

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
MESTRADO EM ODONTOLOGIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM CLÍNICA INTEGRADA

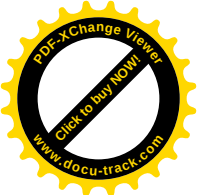
PATRICIA FERNANDES CASSIMIRO DA SILVA

Caracterização do potencial antierosivo do laser Nd:YAG e
fluoretos: um estudo *in vitro*



Recife – PE

2013



PATRICIA FERNANDES CASSIMIRO DA SILVA

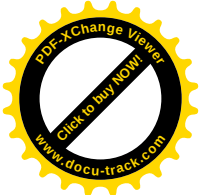
Caracterização do potencial antierosivo do laser Nd:YAG e fluoretos: um estudo *in vitro*

Dissertação apresentada à banca da Pós-Graduação em Clínica Integrada do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do grau de mestre em Clínica Odontológica Integrada.

Orientador: Prof. Dr. Anderson Gomes

Recife – PE

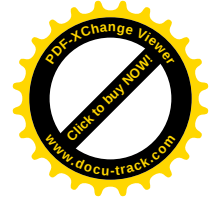
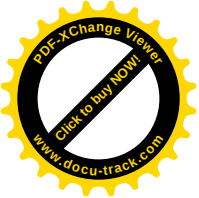
2013



Bibliotecária: Gláucia Cândida da Silva, CRB4-1662

Orientador: Anderson Gomes.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco,
CCS. Pós-graduação em Odontologia, 2013.
Inclui bibliografia.

UFPE (CCS2013-035)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

REITOR

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR

Prof. Dr. Silvio Romero de Barros Marques

PRÓ-REITOR DA PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Francisco de Souza Ramos

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

DIRETOR

Prof. Dr. Nicodemos Teles de Pontes Filho

COORDENADOR DA PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

Profa. Dra. Jurema Freire Lisboa de Castro

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

MESTRADO EM CLÍNICA INTEGRADA

COLEGIADO

MEMBROS PERMANENTES

Profa. Dra. Alessandra Albuquerque T. Carvalho

Prof. Dr. Anderson Stevens Leônidas Gomes

Prof. Dr. Arnaldo de França Caldas Junior

Prof. Dr. Carlos Menezes Aguiar

Prof. Dr. Danyel Elias da Cruz Perez

Prof. Dr. Edvaldo Rodrigues de Almeida

Profa. Dra. Flavia Maria de Moraes Ramos Perez

Prof. Dr. Jair Carneiro Leão

Profa. Dra. Jurema Freire Lisboa de Castro

Profa. Dra. Liriane Baratella Evêncio

Prof. Dr. Luiz Alcino Monteiro Gueiros

Prof. Dra. Maria Luiza dos Anjos Pontual

Prof. Dr. Paulo Sávio Angeiras Goes

Profa. Dra. Renata Cimões Jovino Silveira

Prof. Dra. Simone Guimaraes Farias Gomes

Prof. Dr. Tibério César Uchoa Matheus

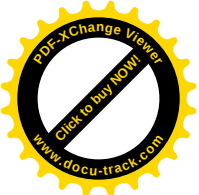
MEMBRO COLABORADOR

Prof. Dr. Cláudio Heliomar Vicente da Silva

Profa. Dra. Lúcia Carneiro de Souza Beatrice

SECRETARIA

Oziclere Sena de Araújo



TÍTULO DO TRABALHO: Caracterização do potencial antierosivo do laser Nd:YAG e fluoretos: um estudo *in vitro*

NOME DO ALUNO: Patricia Fernandes Cassimiro da Silva

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: 31/01/2013

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA:

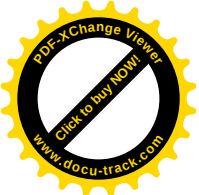
Profa. Dra. Maria Luiza dos Anjos Pontual

Prof. Dr. Danyel Elias da Cruz Perez

Profa. Dra. Marleny Elizabeth Marquez de Martínez Gerbi

Recife –PE

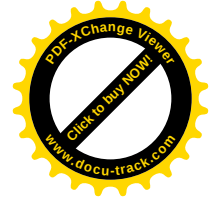
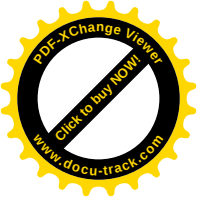
2013



DEDICATÓRIA

À **Deus** por sempre estar presente em meu coração;

Aos meus pais **Maria Lúcia** e **Ricardo** pelo incentivo, educação e por todo amor.



AGRADECIMENTOS

A toda minha **família**, em especial à minha mãe **Maria Lúcia**, pelo apoio, carinho, abraços de incentivo e principalmente pelo exemplo de vida e de superação vivido;

À minha querida vó **Aldenora**, por todo o amor que transpassa em seus olhos;

À minha vizinha **Maria**, a alegria da minha casa, meu sorriso de cada dia;

Ao meu namorado **Heberth Braga**, por todo o amor, carinho, atenção e compreensão em meus momentos de ausência. Te amo;

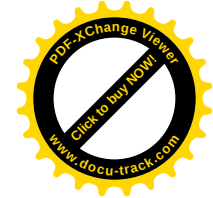
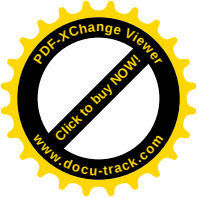
Ao meu orientador **Anderson Gomes**, por incentivar, por sempre disponibilizar meios, encontrar soluções e se fazer bastante presente mesmo em suas ausências;

À professora **Mirella Massa**, pela amizade, troca de ideias e convívio durante a graduação e o início do mestrado;

Ao professor **Ramiro Willmersdorf**, por abrir as portas, quando muitos as fecharam;

À **Cláudia Brainer**, pelo apoio e orientação. Através dela tive os primeiros contatos com o universo desconhecido da Pós-graduação. Obrigada por me mostrar os caminhos.

Um agradecimento especial à **Ana Marly Maia**. Nunca imaginei que seria dela a mão que me ergueu quando mais precisei. De colega à amiga, que fez dos meus dias muito mais agradáveis e que sem nenhum egoísmo tentou me passar todo seu conhecimento e experiência. Mostrou-me caminhos, pessoas, me abriu portas. Sem ela esta pesquisa não se desenvolveria;



À **Gabriela Monteiro** e **Cecília Monteiro**, pelo convívio diário.

À **Mônica Schaffer**, pela aproximação construída e pelo exemplo;

À **Adalberto Amorim** pela ajuda no Laboratório de Fotônica;

Ao técnico **Marcelo Gomes**, por todo o empenho e por toda a disponibilidade;

Ao professor **Pedro Guzzo**, por abrir as portas do seu laboratório;

Ao técnico do MEV **Edwin**, que em nenhum momento se negou a ajudar;

À técnica do Laboratório de Química **Virgínia** e a técnica do Laboratório de Raios-x **Tarsila**, por disponibilizar meios;

Ao físico **Sérgio**, por estar sempre aberto a esclarecimento de dúvidas e pela ajuda na determinação de certos pontos do trabalho;

À **Hans Mejia**, por toda paciência e disponibilidade;

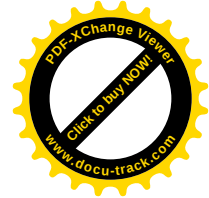
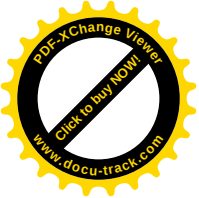
À **Dra. Magnólia**, pelos conselhos e incentivo;

À minha querida professora da ABA, **Fabiana Fonseca**, pelo exemplo de profissional, pela dedicação aos alunos e pelo incentivo na escrita do artigo e correção final do mesmo. Muito obrigada.

Às técnicas do CETENE, **Josi** e **Gabi**, por sempre me receberem tão bem;

À **Olímpio** por toda a ajuda na parte burocrática;

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pelo fomento à pesquisa;



Ao **Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE)** por disponibilizar meios a realização do trabalho;

Aos eternos professores e agora também colegas de trabalho, **Carlos Aguiar** e **Georgina Agnello**, pelo convívio diário e troca de experiência;

À **todos os meus alunos** pelo convívio e aprendizado diário;

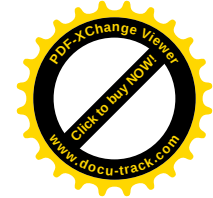
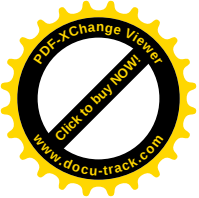
À **todos os professores da pós-graduação** pelo conhecimento transmitido;

À **minha turma de mestrado**, pela amizade e união e por ter feito dos meus dias muito mais felizes;

À amiga **Luana Osório**, por toda a ajuda;

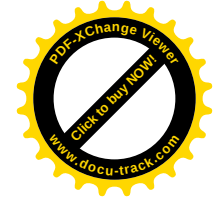
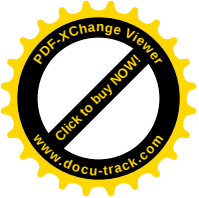
À secretária **Oziclere** e a funcionária **Tânia** por toda simpatia e por estarem dispostas a ajudar sempre;

Enfim, a todos que de uma forma ou de outra fizeram parte desses dois anos de estudo, aventuras, enfrentamentos, dúvidas, desafios, alegrias e tristezas, o meu muitíssimo obrigado.



APRESENTAÇÃO

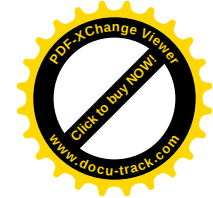
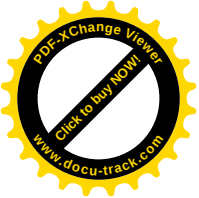
Esta dissertação foi organizada na forma de artigo científico, precedido por uma introdução ao tema, revisão bibliográfica e metodologia expandida. A revisão de literatura em bancos de dados eletrônicos internacionais pesquisou a complexidade do conhecimento sobre a desmineralização do tecido duro dentário e seus diversos métodos de análise, elucidando técnica de avaliação das propriedades ópticas da interação laser-tecido (Tomografia por Coerência Óptica – TCO). Esta dissertação resultou em um artigo intitulado **“Characterization of anti-erosive potential of fluorides and Nd: YAG laser: an *in vitro* study”**, a ser encaminhado à revista internacional Caries Research, Qualis A1. Este consiste em uma avaliação do efeito preventivo do laser Nd:YAG, verniz fluoretado e creme dental sobre a erosão dentária, e o efeito interceptivo de três diferentes cremes dentais sobre a erosão, além de implementar a TCO como um potencial método quantitativo de análise de perda mineral sofrida pela superfície dentária. Outros métodos já consagrados para este tipo de estudo foram utilizados como a Perfilometria por contato e a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).



LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REVISÃO DE LITERATURA E METODOLOGIA

Fig. 1 - Perfil 2D de espécime mostrando batente entre área de referência e erodida	28
Fig. 2 – Imagem de MEV mostrando riscos causados na superfície do esmalte pela perfilometria por contato	29
Fig. 3 - Modelo esquemático do sistema de Tomografia por Coerência Óptica (SD-OCT)	30
Fig. 4 – Imagem 2D de uma “fatia” da amostra (B-scan) mostrando as diferenças entre o lado de referência (esquerdo) e o lado erodido (direito).	31
Fig. 5 – a Imagem MEV com elétrons secundários. b Imagem MEV com elétrons retroespalhados. (Grupo controle)	32
Fig. 6 – Corpo de prova ao final das etapas de planificação e polimento	35
Fig. 7 - Inclusão dos espécimes em resina acrílica	36
Fig. 8 – Corpo de prova ao final das etapas de planificação e polimento	37
Fig. 9 – Organização dos espécimes em tubos falcon	38
Fig. 10 – a. Superfície teste coberta pela pasta de carvão. b. Irradiação a laser do corpo de prova	39
Fig. 11 - Superfície teste coberta por verniz fluoretado	40
Fig. 12 – TCO realizando leitura de corpo de prova	43
Fig. 13 – Perfilômetro realizando leitura de corpo de prova	45



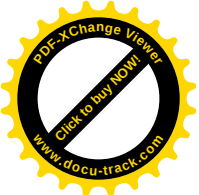
ARTIGO

Fig. 1 – Example of an OCT image profile analyzed. The total distance used as reference to get value of step was 3mm, meaning 1,5 mm of each surface. For measurement of tissue loss, the box tool helps to identify the distance between both superficial faces.

60

Fig. 2 – SEM of the specimens after the erosion cyclic and treatments. **A** Negative Control. **B** Pro-esmalte. **C** Pro-Saúde. **D** MI Paste Plus. **E** Nd:YAG Laser + Duraphat. **F** Nd:YAG Laser + Duraphat + Pro-esmalte.

63



LISTA DE QUADROS E TABELAS

METODOLOGIA

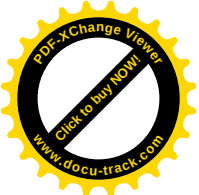
Tabela 1 - Especificações dos produtos utilizados 38

Tabela 2 – Grupos experimentais e seus respectivos tempos de desmineralização e tratamento por dia 41

ARTIGO

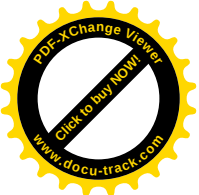
Table 1 - Mean roughness values and standard deviations of surfaces. 62

Table 2 - Mean of mineral loss values and reduction relative to control. 63

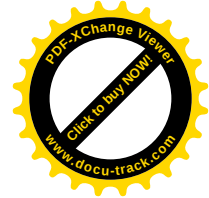
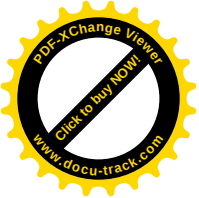


LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AFM	-	Atomic Force Microscopy
AmF	-	Fluoreto de Amina
APF	-	Acidulated Phosphate Fluoride
CaF ₂	-	Fluoreto de Cálcio
CAPES	-	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CCD	-	Dispositivo de câmera acoplada
CEPLO	-	Centro de Estudos e Pesquisa de Laser em Odontologia
CPP-ACP	-	Nano complexo caseína fosfopeptídea com fosfato de cálcio amorfo
CETENE	-	Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste
F	-	Flúor
FACEPE	-	Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco
JAVA	-	Linguagem de programação
LD	-	Laser e Duraphat
LDP	-	Laser, Duraphat e Pro-esmalte
MEV	-	Microscopia eletrônica de varredura
MI	-	MI Paste Plus
NaF	-	Fluoreto de sódio
NC	-	Negative control
Nd:YAG	-	Neodymium-doped yttrium aluminum garnet
OCT	-	Optical coherence tomography
P	-	Pro-esmalte

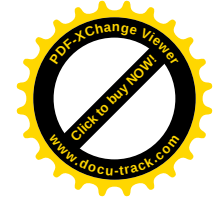
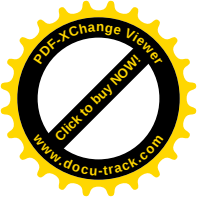


PS	-	Pro-Saúde
QLF	-	Quantitative light-induced fluorescence
R_a	-	Rugosidade média
R_q	-	Rugosidade média quadrática
SD-OCT	-	Spectral domain optical coherence tomography/ tomografia por coerência óptica no domínio espectral
SE	-	Secondary electron
SEM	-	Scanning Electron Microscopy
SnF_2	-	Fluoreto de estanho
SnCl_2	-	Cloreto de estanho
TCO	-	Tomografia por coerência óptica
UFPE	-	Universidade Federal de Pernambuco



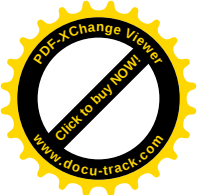
LISTA DE SÍMBOLOS

°C	-	graus Celcius
~	-	Aproximadamente
%	-	Porcentagem
J/cm ²	-	Joules por centímetro quadrado
g	-	gramas
Hz	-	Hertz
ml	-	Mililitros
mm	-	Milímetros
nm	-	Nanômetros
µm	-	Micrômetros
pH	-	Potencial de hidrogênio
ppm	-	Partes por milhão
qsp	-	Quantidade suficiente para
SLDs	-	Diodos Super Luminescentes
W	-	Watts
.xls	-	Extensão Excel



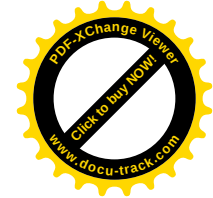
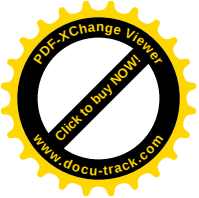
RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito preventivo do laser Nd:YAG utilizado juntamente com um verniz fluoretado na erosão e a efetividade da sua associação ao uso de um creme dental a base de fluoreto de sódio (NaF), além de avaliar o efeito inibidor de diferentes cremes dentais a base de NaF, fluoreto de estanho (SnF_2) e nano complexo caseína fosfopeptídea e fosfato de cálcio amorfo (CPP-ACP) frente ao processo erosivo. Junto a isso, verificar se a tomografia por coerência óptica (TCO) pode ser um método quantitativo a ser utilizado para avaliação de erosão do esmalte. Superfícies de esmalte bovino foram distribuídos aleatoriamente em 6 grupos ($n=7$): NC – controle negativo (sem tratamento); LV – Laser Nd:YAG + verniz de NaF; LV/NaF – Laser Nd:YAG + verniz de NaF + Pro-esmalte (NaF); NaF – Pro-esmalte; SnF_2/NaF – Pro-Saúde; CPP-ACP/NaF – MI Paste Plus. Os grupos LV e LV/NaF foram irradiados a laser Nd:YAG (10 Hz, 1W, $141,5 \text{ J/cm}^2$) durante 30 segundos e em seguida foi aplicado verniz fluoretado (NaF) por 4 horas. A ciclagem erosiva foi realizada em solução de ácido cítrico 0,5% (pH 2,6) 5 x 3 minutos ao dia, seguido pela exposição aos cremes dentais por 2 minutos após a primeira e última ciclagem de cada dia em todos os grupos, com exceção dos grupos NC e LV. No grupo NC nenhum tratamento foi realizado. A análise quantitativa foi realizada através de perfilometria por contato e tomografia por coerência óptica, complementada pela análise qualitativa da microscopia eletrônica de varredura. Entre os métodos testados, a associação laser/verniz/pro-esmalte mostrou-se uma boa estratégia preventiva, com maior efeito redutor de perda mineral. Entre os cremes dentais, em ambos os métodos quantitativos de avaliação, o CPP-ACP/NaF foi o que apresentou o menor efeito redutor da erosão, no entanto



o creme dental a base de SnF_2/NaF apresentou bons resultados. Ambos os métodos de avaliação foram efetivos, não apresentando diferenças estatísticas.

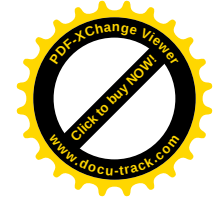
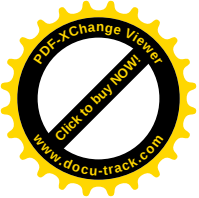
Palavras-chave: Erosão do esmalte; Fluoretos; Laser Nd:YAG; Tomografia de coerência óptica



ABSTRACT

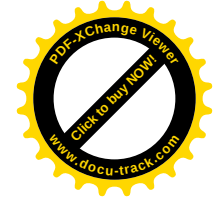
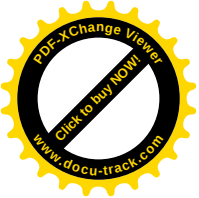
The aim of the study was to evaluate the preventive effect of Nd:YAG laser used in conjunction with a fluoride varnish on erosion and effectiveness of its association with the use of a NaF-toothpaste, besides evaluate the inhibitory effect of different toothpastes (NaF , SnF₂ and CPP-ACP) against the erosive process. Along with this, verify that the optical coherence tomography (OCT) is a quantitative method to be used for assessment of enamel erosion. Specimens were randomly allocated into one of the 6 experimental groups (n=7): Preventive groups: NC – negative control (no treatment); LV – Nd:YAG laser + NaF varnish; LV/NaF – Nd:YAG laser + NaF varnish + Pro-esmalte (NaF); NaF – Pro-esmalte; SnF₂/NaF – Pro-Saúde; CPP-ACP/NaF – MI Paste Plus. The LV/NaF and LV groups were irradiated with Nd: YAG laser (10 Hz, 1W, 141,5 J/cm²) for 30 sec and then fluoride varnish was applied for 4 hours. The erosive cycling was performed in a solution of citric acid 0,5% (pH 2,6) 5 x 3 min daily, followed by exposure to toothpaste for 2 minutes after the first and last cycling of each day in all groups, except for LV and NC groups. Quantitative analysis was performed by using contact profilometry and optical coherence tomography, complemented by qualitative analysis of scanning electron microscopy. Among the methods tested, the combination laser / varnish / pro-enamel proved a good preventive strategy, with greater lowering effect of mineral loss. Among the toothpaste in both quantitative methods of evaluation, CPP-ACP/NaF was showed the lowest reducing effect of erosion, however the toothpaste-based SnF₂/NaF showed good results. Both evaluation methods were effective, with no significant statistical differences.

Key Words: Enamel erosion; Fluoride; Nd:YAG Laser; Optical coherence tomography

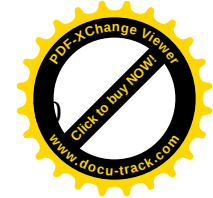
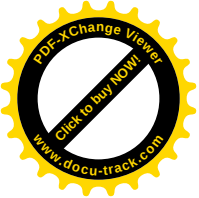


SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
2 REVISÃO DA LITERATURA	22
2.1 Erosão dentária	22
2.2 Métodos preventivos e de tratamento	24
2.3 Métodos de avaliação	26
<i>2.3.1 Perfilometria de superfície</i>	<i>28</i>
<i>2.3.2 Tomografia por Coerência Óptica (TCO)</i>	<i>29</i>
<i>2.3.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)</i>	<i>31</i>
3 OBJETIVOS	33
3.1 Objetivo geral	33
3.2 Objetivos específicos	33
4 METODOLOGIA	34
4.1 Locais de estudo	34
4.2 Aspectos éticos	34
4.3 Coleta e seleção dos dentes bovinos	34
4.4 Preparo dos espécimes	35
4.5 Confeção dos corpos de prova	35
4.6 Planificação e polimento dos corpos de prova	36
4.7 Delimitação da face controle, Fixação e Organização dos corpos de prova	37
4.8 Etapa Experimental	39
4.9 Caracterização superficial	42
<i>4.9.1 Tomografia de Coerência Óptica (TCO)</i>	<i>42</i>



4.9.2 Perfilometria por contato	44
4.9.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	45
4.10 Avaliação estatística	46
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
ARTIGO	53
Abstract	53
Introduction	54
Materials and Methods	57
<i>Specimen Preparation</i>	57
<i>Nd:YAG laser treatment and Fluoride varnish application</i>	58
<i>Erosive cycling</i>	58
<i>Tissue loss measurement</i>	59
Optical Coherence Tomography (OCT)	59
Profilometry	60
Scanning Electron Microscopy (SEM)	61
<i>Statistics</i>	61
Results	61
Discussion	63
Acknowledgements	68
References	69

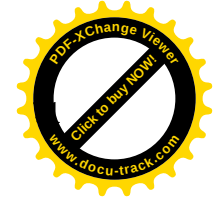
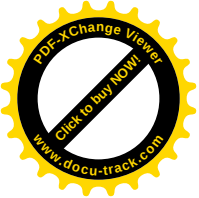


1 INTRODUÇÃO

O conhecimento a cerca do desenvolvimento da cárie, suas formas de prevenção e tratamento, fizeram com que a incidência da doença declinasse com o passar dos anos (ATTIN; ZIRKEL; HELLWIG, 1998), favorecendo, assim, a manutenção dos dentes na cavidade bucal por mais tempo, predispondo-os a outras lesões dentárias como a erosão. A erosão dental é um acometimento bucal que vem tomando a cena e que não deve ser subestimado por ser uma condição multifatorial, na qual fatores nutricionais e ligados ao indivíduo podem desencadeá-la (LUSSI et al., 2011). De acordo com Jaeggi e Lussi (2006), há evidências de que a prevalência da erosão dental vem crescendo firmemente.

O crescimento do consumo de bebidas ácidas no mundo (RESEARCH; MARKETS, 2010) parece confirmar a evidência de que a prevalência da erosão dental esteja realmente aumentando. No entanto, o aumento da consciência sobre o assunto pode estar levando apenas a uma maior precisão no diagnóstico (DOWNER, 1995). De uma forma ou de outra, as ainda limitadas terapias disponíveis para o controle do processo trazem a necessidade de pesquisas para novos agentes de prevenção e reparo de lesões dentais erosivas.

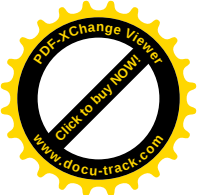
Diferentes abordagens têm sido discutidas para a melhoria da remineralização do esmalte enfraquecido e o aumento na resistência a ácidos através da aplicação tópica de fluoretos (AMAECHI, HIGHAM, 2005). Entretanto os resultados encontrados na literatura ainda são contraditórios. Enquanto a maioria dos autores defende o efeito protetor do flúor tópico (WIEGAND; ATTIN, 2003; AMAECHI; HIGHAM, 2005) outros não encontraram fundamento teórico na afirmativa (TEN CATE et al., 2003).



A maior parte das pesquisas avalia compostos de flúor que vem sendo utilizados há vários anos na prevenção da cárie, como o fluoreto de sódio (NaF), fluoreto de amina (AmF), fluoreto estanhoso (SnF_2) e o flúor fosfato acidulado (APF). Pesquisas com a utilização de laser, principalmente o Nd:YAG, também vem sendo realizadas com intuito de melhoria do efeito destes compostos fluoretados (RIOS et al., 2009).

Vários são os métodos utilizados para avaliação da perda de tecido dental por erosão. A perfilometria de superfície é o método quantitativo mais comum, tanto em estudos *in vitro*, *in situ* e em modelos clínicos (SCHLUETER et al., 2011). Outros métodos como a rugosidade da superfície e a microdureza também podem ser vistos, principalmente este último. A Tomografia por Coerência Óptica (TCO) é um método com grande potencial de análise, mas que ainda não foi proposto como meio quantitativo eficiente de análise de superfícies de esmalte erodidas. Métodos qualitativos como a microscopia eletrônica de varredura e a microscopia de força atômica também são bastante comuns em estudos sobre perda erosiva em esmalte dental.

Diante do exposto, o objetivo do presente trabalho é avaliar o efeito preventivo do laser Nd:YAG utilizado juntamente com um verniz fluoretado na erosão e o efeito do seu uso associado a um creme dental a base de NaF em esmalte bovino, além de avaliar o efeito inibidor de diferentes cremes dentais a base de NaF, SnF_2 e CPP-ACP frente ao processo erosivo. Junto a isso, verificar se a tomografia por coerência óptica (TCO) pode ser um método quantitativo a ser utilizado para avaliação de erosão do esmalte e caracterizar superficialmente os efeitos preventivos e inibidores da erosão através de microscopia eletrônica de varredura.



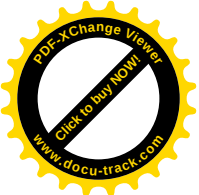
2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Erosão dentária

A erosão dentária é definida como uma perda irreversível do tecido duro dental, devido a um processo químico, sem envolvimento de microrganismos. A erosão se diferencia da atrição a qual é caracterizada por um achatamento liso e brilhante da superfície do dente afetado induzido pelo contato dente a dente, e da abrasão, que é o desgaste dentário causado por objetos introduzidos na boca (ECCLES, 1982). No entanto, nem sempre é fácil diferenciar estas lesões por elas frequentemente ocorrerem simultaneamente e em diferentes proporções (NUNN et al., 1996).

O desenvolvimento da erosão depende do tempo de duração e intensidade da exposição ao ácido podendo ocorrer em qualquer superfície do dente. No entanto, a distribuição da erosão na dentição é diretamente influenciada por fatores como a taxa do fluxo salivar e a capacidade tampão da saliva que podem modificar o processo erosivo (LUSSI et al., 2012). A erosão se dá através de uma contínua dissolução ácida dos cristais de esmalte, amolecendo a superfície dentária e sua região imediatamente abaixo, camada por camada, levando a uma perda permanente de tecido dental (LUSSI, 2009; LUSSI et al., 2011). As lesões erosivas se caracterizam por apresentarem uma aparência polida, podendo ocorrer desgastes em bordas incisais e cúspides e perdas nas superfícies vestibulares (DUGMORE; ROCK, 2004).

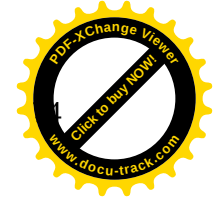
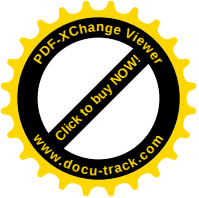
Os ácidos responsáveis pela erosão da superfície dental podem ser de origem intrínseca ou extrínseca. A erosão intrínseca seria provocada por ácidos endógenos provenientes do refluxo gástrico, regurgitação crônica, alcoolismos e distúrbios do sistema nervoso como anorexia e bulimia (IMFELD, 1996). Em geral, o



conteúdo ácido gástrico pode causar lesões erosivas aos tecidos duros dentais se sua presença na cavidade bucal for regular durante algum tempo (LUSSI et al., 2011). Já a erosão extrínseca seria resultado da ação de ácidos exógenos inclusos em diferentes produtos e alimentos de uso da população. Alimentos e bebidas ácidas, produtos de higiene bucal e formulações medicamentosas que reduzam a secreção salivar seriam alguns exemplos (LUSSI et al., 1996). Sucos de frutas, refrigerantes e vinagre, por exemplo, compostas por ácidos, como o cítrico, fosfórico, acético, e fabricados com pH abaixo de 4.5, podem levar a um quadro erosivo (LUSSI; JAEGGI; ZERO, 2004).

O processo erosivo pode ser dividido em dois estágios: um inicial, com uma desmineralização parcial e amolecimento da superfície, podendo teoricamente ainda ocorrer nesta fase uma remineralização e um segundo estágio, no qual o mineral mais externo ao esmalte é totalmente perdido, não sendo possível o reparo (LUSSI; JAEGGI; ZERO, 2004). Sabe-se que o esmalte amolecido é bastante instável sendo assim susceptível a riscos e danos (JAEGGI, LUSI, 1999). Assim, em estágios mais avançados, a contínua exposição a ácidos e desafios mecânicos e químicos leva a perda de superfície, através da dissolução ou da abrasão do frágil esmalte amolecido superficial (SCHLUETER et al., 2011). No entanto, a perda de esmalte causada pela escovação depende do tempo decorrente entre o desafio erosivo e a escovação dentária (JAEGGI, LUSI, 1999), uma vez que neste intervalo pode ocorrer uma remineralização do mesmo.

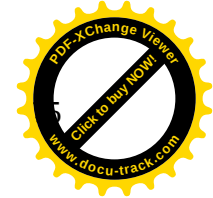
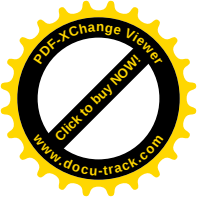
A erosão pode ser severa em pacientes com baixo fluxo salivar. A saliva possui diferentes mecanismos de proteção que podem entrar em ação durante mudanças ácidas no meio bucal, tal como diluição do agente erosivo, neutralização e tamponamento de ácidos e formação da película adquirida (ZERO; LUSI, 2000).



A película adquirida é composta por glicoproteínas, proteínas, lipídios e diversas enzimas (HANNIG; HANNIG; ATTIN, 2005), sendo um importante meio protetor uma vez que age como barreira e membrana seletiva (HANNIG; BALZ, 1999).

2.2 Métodos preventivos e de tratamento

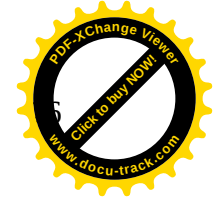
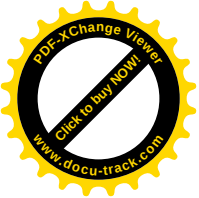
A melhor forma de proteger os elementos dentários da ação de ácidos seria através do tratamento e da eliminação dos fatores causadores (LUSSI; HELLWIG, 2006) como, por exemplo, a diminuição da ingestão excessiva de alimentos e bebidas potencialmente prejudiciais e o acompanhamento e tratamento das diferentes desordens gástricas e alimentares. No entanto, a mudança de hábitos alimentares e comportamentais é muitas vezes um desafio. Assim uma abordagem diferente é necessária para a prevenção da erosão dentária, principalmente em pacientes susceptíveis ao desenvolvimento da erosão e para o alívio dos sintomas naqueles que já se encontram no quadro erosivo (HJORTSJÖ et al., 2009). Apesar das controvérsias ainda existentes na literatura com respeito à efetividade do flúor frente à erosão dentária (AMAECHI; HIGHAM, 2005), há evidências de que o mesmo possui efeito similar à sua ação contra a desmineralização cariogênica no fortalecimento do tecido dentário duro contra a erosão dental. Além disso, o flúor parece ser capaz de causar um reendurecimento da superfície de esmalte erodido e, conseqüentemente, aumentar a sua resistência à abrasão (GANSS et al., 2001) e conseqüentemente à erosão. Após a aplicação do agente fluoreto, a fluorapatita, que é menos solúvel que a hidroxiapatita, é formada (SHELLIS; DUCK-WORTH, 1994). Além disso, ocorre uma precipitação de CaF_2 na superfície erodida e a formação de uma camada protetora (GANSS, et al. 2004; GANSS; KLIMEK; STARCK, 2004). A formação desta camada de CaF_2 e seu efeito protetor depende da concentração de F, do pH, e do tipo de sal do agente fluoreto (SAXEGAARD, ROLLA. 1988). A alta



concentração de agentes fluoretantes como vernizes e géis, tem demonstrado aumento na resistência à abrasão e diminuição dos processos erosivos no esmalte e dentina em ensaios in vitro e in situ (GANSS, et al. 2004; LAGERWEIJ, et al. 2006). No entanto, há evidências de que a camada de CaF_2 formada a partir de aplicações de fluoretos tópicos pode ser dissolvida pela maioria das bebidas ácidas (LARSEN; RICHARDS, 2002).

Além dos compostos fluoretados já estabelecidos como o NaF e o AmF que já vem sendo utilizados há vários anos na prevenção da cárie, complexos de fluoretos com metais polivalentes como titânio, estanho, cobre, zinco, ferro e alumínio tem sido investigados (SCHLUETER et al., 2009). O propósito é identificar novas formulações e compostos que formem outros precipitados e apresentem diferenças quanto à capacidade protetora. Vários autores vêm demonstrando que agentes como o tetrafluoreto de titânio, o fluoreto estanhoso e o fluoreto de sódio são capazes de reduzir a perda mineral do esmalte diante de um desafio ácido (HOVE et al., 2007, 2008; SCHLUETER et al., 2007, 2009).

O íon estanho é capaz de reagir com a hidroxiapatita na superfície do esmalte, (WILLUMSEN, 2004) resultando na redução da sua solubilidade (MOAZZEZ, 2004). Há ainda indicações de que a deposição de estanho na superfície do esmalte seja relativamente resistente à dissolução ácida (MOAZZEZ, 2004). Mesmo na ausência do flúor o estanho tem se mostrado promissor. Uma preparação de cloreto de estanho (SnCl_2) reduziu a perda mineral erosiva em esmalte em 70%, aproximadamente igual a uma solução de NaF (GANSS et al., 2008). No entanto, ainda sabe-se pouco sobre o seu potencial anti erosivo e sua interação com o tecido dentário.

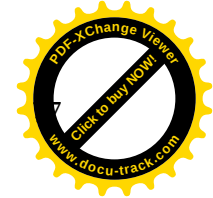
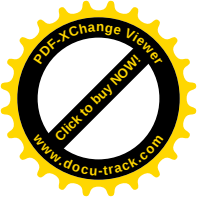


A caseína, uma fosfoproteína derivada do leite (AZARPAZHOOH; LIMEBACK, 2008), é outro agente que também vem sendo bastante estudado. O nano complexo caseína fosfopeptídea (CPP) com fosfato de cálcio amorfo (ACP) vem sendo pesquisada ao longo dos anos e tem demonstrado propriedade preventiva e remineralizadora no processo de cárie. A caseína é capaz de carregar íons fosfato e de cálcio para a superfície do dente, estimulando a remineralização (REES; LOYN; CHADWICK, 2007). Em algumas pesquisas *in vitro*, o complexo CPP-ACP se mostrou efetivo na prevenção da erosão (REES; LOYN; CHADWICK, 2007; RANJITKAR et al., 2009; POGGIO et al., 2010).

De forma a melhorar a efetividade de diferentes compostos fluoretados na erosão, a irradiação a laser tem sido discutida como uma ferramenta adicional (RIOS et al., 2009). Sabe-se que o laser Nd:YAG é capaz de provocar mudanças estruturais e físicas na superfície do esmalte através do derretimento e recristalização dos cristais de hidroxiapatita (TAGOMORI; IWASE, 1995), diminuindo os espaços interprismáticos e consequentemente a difusão de ácidos, o que reduz consideravelmente a desmineralização (HOSSAIN et al., 2001). Junto a isso, favorece a formação de pirofosfato, que é capaz de reduzir a dissolução da hidroxiapatita (KWON et al., 2003). Diversos estudos já demonstraram este efeito favorável do laser Nd:YAG na resistência ácida do tecido dental duro (SOBRAL et al., 2009; RIOS et al., 2009; CHEN; HUANG, 2009; MAGALHÃES et al., 2011).

2.3 Métodos de avaliação

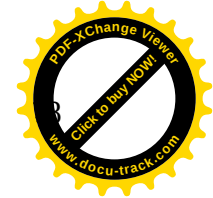
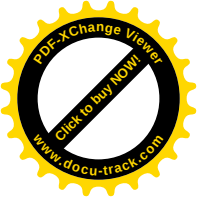
Diversos modelos de estudo podem ser utilizados para a avaliação da erosão ácida sobre os tecidos dentais duros. Mesmo os ensaios clínicos tendo uma importância fundamental no estabelecimento de evidência científica, estudos *in vitro* e *in situ* são de grande importância devido à necessidade de entendimento de



particularidades envolvidas, delimitação de variáveis de interesse e validação de métodos de análise, o que favorece a construção do conhecimento do processo.

Pesquisas que avaliam formas de prevenção da erosão dental *in vivo*, utilizando métodos intra-orais de medição parecem ser o ideal, no entanto estudos *in vivo* não são capazes de alcançar medidas muito precisas de perda de tecido duro dental, devido provavelmente a baixa acurácia dos métodos de avaliação disponíveis para estes (HUYSMANS et al., 2011). Em contrapartida, modelos *in situ* e *in vitro* conseguem fornecer dados significativos, refletindo o que realmente acontece na cavidade oral, por disporem de tecnologias de avaliação da perda tecidual mais precisas, além de possibilitarem uma efetiva padronização do experimento. Modelos *in vitro* são amplamente utilizados por serem passíveis de comparação, uma vez que variáveis tais como a solução erosiva, método de aplicação, pH e temperatura são cuidadosamente descritos e reproduzíveis (WEST; DAVIES; AMAECHI, 2011).

A metodologia de análise dos resultados pode compreender métodos quantitativos e/ou qualitativos e semiquantitativos. Dentre os métodos quantitativos, podemos citar a análise química de minerais dissolvidos, análise da dureza de superfície através da micro e nanodureza, perfilometria e rugosidade superficial e o uso da microrradiografia. Outros métodos também já foram citados, apresentando grande potencial de análise, entretanto necessitam ser investigados e validados antes do seu emprego como instrumento de avaliação principal. São eles o uso do QLF (*quantitative light-induced fluorescence*) e da Tomografia de Coerência Óptica (OCT – *optical coherence tomography*) (Schlueter et al., 2011). A Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM – *Scanning Electron Microscopy*) é o método qualitativo mais comum nestes tipos de estudo. Além deste, a Microscopia de Força



Atômica (AFM – *Atomic Force Microscopy*) também pode ser vista em recentes estudos.

Esta parte da revisão elucidará aspectos dos métodos de avaliação utilizados neste trabalho.

2.3.1 Perfilometria de superfície

A perfilometria de superfície é um método de avaliação capaz de quantificar a perda de tecido dental em relação a uma área de referência não tratada e promover informações sobre a rugosidade da superfície através de parâmetros R_a e R_q (FIELD et al., 2010). Para análise do perfil, partindo da área de referência para a erodida, a superfície do espécime é escaneada utilizando um dispositivo de contato, com uma ponta de aço ou diamante, ou não-contato, luz laser branca ou azul, gerando assim perfis 2D (Gráfico 1) ou 3D do espécime (SCHLUETER et al., 2011).

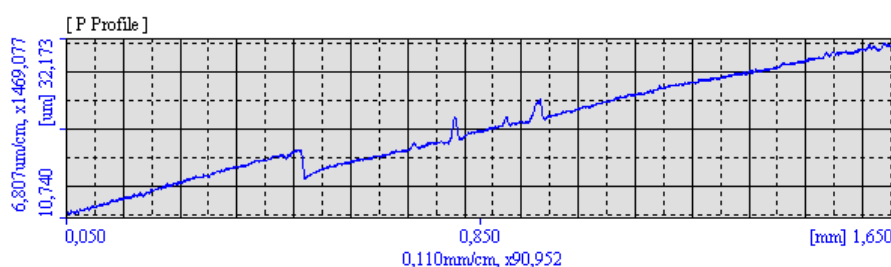


Fig. 1 – Perfil 2D de espécime mostrando batente entre área de referência e erodida (arquivo pessoal).

A perfilometria possui uma maior sensibilidade em superfície planas, normalmente utilizadas em estudos *in vitro*, no entanto, este tipo de avaliação também pode ser realizada em superfícies naturais (sem polimento prévio), apesar da menor acurácia, tornando-a aplicável em estudos de erosão *in vivo* (SCHLUETER et al., 2011). Apesar de ser uma técnica já estabelecida na literatura e considerada padrão em estudos de erosão, a perfilometria possui como

desvantagem a possibilidade de causar danos (riscos) à superfície devido ao deslocamento da ponta mensuradora (perfilometria por contato) durante o escaneamento (HEURICH et al., 2010) (Fig. 1).

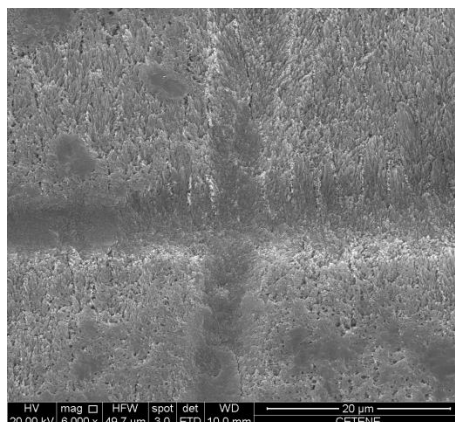


Fig. 2 – Imagem de MEV mostrando riscos causados na superfície do esmalte pela perfilometria por contato (arquivo pessoal).

2.3.2 Tomografia por Coerência Óptica (TCO)

A tomografia por coerência óptica é uma técnica interferométrica de alta resolução capaz de gerar imagens de subsuperfície de espécimes de esmalte (WILDER-SMITH et al., 2009). As primeiras aplicações da TCO nas ciências da saúde foram em oftalmologia, quando Huang et al. (1991) visualizaram, *in vitro*, a área peripapilar da retina e a artéria coronária. O sistema desenvolvido por Huang e colaboradores baseou-se no interferômetro de Michelson e utilizou como fonte de luz o diodo superluminescente de baixa coerência emitindo um comprimento de onda médio de 830 nm.

O interferômetro de Michelson (Fig. 2) consiste em um interferômetro de divisão de amplitude. A luz proveniente da fonte chega a um divisor de feixe (espelho semitransparente) onde é dividida em dois feixes: um dos feixes viaja até o espelho móvel e o outro, viaja até o espelho fixo (que em tomografia por coerência óptica é substituído pela amostra a ser analisada). O feixe de referência viaja até um

espelho móvel, é totalmente refletido e volta em direção ao divisor de feixes. O feixe da amostra é espalhado de acordo com a natureza do tecido, e alguns dos feixes da amostra são retroespalhados na direção da qual foram emitidos rumo ao mesmo divisor de feixes. A luz é retroespalhada ao encontrar diferentes índices de refração referentes a diferentes tipos ou estruturas teciduais (por exemplo, esmalte/dentina, região sadia/erodida) (FELDCHEIN et al., 1998). No divisor, os feixes são recombinados e focalizados para um fotodetector, onde qualquer grau de interferência entre eles pode ser observado, gerando um “A-scan”. Uma sequência de A-scans obtidos ao longo de uma linha gera o B-scan (Fig. 3), que nada mais é do que uma coleção de informações de uma “fatia” da amostra (FACÃO, 1999; BAUMGARTNER et al., 2000).

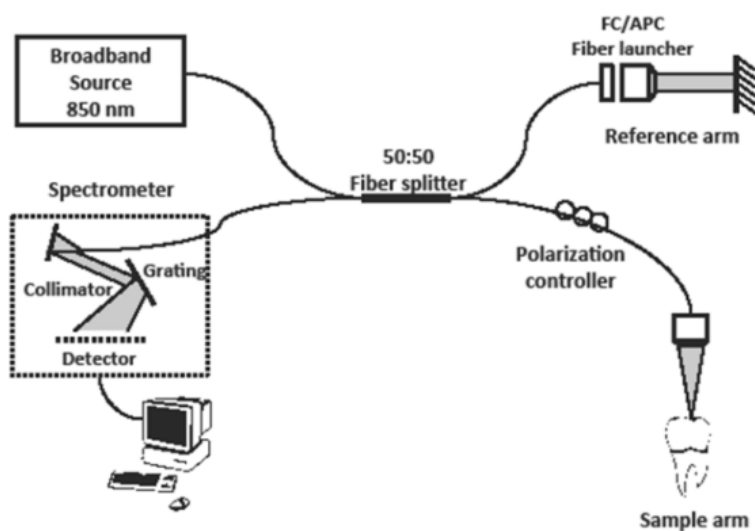


Fig. 3 - Modelo esquemático do sistema de Tomografia por Coerência Óptica (SD-OCT)

As primeiras aplicações em Odontologia datam de 1998 (COLSTON et al., 1998) e, atualmente, tem sido utilizada para diversos fins, como avaliação da interface de restaurações (MELO et al., 2005; MONTEIRO et al., 2011), para o diagnóstico de cárie (FREITAS et al., 2006; MAIA et al., 2010), para análise de materiais dentários (KYOTOKU et al., 2007; BRAZ et al., 2008), detecção precoce

de câncer oral (JUNG et al., 2005), detecção de cáries recorrentes e adaptação marginal de restaurações (OTIS et al., 2000) e caracterização de estruturas periodontais (COLSTON et al., 1998; OTIS et al. 2000).

As principais vantagens do sistema de TCO são o fato de ser uma técnica de geração de imagens não invasiva, não destrutiva, livre da emissão de radiação ionizante e quase em tempo real. A TCO utiliza Diodos Super Luminescentes (SLDs) como fonte de luz. Este tipo de fonte produz luz com uma ampla gama de comprimentos de ondas, e é o comprimento de onda que dita o espalhamento e, portanto, a profundidade de penetração da técnica de imagem. Adicionalmente, o comprimento de onda da luz também interfere na resolução da técnica (BAUMGARTNER et al., 2000). A maioria das técnicas de TCO descritas para tecidos dentários utilizam comprimentos de onda de 840 a 1310 nm, resultando em imagens com profundidade de 0,6 a 2 mm, respectivamente (BAUMGARTNER et al., 2000).

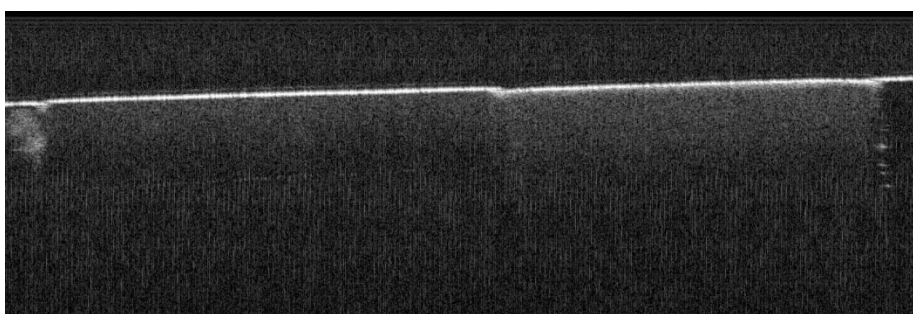


Fig. 4 – Imagem 2D de uma “fatia” da amostra (B-scan) mostrando as diferenças entre o lado de referência (esquerdo) e o lado erodido (direito) – (arquivo pessoal).

2.3.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) tem se mostrado essencial no estudo ultraestrutural de tecidos duros dentários submetidos à erosão (SCHLUETER et al., 2011). O MEV foi uma das primeiras técnicas de avaliação da

desmineralização dental e ainda continua sendo largamente utilizado. As imagens produzidas por MEV possuem uma grande profundidade de campo podendo produzir imagens 3D de alta resolução (FIELD; WATERHOUSE; GERMAN, 2010).

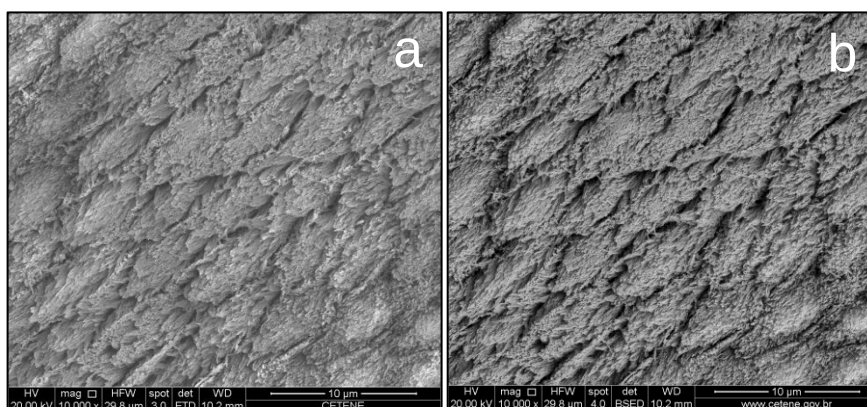
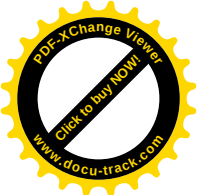


Fig. 5 – **a** Imagem MEV com elétrons secundários. **b** Imagem MEV com elétrons retroespalhados. (Grupo controle)

O MEV convencional utiliza alto vácuo e os espécimes devem ser previamente secos e metalizados com ouro, material que é altamente condutor prevenindo o acúmulo de carga eletrostática (SCHLUETER et al., 2011). O padrão da perda mineral pode ser visualizado por elétrons retroespalhados ou elétrons secundários (Fig. 4_{a,b}) (SCHLUETER et al., 2009).



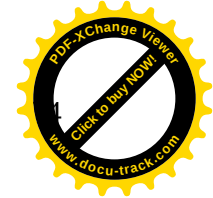
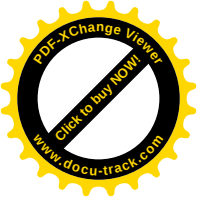
3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito preventivo do laser Nd:YAG utilizado juntamente com um verniz fluoretado na erosão e o efeito do seu uso associado a um creme dental a base de Fluoreto de sódio, além de avaliar o efeito inibidor de diferentes cremes dentais a base de fluoreto de sódio (NaF), fluoreto de estanho (SnF_2) e nano complexo caseína fosfopeptídea e fosfato de cálcio amorfo (CPP-ACP) frente ao processo erosivo.

3.2 Objetivos específicos

- Analisar quantitativamente o efeito protetor dos diferentes agentes;
- Avaliar a rugosidade superficial das amostras antes e após o ensaio erosivo;
- Caracterizar superficialmente o efeito preventivo através de imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV);
- Comparar a efetividade de análise quantitativa da TCO e da Perfilometria.



4 METODOLOGIA

4.1 Locais de estudo

Este estudo experimental foi desenvolvido no Laboratório de Optoeletrônica e Fotônica e na Oficina de Óptica, do Departamento de Física da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, no Centro de Estudos e Pesquisa de Laser em Odontologia – CEPLO – UFPE, no Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste – CETENE e no Laboratório de Comunicação e Laboratório de Química de Interfaces do Departamento de Engenharia de Minas – UFPE.

4.2 Aspectos éticos

O presente trabalho foi submetido à apreciação pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal de Pernambuco e aprovado sob o protocolo nº 23076.045898/2012-17.

4.3 Coleta e seleção dos dentes bovinos

Foram utilizados incisivos bovinos recentemente extraídos, de animais abatidos para consumo no matadouro público do município do Paulista-PE. Uma seleção prévia foi então realizada selecionando-se os 60 melhores dentes, eliminando-se aqueles com trincas, rachaduras e/ou manchas hipoplásica. Os elementos dentários foram desinfetados em solução de cloramina T 0,5%, refrigerados por no mínimo sete dias. Após esse período, os dentes foram limpos com o auxílio de curetas periodontais. Em seguida, foi realizada uma profilaxia com pasta de pedra pomes e água aplicada com escova de Robinson em baixa rotação.

4.4 Preparo dos espécimes

Fragmentos de pelo menos 4 mm X 4 mm foram obtidos da região vestibular mais plana da coroa (Fig. 6), através de secções no sentido cérvico-incisal e no sentido mésio-distal, com o auxílio de disco diamantado dupla face (n.7016, KG Sorensen, Cotia-SP, Brasil), acoplados em peça reta sob refrigeração. Todos os fragmentos eram formados por uma camada de esmalte (superior) e uma camada de dentina (inferior).



Fig. 6 – Fragmento da região vestibular da coroa.

4.5 Confeção dos corpos de prova

Os fragmentos foram incluídos em resina acrílica, de forma a facilitar o manuseio, polimento e as devidas análises. Para isso foram confeccionadas matrizes de silicone. Os fragmentos foram então fixados a uma placa de vidro com auxílio de uma fita adesiva dupla face, sempre com a face de esmalte voltada para baixo (Fig. 7a). Após a devida manipulação, a resina acrílica quimicamente ativada foi vertida na moldeira de silicone (Fig. 7b) e o fragmento, fixado na placa de vidro, vertido ao centro da moldeira (Fig. 7c). Um período de 15 minutos foi aguardado até que houvesse a completa polimerização da resina. Em seguida, os corpos de prova

foram separados da matriz e tiveram seus excessos das bordas removidos com tesoura (Fig. 7d). Todos os corpos de prova permaneceram armazenados em recipientes fechados umedecidos por gases e água destilada até o início da próxima etapa.

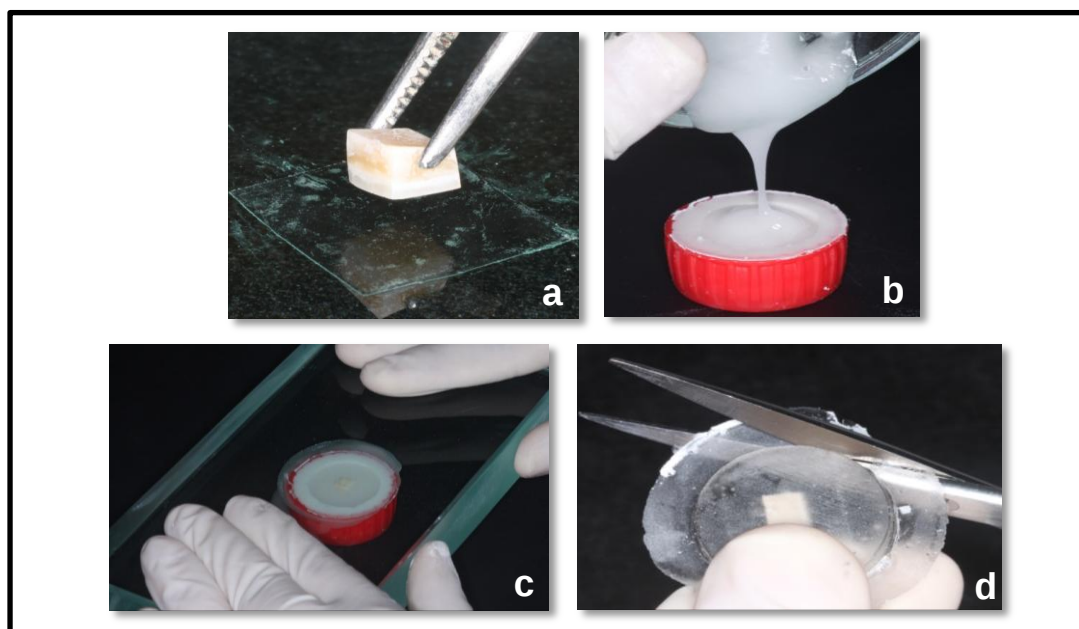


Fig. 7 – Inclusão dos espécimes em resina acrílica.

4.6 Planificação e polimento dos corpos de prova

Os corpos de prova foram levados à poliriz (South Bay Technology, San Clemente, EUA) tendo inicialmente suas bases planificadas para a eliminação de possíveis básculas. A planificação da superfície do esmalte foi realizada com lixas de óxido de alumínio (Wetordry Paper 211Q, 3M, Brasil) de granulação 600 por dois minutos em baixa velocidade e com a lixa 1200 por três minutos em alta velocidade, sendo ambas sob refrigeração com água. Em seguida, foi realizado o polimento da superfície utilizando pano de metalografia SUPRA (Arotec, São Paulo, Brasil) umedecido com uma suspensão de diamante de 1 μm (Buehler, Illinois, EUA), durante 3 minutos, em velocidade alta.



Fig. 8 – Corpo de prova ao final das etapas de planificação e polimento

Entre cada etapa de polimento os corpos de prova foram levados a uma cuba ultrassônica contendo água destilada por dois minutos, para impedir que os grãos das lixas interferissem na qualidade do polimento das lixas seguintes. Ao final do polimento, todos os corpos de prova passaram por um banho final de dez minutos também em cuba ultrassônica com o objetivo de se retirar totalmente o excesso da solução diamantada. Durante a realização destas etapas prévias, todos os corpos de prova foram mantidos em ambiente úmido, com gaze umedecida em água destilada. Na Figura 8 podemos observar o aspecto final de um corpo de prova após o polimento.

4.7 Delimitação da face controle, Fixação e Organização dos corpos de prova

Cada corpo de prova foi subdividido em duas partes, de modo que um dos lados funcionou como uma superfície de teste e o outro como seu respectivo controle (superfície de referência). Para isso, no lado controle, foi aplicada uma camada de esmalte de unhas cosmético e uma camada de protetora de cera pegajosa. Adicionalmente, foi aplicada uma camada de esmalte na face lateral do

corpo de prova (sobre a resina acrílica) no mesmo lado da face de referência, para facilitar a posterior identificação das superfícies a serem avaliadas (referência e teste).



Fig. 9 - Organização dos espécimes em tubos falcon.

Em seguida, todos os corpos de prova foram fixados em tampas de tubos *falcon* de 50 ml por meio de um fio ortodôntico e resina acrílica (Fig. 9).

Tabela 1 – Especificações dos produtos utilizados.

	Excipientes	Agentes ativos
Dentífricos		
Pro-esmalte	Água, sorbitol, sílica, glicerina, nitrato de potássio, PEG-6, cocamidopropil betaína, sabor, goma xantana, sacarina sódica, dióxido de titânio, hidróxido de sódio, limoneno, álcool anis.	NaF – 1425 ppm de F
Pro-Saúde	Glicerina, sílica hidratada, hexametáfosfato sódico, propileno glicol, PEG-6, lactato de zinco, água, fosfato trisódico, aroma, laurel sulfato de sódio, gluconato de sódio, carragenina, dióxido de titânio/cera carnaúba, sacarina sódica, goma xantana, CI 74160.	SnF ₂ – 1100 ppm de F NaF – 350 ppm de F
MI Paste Plus	Água pura, glicerol, D-sorbitol, CMC-Na, Propileno glicol, dióxido de silicone, dióxido de titânio, xylitol, ácido fosfórico, codimentos, sacarina sódica, etil p-hidroxibenzoato, propil p-hidroxibenzoato, butil p-hidroxibenzoato	10% CPP-ACP NaF – 900 ppm de F
Verniz Fluoretado		
Duraphat	Colofônia, álcool etílico, goma-laca, mástica, sacarina, aroma, cera branca de abelha.	NaF - 22.600 ppm de F

Os espécimes foram divididos aleatoriamente em 6 grupos ($n=7$): **NC** – controle negativo (sem tratamento); **LV** – Laser Nd:YAG (Fidelis III Plus, Fotona, Slovenia) + verniz de NaF (Duraphat-Colgate, São Paulo, Brasil); **LV/NaF** – Laser Nd:YAG + verniz de NaF (Duraphat) + Pro-esmalte (Sensodyne, Brasil); **NaF** – Pro-esmalte; **SnF₂/NaF** – Pro-Saúde (Oral B, Alemanha); **CPP-ACP/NaF** – MI Paste Plus (GC, Japão).

4.8 Etapa Experimental

Anteriormente ao ensaio de ciclagem, as amostras dos grupos LV e LV/NaF foram submetidas a irradiação a laser de Nd:YAG (Fidelis III Plus, Fotona, Eslovenia) pertencente ao CEPLO – UFPE. Primeiramente as amostras foram cobertas por uma pasta fotoabsorvente de carvão (Fig. 10a), formada por partículas de carvão de 10 μm de diâmetro diluídas em partes iguais em peso de água deionizada e etanol 99%. A pasta de carvão é utilizada como um meio fotoabsorvente, uma vez que o comprimento de onda do laser Nd:YAG ($\lambda = 1064 \text{ nm}$) não é eficazmente absorvido pelo esmalte dentário. As amostras foram irradiadas por duas vezes de 15 segundos a uma frequência de 10 Hz e uma potência de 1 W em contato com a amostra ($141,5 \text{ J/cm}^2$) (Fig. 10b).

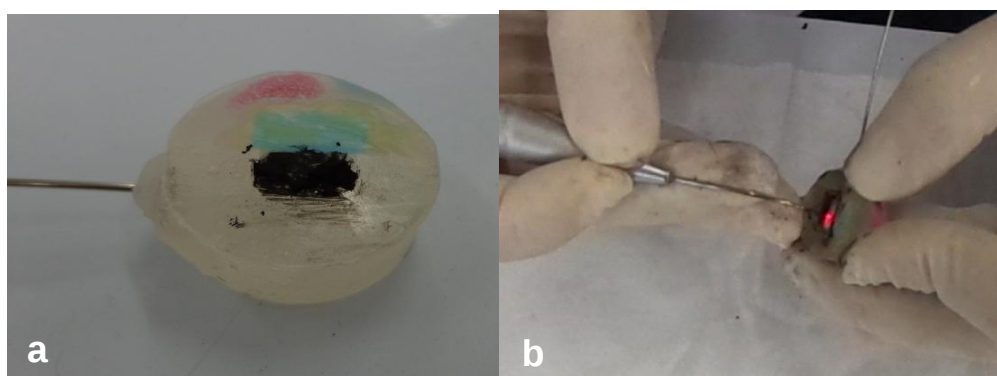


Fig. 10 – a. Superfície teste coberta pela pasta de carvão. **b.** Irradiação a laser do corpo de prova.

Após a irradiação as amostras foram lavadas com água destilada por 15 segundos e secas com jatos de ar. Nesse momento foi aplicada uma camada de um verniz fluoretado (Duraphat – Colgate – NaF 5%), com o auxílio de um microbrush, sobre a área que foi irradiada anteriormente (Fig. 11). O verniz foi deixado sob ação por um período de 4 horas, conforme recomendação do fabricante. Após este, o mesmo foi removido com um lenço de papel embebido de álcool 99%. Em seguida, as amostras foram lavadas com água destilada e armazenadas em saliva artificial 24hrs/37°C juntamente com os outros grupos antes do início da ciclagem. A saliva artificial com pH 7 foi manipulada de acordo com a seguinte formulação: Cloreto de cálcio 0,2205g, Cloreto de potássio 3,725g, Fosfato de potássio dibásico 0,1278g, Hidroxipropilmetilcelulose 0,4% e água purificada em quantidade suficiente para (q.s.p.) 100 ml (Roval Farmácia de manipulação, Recife-PE).

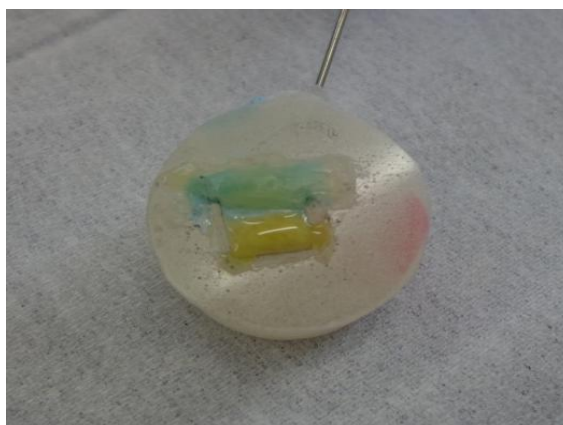


Fig. 11 – Superfície teste coberta por verniz fluoretado.

Passado este período, os espécimes foram lavados com água destilada e tiveram seu excesso removido com papel absorvente. Em seguida, foram submetidos à ciclagem erosiva, realizada em tubos *falcon* conforme cada grupo experimental. Ver grupos experimentais na Tabela 2.

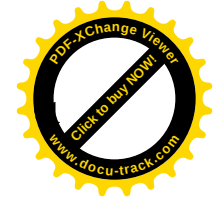
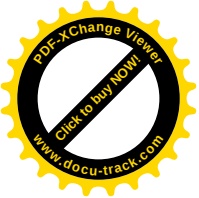


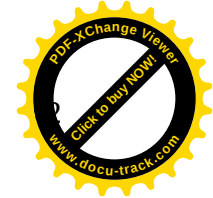
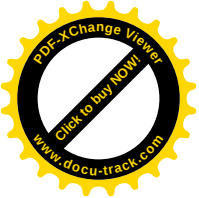
Tabela 2 – Grupos experimentais e seus respectivos tempos de desmineralização e tratamento por dia

	GRUPO	TOTAL DE DIAS	TEMPO DE DESMINERALIZAÇÃO POR DIA	TEMPO DE TRATAMENTO (DENTIFRÍCIO) POR DIA
1	Controle Negativo (NC)	7	5 x 3min	--
2	Laser + Duraphat (LV)	7	5 x 3min	--
3	Laser + Duraphat + Pro-esmalte (LV/NaF)	7	5 x 3min	2 x 2 min
4	Pro-esmalte (NaF)	7	5 x 3min	2 x 2 min
5	Pro-Saúde (SnF ₂ /NaF)	7	5 x 3min	2 x 2 min
6	MI Paste Plus (CPP-ACP/NaF)	7	5 x 3min	2 x 2 min

Seguindo os parâmetros previamente delineados, cada ciclo foi composto de:

- Desmineralização em 25 ml de solução de Ácido Cítrico 0,5% por 3 minutos;
- Lavagem com água destilada por 30 segundos e remoção do excesso de umidade com papel absorvente;
- Tratamento com cremes dentais por 2 minutos nos grupos LV/NaF, NaF, SnF₂/NaF e CPP-ACP/NaF após a primeira e a última solução erosiva do dia;
- Remineralização em 25 ml de saliva artificial por 60 min a 37 °C;
- Lavagem com água destilada por 30 segundos e remoção do excesso de umidade com papel absorvente;

Os cremes dentais foram diluídos em água destilada na proporção de 3:1 em peso para serem utilizados. Após cada dia de ciclagem, os espécimes passaram o período noturno (*overnight*) em saliva artificial a 37 °C. Ao início de cada dia de ciclagem, todas as soluções foram renovadas. Ao final de toda a ciclagem, no último dia, os espécimes permaneceram as últimas 12 horas em saliva e então foram lavados em água destilada por 30 segundos e armazenados em ambiente úmido até o momento dos testes.



4.9 Caracterização Superficial

Para a realização dos testes, a camada de cera e esmalte sobre a superfície de referência foi cuidadosamente removida com auxílio de uma lâmina de bisturi n.15 aplicada nas margens desta camada de forma a facilitar o descolamento através de pinças clínicas. Lenços umedecidos em álcool 99% foram utilizados para a remoção de possíveis resquícios de esmalte de unha sobre os espécimes. Todas as amostras foram cuidadosamente observadas em microscópio óptico para a observação destes possíveis resquícios.

4.9.1 Tomografia de Coerência Óptica (TCO)

A profundidade de desgaste foi determinada através da obtenção de imagens 2D obtidas de montagem comercialmente disponível (Spectral Radar SR-OCT:OCP930SR/ Thorlabs, New Jersey, USA). Nesta montagem, a fonte de luz consiste num diodo superluminescente (SLD) com comprimento de onda central de 930nm. Este sistema é composto de três partes principais: uma peça de mão (*scanning probe*), uma unidade base e um computador. A unidade base contém fonte de luz (SLD). Um adaptador de fibra ótica é utilizado para direcionar a luz do SLD ao interferômetro de Michelson, que se encontra localizado no interior da peça de mão (*scanning probe*). A luz refletida pela sonda e pelo espelho de referência é recombinada através de uma mesma fibra ótica até o espectrômetro e sensor de imagem localizado na unidade base. Esta unidade, apresenta-se conectada a um computador o qual é equipado com dois cartões de aquisição de dados de alta performance. Toda a aquisição de dados assim como os processamentos necessários é realizada via *software* específico. A maior profundidade deste sistema é de 1.6 mm e em largura é de 6.0 mm, com uma resolução axial de 6.2 μm .

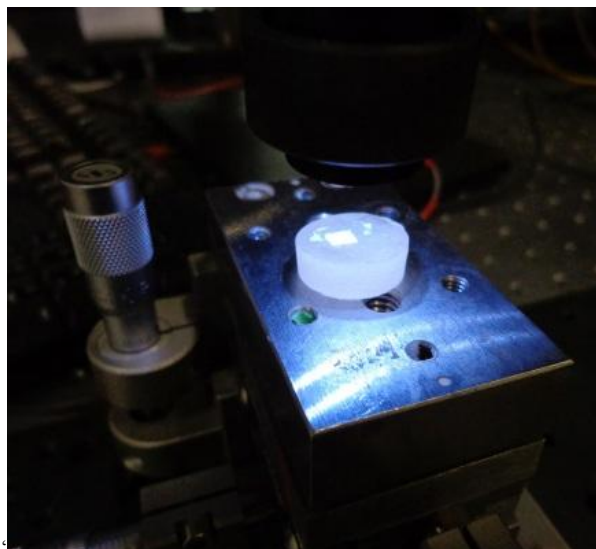
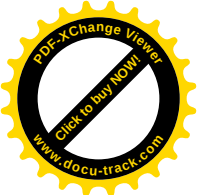


Fig. 12 – TCO realizando leitura de corpo de prova

Após a secagem dos espécimes, os mesmos foram posicionados na mesa de trabalho, com o auxílio da câmera CCD acoplada ao sistema e o translador micrométrico nos eixos X, Y e Z, de forma que a interface entre a superfície sadia e erodida ficasse perpendicular à linha de varredura (Fig. 12). Para todas as amostras, a varredura foi realizada da superfície erodida para a superfície de referência, observando a marcação feita com esmalte na lateral do corpo de resina acrílica.

De forma a garantir uma média de perda mineral, foram realizados um total de cinco varreduras 2D de 5 mm no eixo Y, transladando no eixo X uma distância de 0,5mm entre cada imagem. Desta forma, de cada amostra foram obtidas imagens transversais simultâneas de ambas as superfícies (erodida e referência), o que permitiu a visualização das modificações estruturais comparativas de acordo com o comportamento da luz ao retornar do tecido sadio e erodido. Essa análise de caracterização estrutural foi complementada através das imagens obtidas no modo 3D (Ganymede Spectral Domain SD-OCT/ Thorlabs, New Jersey, USA), comparando a reflexão nas imagens *en-face* das interfaces.



Considerando que a imagem de TCO é gerada a partir dos picos de reflexão no tempo, pode-se mensurar distâncias com resolução em torno de 6 μm . Desta forma, em um segundo momento, os cortes transversais 2D foram avaliados com o auxílio do programa de processamento e análises em JAVA (Image J – *image processing and analysis in JAVA*). As imagens foram colocadas em escalas de alta resolução, sendo possível mensurar a discrepância da possível perda mineral ocorrida na superfície submetida ao teste erosivo, tendo como referencia a altura da superfície sadia. A mensuração do possível batente foi realizada nas 5 imagens transversais obtidas de cada corpo de prova, por dois avaliadores previamente calibrados, e a média da profundidade, representa o desgaste calculado em micrometros.

4.9.2 Perfilometria por contato

Estas análises foram realizadas através de rugosímetro (SJ-400, Mitutoyo, Japão) conectado a um microcomputador com o software SURFPAK – SJ Version 1.300. A análise do desgaste sofrido pela superfície teste em relação ao lado controle (protegido pelo esmalte de unha) foi realizada através da avaliação do perfil. Após a remoção dos corpos de prova do ambiente úmido, os mesmos foram secos de forma suave com papel absorvente e fixados sobre uma placa de vidro. Cinco leituras foram realizadas em cada fragmento da superfície de referência (lado controle), atravessando a superfície exposta (lado experimental), percorrendo um total de 2,5 milímetros, com resolução transversal de 1 μm (Fig. 13).

Os dados dos perfis foram salvos como arquivo .xls, e reanalisados através da plotagem do gráfico do perfil através do software Origin 8.0 (Microcal Software Inc, Northhampton, USA). A média da profundidade de desgaste foi obtida pela

distância em micrômetros entre a regressão linear da superfície de referência e um ponto médio da regressão linear da superfície erodida.

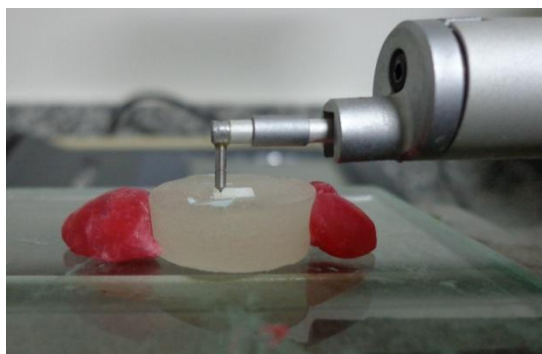
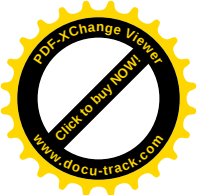


Fig. 13 – Perfilômetro realizando leitura de corpo de prova

Para a aferição da rugosidade superficial, dois traços perfilométricos foram realizados em cada lado do espécime percorrendo um total de 2,4 mm, com cut-off de 0.25 mm. O parâmetro considerado para análise estatística foi o Ra (Rugosidade Média).

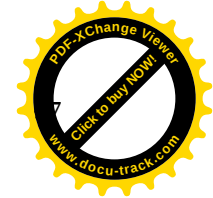
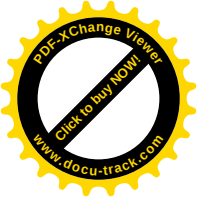
4.9.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Dois espécimes de cada grupo foram escolhidos aleatoriamente e novamente imersos em solução de ácido cítrico 0,5% durante 2 minutos e então levados ao ultrassom por 3 minutos, lavados com água destilada por 1 minuto e secos. Os espécimes foram então montados em *stubs*, e, em seguida, metalizados com ouro (Sputter Coater SCD 050 Bal-Tec). A superfície de esmalte foi analisada por meio de Microscópio Eletrônico de Varredura (FEI, Quanta 200 FEG, Oregon, USA), localizado no CETENE com 10000x de aumento no modo elétron secundário (SE). As imagens obtidas foram avaliadas qualitativamente de forma a observar as alterações provocadas pela erosão.



4.10 Avaliação estatística

Os dados foram tabulados em planilha Excel (Microsoft Office 2007) e analisados no programa SPSS na versão 13 (*Statistical Package for the Social Sciences*, Chicago, USA). Foram obtidas medidas estatísticas e aplicado o teste de *Komogorov Smirnov* para avaliação da normalidade dos dados. O teste de Wilcoxon foi realizado na comparação de diferentes momentos, o teste de Mann-Whitney para comparação entre as técnicas e o teste ANOVA para comparação entre os grupos. Todos os testes foram aplicados com 95% de confiança.



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMAECHI, B.T.; HIGHAM, S.M. Dental erosion: possible approaches to prevention and control. **J Dent**, v. 33, p. 243-252, 2005.

ATTIN, T.; ZIRKEL, C.; HELLWIG, E. Brushing abrasion of eroded dentin after application of sodium fluoride solutions. **Caries Res**, v. 32, n. 5, p. 344-50, 1998.

AZARPAZHOOH A, LIMEBACK H: Clinical efficacy of casein derivatives: a systematic review of the literature. **JADA**, v.139, p.915-24, 2008.

BAUMGARTNER, A.; DICHTL, S.; HITZENBERGER, C. K.; SATTMANN, H.; ROBL, B.; MORITZ, A.; FERCHER, A. F.; SPERR, W. Polarization-sensitive optical coherence tomography of dental structures. **Caries Res**, v.34, n.1, p.59-69, Jan-Fev. 2000.

BRAZ, A. K.; KYOTOKU, B. B.; BRAZ, R.; GOMES, A. S. L. Evaluation of crack propagation in dental composites by optical coherence tomography. **Dent Mater**. 2008. doi: 10.1016/j.dental.2008.04.011.

CHEN, CC.; HUANG, ST. The Effects of Lasers and Fluoride on the Acid Resistance of Decalcified Human Enamel. **Photomedicine and Laser Surgery**, v.27, n.3, p.447-452, 2009.

COLSTON JR, B. W.; EVERETT, M. J.; DA SILVA, L. B.; OTIS, L. L.; STROEVE, P.; NATHEL, H. Imaging of hard- and soft-tissue structure in the oral cavity by optical coherence tomography. **Applied Optics**. v.37, n.16, p. 3582-3585. Jun. 1998.

ECCLES, J.D. Tooth surface loss from abrasion, attrition and erosion. **Dent Update**, p.373-381, 1982.

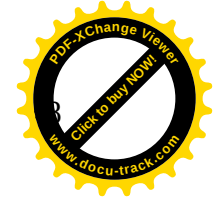
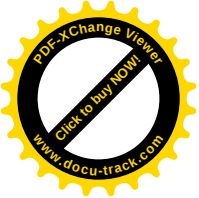
FACÃO, M. **Interferômetro de Michelson**: Princípios e Aplicações. 1999. 71f. Dissertação (Mestrado). Universidade de Aveiro, Aveiro, 1999.

FELDCHEIN, F. I.; GELIKONOV, G. V.; GELIKONOV, V. M.; IKSANOV, R. R.; KURANOV, R. V.; SERGEEV, A. M. In vivo OCT imaging of hard and soft tissue of the oral cavity. **Optics Express**, v.3, n.6, p. 239-250, Set. 1998.

FIELD, J.; WATERHOUSE, P.; GERMAN, M. Quantifying and qualifying surface changes on dental hard tissues in vitro. **J Dent**, v.38, p.182-190, 2010.

FREITAS, A. Z.; ZECELL, D. M.; VIEIRA JR., N. D.; RIBEIRO, A. C.; GOMES, A. S. L. Imaging carious human dental tissue with optical coherence tomography. **J. of Appl. Phys.** v.99, p.024906/1-6, 2006.

GANSS, C.; KLIMEK, J.; SCHAFFER, U.; SPALL, T. Effectiveness of Two Fluoridation Measures on Erosion Progression in Human Enamel and Dentine in vitro. **Caries Res**, v.35, p.325-330, 2001.



GANSS, C.; KLIMEK, J.; BRUNE, V.; SCHUMANN, A. Effects of two fluoridation measures in erosion progression on enamel and dentin in situ. **Caries Res**, v. 38, p.561-6, 2004.

GANSS, C.; KLIMEK, J.; STARCK, C. Quantitative analysis of the impact of the organic matrix on the fluoride effect on erosion progression in human dentine using longitudinal microradiography. **Arch Oral Biol**, v. 49, p. 931-5, 2004.

GANSS, C.; SCHLUETER, N.; HARDT, M.; SCHATTENBERG, P.; KLIMEK, J. Effect of fluoride compounds on enamel erosion in vitro: a comparison of amine, sodium and stannous fluoride. **Caries Res**, v. 42, p. 2-7, 2008.

HANNIG, C.; HANNIG, M.; ATTIN, T. Enzymes in the acquired enamel pellicle. **Eur J Oral Sci**, v.113, p.2-13, 2005.

HANNIG, M.; BALZ, M. Influence of in vivo formed salivary pellicle on enamel erosion. **Caries Res**, v.33, p.372-379, 1999.

HUANG, D.; SWANSON, E. A.; LIN, C. P.; SCHUMAN, J. S.; STINSON, W. G.; CHANG, W.; HEE, M. R.; FLOTTE, T.; GREGORY, K.; PULIAFITO, C. A.; FUJIMOTO, J. G. Optical coherence tomography. **Science**. v.254, n.5035, p. 1178-1181, Nov. 1991.

HEURICH, E.; BEYER, M.; JANDT, K.D.; REICHERT, J.; HEROLD, V.; SCHNABELRAUCH, M.; SIGUSCH, B.W. Quantification of dental erosion—A comparison of stylus profilometry and confocal laser scanning microscopy (CLSM). **Dent Mater**, v.26, p.326-336, 2010.

HJORTSJÖ, C.; JONSKI, G.; THRANE, P.S.; SAXEGAARD, E.; YOUNG, A. Effect of Stannous Fluoride and Dilute Hydrofluoric Acid on Early Enamel Erosion over Time in vivo. **Caries Res**, v.43, p.449-454, 2009.

HOSSAIN, M.; NAKAMURA, Y.; KIMURA, Y.; YAMADA, Y.; KAWANAKA, T.; MATSUMOTO, K. Effect of pulsed Nd:YAG laser irradiation on acid demineralization of enamel and dentin. **J Clin Laser Med Surg**, v. 19, p. 105–108, 2001.

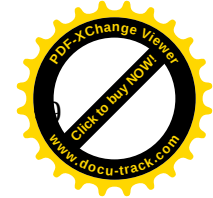
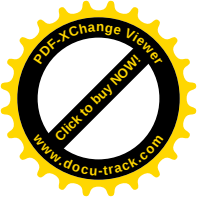
HOVE LH, HOLME B, YOUNG A, TVEIT AB: The protective effect of TiF₄, SnF₂ and NaF against erosion-like lesions in situ. **Caries Res**, v.42, p.68–72, 2008.

HOVE LH, YOUNG A, TVEIT AB: An in vitro study on the effect of TiF₄ treatment against erosion by hydrochloric acid on pellicle-covered enamel. **Caries Res**, v.41, p.80–84, 2007.

HUYSMANS, M.C.D.N.J.M.; CHEW, H.P.; ELLWOOD, R.P. Clinical studies of dental erosion and erosive wear. **Caries Res**, v.45, suppl 1, p.60-68, 2011.

IMFELD, T.N. Dental erosion. Definition, classification and links. **Eur J Oral Sci**, v.104, n.2, p.101-5, 1996.

JAEGGI, T.; LUSSI, A. Toothbrush abrasion of erosively altered enamel after intraoral exposure to saliva: an in situ study. **Caries Res**, v.33, n.6, p.455-61, 1999.



JAEGGI, T.; LUSSI, A. Prevalence, incidence and distribution of erosion. **Monogr Oral Sci**, v. 20, p. 44-65, 2006.

JUNG, W. et al. Advances in Oral Cancer Detection Using Optical Coherence Tomography. **IEEE journal of selected topics in quantum electronics**. v.11, n.4, p.811-816, Jul/Ago. 2005.

KWON, Y.H.; KWON, O.W.; KIM, H.I.; KIM, K.H. Nd:YAG laser ablation and acid resistance of enamel. **Dent Mater J**, v. 22, p. 404–411, 2003.

KYOTOKU, B. B. C.; BRAZ, A. K. S.; BRAZ, R.; GOMES A. S. L. Fiber-reinforced composite analysis using optical coherence tomography after mechanical and thermal cycling. **Proc. SPIE**. v.6425, 64250B, 2007.

LAGERWEIJ MD, BUCHALLA W, KOHNKE S, BECKER K, LENNON AM, ATTIN T. Prevention of erosion and abrasion by a high fluoride concentration gel applied at high frequencies. **Caries Res**. 2006;40:148-53.

LARSEN, M.J.; RICHARDS, A. Fluoride is unable to reduce dental erosion from soft drinks. **Caries Res**, v. 36, p. 75-80, 2002.

LUSSI, A. Dental erosion clinical diagnosis and case history taking. **Eur J Oral Sci**, v.104, n.2, p.191-8, 1996.

LUSSI, A.; HELLWIG, E. Risk assessment and preventive measures. **Monogr Oral Sci**, v.20, p.190-199, 2006.

LUSSI, A.; JAEGGI, T.; ZERO, D. The role of diet in the aetiology of dental erosion. **Caries Res**, v.38, supl 1, p.34-44, 2004.

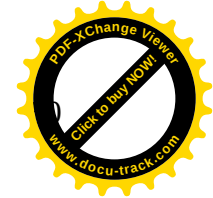
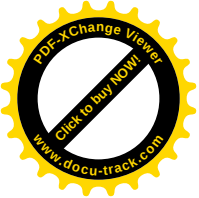
LUSSI, A.; SCHLUETER, N.; RAKHMATULLINA, E.; GANSS. C. Dental erosion – an overview with emphasis on chemical and histopathological aspects. **Caries Res**, v.45, p.2–12, 2011.

MAGALHÃES, A.C.; ROMANELLI, A.C.; RIOS, D.; COMAR, L.P.; NAVARRO, R.S.; GRIZZO, L.T.; ARANHA, A.C.C.; BUZALAF, M.A.R. Effect of a Single Application of TiF 4 and NaF Varnishes and Solutions Combined with Nd:YAG Laser Irradiation on Enamel Erosion in Vitro. **Photomedicine and Laser Surgery**, v.29, n.8, p.537-544, 2011.

MAIA, A.M.; FONSÊCA, D.D.; KYOTOKU, B.B.; GOMES, A.S. Characterization of enamel in primary teeth by optical coherence tomography for assessment of dental caries. **International Journal of Paediatric Dentistry**, v.20, p.158-64, 2010.

MELO, L.S.A.; ARAUJO, R.E.; FREITAS, A.Z.; ZECELL, D.; VIEIRA. JR. N.D.; GIRKIN, J.; HALL, A.; CARVALHO, M.T.; GOMES, A.S.L. Evaluation of enamel dental restoration interface by optical coherence tomography. **Journal of Biomedical Optics**, v.10, n.6, p.064027, 2005.

MOAZZEZ, R.; BARTLETT, D.; ANGGIANSAH, A. Dental erosion, gastro-oesophageal reflux disease and saliva: how are they related? **J Dent**, v.32, n.6, p.489-94, 2004.



MONTEIRO, G.Q.M.; MONTES, M.A.J.R.; ROLIM, T.V.; MOTA, C.C.B.O.; KYOTOKU, B.B.C.; GOMES, A.S.L.; FREITAS, A.Z. Alternative methods for determining shrinkage in restorative resin composites. **Dent Mater**, v.27, p.176–85, 2011.

OTIS, L.L.; EVERETT, M.J.; SATHYAM, U.S.; COLSTON JR, B.W. Optical coherence tomography: a new imaging technology for dentistry American **Dental Association**, v. 131, p. 511-514, 2000.

POGGIO C, LOMBARDINI M, COLOMBO M, BIANCHI S: Impact of two toothpastes on repairing enamel erosion produced by a soft drink: an AFM in vitro study. **J Dent**, v.38, p.868-74, 2010.

RANJITKAR, S.; RODRIGUEZ, J.M.; KAIDONIS, J.A.; RICHARDS, L.C.; TOWNSEND, G.C.; BARLETT, D.W. The effect of the casein phosphopeptide-amourphous calcium phosphate on erosive enamel and dentine wear by toothbrush abrasion. **J Dent**, v.37, p.250-254, 2009.

RESEARCH, MARKET: **Soft Drinks in the BRIC** (Brazil, Russia, India, China) Countries – Market overview and forecasts to 2013.
(<http://www.researchandmarkets.com>)

REES, J.; LOYN, T.; CHADWICK, B. Proenamel and tooth nousse: an initial assessment of erosion prevention in vitro. **J Dent**, v. 35, p. 155-57, 2007.

RIOS, D.; MAGALHÃES, A.C.; MACHADO, M.A.A.M. et al. In vitro evaluation of enamel erosion after Nd:YAG laser irradiation and fluoride application. **Photomed Laser Surg**, v. 27, p. 743–747, 2009.

SAXEGAARD, E.; ROLLA, G. Fluoride acquisition on and in human enamel during topical application in vitro. **Scand J Dent Res**, v. 96, p. 523-35, 1988.

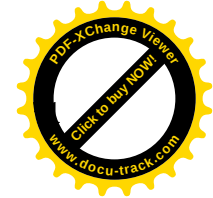
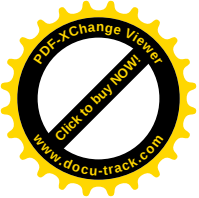
SCHLUETER N, GANSS C, MUELLER U, KLIMEK J: Effect of titanium tetrafluoride and sodium fluoride on erosion progression in enamel and dentine in vitro. **Caries Res**, v.41, p.141–145, 2007.

SCHLUETER, N.; DURAN, A.; KLIMEK, J.; GANSS, C. Investigation of the effect of various fluoride compounds and preparations thereof on erosive tissue loss in enamel in vitro. **Caries Res**, v. 43, p. 10-16, 2009.

SCHLUETER, N.; HARA, A.; SHELLIS, R.P.; GANSS, C. Methods for the measurement and characterization of erosion in enamel and dentine. **Caries Res**, v.45, supl 1, p.13-23, 2011.

SHELLIS, R.P.; DUCKWORTH, R.M. Studies on the cariostatic mechanism of fluoride. **Int Dent J**, v.44, p.263-273, 1994.

SOBRAL, MAP; LACHOWSKI, KM; ROSSI, W; BRAGA, SRM; RAMALHO, KM. Effect of Nd:YAG Laser and Acidulated Phosphate Fluoride on Bovine and Human Enamel Submitted to Erosion/Abrasion or Erosion Only: An in Vitro Preliminary Study. **Photomedicine and Laser Surgery**, v.27, n.5, p.709-13, 2009.



TAGOMORI, S.; AND IWASE, T. Ultrastructural change of enamel exposed to a normal pulsed Nd:YAG laser. **Caries Res**, v. 29, p. 513–520, 1995.

TEN CATE, J.M. et al. Chemical interactions between the tooth and oral fluids In FEJERSKOV, O.; KIDD, E.A.M. **Dental Caries**. The Disease and Its Clinical Management, p. 9-69, 2003.

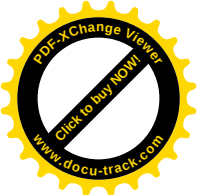
WEST, N.X.; DAVIES, M.; AMAECHI, B.T. In vitro and in situ erosion models for evaluating tooth substance loss. **Caries Res**, v.45, supl 1, p.43-52, 2011.

WIEGAND, A.; ATTIN, T. Influence of fluoride on the prevention of erosive lesions – a review. **Oral Health Prev Dent**, v. 1, p. 245-253, 2003.

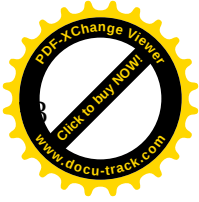
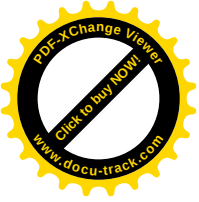
WILDER-SMITH, C.H.; WILDER-SMITH, P.; KAWAKAMI-WONG, H.; VORONETS, J.; OSANN, K.; LUSSI, A. Quantification of dental erosions in patients with GERD using optical coherence tomography before and after double-blind, randomized treatment with esomeprazole or placebo. **Am J Gastroenterol**, v.104, p.2788-2795, 2009.

WILLUMSEN, T.; OGAARD, B.; HANSEN, B.F.; RØLLA, G. Effects from pretreatment of stannous fluoride versus sodium fluoride on enamel exposed to 0.1 M or 0.01 M hydrochloric acid. **Acta Odontologica Scandinavica**, v.62, n.5, p.278-81, 2004.

ZERO, D.T.; LUSSI, A. Etiology of enamel erosion – intrinsic and extrinsic factors In ADDY, M.; EMBERY, G.; EDGAR, W.M. et al: **Tooth wear and sensitivity**. London, 2000. p.121-139.



Artigo



Article to Caries Research

Characterization of anti-erosive potential of fluorides and Nd: YAG laser: an *in vitro* study

P.F. Cassimiro-Silva^a A.M.A. Maia^a G.Q.M. Monteiro^b A.S.L. Gomes^b

^aDepartment of Prosthodontics and Oral-Facial Surgery, Recife, Universidade Federal de Pernambuco

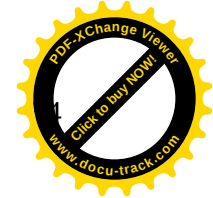
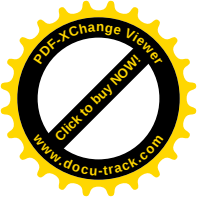
and ^bDepartment of Physics, Recife, Universidade Federal de Pernambuco

Key Words

Enamel erosion; Fluoride; Nd:YAG Laser; Optical coherence tomography

Abstract

The aim of the study was to evaluate the preventive effect of Nd:YAG laser used in conjunction with a fluoride varnish on erosion and effectiveness of its association with the use of a NaF-toothpaste, besides evaluate the inhibitory effect of different toothpastes (NaF, SnF₂ and CPP-ACP) against the erosive process. Along with this, verify that the optical coherence tomography (OCT) is a quantitative method to be used for assessment of enamel erosion. Specimens were randomly allocated into one of the 6 experimental groups (n=7): Preventive groups: NC – negative control (no treatment); LV – Nd:YAG laser + NaF varnish; LV/NaF – Nd:YAG laser + NaF varnish + Pro-esmalte (NaF); NaF – Pro-esmalte; SnF₂/NaF – Pro-Saúde; CPP-ACP/NaF – MI Paste Plus. The LV/NaF and LV groups were irradiated with Nd: YAG laser (10 Hz, 1W, 141,5 J/cm²) for 30 sec and then fluoride varnish was applied for 4 hours. The erosive cycling was performed in a solution of citric acid 0,5% (pH 2,6) 5 x 3 min daily, followed by exposure to toothpaste for 2 minutes after the first and last cycling of each day in all groups, except for LV and NC groups. Quantitative analysis

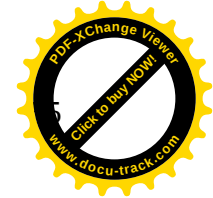
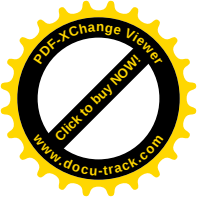


was performed by using contact profilometry and optical coherence tomography, complemented by qualitative analysis of scanning electron microscopy. Among the methods tested, the combination laser / varnish / pro-enamel proved a good preventive strategy, with greater lowering effect of mineral loss. Among the toothpaste in both quantitative methods of evaluation, CPP-ACP/NaF was showed the lowest reducing effect of erosion, however the toothpaste-based SnF₂/NaF showed good results. Both evaluation methods were effective, with no significant statistical differences.

Corresponding Author: Graduate Student Patricia Fernandes Cassimiro da Silva, Universidade Federal de Pernambuco, Physics Departament, Av. Prof Luis Moraes Rego, S/N, Cidade Universitária, Recife, Pernambuco, Brazil. CEP 50670-901; e-mail: patfcs@gmail.com; Fax: [+55-81-32710359](tel:+55-81-32710359)

Introduction

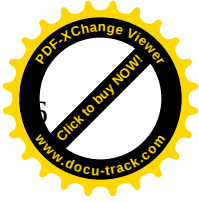
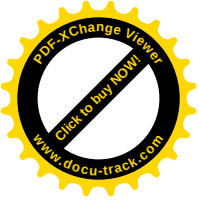
The structure of enamel is composed of crystalline calcium phosphate prisms, known as hydroxyapatite. In contact with several acids, the hydroxyapatite is easily disintegrated into calcium, phosphate and hydroxyl ions [Hichs, Garcia-Godoy and Flaitz, 2004]. Because there is no cell in its composition, the enamel of adults has no biological means of repairing any damage suffered in its structure. Thus, any form of compensation can only be performed by external means [Poggio et al., 2010]. Different approaches to prevention and treatment of enamel erosion have been discussed [Amaechi and Higham, 2005], and despite the controversy in the literature, the most recommended method for inhibiting demineralization and increasing the acid resistance seems to be the frequent use of fluoridated compounds [Wiegand and Attin, 2003].



Many studies investigated the protective effect of fluoride on erosion using fluoride compounds widely used in caries prevention as NaF, AmF, SnF₂ or acidulated phosphate fluoride [Magalhães et al., 2008a]. Due to its ability to adhere to the tooth surface and form reserves of calcium fluoride, fluoride varnishes may be more effective when compared to other administration forms [Vieira et al., 2007], but, normally, they can only be administrated by dentists. According to Ganss et al. [2004] the frequent use of high amounts of fluoride seems to be the most effective procedure for the treatment of erosion. Thus, toothpastes used continuously a few times a day by the patient also seems to be an effective treatment.

Recent studies have shown some effect of NaF toothpastes [Ganss et al., 2011], but the Sn-containing toothpastes appears to be more effective than conventional NaF toothpastes [Hooper et al., 2007]. Tin has the ability to react with and modify the tooth surface making it more resistant [Schlueter, Klimek and Ganss, 2009a]. Several studies have been conducted on treatments with stannous ions combined with fluoride toothpastes and have shown very promising results [Young et al., 2006; Hooper et al., 2007; Ganss et al., 2011; Ganss et al., 2012].

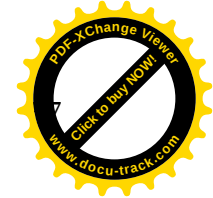
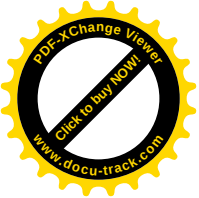
In recent years, research has also been performed using casein phosphopeptide/amourphous calcium phosphate (CPP-ACP) to reduce erosion in tooth surfaces [Rees, Loyn and Chadwick, 2007; Poggio et al., 2009; Wegehaupt and Attin, 2010], and some studies showed a protective effect of CPP-ACP toothpastes against erosive [Rees, Loyn and Chadwick, 2007; Poggio et al., 2010] and erosive/abrasive tooth wear [Ranjitkar et al., 2009]. Casein is a phosphoprotein derived from milk [Azarpazhooh and Limeback, 2008] and is capable of carrying ions of calcium and phosphate to the tooth surface, stimulating remineralization [Rees, Loyn and Chadwick, 2007].



Application of high-intensity ($\sim 100\text{-}200\text{ J/cm}^2$) laser radiation could be another way for preventing dental erosion by improving the effect of different fluoride compounds [Rios et al., 2009]. Several studies demonstrate the favorable effect of Nd: YAG laser on acid resistance of the hard dental tissue [Magalhães et al., 2008b, 2011; Rios et al., 2009]. The Nd:YAG laser is responsible for melting the enamel surface, which reduces the diffusion acids [Hossain et al., 2001].

Preventive and/or interceptive effects can be studied by several qualitative and quantitative methods. Quantitative methods such as roughness, microhardness and profilometry are widely used, the latter being the most common [Schlueter et al., 2011]. Optical techniques seem to be an option for non-destructive analyses and the optical coherence tomography (OCT) is a technique with great potential for analysis that has been used in dentistry, including the assessment of incipient caries lesions [Maia et al., 2010]. The OCT is an imaging method capable of producing high resolution cross-sectional images of tissue and is based on the coherence features of photons [Freitas et al., 2006]. However, this technique still has to be implemented as a means of surface analysis enamel eroded. Qualitative methods such as scanning electron microscopy (SEM) and atomic force microscopy (AFM) are also quite common in these studies.

The aim of this study was therefore to test the efficacy of different toothpastes containing NaF, SnF or CPP-ACP with respect to their potential for inhibiting erosion and the preventive effect of the use of Nd:YAG Laser along with a NaF varnish associated a NaF toothpaste. Besides, check that the OCT can be a quantitative method to be used for assessment of enamel erosion and examining the enamel surface eroded by scanning electron microscopy.



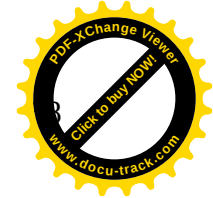
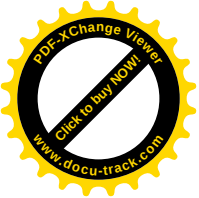
Materials and Methods

Specimen Preparation

Forty two specimens were prepared from freshly bovine lower incisors that were visually examined to confirm the absence of physical damage such as surface texture or cracks. Teeth were sectioned at the enamel/cementum junction with a water-cooled diamond disc. Longitudinal and horizontal sections were performed at the flattest area of the crown in order to obtain specimens of at least 4 x 4 mm. To facilitate the handling of the specimens throughout the experiment, specimens were inserted in acrylic resin. The outer surface of the enamel specimens were then grounded flat with water-cooled sandpaper of decreasing grit (600, 1200) and polished with a metallographic polishing cloth (SUPRA – Arotec, São Paulo-SP, Brazil) moistened with 1µm diamond polishing suspension (Buehler, Illinois, EUA).

For each specimen, half enamel surface was protected with cosmetic nail varnish and a sticky wax layer. This procedure ensured the establishment of a reference surface for further evaluation of enamel loss. To avoid dehydration, specimens were then stored in a moist environment/ 37°C until the beginning of the experiment.

Specimens were randomly allocated into one of the 6 experimental groups (n=7): **NC** – negative control (no treatment); **Preventive groups** (samples were irradiated previously the erosion cycle): **LV** –Nd:YAG Laser (Fidelis III Plus, Fotona, Slovenia) + NaF varnish (Duraphat-Colgate, São Paulo, Brazil, 5 % NaF (22.600 ppm of F), pH 4.5; **LV/NaF** – Nd:YAG Laser + NaF varnish + Pro-esmalte (Sensodyne, Brazil, NaF – 1425 ppm of F); **Interceptive groups** (samples were exposed to fluoride toothpaste after the erosion cycle began): **NaF** – Pro-esmalte; **SnF₂/NaF** –



Pro-Saúde (Oral B, Germany, SnF_2 – 1100 ppm of F and NaF – 350 ppm of F); **CPP-ACP/NaF** – MI Paste Plus (GC, Japan, 10% CPP-ACP and NaF – 900 ppm of F).

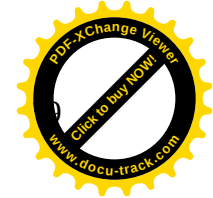
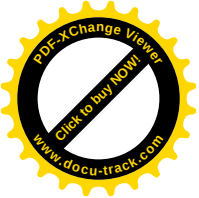
Nd:YAG laser treatment and Fluoride varnish application

Before each laser irradiation, a very thin layer (~100µm) of a photoabsorber coal paste was applied over the enamel surface with a microbrush. This paste contained 10 µm coal particles diluted in equal parts of deionized water and 99% ethanol [Boari et al., 2009]. Two irradiations of 15 seconds were then performed in each specimen of the groups LV and LV/NaF with a Nd:YAG laser (1064 nm, 10 Hz, 1 W, 141.5 J/cm²) by one previously calibrated operator, using contact mode with the fiber optics (300 mm in diameter) positioned perpendicular to the substrate. The specimens were then rinsed with distilled water for 1 min and dried with air jets before applying the fluoride varnish.

The varnish was applied in a thin layer using a microbrush. After 4 h, the varnish was carefully removed using scalpel blade and alcohol 99%, taking care to avoid touching the enamel surface. Specimens were then stored in artificial saliva for 24 h before the beginning of erosive challenge. The artificial saliva was composed of calcium chloride 0.2205 g, potassium chloride 3.725 g, potassium phosphate dibasic 0.1278 g, hidroxipropilmetilcelulose 0.4% q.s.p 1000 ml.

Erosive cycling

Over a 7-day experimental period, the enamel specimens were submitted to a cyclic de- and re-mineralization. The erosive demineralization was performed 5 times/day, for 3 min in 25 ml citric acid 0,5% (pH 2.6). After each cycle, specimens were rinsed with distilled water for 30 s and stored in 25 ml artificial saliva for 1 h. The group NC was only submitted to a cyclic de- and re-mineralization. After the first



and the last cycle of the day, the specimens from groups LV/NaF, NaF, SnF₂/NaF and CPP-ACP/NaF were covered with 3 ml of their corresponding toothpaste slurries group for 2 min. Toothpaste slurries were obtained by dilution in distilled water, always following a 3:1 in weight proportion. After remineralization, specimens were rinsed with distilled water for 30 s. After the last cycle, specimens were stored in 37°C artificial saliva overnight. At the end of the last day the specimens were stored in artificial saliva for 12 h and then rinsed with distilled water for 30 s and stored in moist environment.

Tissue loss measurement

The nail varnish/ sticky wax were removed from the reference areas with the aid of alcohol 99% and soft paper tissues. During removal, specimens were observed under a stereomicroscope (50x) for checking the complete removal of this layer.

Optical Coherence Tomography (OCT)

An scanning surface was obtained using the Optical Coherence Tomography (OCT) from commercially available system (Spectral Radar SR-OCT:OCP930SR / Thorlabs, New Jersey, USA). Specimens were positioned on a manual stage that allow XYZ translation. A scanning line of 6mm was obtained including interface of the reference surface and treated-eroded surface of each specimen, resulting in five 2D images, at intervals of 0,6mm. Cross sections images obtained by OCT (Fig 1a), were processed, scaled and a LUT tool, called edges was applied to image to allow better definition of surface reflections (Fig 1b). To better analyze the interface area, a zoom was added to the image for measurements (Fig 1c) by public JAVA domain Image J. The discrepancy between the height of the reference surface and the treated-eroded surface was measured. A bar tool promotes the measurement of

length that represents the step of mineral loss between referred surface, and the average depth of wear was calculated for each specimen (μm).

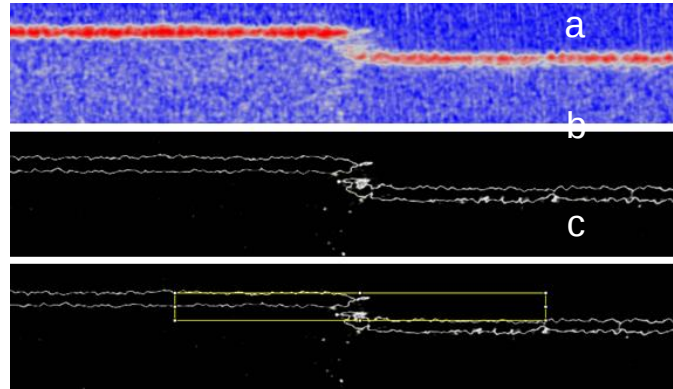
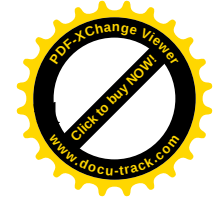
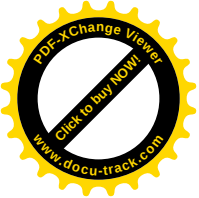


Fig. 1 – Example of an OCT image profile analyzed. The total distance used as reference to get value of step was 3mm, meaning 1,5 mm of each surface. For measurement of tissue loss, the box tool helps to identify the distance between both superficial faces

Profilometry

This analysis was performed using profilometer (SJ-400, Mitutoyo, Japan) connected to a PC with the software SURFPACK – SJ Version 1.300. Five readings were performed on each fragment from the reference to the treated-eroded surface of the specimen, covering a total of 2,5 mm. The average depth of wear was obtained by the distance in micrometers between the linear regression of the reference surface and a midpoint of the linear regression of the treated-eroded surface.

To measure the surface roughness, two traits were conducted in a representative line of 2 mm of each specimen. The parameter used was the Ra (roughness average).



Scanning Electron Microscopy (SEM)

Two specimens of each group were randomly selected and again immersed in citric acid for 1 x 2 min and then taken sonicated for 3 min with ultrasound bath, rinsed with distilled water for 1 min, dried and lightly gold-sputtered [Ganss et al., 2008]. Representative eroded areas of the surfaces were analyzed in a scanning electron microscopy (SEM; FEI Company, Quanta 200 FEG, Oregon, USA). Images were obtained using a secondary electron detector with an increase of 10000 x.

Statistics

Data were organized into an Excel spreadsheet (Microsoft Office 2007) and analyzed using SPSS 13.0 (Statistical Package for the Social Sciences, Chicago, USA) for Windows. Statistical measures were obtained and Komogorov Smirnov test was used to assess the normality of the data. The Wilcoxon test was performed to compare different times, the Mann-Whitney test to compare the techniques and ANOVA test for comparison among groups. All tests were applied with 95% confidence.

Results

Table 1 reports data of roughness obtained through the erosion cycling process. There was a significant increase of roughness in all groups. However groups irradiated by laser (LV and LV/NaF) showed significantly difference from all the others.

There was no statistical difference between the two measurement techniques of mineral loss (Table 2). However, differences were observed among groups,

independently of the evaluation method used ($p < 0,001$). In both methods of evaluation the group CPP-ACP/NaF (MI Paste Plus) had the lowest protective effect.

Table 1: Mean roughness values and standard deviations of surfaces.

Groups	Roughness		p-value*
	Initial	Final	
	Mean $\pm$ SD	Mean $\pm$ SD	
NC	0,11 $\pm$ 0,02	0,43 $\pm$ 0,12	0,018
LV	0,07 $\pm$ 0,02	1,62 $\pm$ 0,29 ^a	0,018
LV/NaF	0,16 $\pm$ 0,17	0,92 $\pm$ 0,40 ^a	0,028
NaF	0,17 $\pm$ 0,09	0,43 $\pm$ 0,09	0,018
SnF ₂ /NaF	0,11 $\pm$ 0,03	0,45 $\pm$ 0,13	0,018
CPP-ACP/NaF	0,09 $\pm$ 0,03	0,45 $\pm$ 0,18	0,018

(*) Wilcoxon Test

(a) Statistical difference comparing to all other groups;

Table 2: Mean of mineral loss values and reduction relative to control evaluated by OCT and Profilometry.

Groups	Method of Evaluation				p-value**¥
	OCT		Profilometry		
	Mean ± SD	Reduction relative to control (%)	Mean ± SD	Reduction relative to control (%)	
NC	14,14 ± 6,05 a	-	17,18 ± 3,38 a	-	0,225
CPP-ACP/NaF	10,98 ± 2,42 ab	22,35%	9,03 ± 1,54 b	47,44%	0,225
NaF	8,02 ± 2,43 bc	43,3%	8,25 ± 2,21 bc	52%	0,848
LV	7,53 ± 2,21 bc	46,74%	8,59 ± 4,16 bc	50%	0,848
LV/NaF	6,25 ± 1,04 bc	55,8%	4,41 ± 2,44 c	74,33%	0,180
SnF ₂ /NaF	5,11 ± 2,37 c	63,86%	6,39 ± 1,39 bc	62,8%	0,338
p-value**€	< 0,001 **		< 0,001 **		

(*) Mann-Whitney Test

(¥) Comparison between means of the types of techniques

(**) ANOVA

(€) Comparison between groups

The same letters indicate significant differences within columns.

Between the preventive methods, LV/NaF group (Nd:YAG Laser + fluoride varnish + Pro-esmalte) showed an improved preventive effect of erosion compared to the LV group (Nd:YAG Laser + fluoride varnish) by profilometry method, but by OCT there were no statistical differences between these groups. Among the interceptive methods, OCT and Profilometry showed similar results with statistically significant

differences only between the groups SnF_2/NaF (Pro-Saúde) and CPP-ACP/NaF (MI Paste Plus). The CPP-ACP/NaF was presented the lowest reducing effect of erosion.

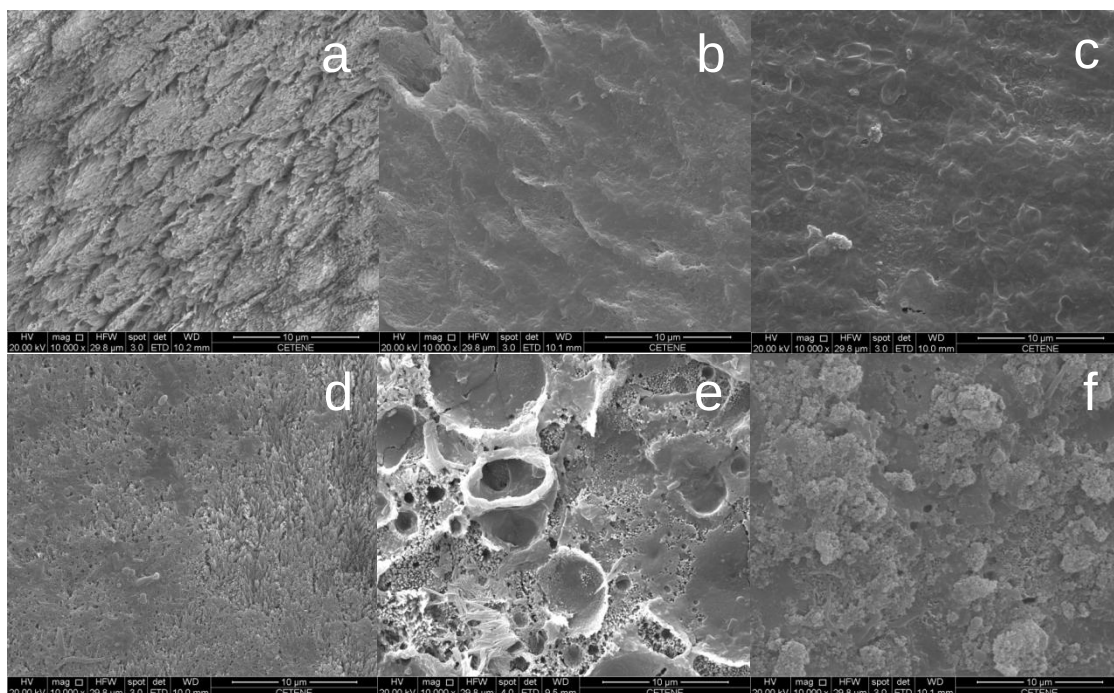
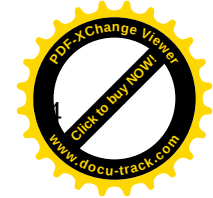
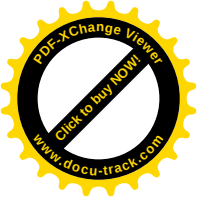


Fig. 2 – SEM of the specimens after the erosion cyclic and treatments. **A** Negative Control. **B** Pro-esmalte. **C** Pro-Saúde. **D** MI Paste Plus. **E** Nd:YAG Laser + Duraphat. **F** Nd:YAG Laser + Duraphat + Pro-esmalte.

SEM revealed a typical erosion pattern in the negative control group (Fig. 1a). The toothpastes showed a degree of protection, Pro-Saúde (Fig. 1c) and Pro-esmalte (fig. 1b) seem to contain precipitates in their surfaces. However, surfaces treated with MI Paste Plus (Fig. 1d) seem to contain amorphous substance in their surfaces. Craters formed by the action of laser can be observed in Fig. 1e (Nd:YAG Laser + Duraphat), but these seem to be covered by precipitates of Pro-esmalte association, in Fig. 1f (Nd:YAG Laser + Duraphat + Pro-esmalte).

Discussion

In the present study, as several other studies [Rios et al., 2009; Sobral et al., 2009; Wiegand et al., 2009; Kato et al., 2010], bovine enamel was used as substitutes for human teeth for erosion tests. The main reason for using them is that

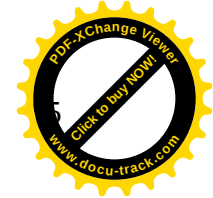
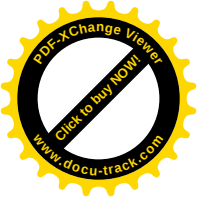


bovine teeth usually stem from the same region with similar genetic lineage and nutrition [Wegehaupt et al., 2008]. Furthermore, bovine teeth do not suffer from caries and do not have history of fluoridation [Wegehaupt and Attin, 2010].

The loss of enamel surface was measured in this study by the use of profilometry and optical coherence tomography (OCT). The profilometry is a quantitative method that has been used in several erosion studies and is considered the standard for evaluation of tissue loss. The OCT is an interferometric technique capable of generating high resolution images of the subsurface enamel specimens, besides being a noninvasive and nondestructive technique, free emission of ionizing radiation and near real-time. However, is still a new method for quantitative assessment of tissue loss caused by erosion, since only a few studies have used OCT with this goal [Wilder-Smith et al., 2009]. In this study, it proved to be effective, with no significant difference from profilometry in the present study.

The present *in vitro* study was performed with citric acid, which is common in beverages, yielding tissue loss in the order of 14µm detected by OCT and 17µm detected by profilometry in the negative group. According to Ganss et al. [2012], a tissue loss in the order of 10-15 µm is suitable to a good differentiation of effects, being the results of this study within an acceptable limit.

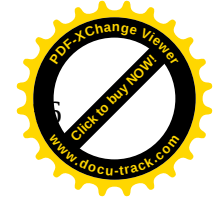
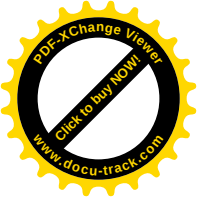
This study proposed to compare groups of two therapeutic methods for dental erosion: a preventive method and an interceptive method. The experimental groups named as “preventive” encompassed preventive actions performed before samples submission to an erosive agent (Nd:YAG laser and fluoride varnish – NaF) and also their use in association with a NaF-toothpaste. In these groups, the aim was to evaluate the preventive effect of the laser with the use of a varnish and observe whether the associated use of toothpaste improves the protective effect. The



protective effect of Nd:YAG laser irradiation against demineralization has showed promising results [Rios et al., 2009; Magalhães et al., 2011]. According to Zezell et al. [2009] the laser irradiation can significantly alter the permeability, crystallinity, acid-solubility of enamel, and cause an increase of its resistance to demineralization. Furthermore, the absorption of fluoride is improved by laser irradiation [Tagomori and Morioka, 1989]. In an in vitro study with bovine teeth, Sobral [2009] verified that Nd:YAG laser and fluoride were capable of increasing enamel resistance to citric acid.

As Nd:YAG laser has low absorption by the enamel structure, a coal paste was used like a photoabsorber [Boari et al., 2009], in order to allow a better absorption of the laser by enamel in order to assure enamel melting. For this, an energy density per pulse of $141,5 \text{ J/cm}^2$ was used. Both preventive groups have proved effective in preventing erosion, confirming the effectiveness of the laser already reported by other authors. Analyzing mineral loss by profilometry, it was verified that the addition of NaF-toothpaste produced a protective effect of about 49% higher. Although OCT images analyzis couldn't detect statistical differences between the groups LV and LV/NaF, they still managed to show that the pretreatment with laser and fluoride varnish associated with NaF based toothpaste was 20% more effective in preventing erosion than just the use of laser and varnish when compared to negative control. Thus, it is clear that the preventive action of Nd:AYG laser plus fluoride varnish by a dentist can be significantly improved through the associated use with an anti-erosive toothpaste. The NaF-toothpaste was chosen to enclose the same fluoride of Duraphat varnish.

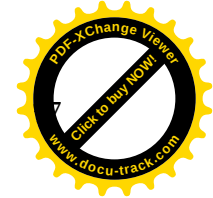
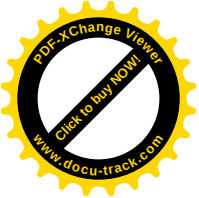
However, contrary to expectations, can not be observed features regions of melting on the enamel surface. The damage suffered by enamel after laser irradiation



with the formation of craters can be noticed in LV group. It can be note the difference between the surfaces of the two preventive groups in the SEM images. In the image of the LV/NaF group it may be noted that such damage was covered by a coating, possibly due to the use of NaF-toothpaste.

It was found that the erosive cycling significantly increased surface roughness of all groups. However, surfaces that were previously submitted to laser treatment also showed statistical differences. The group that was associated with the use of the NaF-toothpaste showed a significantly lower roughness than the group without, it probably due to the deposition of a protective layer on the enamel surface formed by CaF_2 and Na^+ ions, that was possibly facilitated by surface roughness caused by laser.

The NaF-toothpaste was also tested as an interceptive method compared to the other two fluoride mechanism toothpastes, SnF_2/NaF and CPP-ACP/NaF-toothpastes. In these groups, the aim was to observe the effects of different toothpastes in controlling the progression of dental erosion. In these experiments statistical differences between NaF-toothpaste and the other toothpastes were not observed, regardless our methods of evaluation, but there was a statistical difference between SnF_2/NaF and CPP-ACP/NaF-toothpastes. In both methods, SnF_2/NaF -toothpaste achieved the highest protective effect between the toothpastes, around 63% compared to negative control. Little is known about the interaction between the stannous ion and dental enamel [Schlueter et al., 2009b]. What is known is that the application of tin-containing solutions leads to deposits on the tooth surface [Ellingsen, 1986] and that the stannous ion reacts with hydroxyapatite reducing its solubility [Ganss et al., 2008]. The best effects with Sn-toothpaste in this study can be compared to other experimental findings [Schlueter et al., 2009c; Ganss et al.,

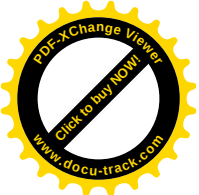


2008, 2011]. The SEM image seems to confirm the theory that SnF_2 is capable of forming a protective layer on the tooth surface, preventing direct contact of acid with the enamel mineral, as was also observed by Schlueter et al. [2009b].

In the present study observed that the NaF-toothpaste showed a reduction of erosion quite satisfactory, about 43% by OCT and 52% by profilometry, similar to the results found by Rees, Loyn and Chadwick [2007] who achieved a reduction of erosion around 48%. However, the design of the study differed once the toothpaste was applied before challenge acid, limiting to some extent a comparison between studies. Other previous researchs also found beneficial action against erosion [Lussi et al., 2008; Hara et al., 2009]. On the other hand, the NaF-toothpaste (Pro-esmalte) did not show an anti-erosive effect expected [Kato et al., 2010] or a limited effect [Poggio et al., 2010]. In this study the SEM image appears to show the presence of a protective layer on the enamel surface.

Several studies have been performed using casein phosphopeptide/amorphous calcium phosphate (CPP-ACP) to reduce the erosive potential of acid drinks. However, this reducing effect has not been observed in some researchs [Wegehaupt and Attin, 2010]. We can observe a certain degree of protection by the action of CPP-ACP, but even showing no statistical differences between NaF and CPP-ACP/NaF groups, the CPP-ACP/NaF-toothpaste showed an effect of reducing erosion 48% lower than NaF-toothpaste by OCT analyze. SEM image showed a deposition of an amorphous substance on the enamel surface.

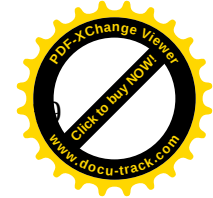
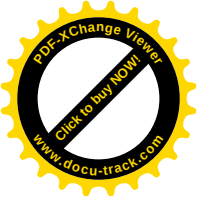
In conclusion, the results showed that the associated use of NaF-toothpaste after laser irradiation and the use of fluoride varnish is the most effective preventive method. The use of SnF_2 /NaF-toothpaste is the most effective interceptive method for reducing the mineral loss. Despite the laser be able to prevent erosion, cause



greater roughness. The OCT is an efficient quantitative method of evaluation of mineral loss.

Acknowledgements

The authors acknowledge the support of CAPES and FACEPE grants.



References

Amaechi BT, Higham SM: Dental erosion: possible approaches to prevention and control. J Dent 2005;33:243-52.

Azarpazhooh A, Limeback H: Clinical efficacy of casein derivatives: a systematic review of the literature. JADA 2008;139:915-24.

Boari HGD, Ana PA, Eduardo CP, Powell GL, Zezell DM: Absorption and Thermal Study of Dental Enamel when Irradiated with Nd:YAG Laser with the Aim of Caries Prevention. Laser Physics 2009;19(7):1463-69.

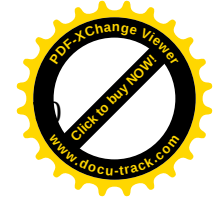
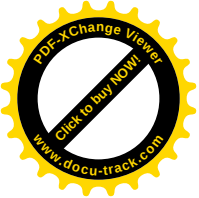
Ellingsen JE: Scanning electron microscope and electron microprobe study of reactions of stannous fluoride and stannous chloride with dental enamel. Scand J Dent Res 1986;94:299–305.

Freitas AZ, Zezell DM, Vieira Jr ND, Ribeiro AC, Gomes ASL: Imaging carious human dental tissue with optical coherence tomography. Journal of Applied Physics 2006;99(2):024906 (6 pages).

Ganss C, Klimek J, Brune V, Schürmann A: Effects of two fluoridation measures on erosion progression in human enamel and dentine in situ. Caries Res 2004;38:561-566.

Ganss C, Schlueter N, Hardt M, Schattenberg P, Klimek J: Effect of fluoride compounds on enamel erosion in vitro: a comparison of amine, sodium and stannous fluoride. Caries Res 2008;42:2-7.

Ganss C, Lussi A, Grunau O, Klimek J, Schlueter N: Conventional and anti-erosion fluoride toothpastes: effect on enamel erosion and erosion-abrasion. Caries Res 2011;45:581-89.



Ganss C, von Hinckeldey J, Tolle A, Schulze K, Klimek J, Schlueter N: Efficacy of the stannous ion and a biopolymer in toothpastes on enamel erosion/abrasion. *J Dent* 2012; 40(12):1036-43.

Hara AT, Kelly SA, González-Cabezas C, Eckert GJ, Barlow AP, Mason SC, Zero DT: Influence of fluoride availability of dentifrices on eroded enamel remineralization in situ. *Caries Res* 2009;43:57-63.

Hicks J, Garcia-Godoy F, Flaitz C: Biological factors in dental caries enamel structure and caries process in the dynamic process of demineralization and remineralization. *J Clin Pediatr Dent* 2004;28:119-24.

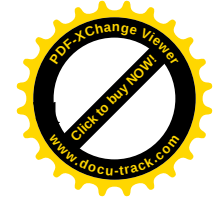
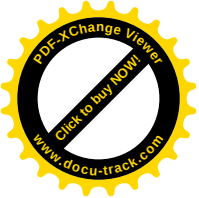
Hooper SM, Newcombe RG, Faller R, Eversole S, Addy M, West NX: The protective effects of toothpastes against erosion by orange juice: studies in situ and in vitro. *J Dent* 2007;35:476-81.

Hossain M, Nakamura Y, Kimura Y, Yamada Y, Kawanaka T, Matsumoto K: Effect of pulsed Nd:YAG laser irradiation on acid demineralization of enamel and dentin. *J Clin Laser Med Surg* 2001;19:105–108.

Kato MT, Lancia M, Sales-Peres SH, Buzalaf MAR: Preventive effect of commercial desensitizing toothpastes on bovine enamel erosion in vitro. *Caries Res* 2010;44:85-89.

Lussi A, Jaeggi T, Gerber C, Megert B: Effect of amine/sodium fluoride rinsing on toothbrush abrasion of softened enamel in situ. *Caries Res* 2004;38:567-71.

Lussi A, Megert B, Eggenberger D, Jaeggi T: Impact of different toothpastes on the prevention of erosion. *Caries Res* 2008;42:62-67.



Magalhães AC, Kato MT, Rios D, Wiegand A, Attin T, Buzalaf MAR: The effect of an experimental 4% TiF_4 varnish compared to NaF varnishes and 4% TiF_4 solution on dental erosion in vitro. *Caries Res* 2008a;42:269-74.

Magalhães AC, Rios D, Machado MAAM, Da Silva SMB, Lizarelli RFZ, Bagnato VS, Buzalaf MAR: Effect of Nd:YAG Irradiation and Fluoride Application on Dentine Resistance to Erosion in Vitro. *Photomedicine and Laser Surgery* 2008b;26(6):559-63.

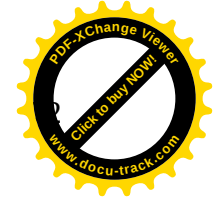
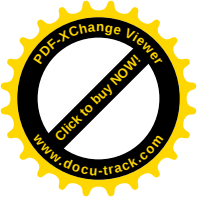
Magalhães AC, Romanelli AC, Rios D, Comar LP, Navarro RS, Grizzo LT, Aranha ACC, Buzalaf MAR: Effect of a Single Application of TiF_4 and NaF Varnishes and Solutions Combined with Nd:YAG Laser Irradiation on Enamel Erosion in Vitro. *Photomedicine and Laser Surgery* 2011;29(8):537-44.

Maia AM, Fonsêca DD, Kyotoku BB, Gomes AS: Characterization of enamel in primary teeth by optical coherence tomography for assessment of dental caries. *International Journal of Paediatric Dentistry* 2010;20:158-64.

Poggio C, Lombardini M, Colombo M, Bianchi S: Impact of two toothpastes on repairing enamel erosion produced by a soft drink: an AFM in vitro study. *J Dent* 2010;38:868-74.

Ranjitkar S, Rodriguez JM, Kaidonis JA, Richards LC, Townsend GC, Bartlett DW: The effect of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate on erosive enamel and dentine wear by toothbrush abrasion. *J Dent* 2009;37:250-54.

Rees J, Loyn T, Chadwick B: Proenamel and tooth mousse: an initial assessment of erosion prevention in vitro. *J Dent* 2007;35:355-57.



Rios D, Magalhães AC, Machado MAAM, Da Silva SMB, Lizarelli RFZ, Bagnato VS, Buzalaf MAR: In Vitro Evaluation of Enamel Erosion After Nd:YAG Laser Irradiation and Fluoride Application. *Photomedicine and Laser Surgery* 2009;27(5):743-47.

Schlueter N, Klimek J, Ganss C: Efficacy of an experimental tin-F-containing solution in erosive tissue loss in enamel and dentine in situ. *Caries Res* 2009a;43:415-21.

Schlueter N, Hardt M, Lussi A, Engelmann F, Klimek J, Ganss C: Tin-containing fluoride solutions as anti-erosive agents in enamel: an in vitro tin-uptake, tissue-loss, and scanning electron micrograph study. *Eur J Oral Sci* 2009b;117:427–434.

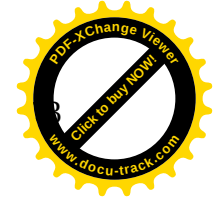
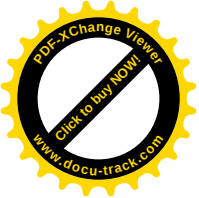
Schlueter N, Duran A, Klimek J, Ganss C: Investigation of the effect of various fluoride compounds and preparations thereof on erosive tissue loss in enamel in vitro. *Caries Res* 2009c;43:10-16.

Schlueter N, Hara A, Shellis RP, Ganss C: Methods for the measurement and characterization of erosion in enamel and dentine. *Caries Res* 2011;45(suppl 1):13-23.

Sobral MAP, Lachowski KM, Rossi W, Braga SRM, Ramalho KM: Effect of Nd:YAG Laser and Acidulated Phosphate Fluoride on Bovine and Human Enamel Submitted to Erosion/Abrasion or Erosion Only: An in Vitro Preliminary Study. *Photomedicine and Laser Surgery* 2009;27(5):709-13.

Tagomori S, Morioka T: Combined effects of laser and fluoride on acid resistance of human dental enamel. *Caries Res* 1989;23:225–231.

Vieira A, Jager DHJ, Ruben JL, Huysmans MC: Inhibition of erosive wear by fluoride varnish. *Caries Res* 2007;41:61–67.



Wegehaupt F, Gries D, Wiegand A, Attin T: Is bovine dentine an appropriate substitute for human dentine in erosion/abrasion tests? *J Oral Rehabil* 2008;35:390-94.

Wegehaupt FJ, Attin T: The role of fluoride and casein phosphopeptide/amorphous calcium phosphate in the prevention of erosive/abrasive wear in an in vitro model using hydrochloric acid. *Caries Res* 2010;44:358-63.

Wiegand A, Attin T: Influence of fluoride on the prevention of erosive lesions – a review. *Oral Health Prev Dent* 2003;1:245-53.

Wiegand A, Waldheim E, Sener B, Magalhães AC, Attin T: Comparison of the Effects of TiF_4 and NaF Solutions at pH 1.2 and 3.5 on Enamel Erosion in vitro. *Caries Res* 2009;43:269-277.

Wilder-Smith CH, Wilder-Smith, P, Kawakami-Wong H, Voronets J, Osann K, Lussi A: Quantification of dental erosions in patients with GERD using optical coherence tomography before and after double-blind, randomized treatment with esomeprazole or placebo. *Am J Gastroenterol* 2009;104:2788-2795.

Young A, Thrane PS, Saxegaard E, Jonski G, RØla G: Effect of stannous fluoride toothpaste on erosion-like lesions: an in vivo study. *Eur J Oral Sci* 2006;114:180-3.

Zezell DM, Boari HGD, Ana PA, Eduardo CP, Powell GL: Nd:YAG Laser in caries prevention: a clinical trial. *Lasers in Surgery and Medicine* 2009;41:31-35.