



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Heitor Hussni Casarin

**Efeito do laser de femtossegundo na paralisação de lesões iniciais de cárie em
esmalte**

Araraquara

2025



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Heitor Hussni Casarin

Efeito do laser de femtossegundo na paralisação de lesões iniciais de cárie em esmalte

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara para obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas, na Área de Dentística Restauradora

Orientadora: Profa. Dra. Michelle Alexandra Chinelatti

Araraquara

2025

C335e Casarin, Heitor
Efeito do laser de femtossegundo na paralisação de lesões
iniciais de cárie em / Heitor Casarin. -- Araraquara, 2025
49 p. : il., tabs., fotos

Dissertação (mestrado profissional) - Universidade Estadual
Paulista (UNESP), Faculdade de Odontologia, Araraquara
Orientadora: Michelle Chinelatti

1. Esmalte dentário. 2. Cárie dentária. 3. Flúor. 4. Lasers. I.
Título.

Heitor Hussni Casarin

Efeito do laser de femtossegundo na paralisação de lesões iniciais de cárie em esmalte

Comissão julgadora

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Ciências Odontológicas

Presidente e orientadora: Profa. Dra. Michelle Alexandra Chinelatti

2º Examinador: Profa. Dra. Luara Aline Pires

3º Examinador: Prof. Dr. William Marcatti Amaru Maximiano

Araraquara, 25 de Fevereiro de 2025.

DADOS CURRICULARES

Heitor Hussni Casarin

NASCIMENTO:07/04/1999 - São Carlos - São Paulo

FILIAÇÃO: Daibra Maria Hussni Casarin e Renê Luís Casarin

2023 – 2025 Mestrado em Ciências Odontológicas área de Dentística Restauradora.
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.

2018 - 2022 Graduação em Odontologia. Centro Universitário Central Paulista,
UNICEP, Brasil.

Com imensa gratidão, dedico esta dissertação a todos que, de alguma forma, contribuíram para que este momento fosse possível.

Aos meus pais, pelo apoio incondicional, por acreditarem em meu potencial mesmo nos momentos mais desafiadores, e por serem minha base sólida e fonte inesgotável de amor e motivação. Cada conquista minha é também de vocês, que sempre me inspiraram a seguir em frente e lutar pelos meus sonhos.

À minha namorada, expresso minha profunda gratidão pelo incentivo constante, pela paciência em compreender os desafios dessa caminhada e pelo amor e apoio inabaláveis que fizeram toda a diferença. Sua presença foi um alicerce essencial para que eu pudesse me dedicar a este trabalho com confiança e determinação.

Aos professores que tive ao longo desta jornada, agradeço pela partilha de conhecimento, pela orientação cuidadosa e pelo estímulo ao pensamento crítico. Em especial, à minha orientadora, meu mais sincero reconhecimento por sua sabedoria, dedicação e paciência em cada etapa deste processo. Seu exemplo como profissional e ser humano foi uma fonte de inspiração que levarei comigo para sempre.

Aos colegas de curso e amigos que estiveram ao meu lado, agradeço pela troca de ideias, pelos momentos de companheirismo e por tornarem esta jornada mais leve e significativa. Vocês tornaram os desafios mais suportáveis e as conquistas ainda mais gratificantes.

Por fim, dedico esta dissertação a todos que, direta ou indiretamente, me apoiaram ao longo desta trajetória, seja com palavras de incentivo, gestos de carinho ou por acreditarem no meu trabalho. Este momento é um reflexo das contribuições de cada um de vocês, e sou profundamente grato por terem feito parte dessa conquista.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar meus sinceros agradecimentos a todos que, de diferentes maneiras, contribuíram para a realização desta dissertação.

Primeiramente, agradeço a Deus, por me conceder força, sabedoria e perseverança ao longo desta caminhada. Sua presença em minha vida foi um guia constante, especialmente nos momentos mais desafiadores.

Aos meus pais e familiares, pela paciência, amor incondicional e por acreditarem em mim nos momentos de dúvida. Vocês foram meu porto seguro, sempre presentes com palavras de incentivo e gestos de carinho que me motivaram a seguir em frente. Sem o apoio de vocês, essa conquista não seria possível.

À minha namorada, Luísa, minha gratidão eterna por estar ao meu lado em cada passo dessa jornada. Seu apoio emocional, incentivo constante e compreensão durante os momentos mais difíceis foram fundamentais para que eu pudesse me dedicar a este projeto.

Em especial à minha orientadora, Michelle, expresso minha profunda gratidão pela orientação cuidadosa, pela dedicação incansável e por compartilhar seu conhecimento com generosidade. Suas valiosas orientações, paciência e confiança em meu trabalho foram pilares para o desenvolvimento desta pesquisa.

Ao pessoal do grupo de Óptica LioA do IFSC-USP, em especial à Fátima e ao Prof. Jarbas, agradeço por sempre estarem dispostos a ajudar e por disponibilizarem o Laser de femtosegundo para a realização deste estudo. Reconheço o quanto isso foi essencial para que os experimentos pudessem ser conduzidos. Agradeço, também, ao Diego, membro do laboratório, por sua colaboração prática, por me acompanhar durante as etapas de uso e aplicação do laser, e por sempre oferecer suporte técnico e camaradagem.

Ao Professor Gelson, registro minha profunda gratidão por ter me ensinado a utilizar o microdurômetro com paciência, atenção e solicitude. Sua disposição em compartilhar conhecimento técnico e sua prontidão em ajudar foram indispensáveis para o sucesso desta pesquisa.

Aos professores e colegas do programa de pós-graduação, agradeço pelo ambiente de troca intelectual, pelas discussões enriquecedoras e pela convivência que trouxe crescimento pessoal e profissional. Cada interação deixou uma marca positiva nessa trajetória.

Por fim, agradeço a todas as pessoas que, de alguma forma, contribuíram para que este trabalho se tornasse realidade. Cada colaboração, por menor que tenha parecido, foi essencial para que eu chegasse até aqui.

A todos vocês, o meu muito obrigado.

Casarin HH. Efeito do laser de femtosegundo na paralisação de lesões iniciais de cárie em esmalte [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2025.

RESUMO

Considerando a ausência de estudos empregando laser de femtosegundo para a paralisação de lesões iniciais de cárie em esmalte, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da irradiação do laser de femtosegundo com parâmetros sub-ablativos na remineralização e progressão de lesões de cárie inicial em esmalte. Fragmentos de incisivos bovinos (5x5mm) foram planejados, polidos e selecionados com base na média dos valores de microdureza superficial inicial do esmalte (n=72). Lesões iniciais de cárie foram desenvolvidas nas superfícies de esmalte dos espécimes. Posteriormente, os espécimes foram aleatoriamente divididos em 6 grupos de acordo com a aplicação de diferentes tratamentos (1. Laser femtosegundo; 2. Flúor Fosfato Acidulado; 3. Flúor Fosfato Acidulado + Laser femtosegundo; 4. Verniz fluoretado; 5. Verniz fluoretado + Laser femtosegundo; 6. Controle, sem tratamento) durante a simulação da progressão das lesões de cárie. A microdureza superficial final foi avaliada para calcular a porcentagem de variação de microdureza superficial. A seguir, cada fragmento foi seccionado longitudinalmente no centro da lesão de cárie para a avaliação da microdureza longitudinal nas seguintes distâncias a partir da superfície externa do esmalte: 10, 30, 50, 70, 90, 110 e 220 μm . Os dados de variação de microdureza superficial e de microdureza longitudinal do esmalte foram avaliados estatisticamente com nível de significância de 5% pela Análise de Variância a um fator e teste de Tukey para comparação múltipla das médias. Os resultados mostraram que o grupo controle (G6) apresentou a maior variação da perda de microdureza superficial do esmalte, com diferença estatística significativa ($p < 0,05$) em relação aos demais grupos. Os grupos G1, G4 e G5 mostraram as menores perdas de microdureza, sendo estatisticamente semelhantes entre si ($p > 0,05$) e diferentes dos demais ($p < 0,05$). Já os grupos G2 e G3 apresentaram resultados semelhantes entre si ($p > 0,05$), mas distintos em relação aos outros grupos ($p < 0,05$). Os resultados também mostraram que os grupos G1, G4 e G5 apresentaram maiores valores de microdureza longitudinal ($p < 0,05$) de 10 μm a 220 μm . O grupo G2 teve valores inferiores a G1, G4 e G5 até 90 μm ($p < 0,05$), mas foi semelhante a esses grupos em 110 μm e 220 μm ($p > 0,05$). O grupo G6 apresentou menores valores em 10 μm e 30 μm ($p < 0,05$). Já o grupo G3 foi semelhante a G2 em 10 μm e 30 μm ($p > 0,05$) e a G1 em 70 μm e 90 μm ($p > 0,05$). Pode-se concluir que, embora tenha sido observada uma desaceleração da desmineralização, nenhum dos tratamentos aplicados foi capaz de interromper ou reverter completamente as lesões iniciais de cárie no esmalte. No entanto, o uso do laser de femtosegundo, isolado ou em combinação com a aplicação tópica de verniz fluoretado, demonstrou o melhor desempenho ao reduzir a perda mineral em comparação ao grupo controle.

Palavras – chave: Esmalte dentário. Cárie dentária. Flúor. Lasers.

Casarin HH. Effect of femtosecond laser on paralyzing initial caries lesions on enamel [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2025.

ABSTRACT

Considering the lack of studies using femtosecond lasers to stop initial caries lesions in enamel, the aim of this study was to evaluate the effects of femtosecond laser irradiation with sub-ablative parameters on the remineralization and progression of initial caries lesions in enamel. Bovine incisor fragments (5x5mm) were planned, polished and selected based on the average initial enamel surface microhardness values (n=72). Initial caries lesions were developed on the enamel surfaces of the specimens. Subsequently, the specimens were randomly divided into 6 groups according to the application of different treatments (1. femtosecond laser; 2. acidulated phosphate fluoride; 3. acidulated phosphate fluoride + femtosecond laser; 4. fluoride varnish; 5. fluoride varnish + femtosecond laser; 6. control, no treatment) during the simulation of the progression of caries lesions. The final surface microhardness was evaluated to calculate the percentage of surface microhardness variation. Next, each fragment was sectioned longitudinally in the center of the caries lesion to evaluate the longitudinal microhardness at the following distances from the outer enamel surface: 10, 30, 50, 70, 90, 110 and 220 μm . The data on variation in surface microhardness and longitudinal microhardness of the enamel were statistically evaluated with a significance level of 5% by one-way Analysis of Variance and Tukey's test for multiple comparisons. The results showed that the variation in the loss of enamel surface microhardness (% ΔMS) indicates that the control group (G6) showed the greatest loss, with a statistically significant difference compared to the other groups ($p < 0.05$). Groups G1, G4 and G5 showed the lowest microhardness losses and were statistically similar to each other ($p > 0.05$) and different from the others ($p < 0.05$). On the other hand, groups G2 and G3 showed similar results ($p > 0.05$), but were different from the other groups ($p < 0.05$). The results also showed that groups G1, G4 and G5 had higher longitudinal microhardness values from 10 μm to 220 μm ($p < 0.05$). Group G2 had lower values than G1, G4 and G5 up to 90 μm ($p < 0.05$), but was similar to these groups at 110 μm and 220 μm ($p > 0.05$). Group G6 showed lower values at 10 μm and 30 μm ($p < 0.05$). Group G3 was similar to G2 at 10 μm and 30 μm ($p > 0.05$) and to G1 at 70 μm and 90 μm ($p > 0.05$). It may be concluded that although a slowdown in demineralization was observed, none of the treatments applied were able to completely stop or reverse the initial caries lesions in the enamel. However, the use of the femtosecond laser, alone or in combination with the topical application of fluoride varnish, showed the best performance in reducing mineral loss compared to the control group.

Keywords: Dental enamel. Dental caries. Fluorine. Lasers.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - PT Isomet 1000, Buehler (A); Corpo de prova com a raiz Seccionada (B); Bloco 5x5mm (C)	18
Figura 2 - Forma de Silicone para embutimento do espécime	18
Figura 3 - Politriz Metalográfica (A); Lixas usadas para Acabamento (B).....	19
Figura 4 - Etapa de Análise de Microdureza superficial inicial (A); Espécime pronto para análise (B); Esquema de análise de microdureza superficial (C)	20
Figura 5 - Ácido Lático (A); Saliva Artificial (B); Gel de Metilcelulose (C)	21
Figura 6 - Grupos Prontos para formação inicial de lesão de Cárie	22
Figura 7 - Laser de Femtosegundo (A e B).....	23
Figura 8 - Amostra sendo irradiada pelo Laser de Femtosegundo	24
Figura 9 - Amostra Grupo 2.....	24
Figura 10 -Amostra Grupo 4.....	25
Figura 11 - Amostra Grupo 6.....	26
Figura 12 - Grupos Prontos para os ciclos de desmineralização ..	27
Figura 13 - Esquema de análise de microdureza superficial	27
Figura 14 - Secção longitudinal das amostras.....	28
Figura 15 - Gráfico representativo da perda de microdureza superficial do esmalte de acordo com os tratamentos empregados.....	31
Figura 16 - Gráfico representativo da variação da microdureza do esmalte nas diferentes profundidades de acordo com os tratamentos empregados.....	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Médias e desvios-padrão (\pm) dos valores de microdureza inicial e final do esmalte e da porcentagem de variação de microdureza superficial superficial do esmalte em função dos Tratamentos..... 30

Tabela 2 - Médias e desvios-padrão (\pm) dos valores de microdureza longitudinal do esmalte em função dos tratamentos e das profundidades 31

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 PROPOSIÇÃO.....	14
3 REVISÃO DA LITERATURA	15
3.1 Lesão de Cárie Inicial.....	15
3.2 Metodologias Preventivas	15
3.2.1 Fluoretos e vernizes.....	15
3.2.2 Uso de lasers.....	16
3.2.3 Laser de femtosegundo.....	16
4 MATERIAL E MÉTODO	17
4.1 Delineamento Experimental.....	17
4.2 Preparação e Seleção dos Espécimes.....	17
4.3 Análise da Microdureza Superficial Inicial do Esmalte.....	19
4.4 Formação das Lesões Iniciais de Cárie.....	21
4.5 Tratamentos do Esmalte.....	22
4.6 Ciclos Desmineralizantes.....	26
4.7 Análise da Microdureza Superficial Final do Esmalte	27
4.8 Análise da Microdureza Longitudinal do Esmalte.....	28
4.9 Análise Estatística.....	29
5 RESULTADOS	30
5.1 Variação da Microdureza Superficial do Esmalte (%ΔMS).....	30
5.2 Microdureza Longitudinal do Esmalte.....	30
6 DISCUSSÃO	32
7 CONCLUSÃO	38
REFERÊNCIAS	40

1 INTRODUÇÃO

A lesão de cárie inicial no esmalte dental pode ser definida, de maneira bem resumida, como a dissolução da hidroxiapatita da região subsuperficial deste tecido¹. O equilíbrio do processo de desmineralização e remineralização sofrido constantemente pelo esmalte está diretamente relacionado aos níveis de pH de sua superfície, e esse depende das condições dos íons cálcio e fosfato presentes na saliva e no fluido do biofilme dental^{1, 2}. Tais desmineralizações, quando tratadas precocemente, podem regredir sem causar nenhum prejuízo à estrutura dental³.

A aplicação tópica de flúor em diferentes formas tem se mostrado eficaz em inibir a desmineralização e favorecer a remineralização⁴. A maioria dos tratamentos é realizada apenas com aplicação tópica de flúor por alguns minutos, que representa a disponibilidade mínima de elementos químicos na hidroxiapatita⁵, o que pode ser um fator limitante. Dessa forma, há evidências na literatura sobre as características superficiais da remineralização pelo flúor^{6, 7, 8}, nas quais lesões não cavitadas ainda são clinicamente e radiograficamente visíveis⁹.

Os vernizes fluoretados também são uma opção preventiva para remineralizar as lesões iniciais de cárie, pois permitem a deposição e incorporação de íons flúor ao esmalte desmineralizado^{8, 10, 11}, são fáceis de aplicar, bem tolerados e ainda permanecem aderidos por longo período de tempo¹².

Frente à dificuldade de controlar os processos de desmineralização do esmalte dental, novas tecnologias vêm sendo estudadas, como o emprego da irradiação com lasers de alta intensidade. Lasers de alta intensidade têm sido utilizados no esmalte dental com parâmetros subablativos para a prevenção e paralisação de lesões de cárie¹³. A irradiação do esmalte dental com os lasers de CO₂, Er,Cr:YSGG, Er:YAG e Nd:YAG, quando empregados com finalidade preventiva, modifica a morfologia e as propriedades físicas do esmalte incluindo fusão, recristalização e derretimento dos cristais de hidroxiapatita^{14, 15, 16, 17}. O objetivo de modificar a estrutura química e cristalina do esmalte é favorecer a estabilização dos íons cálcio e fosfato por meio da redução significativa do conteúdo de material orgânico intercrystalino, água e carbonato, substância que confere maior solubilidade à hidroxiapatita, aumentando a resistência do tecido à desmineralização¹⁸. Além disso, a irradiação com laser após a aplicação de flúor é

capaz de favorecer a deposição de flúor recém-formado na superfície do esmalte^{13, 19, 20}.

Os lasers de alta intensidade podem ser empregados no modo contínuo ou pulsado. Ambos os modos são capazes de inibir a formação de cárie, sendo o modo contínuo menos utilizado, pois oferece maiores riscos para o uso in vivo pelo aumento de temperatura na superfície e maior propagação para o interior do tecido dental, diferentemente do modo pulsado que permite que haja um relaxamento térmico entre um pulso e outro, diminuindo a propagação de calor para as camadas internas do tecido²¹. No entanto, a irradiação no modo pulsado convencional com duração de pulsos curtos gera uma forte onda de choque térmico, podendo acarretar danos às superfícies dos tecidos dentais, tais como rachaduras e fissuras²¹. Consequentemente, os efeitos positivos da irradiação na resistência ácida do esmalte seriam diminuídos, pois a presença de rachaduras e fissuras tornaria o tecido mais suscetível à difusão de microrganismos e ácidos presentes no fluido do biofilme dental²¹.

Nos últimos anos, o desenvolvimento de lasers de pulsos ultra-curtos, como o laser de femtosegundo, tem resultado em um interesse crescente em aplicações odontológicas devido à sua capacidade de ablação precisa e eficaz e ausência de dano colateral ao tecido proveniente de ondas de choque térmico²². Como a duração de pulso de um laser de femtosegundo é menor do que o tempo de relaxamento térmico dos tecidos, dentina ou esmalte são ionizados antes que a difusão térmica ocorra, restringindo a geração de efeitos térmicos²³.

Recentemente, demonstrou-se que a irradiação do esmalte dental com laser de femtosegundo utilizando parâmetros subablativos promoveu uma redução significativa do conteúdo de carbonato e da razão carbonato/fosfato, sem alterar a estrutura e a morfologia do tecido dental²⁴. A redução dos níveis de carbonato está associada a menor solubilidade e maior resistência ao ataque ácido produzido pelo processo de formação da cárie²⁵. Porém, estudos são necessários para avaliar se as alterações no conteúdo de carbonato e fosfato do esmalte após a aplicação do laser de femtossegundo são suficientes para promover alterações na solubilidade do esmalte diante de desafios cariogênicos.

Entretanto, até o momento, não existem estudos relatando a utilização de laser de femtosegundo para a paralisação de lesões iniciais de cárie no esmalte dental, assim como no controle da progressão destas lesões. Desta forma, torna-se

necessária a realização de estudos que busquem a comprovação da efetividade da ação do laser de femtosegundo na remineralização do esmalte dental frente aos métodos convencionais de aplicação tópica de flúor.

2 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da irradiação do laser de femtosegundo com parâmetros subablativos, associado ou não aos métodos tradicionais de aplicação tópica de flúor, na paralisação e progressão de lesões de cárie inicial em esmalte.

3 REVISÃO DA LITERATURA

Nesta seção, serão abordados tópicos relevantes para o melhor entendimento da metodologia, aplicada durante o estudo.

3.1 Lesão de Cárie Inicial

Pode-se simplificar a definição de lesão de cárie inicial no esmalte dental como a dissolução da hidroxiapatita da região subsuperficial do esmalte. O processo de desmineralização e remineralização que o esmalte dentário sofre, está diretamente ligado às alterações de nível de pH (tal nível está relacionado a condições dos íons cálcio e fosfato presentes na saliva e no fluido do biofilme)^{1,2}

3.2 Metodologias Preventivas

Ao longo dos anos, variados tratamentos foram propostos para o manejo de lesões de cárie iniciais. Podemos citar aplicação de fluoretos, produtos à base de cálcio e fosfato, e técnicas como a microabrasão e estudo com a aplicação de lasers, buscando alteração estrutural do esmalte e por sua vez aumento de resistência frente à dissolução causada pelos agentes causadores da cárie.

Novas metodologias e técnicas vêm sendo exploradas, buscando reduzir a perda mineral, remineralizando as lesões iniciais pensando na manutenção da integridade estrutural, tudo isso tendo em vista o ideal de odontologia minimamente invasiva.

3.2.1 Fluoretos e vernizes

Estudos demonstram que a o uso tópico de flúor em diferentes formas têm se mostrado eficaz quando buscamos diminuir o processo de desmineralização e potencializar a remineralização^{3,4}.

Outra opção são os vernizes fluoretados, de fácil aplicação e de longa duração de adesão, usados de maneira preventiva buscando remineralizar as lesões iniciais de cárie, por meio da deposição e incorporação de íons flúor ao esmalte desmineralizado^{8,10,11}.

3.2.2 Uso de lasers

Lasers de alta intensidade têm sido empregados com parâmetros subablativos e aplicados sobre a estrutura do esmalte dental, buscando prevenir e paralisar de lesões de cárie¹³.

Podem-se citar os lasers de CO₂, Er,Cr:YSGG, Er:YAG e Nd:YAG, que quando aplicados, modificam não só morfologicamente, mas também as propriedades físicas do esmalte incluindo ponto fusão, recristalização e derretimento dos cristais de hidroxiapatita^{14,15,16,17}, de modo a estabilizar os íons cálcio e fosfato por meio da redução significativa do conteúdo de material orgânico intercrystalino, água e carbonato, substância que confere maior solubilidade à hidroxiapatita, o que por sua vez eleva resistência do tecido à desmineralização¹⁸.

Vale mencionar que além das alterações citadas, a irradiação com laser após a aplicação de flúor favorece a deposição de flúor recém-formado na superfície do esmalte^{13,19,20}.

3.2.3 Laser de Femtosegundo

Recentemente, e com o desenvolvimento de lasers de pulsos ultra-curtos (causa um tempo menor de relaxamento térmico dos tecidos, dentina ou esmalte diminuindo a geração de efeitos térmicos), como o laser de femtosegundo, tem ganhado destaque na odontologia, uma vez que ele apresenta uma ablação precisa e eficaz e ausência de dano colateral ao tecido proveniente de ondas de choque térmico, quando comparado aos outros lasers²².

Em estudos mais recentes, demonstrou-se que a irradiação do esmalte dental com laser de femtosegundo utilizando parâmetros subablativos promoveu uma redução significativa do conteúdo de carbonato (associado a menor solubilidade e maior resistência ao ataque ácido produzido durante a formação da lesão de cárie) e da razão carbonato/fosfato, sem alterar a estrutura e a morfologia do tecido dental²⁴.

4 MATERIAL E MÉTODO

Nesta seção, serão abordados os materiais e a metodologia usada durante o estudo.

4.1 Delineamento Experimental

O projeto consistiu em um estudo in vitro, no qual o fator em estudo foi o Tratamento do Esmalte em 6 níveis (1. Laser femtosegundo; 2. Flúor Fosfato Acidulado; 3. Flúor Fosfato Acidulado + Laser femtosegundo; 4. Verniz fluoretado; 5. Verniz fluoretado + Laser femtosegundo; 6. Controle, sem tratamento).

O cálculo do tamanho amostral foi realizado utilizando o programa G* Power 3.1.7 para Windows (Heinrich-Heine-Universität Dusseldorf, Dusseldorf, Alemanha) para conduzir uma análise de variância (ANOVA) de um fator para seis grupos. Com base nos resultados do estudo piloto, o tamanho do efeito (f) foi calculado como 0,65, com a probabilidade de erro alfa definida em 0,05 e poder em 0,80. O tamanho mínimo da amostra de 12 unidades experimentais por grupo foi considerado adequadamente representativo. Sendo assim, a amostra do estudo foi composta por 72 fragmentos de esmalte bovino, divididos aleatoriamente entre os grupos experimentais ($n=12$). As variáveis de resposta quantitativas foram: microdureza Knoop de superfície (kg/mm^2) e microdureza Knoop longitudinal (kg/mm^2).

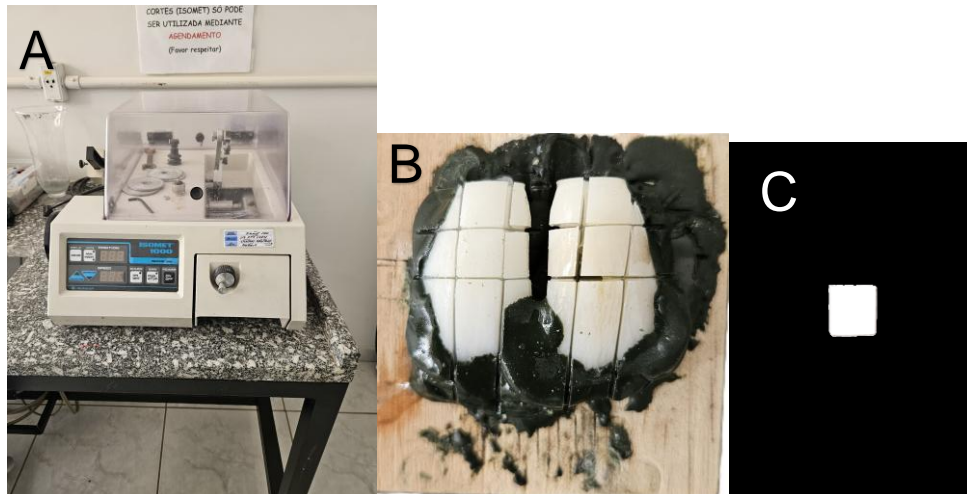
4.2 Preparação e Seleção dos Espécimes

Para a realização deste trabalho, foram utilizados incisivos bovinos hígidos recém-extraídos, provenientes de um único frigorífico (Frigorífico Mondelli, Bauru – SP), mantidos em solução de timol 0,1% à temperatura de 4°C. Os dentes foram limpos com o auxílio de pasta de pedra-pomes e água, usando escovas de Robinson, e examinados em estéreo-microscópio com aumento de 40X (PT Leica S6 D Stereozoom), descartando-se aqueles com trincas ou anomalias de estrutura.

Para a preparação dos espécimes, inicialmente os incisivos centrais tiveram suas coroas e raízes separadas por meio de uma secção localizada a 1 mm abaixo da junção amelocementária com um disco flexível diamantado montado em cortadeira elétrica de precisão (PT Isomet 1000, Buehler) (Figura 1- A). As coroas

dentais foram seccionadas nos sentidos méso-distal e vestibulo-lingual (Figura 1- B), de modo a serem obtidos blocos retangulares com dimensões de 5 x 5 mm (Figura 1- C).

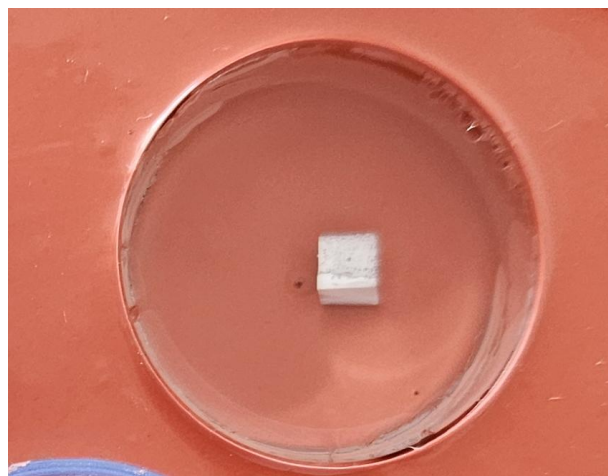
Figura 1 - PT Isomet 1000, Buehler (A); Corpo de prova com a raiz seccionada (B); Bloco 5x5mm (C)



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Os blocos foram embutidos em resina de poliéter com as superfícies de esmalte voltadas para cima (Figura 2).

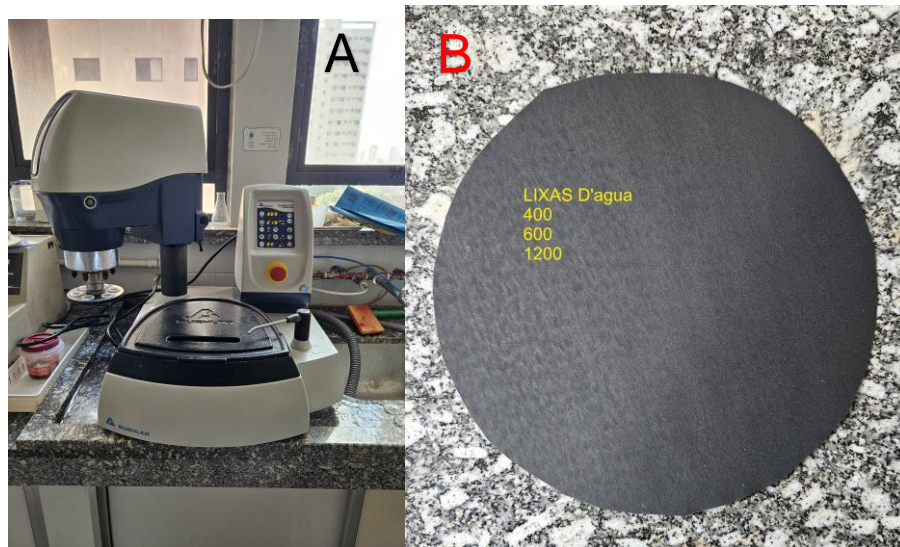
Figura 2 - Forma de Silicone para embutimento do espécime



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

As superfícies de esmalte dos blocos foram polidas e planificadas em politriz metalográfica refrigerada à água (Figura 3- A), utilizando em seguida discos de lixa d'água (granulações 400, 600 e 1200) (Figura 3- B) e discos de feltro com pastas de diamante. Os espécimes assim preparados foram mantidos em um recipiente tampado contendo água destilada e desmineralizada, em refrigerador, até o momento das análises.

Figura 3 - Politriz Metalográfica (A); Lixas usadas para acabamento (B)



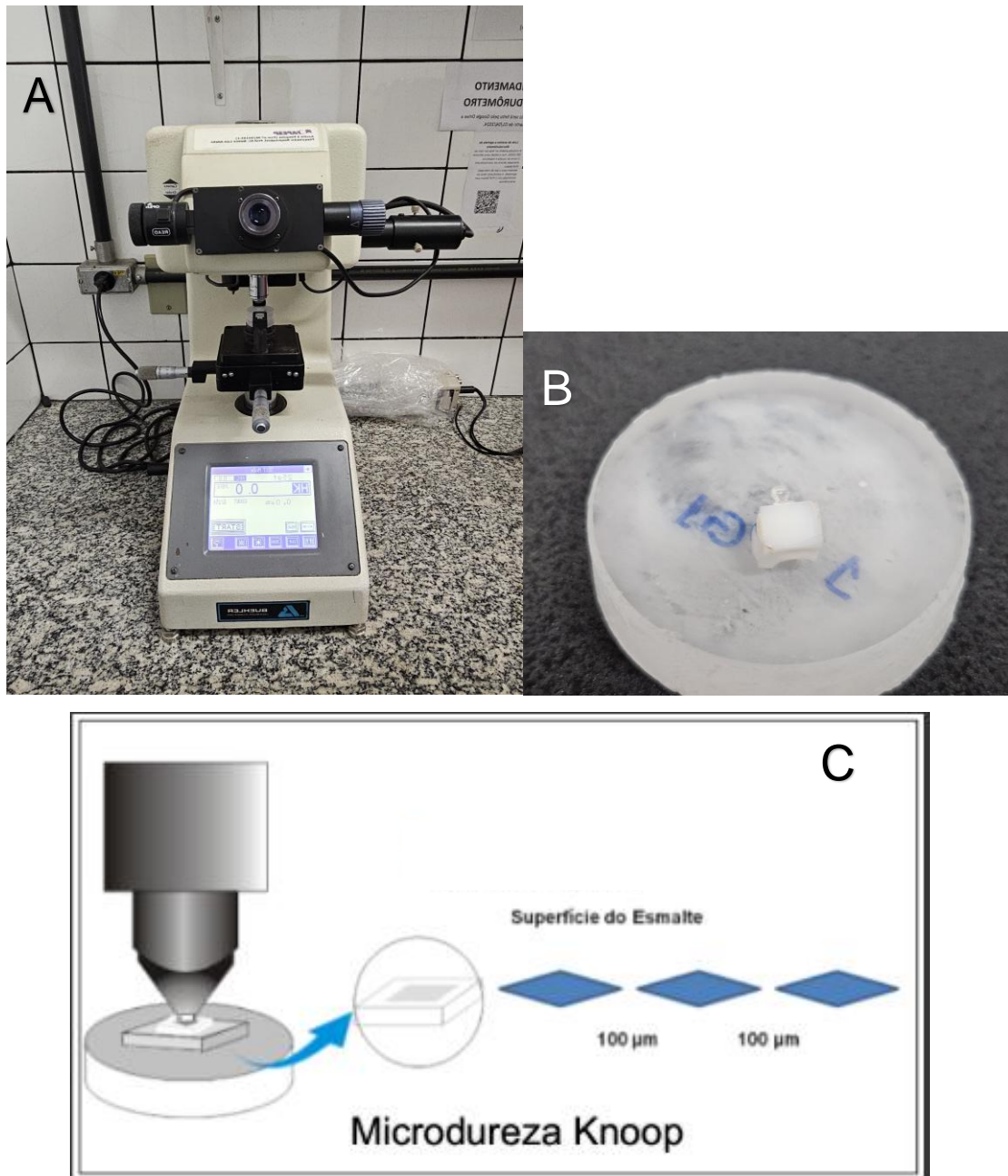
Fonte: Arquivo pessoal do autor.

A padronização amostral das superfícies de esmalte a serem estudadas foi baseada na análise de microdureza inicial, sendo selecionados 72 espécimes que apresentaram valores em torno da média, com variação de mais ou menos 10%.

4.3 Análise da Microdureza Superficial Inicial do Esmalte

Para o teste de microdureza inicial, foram realizadas na superfície de esmalte três marcações equidistantes de 100 μm em linha horizontal, utilizando microdurômetro 1600-6300 (Buehler, Lake Bluff, Illinois, EUA) (Figura 4- A) com penetrador para microdureza Knoop (KHN) e célula de carga de 25 gramas durante 10 segundos. A média das três marcações foi utilizada como o valor inicial de microdureza superficial do espécime (MS inicial) (Figura 4- C).

Figura 4 - Etapa de Análise de Microdureza superficial inicial (A); Espécime pronto para análise (B); Esquema de análise de microdureza superficial (C)

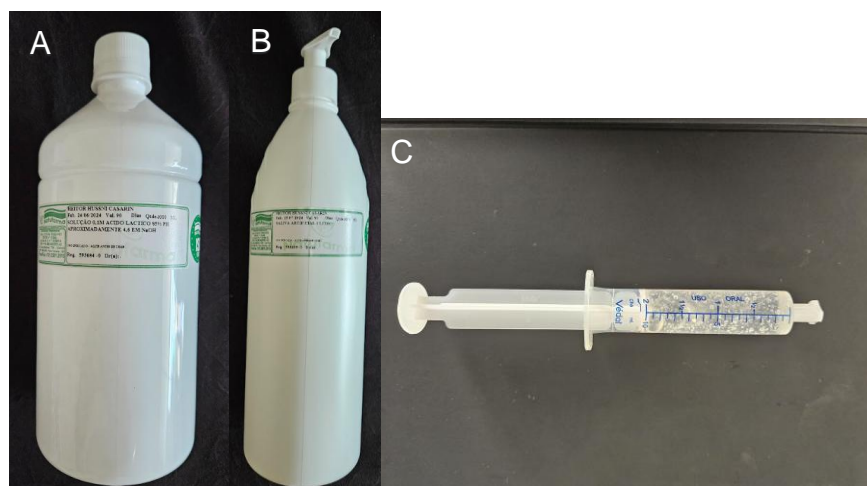


Fonte: Arquivo pessoal do autor.

4.4 Formação das Lesões Iniciais de Cárie

Para a indução de cárie em esmalte, os espécimes foram cobertos com 0,5 cm de gel de metilcelulose de viscosidade média (NATUFARMA, Porto Ferreira- SP), o qual foi deixado na geladeira durante 12 horas para chegar à temperatura de 4°C e adquirir maior viscosidade (Figura 5- A). Em seguida, os espécimes foram cobertos com solução 0,1 M de ácido láctico (Ácido Láctico 85%, 1 Kg), previamente preparada com seu pH ajustado para 4,6 com NaOH e agente bacteriostático azida de sódio (NATUFARMA, Porto Ferreira- SP) (Figura 5- B). Os recipientes foram selados e colocados em incubadora a 37°C durante 10 dias (Figura 6). O gel teve a finalidade de reduzir a velocidade de difusão do ácido e manter os íons perdidos pelo dente próximos à sua superfície, permitindo a precipitação superficial e a produção da lesão de subsuperfície. Após o período de desmineralização, o gel foi removido da superfície dos espécimes, que foram lavados abundantemente com água destilada e armazenados em saliva artificial (NATUFARMA, Porto Ferreira- SP) (Figura 5- C) por 24 horas a 37°C.

Figura 5 - Ácido Láctico (A); Saliva Artificial (B); Gel de Metilcelulose (C)



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Figura 6 - Grupos Prontos para formação inicial de lesão de Cárie



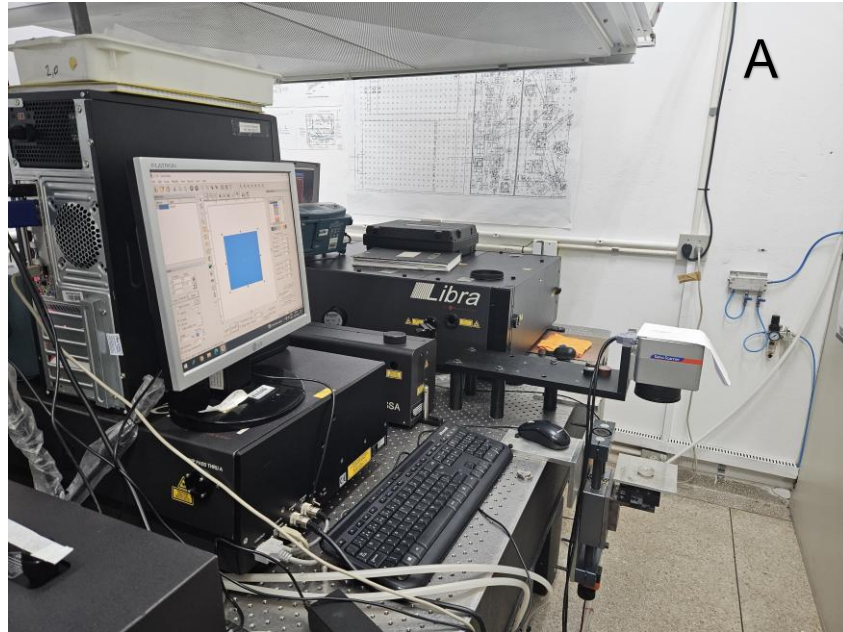
Fonte: Arquivo pessoal do autor.

4.5 Tratamentos do esmalte

Após a formação das lesões iniciais de cárie, os espécimes foram distribuídos aleatoriamente em 6 grupos (n=10) de acordo com o tratamento realizado nas superfícies de esmalte, a seguir:

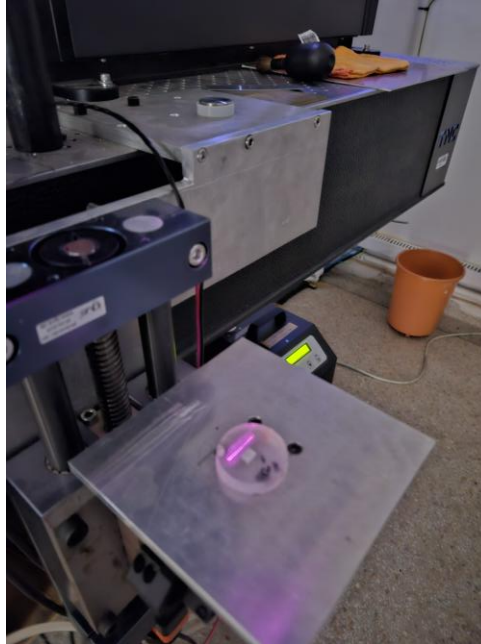
Grupo 1: Laser de femtosegundo: a irradiação foi realizada com o sistema laser Ti (Libra S, Coherente) (Figura 7- A e B), pulsado no regime de femtosegundos (aproximadamente 70 fs), com comprimento de onda de 801 nm, operando a uma taxa de repetição de pulso constante de 1 kHz no modo focalizado (distância focal de 20 cm). A superfície de esmalte do espécime foi posicionada perpendicularmente ao feixe de laser e irradiada com potência de 1 W, energia de pulso de 1 mJ e tempo de exposição de 15 segundos (Casarin et al., 2021).

Figura 7 - Laser de Femtosegundo (A e B)



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Figura 8 - Amostra sendo irradiada pelo Laser de Femtosegundo



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Grupo 2: Flúor fosfato acidulado (FFA): o gel de flúor fosfato acidulado a 1,23% (Flúor-Gel®, Dentsply) foi aplicado sobre as superfícies de esmalte dos espécimes por 4 minutos (Figura 9), seguindo as recomendações do fabricante, e então foi removido cuidadosamente com papel absorvente. Em seguida, as superfícies foram enxaguadas com água destilada e deionizada por 30 segundos e secas com papel absorvente.

Figura 9 - Amostra Grupo 2

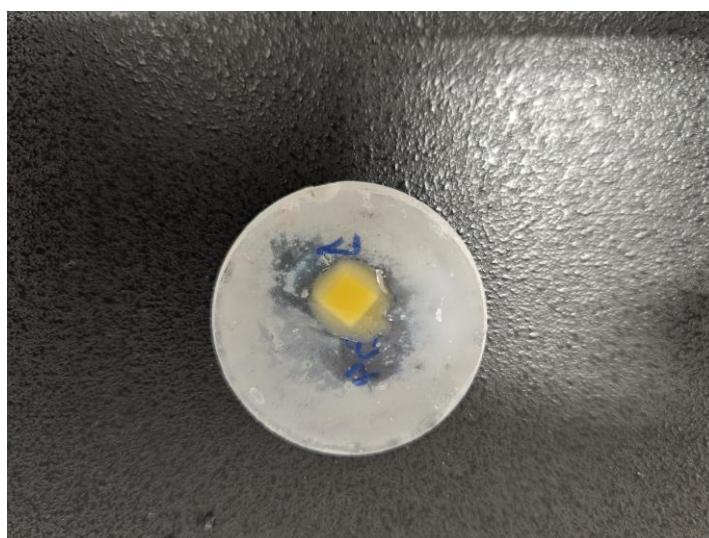


Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Grupo 3: FFA + Laser: os espécimes receberam a aplicação do gel de flúor fosfato acidulado a 1,23% conforme descrito e, em seguida, foram irradiados com o laser de femtosegundo, como anteriormente.

Grupo 4: Verniz fluoretado: as superfícies de esmalte dos espécimes receberam a aplicação do verniz de fluoreto de sódio a 5% (Duraphat®, Colgate-Palmolive) com microbrush por 1 minuto (Figura 10). Em seguida, os espécimes foram armazenados em saliva artificial e o verniz foi removido cuidadosamente após 6 horas usando lâmina cirúrgica¹². O tempo de ação foi de 6 horas para padronizar o tempo de exposição do esmalte desmineralizado aos diferentes tratamentos.

Figura 10 - Amostra Grupo 4

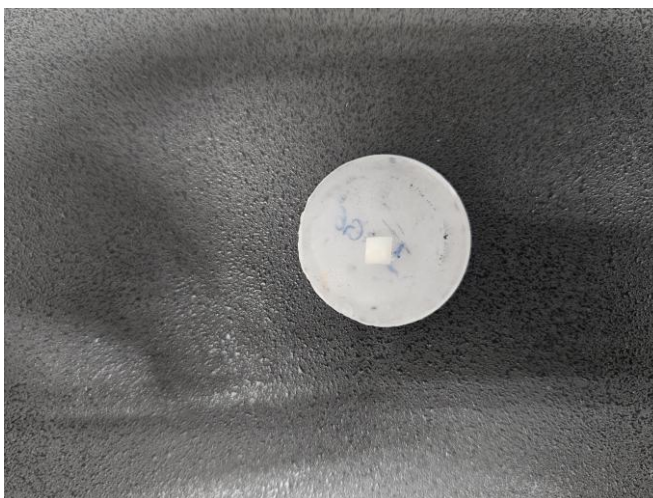


Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Grupo 5: Verniz fluoretado + Laser: as superfícies de esmalte dos espécimes receberam a aplicação do verniz de fluoreto de sódio a 5% (Duraphat®, Colgate) com microbrush por 1 minuto e, em seguida, foram irradiadas com o laser de femtosegundo, como descrito anteriormente. Em seguida, os espécimes foram armazenados em saliva artificial e o verniz foi removido cuidadosamente após 6 horas usando lâmina cirúrgica.

Grupo 6: Controle: nenhum tratamento - os espécimes foram mantidos em saliva artificial (Figura 11).

Figura 11 - Amostra Grupo 6



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Após a realização dos respectivos tratamentos, os espécimes foram armazenados em saliva artificial por 24 horas a 37°C.

4.6 Ciclos Desmineralizantes

Foram iniciados novos ciclos desmineralizantes para simular a progressão da lesão de cárie, seguindo o mesmo protocolo descrito para a formação da lesão de cárie inicial. Durante a realização dos ciclos, os tratamentos do esmalte foram repetidos 3 vezes, com intervalos de 10 dias. Os ciclos desmineralizantes foram realizados entre os períodos de tratamentos.

Figura 12 - Grupos prontos para os ciclos de desmineralização

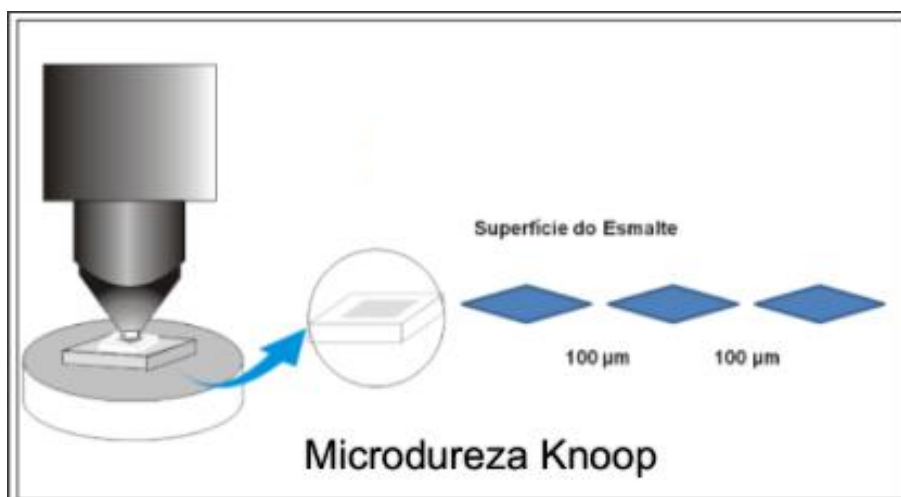


Fonte: Arquivo pessoal do autor.

4.7 Análise da Microdureza Superficial Final do Esmalte

Após os ciclos desmineralizantes e novos tratamentos do esmalte, seguindo o mesmo protocolo descrito para a análise da microdureza superficial inicial (3 marcações equidistantes 100 μm ; carga: 25 g; tempo: 10 s) (Figura 13). A microdureza superficial final (MS final) foi avaliada em todas as superfícies de esmalte dos espécimes para calcular a porcentagem de variação da microdureza superficial: $\% \Delta \text{MS} = [(\text{MS final} - \text{MS inicial}) / \text{MS inicial}] \times 100$.

Figura 13 - Esquema de análise de microdureza superficial final



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

4.8 Análise da Microdureza Longitudinal do Esmalte

Primeiramente, cada espécime foi seccionado longitudinalmente no centro, utilizando um disco flexível diamantado montado em cortadeira elétrica de precisão com irrigação.

As metades destinadas ao teste de microdureza longitudinal (Figura 14) tiveram as superfícies transversais polidas em politriz metalográfica refrigerada à água com lixas d'água de granulação 600 e 1200 e feltro com pasta de alumina de 1 μm (Buehler). A microdureza longitudinal foi realizada nas seguintes distâncias a partir da superfície externa do esmalte: 10, 30, 50, 70, 90, 110 e 220 μm . Em cada distância foram realizadas duas marcações, sendo calculada a média da microdureza.

Figura 14 - Secção longitudinal das amostras



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

4.9 Análise Estatística

Os dados da variação da microdureza superficial e da microdureza longitudinal do esmalte foram analisados seguindo os Conceitos da Estatística Clássica, utilizando-se o software Jamovi® (Projeto jamovi 2023. Versão 2.3; Computer Software, Sydney, Australia. Obtido em <https://www.jamovi.org>). Todas as análises foram realizadas com nível de significância de 5%. A verificação dos pressupostos de normalidade foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilk e a observância de homogeneidade dos dados foi realizada por meio dos testes de Levene. A avaliação quantitativa dos dados foi realizada pela Análise de Variância a um fator e posteriormente pelo teste de Tukey para comparação múltipla das médias.

5 RESULTADOS

Nesta seção, serão abordados os resultados obtidos durante o estudo.

5.1 Variação da Microdureza Superficial do Esmalte (% Δ MS)

A Tabela 1 apresenta as médias e desvios-padrão da variação da perda de microdureza superficial (% Δ MS) entre os grupos após os tratamentos.

Percebe-se que o grupo controle (G6) apresentou os maiores valores de perda de microdureza superficial, apresentando uma diferença estatística ($p < 0,05$) quando comparado aos demais grupos.

Nota-se que os grupos com menores valores perda de microdureza superficial de esmalte foram G1, G4 e G5, sendo estatisticamente semelhantes entre si ($p > 0,05$) e diferentes ($p < 0,05$) dos demais grupos.

Por fim, pode-se observar que grupos G2 e G3, apresentaram valores estatisticamente semelhantes entre si ($p > 0,05$), porém apresentaram distinção em relação aos demais grupos ($p < 0,05$).

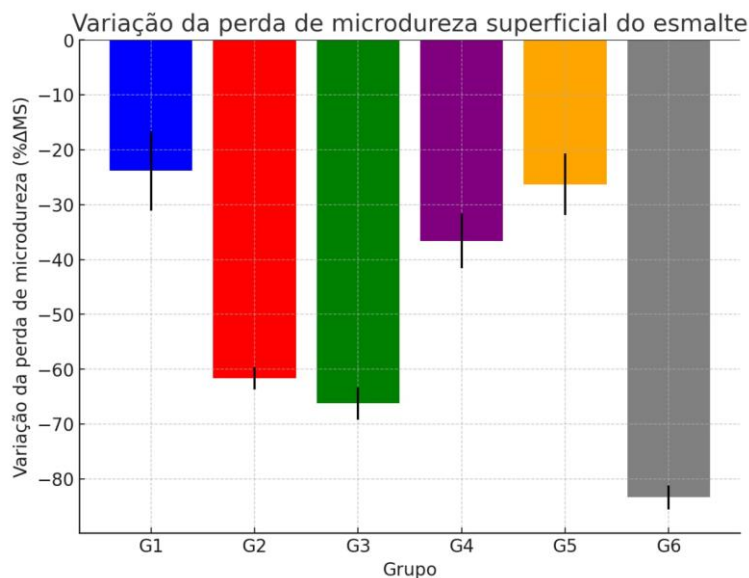
Tabela 1 - Médias e desvios-padrão (\pm) dos valores de microdureza superficial inicial e final do esmalte e da porcentagem de variação de microdureza superficial em função dos tratamentos

	G1	G2	G3	G4	G5	G6
Microdureza superficial inicial	342,1 \pm 2,5	344,1 \pm 4,1	341,1 \pm 3,25	352,5 \pm 2,6	334,2 \pm 5,6	336,5 \pm 2,9
Microdureza superficial final	260,6 \pm 11,9	132,1 \pm 5,4	115,1 \pm 2,7	223,25 \pm 7,3	246,3 \pm 5,6	56,0 \pm 1,5
% Δ MS	-23,8 \pm 7,2 A	-61,6 \pm 2,0 B	-66,2 \pm 2,9 B	-36,6 \pm 4,9 A	-26,3 \pm 5,6 A	-83,3 \pm 2,2 C

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

Fonte: Elaboração própria.

Figura 15 - Gráfico representativo da perda de microdureza superficial do esmalte de acordo com os tratamentos empregados



Fonte: Elaboração própria.

5.2 Microdureza Longitudinal do Esmalte

A Tabela 2 apresenta as médias e desvios-padrão da microdureza longitudinal em diferentes profundidades para cada grupo.

Nas profundidades de 10 μm a 220 μm , os grupos G1, G4 e G5 apresentaram maiores valores de microdureza, sendo estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) dos demais grupos.

Para o grupo G2, nota-se que este apresentou valores inferiores aos grupos G1, G4 e G5 ($p < 0,05$) até a profundidade de 90 μm , apresentando valores estatisticamente semelhantes a estes grupos ($p > 0,05$) nas profundidades 110 μm e 220 μm .

Percebe-se que o grupo G6 apresenta valores de microdureza menores nas profundidades 10 μm e 30 μm , sendo estatisticamente diferente ($p < 0,05$) dos demais grupos.

O grupo G3 apresentou valor estatisticamente semelhante ($p > 0,05$) ao grupo G2 na profundidade de 10 μm e 30 μm , mas foi estatisticamente semelhante G1 em profundidades maiores como em 70 μm , 90 μm ($p > 0,05$).

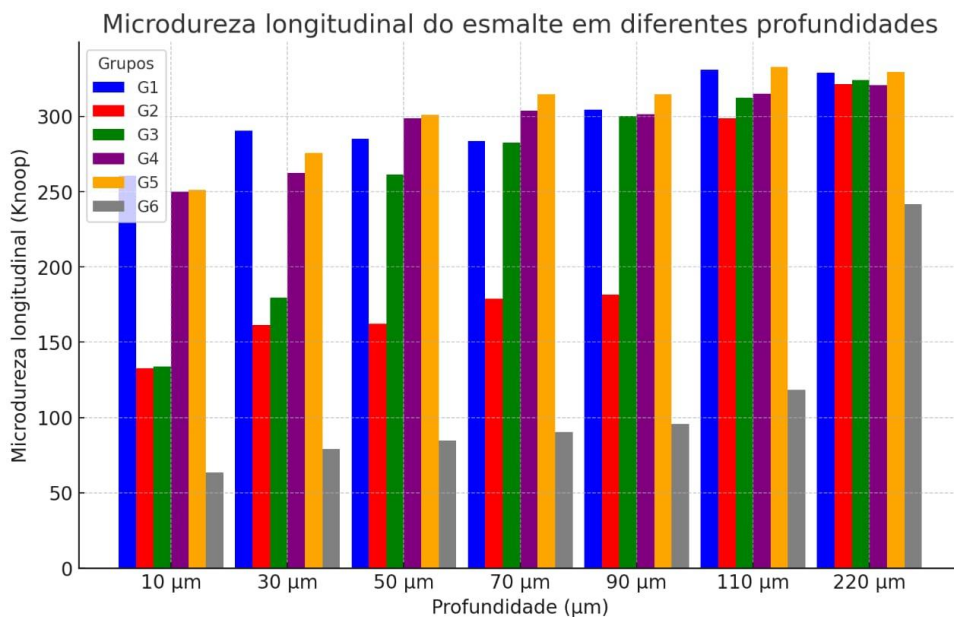
Tabela 2 - Médias e desvios-padrão (\pm) dos valores de microdureza longitudinal do esmalte em função dos tratamentos e das profundidades

	G1	G2	G3	G4	G5	G6
10 μm	260,6 \pm 11,6 A,a	132,9 \pm 3,2 B,a	133,9 \pm 2,7 B,a	250,0 \pm 8,9 A,a	251,0 \pm 3,3 A,a	63,6 \pm 1,5 C,a
30 μm	290,5 \pm 2,9 A,b	161,7 \pm 7,5 B,b	179,7 \pm 3,3 B,b	262,5 \pm 2,4 A,a	275,7 \pm 3,2 A,b	78,9 \pm 5,5 C,b
50 μm	285,0 \pm 11,9 A,b	162,1 \pm 8,6 B,b	261,5 \pm 2,9 A,c	298,6 \pm 2,6 A,b	301,2 \pm 5,0 A,c	84,7 \pm 2,3 C,b
70 μm	283,4 \pm 11,7 A,b	179,0 \pm 5,6 B,b	282,4 \pm 5,5 A,c	303,7 \pm 3,4 A,b	314,7 \pm 2,1 A,d	90,5 \pm 2,6 C,b
90 μm	304,6 \pm 6,6 A,b	181,6 \pm 2,9 B,b	300,4 \pm 6,9 A,c	301,3 \pm 3,1 A,b	314,6 \pm 4,3 A,d	95,9 \pm 1,7 C,b
110 μm	330,9 \pm 8,5 A,c	298,7 \pm 3,4 A,c	312,5 \pm 7,8 A,c	314,8 \pm 5,2 A,c	332,7 \pm 7,4 A,e	118,3 \pm 3,9 B,c
220 μm	328,9 \pm 11,1 A,c	321,6 \pm 7,5 A,c	324,0 \pm 6,6 A,c	320,8 \pm 6,6 A,c	329,5 \pm 3,6 A,e	241,6 \pm 5,1 B,d

Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$) entre as colunas (diferenças entre os grupos na mesma profundidade). Letras minúsculas diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$) entre as linhas (diferenças entre as profundidades no mesmo grupo).

Fonte: Elaboração própria.

Figura 16 - Gráfico representativo da variação da microdureza do esmalte nas diferentes profundidades de acordo com os tratamentos empregados



Fonte: Elaboração própria.

6 DISCUSSÃO

As lesões iniciais de cárie em esmalte representam um desafio significativo na odontologia contemporânea, especialmente diante da busca por abordagens que não apenas previnam sua progressão, mas também promovam sua paralisação de forma eficaz e minimamente invasiva. O presente estudo investigou os efeitos do laser de femtosegundo com parâmetros subablativos, associado ou não aos métodos tradicionais de aplicação tópica de flúor, no controle da evolução dessas lesões no esmalte dental.

O grupo controle (sem tratamento) apresentou a maior perda de microdureza superficial, evidenciando a progressão acelerada da desmineralização na ausência de tratamento. Os resultados deste estudo confirmam a necessidade de intervenções ativas, dado que a ausência de tratamento levou a uma perda substancial de microdureza. Clinicamente, esses achados reforçam a importância de selecionar tratamentos que não apenas protejam a superfície do esmalte, mas também promovam remineralização efetiva em profundidade.

Por outro lado, os grupos tratados com laser de femtosegundo (G1), verniz fluoretado (G4) e sua combinação com laser (G5) mostraram os melhores resultados, com menores valores de perda de microdureza superficial e longitudinal, sendo semelhantes entre si. Estes resultados reforçam a eficácia do verniz fluoretado e do laser, individualmente ou em combinação, na proteção do esmalte contra a progressão das lesões.

No presente trabalho, embora os efeitos do laser de femtosegundo, associado ou não aos métodos tradicionais de aplicação tópica de flúor tenham se mostrado capazes de tornar a perda mineral mais lenta em relação ao grupo controle, não se pode considerar que tenha havido paralisação e muito menos reversão das lesões. Isso pode ter acontecido em decorrência da intensidade do desafio cariogênico e da ausência de fatores protetores próprios do ambiente bucal.

A utilização de modelos para a criação de lesões artificiais de cárie é relevante para compreender de forma mais aprofundada o processo de desmineralização e as modificações estruturais que ocorrem na superfície do esmalte²⁶. Nesse sentido, diversos modelos e substâncias desmineralizantes têm

sido sugeridos⁴⁴, incluindo o uso de gel de metilcelulose combinado com ácido láctico^{1,45}. É fundamental considerar que os protocolos empregados podem gerar tipos variados de lesões, com o grau de desmineralização influenciando diretamente essas variações, uma vez que a porosidade e a profundidade afetam a difusão de minerais. O processo cariogênico, um procedimento de desmineralização, é afetado por diversos fatores, como o pH, a presença de cálcio, fosfato e/ou flúor na solução, além de variáveis como o tempo, o volume e a viscosidade da solução, o que pode resultar em lesões subsuperficiais ou características de erosão^{1,45}.

Neste estudo, optou-se pelo uso de gel de metilcelulose e solução de ácido láctico, um método simples de aplicação (com poucos reagentes) e eficaz para simular lesões dentárias clínicas. No entanto, este método pode gerar lesões não homogêneas devido à viscosidade e pureza do gel de metilcelulose, sendo que um gel mais espesso e puro tende a resultar em lesões menos desmineralizadas, conforme observado nas superfícies do esmalte⁴⁶. Os espécimes foram submetidos à desmineralização em pH 4,6 a 37 °C por um período de 10 dias¹ utilizando o sistema de metilcelulose/ácido láctico. Esse protocolo resultou em lesões com características subsuperficiais e erosivas. Esse comportamento pode ser explicado pelo tempo de desmineralização ser maior do que o utilizado no estudo de Lippert et al. 2013⁴⁷, além da ausência de saturação da solução ácida, como realizada por Lippert e Lynch 2014⁴⁸, que induziram lesões semelhantes à cárie por 14 dias, respeitando a composição dentária.

Embora o processo de desmineralização siga um padrão geral, ele pode apresentar variações. As diferenças nas características físicas e mecânicas das lesões geradas por protocolos distintos podem impactar os resultados de desmineralizações e remineralizações subsequentes⁴⁰. No estudo em questão, a exposição prolongada à solução desmineralizante com ácido láctico pode ter causado uma degradação superficial mais acentuada em alguns espécimes. Além disso, dentes bovinos possuem uma mineralização inferior à dos dentes humanos⁴¹, e as lesões de cárie artificial induzidas em esmalte de dentes bovinos tendem a ser duas vezes mais profundas do que as formadas em dentes humanos^{27, 42}. Nesse contexto, a perda mineral significativa observada no presente trabalho pode ter interferido nos resultados, possivelmente mascarando algum efeito de inibição da desmineralização nos tratamentos testados. Um fenômeno semelhante foi descrito

por Pulido et al., 2008²⁷, que notaram a presença de erosão na superfície externa das lesões ao final do tratamento, sugerindo que o modelo de lesão utilizado poderia ter induzido uma progressão muito rápida. De acordo com os autores, essa erosão pode ter ocultado qualquer pequeno efeito de inibição da desmineralização causado pelos produtos remineralizadores avaliados, como também foi observado neste estudo.

Outro fator relevante é o polimento realizado nas superfícies dos espécimes antes da análise de microdureza inicial, com o objetivo de selecionar a amostra. Esse procedimento é crucial para garantir resultados consistentes e com pouca variação^{28,29}. No entanto, o esmalte polido pode ser mais suscetível à desmineralização, pois a camada superficial, que é mais resistente, acaba sendo removida, expondo camadas internas mais vulneráveis^{28, 30, 31}. A análise da microdureza da subsuperfície que foi submetida ao desafio cariogênico é uma das técnicas utilizadas para avaliar a eficácia de inibição da progressão da cárie no esmalte^{3, 32, 33, 34, 35, 36}). A microdureza é um método rápido e amplamente reconhecido por sua sensibilidade na avaliação da desmineralização do esmalte³⁷, sendo, por isso, adotado neste estudo. Sabe-se que a dureza do esmalte diminui com o tempo de exposição ao ácido, o que a torna um indicador do grau de desmineralização^{37, 38}). Trata-se de uma técnica mecânica, dependente do local e específica para avaliar a perda ou ganho de minerais com base no tamanho da indentação, mas que não permite analisar a distribuição e localização dos minerais nem o desgaste do tecido denta³⁹. A dureza longitudinal oferece importantes informações sobre as propriedades mecânicas do tecido desmineralizado em profundidade⁴⁰. Apesar de ser um método simples e com equipamento de custo relativamente baixo, a microdureza apresenta limitações para a avaliação da desmineralização da cárie, como: (1) ser influenciada pela quantidade de material orgânico e pelo grau de umidade do tecido durante a indentação; (2) não ser tão sensível para detectar alterações nos primeiros 10 µm da subsuperfície devido ao tamanho da indentação^{30, 43}; e (3) não ser capaz de determinar com precisão a profundidade em que o esmalte/dentina se mantém intacto ⁴⁰.

Diversos tratamentos preventivos foram sugeridos para o manejo de lesões iniciais de cárie, sendo a aplicação tópica de fluoretos uma das opções mais comuns^{26, 32, 33, 34, 35, 36, 37}. Os fluoretos são amplamente reconhecidos como agentes

remineralizantes de referência, capazes de prevenir e reparar lesões cariosas^{3, 11, 33, 38, 39, 40, 41, 42, 43} pois se ligam aos íons de cálcio e fosfato para formar apatita fluoretada, que é mais resistente a um pH de 4,5^{26, 36, 37, 39, 40, 42, 44, 45}. A aplicação dos íons flúor nos dentes cria um ambiente saturado ao redor da estrutura dental, ajudando a interferir no processo de desmineralização. Esses íons se adsorvem na superfície do cristal, atraindo íons de cálcio e fosfato, promovendo a formação de novos minerais (remineralização), que são menos solúveis²⁶. Contudo, a terapia tópica com flúor tem um efeito preventivo limitado, já que não elimina a cárie por completo, dependendo da disponibilidade de íons cálcio e fosfato no ambiente^{3, 12, 42}.

Como observado no presente estudo, os produtos fluoretados não proporcionaram remineralização completa, o que pode ser explicado por diversos fatores. Primeiramente, o gel de flúor permanece em contato com os dentes por um período curto, o que resulta em ligações formadas apenas nas camadas superficiais do esmalte³⁹. De acordo com Byeon et al., 2016³⁹, Majithia et al., 2016⁴¹ e Silva et al., 2012³⁸, a quantidade de flúor absorvida pelo esmalte é diretamente proporcional ao tempo de contato. Nesse sentido, o verniz fluoretado utilizado neste estudo é amplamente reconhecido como eficaz na prevenção de cáries, pois tem a capacidade de introduzir uma maior concentração de flúor, o que deveria favorecer uma remineralização mais profunda da superfície do esmalte¹², embora os resultados do presente estudo não tenham confirmado essa eficácia de maneira total. Outra possível explicação para os resultados obtidos pode estar na composição do verniz, que possui uma base resinosa⁴¹. Essa base libera os íons de flúor de maneira gradual ao longo do tempo, e o período de 6 horas em que o verniz permaneceu em contato com a superfície do esmalte pode não ter sido suficiente para atingir diferentes profundidades de remineralização.

É importante ressaltar que, fatores como a disponibilidade de cálcio e fosfato na saliva, o tempo de exposição e a profundidade das lesões influenciam diretamente a eficácia desses tratamentos⁴². No caso do verniz fluoretado, sua liberação lenta de íons flúor pode ser vantajosa em aplicações prolongadas, mas o período de contato de 6 horas utilizado neste estudo parece não ter sido suficiente para remineralizar significativamente as camadas mais profundas⁴².

O grupo irradiado com laser de femtosegundo (G1) mostrou um desempenho similar ao grupo flúor fosfato acidulado e laser de femtosegundo (G3) em

profundidades maiores (70µm e 90µm), o que indica que o laser de femtosegundo pode potencializar a remineralização do esmalte, como sugerido por Casarin et al., 2021²⁴. Esse efeito pode ser atribuído à capacidade do laser de modificar a estrutura cristalina do esmalte, reduzindo o conteúdo de carbonato e aumentando sua resistência à desmineralização²⁵, sugerindo que a irradiação com laser de femtosegundo pode ser uma alternativa, uma vez que seus efeitos alteram a estrutura do esmalte, aumentando sua resistência à solubilidade frente aos ataques ácidos provenientes do microorganismos acidogênicos causadores da cárie.

O efeito sinérgico entre o laser de femtosegundo e o verniz fluoretado foi observado nos resultados, especialmente nas profundidades mais elevadas do esmalte, onde o tratamento combinado foi mais eficaz do que o gel de flúor isolado (FFA) ou mesmo em conjunto com a laser de femtosegundo. De acordo com Tisler et al., 2022¹⁹, a combinação de laser e flúor pode melhorar a deposição de flúor na superfície do esmalte, potencializando a remineralização. Esses achados são consistentes com a ideia de que a irradiação com laser pode melhorar a penetração dos íons flúor nas camadas mais profundas do esmalte, facilitando a remineralização, como descrito por Xue et al., 2022²⁰.

É importante destacar que, enquanto os lasers de alta intensidade têm sido eficazes na modificação das propriedades do esmalte, o uso do laser de femtosegundo é mais vantajoso por não causar danos térmicos ao tecido dental, como lasers de alta intensidade como o CO2 e o Er:YAG, estrutura dental^{13, 14}. Estudos de Behroozibakhsh et al., 2018²¹ enfatizaram os riscos térmicos associados ao uso de lasers em modo contínuo, o que pode resultar em fissuras e rachaduras na superfície do esmalte, prejudicando sua resistência à cárie. A irradiação com laser de femtosegundo, por sua vez, evita esses danos devido à sua capacidade de gerar pulsos extremamente curtos, que não provocam a difusão de calor para o interior do esmalte, conforme descrito por Petrov et al., 2018²³.

No atual estudo, o impacto do laser de femtosegundo foi ainda mais expressivo no que diz respeito à profundidade de desmineralização, com reduções consistentes na desmineralização em profundidade, particularmente quando combinado com verniz fluoretado. A capacidade do laser de aumentar a resistência do esmalte reflete seu potencial como uma ferramenta terapêutica em populações de alto risco cariogênico.

Ademais, é fundamental considerar as limitações deste estudo *in vitro*, pois ele não consegue replicar toda a complexidade de um ambiente *in vivo* e há uma escassez de pesquisas que abordem o efeito do laser de femtosegundo sobre lesões de cárie. A reprodutibilidade dos efeitos do laser de femtosegundo em ambientes clínicos é fundamental para estabelecer suas implicações na prática odontológica, especialmente para o tratamento de lesões iniciais de cárie.

Em suma, este estudo sugere que o laser de femtosegundo, em combinação com tratamentos tradicionais como o verniz fluoretado, pode oferecer novas perspectivas no manejo das lesões iniciais de cárie, com um enfoque minimamente invasivo e mais eficiente na proteção do esmalte dental contra a progressão da doença. Contudo, mais estudos clínicos são necessários para explorar o real impacto e as vantagens dessa abordagem terapêutica no ambiente clínico.

7 CONCLUSÃO

Com base nos resultados alcançados neste estudo in vitro após a metodologia utilizada, pode-se concluir que:

- apesar de se observar uma desaceleração da desmineralização, nenhum dos tratamentos empregados promoveu a paralisação ou reversão completa das lesões iniciais de cárie em esmalte;

- a utilização do laser de femtosegundo, associado ou não à aplicação tópica de verniz fluoretado, exibiram o melhor desempenho, pois foram capazes de diminuir a perda mineral quando comparados ao grupo controle.

REFERÊNCIAS*

1. Buzalaf MA, Pessan JP, Honório HM, ten Cate JM. Mechanisms of action of fluoride for caries control. *Monogr Oral Sci.* 2011; 22:97-114.
2. Bradshaw DJ, Lynch RJ. Diet and the microbial aetiology of dental caries: new paradigms. *Int Dent J.* 2013 Dec; 63 Suppl 2: 64-72.
3. Featherstone JD, Fontana M, Wolff M. Novel anticaries and remineralization agents: Future research needs. *J Dent Res* 2018; 97: 125-7.
4. Costa E, Domingues J, Ferreira JC, Melo P. Tratamento medicamentoso de lesões iniciais de cárie. Agentes terapêuticos remineralizantes. *Rev Port Estomatol Cir Maxilofac* 2009; 50(1): 43-51.
5. Maia AM, de Freitas AZ, de L Campello S, Gomes AS, Karlsson L. Evaluation of dental enamel caries assessment using Quantitative Light Induced Fluorescence and Optical Coherence Tomography. *J Biophotonics.* 2016 Jun; 9(6): 596-602.
6. Attin T, Betke H, Schippan F, Wiegand A. Potential of fluoridated carbamide peroxide gels to support post-bleaching enamel re-hardening. *J Dent.* 2007; 35(9): 755-9.
7. Curtis AR, West NX, Su B. Synthesis of nanobioglass and formation of apatite rods to occlude exposed dentine tubules and eliminate hypersensitivity. *Acta Biomater* 2010; 6(9): 3740-6.
8. Jardim JJ, Pagot MA, Maltz M. Artificial enamel dental caries treated with different topical fluoride regimes: an in situ study. *J Dent* 2008; 36(6): 396-401.
9. Vianna JS, Marquezan M, Lau TC, Sant'Anna EF. Bonding brackets on white spot lesions pretreated by means of two methods. *Dental Press J Orthod.* 2016 Mar-Apr; 21(2): 39-44.
10. Rehder Neto FC, Maeda FA, Turssi CP, Serra MC. Potential agents to control enamel caries-like lesions. *J Dent* 2009; 37(10): 786-90.
11. Upadhyay S, Rao A, Shenoy R. Comparison of the amount of fluoride release from nanofilled resin modified glass ionomer, conventional and resin modified glass ionomer cements. *J Dent (Tehran)* 2013; 10(2): 134-40.
12. Mohd Said SN, Ekambaram M, Yiu CK. Effect of different fluoride varnishes on remineralization of artificial enamel carious lesions. *Int J Paediatr Dent* 2017; 27(3): 163-73.
13. Al-Maliky MA, Frentzen M, Meister J. Laser-assisted prevention of enamel caries: a 10-year review of the literature. *Lasers Med Sci.* 2020; 35(1): 13-30.

* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/guia-de-normalizacao-atualizado.pdf>.

14. Tavares JG, Eduardo Cde P, Burnett LH Jr, Boff TR, de Freitas PM. Argon and Nd:YAG lasers for caries prevention in enamel. *Photomed Laser Surg.* 2012 Aug; 30(8): 433-7.
15. Geraldo-Martins VR, Lepri CP, Palma-Dibb RG. Influence of Er,Cr:YSGG laser irradiation on enamel caries prevention. *Lasers Med Sci.* 2013 Jan; 28(1): 33-9.
16. Fornaini C, Brulat N, Milia G, Rockl A, Rocca JP. The use of sub-ablative Er:YAG laser irradiation in prevention of dental caries during orthodontic treatment. *Laser Ther.* 2014 Sep 30; 23(3): 173-81.
17. Chang NN, Jew JM, Simon JC, et al. Influence of multi-wavelength laser irradiation of enamel and dentin surfaces at 0.355, 2.94, and 9.4 μm on surface morphology, permeability, and acid resistance. *Lasers Surg Med.* 2017 Dec; 49(10): 913-927.
18. Corrêa-Afonso AM, Bachmann L, Almeida CG, Corona SA, Borsatto MC. FTIR and SEM analysis of CO₂ laser irradiated human enamel. *Arch Oral Biol.* 2012 Sep; 57(9): 1153-8.
19. Tisler CE, Moldovan M, Petean I, et al. Human Enamel Fluorination Enhancement by Photodynamic Laser Treatment. *Polymers (Basel).* 2022 Jul; 14(14): 2969.
20. Xue VW, Yin IX, Niu JY, et al. Combined Effects of Topical Fluorides and Semiconductor Lasers on Prevention of Enamel Caries: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Photobiomodul Photomed Laser Surg.* 2022 Jun; 40(6): 378-386.
21. Behroozibakhsh M, Shahabi S, Ghavami-Lahiji M, et al. Evaluation of crystalline changes and resistance to demineralization of the surface of human dental enamel treated with Er:YAG laser and fluoride using x-ray diffraction analysis and Vickers microhardness. *Laser Phys.* 2018; 28(6): 065602.
22. Nicolodelli G, Lizarelli RF, Bagnato VS. Influence of effective number of pulses on the morphological structure of teeth and bovine femur after femtosecond laser ablation. *J Biomed Opt.* 2012 Apr; 17(4): 048001.
23. Petrov T, Pecheva E, Walmsley AD, Dimov S. Femtosecond laser ablation of dentin and enamel for fast and more precise dental cavity preparation. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2018 Sep; 90: 433-438.
24. Casarin HH, Mattos VS, de Castro Neto JC, Chinelatti MA. Chemical and morphological changes of femtosecond laser-irradiated enamel using subablative parameters. *Microsc Res Tech.* 2021 Oct; 84(10): 2399-2408.
25. Tsuda H, Arends J. Raman spectroscopy in dental research: a short review of recent studies. *Adv Dent Res.* 1997; 11(4): 539-47.
26. Rehder Neto FC, Maeda FA, Turssi CP, Serra MC. Potential agents to control enamel caries-like lesions. *J Dent.* 2009; 37(10): 786-90.

27. Pulido MT, Wefel JS, Hernandez MM, Denehy GE, Guzman-Armstrong S, Chalmers JM, Qian F. The inhibitory effect of MI Paste, fluoride and a combination of both on the progression of artificial caries-like lesions in enamel. *Oper Dent*. 2008; 33(5): 550-555.
28. Corrêa FNP. Efeito do flúor e da caseína fosfopeptídea – fosfato de cálcio amorfo na inibição da erosão em dentes decíduos e permanentes [Tese Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2008.
29. Srinivasan, N; Kavitha, M; Loganathan, SC. Comparison of the remineralization potential of CPP-ACP and CPP-ACP with 900 ppm fluoride on eroded human enamel: an in situ study. *Arch Oral Biol*. 2010 jul; 55(7): 541-544.
30. Moron, T. Methods for assessment of dental erosion. *Monogr Oral Sci*. 2006; 20:152-72.
31. Meurman, JH; Frank, RM. Progression and surface ultrastructure of in vitro caused erosive lesions in human and bovine enamel. *Caries Res* 1991; 25(2): 81-87.
32. Kantorowiz, Z; Featherstone, JD; Fried, D. Caries prevention by CO2 laser treatment: dependency on the number of pulses used. *J Am Dent Assoc*. 1998; 129(5): 585-591.
33. Tagliaferro, EP; Rodrigues, LK; Nobre dos Santos, M; Soares, LE; Martin, AA. Combined effects of carbon dioxide laser and fluoride on demineralized primary enamel: An in vitro study. *Caries Res*. 2007; 41(1): 74-76.
34. Steiner-Oliveira, C; Rodrigues LK; Lima EB; Nobre dos Santos M. Effect of the CO2 laser combined with fluoridated products on the inhibition of enamel demineralization. *J Contemp Dental Pract*. 2008; 9(2): 113-121.
35. Esteves-Oliveira, M; Zzell, DM; Meister, J; Franzen, R.; Stanzel, S; Lampert, F; Eduardo CP; Apel, C. CO2 laser (10.6µm) parameters for caries prevention in dental enamel. *Caries Res*. 2009; 43(4): 261-268.
36. Souza-Gabriel, AE. Progressão da lesão de cárie no esmalte dental após aplicação de compostos fluoretados e irradiação com laser de CO2. [Tese]. Ribeirão Preto; Universidade de São Paulo, 2009.
37. White, AJ, Yorath C, ten Hengel V, Leary SD, Huysmans MC, Barbour ME. Human and bovine enamel erosion under 'single-drink' conditions. *Eur J Oral Sci*. 2010; 118:604–609.
38. Barbour, ME; Parker, DM; Allen, GC; Jandt, KD. Human enamel erosion in constant composition citric acid solutions as a function of degree of saturation with respect to hydroxyapatite. *Journal of Oral Rehabilitation*. 2005; 32:16–21.
39. Zero, DT. In situ caries models. *Adv Dent Res*. 1995; 9 (3): 214-230.
40. Moron, BM. Comparação entre diferentes métodos para a produção e análise de cárie artificial em esmalte e dentina [Dissertação]. Bauru: Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo; 2011.

41. Mellberg, JR. Hard-tissue substrates for evaluation of cariogenic and anti-cariogenic activity in situ. *J Den Res.* 1992; 71: 913-999.
42. Barros ACP. Remineralização de lesão de cárie inicial por meio da aplicação de diferentes produtos [Dissertação]. Araraquara: Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista; 2018
43. Edmunds, DH; Whittaker, DK; Green, RM. Suitability of human, bovine, equine and ovine tooth enamel for studies of artificial bacterial carious lesions. *Caries Res.* 1988; 22:327-36.
44. Clasen, ABS, Ogaard B. Experimental intra-oral caries models in fluoride research. *Acta Odontol Scand.* 1999; 57: 334-341.
45. Kamath P, Nayak R, Kamath SU, Pai D. A comparative evaluation of the remineralization potential of three commercially available remineralizing agents on white spot lesions in primary teeth: An in vitro study. *J Indian Soc Pedod Prev Den* 2017; 35(3): 229-37.
46. Moron BM, Comar LP, Wiegand A, Buchalla W, Yu H, Buzalaf MA, Magalhães AC. Different protocols to produce artificial dentine carious lesions in vitro and in situ: hardness and mineral content correlation. *Caries Res* 2013; 47(2): 162-70.
47. Salomão PMA, Comar LP, Buzalaf MAR, Magalhães AC. In situ remineralisation response of different artificial caries-like enamel lesions to home-care and professional fluoride treatments. *BMC Oral Health* 2016; 16(8): 2-9.
48. Lippert F, Butler A, Lynch RJM. Characteristics of methylcellulose acid gel lesions created in human and bovine enamel. *Caries Res* 2013; 47(1): 50–5.
49. Lippert F, Lynch RJ. Comparison of knoop and vickers surface microhardness and transverse microradiography for the study of early caries lesion formation in human and bovine enamel. *Arch Oral Biol* 2014; 59(7): 704-10.
50. Li X, Wang J, Joiner A, Chang J. The remineralisation of enamel: a review of the literature. *J Dent* 2014; 42: S12-20.
51. Nozari A, Ajami S, Rafiei A, Niazi E. Impact of Nano Hydroxyapatite, Nano Silver Fluoride and Sodium Fluoride Varnish on Primary Teeth Enamel Remineralization: An In Vitro Study. *J Clin Diagn Re* 2017; 11(9): ZC97-100.
52. Chinelatti MA, Tirapelli C, Corona SAM, Jasinevicius RG, Peitl O, Zanotto ED, Pires-de Souza FCP. Effect of a Bioactive Glass Ceramic on the Control of Enamel and Dentin Erosion Lesions. *Braz Dent J* 2017; 28(4): 489-97
53. El-Wassefy NA. The effect of plasma treatment and bioglass paste on enamel white spot lesions. *Saudi Dent J* 2017; 8(1–2): 8-66.
54. Jagga U, Paul U, Padmanabhan V, Kashyap A, Guram G, Keswani K. Comparative Evaluation of Remineralizing Effect of Novamin and

- Tricalcium Phosphate on Artificial Caries: An in vitro Study. *J Contemp Dent Pract* 2018; 19(1): 109-12.
55. Kanwal N, Brauer DS, Earl J, Wilson RM, Karpukhina N, Hill RG. In-vitro apatite formation capacity of a bioactive glass - containing toothpaste. *J Dent* 2018; 68: 51-8.
56. Silva RM, Ferreira JMS, Silva CDB, Fontes LBC; Granville-Garcial AF; Menezes VA. In vivo evaluation of therapeutic potential of fluoride varnishes. *Rev Odonto Cienc* 2012; 27(3): 233-7.
57. Byeon SM, Lee MH, Bae TS. The effect of different fluoride application methods on the remineralization of initial carious lesions. *Restor Dent Endod* 2016; 41(2): 121-9.
58. Damle SG, Bector A, Damle D, Kaur S. Effect of dentifrices on their remineralizing potential in artificial carious lesions: An in situ study. *Dent Res J (Isfahan)* 2016; 13(1): 74-9.
59. Majithia U, Venkataraghavan K, Choudhary P, Trivedi K, Shah S, Virda M. Comparative evaluation of application of different fluoride varnishes on artificial early enamel lesion: An in vitro study. *Indian J Dent Re* 2016; 27(5): 521-7.
60. Soares R, De Ataide IN, Fernandes M, Lambor R. Assessment of Enamel Remineralisation After Treatment with Four Different Remineralising Agents: A Scanning Electron Microscopy (SEM) Study. *J Clin Diagn Res* 2017; 11(4): 136-41.
61. González-Cabezas C, Fernández CE. Recent Advances in Remineralization Therapies for Caries Lesions. *Adv Dent Res* 2018; 29(1): 55-9.
62. Huang SB, Gao SS, Yu HY. Effect of nano-hydroxyapatite concentration on remineralization of initial enamel lesion in vitro. *Biomed Mater* 2009; 4(3): 034104.
63. Narayana SS, Deepa VK, Ahamed S, Sathish ES, Meyappan R, Satheesh Kumar KS. Remineralization efficiency of bioactive glass on artificially induced carious lesion an in-vitro study. *J Indian Soc Pedod Prev Dent* 2014; 32(1): 19-25.
64. Barros ACP. Remineralização de lesão de cárie inicial por meio da aplicação de diferentes produtos [Dissertação]. Araraquara: Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista; 2018.
65. Mameluque S. Corrêa FNP. Efeito do flúor e da caseína fosfopeptídea – fosfato de cálcio amorfo na inibição da erosão em dentes decíduos e permanentes [Tese Doutorado]. Ribeirão Preto: Faculdade de Odontologia da USP; 2014.