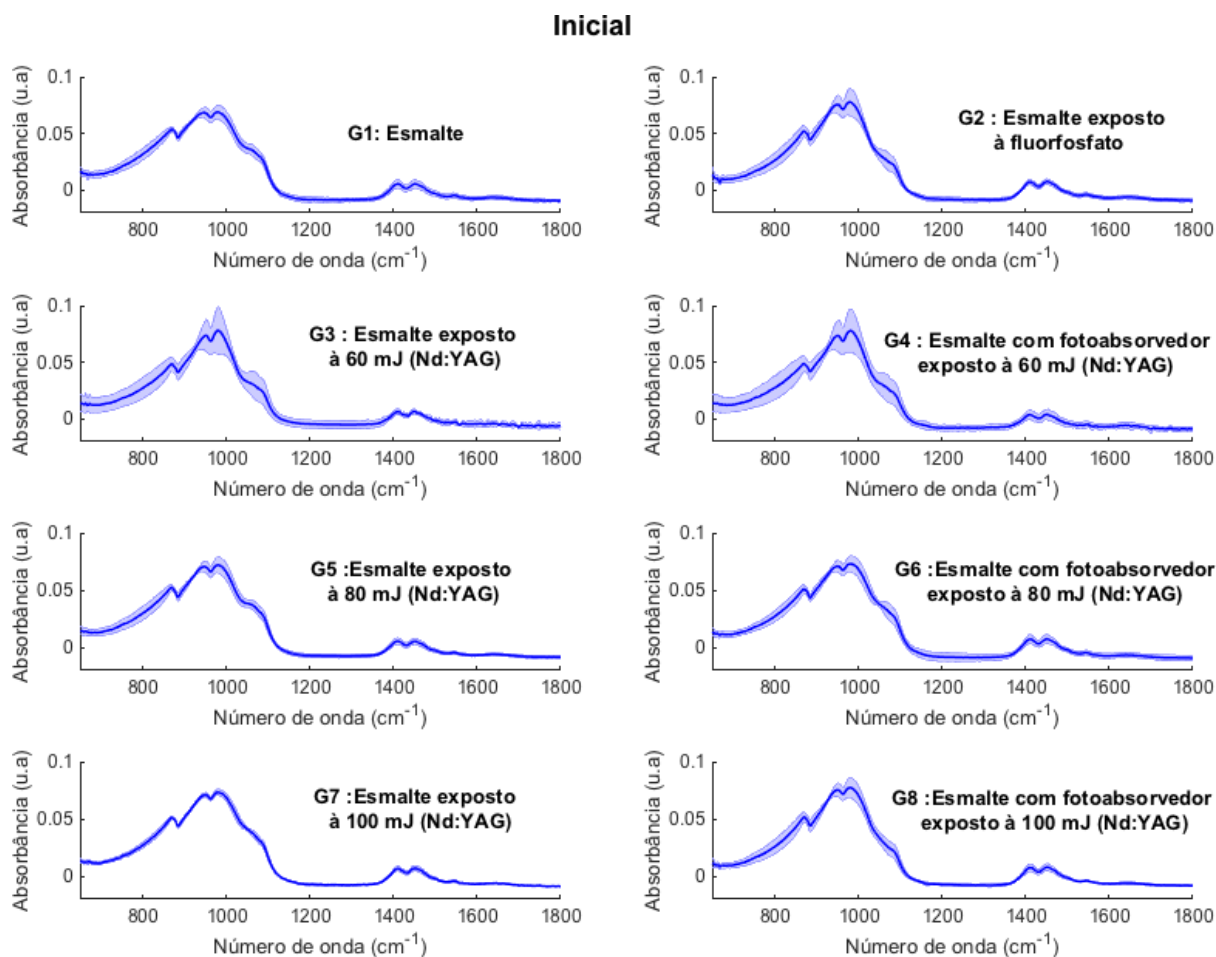
Os dados obtidos estão apresentados em três partes para melhor compreensão do leitor. Na primeira parte, apresentam-se os resultados da análise química dos substratos (grupos: G2 (controle positivo); G3 (*Nd:YAG* 60 mJ); G4 (fotoabsorvedor + *Nd:YAG* 60 mJ); G5 (*Nd:YAG* 80 mJ); G6 (fotoabsorvedor + *Nd:YAG* 80 mJ); G7 (*Nd:YAG* 100 mJ); G8 (fotoabsorvedor + *Nd:YAG* 100 mJ) em espectroscopia – FTIR. Na segunda parte está a análise da microdureza superficial dos mesmos substratos. Na terceira parte está a análise da rugosidade superficial por meio de interferometria de luz branca.

5.1 Análise química dos substratos em espectroscopia - FTIR

Gráficos dos picos de absorbância iniciais referentes aos diferentes tratamentos de superfície estão representados na figura 12; bem como os picos de absorbância dos grupos fosfato (entre 1300 e 900 cm^{-1}), amida I (entre 1680 e 1600 cm^{-1}), amida II (entre 1580 e 1480 cm^{-1}) e carbonato (entre 1600 e 1300 cm^{-1}), presentes na estrutura do esmalte, para os respectivos grupos estudados. A figura 13 apresenta os gráficos dos picos de absorbância após o ciclo de des - remineralização referentes aos diferentes tratamentos de superfície. A figura 14 mostra o resultado do teste *T* de Student par a par, com as médias e desvios padrão das áreas das bandas Fosfato ν_3 , Carbonato ν_2 , Carbonato ν_3 e superposição do alongamento ν_3 e flexão ν_4 , modo vibração de carbonato, dos grupos contendo fotoabsorvedor (G4, G6 e G8) após des-re, em comparação com o grupo G2 (flúor). Observam-se diferenças estatísticamente significantes entre G2 e G8, quanto ao modo de vibração ν_3 do fosfato, com diminuição mais expressiva desse componente inorgânico no grupo G2; entre G2 e G4, e G2 e G6, quanto ao modo de vibração ν_2 do carbonato, com diminuição mais expressiva desse componente inorgânico em G2; e entre G2 e G8 quanto a superposição do alongamento ν_3 e flexão ν_4 , com

maior diminuição desse componente inorgânico em G2. A figura 15 mostra o resultado do teste *T* de Student par a par, com as médias e desvios padrão das áreas das bandas Amida I e Amida II dos grupos contendo fotoabsorvedor (G4, G6 e G8), em comparação com o grupo G2 (flúor), após des-re. Observam-se diferenças estatísticamente significantes entre G2 e G8, com diminuição do componente orgânico amida I em G8. A figura 16 mostra o resultado do teste *T* de Student par a par, com as médias e desvios padrão da relação Amida I + Amida II / Carbonatos + Fosfato, e relação Carbonatos / Fosfato dos grupos contendo fotoabsorvedor (G4, G6 e G8), em comparação com o grupo G2 (flúor) após des-re. Diferenças estatísticamente significantes ocorreram entre G2 e G4, e G2 e G6, quanto à relação Carbonatos / Fosfato, evidenciando diminuição mais expressiva em G2.

Figura 12 – Espectros Iniciais dos 8 grupos estudados, obtidos no ATR-FTIR



Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 13 – Espectros, após ciclo des – re, dos 8 grupos estudados, obtidos no ATR-FTIR

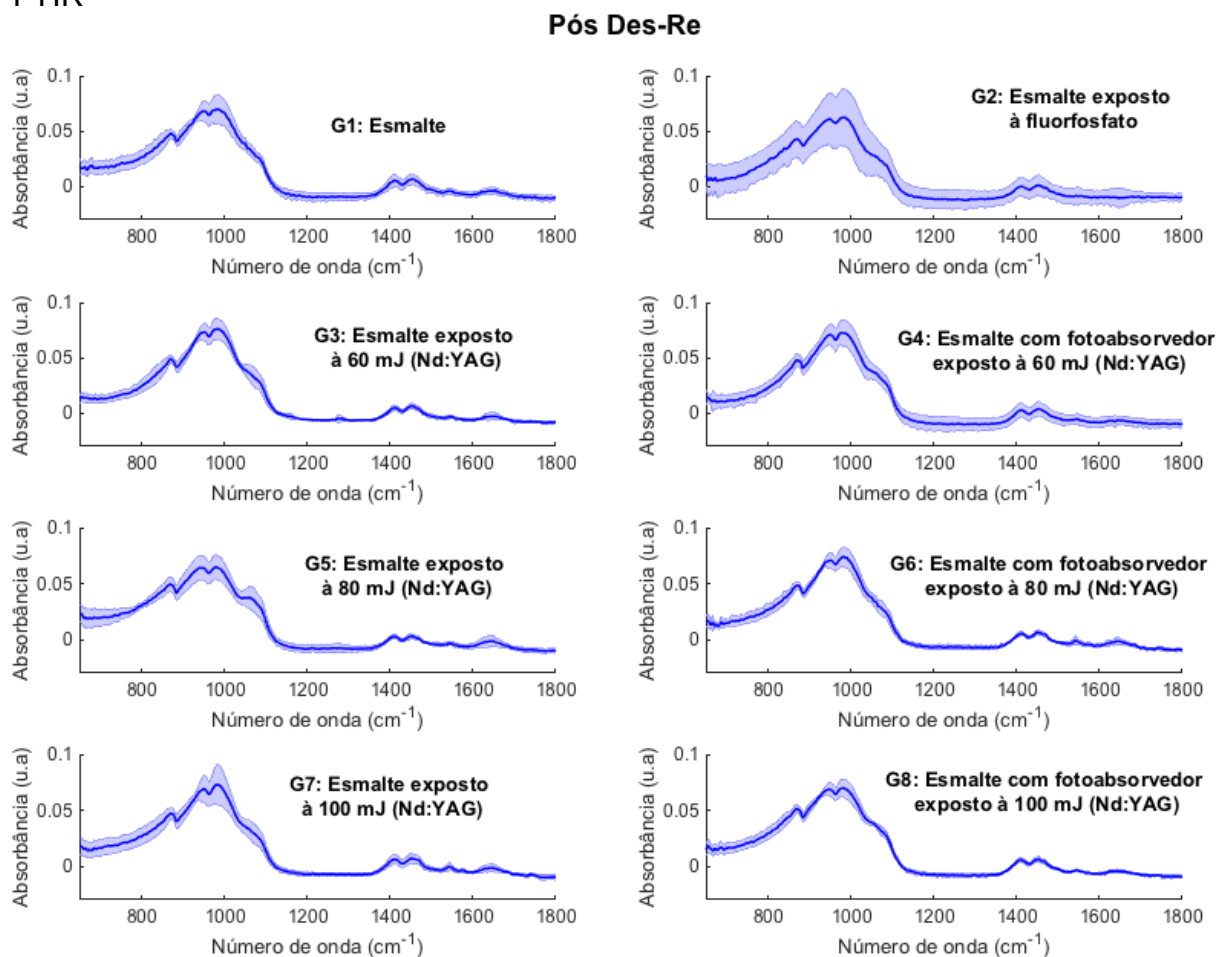
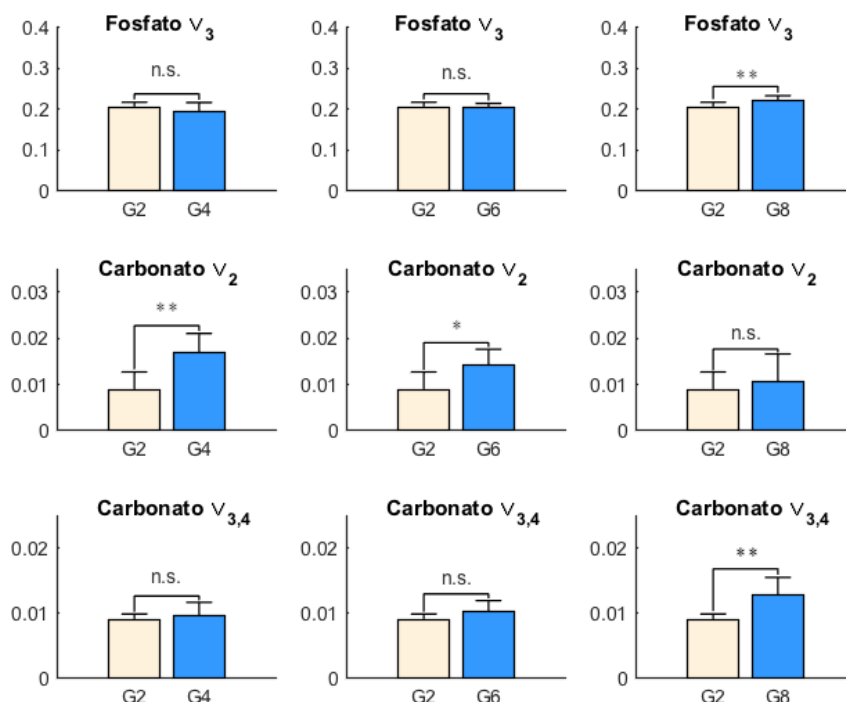


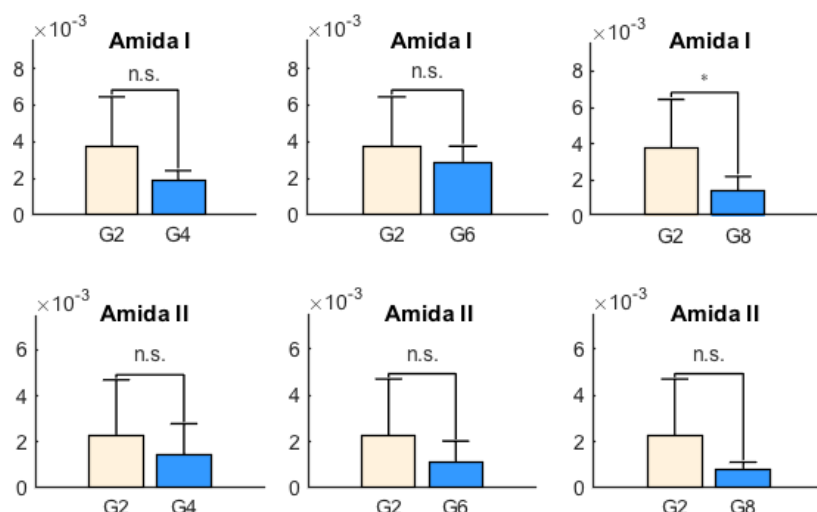
Figura 14 – Resultados do teste *T* de Student par a par. A figura mostra as médias e desvios padrão das áreas das bandas Fosfato ν_3 , Carbonato ν_2 e Carbonato $\nu_{3,4}$ dos grupos contendo fotoabsorvedor (G4, G6 e G8), em comparação com o grupo G2 (flúor), após des-re



Legenda: considera-se $p > 0.05$ como sendo o intervalo de rejeição. Quando há a representação *n.s.*, assume-se sem diferença estatística. Para valores de $p \leq 0.05$ simboliza-se com *, para valores de $p \leq 0.01$ simboliza-se com **, para valores de $p \leq 0.001$ simboliza-se com *** e para valores de $p \leq 0.0001$ simboliza-se com >***.

Fonte: Elaborada pelo autor

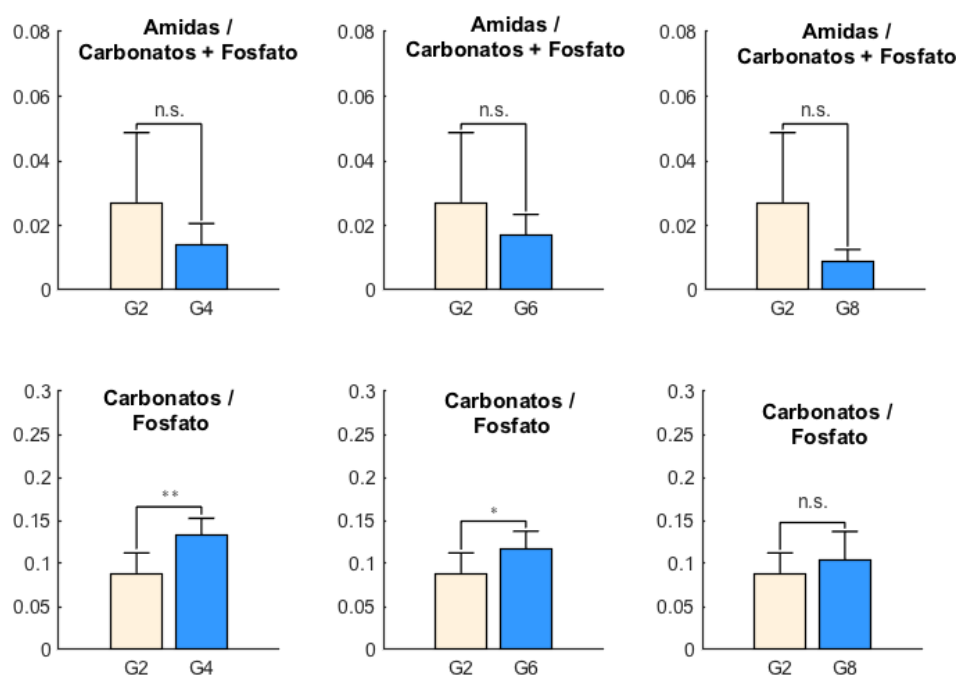
Figura 15 – Resultados do teste *T* de Student par a par. A figura mostra as médias e desvio padrão das áreas das bandas Amida I e Amida II dos grupos contendo fotoabsorvedor (G4, G6 e G8), em comparação com o grupo G2 (flúor), após des-re



Legenda: considera-se $p > 0.05$ como sendo o intervalo de rejeição. Quando há a representação *n.s.*, assume-se sem diferença estatística. Para valores de $p \leq 0.05$ simboliza-se com *, para valores de $p \leq 0.01$ simboliza-se com **, para valores de $p \leq 0.001$ simboliza-se com *** e para valores de $p \leq 0.0001$ simboliza-se com >***.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 16 – Resultados do teste *T* de Student par a par. A figura mostra as médias e desvio padrão da relação Amida I + Amida II / Carbonatos + Fosfato e relação Carbonatos / Fosfato dos grupos contendo fotoabsorvedor (G4, G6 e G8), em comparação com o grupo G2 (flúor), após des-re



Legenda: considera-se $p > 0.05$ como sendo o intervalo de rejeição. Quando há a representação *n.s.*, assume-se sem diferença estatística. Para valores de $p \leq 0.05$ simboliza-se com *, para valores de $p \leq 0.01$ simboliza-se com **, para valores de $p \leq 0.001$ simboliza-se com *** e para valores de $p \leq 0.0001$ simboliza-se com >***.

Fonte: Elaborada pelo autor.

5.2 Análise de microdureza superficial (KHN)

5.2.1 Estatística descritiva da análise de microdureza superficial (KHN)

Na tabela 1 encontram-se os valores da estatística descritiva, mostrando os valores de média, desvio-padrão e percentagem de perda de microdureza nos 8 grupos estudados, onde se evidencia menor percentagem de perda de microdureza no grupo G2 (flúor), seguido de G8 (fotoabsorvedor + *Nd:YAG laser*).

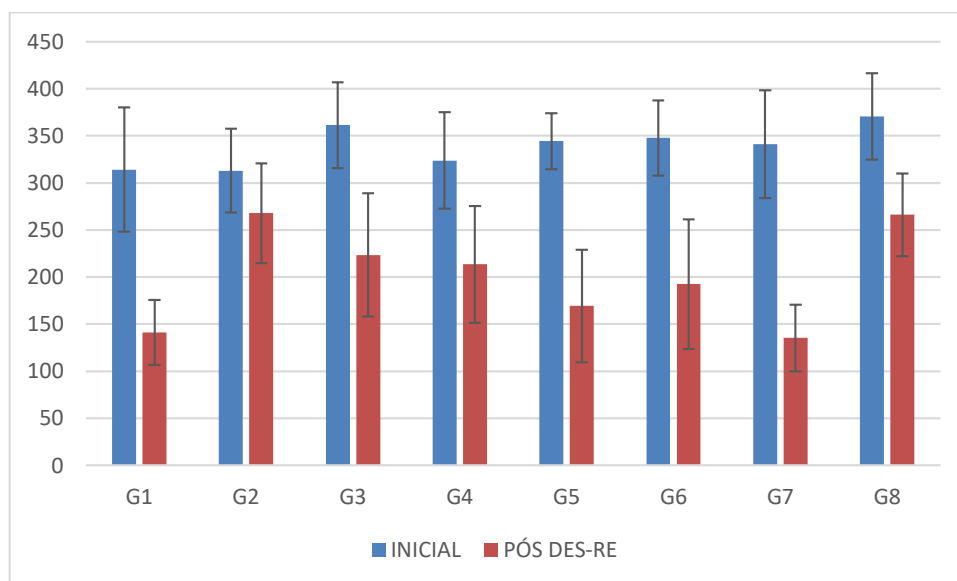
Tabela 1 – Valores de média \pm desvio padrão e percentagem de perda da microdureza em cada grupo (KHN)

Grupos	Tempo		% de perda de microdureza (KHN)
	Inicial	Após des-re	
G1	314 \pm 66	141 \pm 35	-53,54
G2	313 \pm 44	268 \pm 53	-12,85
G3	361 \pm 45,5	223,5 \pm 66	-38,48
G4	324 \pm 51	213 \pm 62	-33,79
G5	344 \pm 30	169 \pm 60	-50,80
G6	348 \pm 40	192,5 \pm 69	-44,87
G7	341 \pm 57	135 \pm 35	-58,79
G8	371 \pm 46	266 \pm 44	-27,45

Fonte: Elaborada pelo autor, segundo o software Minitab.

A Figura 17 apresenta graficamente a análise descritiva das médias e desvio-padrão de microdureza (KHN), evidenciando as diferenças obtidas entre os grupos experimentais.

Figura 17 - Gráfico das médias e desvios-padrão em cada grupo



Fonte: Microsoft Excel 2016.

5.2.2 Estatística inferencial da análise de microdureza superficial (KHN)

Na Tabela 2, apresentam-se os dados relativos aos efeitos dos fatores primários (laser, fotoabsorvedor) e sua interação, que foram submetidos à análise de variância (ANOVA) a dois fatores. Diferenças estatisticamente significantes foram obtidas no fator fotoabsorvedor individualmente e na interação entre os fatores laser e fotoabsorvedor, considerando um nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

Tabela 2 – Resultados do teste ANOVA 2 fatores

Fatores	GL	SQ	MQ	F	<i>p</i>
Laser	2	1385,1	692,6	2,6420	0,080412
Fotoabsorvedor	1	2934,9	2934,9	11,1962	0,001497*
Interação	2	2262,4	1131,2	4,3154	0,018254*

Legenda: GL: grau de liberdade; SQ: soma quadrática; MQ: média quadrática; F: razão; *p*: p-valor; *Diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$).

Fonte: Elaborada pelo autor, segundo o software Minitab.

Aplicou-se o Teste de Tukey (5%) com a finalidade de observar as diferenças significativas nos fatores avaliados.

Na tabela 3 observam-se os resultados do fator fotoabsorvedor para o teste de Tukey. Os grupos com fotoabsorvedor apresentaram porcentagem de perda de microdureza significativamente menor quando comparado aos grupos sem fotoabsorvedor.

Tabela 3 – Resultados do teste de Tukey (5%) para o fator fotoabsorvedor

Fotoabsorvedor	% de perda de microdureza (KHN)	Grupos Homogêneos
Sem fotoabsorvedor	-49,3557	a
Com fotoabsorvedor	-35,3677	b

Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$).

Na tabela 4 observam-se os resultados da interação dos fatores para o teste de Tukey. O grupo G8 (laser 100 mJ + fotoabsorvedor) apresentou porcentagem de perda de microdureza significativamente menor em relação aos grupos experimentais G5 (*Nd:YAG laser 80 mJ*) e G7 (*Nd:YAG laser 100 mJ*).

Tabela 4 – Resultados do teste de Tukey (5%) para a interação dos fatores

Interação		% de perda de microdureza (KHN)	Grupos Homogêneos		
Laser	Fotoabsorvedor				
100 mJ	Ausente	-58,7888	a		
80 mJ	Ausente	-50,7964	a	b	
80 mJ	Presente	-44,8668	a	b	c
60 mJ	Ausente	-38,4819	a	b	c
60 mJ	Presente	-33,7893		b	c
100 mJ	Presente	-27,4472			c

Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si ($p < 0,05$)

Com o objetivo de comparar cada tratamento de superfície com os grupos controle aplicou-se o Teste de comparação múltipla de Dunnett.

Na tabela 5 são dispostos os resultados para o teste de comparação múltipla de Dunnett, no qual foram comparados todos os tratamentos de superfície ao grupo G1 (controle negativo). Não houve diferença estatisticamente significativa nas médias de microdureza entre os grupos experimentais e o grupo controle negativo.

Tabela 5 – Resultados do teste de Dunnett em relação ao grupo G1

Grupos	Valores de p
G3 – G1	0,999848
G4 – G1	0,999963
G5 – G1	0,937391
G6 – G1	0,994298
G7 – G1	0,572126
G8 – G1	0,999965

Fonte: Elaborada pelo autor, segundo o software Minitab.

Na Tabela 6, apresentam-se os dados relativos ao teste de comparação múltipla de Dunnett para o grupo G2 (controle positivo) relacionado aos tratamentos avaliados. O grupo G8 (fotossensibilizador + Nd:YAG 100 mJ) apresentou média de microdureza semelhante ao grupo G2.

Tabela 6 – Resultados do teste de Dunnett em relação ao grupo G2

Grupos	Valores de p
G3 – G2	0,003071
G4 – G2	0,017373
G5 – G2	0,000032
G6 – G2	0,000215
G7 – G2	0,000021
G8 – G2	0,114253*

Fonte: Elaborada pelo autor, segundo o software Minitab.

5.3 Análise da rugosidade superficial por meio de interferometria de luz branca

5.3.1 Estatística descritiva da análise da rugosidade superficial (nm)

Na tabela 7 encontram-se os valores da estatística descritiva, mostrando os valores de média e desvio-padrão de rugosidade superficial nos 8 grupos estudados.

Tabela 7 – Valores de média \pm desvio padrão da rugosidade superficial em cada grupo (nm)

Grupos	Lado da amostra	
	Inicial	Após des-re
G1	14 \pm 4	16 \pm 3
G2	16 \pm 4	17 \pm 5
G3	11 \pm 3	13 \pm 6
G4	12 \pm 4	15 \pm 6
G5	12 \pm 4	15 \pm 3
G6	13 \pm 4	16 \pm 4
G7	13 \pm 3	13 \pm 4
G8	16 \pm 4	19 \pm 6

Fonte: Elaborada pelo autor, segundo o software Minitab.

5.3.2 Estatística inferencial da análise da rugosidade superficial (nm)

Na Tabela 8, apresentam-se os dados relativos aos efeitos dos fatores primários (laser, fotoabsorvedor e tempo) e sua interação, que foram submetidos à análise de variância (ANOVA) a três fatores de medidas repetidas. Diferenças estatisticamente significantes foram obtidas no fator fotoabsorvedor individualmente e no fator tempo, considerando um nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

Tabela 8 – Resultados do teste ANOVA 3 fatores de medidas repetidas

Fatores	GL	SQ	MQ	F	p
Laser	2	97,91	48,95	2,690	0,078792
Fotoabsorvedor	1	119,33	119,33	6,557	0,013869*
Laser + Fotoabs.	2	2,36	1,18	0,065	0,937289
Tempo	1	195,21	195,21	167,665	0,000000*
Tempo + Laser	2	4,74	2,37	2,037	0,142271
Tempo + Fotoabs.	1	0,33	0,33	0,287	0,595017
Tempo+Laser+Fotoabs	2	2,16	1,08	0,927	0,403311

Legenda: GL: grau de liberdade; SQ: soma quadrática; MQ: média quadrática; F: razão; p: p-valor; *Diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$).

Fonte: Elaborada pelo autor, segundo o software Minitab.

Na tabela 9 observam-se os resultados do fator fotoabsorvedor, para o teste de Tukey. Após o processo de des-remineralização, os grupos sem fotoabsorvedor apresentaram menor rugosidade superficial que os grupos com fotoabsorvedor.

Tabela 9 – Resultados do teste de Tukey (5%) para o fator fotoabsorvedor

Fotoabsorvedor	Rugosidade	Grupos Homogêneos
SEM	12,78271	a
COM	15,02483	b

Letras diferentes mostram diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$).

Fonte: Elaborada pelo autor

A tabela 10 mostra os resultados do fator tempo, para o teste de Tukey. A rugosidade superficial aumentou após o ciclo de des-remineralização.

Tabela 10 – Resultados do teste de Tukey (5%) para o fator tempo

Tempo	Rugosidade	Grupos Homogêneos
ANTES	12,58659	a
APÓS	15,35284	b

Letras diferentes mostram diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$).

Fonte: Elaborada pelo autor

Na tabela 11 são dispostos os resultados para o teste de comparação múltipla de Dunnett, no qual foram comparados todos os tratamentos de superfície ao grupo G1 (controle negativo), após o ciclo de des-remineralização. Não houve diferença estatisticamente significativa nas médias de rugosidade entre os grupos experimentais e o grupo controle negativo.

Tabela 11 – Resultados do teste de Dunnett em relação ao grupo G1

Grupos	Valores de p
G3 – G1	0,999064
G4 – G1	0,481759
G5 – G1	0,399098
G6 – G1	0,955361
G7 – G1	0,723884
G8 – G1	0,988020

Fonte: Elaborada pelo autor, segundo o software Minitab.

Na Tabela 12, apresentam-se os dados relativos ao teste de comparação múltipla de Dunnett para o grupo G2 (controle positivo) após o ciclo de des-remineralização. Não houve diferença estatisticamente significativa nas médias de rugosidade entre os grupos experimentais e o grupo controle positivo.

Tabela 12 – Resultados do teste de Dunnett em relação ao grupo G2

Grupos	Valores de p
G3 – G2	0,067761
G4 – G2	0,406876
G5 – G2	0,336636
G6 – G2	0,916965
G7 – G2	0,651771
G8 – G2	0,999078

Fonte: Elaborada pelo autor, segundo o software Minitab.

6 DISCUSSÃO

6.1 Da Metodologia

Para a execução deste estudo, após revisão de literatura, optou-se pela utilização de dentes bovinos, uma vez que a unidade experimental proposta foi composta de 80 elementos dentais hígidos, número considerado elevado e preocupante para se obter de dentes humanos, de acordo com a política de vigilância dos comitês de ética em pesquisa.

De acordo com Yassen et al. (2011) os dentes bovinos são de fácil obtenção em grandes quantidades, geralmente se encontram em boas condições e apresentam composição mais uniforme em comparação a dentes humanos, pela maior facilidade de padronização pela obtenção de animais de mesma idade e condições de alimentação. Os dentes bovinos apresentam ainda, superfície plana larga, e apresentam menor incidência de defeitos estruturais que possam comprometer os resultados das pesquisas. Além disso não foram encontradas diferenças entre a matriz mineral dos tecidos duros dentários humano e bovino (Bachmann et al., 2003).

A falta de padronização mostra a necessidade de estabelecer parâmetros seguros para uso de lasers na prevenção de cáries (Azevedo et al., 2012).

Segundo Azevedo et al. (2012), lasers que emitem no espectro infravermelho próximo, tais como o *Nd:YAG laser*, são fracamente absorvidos pelos tecidos duros dentais, como o esmalte. No entanto, de acordo com os mesmos autores, com a finalidade de alterar a composição ou a solubilidade dos tecidos dentários mineralizados para produzir o efeito preventivo da cárie, a luz do laser deve ser fortemente absorvida. Por esta razão, corantes como nanquim são comumente aplicados em superfícies de esmalte antes da irradiação com *Nd:YAG laser* para servir como fotoabsorvedores, limitando sua ação à superfície e reduzindo a possibilidade de transmissão de energia ao tecido pulpar, com consequente dano térmico. Quanto mais radiação é absorvida pelo tecido alvo, menor a profundidade da penetração da luz. Contudo, a tinta nanquim induz ao manchamento da estrutura,

sendo neste estudo substituída pela pasta de mesma coloração sem os efeitos de impregnação. Assim, os parâmetros do laser utilizados no presente estudo foram estabelecidos para promover resistência à desmineralização da superfície do esmalte por meio de alterações químicas e morfológicas.

Lesões artificiais no esmalte têm sido comumente utilizadas em estudos *in vitro* para simular o comportamento da cárie *in vivo* (Kantovitz et al., 2013; Feitosa et al., 2017; Campos et al., 2011).

Para a indução artificial de lesão cáriosa em esmalte utilizou-se a solução desmineralizadora de Buskes (Buskes et al., 1985), contendo 3 mM de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 3 mM de KH_2PO_4 e 50 mM de CH_3COOH (pH 5,0). A cárie artificial, decorrente do emprego dessa solução desmineralizadora gera lesões subsuperficiais em esmalte com estrutura histológica típica de cárie em esmalte. Foi utilizado o modelo de ciclo dinâmico de desmineralização e remineralização proposto por (Queiroz et al., 2008) que consiste em imergir os espécimes em uma solução de desmineralização durante 6 h, então lavagem em água deionizada, secagem com jatos de ar e imersão em uma solução de remineralização, sendo representada, no caso deste estudo, por saliva artificial (Göhring et al., 2004), durante 18 h a 37°C. Todo o procedimento sendo repetido diariamente por 8 dias. Os espécimes foram imersos individualmente nas soluções, a 37°C, durante 8 dias consecutivos e trocadas após 4 dias para manter os pH constantes. O volume total das soluções utilizadas foi calculado utilizando-se 6,25 mL / mm² de área de esmalte da amostra da solução desmineralizadora; e 3,12 mL / mm² de área de esmalte da solução remineralizadora.

Na análise química realizada por meio de espectroscopia de infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR), as bandas de infravermelho de carbonato e fosfato estão relacionadas à hidroxiapatita carbonatada, que é o componente principal de tecidos duros. A pureza e qualidade da apatita biológica estão relacionadas com a sua solubilidade; desta forma, a análise de carbonato relacionado ao fosfato fornece informações sobre a estrutura e cristalinidade dos tecidos duros após os tratamentos propostos. Além disso, os teores das amidas I e II estão relacionados ao teor de colágeno na matriz orgânica de tecidos duros, e a análise dessas bandas pode fornecer informações importantes sobre a conformação e desnaturação desta molécula (Zezell et al., 2015).

Após a seleção das bandas, o sinal de fundo foi subtraído e, para uma comparação semiquantitativa entre os grupos, as áreas sob as bandas consideradas foram calculadas após a normalização pela área dos modos de vibração ν_1 e ν_3 da banda de fosfato ($1300-900\text{ cm}^{-1}$). Desta forma, a relação entre a área de $850-890\text{ cm}^{-1}$, da banda de carbonato, e a área da banda de fosfato, estão relacionadas com a proporção de carbonato para fosfato. Além disso, as razões entre amida I / fosfato e amida II / fosfato estão relacionadas à proporção de colágeno e à hidroxiapatita (Zezell et al., 2015). Embora os componentes orgânicos representem uma porção menor na estrutura do esmalte (2% em volume) (Bachmann et al., 2003), a matriz orgânica pode ter um papel importante na via de difusão de íons no esmalte dentário e, portanto, tem um grande potencial na prevenção de cáries com aplicação do laser (Shahabi et al., 2016).

6.2 Dos Resultados

O presente estudo analisou a perda mineral do esmalte dentário sem qualquer tratamento de superfície, do esmalte dentário tratado com aplicação tópica de flúorfosfato acidulado gel na concentração 1,23% e do esmalte dentário irradiado pelos parâmetros de 60 mJ, 80 mJ e 100 mJ do *Nd:YAG laser* associados ou não a um fotoabsorvedor após um desafio cariogênico *in vitro*. Embora o modelo *in vitro* simule o desenvolvimento de lesões semelhantes à cárie do cenário *in vivo*, a acessibilidade das soluções de remineralização e de desmineralização às amostras, o método pelo qual foi realizado o escaneamento das amostras quando das irradiações dos parâmetros do laser, e a grande variação nos valores iniciais de microdureza entre as amostras podem ter afetado os resultados. Esses fatores devem ser levados em conta quando os dados são extrapolados para uma condição *in vivo*.

Tendo em vista os resultados obtidos no presente estudo, os autores observaram que o grupo G2 (controle positivo) apresentou menor percentagem de perda de microdureza após o ciclo de des – reminerlização, evidenciando uma maior resistência à desmineralização. Desta forma, a primeira hipótese nula testada foi

rejeitada. Além disso, os tratamentos apresentaram diferenças estatisticamente significantes na microdureza em relação ao fator fotoabsorvedor individualmente ($p = 0,001497$) e na interação entre os fatores laser e fotoabsorvedor ($p = 0,018254$). Quando comparados com o grupo G1 (controle negativo), os tratamentos não apresentaram diferenças estatisticamente significantes em relação à microdureza. Portanto, a terceira hipótese nula testada não foi rejeitada. No entanto, nos grupos onde foi empregado fotoabsorvedor houve uma perda de microdureza significativamente menor, após o ciclo des – re, em comparação aos grupos sem fotoabsorvedor, considerando um nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Assim, a quarta hipótese nula testada foi rejeitada. Além disso, o grupo G8 (fotoabsorvedor + *Nd:YAG* 100 mJ) apresentou perda de microdureza semelhante ao grupo G2 (controle positivo), enquanto os demais tratamentos apresentaram perda de microdureza significativamente maior que o grupo G2. Desta forma, a segunda hipótese nula testada não foi rejeitada. Esses resultados estão de acordo com os achados de Azevedo et al. (2012) onde foi relatado que *Nd:YAG laser* combinado ou não com gel / verniz fluoretado não foi mais eficaz que o flúor isolado para prevenir a desmineralização do esmalte no período experimental. Entretanto, estão em desacordo com Stangler et al. (2013) que obtiveram resultados evidenciando que a irradiação de laser ao redor de bráquetes ortodônticos combinadas ou não à aplicação tópica de flúor foi eficaz no aumento da microdureza superficial do esmalte; e com Korytnicki et al. (2006), que encontraram uma diferença significativa na microdureza entre os grupos com e sem laser até 60 μm de profundidade, com o grupo irradiado por *Nd:YAG laser* demonstrando valores mais altos, para os autores tal achado sugere que o tratamento a laser do esmalte é restrito às camadas mais superficiais. Os resultados de estudos que lidam com os efeitos de lasers na microdureza do esmalte são divergentes e inconclusivos, provavelmente devido aos diferentes tipos de lasers, configurações de parâmetros e metodologias usadas nas investigações (Azevedo et al., 2012). Além disso, o real efeito isolado do laser na estrutura dentária para a prevenção da cárie ainda não está claro, pois vários estudos utilizam o flúor associado ao laser e variam o parâmetro de irradiação (Tavares et al., 2012). A obtenção de resultados aparentemente destoantes quanto à microdureza no presente estudo, foi devido, provavelmente, à grande variação nos valores iniciais de microdureza entre os

diferentes grupos estudados.

Neste estudo, a imagem por interferometria sem contato 3D foi usada para avaliar as características nanoestruturais da topografia da superfície do esmalte dentário antes e após os processos de desmineralização e remineralização. Imagens de alta resolução foram obtidas em escala nanométrica (resolução Z sub-angstrom), com varredura precisa de áreas com dimensões 800 × 800 µm. Os resultados do teste demonstraram que o método de avaliação foi preciso e confiável para a análise quantitativa dos efeitos da desmineralização, por meio da avaliação do grau de rugosidade, na superfície do esmalte dentário. Concomitantemente, análises qualitativas precisas das superfícies, antes e depois dos processos de desmineralização e remineralização foram possibilitados por meio de imagens claras de alta resolução. Esses resultados corroboram com os achados de Ferreira et al. (2014). A diferença de rugosidade superficial, embora verificada pelo teste de Tukey como sendo maior nos grupos com fotoabsorvedor e após o ciclo de des-remineralização foi, provavelmente, resultante também do próprio processo de desmineralização. Após o ciclo de des-remineralização não houve diferença estatisticamente significativa nas médias de rugosidade entre os grupos experimentais e os grupos controle, evidenciado pelo teste de comparação múltipla de Dunnett para os grupos G1 e G2. Desta forma, não foi possível afirmar que o emprego do *Nd:YAG laser*, nos diferentes parâmetros testados, com ou sem o uso de fotoabsorvedor, seja mais efetivo que a aplicação tópica de flúor na proteção da superfície de esmalte frente à desmineralização.

Ao considerar os tecidos biológicos duros, de acordo com Zezell et al. (2015), os principais constituintes que podem ser analisados por espectroscopia FTIR são o fosfato e o carbonato, que estão relacionados à matriz inorgânica, e o conteúdo das amidas I, II e III, que estão relacionadas à matriz orgânica. Considerando que os lasers infravermelhos de alta intensidade podem aumentar a temperatura superficial desses tecidos, são esperadas mudanças na matriz orgânica, bem como na matriz inorgânica (Kuroda, Fowler, 1984). Relacionada à matriz orgânica, a literatura mostra que a irradiação a laser pode promover a desnaturação do colágeno e a evaporação da água, o que pode ser percebido como a diminuição da proporção das bandas infravermelhas correspondentes às amidas I, II e III em relação ao fosfato quando analisado por espectroscopia FTIR (Zezell et

al., 2015). A exposição da superfície de esmalte à irradiação laser, ocasiona também a perda de água presente em sua estrutura, além da oxidação de fosfatos, formação de pirofosfatos e novas fases cristalinas, como o fosfato tricálcico (fases α -TCP e β -TCP) e fosfato tetracálcico (Zezell et al., 2009; Fowler, Kuroda, 1986). Os novos produtos químicos na estrutura do esmalte irradiado, fosfato tricálcico alfa e beta (TCP) e fosfato tetracálcico, são menos resistentes ao ataque ácido do que a hidroxiapatita do esmalte (Fowler, Kuroda, 1986). De acordo com Hsu et al.(2000), além da solubilidade do esmalte, a formação de cáries envolve também a eficiência da difusão de íons através da rede de matriz orgânica que ocupa os espaços inter e intraprismáticos, os quais podem ser bloqueados caso ocorra a decomposição parcial dessa matriz, comprometendo a difusão de íons no esmalte, retardando o processo de desmineralização. Diferenças na composição química podem ocorrer entre diferentes áreas do mesmo tecido, entre áreas internas e externas da superfície do dente, e diferentes indivíduos ou animais (Sakae, 1988).

A avaliação da composição química da superfície de esmalte das amostras por meio de espectroscopia FTIR aponta que, nas comparações por meio do teste *T* de Student pareado, diferenças estatisticamente significantes ocorreram entre G2 e G8, quanto ao modo de vibração ν_3 do fosfato, com diminuição mais expressiva desse componente inorgânico no grupo G2; entre G2 e G4, e G2 e G6, quanto ao modo de vibração ν_2 do carbonato, com diminuição mais expressiva desse componente inorgânico em G2; e entre G2 e G8 quanto a superposição do alongamento ν_3 e flexão ν_4 do carbonato (entre 1600-1300 cm^{-1}), com maior diminuição desse componente inorgânico em G2. Além disso, foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre G2 e G8 nas áreas das bandas Amida I, com diminuição deste componente orgânico em G8. Diferenças estatisticamente significantes ocorreram ainda, entre G2 e G4, e G2 e G6, quanto à relação Carbonatos / Fosfato, evidenciando diminuição mais expressiva em G2. Tais alterações químicas não parecem ter refletido diretamente na diminuição da percentagem de perda de microdureza, excetuando-se o grupo G8 (fotoabsorvedor + *Nd:YAG* 100 mJ), o qual apresentou perda de microdureza semelhante ao grupo G2 (controle positivo). Dessa forma, aparentemente, não houve, devido à irradiação por *Nd:YAG laser*, associado ou não a fotoabsorvedor, em comparação com a aplicação tópica de flúor, aumento estatisticamente

significativo da resistência da superfície de esmalte frente à desmineralização por cárie artificial. Esse resultado concorda com numerosos achados na literatura (Tavares et al., 2012; Azevedo et al., 2012; João-Souza et al., 2015; Paulos et al., 2017; Seino et al., 2015; Pereira et al., 2017). Além disso, em comparação com os grupos controle G1 e G2, não foi verificado nos grupos irradiados por *Nd:YAG laser* com ou sem fotoabsorvedor um aumento da rugosidade superficial após os ciclo de des- remineralização. Os resultados deste estudo decorreram provavelmente da metodologia empregada para a irradiação do laser sobre a superfície do esmalte dentário pois, de acordo com Correa-Afonso et al. (2012) acredita-se que qualquer alteração que ocorra na superfície do esmalte resultando na redução de sua solubilidade se deva à irradiação no modo de contato. Desta forma talvez, pelo modo de irradiação selecionado ter sido o de não contato, o aumento de temperatura na superfície do esmalte não tenha sido suficiente para promover, da mesma forma, em todos os grupos irradiados por *Nd:YAG laser*, as mudanças físicas e químicas responsáveis pelo aumento da resistência da superfície do esmalte à desmineralização.

De acordo com Seino et al. (2015), a irradiação por *Nd:YAG laser* aumentaria a rugosidade superficial. Assim, o fato de não ter sido observado aumento na rugosidade superficial, na comparação entre os grupos controle e os grupos experimentais parece promissor, quando observamos que o emprego do *Nd:YAG laser* no parâmetro de 100 mJ associado a fotoabsorvedor (grupo G8) se comparou à aplicação tópica de flúor, em relação à perda de microdureza superficial e que, enquanto os efeitos preventivos do flúor dependem da colaboração do paciente e são limitados ao longo do tempo, os do laser dependem exclusivamente do operador e talvez, possam apresentar efeitos mais duradouros. Portanto, levando-se em conta que o tempo de duração do ciclo de des-remineralização neste estudo foi limitado (08 dias), outras pesquisas, com extenso acompanhamento, ainda são necessárias para fornecer informações sobre os efeitos a longo prazo do *Nd:YAG laser* na prevenção da cárie.

7 CONCLUSÃO

De acordo com a metodologia utilizada, e com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que:

- a) O emprego de fotoborvedor diminuiu a perda de microdureza. Entretanto somente o grupo G8 (fotoborvedor + *Nd:YAG* 100 mJ) apresentou mesma eficácia que o grupo G2 (controle positivo);
- b) O emprego dos parâmetros de *Nd:YAG laser* não associados a fotoborvedor foi menos efetivo que o emprego de flúor na prevenção da desmineralização;
- c) O parâmetro de 100 mJ do *Nd:YAG laser* associado a fotoborvedor apresentou-se tão efetivo quanto o flúor na prevenção da desmineralização.
- d) A aplicação dos diferentes parâmetros do *Nd:YAG laser* testados neste estudo *in vitro*, associados ou não ao fotoborvedor, não foi mais eficaz que a aplicação tópica de flúor na redução da desmineralização por cárie artificial.

REFERÊNCIAS*

- Azevedo DT, Faraoni-Romano JJ, Derceli J dos R, Palma-Dibb RG. Effect of Nd:YAG laser combined with fluoride on the prevention of primary tooth enamel demineralization. *Braz Dent J.* 2012;23(2):104–9.
- Bachmann L, Diebolder R, Hibst R, Zezell DM. Infrared absorption bands of enamel and dentin tissues from human and bovine teeth. *Appl Spectrosc Rev.* 2003;38(1):1–14.
- Behnan SM, Arruda AO, González-Cabezas C, Sohn W, Peters MC. In-vitro evaluation of various treatments to prevent demineralization next to orthodontic brackets. *Am J Orthod Dentofac Orthop.* 2010;138(6):1–7.
- Buskes JA, Christoffersen J, Arends J. Lesion formation and lesion remineralization in enamel under constant composition conditions. A new technique with applications. *Caries Res.* 1985;19(6):490–6.
- Campos MIC, Campos CN, Aarestrup FM, Fraga MR, Vitral RWF. Estudo microscópico da prevenção da desmineralização do esmalte dentário durante tratamento ortodôntico utilizando selante de fósulas e fissuras. *Pesqui Bras Odontopediatria Clin Integr.* 2011;11(3):399–405.
- Chapman JA, Roberts WE, Eckert GJ, Kula KS, González-Cabezas C. Risk factors for incidence and severity of white spot lesions during treatment with fixed orthodontic appliances. *Am J Orthod Dentofac Orthop.* 2010;138(2):188–94.
- Corrêa-Afonso AM, Bachmann L, de Almeida CG, Dibb RGP, Borsatto MC. Loss of structural water and carbonate of Nd:YAG laser-irradiated human enamel. *Lasers Med Sci.* 2015;30(4):1183–7.
- Cunha SR, Garófalo SA, Scaramucci T, Zezell DM, Aranha ACC. The association between Nd:YAG laser and desensitizing dentifrices for the treatment of dentin hypersensitivity. *Lasers Med Sci.* 2017;32(4):873–80.
- Cury JA. Uso do flúor e controle da cárie como doença. In: Baratieiri LN, Monteiro Junior S, Andrada MAC, Vieira LCC, Ritter AV, Cardoso AC, editors. *Odontologia restauradora: fundamentos e possibilidades.* São Paulo: Santos; 2001. p. 33–68.
- Featherstone JDB. Prevention and reversal of dental caries: role of low level fluoride. *Community Dent Oral Epidemiol.* 1999;27(1):31–40.
- Feitosa F, Crastechini E, Esteves SRM, Silva T, Huhtala MFR, Gonçalves SE. Conventional and experimental treatments for pit and fissure sealing associated with ND:YAG laser. *Lasers Dent Sci.* 2017;1(1):33–40.

- Ferreira F, Barbosa I, Scelza P, Russano D, Neff J, Montagnana M, et al. A new method for the assessment of the surface topography of NiTi rotary instruments. *Int Endod J*. 2017;50(9):902–9.
- Ferreira FG, Nouer DF, Silva NP, Garbui IU, Correr-Sobrinho L, Nouer PRA. Qualitative and quantitative evaluation of human dental enamel after bracket debonding: a noncontact three-dimensional optical profilometry analysis. *Clin Oral Investig*. 2014;18(7):1853–64.
- Field J, Waterhouse P, German M. Quantifying and qualifying surface changes on dental hard tissues in vitro. *J Dent*. 2010;38(3):182–90.
- Fowler BO, Kuroda S. Changes in heated and in laser-irradiated human tooth enamel and their probable effects on solubility. *Calcif Tissue Int*. 1986;38(4):197–208.
- Göhring TN, Zehnder M, Sener B, Schmidlin PR. In vitro microleakage of adhesive-sealed dentin with lactic acid and saliva exposure: a radio-isotope analysis. *J Dent*. 2004;32(3):235–40.
- Hadler-Olsen S, Sandvik K, El-Agroudi MA, Ogaard B. The incidence of caries and white spot lesions in orthodontically treated adolescents with a comprehensive caries prophylactic regimen - A prospective study. *Eur J Orthod*. 2012;34(5):633–9.
- Hsu CYS, Jordan TH, Dederich DN, Wefel JS. Effects of low-energy CO₂ laser irradiation and the organic matrix on inhibition of enamel demineralization. *J Dent Res*. 2000;79(9):1725–30.
- João-Souza SH, Bezerra SJC, Borges AB, Aranha AC, Scaramucci T. Effect of sodium fluoride and stannous chloride associated with Nd:YAG laser irradiation on the progression of enamel erosion. *Lasers Med Sci*. 2015;30(9):2227–32.
- Josso B, Burton DR, Lalor MJ. Frequency normalised wavelet transform for surface roughness analysis and characterisation. *Wear*. 2002;252(5–6):491–500.
- Kantovitz KR, Pascon FM, Nociti FH, Tabchoury CPMH, Puppini-Rontani RM. Inhibition of enamel mineral loss by fissure sealant: an in situ study. *J Dent*. 2013;41(1):42–50.
- Korytnicki D, Mayer MPA, Daronch M, Singer JDM, Grande RHM. Effects of Nd:YAG laser on enamel microhardness and dental plaque composition: an in situ study. *Photomed Laser Surg*. 2006;24(1):59–63.
- Kuroda S, Fowler BO. Compositional, structural, and phase changes in in vitro laser-irradiated human tooth enamel. *Calcif Tissue Int*. 1984;36(1):361–9.
- Lussi A, Hellwig E, Klimek J. Fluorides – Mode of action and recommendations for use. *Schweiz Monatsschr Zahnmed*. 2012;122(122):1030–6.
- Øgaard. Prevalence of white spot lesions in 19-year-olds: a study on untreated and orthodontically treated persons 5 years after treatment. *Am J Orthod Dentofac Orthop*. 1989;96(5):423–5.

Paulos RS, Seino PY, Fukushima KA, Marques MM, de Almeida FCS, Ramalho KM, et al. Effect of Nd:YAG and CO₂ laser irradiation on prevention of enamel demineralization in orthodontics: *In Vitro* Study. *Photomed Laser Surg.* 2017;35(5):282–6.

Pereira LGS, Joao-Souza SH, Bezerra SJC, Borges AB, Aranha ACC, Scaramucci T. Erratum to: Nd:YAG laser irradiation associated with fluoridated gels containing photo absorbers in the prevention of enamel erosion. *Lasers Med Sci.* 2017;32(7):1453–9.

Queiroz CS, Hara AT, Paes Leme AF, Cury JA. pH-Cycling models to evaluate the effect of low fluoride dentifrice on enamel De- and remineralization. *Braz Dent J.* 2008;19(1):21–7.

Raucci Neto W, Lepri CP, Romano JJF, Fernandes FS, de Castro Raucci LMS, Bachmann L, et al. Chemical and morphological changes of primary teeth irradiated with Nd:YAG laser: an ex vivo long-term analysis. *Photomed Laser Surg.* 2015;33(5):266–73.

Sakae T. X-ray diffraction and thermal studies of I III. *Archs Oral Biol.* 1988;33(10):707–13.

Seino PY, Freitas PM, Marques MM, de Souza Almeida FC, Botta SB, Moreira MSNA. Influence of CO₂ (10.6 μm) and Nd:YAG laser irradiation on the prevention of enamel caries around orthodontic brackets. *Lasers Med Sci.* 2015;30(2):611–6.

Shahabi S, Fekrazad R, Johari M, Chiniforoush N, Rezaei Y. FT-Raman spectroscopic characterization of enamel surfaces irradiated with Nd:YAG and Er:YAG lasers. *J Dent Res Dent Clin Dent.* 2016;10(4):207–12.

Stangler LP, Romano FL, Umekita Shirozaki M, Galo R, Corrêa-Afonso AM, Borsatto MC, et al. Microhardness of enamel adjacent to orthodontic brackets after CO₂ laser irradiation and fluoride application. *Braz Dent J.* 2013;24(5):508–12.

Tavares JG, Eduardo C de P, Burnett LH, Boff TR, de Freitas PM. Argon and Nd:YAG lasers for caries prevention in enamel. *Photomed Laser Surg.* 2012;30(8):433–7.

Thylstrup A, Fejerskov O. Características clínicas e patológica da cárie dentária. In: Thylstrup A, Fejerskov O, editors. *Cariologia clínica.* 2. ed. São Paulo: Santos; 1995. p. 111–57.

Tsuda Y, Kitasako Y, SADR A, Nakashima S, Tagami J. Effects of brushing timing after erosive challenge on enamel loss in situ: white light interferometer and nanoindentation study. *Dent Mater J.* 2016;35(4):613–20.

Valério RA, da Cunha VS, Galo R, de Lima FA, Bachmann L, Corona SAM, et al. Influence of the Nd:YAG laser pulse duration on the temperature of primary enamel. *Sci World J.* 2015;2015:1–5.

Yassen GH, Platt JA, Hara AT. Bovine teeth as substitute for human teeth in dental research: a review of literature. *J Oral Sci.* 2011;53(3):273–82.

Zach L, Cohen G. Pulp response to externally applied heat. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1965;19(4):515–30.

ZeZell DM, Benetti C, Veloso MN, Castro PAA, Ana PA. FTIR spectroscopy revealing the effects of laser and ionizing radiation on biological hard tissues. *J Braz Chem Soc.* 2015;26(12):2571–82.

ZeZell DM, Boari HGD, Ana PA, Eduardo CDP, Powell GL. Nd:YAG laser in caries prevention: a clinical trial. *Lasers Surg Med.* 2009;41(1):31–5.

ANEXO – Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa.

CEUA - Comissão de Ética no
Uso de Animais

São José dos Campos, 24 de abril de 2018

Ofício nº 04/2018-CEUA-ICT-SJC-UNESP

O protocolo nº 03/2018, intitulado “**Avaliação da aplicação de diferentes parâmetros do laser de Nd:YAG, associados ou não à aplicação de um fotossensibilizador, sobre a superfície de esmalte na redução da desmineralização por cárie.**”, de sua responsabilidade tendo como orientador o Professor Doutor **Sergio Eduardo de Paiva Gonçalves**, não necessita ser analisado por esta CEUA, devido a pesquisa em tela não envolver a utilização de vertebrados e sim o uso de dentes bovinos, como substrato comercialmente disponível, de acordo com a Lei nº 11.794 de 08/10/2008 – Lei “Arouca

Atenciosamente

Profa.Dra. **PAULA CAROLINA KOMORI DE CARVALHO**
Coordenadora

MATEUS RODRIGUES SILVA
Discente do Mestrado - Área de Odontologia Restauradora
ICT-CSJC-UNESP

Av. Eng. Francisco José Longo, 777 – Jd. São Dimas
CEP 12201-970 – F. (12) 3947-9028 / 9307
Fax (12) 3947-9010 / guedes@fosjc.unesp.br/komori@fosjc.unesp.br