



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE PRÓTESE E CIRURGIA BUCO FACIAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

MÔNICA SCHÄFFER LOPES

**COMPORTAMENTO ADESIVO DE BRAQUETES LINGUAIS APÓS PROTOCOLO
DE PREVENÇÃO DE CÁRIES COM LASER DE ND:YAG**

Recife
2019

MÔNICA SCHÄFFER LOPES

**COMPORTAMENTO ADESIVO DE BRAQUETES LINGUAIS APÓS PROTOCOLO DE
PREVENÇÃO DE CÁRIES COM LASER DE ND:YAG**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Odontologia.

Área de concentração: Clínica integrada.

Orientador: Prof^o. Dr. Anderson Stevens Leônidas Gomes.

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Cláudia Cristina Brainer de Oliveira Mota.

Recife

2019

Catálogo na fonte:
Bibliotecária: Elaine Freitas, CRB4:1790

L864c Lopes, Mônica Schäffer
Comportamento adesivo de braquetes linguais após protocolo de prevenção de cáries com laser de nd:YAG/ Mônica Schäffer Lopes. – 2019.
111 f. : il. fig., tab.

Orientador: Anderson Stevens Leônidas Gomes.
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências da Saúde. Programa de pós-graduação em Odontologia. Recife, 2019.
Inclui referências e apêndice e anexo.

1. Esmalte dentário. 2. Braquetes ortodônticos. 3. Tomografia de coerência óptica. 4. Lasers. 5. Desmineralização do dente. I. Gomes, Anderson Stevens Leônidas (orientador). II. Título.

617.6 CDD (23.ed.) UFPE (CCS 2019 - 194)

MÔNICA SCHÄFFER LOPES

**COMPORTAMENTO ADESIVO DE BRAQUETES LINGUAIS APÓS PROTOCOLO DE
PREVENÇÃO DE CÁRIES COM LASER DE ND:YAG**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Odontologia.

Aprovada em: 18/02/2019.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Luiz Alcino Monteiro Gueiros (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Renata Cimões Jovino Silveira (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Sérgio de Lemos Campello (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Luiz Filipe G. Canuto (Examinador Externo)
Associação Brasileira de Odontologia

Prof^a. Dr^a. Niedje Siqueira de Lima (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

Um desafio tão grande quanto escrever esta Tese foi utilizar apenas uma página para agradecer as pessoas que fizeram parte desta trajetória.

Inicialmente, agradeço imensamente aos meus pais Rosa e Ricardo por todo amor e por sempre primarem pela minha educação. E juntamente a eles, agradeço ao meu irmão André, a minha cunhada Aline, à tia Márcia e ao meu marido Rodrigo, por comporem juntamente com os meus pais, o meu maior tesouro e minha grande fortaleza. Não poderia deixar de agradecer aos demais familiares que sempre me apoiaram e aos amigos que se tornaram parte da minha família.

Ao meu orientador Anderson Stevens, por todo apoio, carinho e compreensão. E por ter lutado por mim, e comigo, para chegarmos até aqui. À querida professora Denise Zezell que me deu todo o suporte e orientação necessários sempre de forma muito atenciosa e carinhosa. Aos colegas do laboratório de Recife e de São Paulo. Em especial, a Daísa, minha maior companheira e braço direito, a Cláudia Zamataro, por toda leveza, a Cláudia Mota, por todo o apoio.

Aos meus colegas de doutorado, funcionários, especialmente a Ozi e Tamires, por toda a paciência e atenção comigo neste trajeto, e aos professores da pós que sempre motivaram minha admiração e respeito. Ao IPEN-SP e UFPE por me acolherem e me permitirem realizar esta pesquisa. Ao Eduardo Moura e Djalma (CTR-IPEN) que me ajudaram com os ensaios de cisalhamento, e a todos os outros que indiretamente também contribuíram para esta conquista. Muito obrigada!!

E a Deus, por ser o meu guia, sempre me abençoando e me guiando com suas mãos carinhosas.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES-Brasil. Agradeço esta instituição pelo apoio financeiro e, principalmente pelo interesse neste estudo.

RESUMO

O presente trabalho foi um estudo laboratorial *in vitro* que objetivou avaliar a influência do laser de Nd:YAG como protocolo de prevenção de cáries ao redor de braquetes ortodônticos linguais e sua influência no esmalte e no cisalhamento sob diferentes condições de tratamento de superfície. Foram utilizados 110 dentes bovinos divididos de acordo com o tipo de condicionamento do esmalte antes da colagem do braquete, tendo como variáveis a irradiação com laser de Nd:YAG, o uso do flúor associado ao laser, jateamento com óxido de alumínio (Al_2O_3) e condicionamento ácido (H_3PO_4). Os espécimens foram avaliados qualitativamente através da Tomografia por Coerência Óptica (TCO) e da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e quantitativamente pelo ensaio de cisalhamento (SBS), coeficiente de atenuação óptica (α) e microdureza. Os dados foram estatisticamente analisados pelo testes ANOVA, *post hoc* de Dunn, Kruskal Wallis e Friedman (significância de 5%). Os resultados indicaram que o protocolo de irradiação com laser de Nd:YAG para prevenção de cárie não comprometeu a SBS dos braquetes, se comparados à colagem convencional com H_3PO_4 . TCO e MEV evidenciaram que o Al_2O_3 removeu parcialmente o efeito de *melting* do laser e seu uso associado não aumentou o SBS relação ao H_3PO_4 isoladamente. Houve aumento do α para os grupos Nd:YAG e Al_2O_3 , indicado pela redução da transmissão de luz no interior das amostras devido às alterações promovidas na superfície. Também foi observado um efeito sinérgico em relação a associação do flúor ao Nd:YAG, minimizando a profundidade de desmineralizações ($p=0,0006$). Não houve diferença da microdureza, intergrupos ou entre diferentes áreas de um mesmo grupo, para irradiações com laser ou seu estado hígido.

Palavras-chave: Esmalte dentário. Braquetes ortodônticos. Tomografia de Coerência Óptica. Lasers. Desmineralização do Dente. Resistência ao Cisalhamento.

ABSTRACT

The present study evaluated in vitro the Nd:YAG laser influence and its implication on enamel and shear bond strength in different surface treatment conditions. 110 bovine teeth were divided according to the type of enamel conditioning before bracket bonding, considering the variables Nd:YAG laser irradiation, the laser-fluoride association, aluminum oxide blasting (Al₂O₃) and acid-etching (H₃PO₄). Specimens were qualitatively evaluated by Optical Coherence Tomography (OCT) and Scanning Electron Microscopy (SEM), and quantitatively evaluated by the shear bond strength test (SBS), optical attenuation coefficient (α) and Microhardness. Data were statistically analyzed by ANOVA, post hoc by Dunn, Kruskal Wallis, and Friedman tests (5% significance). The results indicated that the protocol of Nd:YAG laser irradiation for caries prevention did not compromise the bracket SBS, if compared to conventional bonding protocol with H₃PO₄. OCT and SEM evidence that Al₂O₃ partially removed the laser melting effect and its associated use did not increase the SBS if compared to H₃PO₄ isolated. There was an increase in α for Nd:YAG and Al₂O₃ groups, indicated by the reduction of light propagation into the samples due to the changes promoted in the surface. Still, a synergistic effect was also observed regarding the association of Nd:YAG with fluoride, minimizing the demineralization depths ($p = 0.0006$). There were no differences in microhardness measurements, neither intergroup or between different areas of the same group, for laser irradiation or healthy samples.

Key-words: Dental Enamel. Orthodontic Brackets. Optical Coherence Tomography. Lasers. Tooth Demineralization. Shear Strength.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Imagem em SEM com 1000 x de aumento representando: (a) esmalte íntegro, (b) esmalte desmineralizado, (c) esmalte desorganizado e (d) esmalte com fusão dos cristais de hidroxiapatita.....	34
Figura 2 –	Imagem <i>B-scan</i> gerada pelo TCO de uma superfície lingual de esmalte hígida.....	35
Figura 3 –	Imagem <i>B-scan</i> gerada pelo TCO demonstrando aspecto de uma alteração superficial do esmalte.....	37
Figura 4 –	Identações knoop em região desmineralizada e íntegra, evidenciando a diferença nas larguras das identações-pequenos losângulos enfileirados.	38
Figura 5 –	Desenho esquemático da remoção da superfície incisal do dente.....	40
Figura 6 –	Etapas realizadas em cada grupo do Estudo 1: (a) irradiação com laser de Nd:YAG, (b) jateamento com óxido de alumínio, (c) condicionamento ácido, (d) aspecto de giz resultante do condicionamento ácido, (e) aplicação do sistema adesivo, (f) o molhamento da superfície pelo sistema adesivo, (g) posicionamento do braquete, (h) fotoativação.....	41
Figura 7 –	Kit de preparo do carvão vegetal em partículas de 10 µm: (a) almofariz, pistilo e peneiras de análise granulométrica de diferentes aberturas, (b) peneiras nas aberturas de 20 µm e 10 µm.....	43
Quadro 1 –	Parâmetros para irradiação com laser de Nd:YAG.....	43
Figura 8 –	Superfície de esmalte (a) antes, (b) durante e (c) após irradiação com laser de Nd:YAG.....	44
Figura 9 –	Imagem em SEM a base dos braquetes Forestadent utilizados no Estudo 1.....	44

Figura 10 –	Sequência ilustrativa de inclusão de corpo de prova em resina acrílica.....	46
Figura 11 –	a) Imagem ilustrativa da direção da força de cisalhamento (seta vermelha) e b) do comportamento gráfico do cisalhamento.....	47
Figura 12 –	O mesmo corpo de prova após irradiação com laser de Nd:YAG, em diferentes ampliações: 40, 200, 1000, 3000 x, da esquerda para direita. As imagens evidenciam o pulso do laser em menor aumento e a fusão do esmalte (melting), em maior aumento.....	48
Figura 13 –	Imagem representativa das 6 linhas de escaneamento do TCO com intervalos de 1 mm entre elas.....	49
Figura 14 –	Imagem (<i>B-scan</i>) de TCO obtida a partir de corpos de prova jateados com Al_2O_3	50
Figura 15 –	Tela do programa MATLAB Runtime mostrando uma imagem <i>B-scan</i> de um corpo de prova em T1. Evidenciando a janela e profundidade de trabalho em 1 ROI, e a curva do <i>A-scan</i> médio gerado em cada amostra.....	51
Figura 16 –	Etapas realizadas em cada grupo do Estudo 2: (a) irradiação com laser de Nd:YAG, (b) condicionamento ácido, (c) aplicação do sistema adesivo, (d) o molhamento da superfície pelo sistema adesivo, (e) posicionamento do braquete, (f) fotoativação, (g) aplicação de flúor ao redor do braquete colado.....	52
Figura 17 –	Imagem em MEV da base dos braquetes Orthomundi.....	54
Figura 18 –	Imagem representativa da janela de trabalho nas laterais e abaixo do braquete.....	56
Figura 19 –	Imagem representativa de TCO (<i>B-scan</i>) indicando as áreas expostas no corpo de prova após o desafio cariogênico.....	57

Figura 20 –	Tela do programa MATLAB Runtime mostrando uma imagem <i>B-scan</i> de um corpo de prova em T1. Evidenciando a janela e profundidade de trabalho em 2 ROIs, e a curva do <i>A-scan</i> médio gerado em cada amostra.....	58
Figura 21 –	Área de interesse do estudo (região do desafio cariogênico) delimitada em vermelho na figura. Em cada região delimitada foram realizadas 3 medidas (linhas brancas): uma em cada extremidade e outra no centro.....	59
Figura 22 –	(a) Linha de corte, (b) pedaço do corpo de prova utilizado para embutimento, (c) aspecto dos discos embutidos para testes de microdureza.....	60
Figura 23 –	Exemplificação das medidas feitas iniciando 20 µm abaixo da borda da lesão em corpo de prova representativo do G1.....	62
Figura 24 –	Representação ilustrativa do protocolo utilizado no ensaio de microdureza sobreposto a uma imagem de TCO com finalidade didática.....	62
Figura 25 –	Representação do comportamento dos grupos (a) antes de qualquer tratamento, (b) após acondicionamento das superfícies e (c) após cisalhamento dos braquetes. Linha 1 = G1 (controle), linha 2 = G2 (laser), linha 3 = G3 (laser + jato), linha 4 = G4 (jato) e linha 5 = G5 (jato + laser).....	65

Artigo 1

Figure 1 –	Schematic drawing of the incisal tooth surface removal to help positioning the brackets	71
Figure 2 –	SEM images after preconditioning (T1) of enamel surface: a) G1 initial control; b) G2 after Nd: YAG laser irradiation; c) G3	

after laser irradiation + Al₂O₃; d) G4 after Al₂O₃; e) G5 after Al₂O₃ + Nd: YAG laser irradiation.

74

Figure 3 – OCT images after preconditioning (T1) of enamel surface: a) G1 initial control; b) G2 after Nd: YAG laser irradiation; c) G3 after laser irradiation + Al₂O₃; d) G4 after Al₂O₃; e) G5 after Al₂O₃ + Nd: YAG laser irradiation. On OCT images, the laser effect is shown by red arrows and sandblasting effect by white arrows.....

76

Artigo 2

Figure 1- Diagrammatic illustration showing: A-C) specimen preparation; D) thermocycling; E) varnish coerture with 3 mm rectangular window uncovered surrounding the bonded area; F) cariogenic challenge; G) shear bond strength step; H) preparation of specimens- section and polishing; I) microhardness analysis. The schematic draw of microhardness test (I) represents the protocol used in this study, as described in the methods section.....

85

Figure 2- The figure represents the visual aspect, SEM (1.000x) and OCT (300µm) images around the bracket, after cariogenic challenge: A) G1- negative control group, with no fluor protection; B) G2- no acid etching bonding, with fluor protection; C) G3- acid etching bonding, with fluor protection; D) G4- Nd:YAG laser, with no acid etching and with fluor protection; E) G5- Nd:YAG laser, with acid etching and with fluor protection. The white lines are surrounding the demineralized area in G1, G2 and G3 protocols. And the red lines are surrounding the areas of laser effect in G4 and G5 protocols.....

89

Figure 3- Representative images from the experimental groups, showing, from left to right side sequence, the visual aspect of samples, SEM (1.000x) and OCT (300µm) images around the bracket, after cariogenic challenge: a, a1(MEV) and a2 (OCT): G1- negative control group, with no fluoride protection; b, b1 and b2: G2- no acid etching bonding, with fluoride protection; c, c1 and c2: G3- acid etching bonding, with fluoride protection; d, d1 and d2: G4- Nd:YAG laser, with no acid etching and with fluoride protection; e, e1 and e2: G5- Nd:YAG laser, with acid etching and with fluoride protection. The white lines are surrounding the demineralized area in G1, G2 and G3, whilst dotted lines are surrounding the areas of laser effect in G4 and G5.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Delineamento experimental do Estudo 1.....	42
Tabela 2 –	Delineamento experimental do Estudo 2.....	53

Artigo 1

Table 1 –	Parameters of Nd:YAG laser irradiation	71
Table 2 –	Measurements description of shear bond strength of groups.....	74
Table 3 –	Measurements variation of α before and after pretreatment on enamel surface.....	76

Artigo 2

Table 1 –	Measurements description of shear bond strength of groups (MPa)	91
Table 2 –	Demineralization depth of each group.....	92
Table 3 –	Individual comparison measurements description of α values before and after cariogenic challenge on enamel surface (μm^{-1}).....	92
Table 4 –	Minimum and maximum Knoop microhardness (KHN) measurements beneath varnish, challenge and bracket area.....	93

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Al_2O_3	Óxido de Alumínio
APF	Acidulated Phosphate Fluoride
CO_2	Laser de Dióxido de carbono
DSL	Diodo superluminescente
Er:YAG	Laser de Érbio-YAG
FFA	Flúor fosfato acidulado
H_3PO_4	Ácido fosfórico
LMB	Lesão de Mancha Branca
LSS	Lesão subsuperficial
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MPa.	Megapascal (10^6)
Nd:YAG	Laser de Neodímio-YAG
OCT	Tomografia por Coerência Óptica/ Optical Coherence Tomography
ROI	Regions Of Interest/ Regiões de interesse
SBS	Shear Bond Strength
SEM	Microscopia Eletrônica de Varredura/ Scanning Electron Microscope
TCO	Tomografia por Coerência Óptica
TCP	Fosfato tricálcio

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Coeficiente de atenuação óptica
μm	Micrometros (10^{-6})
Δ	Delta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
1.1	OBJETIVOS	21
1.1.1	Objetivo geral	21
1.1.2	Objetivos específicos.....	22
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	23
2.1	ORTODONTIA COMO FATOR DE RISCO DA CÁRIE DENTAL.....	23
2.1.1	Risco de LMB em braquetes vestibulares e linguais.....	24
2.1.2	Métodos para prevenção de cárie/mancha branca.....	25
2.1.2.1	Flúor.....	25
2.1.2.1	Laser de Nd:YAG (Granada de ítrio e alumínio dopada com íon neodímio)	26
2.2	IMPLICAÇÕES DA ADESÃO EM ORTODONTIA.....	28
2.2.1	Métodos de adesão em ortodontia.....	28
2.2.1.1	Condicionamento ácido.....	29
2.2.1.2	Jateamento com óxido de alumínio.....	29
2.2.1.3	Lasers.....	31
2.3	MÉTODOS LABORATORIAIS PARA ANÁLISE DE SUPERFÍCIE E AVALIAÇÃO DE DESMINERALIZAÇÃO DE ESMALTE.....	32
2.3.1	Microscopia.....	32
2.3.2	Tomografia por Coerência Óptica (TCO).....	34
2.3.2.1	Coeficiente de atenuação óptica (α).....	35
2.3.3	Microdureza.....	37
3	MÉTODO	39
3.1	METODOLOGIA ESTUDO 1.....	40
3.1.1	Pré-tratamento da superfície.....	42
3.1.1.1	Jateamento com óxido de alumínio.....	42
3.1.1.2	Laser de Nd:YAG.....	42
3.1.2	Braquete utilizado.....	44

3.1.3	Protocolo de colagem dos braquetes.....	45
3.1.4	Inclusão dos corpos de prova.....	46
3.1.5	Análises.....	47
3.1.5.1	Ensaio de cisalhamento.....	47
3.1.5.2	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	48
3.1.5.3	Tomografia por Coerência Óptica (TCO).....	48
3.1.5.3.1	<i>Coeficiente de atenuação óptica (α).....</i>	<i>50</i>
3.2	METODOLOGIA ESTUDO 2.....	51
3.2.1	Pré-tratamento da superfície.....	53
3.2.1.1	Laser de Nd:YAG.....	54
3.2.1.2	Condicionamento ácido.....	54
3.2.1.3	Protocolo de flúor.....	54
3.2.2	Braquete utilizado.....	54
3.2.3	Protocolo de colagem dos braquetes.....	55
3.2.4	Testes laboratoriais.....	55
3.2.4.1	Termociclagem.....	55
3.2.4.2	Desafio cariogênico.....	55
3.2.5	Inclusão dos corpos de prova.....	56
3.2.6	Análises.....	56
3.2.6.1	Ensaio de cisalhamento.....	56
3.2.6.2	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	57
3.2.6.3	Tomografia por Coerência Óptica (TCO).....	57
3.2.6.3.1	<i>Coeficiente de atenuação óptica (α).....</i>	<i>58</i>
3.2.6.3.2	<i>Profundidade de desmineralização.....</i>	<i>59</i>
3.2.6.4	Microdureza.....	60
3.2.6.4.1	<i>Secção e embutimento dos corpos de prova.....</i>	<i>60</i>
3.2.6.4.2	<i>Medidas de microdureza.....</i>	<i>61</i>
3.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	63
4	RESULTADOS.....	64
4.1	RESULTADOS DO ESTUDO 1.....	64
4.1.1	Ensaio de Cisalhamento.....	64

4.1.2	Microscopia Eletrônica de Varredura	64
4.1.3	Tomografia por Coerência Óptica.....	65
4.1.3.1	Coeficiente de atenuação óptica.....	66
4.2	RESULTADOS DO ESTUDO 2.....	66
4.2.1	Ensaio de Cisalhamento.....	66
4.2.2	Microscopia Eletrônica de Varredura.....	66
4.2.3	Tomografia por Coerência Óptica.....	67
4.2.3.1	Coeficiente de atenuação óptica.....	67
4.2.3.2	Profundidade de desmineralização.....	67
4.2.4	Ensaio de Microdureza.....	67
5	ARTIGOS.....	68
5.1	ARTIGO 1: EFFECT OF ND:YAG LASER AND ALUMINUM OXIDE SANDBLASTING PRECONDITIONING ON LINGUAL ENAMEL CHARACTERIZATION AND BRACKET SHEAR BOND STRENGTH.....	68
5.2	ARTIGO 2: INFLUENCE OF ND:YAG LASER IRRADIATION AND FLUOR TREATMENT ON ENAMEL AROUND LINGUAL BRACKETS: DEMINERALIZATION AND SHEAR BOND STRENGTH.....	82
6	CONCLUSÕES.....	100
6.1	CONCLUSÕES ESTUDO 1.....	100
6.2	CONCLUSÕES ESTUDO 2.....	100
	REFERÊNCIAS	101
	ANEXO A – DECLARAÇÃO DO MATADOURO DE DOAÇÃO DOS DENTES.....	110
	ANEXO B- APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.....	111

1 INTRODUÇÃO

Esta tese foi um estudo laboratorial *in vitro* desenvolvido no Laboratório de Fotônica e Biofotônica do Departamento de Física da Universidade Federal de Pernambuco (DF-UFPE) e do Centro de Lasers e Aplicações do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (CLA-IPEN-USP), após aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-IPEN) (Anexo B), e originou dois artigos.

Considerando que ainda hoje a cárie dental é uma das doenças orais mais frequentes do mundo (LISTL *et al.*, 2015) e que provoca danos irreversíveis no esmalte, tanto a sua prevenção quanto a sua identificação precoce (MOTA *et al.*, 2013) são de fundamental importância para a saúde bucal. Adicionalmente, pacientes que fazem uso de aparelhos ortodônticos (YAGCI *et al.*, 2010; TUFEKCI *et al.*, 2011; HADLER-OLSEN *et al.*, 2012; KNÖSEL *et al.*, 2016; VELUSAMY *et al.*, 2018), sejam eles vestibulares ou linguais, (VAN DER VEEN *et al.*, 2010; LOMBARDO *et al.*, 2013; SAUNDERS *et al.*, 2018) estão mais propensos a desenvolver desmineralizações, que se não tratadas, podem evoluir para a cárie dentária.

Diante disso, o artigo 2 desta tese avaliou se o protocolo preventivo de cárie utilizado por ZECELL *et al.* (2009), com o uso do laser de Nd:YAG, seria capaz de prevenir o surgimento de desmineralizações ao redor e abaixo dos braquetes sem, contudo, prejudicar a resistência adesiva dos braquetes. Foram usados 75 dentes bovinos divididos em 5 grupos ($n=15$) de acordo com o pré-condicionamento da superfície da superfície do esmalte: laser, fluoreto e H_3PO_4 . As alterações superficiais foram avaliadas qualitativamente através da microscopia eletrônica de varredura (MEV) e da tomografia por coerência óptica (TCO), e quantitativamente pelo coeficiente de atenuação (α), teste de cisalhamento (SBS), profundidade de desmineralização e microdureza, indicando que o protocolo de laser, além de diminuir a profundidade de desmineralização, não compromete a SBS.

Como inicialmente o protocolo de colagem de braquetes linguais envolvia o jateamento da superfície lingual com Al_2O_3 , o artigo 1 desta tese avaliou a resistência de união dos braquetes após pré-condicionamento do esmalte tanto com o Al_2O_3 , como com o Nd:YAG, e a associação dos dois, e estudou o comportamento destes através do

MEV, TCO, α e SBS. Evidenciou-se que não há necessidade do uso do Al_2O_3 no protocolo de colagem, pois não melhorou o desempenho SBS e ainda removeu parcialmente o efeito do laser.

As técnicas do TCO e do α possibilitam o monitoramento de perdas minerais da estrutura do tecido dentário em estágios iniciais, de forma conservadora e não invasiva, podendo ser utilizadas em estudos clínicos, o que é um diferencial na literatura. Apesar desta ter utilizado braquetes linguais, os resultados do SBS obtidos podem ser estendidos para trabalhos com braquetes vestibulares, uma vez que há similaridade na resistência adesiva entre eles. (LOMBARDO *et al.*, 2011; SFONDRINI *et al.*, 2017)

A desmineralização do esmalte é uma complicação indesejável, embora comum, da terapia ortodôntica com aparelhos fixos. Visualmente, as desmineralizações são encontradas como lesões de manchas brancas (LMB) ao redor dos braquetes logo após o primeiro mês de instalação. (GORTON; FEATHERSTONE, 2003)

Alterações no ambiente bucal - como aumento da retenção de placa, flora bacteriana alterada, aumento da contagem bacteriana acidogênica, redução do efeito de limpeza da língua, (ABUFARWA *et al.*, 2018) alterações no pH salivar (SAUNDERS *et al.*, 2018) - e fatores genéticos (STRÖMBERG *et al.*, 2017) desempenham papéis significativos na alta prevalência de LMB (em torno de 75%) em pacientes com aparelhos fixos. (AL MAAITAH *et al.*, 2011; SAGARIKA *et al.*, 2012; WIECHMANN *et al.*, 2015)

Em 20% da população mundial a doença cárie ocorre por fatores genéticos que não respondem adequadamente à fluoroterapia e aos hábitos de higiene oral. (STRÖMBERG *et al.*, 2017) Considerando o uso de braquetes ortodônticos como um fator de risco para a cárie dental, (VAN DER VEEN *et al.*, 2010) estes pacientes desenvolvem 3,9 vezes mais cáries do que normal. Para esta parcela da população estão indicados cuidados orais individualizados com intensificação das terapias preventivas tradicionais – baixa ingestão de carboidratos, profilaxias, raspagens e uso de fluoretos- além de novas terapias com imunoestimulação ou suplementações. (STRÖMBERG *et al.*, 2017)

O uso de aparelhos pela técnica lingual passou por um ressurgimento em popularidade nos últimos anos, (AULUCK, 2013) com aumento progressivo da demanda em escala global. (SINGH; COX, 2011) Alguns estudos (VAN DER VEEN *et al.*, 2010; WIECHMANN *et al.*, 2015; KNÖSEL *et al.*, 2016) relatam haver menor prevalência de LMB nesta técnica, porém observa-se que foram utilizados braquetes prototipados ou customizados, que recobrem quase a totalidade da superfície lingual, não deixando claro se esse resultado se deve de fato ao selamento completo da superfície ou a outros fatores etiológicos. (AULUCK, 2013) Em estudos com braquetes linguais pré-fabricados, as características de menor distância interbraquetes e posicionamento mais próximo da gengiva apontaram para uma maior dificuldade de higienização da superfície dental (MIETHKE; BRAUNER, 2007; AULUCK, 2013; ATA-ALI *et al.*, 2016) e aumento significativamente de retenção de placa e de contagens de bactérias patogênicas - capazes de induzir a doença cárie e o aumento de inflamações gengivais. (DEMLING *et al.*, 2010; LOMBARDO *et al.*, 2013)

Nos últimos anos, o ônus econômico global das doenças dentárias foi de 4,6% do gasto global em saúde. (LISTL *et al.*, 2015) Embora o flúor desempenhe um papel importante na prevenção de cáries, (VELUSAMY *et al.*, 2018) sua ação isolada nem sempre é suficiente para inibir o surgimento das LMB, e o seu uso indiscriminado pode provocar fluorose - oferecendo um risco sistêmico ao paciente. (UNDE; PATIL; DASTOOR, 2018) Quando associado à irradiação do esmalte com laser de Nd:YAG, há uma maior captação dos íons fluoretos pelo esmalte, com maior tempo de atuação em ambiente bucal. (ZECELL *et al.*, 2009; PEREIRA *et al.*, 2018)

As alterações químicas e morfológicas que o laser promove na superfície do esmalte permite maior resistência a desmineralizações e aos altos riscos de cárie. (ANA; BACHMANN; ZECELL, 2006) Estes achados foram comprovados em estudos *in vivo* que encontraram redução de cárie de 45,9% (ZECELL *et al.*, 2009) e 50% (HARAZAKI *et al.*, 2001) para dentes posteriores e anteriores, respectivamente. Em poucos anos o laser se tornará uma ferramenta acessível para as clínicas odontológicas e, especialmente, os pacientes com alto risco de cáries poderão se beneficiar destas intervenções. (MIRESMAEILI *et al.*, 2014) Microscopicamente, a irradiação com laser de Nd:YAG promove irregularidades na morfologia do esmalte

capaz de aumentar a sua microdureza superficial e resistência ao cisalhamento (SBS). (BANDA; VANAJA REDDY; SHASHIKIRAN, 2011) Entretanto, nenhum estudo relatou se estas alterações comprometem a SBS de braquetes linguais.

O esmalte deve ser adequadamente preparado para interagir mecânica e quimicamente com os materiais adesivos do sistema de colagem assegurando um SBS mínimo entre 5,9 e 7,8 MPa. (REYNOLDS, 1975) No início do uso dos braquetes linguais acreditava-se que seu menor tamanho e posição acarretavam uma maior taxa de descolagem. (WIECHMANN *et al.*, 2003) Então, o jateamento com óxido de alumínio (WARD, 2013) passou a ser utilizado na superfície do esmalte como uma etapa prévia ao condicionamento ácido, visando aumentar a SBS. (LOMBARDO *et al.*, 2011; MATI *et al.*, 2012; WARD, 2013) Atualmente não há consenso na literatura sobre a sua real eficácia clínica como protocolo de colagem de braquetes linguais.

Atualmente, as alterações morfológicas do esmalte podem ser vistas através de ferramentas ópticas, como por exemplo a Tomografia por Coerência Óptica (TCO) e Microscopias, que auxiliam na conclusão das análises. A TCO (MOTA *et al.*, 2013; CARA *et al.*, 2014; MAIA *et al.*, 2016; AUSTIN *et al.*, 2017; BAKHSH *et al.*, 2017; VELUSAMY *et al.*, 2018) é uma técnica não invasiva, excelente em detectar desde desmineralizações precoces até alterações subsuperficiais (MOTA *et al.*, 2013; VELUSAMY *et al.*, 2018) em profundidades de 2 mm, e que podem ser utilizada clinicamente (AUSTIN *et al.*, 2017; FERNANDES *et al.*, 2017) auxiliando neste diagnóstico.

1.1. OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Avaliar a força de cisalhamento de braquetes linguais e a resistência do esmalte à desmineralização em superfícies irradiadas com laser de Nd:YAG, associado ou não a outros métodos de pré-tratamento.

1.1.2 Objetivos específicos

- ✓ Mensurar a resistência ao cisalhamento dos braquetes linguais após tratamento de superfície de esmalte com laser de Nd:YAG e/ou jateamento com óxido de alumínio **(estudo1)**.
- ✓ Avaliar a influência da irradiação com laser de Nd:YAG e do flúor na força de cisalhamento dos braquetes linguais e na desmineralização do esmalte adjacente **(estudo 2)**.
- ✓ Analisar a superfície de esmalte dentário antes, durante e depois de diferentes pré-tratamentos da superfície através de análises ópticas em TCO, MEV e coeficiente de atenuação óptica **(estudos 1 e 2)**.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 ORTODONTIA COMO FATOR DE RISCO DA CÁRIE DENTAL

Em estudos de prevalências os LMB foram descritas entre 2 % a 97 % dos pacientes com aparelhos fixos. (BOERSMA *et al.*, 2005) Por se tratar de uma variação muito ampla, abriu margem para novos estudos mais recentes encontrarem valores em torno de 71 % a 75 %. (AL MAAITAH *et al.*, 2011; SAGARIKA *et al.*, 2012; WIECHMANN *et al.*, 2015) Em geral, braquetes e bandas ortodônticas agem como estruturas retentoras de placa, uma vez que limitam a autolimpeza natural que ocorre pela musculatura oral e saliva. (VAN DER VEEN *et al.*, 2010; DIAS, 2015; HEYMANN; GRAUER, 2013; SHAHEEN; ILYAS; UL HAMID, 2016; BAKHSH *et al.*, 2017) Estas são as principais causas de desenvolvimento de desmineralizações no esmalte adjacente aos braquetes durante o tratamento ortodôntico. (AULUCK, 2013) E a presença de braquetes é considerada um fator de risco para a cárie dental. (VAN DER VEEN *et al.*, 2010)

Embora a cárie seja descrita como um processo crônico de progressão lenta, (FEATHERSTONE, 2008) ela progride mais rapidamente em pacientes com aparelho ortodôntico. A LMB, considerada um dos primeiros estágios da cárie, já pode ser vista adjacentes aos braquetes após um mês da colagem do aparelho. (GORTON; FEATHERSTONE, 2003; LOMBARDO *et al.*, 2013) Elas são frequentemente encontradas na região cervical dos dentes (TUFEKCI *et al.*, 2011) e abaixo dos braquetes. (UYSAL *et al.*, 2008)

A maior propensão das LMB nestas regiões pode ser justificada a partir da contração de polimerização do sistema adesivo para colagem, que pode provocar microinfiltrações e provocar a lesão na interface esmalte-adesivo. (YAGCI *et al.*, 2010) O surgimento destas lesões provoca descalcificações, corrosão, descoloração do esmalte e diminuição da força adesiva. (UYSAL *et al.*, 2008) Estas microinfiltrações podem acontecer igualmente em colagens diretas ou indiretas de braquetes. (SHAHEEN; ILYAS; UL HAMID, 2016)

2.1.1 Risco de LMB em braquetes vestibulares e linguais

Existem relatos de que tratamentos com braquetes linguais prototipados chegam a desenvolver 4,8 vezes menos LMB que braquetes vestibulares, graças a limpeza mecânica da língua nas superfícies linguais dos dentes. E que, quando instaladas, as lesões apresentam 10,6 vezes menos perda mineral. (VAN DER VEEN *et al.*, 2010)

Outros autores (WIECHMANN *et al.*, 2015) encontraram que a incidência de LMB era reduzida para braquetes customizados quando comparados aos relatos da literatura para braquetes vestibulares. Contudo, houve diferenças metodológicas entre os artigos usados na comparação, sendo este resultado uma estimativa. Os autores ainda concluíram que os dentes posteriores foram os mais afetados por LMB quanto maior o tempo de tratamento.

Quando comparado o desempenho de braquetes customizados e prototipados em relação ao surgimentos de LMB e de lesões subsuperficiais (LSS), observou-se que não há diferenças em relação ao surgimento das LMB. Porém, os braquetes customizados apresentam maior incidência de LSS. Em comparação a literatura anteriormente publicada para braquetes vestibulares, os autores também identificaram menor surgimento das lesões em braquetes linguais do que vestibulares. (KNÖSEL *et al.*, 2016)

Contudo, estes estudos (KNÖSEL *et al.*, 2016; VAN DER VEEN *et al.*, 2010; WIECHMANN *et al.*, 2015) utilizaram braquetes que recobrem quase a totalidade da superfície lingual e por isso não fica claro se esse resultado se deveu ao selamento completo da superfície ou a outros fatores etiológicos. (AULUCK, 2013) Além disso, a comparação entre metodologias diferentes abre margem a questionamentos das conclusões.

Ainda sobre braquetes customizados, as alterações periodontiais e da microbiota em pacientes com aparelhos linguais customizados foram avaliadas por Demling *et al.*, (2010). Os autores concluíram que após 4 semanas do uso de aparelhos linguais fixos ocorre um aumento do acúmulo de placa e inflamação gengival associado ao aumento da flora bacteriana patogênica- *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. E que estas mudanças estão restritas a superfícies coladas seja ela vestibular ou lingual.

Após o mesmo período de estudo, Lombardo *et al.* (2013) estudaram *in vivo* o comportamento da microbiota e retenção de placas em pacientes com braquetes linguais pré-fabricados e braquetes vestibulares. Quando comparados, ocorreu maior propensão para inflamação gengival, por retenção de placa e adesão de *S. mutans* - agente etiológico da doença cárie - nos braquetes linguais.

Em revisão sistemática recente (ATA-ALI *et al.*, 2016) não foi encontrada diferença estatística em relação ao risco de cáries entre os tratamentos com braquetes vestibulares e linguais.

2.1.2 Métodos para prevenção de cárie/mancha branca

Após o consumo de carboidratos ocorre a sua incorporação ao biofilme dental e posterior fermentação pelo metabolismo bacteriano, produzindo ácidos e reduzindo o pH do biofilme. À medida que o pH varia ao longo do tempo, tendendo a 7, ocorre dissolução e reposição de minerais. Quando há um desequilíbrio entre os fatores protetores (disponibilidade de fluoretos, frequência de higiene dental e capacidade tampão da saliva) e fatores de risco (diminuição do fluxo salivar, frequência alta de ingestão de carboidratos e hábitos de higiene deficientes) ocorre a desmineralização da superfície de esmalte pela dissolução dos cristais de hidroxiapatita, configurando LMB e cáries. (FEATHERSTONE, 2008)

2.1.2.1 Flúor

Durante o desenvolvimento dentário ocorre a incorporação de fluoretos à rede cristalina do esmalte. A concentração deste íon alcança até 1.000 – 2.000 ppm nos micrômetros mais superficiais e em torno de 20 a 100 ppm abaixo da superfície dental. (FEATHERSTONE, 1999)

Tratamentos com flúor (soluções, géis, dentifrícios, fluoretação da água, vernizes e enxaguantes) tem sido uma prática comum e consagrada na literatura pela capacidade de aumentar a resistência do esmalte às desmineralizações, sendo as aplicações tópicas uma das mais eficazes. (ANA *et al.*, 2014; ATA-ALI *et al.*, 2016; BAKHSH *et al.*, 2017; HAMDAN; BADRI; EL SAYED, 2018)

O fluoreto de cálcio é o responsável pelo potencial cariostático dos produtos à base de flúor para uso tópico. O pH ácido dos géis acidulados aumenta a concentração dos produtos de flúor no esmalte (DELBEM; CURY, 2002) e são eficientes na prevenção a partir de protocolos de única aplicação – entre 1 e 4 minutos.

Após a aplicação tópica, a concentração de fluoreto de cálcio atua como um reservatório liberando flúor no esmalte e melhorando sua remineralização por formação de fluorapatita. Porém, a concentração diminui após cerca de três dias, (TENUTA *et al.*, 2009) e por isso, alguns autores relataram que os protocolos de aplicação de flúor não são totalmente eficazes para controlar a cárie dentária durante tratamentos ortodônticos. (ZIMMER; ROTTWINKEL, 2004)

O ideal é manter uma concentração de flúor mais baixa agindo por mais tempo. (RESTREPO, 2013) Por este motivo surgiram os estudos entre associações dos fluoretos a sistemas adesivos de colagem (FEATHERSTONE, 2003; GORTON; FEATHERSTONE, 2003; HADLER-OLSEN *et al.*, 2012; NASCIMENTO *et al.*, 2016; GHADIRIAN *et al.*, 2017) e os estudos com laser de Nd:YAG. (ANA; BACHMANN; ZECELL, 2006; CASTELLAN *et al.*, 2007; ZECELL *et al.*, 2009; BANDA; VANAJA REDDY; SHASHIKIRAN, 2011; JORDÃO, 2011; MARIMOTO *et al.*, 2013; KARANDISH, 2014; WEN *et al.*, 2014; CORRÊA-AFONSO *et al.*, 2015; SEINO *et al.*, 2015; BRAGA; DE OLIVEIRA; SOBRAL, 2017; PEREIRA *et al.*, 2018)

2.1.2.2 Laser de Nd:YAG (Granada de ítrio e alumínio dopada com íon neodímio)

A maior parte das investigações em Ortodontia referem-se às terapias com laser de alta potência para promover aumento da resistência à cárie (ZECELL *et al.*, 2009; ANA *et al.*, 2012; BRAGA; KARANDISH, 2014; DE OLIVEIRA; SOBRAL, 2017) e desmineralizações como um dos efeitos de maior significância clínica.

Os efeitos da irradiação sobre o esmalte variam de acordo com as combinações do tipo de laser, tempo de exposição e da potência usada. Isoladamente, a irradiação com laser de Nd:YAG promove alterações químicas e morfológicas no esmalte, alterando o balanço de Ca/P em 10 a 20 µm de profundidade, com a criação de uma nova fase (tetracalcium difosfato, TCP) na superfície tratada. (ANA; BACHMANN; ZECELL, 2006)

Estas alterações no esmalte variam de acordo com o comprimento de onda que interage. No caso do laser de Nd:YAG ocorre uma ablação do tecido ao mesmo tempo que ocorre uma fusão dos cristais de hidroxiapatita, conhecida como *melting*. (VIEIRA *et al.*, 2015) Esta alteração permite a redução do teor de carbonato na camada superficial do esmalte (ANA; BACHMANN; ZECELL, 2006; BRAGA; DE OLIVEIRA; SOBRAL, 2017) que pode estar relacionado ao aumento da resistência do tecido às desmineralizações.

O carbonato é por natureza um composto solúvel em soluções ácidas. A incorporação do carbonato provoca uma redução no tamanho dos cristais, alteração de sua morfologia, aumento de tensão na estrutura cristalina, e uma maior solubilidade. Em contrapartida, durante a irradiação com laser, entre temperaturas de 100 e 650 °C ocorre a remoção do carbonato e perda de água, que permite alterações na composição estrutural da hidroxiapatita à medida que ocorre o aumento da temperatura. (VIEIRA *et al.*, 2015)

Entre 650°C-1100°C ocorre o aumento dos tamanhos dos cristalitos de hidroxiapatita com expansão da sua malha unitária, e a formação de fosfato tricálcico em fase beta (β -TCP). Acima de 1100°C, esta fase β é convertida em fase α , que permite a fusão da hidroxiapatita em temperaturas mais altas (1280°C), e em seguida a formação de fosfato tetracálcico (> 1300°C).

Estas novas características cristalográficas da matriz mineral indicam a cristalização dos prismas de esmalte superficiais, indicando um tecido mais resistente aos meios ácidos, (ZECELL *et al.*, 2010) tanto pela redução da permeabilidade à água, quanto pela redução do teor de carbonato, que permite o aumento do tamanho dos cristais de hidroxiapatita. Essas alterações permitem que o pH crítico para dissolução de esmalte passe de 5,5 para 4,8 nos tecidos irradiados. (FOX *et al.*, 1992)

Estudos relatam efeitos de proteção do esmalte quando o laser de Nd:YAG é usado sozinho (CASTELLAN *et al.*, 2007; BOARI *et al.*, 2009; CORRÊA-AFONSO *et al.*, 2015; MARIMOTO *et al.*, 2013; WEN *et al.*, 2014) ou em associação ao flúor tópico. (ANA; BACHMANN; ZECELL, 2006; ZECELL *et al.*, 2009; BANDA; VANAJA REDDY; SHASHIKIRAN, 2011; BRAGA; DE OLIVEIRA; SOBRAL, 2017; HARAZAKI *et al.*, 2001; SEINO *et al.*, 2015) Quando associado ao flúor há controvérsias na literatura a respeito

do sinergismo de efeitos preventivos. Alguns autores (JORDÃO, 2011; ARAÚJO, 2012; PEREIRA *et al.*, 2017) não encontraram sinergismo enquanto outros encontraram. (ZEZELL *et al.*, 2009; ANA *et al.*, 2012; KARANDISH, 2014; SEINO *et al.*, 2015; BRAGA; DE OLIVEIRA; SOBRAL, 2017) Dentre estes, na irradiação do laser de Nd:YAG seguido do flúor tópico ocorre maior formação de fluorapatita na superfície do esmalte do que quando o flúor é aplicado antes da irradiação. (ANA *et al.*, 2012)

A irradiação pode aumentar a difusão dos íons de flúor até as camadas mais internas da estrutura cristalina do esmalte, criando novas reservas de flúor e diminuindo sua solubilidade. (ANA *et al.*, 2012) Além disso, o tempo de ação do flúor que naturalmente decresceria com 3 dias (TENUTA *et al.*, 2009) pode ser visto em mesma concentração em até 10 dias após associação. (PEREIRA *et al.*, 2018)

Clinicamente, o sinergismo de efeito foi evidenciado por Zezell *et al.*, (2009) com redução da cárie de 45,9% e 22,4% em faces oclusais de molares e pré-molares, respectivamente, em estudo prospectivo. E também por Harazaki *et al.*, (2001) com redução de cerca de 50% das LMB ao redor de braquetes em dentes anteriores.

2.2 IMPLICAÇÕES DA ADESÃO EM ORTODONTIA

É intuitivo pensar que, quanto maior a resistência de adesão entre esmalte e braquetes ortodôntico, menores desuniões e contratempos ocorrerão ao longo do tratamento ortodôntico. Porém, o ideal é ter uma adesão mínima que resista ao cisalhamento durante todo o tratamento, e que permita a descolagem dos braquetes ao final do tratamento sem danos ao esmalte. (ELNAFAR *et al.*, 2015)

2.2.1 Métodos de adesão em ortodontia

As falhas adesivas podem influenciar na duração, nos custos totais e no tempo de cadeira dos tratamentos ortodônticos. Dentre os fatores necessários para uma boa adesão estão os cuidados para evitar a contaminação do esmalte por água, saliva ou sangue antes da colagem, (SFONDRINI *et al.*, 2017) o uso de um sistema adesivo adequado, a escolha do design da base de braquetes e os pré-tratamentos das superfícies. (ELNAFAR *et al.*, 2015)

Dentre os métodos de pré-tratamento mais usados estão o condicionamento ácido, o jateamento com óxido de alumínio, o uso de laser de alta potência, e a associação destas técnicas.

2.2.1.1 Condicionamento ácido

O condicionamento do esmalte é um passo fundamental para alcançar uma boa aderência dos braquetes. O ácido ortofosfórico foi utilizado pela primeira vez por Buonocore, em 1955. Desde então, o conceito de adesão ao esmalte se desenvolveu e o uso do ácido se espalhou para todas as áreas da odontologia. Dez anos depois, Newman propôs o uso de condicionamento ácido para colagens diretas de braquetes nos dentes. (ROBLES-RUÍZ *et al.*, 2015)

O protocolo de colagem de braquetes que utiliza apenas o condicionamento ácido como pré-tratamento da superfície é considerado o protocolo tradicional. Em revisão sistemática da força de cisalhamento de braquetes vestibulares, encontrou-se uma força média de $13,4 \pm 5,7$ Mpa. (FINNEMA *et al.*, 2010) No entanto não há diferença entre os valores adesivos de braquetes linguais e vestibulares, (SFONDRINI *et al.*, 2017) tanto na técnica de colagem direta, quanto indireta. (LOMBARDO *et al.*, 2011)

O trabalho mais citado na literatura é o de Reynolds (1975) que considera uma força adesiva clínica minimamente aceitável de 5,9 a 7,8 MPa. Um outro estudo (GIANNINI; SOARES; DE CARVALHO, 2004) encontrou que os valores máximos aceitáveis de forças adesivas dos braquetes que não promovem danos ao esmalte na descolagem está entre 40 e 50 Mpa. Apesar disso, há relatos de que forças acima de 14 MPa já apresentam danos microscópicos ao esmalte. (PICKETT *et al.*, 2001)

2.2.1.2 Jateamento com óxido de alumínio

No início dos tratamentos com braquetes linguais, o jateamento da superfície lingual com óxido de alumínio (50 μ m) fazia parte do protocolo de pré-tratamento do esmalte antes das colagens, (MAVREAS *et al.*, 2018; ROBLES-RUÍZ *et al.*, 2014; WARD, 2013; ZIEBURA *et al.*, 2014) embora as evidências sobre o seu real benefício clínico ainda seja um tema controverso.

Apesar de alguns estudos relatarem o aumento significativo da resistência adesiva na associação do jateamento de óxido de alumínio (DERECH *et al.*, 2008; HALPERN; ROULEAU, 2010; MATI *et al.*, 2012) com o condicionamento ácido, outros afirmam que este aumento é estatisticamente semelhante ao protocolo tradicional apenas com o condicionamento ácido. (HALPERN; ROULEAU, 2010; CAL-NETO *et al.*, 2011; ZARIF NAJAFI *et al.*, 2015) Com isso, não há melhora do desempenho clínico. (BORSATTO *et al.*, 2002; CAL-NETO *et al.*, 2011; MARIMOTO *et al.*, 2013; ROBLES-RUÍZ *et al.*, 2014; THURLER *et al.*, 2014)

Ainda assim, alguns autores (DERECH *et al.*, 2008) indicam o uso do jateamento prévio para a colagem de acessórios em superfícies de dentes submetidos a maior impacto mastigatório - em molares inferiores - , com aumento adesivo de 60%.

Em oposição, um estudo (BARCELLOS *et al.*, 2015) encontrou diminuição da resistência adesiva quando associaram o jateamento de óxido de alumínio com condicionamento ácido. E os piores resultados foram encontrados no seu uso isolado em superfícies de esmalte – sem o condicionamento ácido associado - sendo contraindicado por não oferecer resistência adesiva minimamente aceitável. (BORSATTO *et al.*, 2002; ALHAIJA; AL-WAHADNI, 2004)

O jateamento permite que as partículas de óxido de alumínio (diâmetro de 50 μm) ataquem aleatoriamente os prismas de esmalte (diâmetro dos prismas de 5 μm) removendo diferentes partes da superfície, expondo a estrutura prismática subjacente, (PATCAS *et al.*, 2015) promovendo fraturas irreversíveis em diferentes partes da superfície e aumentando a rugosidade superficial, (ROBLES-RUÍZ *et al.*, 2015; GABARRONE, 2016) e a superfície de contato.

Quando se aplica o condicionamento ácido sobre esta superfície previamente tratada com o jateamento, o ácido fosfórico a 37% consegue condicionar o esmalte subsuperficial através de uma desmineralização adicional da estrutura do esmalte fragilizado. Isto aumenta ainda mais a superfície de contato condicionada, o que oferece maior força de união nesta superfície. (PATCAS *et al.*, 2015)

2.2.1.3 Lasers

Para que o laser possa interagir com tecido biológicos deve haver absorção dele pela água e pelas substâncias cromóforas do tecido. As substâncias cromóforas são elementos que possuem alto coeficiente de absorção. No caso do esmalte dental são representadas pela hidroxiapatita. Por este motivo, muitos estudos de adesão em ortodontia utilizam, preferencialmente, os lasers com alta absorção pela água e hidroxiapatita (laser de Er:YAG: λ - 2,94 μm), e com alta afinidade pela água e fosfato sejam facilmente absorvidos pelos tecidos que os contém (laser de CO₂: λ -10,6 μm). (YAMADA *et al.*, 2004)

O laser de Nd:YAG (λ – 1,064 μm) tem baixa absorção em água e hidroxiapatita, sendo melhor absorvido por pigmentos, como por exemplo a hemoglobina e a melanina. Apesar disso, o Nd:YAG é comumente indicado para protocolos de prevenção de cárie na literatura, associado ou não ao flúor, mostrando resultados de impacto na redução do risco de cárie dental. (HARAZAKI *et al.*, 2001; ZECELL *et al.*, 2009)

Pelas suas características, ele alcança maior profundidade de penetração nos tecidos biológicos. E, para restringir a absorção do feixe de laser a superfície do esmalte – potencializando os efeitos térmicos-, ele é utilizado associado a um fotossensibilizador (de cor escura), aplicado antes da irradiação. (BOARI *et al.*, 2009; ANA *et al.*, 2014) Nos estudos de Boari *et al.* (2009), o carvão vegetal foi o fotossensibilizador que promoveu uma absorção mais uniforme do laser de Nd:YAG.

A interação fototérmica pode provocar carbonização, coagulação, vaporização, fusão, fotoablação, fotodisrupção e ablação induzida por plasma nos tecidos. A condução de calor para os tecidos vizinhos ao tecido alvo em que se deseja produzir o efeito deve ser considerada, para que não haja efeitos deletérios. (DIAS-MORAES *et al.*, 2019) Em estudos sobre a influência do Nd:YAG nas alterações de temperaturas pulpares, observou-se variações de 5,5°C – ainda consideradas seguras para a polpa- ao irradiar a superfície sem uso do fotossensibilizador. O uso adequado do fotossensibilizador pode diminuir ainda mais essa transmissão de calor para a polpa. (VALÉRIO *et al.*, 2015)

Para protocolos de colagens, poucos autores avaliaram os efeitos do laser de Nd:YAG em substituição ao condicionamento ácido, para colagens de braquetes. (WEN *et al.*, 2014) O mais comum é encontrá-los associados. (MATOS *et al.*, 2000; MARIMOTO *et al.*, 2013; WEN *et al.*, 2014; BARCELLOS *et al.*, 2015) A ordem em que se apresentam parece influenciar nos resultados. Quando a irradiação é feita antes do condicionamento, parece haver um aumento na resistência adesiva dos braquetes – pelo aumento da rugosidade da superfície irradiada e eliminação das estruturas fracas resultantes. (WEN *et al.*, 2014)

Na ordem inversa, dois estudos (WEN *et al.*, 2014; BARCELLOS *et al.*, 2015) encontraram uma diminuição da força adesiva, e um outro artigo (MATOS *et al.*, 2000) relatou o seu aumento. Um outro estudo (MARIMOTO *et al.*, 2013) não encontrou diferença estatística na associação das técnicas.

Os achados de Bedini *et al.* (2010) sugerem que o laser de Nd:YAG deve ser aplicado com baixos níveis de energia quando o objetivo for preservar sua integridade e reduzir a desmineralização; e com altos níveis de energia para criar retenções na superfície dental adequadas para selantes ou ancoragem de resinas.

2.3 MÉTODOS LABORATORIAIS PARA ANÁLISE DE SUPERFÍCIE E AVALIAÇÃO DE DESMINERALIZAÇÃO DE ESMALTE

Na desmineralização, quando a perda mineral atinge certo nível, o volume aumentado dos poros resulta numa área branca, opaca e clinicamente visível no esmalte. (RESTREPO, 2013) O fato de a desmineralização do esmalte ser passível de ser prevenida e revertida em estágios iniciais, agrega grande valor às técnicas diagnósticas ópticas que permitem identificação precoce destas lesões. (MAIA *et al.*, 2016)

2.3.1 Microscopia

Nos últimos anos, a técnica de microscopia de luz polarizada tem sido bastante difundida e atualmente é a técnica mais utilizada para avaliações de cárie incipiente *in vitro*. Nela, a LMB aparece caracterizada por manchas marrons difusas e infiltrativas. (SILVA *et al.*, 2009) No grupo das microscopias, a microscopia eletrônica de

varredura (MEV) também pode ser utilizada para avaliar desmineralizações, e agrega a vantagem de avaliar aspectos hígidos da superfície (Figura 1a) como também outras alterações topográficas.

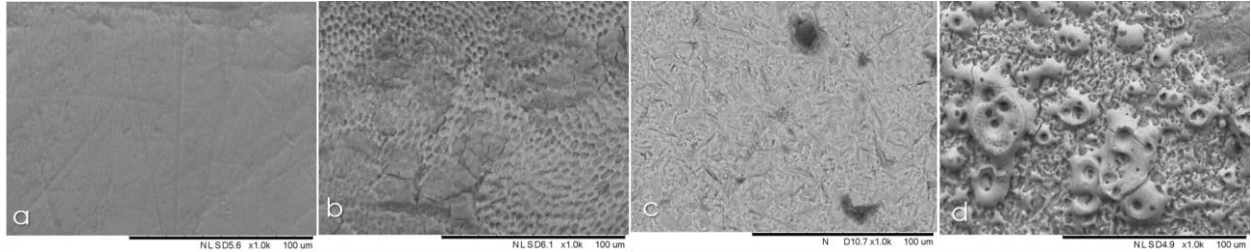
Na MEV, a LMB aparece como padrões prismáticos de desmineralização, devido a um aumento das bainhas dos prismas, com diferentes graus de dissolução do esmalte superficiais e subsuperficiais. (MARSILLAC, 2007) As desmineralizações subsuperficiais criam poros entre os prismas de esmalte, tornando a superfície áspera e mais porosa (Figura 1b), alterando o índice de refração e de reflexão do esmalte e visualmente provocando a perda do seu brilho superficial. (DIAS, 2015)

O ácido fosfórico também promove desmineralização das camadas mais superficiais do esmalte, entre 10 μm a 50 μm , criando porosidades até 200 μm de profundidade. (GRABER; ELIADES; ATHANASIOU, 2005) Ele modifica a superfície do esmalte seletivamente removendo estrutura mineral interprismática. Logo, o material orgânico é menos afetado do que a desmineralização decorrente de exposição prolongada a meios ácidos.

O condicionamento ácido promove rugosidades e microporosidades nos tecidos periféricos dos prismas dissolvidos mantendo as partes centrais intactas (padrão tipo 2). Os corpos de prova sob efeito do jateamento de óxido de alumínio (50 μm) apresentaram aspecto irregular, sem um padrão de condicionamento definido, sendo definida como uma desorganização superficial (Figura 1c). (CHINELATTI *et al.*, 2007) Quando da associação do jateamento com o condicionamento ácido, Chinelattii *et al.* (2007) encontraram um padrão similar ao apresentado pelo condicionamento.

Diferente do ácido, as alterações no esmalte promovidas pelo laser de Nd:YAG são vistas como microcrateras superficiais, pequenas bolhas de esmalte e microporos com aspecto recristalizado sem prisma de esmalte exposto (Figura 1d). (BANDA; VANAJA REDDY; SHASHIKIRAN, 2011; WEN *et al.*, 2014) Quando utilizado sem fotossensibilizador, nos parâmetros de 60 mJ, 10 Hz e 0,6 W, Bedini *et al.* (2010) descreveram um aspecto superficial de vidro sem presença de microtrincas. Os autores detectaram aumento da rugosidade promovida pelo contato da fibra do laser com a superfície.

Figura 1 - Imagem em SEM com 1000 x de aumento representando: (a) esmalte íntegro, (b) esmalte desmineralizado, (c) esmalte desorganizado e (d) esmalte com fusão dos cristais de hidroxiapatita.



Fonte: a autora

2.3.2 Tomografia por Coerência Óptica (TCO)

Esta técnica utiliza a luz para gerar imagens e obter medidas de tecidos biológicos a uma profundidade de penetração de até 2 mm em tecidos duros, permitindo a visualização de microestruturas a micrômetros com resolução espacial entre 1 e 10 μm , de forma não invasiva.(LEÃO FILHO *et al.*, 2015) Ela já foi consagrada e validada para avaliação da superfície dental, incluindo graus de erosão, quantificação dos remanescentes de resina, e padrões de fraturas de esmalte e resina.(LEÃO FILHO *et al.*, 2015)

A TCO utiliza princípios de interferometria de baixa coerência – Interferômetro de Michelson – sem radiação ionizante. A técnica faz vários escaneamentos longitudinais (*A-scans*) em vários locais adjacentes e permite a visualização de cortes transversais (semelhantes a cortes histológicos). A soma dos *A-scans* geram um mapa topográfico bidimensional (*B-scans*) (Figura 2), que em conjunto podem gerar uma imagem em 3D. (HUANG *et al.*, 1991)

Diferente das técnicas clínicas convencionais para detecção da cárie (visual, inspeção e radiografias), que tem alta especificidade, mas baixa sensibilidade, a TCO tem alta especificidade e alta sensibilidade. (ŞEN *et al.*, 2018; ZAIN; ZAKIAN; CHEW, 2018)

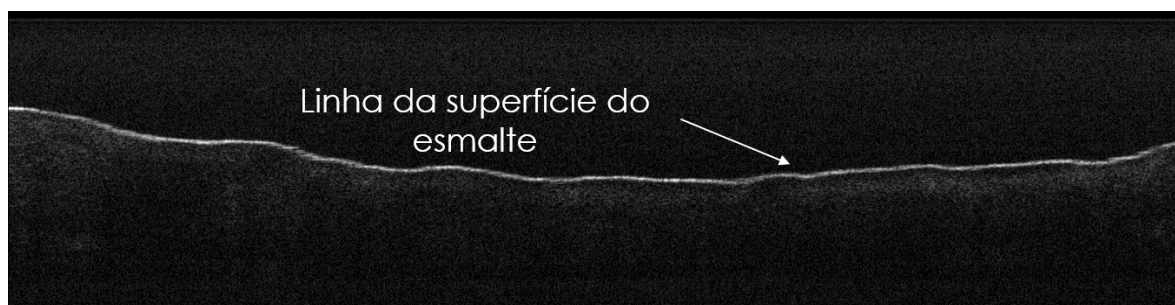
Ao interagir com os tecidos, a luz pode ser refletida, transmitida, absorvida na forma de calor, gerar fluorescência ou espalhar. A TCO só percebe o retroespalhamento e a reflexão. O sinal elétrico gerado pela interação com o tecido

biológico se dá por retroespalhamento da luz que é interpretado por um software e convertido em imagens em um monitor acoplado. O espalhamento é a descontinuidade do índice de refração no meio de propagação.

O tipo de espalhamento depende do comprimento de onda incidente em relação a razão entre os índices de refração de uma estrutura espalhadora e o meio em que ela se encontra, e do tamanho das estruturas do meio. No caso do esmalte, consideram-se os prismas com larguras entre 4,9 a 5,3 μm . (BACHMANN, 2004) O sinal retroespalhado é representado por uma escala logarítmica traduzida em escala de tons de cinza. A cor branca representa um alto espalhamento com aumento da intensidade do sinal, e a cor preta, um baixo espalhamento com baixa intensidade do sinal. (DIAS-MORAES *et al.*, 2019)

Quando ocorre a LMB, a imagem *B-scan* aparece com um aspecto mais esbranquiçado na linha da superfície do esmalte e também um decaimento óptico em tons de cinza abaixo desta. Atualmente estudos (MOTA *et al.*, 2013; CHAN; TOM; FRIED, 2014; AUSTIN *et al.*, 2017) relatam que as LMB podem ser melhor avaliadas pela TCO do que por microscopia, sendo uma ferramenta promissora, especialmente pela possibilidade de aplicação clínica com análises em tempo real. (MOTA *et al.*, 2009; LENTON *et al.*, 2012; FERNANDES *et al.*, 2017)

Figura 2- Imagem *B-scan* gerada pelo TCO de uma superfície lingual de esmalte hígida.



Fonte: a autora

2.3.2.1 Coeficiente de atenuação óptica (α)

As imagens obtidas através do sistema de TCO podem ser avaliadas qualitativamente e quantitativamente através da análise de parâmetros da amplitude do

sinal, como refletividade integrada e coeficiente de atenuação óptica total. (CARA *et al.*, 2014)

A imagem de TCO é gerada a partir da reflexão e retoespalhamento da luz que atravessa os tecidos, e a imagem transmitida também contribui para a formação do α . O α é regido pela lei de Beer e baseia-se no decaimento exponencial da intensidade do sinal da luz que passa pelos tecidos em relação a sua distância percorrida, ou seja, sua profundidade de penetração. Quanto mais profundo o tecido, menos luz chega até o final, logo mais fraca será a intensidade do sinal.

Diferentes tecidos biológicos, ou estados de um tecido (saudável ou doente), podem apresentar diferentes α . Alterações das propriedades ópticas dos tecidos pela desmineralização podem ser detectados precocemente (antes de técnicas convencionais), pelo α (Figura 3). O espalhamento da luz branca visível pelo esmalte desmineralizado pode fornecer uma estimativa sobre a quantidade de perda mineral. (KO *et al.*, 2000)

A desmineralização da superfície do esmalte causada pela perda de minerais e aumenta a porosidade do tecido, que permite maior passagem de luz. E o seu maior conteúdo de água aumenta o retroespalhamento da luz. Estas alterações aumentam a intensidade do sinal e provocam aumento do brilho dentro da imagem do TCO em até 3 vezes. (VELUSAMY *et al.*, 2018)

Existem resumidamente duas teorias a respeito do coeficiente de atenuação óptica relacionadas a desmineralizações dentárias: a primeira afirma que tecidos desmineralizados permitem maior passagem de luz por apresentar maior porosidade do tecido, e com isso ocorre uma diminuição do sinal de TCO, ocasionando também uma diminuição do coeficiente de atenuação óptica. (POPESCU *et al.*, 2008)

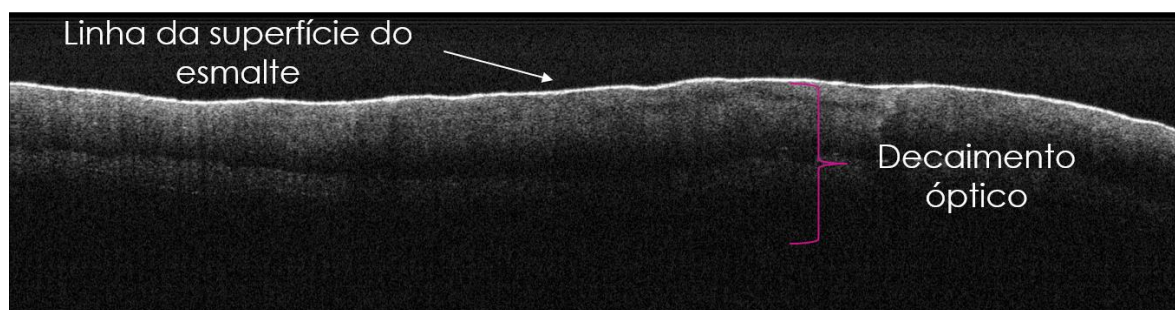
A segunda defende que dentes desmineralizados diminuem a passagem de luz, pois tem uma superfície mais desorganizada e com isso promove um maior espalhamento superficial (reflexão) da luz emitida, ocasionando um aumento do sinal do TCO e consequentemente um aumento do coeficiente de atenuação óptica. (CARA *et al.*, 2014b; SOWA *et al.*, 2011)

Dentes desmineralizados tem menor refletividade na superfície pois ela está mais porosa. E a radiação incidente consegue penetrar mais no corpo de prova.

(POPESCU *et al.*, 2008) Por ela apresentar menor conteúdo mineral há maior penetração de luz que interage com menor índice de refração da água e menos centros espalhadores. Logo a velocidade de decaimento do sinal é maior e assim também é maior o α .

A eliminação da água fracamente ligada nos corpos de prova irradiados e sua substituição por ar aumenta temporariamente o α pois o ar tem menor índice de refração que a água, e aumenta o espalhamento. Se reidratar o corpo de prova, volta a diminuir o α . (DIAS-MORAES *et al.*, 2019)

Figura 3- Imagem *B-scan* gerada pelo TCO demonstrando aspecto de uma alteração superficial do esmalte.



Fonte: a autora

2.3.3 Microdureza

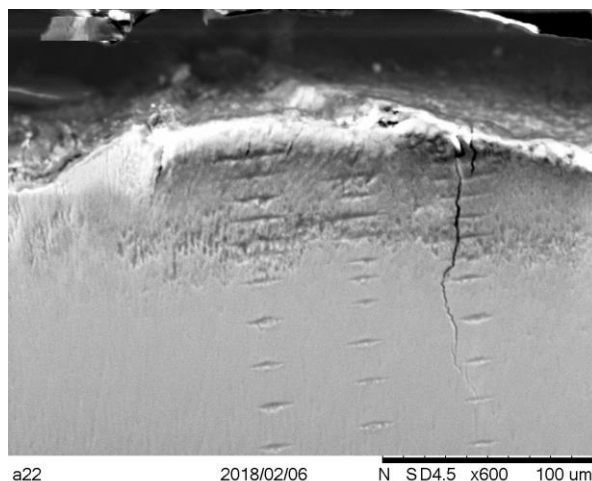
O teste de microdureza de superfície é um indicador indireto do conteúdo mineral presente no corpo de prova e pode ser relacionado com o início do processo de cárie, sendo considerado um indicador de mineralização, desmineralização e remineralização. (ZAMATARO, 2013) A sua maior vantagem é o controle de variação de dureza no próprio corpo de prova, aumentando a confiabilidade do dado obtido e diminuindo o erro experimental.

Devido à proximidade das indentações, nos trabalhos da área odontológica a microdureza Knoop é mais utilizada. É também considerada mais adequada para pequenas áreas, materiais frágeis muito duros e secções muito finas, sendo mais sensível às condições da superfície do que a microdureza Vickers. Nesse tipo de teste,

o valor de dureza é calculado com base na medida do comprimento da maior largura da endentação, representada por pequenos losângulos na figura 4. (CARA *et al.*, 2014) Quanto mais larga for a indentação, menos dura é a superfície medida.

A superfície do esmalte pode ter sua dureza alterada dependendo do tratamento a que for submetido. Dependendo da potência usada, a irradiação com laser de Nd:YAG aumenta (BANDA; VANAJA REDDY; SHASHIKIRAN, 2011) ou diminui (WEN *et al.*, 2014) a microdureza do esmalte. Barcellos *et al.* (2015) falam que o laser de Nd:YAG provocar microfraturas que diminuem a microdureza do esmalte dentário, no entanto, a densidade energética utilizada no estudo ($174,16 \text{ J/cm}^2$) foi elevada e altas densidades energéticas podem diminuir a microdureza do esmalte, além de poder aquecer inadequadamente outros tecidos dentários. (KURAMOTO JÚNIOR *et al.*, 2001)

Figura 4- Identações knoop em região desmineralizada e íntegra, evidenciando a diferença nas larguras das indentações- pequenos losângulos enfileirados.



Fonte: a autora

3 MÉTODO

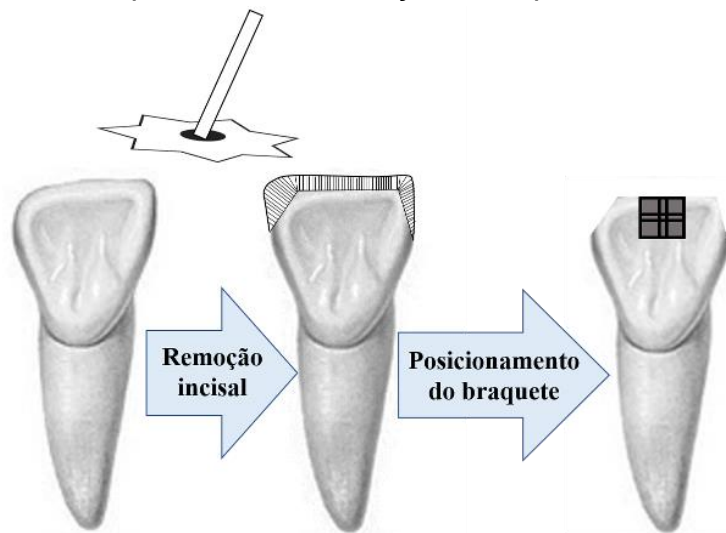
Foi realizado um ensaio laboratorial *in vitro* utilizando dentes incisivos bovinos que foram doados pelo Matadouro de Paulista (Pernambuco-PE) (Anexo A). Os experimentos só iniciaram após aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/IPEN), processo nº 107/12 (Anexo B). Inicialmente, realizou-se um estudo piloto que serviu para analisar as condições e ajustar a metodologia, e a partir dele, optou-se por dividir esta tese em 2 estudos, que originaram o artigo 1 e o artigo 2 (itens 5 e 6).

Para calcular o tamanho da amostragem utilizou-se a equação $N = 4\sigma^2(Z_{crit} + Z_{pwr})^2/D^2$, (ENG, 2003) onde N é o tamanho total da amostra, σ é o desvio padrão, Z_{crit} é o nível de significância (para significância de 95% foi de 1,96), Z_{pwr} é o poder estatístico (para poder de estudo de 90% foi de 1,282) e D é a diferença mínima esperada entre os grupos (valor de 0,5). Através deste cálculo obteve-se aproximadamente 7 corpos de prova por grupo para o estudo 1, e 15 corpos de prova por grupo para o estudo 2.

Os dentes foram limpos em ambiente úmido ($23 \pm 2^\circ\text{C}$), desinfetados em solução de Cloramina T (1%) e armazenados em temperatura de 4°C , conforme as normas da ISO/TS 11405:2015. Os corpos de prova foram selecionadas com o auxílio de uma lupa estereoscópica (0.65x – BX-51, Olympus, EUA) utilizando como critério de inclusão dentes livres de cáries, rachaduras, fraturas, depressões profundas, descalcificações superficiais, abrasões e manchamentos.

Baseado no estudo piloto, antes de iniciar o experimento, as bordas incisais dos dentes foram retificadas, cerca de 2 mm, com auxílio de disco de corte diamantado de dupla face ventilado (Pretty Odonto, São Paulo, Brasil), a fim de padronizar a área de colagem dos braquetes nos corpos de prova (Figura 5) e facilitar o deslize do cinzel para a etapa do ensaio de cisalhamento dos braquetes. Esta necessidade foi previamente avaliada em estudo piloto.

Figura 5 - Desenho esquemático da remoção da superfície incisal do dente.



Fonte: a autora

3.1 METODOLOGIA DO ESTUDO 1

No estudo utilizou 35 dentes incisivos bovinos, distribuídos em 5 grupos ($n=7$), conforme pré-tratamento da superfície: G1 - grupo controle; G2 - laser de Nd:YAG; G3 - laser + jateamento com óxido de alumínio (Al_2O_3); G4 - Al_2O_3 ; G5 - Al_2O_3 + laser. A figura 6 mostra a divisão dos grupos com suas respectivas etapas, evidenciando que a única diferença entre eles foi nas etapas que precederam o condicionamento ácido.

Figura 6- Etapas realizadas em cada grupo do Estudo 1: (a) irradiação com laser de Nd:YAG, (b) jateamento com óxido de alumínio, (c) condicionamento ácido, (d) aspecto de giz resultante do condicionamento ácido, (e) aplicação do sistema adesivo, (f) o molhamento da superfície pelo sistema adesivo, (g) posicionamento do braquete, (h) fotoativação.



Fonte: a autora

Os grupos passaram por análises ópticas (TCO e MEV) para morfologia superficial do esmalte no momento inicial (T0) e após o pré-tratamento da superfície (T1). Após estas análises os corpos de prova seguiram para a etapa da colagem dos braquetes, e após 24 h de armazenamento em água deionizada seguiram para o ensaio de cisalhamento. E então foi realizada nova análise da morfologia superficial para efeitos comparativos. O delineamento experimental deste estudo encontra-se na tabela 1.

Tabela 1- Delineamento experimental do Estudo 1.

Estudo	Fatores em estudo	Esmalte dentário (face lingual)
	Tratamentos	Jateamento com óxido de alumínio Irradiação com laser Nd:YAG Jateamento Al_2O_3 + Laser Nd:YAG
Unidades experimentais		Dentes bovinos
Variáveis resposta		Cisalhamento: MPa Coeficiente de atenuação óptica: μm^{-1} Morfologia superficial

3.1.1 Pré - tratamentos da superfície

3.1.1.1 Jateamento com óxido de alumínio

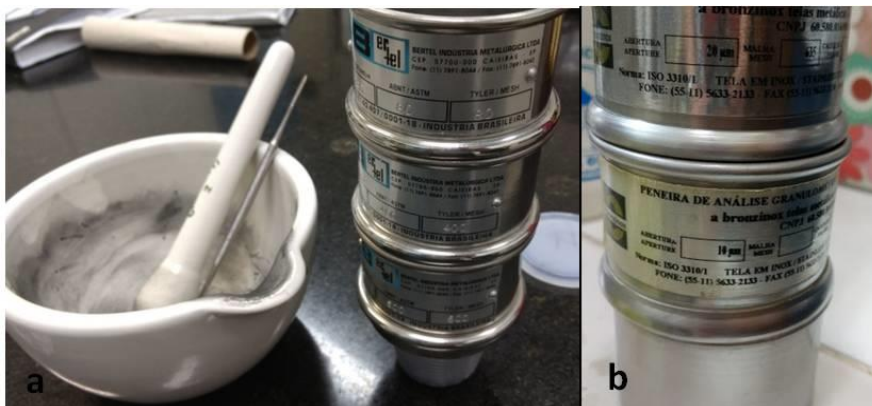
O jateamento com óxido de alumínio (50 μm , 60 PSI, BIO ART, SP, Brasil) foi realizado a uma distância de 10 mm durante 3 segundos, segundo protocolo de Thurler *et al.* (2014).

3.1.1.2 Laser de Nd:YAG

A irradiação com laser de Nd:YAG (Nd:YAG laser Power TM ST6, Lares Research®, EUA) foi associada à aplicação prévia de um fotoabsorvedor, o carvão vegetal triturado e peneirado em partículas de 10 μm (Figura 7), misturado em partes iguais de água destilada e álcool 99%, seguindo o protocolo de Zezell *et al.* (2009).

Os corpos de prova foram irradiadas duas vezes em contato manual: uma no sentido horizontal e outra no sentido vertical, por 30 segundos cada sentido, para garantir que toda a superfície fosse irradiada conforme aplicação clínica.

Figura 7 - Kit de preparo do carvão vegetal em partículas de 10 μm : (a) almofariz, pistilo e peneiras de análise granulométrica de diferentes aberturas, (b) peneiras nas aberturas de 20 μm e 10 μm .



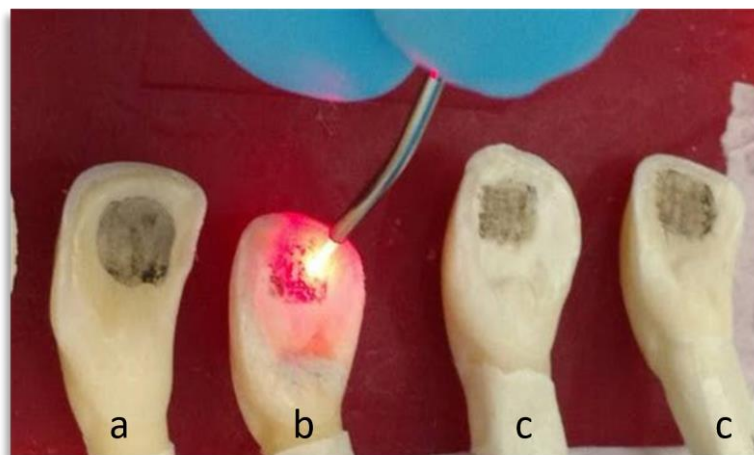
Fonte: a autora

Os parâmetros utilizados no laser estão dispostos no quadro 1, e as imagens dos aspectos clínicos antes, durante e após irradiação estão dispostos na figura 8.

Quadro 1 - Parâmetros para irradiação com laser de Nd:YAG.

Laser	Nd:YAG
Comprimento de onda	1064 nm
Potência	0.6 W
Frequência do pulso	10 Hz
Duração do pulso	100 μs
Energia do pulso	60 mJ
Densidade energética	84,9 J/cm ²
Tempos de irradiação	30"
Tipo de emissão	pulsada

Figura 8 - Superfície de esmalte (a) antes, (b) durante e (c) após irradiação com laser de Nd:YAG.

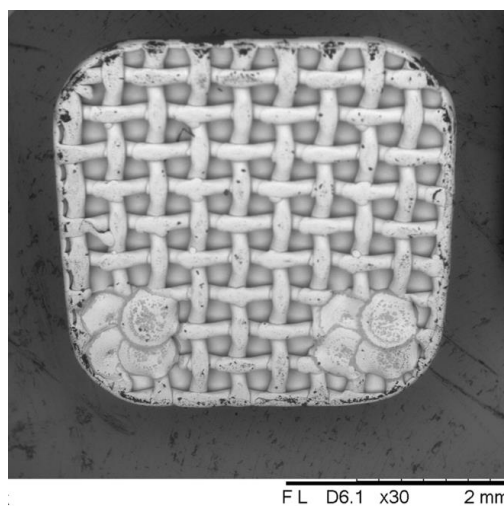


Fonte: a autora

3.1.2 Braquete utilizado

Para a colagem foram utilizados os braquetes ortodônticos linguais Forestadent (Pforzheim, Alemanha), com base quadrangular de dimensões 3,26 x 3,26 mm (área da base: 10,62 mm²) de dentes incisivos centrais superiores (figura 9).

Figura 9 - Imagem em SEM da base dos braquetes Forestadent utilizados no Estudo 1.



Fonte: a autora

3.1.3 Protocolo de colagem dos braquetes

Os dentes foram apoiados numa prensa de bancada e o protocolo de colagem seguiu os passos abaixo, e utilizou os materiais expostos no quadro 2:

1. Limpeza da superfície com pedra pomes e escova de Robinson;
2. Lavagem da superfície com spray de água até sair toda a pasta de pedra pomes;
3. Secagem da superfície com spray de ar por 10 segundos;
4. Demarcação da área de trabalho com lápis grafite com auxílio de um paquímetro;
5. Condicionamento com ácido fosfórico 37% durante 30 segundos;
6. Lavagem da superfície condicionada com spray de água por 30 segundos;
7. Secagem da superfície com spray de ar por 10 segundos;
8. Aplicação do adesivo do kit Transbond XT com auxílio de um aplicador descartável (KG brush fine, KG Sorensen, Cotia, SP, Brasil) na área de trabalho demarcada até o molhamento da superfície;
9. Leve jato de ar na superfície;
10. Posicionamento do braquete com auxílio de uma pinça porta braquete, em posição incisal;
11. Pressionamento do braquete contra a superfície de esmalte com auxílio de um tensiômetro (Morelli, São Paulo, Brasil) por 5 segundos com 1200gf;
12. Remoção do excesso da resina ao redor do braquete com auxílio de uma sonda exploradora;
13. Fotoativação do conjunto braquete-dente por 20 segundos, com um fotopolimerizador (LED Ortholux™ Luminous Curing Light; 3M ESPE, Minnesota, EUA) previamente testado com irradiância de 800 mW/cm² por um por um radiômetro Demetron Research Corporation (Danbury, CT, EUA).

Dentre os produtos utilizados para a colagem dos braquetes estão o ácido fosfórico 37% (Condac, FGM, Joinville - SC – Brasil) - com composição de ácido fosfórico 37%, espessante, corante e água deionizada- e a resina Transbond XT (Lote:N821727, 3M Unitek, Monrovia, CA, EUA), composta por TEGDMA, Bis-GMA e canforoquinona.

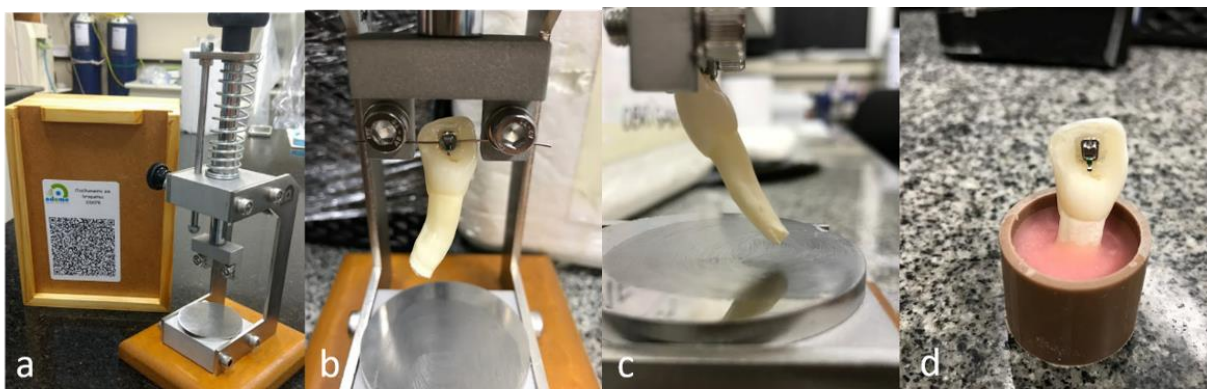
3.1.4 Inclusão dos corpos de prova

Após a colagem dos braquetes os corpos de prova estavam prontos para inclusão. O processo de inclusão foi realizado da mesma forma para todos os corpos de prova: os dentes foram incluídos verticalmente em cano de PVC (3/4 de polegada) preenchido com resina acrílica quimicamente ativada (Jet, São Paulo, Brasil). Para assegurar que a interface braquete-esmalte fosse mantida perpendicularmente ao plano horizontal, foi usado um dispositivo de inclusão de corpos de prova (Modelo 467, Odeme, Santa Catarina, Brasil), como mostra a figura 10.

A figura ilustra o dispositivo de inclusão de corpo de prova (Figura 10 a), o encaixe do conjunto dente-braquete no fio metálico 0,017" x 0,025" do sistema do dispositivo de inclusão de corpo de prova com auxílio de ligadura elástica (Figura 10 b), a verificação do ângulo gerado no dente promovendo o correto paralelismo entre o braquete e o eixo em que este será cisalhado na máquina de ensaios universal (Figura 10 c) e o conjunto final dos corpos de prova para ensaio de cisalhamento (Figura 10 d).

Após inclusão dos corpos de prova permaneceram imersas em água deionizada por 24h para realização do ensaio de cisalhamento, escaneamento com MEV e TCO e mensuração do coeficiente de atenuação óptica.

Figura 10 - Sequência ilustrativa de inclusão de corpo de prova em resina acrílica.



Fonte: a autora

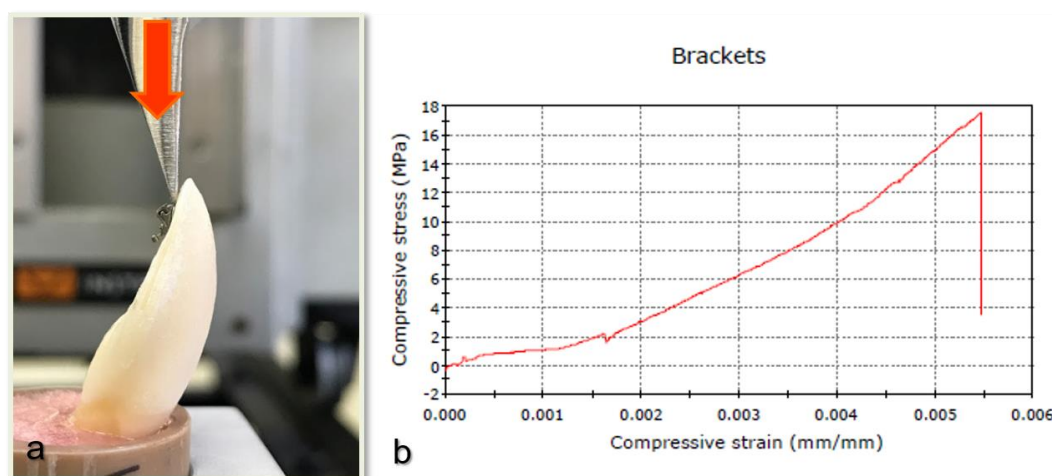
3.1.5 Análises

3.1.5.1 Ensaio de cisalhamento

Os ensaios foram realizados, conforme norma ISO/TR11405, pela máquina de ensaios universal INSTROM 5567 (Texas, Estados Unidos) (Figura 11). Foi utilizada uma célula de carga de até 1kN acionada à velocidade de 0,5 mm/minuto no sentido de compressão incisogengival (Figura 11a), desenvolvendo-se assim uma tensão de cisalhamento na interface base do braquete-resina até o momento da fratura ou rompimento da união adesiva. A tensão de cisalhamento foi calculada utilizando-se a fórmula $P=F/A$, onde F era a força máxima para ocorrer o cisalhamento do braquete e A representou a área da base do braquete utilizado.

Associado ao cálculo da tensão de cisalhamento, a máquina gerava um gráfico que representava o comportamento padrão da força de cisalhamento (MPa) em relação ao deslocamento do cinzel na interface braquete- resina- esmalte durante a tensão de cisalhamento.

Figura 11 – a) Imagem ilustrativa da direção da força de cisalhamento (seta vermelha) e b) do comportamento gráfico do cisalhamento.



Fonte: a autora

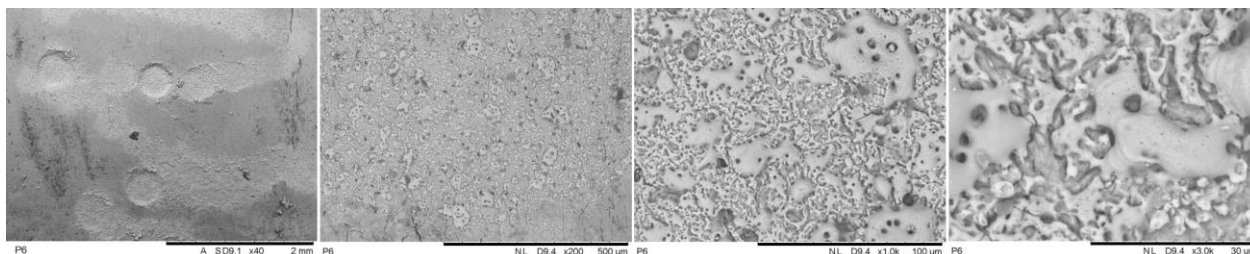
Sempre antes de seguirem para escaneamento em TCO e MEV, os corpos de prova passaram por banhos em cuba ultrassônica Thornton T7 (Unique, Indaiatuba, Brasil), durante 4 minutos.

3.1.5.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para analisar diferenças do comportamento da superfície do esmalte dentário ao final de cada etapa do estudo, foi utilizado o SEM de baixo vácuo Hitachi TM3000 (Tokyo, Japão). O equipamento apresenta tensão de aceleração de 5 ou 15 kV, fonte de tungstênio, ampliação de 15 X a 30.000 X, resolução de 30 nm, e modo de redução de carga (que utiliza a pressão da câmara superior) que permite obter a imagens a partir de corpos de prova não revestidos. Os corpos de prova foram analisados em diferentes ampliações (40, 200, 1000, 3000 x) com parâmetro de 15 kV em modo *Shadow 1* (Figura 12).

As imagens em SEM foram obtidas no T0 (momento inicial), após os pré-tratamentos das superfícies de esmalte e após o cisalhamento dos braquetes.

Figura 12- O mesmo corpo de prova após irradiação com laser de Nd:YAG, em diferentes ampliações: 40, 200, 1000, 3000 x, da esquerda para direita. As imagens evidenciam o pulso do laser em menor aumento e a fusão do esmalte (*melting*), em maior aumento.



Fonte: a autora

3.1.5.3 Tomografia por Coerência Óptica (TCO)

Neste estudo, um sistema de TCO comercial OCP930RS (Thorlabs Inc., New Jersey, EUA) utilizou uma fonte luminosa com comprimento central de onda de

930 nm, com 2 mW de potência e largura espectral de 100 nm, produzindo imagens em corte transversal (2D) ligado a um computador pré-configurado. As imagens foram geradas com 2000 colunas e 6 mm de varredura transversal com escalas de 300 μm . O intervalo de escaneamento foi de 1 mm na janela de estudo, em sentido cérvico-incisal, usando a margem cervical dos dentes como referência no posicionamento dos corpos de prova. Cada dente escaneado desta forma gerou 6 imagens por corpo de prova - em formato BMP (Figura 13) – em cada tempo analisado (T0 e T1), que foram coletadas pelo TCO sempre no mesmo padrão (RAW 0,003089).

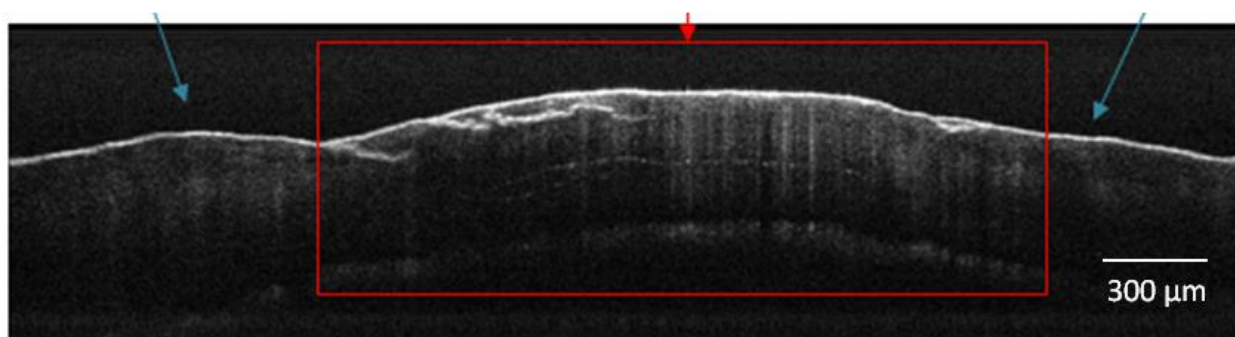
Figura 13 – Imagem representativa das 6 linhas de escaneamento do TCO com intervalos de 1 mm entre elas.



Fonte: a autora

As imagens em TCO foram obtidas no T0 (momento inicial), após os pré-tratamentos das superfícies de esmalte (T1) e após o cisalhamento dos braquetes. Foi considerado o índice de refração do esmalte dental de 1,6.(CARA *et al.*, 2014) A figura 14 ilustra a região de interesse de estudo (ROI) demarcada em vermelho, e as regiões livres de tratamento da superfície apontadas pelas setas azuis. Todos os corpos de prova foram centralizados da mesma forma no momento da aquisição das imagens.

Figura 14 - Imagem (*B-scan*) de TCO obtida a partir de corpos de prova jateados com Al_2O_3 .



Fonte: a autora

3.1.5.3.1 Coeficiente de atenuação óptica (α)

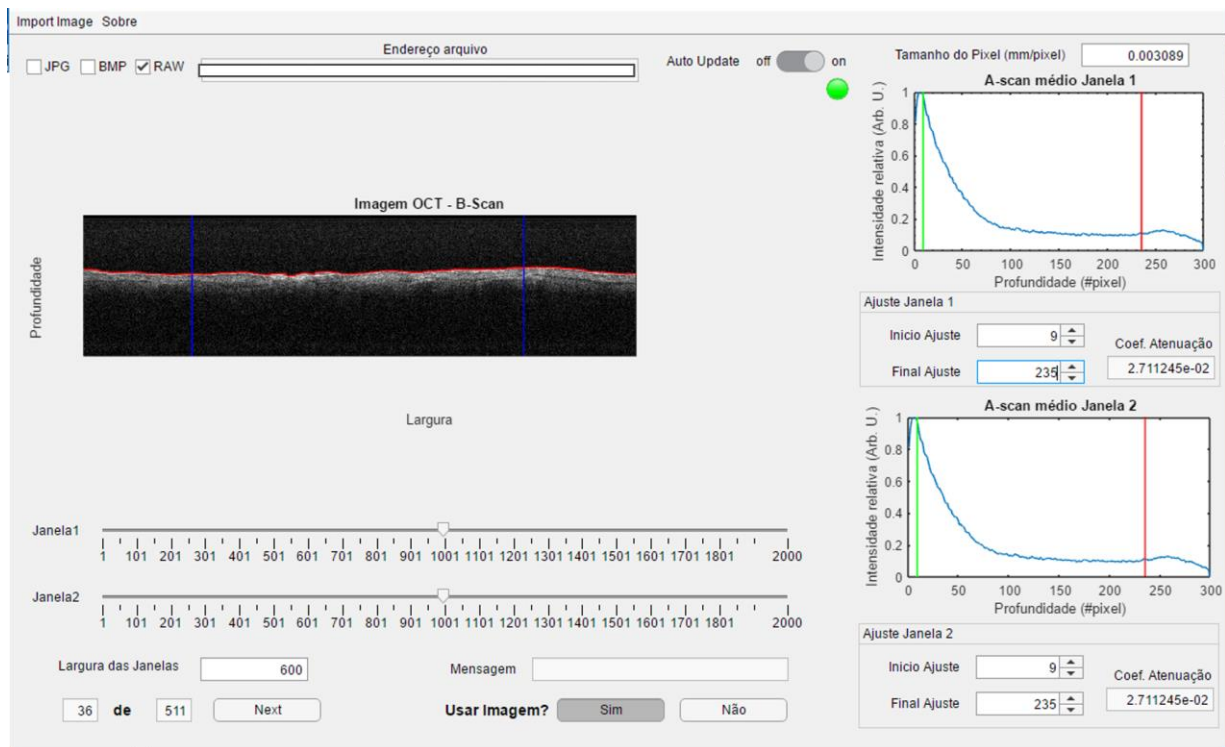
A partir das imagens obtidas pelo TCO, o α foi utilizado para mensurar o decaimento exponencial da intensidade da luz retroespalhada nas imagens. Para isso foram utilizadas as imagens de TCO iniciais (T0) e logo após os procedimentos de jateamento com óxido de alumínio e/ou irradiação com laser de Nd:YAG (T1). Para a medida α , foi utilizado o software MATLAB Runtime - MATLAB Compiler (MathWorks Inc, Massachusetts, EUA).

O programa desenvolvido permite selecionar até duas regiões de interesse (ROI – Regions of Interest) ao mesmo tempo de forma independente com o uso dos delimitadores- chamados de janelas. No estudo 1, havia apenas uma região de interesse (área que teve preparo com laser e/ou jateamento no centro do corpo de prova - Figura 15). Foram padronizadas janelas com 600 μm de largura com profundidade variando entre 0 e 600 μm .

Para o α , cada corpo de prova teve as 6 imagens analisadas. Totalizando 30 imagens por grupo no T0, e 30 imagens por grupo no T1. A média do *A-scan* foi calculada nas imagens de TCO e a análise foi repetida para várias aquisições sequenciais, fornecendo o valor aritmético médio de *A-scans* de cada grupo. Para a comparação intergrupos foi determinada a variação (Δ) individual dos grupos

considerando a diferença entre os valores médios finais (T1) e os valores médios iniciais (T0).

Figura 15- Tela do programa MATLAB Runtime mostrando uma imagem *B-scan* de um corpo de prova em T1. Evidenciando a janela e profundidade de trabalho em 1 ROI, e a curva do *A-scan* médio gerado em cada amostra.



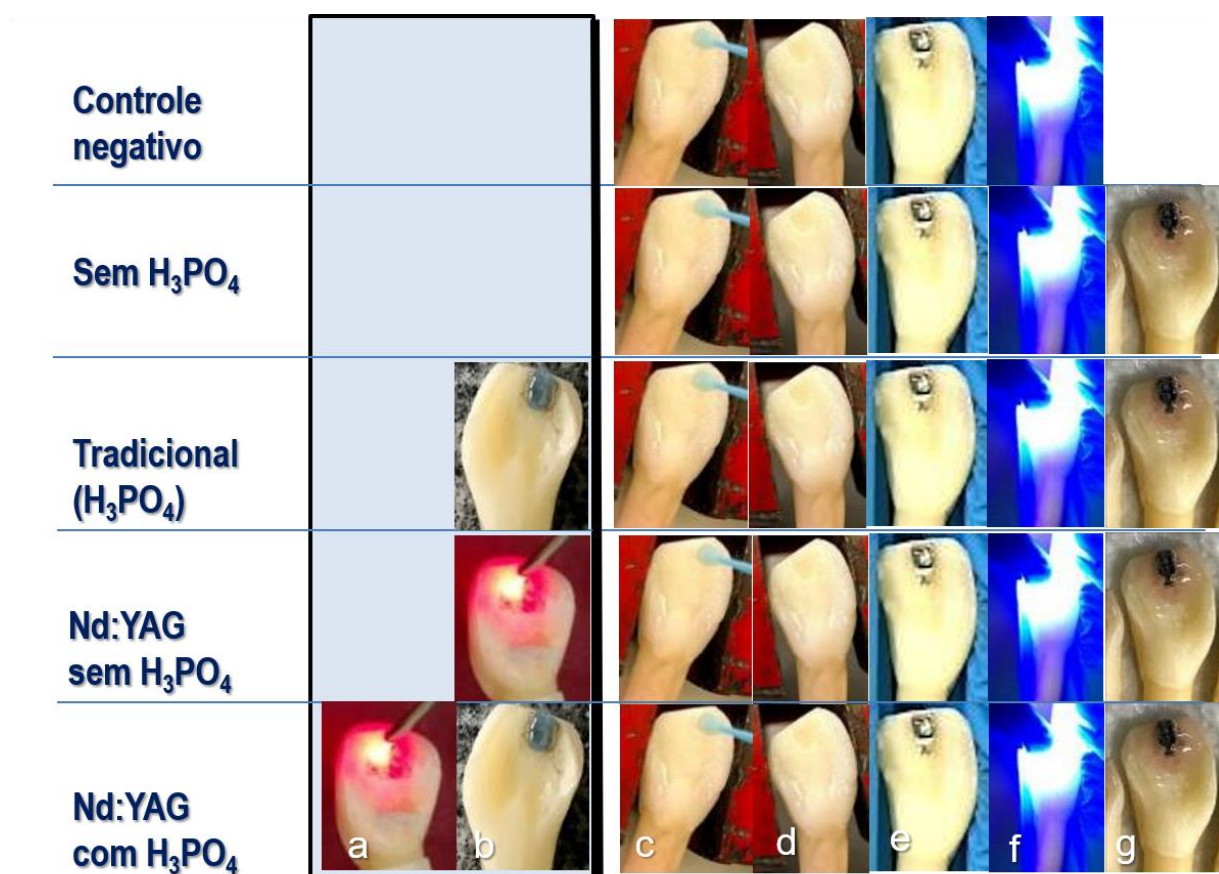
Fonte: a autora

3.2 METODOLOGIA DO ESTUDO 2

Após análise óptica inicial (T0) da morfologia superficial do esmalte através das técnicas de análise óptica (TCO e MEV), 75 dentes bovinos foram distribuídos em 5 grupos ($n=15$), conforme pré-tratamento da superfície: G1- grupo controle negativo (sem condicionamento ácido- H_3PO_4 prévio a colagem direta – CD- dos braquetes, e sem aplicação de Flúor fosfato acidulado – FFA, após a CD); G2- sem H_3PO_4 prévio a colagem+ FFA após a colagem; G3- CD com H_3PO_4 + FFA após a colagem; G4-

preparo do esmalte apenas com irradiação com laser de Nd:YAG sem H_3PO_4 + FFA, após a CD; G5- irradiação com laser de Nd:YAG+ H_3PO_4 antes da CD, e FFA após a CD. A figura 16 mostra a divisão dos grupos com suas respectivas etapas, evidenciando que a única diferença entre eles foi nas etapas que precederam a aplicação do sistema adesivo.

Figura 16 - Etapas realizadas em cada grupo do Estudo 2: (a) irradiação com laser de Nd:YAG, (b) condicionamento ácido, (c) aplicação do sistema adesivo, (d) o molhamento da superfície pelo sistema adesivo, (e) posicionamento do braquete, (f) fotoativação, (g) aplicação de flúor ao redor do braquete colado.



Fonte: a autora

Os corpos de prova passaram por uma segunda análise óptica, após o pré-tratamento da superfície, e seguiram para a etapa da colagem dos braquetes. Após a colagem dos braquetes, os grupos indicados receberam aplicação tópica de FFA e ficaram armazenados 24h em água deionizada. Em seguidas, os dentes foram

submetidos aos ensaios de termociclagem e ao desafio cariogênico, e 24h após novo armazenamento em água deionizada, foram cisalhados.

Após o cisalhamento, foi realizada a terceira análise óptica (T1) da morfologia superficial do esmalte. Em seguida, todos os dentes seguiram para o ensaio de microdureza. E então foi realizada nova análise óptica para efeitos comparativos. O delineamento experimental deste estudo encontra-se na tabela 3.

Tabela 2 - Delineamento experimental do Estudo 2.

Estudo 2	Fatores em estudo	Esmalte dentário (face lingual)
	Tratamentos	Irradiação com laser Aplicação de FFA Condicionamento ácido
	Período de Termociclagem	6h
	Período de Desafio Cariogênico	48h
Unidades experimentais		Dentes bovinos
Variáveis resposta		Cisalhamento: MPa Profundidade de desmineralização da superfície: μm Coeficiente de atenuação: μm^{-1} Microdureza: Kgf.mm^{-2} Morfologia superficial

3.2.1 Pré - tratamentos da superfície

No estudo a escolha pelo uso do condicionamento ácido após a irradiação com laser de Nd:YAG foi baseada nos resultados encontrados no estudo de Wen *et al.* (2014), em que os autores testaram protocolos de utilização do condicionamento ácido fosfórico (37%) antes e depois da irradiação com Nd:YAG para colagem de braquetes, e alcançaram melhores resultados quando o condicionamento ácido foi realizado após a irradiação do laser.

Os grupos tiveram como variáveis de pré-tratamentos: o laser de Nd:YAG, o condicionamento ácido e o flúor.

3.2.1.1 Laser de Nd:YAG

A irradiação com laser decorreu da mesma forma que na metodologia do estudo 1 (item 3.1.1.2 desta tese).

3.2.1.2 Condicionamento ácido

O condicionamento ácido foi utilizado nos grupos indicados de acordo com orientação do fabricante (por 30 segundos).

3.2.1.3 Protocolo de Flúor

A aplicação do flúor (flúor fosfato acidulado 1,23%-Nova DFL, Rio de Janeiro, Brasil) foi realizada em única sessão, por 4 minutos, com auxílio de uma haste flexível com algodão (Johnson&Johnson, New Jersey, EUA). Após esse período, os corpos de prova foram lavados com água deionizada por 1 minuto e secos com papel absorvente, seguindo protocolo de Delbem e Cury (2002).

3.2.2 Braquete utilizado

Os braquetes ortodônticos linguais utilizados foram da marca Orthomundi (Porto Alegre, RS, Brasil), com base trapezoidal apresentando medidas de 3,01 x 2,71 x 3,62 (área da base: 10,35 mm²), de incisivos centrais superiores (Figura 17).

Figura 17 - Imagem em MEV da base dos braquetes Orthomundi.



Fonte: a autora

Apesar de ter sido utilizado um braquete diferente do utilizado no estudo 1, não houve diferença entre as bases dos braquetes deste estudo.

3.2.3 Protocolo de colagem dos braquetes

O protocolo de colagem seguiu os mesmos passos e materiais descritos no item 3.1.3 desta tese, para os grupos G3 e G5, seguindo as etapas de 1 a 13.

Os grupos G1, G2 e G4 dispensaram as etapas do condicionamento com ácido fosfórico 37% durante 30 segundos (etapa 5) e a lavagem da superfície condicionada com spray de água por 30 segundos (etapa 6). A partir da aplicação do sistema adesivo (etapa 8) todos os grupos seguiram os mesmos passos até serem fotoativados (etapa 13).

3.2.4 Testes laboratoriais

3.2.4.1 Termociclagem

A termociclagem foi realizada 24 h após a colagem dos braquetes estando os corpos de prova armazenados em água destilada a 37°C. Os ensaios seguiram as orientações da ISO/TS 11405:2015, com 500 ciclos realizados em água entre $5 \pm 3^\circ \text{C}$ e $55 \pm 3^\circ \text{C}$ na máquina modelo MSCT-3 (Elquip, São Carlos, SP, Brasil) e exposição de 20 segundos a cada banho. O tempo de transferência entre os banhos foi de 5 segundos.

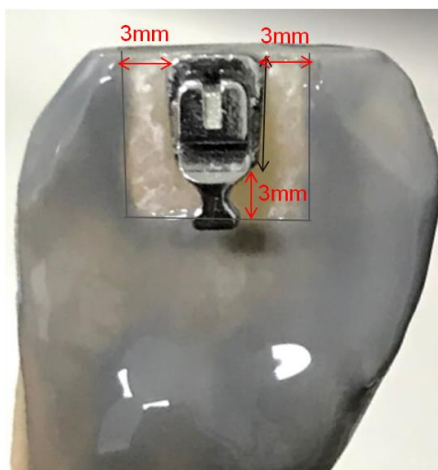
3.2.4.2 Desafio cariogênico

Após termociclagem foi delimitada uma janela de trabalho com margem de 3 mm ao redor dos braquetes, ^{Bakhrs, 2017} e as demais áreas foram recobertas por esmalte de unha (Colorama, L'oréal, Brasil) (Figura 18). Em seguida os corpos de prova foram submetidos ao ensaio de desafio cariogênico por 48h contínuas em Câmara Incubadora Refrigerada com Agitação Orbital (modelo MA832, São Paulo, Brasil), seguindo protocolo de Fried *et al.* (2013). (FRIED *et al.*, 2013) Para tal os dentes foram

submersos individualmente em 50 ml de uma solução de Ca / PO₄ / acetato contendo 2,0 mmol / L de cálcio, 2,0 mmol / L de fosfato e 0,075 mol / L de acetato mantido a pH 4,5 e um temperatura de 37 °C.

Após o desafio cariogênico, os corpos de prova foram retirados das soluções e lavadas com água deionizada durante 1 min. E em seguida, armazenadas em água deionizada a 4°C, por 24h.

Figura 18 - Imagem representativa da janela de trabalho nas laterais e abaixo do braquete.



Fonte: a autora

3.2.5 Inclusão dos corpos de prova

A inclusão dos corpos de prova deste estudo foi realizada como descrito na metodologia do estudo 1, no item 3.1.5 desta tese.

3.2.6 Análises

3.2.6.1 Ensaio de cisalhamento

O ensaio de cisalhamento para este estudo foi realizado como descrito na metodologia do estudo 1, no item 3.1.5.1 desta tese.

3.2.6.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

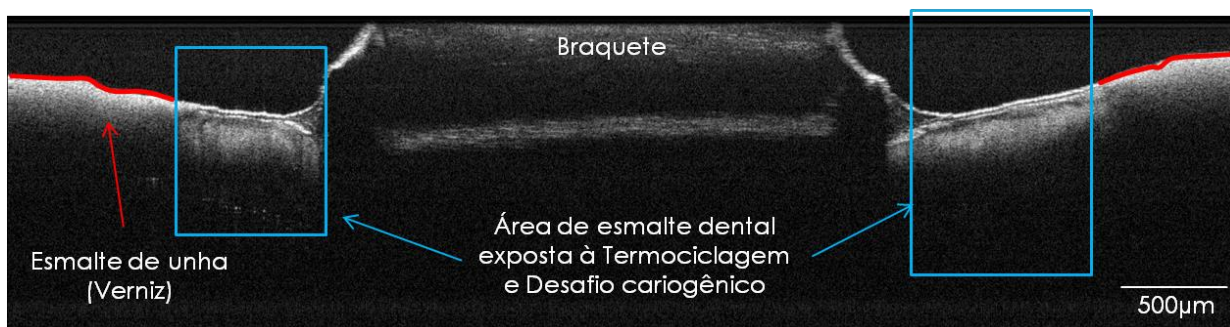
A análise óptica da morfologia superficial do esmalte através da microscopia eletrônica de varredura foi realizado como descrito na metodologia do estudo 1, no item 3.1.5.2 desta tese. Houve escaneamentos dos corpos de prova nos momentos: T0 (momento inicial), após os pré-tratamentos das superfícies de esmalte, após a termociclagem, após o desafio cariogênico (T1), após o cisalhamento dos braquetes e após o ensaio de microdureza.

3.2.6.3 Tomografia por Coerência Óptica (TCO)

A análise óptica através da tomografia por coerência óptica foi realizado como descrito no estudo 1, no item 3.1.5.3 desta tese. Contudo, a varredura transversal das imagens tiveram escalas de 500 μm para que fosse possível englobar na mesma varredura da imagem as 2 regiões adjacentes aos braquetes que foram expostas ao desafio cariogênico (Figura 19).

As imagens em TCO foram obtidas no T0 (momento inicial), após os pré-tratamentos das superfícies de esmalte, após a termociclagem, após o desafio cariogênico (T1), após o cisalhamento dos braquetes e após o ensaio de microdureza.

Figura 19 - Imagem representativa de TCO (*B-scan*) indicando as áreas expostas no corpo de prova após o desafio cariogênico.

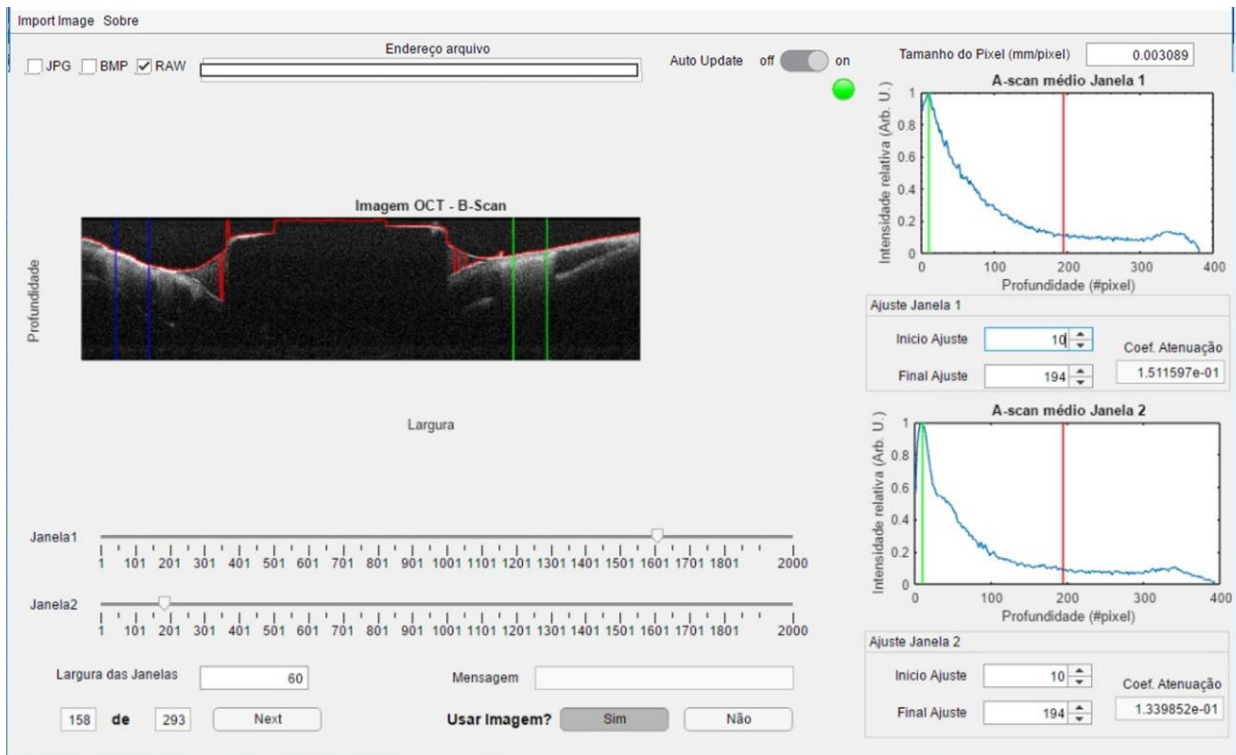


Fonte: a autora

3.2.6.3.1 Coeficiente de atenuação óptica (α)

A análise do α óptica foi realizado como descrito na metodologia do estudo 1, no item 3.1.5.3.1 desta tese. Contudo, neste estudo havia duas regiões de interesse (área ficou exposta ao desafio cariogênico do lado direito e esquerdo do braquete-Figura 20). E as larguras das janelas variavam de acordo com a largura da lesão de desmineralização que aparecia em cada corpo de prova. No exemplo abaixo, a largura das janelas foi de 60 μm .

Figura 20 - Tela do programa MATLAB Runtime mostrando uma imagem *B-scan* de um corpo de prova em T1. Evidenciando a janela e profundidade de trabalho em 2 ROIs, e a curva do *A-scan* médio gerado em cada amostra.

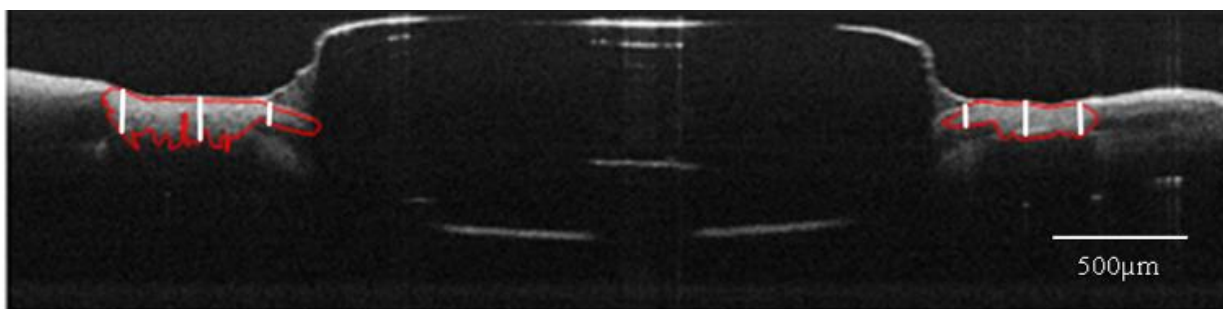


Fonte: a autora

3.2.6.3.2 Profundidade de desmineralização

A partir das imagens de TCO também foi calculado o alcance da profundidade de desmineralização gerado pelo desafio cariogênico nos grupos. Cada corpo de prova teve as 6 imagens analisadas e para representar cada grupo foram escolhidas 5 corpos de prova de cada um. Os corpos de prova tiveram as imagens iniciais e finais comparadas para eliminar dúvidas sobre os efeitos isolados da desmineralização. Em seguida foram selecionadas 5 cortes diferentes em imagens de TCO, de cada um dos 5 corpos de prova. Na área de interesse do estudo (região do desafio cariogênico) foram contornados os limites de profundidade de desmineralização (região delimitada em vermelho- Figura 21) onde foram realizadas três medidas: uma em cada extremidade e outra no centro conforme ilustra a figura abaixo.

Figura 21 - Área de interesse do estudo (região do desafio cariogênico) delimitada em vermelho na figura. Em cada região delimitada foram realizadas 3 medidas (linhas brancas): uma em cada extremidade e outra no centro.



Fonte: a autora

As medidas foram realizadas com auxílio do Software ImageJ (Versão 1.46r, Wayne Rasband National Institutes of Health, EUA), utilizando a escala do programa em micrometros. O índice de refração para o esmalte de 1.6.(CARA *et al.*, 2014) Cada imagem de TCO foi redimensionada no software ImageJ convertendo pixels para distância, já conhecida, da escala da imagem do TCO (500 µm) gerada pelo software. Em seguida foi realizada a medida guiada pelas linhas brancas traçadas dentro da área delimitada.

3.2.6.4 Microdureza

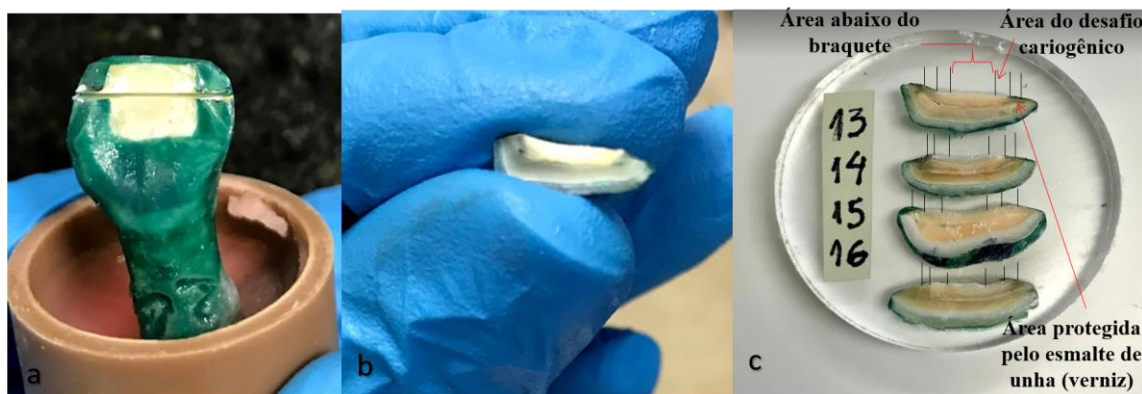
3.2.6.4.1 Secção e embutimento dos corpos de prova

Para a análise de microdureza foi necessário previamente seccionar os corpos de prova e embuti-las em resina acrílica quimicamente ativada (Clássico Artigos Odontológicos Ltda, Campo Limpo Paulista – SP, Brasil), com auxílio da prensa de embutimento PRE-30Mi (Arotec, Cotia, São Paulo, Brasil).

Os corpos de prova foram seccionadas perpendicularmente ao longo eixo do dente com auxílio de um disco de corte diamantado de dupla face ventilado (Pretty Odonto, São Paulo, Brasil) acoplado em micro-motor e peça reta (Dabi-Atlante, Ribeirão Preto, SP, Brasil). A linha de corte selecionada (Figura 22 a) representa o meio da área de estudo delimitada no início do trabalho. Antes de serem embutidas, os corpos de prova foram armazenadas individualmente por 24h em água deionizada.

Após seccionadas, os pedaços cortados dos corpos de prova (Figura 22 b) foram embutidos agrupados em 4 unidades por disco acrílico (Figura 22 c). Cada disco tinha 2 cm de diâmetro e 0,5 cm de altura. Os ciclos de embutimento foram padronizados em 6 minutos de aquecimento, com pressão mantida entre 100-150 Kg/cm², seguido por 9 minutos de resfriamento.

Figura 22 - (a) Linha de corte, (b) pedaço do corpo de prova utilizado para embutimento, (c) aspecto dos discos embutidos para testes de microdureza.



Fonte: a autora

Antes de seguirem para o ensaio de microdureza desta região, cada disco foi submetido a uma sequência de polimento até atingirem brilho superficial com auxílio de uma lixadeira- politriz Ecomet 300 (Jabaquara, São Paulo, Brasil) com um dispositivo para tratamento simultâneo de 6 corpos de prova - discos acrílicos. A sequência de lixas seguiu as granulações: 400, 600, 800, 1200, 2500, 4000 Carbimed Paper Discs (Buehler, Illinois, EUA). O polimento foi realizado com disco de papel feltro auto-adesivo Polishing Cloth (METADI, Buehler 40-7618, IL, EUA) e suspensão diamantada de 1 μ m (METADI Diamond Suspension - Buehler), sendo considerado satisfatório quando não foram mais observados riscos nas superfícies dos corpos de prova. O tempo dos corpos de prova com cada lixa foi de 4 minutos, e mais 4 minutos com o disco de feltro com a suspensão diamantada. Em seguida, os corpos de prova passaram por banhos em cuba ultrassônica e foram secas com lenço de papel absorvente. Este procedimento padronizado foi realizado entre todas as etapas de acabamento e polimento, e os corpos de prova ficaram armazenados em água deionizada (4°C) por 24h.

Após o polimento, os corpos de prova foram marcados com caneta esferográfica preta de ponta fina, dividindo o esmalte nas áreas que ficaram protegidas pelo esmalte de unha, abaixo do braquete e a área do desafio cariogênico, para facilitar a visualização no momento do ensaio de microdureza.

3.2.6.4.2 Medidas de Microdureza

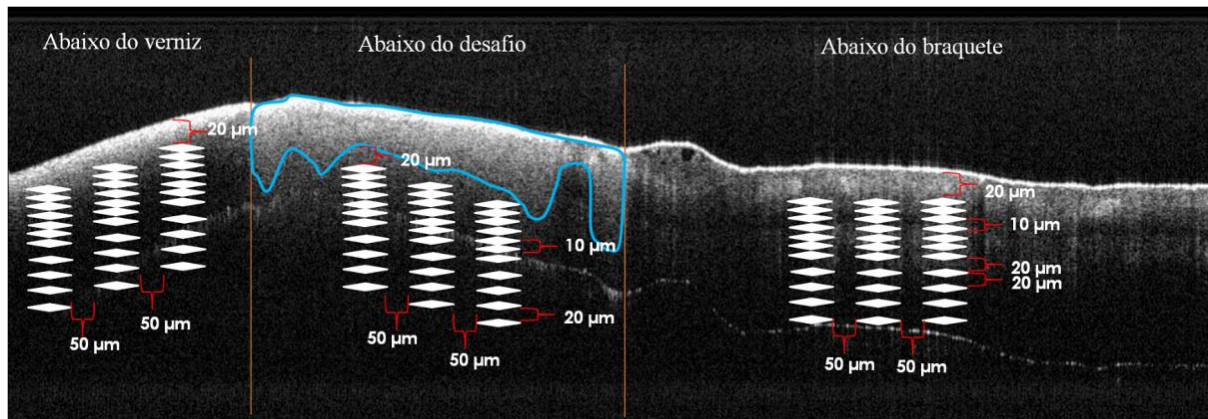
Após o polimento, os corpos de prova foram submetidos à análise de microdureza seccional utilizando-se o microdurômetro HMV-2000 (Shimadzu, Kyoto, Japão). Em cada corpo de prova, foram realizadas três seqüências de 11 indentações no meio do bloco de esmalte, sendo que a primeira indentação foi feita a partir de 20 μ m da borda da lesão de esmalte na região abaixo do desafio e a 20 μ m de distância da borda da superfície de esmalte nas regiões abaixo do braquete e abaixo do verniz, seguindo-se as distâncias de 30 μ m, 40 μ m, 50 μ m, 60 μ m, 70 μ m, 80 μ m, 100 μ m, 120 μ m, 140 μ m e 160 μ m em profundidade (Figuras 23 e 24). Entre as linhas, a distância padronizada foi de 50 μ m, sendo todas as indentações realizadas com carga estática de 98,07 mN (HK 0,01) durante 5 segundos.

Figura 23 - Exemplificação das medidas feitas iniciando 20 μm abaixo da borda da lesão em corpo de prova representativo do G1.



Fonte: a autora

Figura 24 - Representação ilustrativa do protocolo utilizado no ensaio de microdureza sobreposto a uma imagem de TCO com finalidade didática.



Fonte: a autora

O parâmetro de força da microdureza foi escolhido de acordo com teste piloto que possibilitaram resultados com esta força utilizada, uma vez que o tecido abaixo do desafio cariogênico apresentava-se demasiadamente amolecido, impossibilitando as medidas com forças maiores nesta região e adjacente a ela.

Os dados obtidos foram transportados para planilhas, onde foram calculadas as médias dos valores obtidos para, a partir destes dados, calcular-se o valor de conteúdo mineral (% vol.) de acordo com o protocolo do estudo de Ana (2007),(ANA; BACHMANN; ZECELL, 2006) utilizando-se a relação: [conteúdo mineral= $4,3 \sqrt{KHN} + 11,3$], onde KHN (Knoop hardness number) é o número de dureza Knoop médio em cada uma das profundidades analisadas. Desta forma é possível o cálculo do perfil mineral de cada corpo de prova. (FEATHERSTONE *et al.*, 1983)

A área de lesão de cárie foi calculada individualmente para cada corpo de prova sendo e relacionada com a profundidade de lesão. Para o seu cálculo, faz-se a projeção do perfil mineral do corpo de prova considerado hígido. Assim, a perda mineral corresponderá à diferença entre a área do esmalte hígido e a área do esmalte cariado.

3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os testes estatísticos foram executados no programa GraphPrisma (GraphPad Software, São Paulo, Brasil) com níveis de significância de 95% para os dois estudos. Os testes de normalidade de Shapiro-Wilk foram realizados para verificar a normalidade dos dados obtidos. Para os dados de cisalhamento, os testes ANOVA e Post Hoc Tukey foram feitos (considerando dados normais e testes não pareados). Para a profundidade de desmineralização e o coeficiente de atenuação óptica foram utilizados o teste de Kruskal Wallis e o teste post hoc de Dunn. Para análise de microdureza, foi realizado o teste ANOVA, Kruskal Wallis (para medidas intergrupos) e Friedman (para medidas inter regiões do mesmo corpo de prova).

4 RESULTADOS

Os resultados serão mais bem descritos nos artigos 1 e 2, derivados dos estudos 1 e 2 desta tese.

4.1 RESULTADOS DO ESTUDO 1

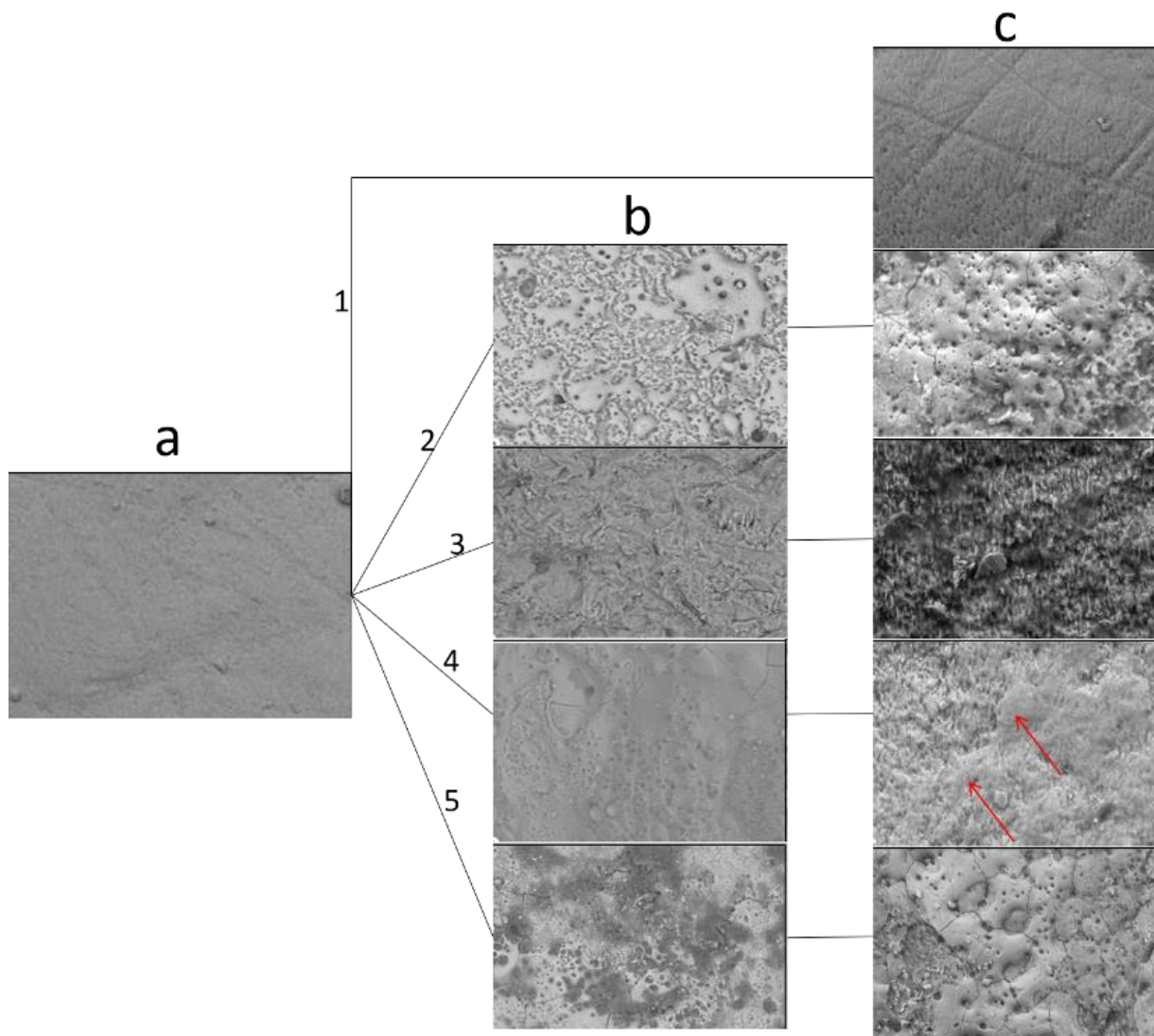
4.1.1 Ensaio de Cisalhamento

Houve similaridade entre todos os grupos. O maior valor foi observado no grupo jato + laser (G5), seguido pelo grupo laser + jato (G3), grupo jato (G4), grupo controle (G1) e grupo laser (G2), respectivamente.

4.1.2 Microscopia Eletrônica de Varredura

Após preparo dos grupos, o grupo do laser (G2) evidenciou fusão dos cristais de hidroxiapatita (*melting*) com aspecto de microcrateras e bolhas, os grupo que tiveram o jateamento como ultima etapa de pré-tratamento mostraram desorganização da superfície. O grupo que teve associação das técnicas com o laser em última etapa (G5) evidenciou *melting* em menor quantidade do que o grupo do laser isolado (G3). Após o cisalhamento, o grupo controle (G1) mostrou exposição dos prismas de esmalte e os demais grupos mantiveram seus aspectos semelhantes à análise anterior. (Figura 26)

Figura 25 - Representação do comportamento dos grupos (a) antes de qualquer tratamento, (b) após condicionamento das superfícies e (c) após cisalhamento dos braquetes. Linha 1 = G1 (controle), linha 2 = G2 (laser), linha 3 = G3 (laser + jato), linha 4 = G4 (jato) e linha 5 = G5 (jato + laser).



Fonte: a autora

4.1.3 Tomografia por Coerência Óptica

O grupo do laser (G2) demonstrou o *melting* como pontos densos na linha da superfície do esmalte ou imediatamente abaixo dela. O grupo do jateamento (G4) apresentou uma área de refração larga com decaimento óptico mais evidente do que em dentes hígidos. No grupo em que o jateamento foi realizado sobre o *melting* (G3),

houve um decaimento óptico menor do que o grupo apenas com jateamento (G4). Quando o laser foi aplicado em superfície jateada (G5) observou-se pontos densos pouco evidentes misturado com decaimento óptico característico do jateamento.

4.1.3.1 Coeficiente de atenuação óptica

Observou-se que o grupo da irradiação com o laser (G2) e o grupo do jateamento (G4) tiveram um aumento do α , enquanto os grupos com associação de técnicas (G3 e G5) tiveram uma diminuição. A análise de variação α (Δ) mostrou diferença estatisticamente significativa ($p = 0,0124$) entre os grupos G5/G2 e G5/G4.

4.2 RESULTADOS DO ESTUDO 2

4.2.1 Ensaio de Cisalhamento

O grupo laser + condicionamento ácido + FFA obteve o maior resultado ($21,21 \pm 1,83$ MPa), seguido dos grupos condicionamento ácido + FFA ($15,93 \pm 1,66$ MPa), laser + FFA ($8,53 \pm 0,81$ MPa), Controle negativo ($6,85 \pm 1,26$ MPa) e apenas FFA ($4,68 \pm 0,76$ MPa), respectivamente. Houve diferença estatística apenas entre os grupos com condicionamento ácido em relação aos grupos sem condicionamento ($p < 0,0001$).

4.2.2 Microscopia Eletrônica de Varredura

Após desafio cariogênico o grupo controle negativo apresentou grande desmineralização superficial com exposição dos prismas de esmalte em forma de microcavidades ovaladas. O grupo com apenas FFA teve menor exposição dos prismas de esmalte. O grupo com condicionamento ácido + FFA demonstrou desmineralização mais uniforme. O grupo do laser + FFA exibiu *melting* na superfície, e o grupo laser + condicionamento + FFA teve um melting com aspecto mais liso.

4.2.3 Tomografia por Coerência Óptica

Os grupos sem irradiação do laser mostraram a presença de desmineralização na área exposta ao desafio cariogênico como um decaimento óptico

extenso e esbranquiçado. Dentre eles, o grupo controle teve desmineralização mais intensa, o grupo apenas FFA foi menos profundo, e o grupo tradicional mais uniforme. Os irradiados revelaram os pontos densos de fusão sem desmineralizações abaixo destes pontos, sendo que o grupo do laser + condicionamento ácido + FFA demonstrou remoção parcial do *melting*.

4.2.3.1 Coeficiente de atenuação óptica

Todos os grupos, com exceção do grupo condicionamento ácido + FFA, apresentaram aumento do α após o desafio cariogênico, demonstrando diferença na comparação intergrupos ($p < 0,0001$). Na comparação das variações (Δ) do α final e inicial individuais, o grupo laser + FFA foi o único não que teve diferença estatística significativa ($p = 0,0630$).

4.2.3.2 Profundidade de desmineralização

O grupo controle apresentou maior profundidade de desmineralização ($312,20 \pm 24,15\mu\text{m}$), seguido pelo grupo apenas FFA ($300,60 \pm 12,16\mu\text{m}$), grupo condicionamento ácido + FFA ($285,60 \pm 13,34\mu\text{m}$), grupo laser + condicionamento + FFA ($235,20 \pm 6,70\mu\text{m}$) e grupo do laser + FFA ($214,90 \pm 13,86\mu\text{m}$). Apenas o grupo do laser + FFA teve diferença estatística significativa ($p=0,0006$).

4.2.4 Ensaio de microdureza

O grupo controle e o grupo apenas FFA foram desconsiderados para a análise estatística, pois a presença de lesões caviadas na superfície de alguns corpos de prova impossibilitou indentações delimitadas nestas áreas, dificultando a obtenção de medidas corretas tanto abaixo do braquete quanto do desafio. Não houve diferenças na comparação inter regiões entre os grupos ou nos mesmos corpos de prova ($p > 0,05$). Todos os grupos apresentaram os valores mínimos de microdureza entre 20-40 μm de profundidade. E, os valores máximos foram encontrados entre 70-80 μm de profundidade, exceto no grupo laser + condicionamento + FFA, que foram a partir de 100 μm de profundidade.

5 ARTIGOS

5.1 ARTIGO 1: EFFECT OF Nd:YAG LASER AND ALUMINUM OXIDE SANDBLASTING PRECONDITIONING ON LINGUAL ENAMEL CHARACTERIZATION AND BRACKET SHEAR BOND STRENGTH

A ser submetido à Journal of adhesive dentistry

Effect of Nd:YAG laser and aluminum oxide sandblasting preconditioning on lingual enamel morphology and bracket shear bond strength

Purpose: This study measured the shear bond strength (SBS) of lingual brackets and analyzed the enamel morphology after different surface preconditioning techniques.

Materials and Methods: 35 bovines' incisors were divided into 5 groups ($n=7$): G1- Control group; G2- Nd:YAG laser; G3- laser + Aluminum oxide sandblasting (Al_2O_3); G4- Al_2O_3 ; G5- Al_2O_3 + laser. All groups had lingual brackets bonded with Transbond XT adhesive (3M ESPE) according to the manufacturer' protocol, and were shear bonded after 72h. The enamel was evaluated by Optical Coherence Tomography (OCT) and Scanning Electron Microscope (SEM) before (T0) and after preconditioning surface (T1) for each group. The optical attenuation coefficient (α) was obtained from OCT images. Data were analyzed by ANOVA-test, followed by *post hoc* Tukey for SBS, and Kruskal Wallis and *post hoc* Dunn test for α (significance of 5%).

Results: The SBS was similar among groups but α presented statistical difference ($p=0.0124$) between associated preconditioning groups (G3 and G5) and the others. The optical analyzes evidenced the melting on the enamel after lasing, when it was the only preconditioning or when it was the final preconditioning step. Also there is crystal surface disorganization in Al_2O_3 groups, however the sandblasting removed partially the melting of the laser effect.

Conclusion: All protocols presented SBS within the recommended in literature. The laser irradiation and/or the aluminum oxide sandblasting promoted enamel structural changes that maintained the clinical adhesive performance. Sandblasting preconditioning did not increase significantly the SBS in bonding protocols, and mechanically reduced the laser melting effect.

Key words: Dental Enamel, Orthodontic Brackets, Optical Coherence Tomography, Laser, Melting, Dental Air Abrasion.

INTRODUCTION

Dental caries is a chronic infectious disease that affects billions of people with large individual differences in activity. It is estimated that 20% of the population has caries by genetic factors that have not enough response to fluor therapy and hygiene habits, being indicated intensified traditional prevention and immunostimulatory therapeutics.³⁵ In general, orthodontic brackets are considered a risk factor beginning as white spot lesions (WSL).³⁰ About 75% of the orthodontic patients have an incidence of WSL, and recently, 4.6% of the global economy is a burden of dental diseases.¹⁸

The introduction of lingual brackets, in the 70s, came to improve the aesthetic of the patient during treatment. However, the diminished inter-bracket distance and the gum proximity of the bracket position decrease the cleaning efficiency and increase the WSL's risks.¹² Usually, the base of prototyped lingual bracket covers the whole lingual surface and decrease this risk,^{38,41} but patients wearing non-prototyped lingual brackets showed more plaque retention and *S. mutans* counts after bonding, even more than buccal appliances,²⁰ as it intensifies the risk of caries disease. Additionally, the lingual enamel is thicker than the buccal⁸ and could increase the caries propagation to the other tissues.

During the lingual bracket bonding, the initial protocol includes the aluminum oxide sandblasting³⁹ before the acid etching to increase the surface contact area.^{4, 15, 19, 22, 36} After acid etching, the enamel demineralization, that promotes superficial hydroxyapatite loss and porosities, is considered a WSL risk factor. To minimize these lesions it is indicated fluoride application directly onto the enamel adjacent to bracket,¹⁶ associated with bonding materials²⁴ or with laser irradiation.^{7, 31} The ability of Nd:YAG laser to promote fluoride uptake and prolong it releasing time in an oral environment points to a demineralization resistance with reduction of caries potential up to 45.9%.⁴⁴

The laser irradiation changes chemically and morphologically the enamel surface that could influence shear bond strength (SBS) of the brackets. To guarantee the SBS during the treatment, the enamel should be prepared to assure SBS of brackets between 5.9 and 7.8 MPa.²⁷ No studies have reported if the changes on enamel after lasing disturb the SBS of lingual brackets and if the aluminum oxide sandblasting allow the SBS to increase without removing the laser effect of enamel protection.

The aim of this study was to quantify the shear bond strength of lingual brackets for direct bonding after different surface preconditioning using the Nd:YAG laser as preventive protocol and/or aluminum oxide sandblasting. Characterization of the enamel behavior was carried out before, during and after procedures, through noninvasive optical analysis.

MATERIAL AND METHODS

This study was carried out after approval by the Animal Ethics Committee from IPEN (CEUA-IPEN/SP n. 107/12). Thirty-five bovine incisors teeth, free from caries, cracks, fractures, deep dental grooves, surface decalcification, abrasions, and stains, were selected and disinfected with 1 % Chloramine-T solution (7 days) (ISO / TS11405) and stored in deionized water at 4 °C.

17

For sample size calculation, the equation $N = 4\sigma^2 (Z_{crit} + Z_{pwr})^2 / D^2$, was used.¹³ N is the total sample size, σ the standard deviation (value 0.204), Z_{crit} the significance level (1.96, for significance 5 %), Z_{pwr} the statistical power (1.282, for study power of 90 %) and D is the expected minimum difference between the groups (value 0.5). This calculation consisted of approximately 7 samples per group.

Sample preparation

Approximately 2 mm of the incisal surface was removed from the teeth with a diamond disc (Pretty Dental, São Paulo, Brazil) mounted in the micromotor and handpiece to standardize the positioning of brackets and the shear bond strength procedure (Figure 1). The groups were divided according to the preconditioning methods of lingual surfaces ($n=7$): G1- Control Group; G2- Nd: YAG laser irradiation; G3- Nd: YAG laser irradiation and aluminum oxide sandblasting; G4- Aluminum oxide sandblasting; G5- Aluminum oxide sandblasting and Nd: YAG laser irradiation.

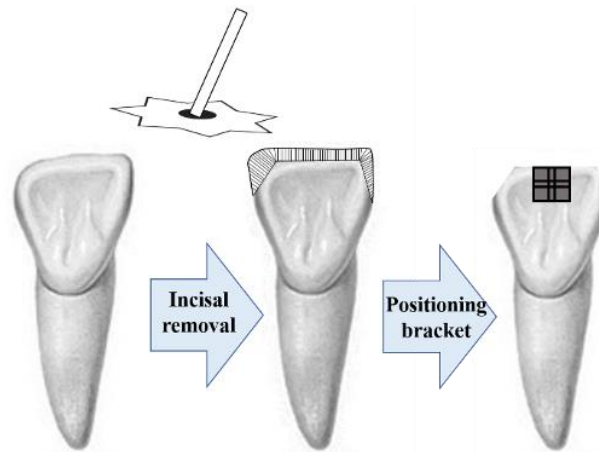


Figure 1. Schematic drawing of the incisal tooth surface removal to help positioning the brackets.

Orthodontics lingual brackets (Forestadent, Pforzheim, Germany) with quadrangular base were used by a mesh with dimensions of 3.26 mm x 3.26 mm (base area: 10.62 mm²).

The aluminum oxide sandblasting (50µm, 60 PSI, BIO-ART, SP, Brazil) was applied perpendicular to the tooth lingual surface, within the distance of 10 mm for 3 seconds.³⁷

For pulsed laser irradiation (Nd:YAG laser Power TM ST6, Lares Research®, USA), the lingual surfaces were covered with a thin layer (~100 µm) of a photoabsorber composed of triturerated coal (particles of ±10 µm diameter) diluted in equal parts of deionized water and 99% ethanol.⁴⁴ Samples were irradiated twice in manual contact: once in a horizontal way and the other in a vertical way (30 s each) to guarantee that all the surface was irradiated as per clinical application. The employed laser protocol is shown in Table I.

Table I: Parameters of Nd:YAG laser irradiation

Laser	Nd:YAG
Wavelength	1064 nm
Average Power	0.6 W
Pulse frequency	10 Hz
Width of pulses	100 µs
Pulse Energy	60 mJ
Energy density (fluency)	84,9 J/cm ²
Duration of the irradiation	30 s
Fiber Diameter	300 µm

All teeth were cleaned with pumice stone (SSWhite Duflex, Rio de Janeiro, Brazil) then washed (10 s), air dried (10 s) and bonded, after respective pretreatments, according to the manufacturer instructions (kit Transbond XT/Lot: N821727/3M Unitek, Monrovia, CA, USA), including: 37% phosphoric acid etching (Condac, FGM, Joinville, Brazil) for 30 seconds on the designated space for bonding, followed by water spray (10 s), air dried (10 s), primer application, primer photoactivation (20 s) and resin application on the brackets' base for positioning on the tooth surface.

To standardize the resin flow before the curing, an adapted tensiometer (Morelli, São Paulo, Brazil) was used with 1200 gf for 5 s, and all the excesses of resin were removed by an exploratory probe. The LED curing unit (LED Ortholux™ Luminous Curing Light; 3M ESPE, Minnesota, EUA) had 1600 mW/cm² of irradiance tested before the experiment, and the photoactivation was done for 10 s on each side of the brackets (distance of 2-3 mm).

After 24 h of storage in deionized water, samples were vertically included in chemically activated acrylic resin (Jet, São Paulo, Brazil) aided by a device for specimens' inclusion (Odeme, 467, Santa Catarina, Brazil). After inclusion, another 48 h storage occurred in deionized water, totalizing 72 h between the bonding procedure and the shear bond strength.

Shear bond strength analysis

The shear bond strength test was performed according to ISO/TS11405 by a universal test machine (Instron 5567, Texas, EUA) with 1 kN cell load and 0.5 mm/min speed. Samples were positioned for the chisel to have contact with the bracket-adhesive-enamel interface when sliding in parallel vector to the bracket's base until it fractures or the adhesive bond breaks. The force was recorded in Newtons (N) and divided by the base bracket area to obtain the resistance value of shear bond strength in Megapascal (MPa).

Scanning Electron Microscope (SEM) analysis

For each stage, the groups were evaluated by low vacuum SEM (Hitachi TM3000, Tokyo, Japan) to analyze the enamel surface morphology. It was operated with 15 kV, and images were captured and analyzed at magnitudes of 3.000 x.

Optical Coherence Tomography (OCT) analysis

An OCT system, OCP930SR (Thorlabs Inc., NJ, USA), produced cross-sectional (2D) images from the scanned samples. The base unit contains a light source, a superluminescent diode (SLD), operating at a central wavelength of 930 nm, with a spectral width of 100 nm, 29 kHz A-scan rate and it can capture 8 frames per second (fps), composed by 512 lines, 2000 columns and axial resolution of 6.2 μm . The generated images had 6 mm of transverse scan and the distance between the cuts and measurements in the cervico-incisal direction were 1 mm. The enamel refractive index considered was 1.6.¹⁰

Optical Attenuation Coefficient (α)

A custom software using MatLab programming language (Matlab, MathWorks Inc, Massachusetts, USA) was specially developed to analyze the optical decay of samples images obtained by OCT. The software identifies the air sample interface. The operator selects a region of interest (ROI) delimiting the analysis where the average A-scan was calculated after aligning the A-scan by the air-sample interface. An exponential fit, based on Beer's Law, was applied to average A-scan to obtain the optical attenuation coefficient (α). This analysis was repeated for several sequential acquisitions giving an arithmetic value α for each group. It was calculated the variation (Δ) considering the final average values (T1- immediately after the group's preconditioning) minus initial average values (T0- before any treatment), for intergroup comparison.¹⁰ It was considered a depth analysis between 0 and 400 μm .

Data analysis

Shapiro-Wilk normality tests were performed to verify the normality of obtained data with a significance of 95% (power of 90%). For intergroup comparison of SBS data, the ANOVA and Post Hoc Tukey tests were done (considering normal data and unpaired tests). For the optical attenuation coefficient, the Kruskal Wallis test and the Dunn *post hoc* test was used. Tests were performed in the GraphPrisma program (version 6, GraphPad Software, São Paulo, Brazil).

RESULTS

Shear bond strength

The shear bond strength demonstrated the difference in the intergroup comparison ($p=0.0034$) for G3 and G5 in relation to G1, G2, and G4, as shown in Table II.

Table II. Measurements description of shear bond strength of groups.

Groups	Minimum	Maximum	Median ($\pm$ SE) (MPa)
G1- Control	6.22	20.07	9.76 ($\pm$ 1.83) ^{a,b}
G2- Nd:YAG	4.60	14.16	7.01 ($\pm$ 1.54) ^{a,b}
G3- Nd:YAG + Al ₂ O ₃	4.41	26.19	13.31 ($\pm$ 2.56) ^a
G4- Al ₂ O ₃	10.71	24.21	11.36 ($\pm$ 1.83) ^{a,b}
G5- Al ₂ O ₃ + Nd:YAG	10.83	28.20	14.15 ($\pm$ 2.39) ^a

SE= standard error. ANOVA and Post Hoc Tukey tests.

SEM and OCT

The analysis of the enamel superficial morphology by SEM resulted in the images shown in figure 2. By SEM analysis, G2 presented a fusion and recrystallization of enamel surface (melting). In G3 and G4, surfaces showed roughness and irregularities, with multiple elevations, different heights, and rounded borders, showing superficial depressions of the particles impact, with linear forms. In G5 the surface presented the aspect of a few enamel fusions associated with micro-craters and some cracks.

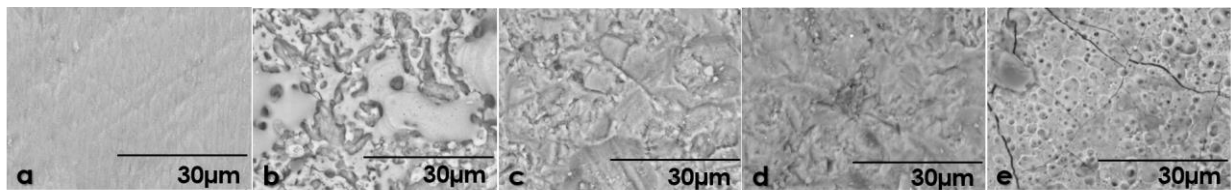


Figure 2. SEM images after preconditioning (T1) of enamel surface: a) G1 initial control; b) G2 after Nd: YAG laser irradiation; c) G3 after laser irradiation + Al₂O₃; d) G4 after Al₂O₃; e) G5 after Al₂O₃ + Nd: YAG laser irradiation.

Through OCT images (Figure 3), it was observed that the laser melting effect in G2 was present as dense points on enamel surface line. In the samples of G4, the effect of aluminum

oxide sandblasting was represented as a large straight refraction area under the enamel surface line showing a different optical decay from G3, that sandblasting effect was more concentrated in points on the sub superficial layer and less reflective. In G5, the center of the image presented less optical decay than lateral areas, but nevertheless, it also presents interleaved areas of higher optical decay.

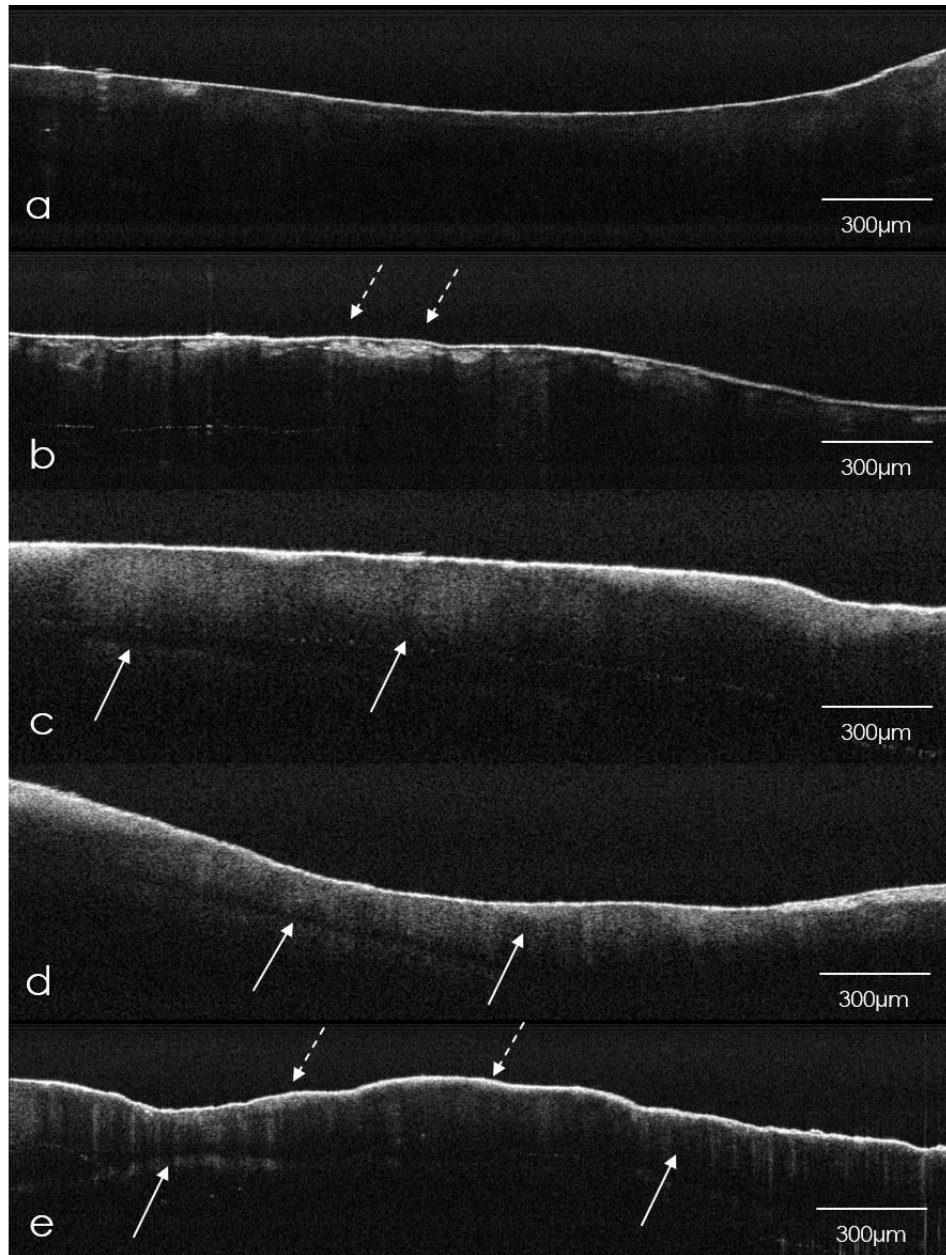


Figure 3. OCT images after preconditioning (T1) of enamel surface: a) G1 initial control; b) G2 after Nd: YAG laser irradiation; c) G3 after laser irradiation + Al_2O_3 ; d) G4 after Al_2O_3 ; e) G5 after Al_2O_3 + Nd: YAG laser irradiation. On OCT images, the laser effect is shown by dotted arrows and sandblasting effect by white arrows.

Optical Attenuation Coefficient (α)

The analysis of the variation (Δ) on the optical attenuation coefficient α showed a statistically significant difference ($p=0.0124$) among the groups G5/G2 and G5/G4. The G3 and G5 were similar and both presented a decrease in their final α values, whilst G2 and G4 had increased (Table III).

Table III. Measurements variation of α before and after pretreatment on enamel surface.

Groups	Δ ($\pm$ SE) (μm^{-1})
G2- Nd:YAG	1.04 ($\pm$ 0.37) ^a ($\uparrow$)
G3- Nd:YAG + Al ₂ O ₃	-0.67 ($\pm$ 0.52) ^{a,b} ($\downarrow$)
G4- Al ₂ O ₃	0.92 ($\pm$ 0.48) ^a ($\uparrow$)
G5- Al ₂ O ₃ + Nd:YAG	-2.57 ($\pm$ 1.13) ^b ($\downarrow$)

SE= standard error. Kruskal Wallis e o teste post hoc de Dunn tests.

Δ is a variation of α before and after pretreatment

DISCUSSION

The present study is, to the best of our knowledge, the first that reports the SBS for direct bonding on the lingual surface of anterior teeth with lingual brackets. It was motivated by the increased demand for preventive caries protocol with lasers in orthodontics.^{5, 44} The 20% of the patients with high caries risk due to genetic factors have an indication to intensified traditional prevention and immunostimulatory therapeutics.³⁵ However, it could result in fluorosis or other systemic compromises. And the laser could supersede these disturbs.

The statistical similarity between direct and indirect bracket bonding,^{19, 33} lead the present study to choose the simplicity of the direct technique. The bovine incisor teeth have chemical and microstructural similarities with human tooth becoming adequate for enamel adhesion studies.^{11, 17, 23} And the use of human premolars would demand resin compensations to adapt to the utilized bracket, compromising the sample standardization.

The present study demonstrates accordance with Sfondrini *et al.* (2017)³² of SBS - between 16.74 ± 5.18 MPa - using the same lingual brackets in similar tests conditions, but on the buccal enamel. Additionally, the present results agree with a meta-analysis on that ranges from 3.5 to 27.8 MPa (mean, 13.4 MPa, SD, 5.7).¹⁴ And based in the minimal adhesive resistance for

clinical demand on orthodontics treatments - 5.9 to 7.8 MPa –,²⁷ all the groups of this study presented favorable results.

The literature indicates that the sandblasting allows the aluminum oxide particles (50 µm of diameter) randomly attack the enamel prisms (5 µm of diameter) removing different parts of the surface.²⁸ It exposes the subjacent prismatic structure²⁵ and increases the superficial roughness. Associated with the acid etching there is an additional demineralization of the fragilized enamel structure that enhances the area of surface contact.²⁵ It consequently increases the union strength. Optically, this alteration is represented as large structural disorganization of enamel prisms (Figures 2c and 2d) in SEM images - especially when Al₂O₃ was the final step (G3 and G4). And, by OCT analysis, as greater exponential light decay in depths than the other protocols.

The chemical and morphological alterations on the enamel after lasing by Nd: YAG changed the balance of Ca/P in 10 to 20 µm in depth according to the temperatures reached. Between 100°C-650°C, the hydroxyapatite presents an expansion of their unit mesh. Until 1100 °C there is a continuous expansion of hydroxyapatite crystallite sizes, and tricalcium phosphate formation (β-TCP). Above 1100 °C, the β-TCP phase is converted into α-TCP. It allows the hydroxyapatite melting (at 1280 °C) creating a new phase (tetracalcium diphosphate). These matrix crystallographic alterations reduce the water permeability and carbonate amount and enhance the hydroxyapatite crystal sizes. It indicates an additional resistance to acids contends that help to prevent dental caries^{1, 43} because decreases the critical pH for irradiated enamel tissue.

The melted enamel could increase the adhesive mechanical bonding^{2, 40} once the surface alterations were similar to micro-craters - on tested output – as seen in the microscopical analysis (Figure 2b).⁴⁰ The melting effect is seeing as dense points on enamel superficial line in OCT images (Figure 2b).

The results of the preconditioning association groups (G3 and G5) are new in the literature, to the best of our knowledge. It is speculated that the subsequent treatment of Nd:YAG laser further increased the contact surface of the sandblasted enamel and simultaneously eliminated the weak structures caused by the sandblasting. The Al₂O₃ removes partially the melting effect (G3), and the laser irradiation is effective even on disorganized surfaces (G5). It also implies that the protective laser effect could be active without harm the SBS. Furthermore, considering the SBS, the present results demonstrated no differences in the pretreatment

protocols tested. It corroborates with other studies that showed no difference to the traditional protocol.^{6, 9, 29, 37, 42}

Beer's law relates the light attenuation through the material properties with its traveled distance. Different biological tissues, or states of a tissue (healthy or diseased), present different optical attenuation coefficient (α). Several studies have reported the behavior of the attenuation coefficient α carried out between healthy and demineralized enamel.^{10, 25, 21, 26, 34} Differently, the present study proposed to identify the attenuation coefficient differences due to different types of preconditioning.

The higher is the α , the less is the light transmission,^{10, 34} due to light scattering and absorption. In the laser (G2) and Al_2O_3 (G4) group the final surface promoted a higher light scattering. It was possible due to a higher density (in the case of the laser), or with great structural disorganization (in the case of sandblasting).³⁴ It increases the light reflection on the surface and reducing the light propagation within the sample.

After preconditioning, the associated groups (G3 and G5) presented a decrease in the α . This fact indicates greater light transmission in these images and low interaction with scattering centers,²⁶ probably due to the lower mineral content on enamel sandblasted by Al_2O_3 particles that removes the central enamel.²⁵ The values of α were similar for both preconditioning orders presented.

CONCLUSION

- 1) All protocols employed in this work, using lasers and conventional ways, led to SBS within the recommended in the literature. The irradiation with Nd: YAG laser and/or aluminum oxide sandblasting presented enamel structural modifications that maintains the clinical adhesive performance.
- 2) Sandblasting preconditioning did not increase significantly the SBS in bonding protocols, and mechanically reduces the laser melting effect.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was carried out under the PROCAD-CAPES/MEC (National Program of Academic Cooperation – grant number 0156/01-9 and 0349/05-4), sponsored by CAPES (Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel and Ministry of Education;

PRONEX program (Center of Excellence on Biophotonics and Nanophotonics — APQ-0504-1.05/14); supported by FACEPE/CNPq (Foundation for Science and Technology of Pernambuco State and National Council of Technological and Scientific Development) and INCT-INFO (National Institutes of Science and Technology, Institute of Photonics — 465.763/2014-6), sponsored by CNPq/ MCT (National Council of Technological and Scientific Development and Ministry of Science and Technology). The authors report no conflict of interest related to this work.

CLINICAL RELEVANCE

The Nd:YAG laser, as a tool to prevent caries without promoting systemic effects, do not compromise the adhesion efficiency in orthodontics and is interesting for patients with genetic high risks of caries.³⁵ Additionally, in a few years, its benefits will become an accessible tool for clinics.

REFERENCES

1. Ana PA, Bachmann L, Zezell DM. Lasers effects on enamel for caries prevention. *Laser Phys.* 2006;16(5):865–75.
2. Banda NR, Reddy-G V, Shashikiran ND. Evaluation of primary tooth enamel surface morphology and microhardness after Nd: YAG laser irradiation and APF gel treatment-an in vitro study. *J Clin Pediatr Dent.* 2011;35(4):377–82.
3. Baumgartner S, Koletsi D, Verna C, Eliades T. The Effect of Enamel Sandblasting on Enhancing Bond Strength of Orthodontic Brackets: A Systematic Review. *J Adhes Dent.* 2017;19:1–11.
4. Bayram M, Yesilyurt C, Kuscüoğlu A, Ulker M, Nur M. Shear bond strength of orthodontic brackets to aged resin composite surfaces: effect of surface conditioning. *Eur J Orthod.* 2011;33(2):174–9.
5. 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 Phys.* 2009;19(7):1463–9.
6. Borsatto MC, Catirise, Alma Blásida Elisaur Palma Dibb RG, Nascimento TN do, Rocha RAS de S, Corona SAM. Shear bond strength of enamel surface treated with air-abrasive system. *Braz Dent J.* 2002;13(3):175–8.
7. Braga SRM, de Oliveira E, Sobral MAP. Effect of neodymium:yttrium-aluminum-garnet laser and fluoride on the acid demineralization of enamel. *J Investig Clin Dent.* 2017;8(1):1–6.
8. Brokos Y Bortolotto T, Krejci I SM. Evaluation of enamel thickness of upper anterior teeth in different age groups by dental cone beam computed tomography scan in vivo. *Int J Adv Case Reports.* 2015;2(23):1396–409.
9. Cal-Neto JP, Castro S, Moura PM, Ribeiro D, Miguel JAM. Influence of enamel

- sandblasting prior to etching on shear bond strength of indirectly bonded lingual appliances. *Angle Orthod.* 2011;81(1):151–4.
10. Cara ACB, Zezell DM, Ana PA, Maldonado EP, Freitas AZ. Evaluation of two quantitative analysis methods of optical coherence tomography for detection of enamel demineralization and comparison with microhardness. *Lasers Surg Med.* 2014;46(9):666–71.
 11. de Carvalho MFF, Leijôto-Lannes ACN, Rodrigues MCN de S, Nogueira LC, Ferraz NKL, Moreira AN, et al. Viability of bovine teeth as a substrate in bond strength tests: A systematic review and meta-analysis. *J Adhes Dent.* 2018;20:471–9.
 12. Demling A, Demling C, Schwestka-Polly R, Stiesch M, Heuer W. Short-term influence of lingual orthodontic therapy on microbial parameters and periodontal status a preliminary study. *Angle Orthod.* 2010;80(3):480–4.
 13. Eng J. Sample Size Estimation: How Many Individuals Should Be Studied? *Radiology.* 2003;227(2):309–13.
 14. Finnema KJ, Özcan M, Post WJ, Ren Y, Dijkstra PU. In-vitro orthodontic bond strength testing: A systematic review and meta-analysis. *Am J Orthod Dentofac Orthop.* 2010;137(5):615–22.
 15. Halpern RM, Rouleau T. The effect of air abrasion preparation on the shear bond strength of an orthodontic bracket bonded to enamel. *Eur J Orthod.* 2010;32(2):224–7.
 16. Hamdan WA, Badri S, El Sayed A. The effect of fluoride varnish in preventing enamel demineralization around and under orthodontic bracket. *Int Orthod.* 2018;1–11.
 17. Larry J. Oesterle LJ, Shellhart WC, Gary K, Belanger G. The use of bovine enamel in bonding studies Larry. 2013;126(20):3860–4.
 18. Listl S, Galloway J, Mossey PA, Marcenes W. Global economic impact of dental diseases. *J Dent Res.* 2015;94(10):1355–61.
 19. Lombardo L, Kaplan A, Lapenta R, Bratti E, Pera C, Scuzzo G, et al. A comparative study of lingual bracket bond strength. *Orthod.* 2011;12(3):178–87.
 20. Lombardo L, Ortan YÖ, Gorgun Ö, Panza C, Scuzzo G, Siciliani G. Changes in the oral environment after placement of lingual and labial orthodontic appliances. *Prog Orthod.* 2013;14(1):1–8.
 21. Maia AMA, Freitas AZ De, Campello SDL, Gomes ASL, Karlsson L. Evaluation of dental enamel caries assessment using Quantitative Light Induced Fluorescence and Optical Coherence Tomography. *J Biophotonics.* 2016;602(6):596–602.
 22. Mati M, Amm E, Bouserhal J, Bassil-Nassif N. Effet du microsablage de l'émail vestibulaire et lingual sur la résistance au cisaillement d'attaches orthodontiques collées avec un primaire automordant. *Int Orthod.* 2012;10(4):422–31.
 23. Nakamichi I, Iwaku M, Fusayama T. Bovine teeth as possible substitutes in the adhesion test. *J Dent Res.* 1983;62(10):1076–81.
 24. Nascimento PL de MM, Fernandes MTG, de Figueiredo FED, Faria-e-Silva AL. Fluoride-releasing materials to prevent white spot lesions around orthodontic brackets: A systematic review. *Braz Dent J.* 2016;27(1):101–7.
 25. Patcas R, Zinelis S, Eliades G, Eliades T. Surface and interfacial analysis of sandblasted and acid-etched enamel for bonding orthodontic adhesives. *Am J Orthod Dentofac Orthop.* 2015;147(4):S64–75.
 26. Popescu DP, Sowa MG, Hewko MD, Choo-Smith L-P. Assessment of early demineralization in teeth using the signal attenuation in optical coherence tomography images. *J Biomed Opt.* 2008;13(5):054053-1–17.
 27. Reynolds IR. A Review of Direct Orthodontic Bonding. *Br J Orthod.* 1975;2(3):171–8.

28. Robles-Ruíz JJ, Arana-Chavez VE, Ciamponi AL, Abrão J, Kanashiro LK. Effects of sandblasting before orthophosphoric acid etching on lingual enamel: In-vitro roughness assessment. *Am J Orthod Dentofac Orthop*. 2015;147(4):S76–81.
29. Robles-Ruíz JJ, Ciamponi AL, Medeiros IS, Kanashiro LK. Effect of lingual enamel sandblasting with aluminum oxide of different particle sizes in combination with phosphoric acid etching on indirect bonding of lingual brackets. *Angle Orthod*. 2014;84(6):1068–73.
30. Sagarika N, Suchindran S, Loganathan S, Gopikrishna V. Prevalence of white spot lesion in a section of Indian population undergoing fixed orthodontic treatment: An in vivo assessment using the visual International Caries Detection and Assessment System II criteria. *J Conserv Dent*. 2012;15(2):104-8.
31. Seino PY, Freitas PM, Marques MM, de Souza Almeida FC, Botta SB, Moreira MSNA. Influence of CO₂ (10.6 µm) and Nd:YAG laser irradiation on the prevention of enamel caries around orthodontic brackets. *Lasers Med Sci*. 2015;30(2):611–6.
32. Sfondrini MF, Gandini P, Gioiella A, Zhou FX, Scribante A. Orthodontic Metallic Lingual Brackets: The Dark Side of the Moon of Bond Failures? *J Funct Biomater*. 2017;8(27):1–7.
33. Shpack N, Geron S, Floris I, Davidovitch M, Brosh T, Vardimon AD. Bracket placement in lingual vs labial systems and direct vs indirect bonding. *Angle Orthod*. 2007;77(3):509–17.
34. Sowa MG, Popescu DP, Friesen JR, Hewko MD, Choo-Smith LP in. A comparison of methods using optical coherence tomography to detect demineralized regions in teeth. *J Biophotonics*. 2011;4(11–12):814–23.
35. Strömberg N, Esberg A, Sheng N, Mårell L, Löfgren-Burström A, Danielsson K, et al. Genetic- and Lifestyle-dependent Dental Caries Defined by the Acidic Proline-rich Protein Genes PRH1 and PRH2. *EBioMedicine*. 2017;26:38–46.
36. Suma S, Anita G, Chandra Shekar B, Kallury A. The effect of air abrasion on the retention of metallic brackets bonded to fluorosed enamel surface. *Indian J Dent Res*. 2012;23(2):230–5.
37. Thurler RCSB, Carvalho PEG, Junior WS, Turbino ML, Youssef MN. Influência do óxido de alumínio na colagem dos bráquetes linguais The influence of the aluminum oxide on lingual brackets bonding Material e métodos. 2014;7(28):470–7.
38. van der Veen MH, Attin R, Schwestka-Polly R, Wiechmann D. Caries outcomes after orthodontic treatment with fixed appliances: Do lingual brackets make a difference? *Eur J Oral Sci*. 2010;118(3):298–303.
39. Ward P. Bonding techniques in lingual orthodontics. *J Orthod*. 2013;40(sup1):s20–6.
40. Wen X, Zhang L, Liu R, Deng M, Wang Y, Liu L, et al. Effects of Pulsed Nd:YAG Laser on Tensile Bond Strength and Caries Resistance of Human Enamel. *Oper Dent*. 2014;39(3):273–82.
41. Wiechmann D, Klang E, Helms HJ, Knösel M. Lingual appliances reduce the incidence of white spot lesions during orthodontic multibracket treatment. *Am J Orthod Dentofac Orthop*. 2015;148(3):414–22.
42. Zarif Najafi H, Moshkelgosha V, Khanchemehr A, Alizade A, Mokhtar A. The Effect of Four Surface Treatment Methods on the Shear Bond Strength of Metallic Brackets to the Fluorosed Enamel. *J Dent*. 2015;16(3 Suppl):251–9.
43. Zezell DM, Ana PA, Benetti C, Goulart VP, Bachmann L, Tabchoury CPM, et al. Compositional and crystallographic changes on enamel when irradiated by Nd:YAG or Er,Cr:YSGG lasers and its resistance to demineralization when associated with fluoride. 2010;7549:75490G.
44. Zezell DM, Boari HGD, Ana PA, Eduardo CDP, Powell GL. Nd:YAG laser in caries prevention: A clinical trial. *Lasers Surg Med*. 2009;41(1):31–5.

5.2 ARTIGO 2: INFLUENCE OF ND:YAG LASER IRRADIATION AND FLUOR TREATMENT ON ENAMEL AROUND LINGUAL BRACKETS: DEMINERALIZATION AND SHEAR BOND STRENGTH

A ser submetido à American Journal of Orthodontics and Dentofacial

Influence of Nd:YAG laser irradiation on enamel around lingual brackets on demineralization and shear bond strength

The aim of this study was to use Nd:YAG laser irradiation and fluoride treatment to reduce the demineralization around/under lingual brackets with no interference in shear bond strength, after direct bonding. Seventy-five bovine incisors teeth were divided into 5 groups ($n=15$) according to different preconditioning surface: G1 - negative control group; G2 - no acid etching bonding + acidulated phosphate fluoride (APF); G3 - acid etching bonding (H_3PO_4) + APF; G4 - Nd:YAG laser irradiation + APF; G5 - Nd:YAG laser + H_3PO_4 + APF. All brackets were bonded with Transbond XT resin (3M ESPE), thermocycled, submitted to a 48h cariogenic challenge and shear bonded in a universal testing machine (0.5 mm/min). Specimens were qualitatively analyzed by Optical Coherence Tomography (OCT) and Scanning Electron Microscope (SEM) and quantitatively evaluated through the shear bond strength (SBS), demineralization depth, optical attenuation coefficient (α) and microhardness. Data were analyzed by ANOVA *post hoc* Tukey for SBS, Dunn *post hoc* for demineralization depth and α , Friedman and Kruskal Wallis for microhardness (significance of 5%). The combination of Nd:YAG laser irradiation + H_3PO_4 + APF presented the highest SBS (16.23 ± 1.40 MPa), whilst the group no acid etching + APF, the lowest. Groups with acid etching were similar ($p>0.05$). Melting was observed by SEM and OCT (as higher density) in groups after laser application, without demineralization under irradiation. The association of laser and APF presented less demineralization depth than isolated fluor ($p=0.0006$). There were no significant differences in enamel microhardness between groups ($p>0.05$). Nd:YAG laser irradiation is, therefore, a good alternative to avoid demineralization around the brackets and keep the SBS performance when associated with the acid etching.

Key-words: Dental Enamel; Orthodontic Brackets; Optical Coherence Tomography; Laser; Melting; Tooth demineralization; Shear Bond Strength.

1 Introduction and literature review

Enamel demineralization is a common complication of orthodontic fixed appliance therapy that can be seen in 71.7% to 75% of the patients after the first month of treatment.¹⁻³ The demineralization first appears as white spot lesions (WSL) on cervical regions adjacent to brackets.⁴ Changes in the oral environment, such as increased plaque retention, altered bacterial flora, increased acidogenic bacterial counts, reduced cleansing effects of the tongue,⁵ saliva pH alterations⁶ and genetic factors,⁷ and adhesive failure on bonding⁸ extends the lesions for deep layers and beneath the bracket.

Caries is a chronic disease that compromises about 4.6% of global health spending.⁹ Orthodontic brackets are a risk factor that present 3.9 more risk than non-orthodontic patients. Considering the non-prototyped lingual brackets, the risk increases due to decrease in inter-bracket distance and the gum proximity of the bracket position decrease the cleaning efficiency and increase the WSL's risks.^{10,11} It retains more plaque and increases the *S. mutans* counts after bonding.¹¹ The thickness of the lingual enamel layer^{12,13} could be a concern for faster caries propagation once installed.

The use of Nd: YAG laser on enamel changes the hard tissue morphology and turns it more resistant to demineralization and habitual high risks of caries,¹⁴ and when associated to fluoride, allows it to uptake and prolong the releasing time in an oral environment.¹⁵ The caries reduction could reach up to 45.9 %¹⁶ to 50 %¹⁷ for posterior and anterior teeth, respectively. Microscopically, the chemical and crystalline changes on enamel after laser treatment could benefit the superficial microhardness and shear bond strength (SBS).¹⁸ However, no studies have reported optically if it can be an advantage to avoid lingual enamel demineralization beneath¹⁹ and adjacent^{20,21} to lingual bracket, without altering its SBS.

Initial demineralization lesion can only be detected at microscopic level on extracted teeth, *in vitro*. When it is detected radiographically or visually, means a great mineral loss. Unfortunately, 20% of the population has a genetic alteration that does not respond to the traditional techniques of caries prevention (fluoride therapy, dietary and hygiene habits).⁷ In this case, the non-invasive optical tools, such as optical coherence tomography (OCT),²²⁻²⁷ could help the detection in early stages. OCT allows visualizing the demineralization even earlier in cross-sectional images of the dental structures,^{22,23} and can be exploited as another tool that

simultaneously analyze the optical decay of light through the teeth, indicating the precise demineralization point.

This study aimed to analyze the effect of Nd:YAG laser irradiation associated to fluoride treatment for preventing the enamel demineralization close to lingual brackets, as well as the changes promoted in enamel and their shear bond strength. at enamel-bracket interface.

2 Material and methods

This study was carried out after approval by the Ethics Commission on Animal Use (CEUA-IPEN/SP), under process number 107/12. Seventy-five bovine incisors teeth, free from caries, cracks, fractures, deep dental grooves, surface decalcification, abrasions, and stains, were selected and disinfected with 1 % Chloramine-T solution (7 days) (ISO / TS11405) and stored in deionized water at 4° C.

The sample size was determined according to the equation $N = 4\sigma^2 (Z_{crit} + Z_{pwr})^2 / D^2$ ²⁸, considering that N is the total sample size, σ the standard deviation (value 0.298), Z_{crit} the significance level (1.96, for 5% significance), Z_{pwr} the statistical power (1.282, for study power of 90 %) and D is the expected minimum difference between the groups (value 0.5). This calculation consisted of approximately 15 samples per group.

Approximately 2 mm of the incisal surface was removed from the teeth with a diamond disc (Pretty Dental, São Paulo, Brazil) mounted in the micromotor and handpiece to standardize the positioning of brackets and the shear bond strength procedure (Figure 1). The groups were divided according to the preconditioning methods of lingual surfaces ($n = 15$): G1- negative control group, represented by the absence of acid etching and fluoride application; G2- no acid etching previous bonding + acidulated phosphate fluoride application (APF); G3- acid etching previous bonding (H_3PO_4) + APF; G4- Nd:YAG laser + APF; G5- Nd:YAG laser + H_3PO_4 + APF.

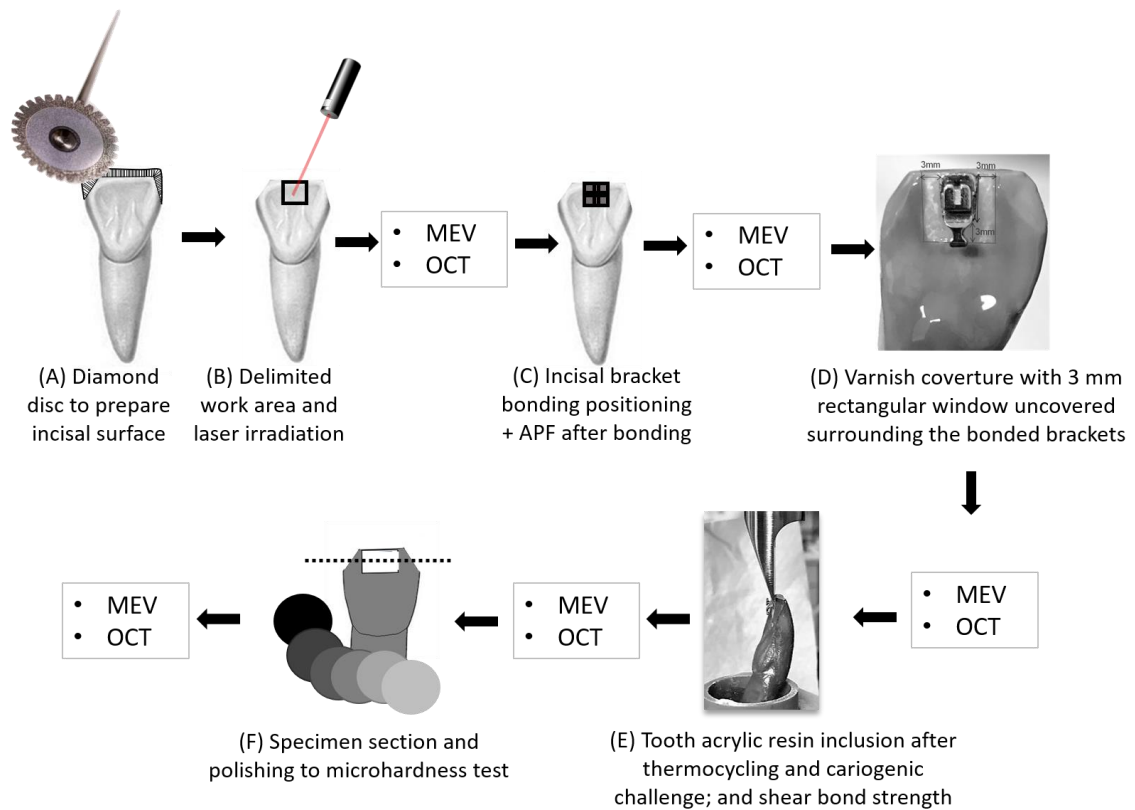


Figure 1. Experimental design: A) incisal surface preparation; B) laser irradiation, only for G4 and G5; C) Bracket bonding and APF application; D) varnish coerture with 3 mm rectangular window uncovered surrounding the bonded area; E) Tooth inclusion and shear bond strength step; F) sectioning and polishing of the specimen for microhardness analysis.

For laser irradiation, the selected area for bracket bonding on lingual surfaces was covered with a thin layer ($\sim 100 \mu\text{m}$) of a photoabsorber composed of triturated coal (particles of $\pm 10 \mu\text{m}$ diameter) diluted in equal parts of deionized water and 99% ethanol.¹⁶ Samples were irradiated twice in manual contact: once in a horizontal way and the other in a vertical way to guarantee that all the surface was irradiated as per clinical application. For irradiation, a Nd:YAG laser was employed (Nd:YAG laser Power TM ST6, Lares Research®, USA), with 1064 nm of central wavelength, following the protocol of 0.6 W, 10 Hz frequency, emitting 60 mJ of pulse energy and 100 μs of pulse width, resulting in 84.9 J/cm^2 fluence. Each sample was irradiated through 30 seconds, and the laser fiber measures 300 μm diameter.

Acidulated Phosphate Fluoride gel (1.23 % F, 0.1 M of phosphoric acid, pH 3.6–3.9 – Nova DFL, Rio de Janeiro, Brazil) was applied to the enamel with a cotton swab for 4 min, followed by washing with deionized water during 1 min.²⁹ The APF application followed the

bracket bonding step, around the brackets, to avoid the interference of fluor particles on adhesive results. Orthodontics lingual brackets (Orthomundi, Porto Alegre, Brazil) with the quadrangular base were used by a mesh base with an area of 10.62 mm².

The groups H₃PO₄ + APF (G3) and Nd:YAG laser + H₃PO₄ + APF (G5) had the samples cleaned with pumice stone (SSWhite Duflex, Rio de Janeiro, Brazil), then washed (10 s), air dried (10 s) and bonded, after respective pretreatments, according to the manufacturer instructions (kit Transbond XT/Lot: N821727/3M Unitek, Monrovia, CA, USA), which included: 37% phosphoric acid etching (Condac, FGM, Joinville, Brazil) for 30 seconds on the designated space for bonding, followed by water spray (10 s), air dried (10 s), primer application, primer photoactivation (20 s) and resin application on the brackets' base for positioning on the tooth surface. Samples from the negative control group (G1), no H₃PO₄ + APF (G2) and Nd:YAG laser + APF (G4) were initially cleaned with the pumice stone, washed (10 s), air dried (10 s) and had the primer application, subsequently photoactivated (20 s) and then the resin was applied on the brackets' base for positioning on the tooth surface.

To standardize the resin flow before the polymerization an adapted tensiometer (Morelli, São Paulo, Brazil) was used with 1200 gf for 5 seconds, and the resin excess was removed by an exploratory probe. The LED curing unit (Radii-cal, SDI, São Paulo, Brazil) had 1200 mW/cm² of irradiance tested previous to the experiment, and the photoactivation was performed for 10 s on each side of the brackets (distance of 2-3 mm). After 24 h of storage in deionized water, samples were thermocycled and 24 h later the cariogenic challenge was carried out. These steps simulated approximately 10 weeks in oral environment conditions.³⁰

After 24 h storage, samples were vertically included in a matrix with self-curing acrylic resin (Jet, São Paulo, Brazil), aided by a device for specimens' inclusion (Odeme, 467, Santa Catarina, Brazil). After inclusion, another 48 h storage occurred.

The specimens were thermocycled (MSCT-3, Elquip, São Carlos, SP, Brazil), 500 cycles of cold and warm baths, with distilled water between 5 °C ± 3 °C and 55 °C ± 3 °C, respectively, with 20 s of exposition in each temperature and 5 s of transference between then, following ISO / TS 11405: 2015 protocol. A nail-varnish was used, after the thermocycling, to cover the whole specimens leaving a 3 mm rectangular window uncovered surrounding the bonded brackets,²⁷ (Figure 1d), and submitted to the cariogenic challenge following the model proposed by Fried *et al.* (2013)³¹, by 48 h.

a. Measurement techniques

The measurements with SEM and OCT were done on initial evaluation and after 1) laser irradiation, 2) thermocycling, 3) cariogenic challenge 4) Shear bond and 5) microhardness test.

2.1.1. Scanning Electron Microscopy

The groups were evaluated by low vacuum SEM (Hitachi TM3000, Tokyo, Japan) to analyze the enamel surface morphology. It was operated with 15 kV, and images were captured and analyzed at magnitudes of 1.000 x.

2.1.2. Optical Coherence Tomography

An OCT system, OCP930SR (Thorlabs Inc., USA), produced cross-sectional (2D) images from the scanned samples. The base unit contains a light source, a superluminescent diode (SLD), operating at a central wavelength of 930 nm, with a spectral width of 100 nm, 29 kHz A-scan rate and it can capture 8 frames per second (fps), composed by 512 lines, 2000 columns and axial resolution of 6.2 μm . The generated images had 6 mm of transverse scan and the distance between the cuts and measurements in the cervico-incisal direction were 1 mm. The enamel refractive index considered was 1.6.²⁶

The analyzed areas on OCT images were (1) under the nail-varnish, (2) under the bracket and (3) under the cariogenic challenge (see Figure 2). This last area was subdivided into region immediately around the bracket – corresponding to approximately 1 mm surrounding the bonded brackets –, and the region totally exposed – the remaining 2 mm.

Demineralization depths were measured on the demineralized bounded area by ImageJ (Version 1.46r, Wayne Rasband National Institutes of Health, USA) on OCT images and represented the reach of enamel damage from the cariogenic challenge. Each demineralized bounded area had 3 vertical measures horizontally equidistant, and the registered data followed to statistical analysis.

A routine (Matlab, MathWorks Inc, Massachusetts, USA) was developed to analyze the optical decay (α) of samples images obtained by OCT. It was used the delimiters analysis from horizontally select the two regions of interest (ROI) by each side of the bracket on enamel exposed area to the cariogenic challenge. The A-scan average was calculated, and analysis was

repeated for several sequential acquisitions giving an arithmetic value average of A-scans for each group. It was calculated the variation (Δ) considering the final average values (T1- immediately after cariogenic challenge test) minus initial average values (T0- before any treatment), for intergroup comparison.²⁶ It was considered a depth analysis between 0 and 400 μm .

2.2. Shear Bond Strength

The SBS test was carried out according to ISO/TS11405 by a universal test machine (Instron 5567, Texas, EUA) with 1 kN cell load and 0.5 mm/min speed. Samples were positioned for the chisel to have contact with the bracket-adhesive-enamel interface when sliding in parallel vector to the bracket's base until it fractures or the adhesive bond breaks. The force was recorded in Newtons (N) and divided by the base bracket area to obtain the resistance value of shear bond strength in Megapascal (MPa).

2.3. Microhardness

Specimens were horizontally sectioned in the middle of the studied area with a micromotor and handpiece with diamond disc (Pretty Dental, São Paulo, Brazil). The samples were included in self-curing acrylic resin (Classico Artigos Odontológicos Ltda, Campo Limpo Paulista, SP, Brazil) aided by pre-inlay press PRE-30Mi (Arotec, Cotia, São Paulo, Brazil). The produced discs had 25 mm (height) x 3 cm (diameter) with 4 pieces of samples. The grinding wheels polishing sequence was: #400, 600, 800, 1200, 2500, 4000 (Carbimed Paper Discs, Buehler, IL, USA) and felt disc (Polishing Cloth METADI, Buehler, IL, USA) with 1 μm diamond suspension solution (METADI Diamond Suspension, Buehler, IL, USA) in a Politrix (Ecomet 300, Jabaquara, São Paulo, Brazil) for 4 min each (Figure 1f).

A Knoop longitudinal microhardness tester (Shimadzu HMV-2000, Kyoto, Japan) loaded with a 98.07 mN (HK 0.01) (5 s) measured three rows of 11 indentations depths (20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 100, 120, 140 e 160 μm) in the 3 analyzed area, with 50 μm of horizontal distance. In the areas, under the nail-varnish and the bracket the measurements were taken from the outer enamel surface to dentin-enamel junction, whilst under the exposed area, measurements were taken from the outer lesion surface (Figure 2).

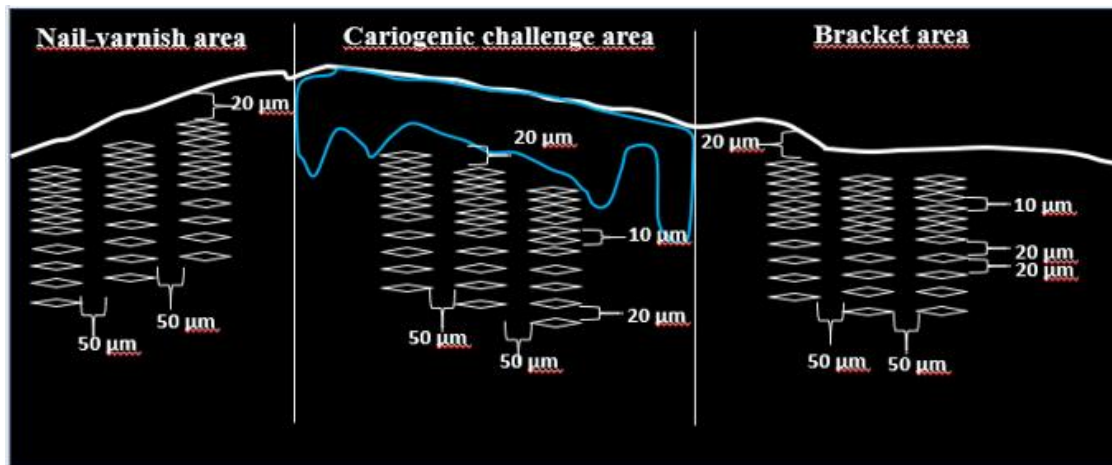


Figure 2. The schematic draw of microhardness test represents the protocol used in this study, as described in the methods section. Microhardness measures beneath the brackets, around the brackets (cariogenic challenge exposed region) and beneath nail varnish area.

The area beneath the nail-varnish for each sample was considered the control area for itself. It was calculated the average of all points of the same distance from the surface and then it was obtained the Knoop hardness number (kg/mm^2). The area of hardness loss was calculated by numerical integration using a trapezoidal rule by the difference between the area under the curve ($\text{kg}/\text{mm}^2 \times \mu\text{m}$) of the sound enamel minus the area of the demineralized one.³²

2.2.5. Data analysis

Shapiro-Wilk normality test was performed to verify the normality (significance 95 %). For shear bond strength data, ANOVA and *post hoc* Tukey test were done (considering normal data and unpaired tests). For the demineralization depth and optical attenuation coefficient, the Kruskal Wallis test and the Dunn post hoc test was used. For microhardness analysis, ANOVA, Friedman and Kruskal Wallis tests were done. Statistical analyses were performed with the GraphPrisma program (version 6, GraphPad Software, São Paulo, Brazil).

3 RESULTS

SEM and OCT

Figure 3 presents a composition of photograph, SEM and OCT images from representative samples of the studied groups. Through the SEM analysis, it was observed the exposure of enamel prism in non-irradiated groups (G1, G2 and G3). In G1, the exposure was

more intense than the G2 (Figure 3a1 and 3b1). In the traditional group, with acid etching (G3), there was a uniform prisms exposure (Figure 3c1). There was melting on laser irradiated enamel, represented by small enamel molten bubbles, craters, micropores and recrystallized aspect (Figures 3d1 and 3e1). When associated with acid etching the laser irradiated enamel samples presented flatter aspect of the melting (Figure 3e1).

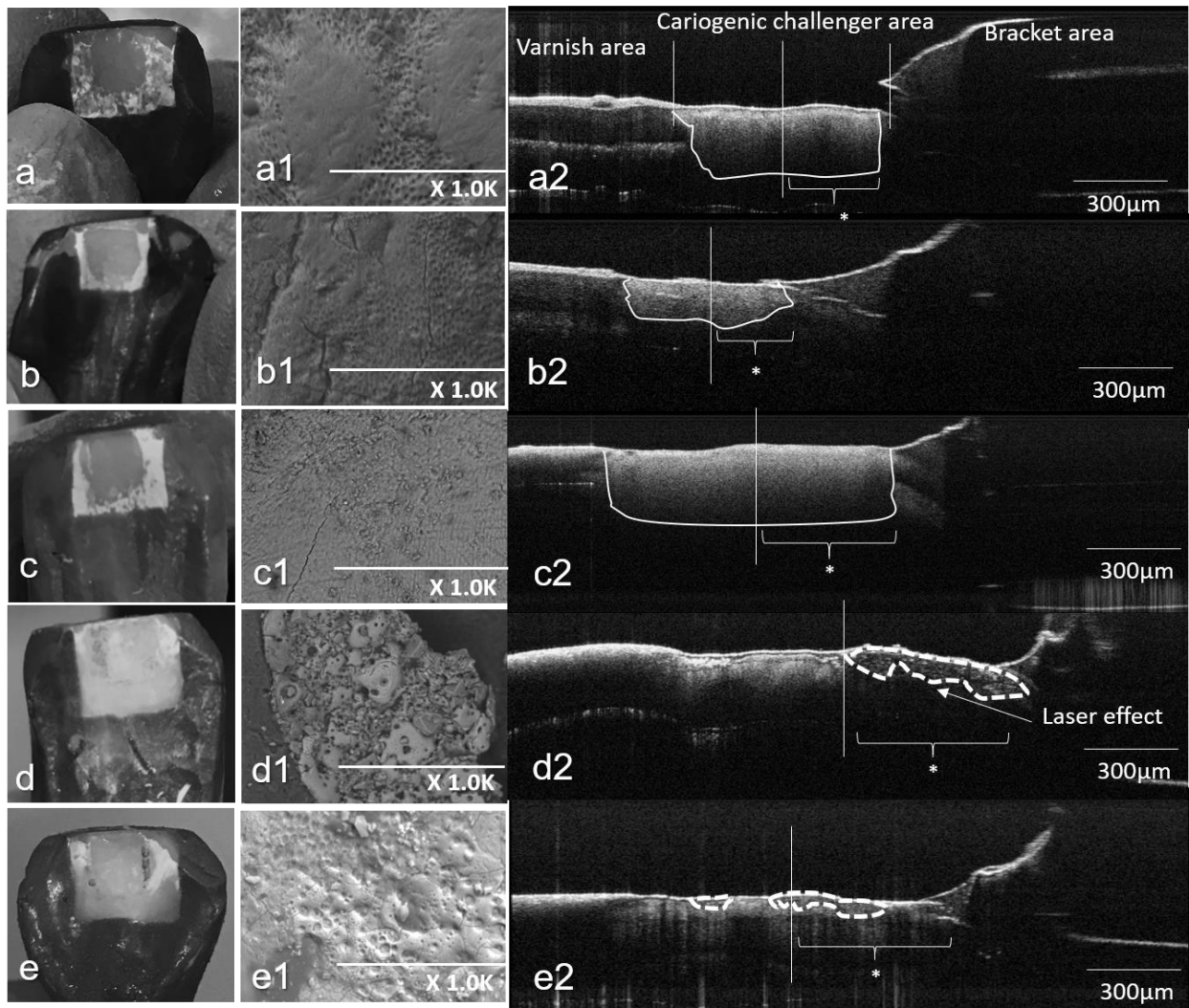


Figure 3. Representative images from the experimental groups, showing, from left to right side sequence, the visual aspect of samples, SEM (1.000x) and OCT (300μm) images around the bracket, after cariogenic challenge: a, a1(MEV) and a2 (OCT): G1- negative control group, with no fluoride protection; b, b1 and b2: G2- no acid etching bonding, with fluoride protection; c, c1 and c2: G3- acid etching bonding, with fluoride protection; d, d1 and d2: G4- Nd:YAG laser, with no acid etching and with fluoride protection; e, e1 and e2: G5- Nd:YAG laser, with acid etching and with fluoride protection. The white lines are surrounding the demineralized area in G1, G2 and G3, whilst dotted lines are surrounding the areas of laser effect in G4 and G5.

In the OCT analysis, the images after cariogenic challenge showed demineralization in exposed areas in the groups without laser irradiation (Figures 3a2-c2), but the negative control had the highest signal intensity in outer enamel surface. It led the G1 to present the higher demineralized aspect with intense optical decay. Among the non-irradiated groups, the G3 presented the lowest depth and a uniformity in its demineralization pattern. In laser irradiated enamel the melting appears on the surface as white dense points (Figures 3d2 and 3e2) and beneath it there were no demineralization. The demineralization occurred only in areas where the laser irradiation did not reach in both G4 and G5 groups. When associated to acid etching, the melting was softer, as seen in G5 group (Figure 3e2).

Demineralization depth

There was statistically significant difference between G4 and the other groups ($p = 0.0006$), regarding the demineralization depth, as shown in Table I.

Table I. Demineralization depth of each group.

Groups	Minimum	Maximum	Median ($\pm$ SE) (μ m)
G1 (Negative Control)	188.1	417.2	321.4 ($\pm$ 24.15) ^a
G2 (APF)	225.6	347.0	304.2 ($\pm$ 12.16) ^a
G3 (H₃PO₄ + APF)	224.4	358.3	270.8 ($\pm$ 13.34) ^a
G4 (Nd:YAG + APF)	113.3	279.8	231.8 ($\pm$ 13.86) ^b
G5 (Nd:YAG + H₃PO₄+ APF)	198.7	264.9	229.8 ($\pm$ 6.70) ^a

SE= standard error. post hoc de Dunn test.
a and b= statistical significance

Optical attenuation coefficient

There was a statistically significant difference for the optical attenuation coefficient (α) when comparing G3 to the other groups ($p < 0.0001$). G1, G2, G4, and G5 showed an increase in the final surface condition, whilst G3 had a decrease. Individually, the G4 was the only group that did not show a statistically significant difference between the variation in the α value from initial to final enamel conditions (Table II).

Table II. Individual comparison measurements description of α values before and after cariogenic challenge on enamel surface (μm^{-1}).

Groups	Before (SE)	After (SE)	Δ
G1 (Negative Control)	3.35 (0.38)	4.63 (0.67)	1,28 ^a (↑)
G2 (APF)	3.10 (0.21)	6.14 (0.28)	3,04 ^a (↑)
G3 (H₃PO₄+ APF)	5.49 (0.27)	4.11 (0.13)	-1,38 ^b (↓)
G4 (Nd:YAG + APF)	3.96 (0.45)	5.46 (0.57)	1,5 ^a (↑)
G5 (Nd:YAG + H₃PO₄+ APF)	4.66 (0.40)	5.04 (0.36)	0,38 ^a (↑)

SE= standard error. Kruskal Wallis e o teste post hoc de Dunn tests.

Δ is the variation between the final and initial α .

a and b= statistical significance

Shear bond strength

There was a significant difference among the groups G1, G2 and G4 in comparison to G3 and G5 ($p < 0.0001$) on the shear bond strength test, as shown in Table III.

Table III. Measurements description of shear bond strength of groups (MPa)

Groups	Minimum	Maximum	Median ($\pm$ SE)
G1 (Negative Control)	0.71	11.19	4.86 ($\pm$ 0.95) ^a
G2 (APF)	0.77	8.18	3.50 ($\pm$ 0.58) ^a
G3 (H₃PO₄+ APF)	2.04	19.57	13.00 ($\pm$ 1.12) ^b
G4 (Nd:YAG + APF)	3.25	10.28	5.77 ($\pm$ 0.73) ^a
G5 (Nd:YAG + H₃PO₄+ APF)	7.88	25.71	15.57 ($\pm$ 1.40) ^b

SE= standard error. Post Hoc Tukey test.

a and b= statistical significance

Microhardness

Only G3, G4, and G5 groups were considered for microhardness test; G1 and G2 were excluded because they presented enamel cavities lesions from cariogenic challenge, which did not allow to measure the samples at the same points of the other groups. There was similarity in the comparison of intergroup regions or among regions in the same group ($p > 0.05$). All groups presented proportionally minimum values of microhardness between 20-40 μm depth. And the

maximum values were found between 70-80 μm depth, except in G5, which were from 100 μm depth (Table IV).

Table IV. Minimum and maximum Knoop microhardness (KHN) measurements beneath varnish, challenge and bracket area.

Groups	KHN (Kg/mm ²)									P value F
	Varnish		Challenge			Bracket				
	Min.	Max.	Median	Min.	Max.	Median	Min.	Max.	Median	
G3 (H ₃ PO ₄ + APF)	258.80	470.90	366.85	96.59	406.40	313.31	300.43	450.37	343.17	0.8187
G4 (Nd:YAG + APF)	297.33	482.83	354.77	275.00	412.73	355.37	275.00	481.97	402.00	0.3087
G5 (Nd:YAG + H ₃ PO ₄ + APF)	219.53	432.77	313.43	226.75	441.67	308.77	234.23	435.87	307.72	0.0654
P value	0.2821		0.1928			>0.05				

ANOVA e Kruskal Wallis test (P value) for intergroups comparison and Friedman (P value F) for inter regions comparison in the same sample.

Considering the median after cariogenic challenge, G3 had 14.6% hardness loss in the challenge area, and 6.45% in the bracket area. On the other hand, G4 had an increase of 0.16% and 13.31%, whilst G5 presented 1.48% and 1.82% of loss, respectively, to challenge and bracket areas.

4 DISCUSSION

Laser-induced caries resistance is relevant for Orthodontics practice as an alternative to reduce demineralization lesions. Especially for patients with genetic high risks,⁷ it could minimize the need of fluoride application since it prolongs the fluoride-releasing time,¹⁵ and consequently diminished the fluorosis risks. It also diminishes the patient's need to dislocate many times for fluoride application. Additionally, one study³³ mentioned the potential of fluoride to decrease the mechanical properties of Ni-Ti wires, that could prolonged the duration of the treatment. The use of bovine incisors guarantees the sample standardization, due to better bracket adaptation on anterior teeth. It is considered an adequate substitute for human teeth for enamel adhesion studies.³⁴ The lack of studies with lingual brackets and demineralization inspired the present study.¹¹

To evaluate the SBS condition, the present study considered the work of Wen *et al.* (2014)³⁵ to choose the order of irradiation, acid etching, and the fluoride to be presented. The obtained finds corroborate with it because the association of Nd: YAG + H₃PO₄ had greater performance. However, the present study used lingual bracket instead buccal ones, bonded on lingual surface. Another difference was the present study used a photosensitizer before the laser irradiation to guarantee the laser absorption, which according to other studies,^{36,37} allows lower laser outputs that can reflect in lower SBS values. Considering the minimal clinical SBS accepted in literature (5.8-8 MPa),³⁸ only the acid etching groups were considered adequate (G3 and G5). It speculates the G5 had a synergic effect of melting and H₃PO₄ that increase the surface contact area and reach higher SBS values than G3 (traditional protocol).

The crystalline structure of enamel hydroxyapatite (HA) basically consists of the calcium, phosphate, and hydroxyl group. When exposed to acid contents, the enamel demineralizes,⁵ which was clearly seen in the non-irradiated groups by SEM and OCT images (Figures 3a - 3c). On the other hand irradiated groups presented the melting on enamel surface. It occurs because of the homogeneous hydroxyapatite fusion, with the growth of hydroxyapatite crystals,^{35,39} and a new component formation (tetracalcium diphosphate). It changes the balance of Ca/P¹⁴ decreasing the interprismatic spaces and increases the resistance of demineralization.^{16,35,39}

The melting is microscopically (MEV) shown as superficial micro-craters, small enamel molten bubbles or micropores,^{18,35} especially in the first 20 µm⁴⁰ of the lased enamel. In sound enamel the acid etching for more than 15 s removes 10 µm to 50 µm of it, creating microporosities (until 200 µm).⁴¹ It enhances the mechanical bond strength between resin-enamel interface,⁵ but also removes the acid-protection of superficial enamel layer with fluoride retention up to 50 µm.⁴² The underlying layers are less mineralized and easily allows demineralized depths (until 75 µm) just after 1 month of orthodontic treatment.⁴³

Through OCT images, the present study demonstrated that the enamel after laser irradiation had shallow demineralization depth after cariogenic challenge than the other groups. It is important to notice that the laser irradiation associated with acid etching (G5) seems to have the melting effect more discreet than the group which only received laser irradiation (G4), suggesting that the acid etching removes part of the melting superficial layer. The negative control group had the deepest demineralization, and the association of Nd:YAG laser and fluoride

had a synergic effect to prevent the demineralization (Table I). But the isolated fluoride application did not avoid demineralization lesions. In despite of this, for less aggressive protocols in literature, the isolated fluoride application showed enough lesions protection.²²

The laser-irradiated groups (G4 and G5) did not show demineralization beneath irradiated points, and because of that, they were considered the best protocol to minimize the demineralization, corroborating to other studies.^{16,17,39} The OCT allows observing the melting effect as dense points (Figures 3d and 3e). Additionally, the optical attenuation coefficient in these samples kept the final aspect almost unaltered when compared to the initial aspect.

Instead, the demineralization observed in non-irradiated groups created a large number of micro-interfaces. It increases the light backscattering and the brightness, leading to 2–3 times the magnitude of scattered coefficient values in OCT.²² The deeper the lesion is, the weaker is the signal strength. G3 was the only group that decreased the final α . It can be related to the intensification of the light propagation through the exposed enamel prisms with lower mineral content from the acid etching.

Usually, the demineralization decreases the enamel microhardness,²⁷ whilst Nd:YAG laser irradiation increases – depending on the applied radiation energy.¹⁸ The laser protocol used in the present study (60 mJ, 10 Hz) already showed satisfactory clinical results of caries reduction in hard tissues, in previous study,¹⁶ related to the increase of the enamel microhardness.⁴⁴ The Knoop microhardness test, indirectly, indicates the enamel mineral content.²⁹ In the present study, there were similarity in intergroup and inter regions comparison, suggesting no mineral content significant changes. However, considering the differences in the median values, it is possible to infer there was a synergic effect of acid challenge and acid etching on mineral loss in G3, melting protection against acid challenge in G4 and G5, but also an effect of acid etching on G5 that partially removed the melting. In a large sample size, these results could be statically significant.

Generally the first 40 μm of enamel presents greater mineral content after laser irradiation than deeper layers,^{37,40} although the analysis of microhardness behavior in the present study demonstrated there were minimum values of microhardness between 20–40 μm depth with an increase up from 50 μm . It was associated with the aggressiveness of the cariogenic challenge protocol. Additionally, there was a microhardness limitation in the tested protocol because the 3 mm rectangular area was not fully irradiated. Then, the laser irradiated groups presented some

areas left with isolated APF protection, which could negatively influence the results. But, although microhardness test had no differences between groups, the optical analysis showed better results from laser + APF experience, and this protocol can be used to improve the enamel resistance with the same SBS than the traditional protocol.

5 CONCLUSIONS

The laser irradiation associated to acid etching had similar performance to traditional bonding protocol, regarding the SBS. The optical analysis (OCT and SEM) showed that the association of Nd:YAG laser with APF was more preventive to WSL formation around lingual orthodontic brackets than the isolated APF, or the absence of treatment. There was a synergic effect of Nd:YAG and APF with melting formation, which reduced the demineralizing depth and increased the optical attenuation coefficient, representing a denser surface. The first 20 μm of enamel had greater mineral content than deeper layers.

CLINICAL RELEVANCE

It's known that the laser promotes a protective effect on the enamel surface by melting and can be helpful to avoid caries around orthodontics appliances. And considering the tendency to popularize the lasers uses becomes important to know about its performance. For the patients with a high risk of caries, where traditional therapy is not sufficient for its development, there is an intensified fluoride use and continuous search for alternative treatment and immunostimulatory therapeutic medicines. Unfortunately, it can cause systemic implications, but the laser could be an alternative to avoid caries lesions or even medicines/fluoride overdose in these patients without harm the bracket shear bond strength. It dispenses any additional protocols to guarantee adequate shear values.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was carried out under the PROCAD-CAPES/MEC (National Program of Academic Cooperation – grant number 0156/01-9 and 0349/05-4), sponsored by CAPES (Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel and Ministry of Education; PRONEX program (Center of Excellence on Biophotonics and Nanophotonics — APQ-0504-1.05/14); supported by FACEPE/CNPq (Foundation for Science and Technology of Pernambuco State and National Council of Technological and Scientific Development) and INCT-INFO

(National Institutes of Science and Technology, Institute of Photonics — 465.763/2014-6), sponsored by CNPq/ MCT (National Council of Technological and Scientific Development and Ministry of Science and Technology). The authors report no conflict of interest related to this work.

REFERENCES

1. Al Maaitah EF, Adeyemi AA, Higham SM, Pender N, Harrison JE. Factors affecting demineralization during orthodontic treatment: A post-hoc analysis of RCT recruits. *Am J Orthod Dentofac Orthop*. 2011;139(2):181–91.
2. Sagarika N, Suchindran S, Loganathan S, Gopikrishna V. Prevalence of white spot lesion in a section of Indian population undergoing fixed orthodontic treatment: An in vivo assessment using the visual International Caries Detection and Assessment System II criteria. *J Conserv Dent*. 2012;15(2):104.
3. Gorton J, Featherstone JDB. In vivo inhibition of demineralization around orthodontic brackets. *Am J Orthod Dentofac Orthop*. 2003;123(1):10–4.
4. Tufekci E, Dixon JS, Gunsolley J, Lindauer SJ. Prevalence of white spot lesions during orthodontic treatment with fixed appliances. *Angle Orthod*. 2011;81(2):206–10.
5. Abufarwa M, Voorhees RD, Varanasi VG, Campbell PM, Buschang PH. White spot lesions: Does etching really matter? *J Invest Clin Dent*. 2018;9(1):1–6.
6. Saunders KG, Mattevi G, Donly KJ, Ravikumar A. The Orthodontic Blogosphere. *APOS Trends Orthod*. 2018;8:200–3.
7. Strömberg N, Esberg A, Sheng N, Mårell L, Löfgren-Burström A, Danielsson K, *et al*. Genetic- and Lifestyle-dependent Dental Caries Defined by the Acidic Proline-rich Protein Genes PRH1 and PRH2. *EBioMedicine*. 2017;26:38–46.
8. Yagci A, Uysal T, Ulker M, Ramoglu SI. Microleakage under orthodontic brackets bonded with the custom base indirect bonding technique. *Eur J Orthod*. 2010;32(3):259–63.
9. Featherstone JDB. Dental caries: A dynamic disease process. *Aust Dent J*. 2008;53(3):286–91.
10. Listl S, Galloway J, Mossey PA, Marcenes W. Global economic impact of dental diseases. *J Dent Res*. 2015;94(10):1355–61.
11. Lombardo L, Ortan YÖ, Gorgun Ö, Panza C, Scuzzo G, Siciliani G. Changes in the oral environment after placement of lingual and labial orthodontic appliances. *Prog Orthod*. 2013;14(1).
12. Demling A, Demling C, Schwestka-Polly R, Stiesch M, Heuer W. Short-term influence of lingual orthodontic therapy on microbial parameters and periodontal status a preliminary study. *Angle Orthod*. 2010;80(3):480–4.
13. Brokos Y, Bortolotto T, Krejci I SM. Evaluation of enamel thickness of upper anterior teeth in different age groups by dental cone beam computed tomography scan in vivo. *Int J Adv Case Reports*. 2015;2(23):1396–409.
14. Ana PA, Bachmann L, Zezell DM. Lasers effects on enamel for caries prevention. *Laser Phys*. 2006;16(5):865–75.
15. Pereira DL, Freitas AZ, Bachmann L, Benetti C, Zezell DM, Ana PA. Variation on molecular structure, crystallinity, and optical properties of dentin due to Nd:YAG laser and fluoride aimed at tooth erosion prevention. *Int J Mol Sci*. 2018;19(2):1–14.

16. Zezell DM, Boari HGD, Ana PA, Eduardo CDP, Powell GL. Nd:YAG laser in caries prevention: A clinical trial. *Lasers Surg Med.* 2009;41(1):31–5.
17. Harazaki M, Hayakawa K, Fukui T, Isshiki Y, Powell LG. The Nd-YAG laser is useful in prevention of dental caries during orthodontic treatment. *Bull Tokyo Dent Coll.* 2001;42(2):79–86.
18. Banda NR, Vanaja Reddy G, Shashikiran ND. Evaluation of primary tooth enamel surface morphology and microhardness after Nd:YAG laser irradiation and APF gel treatment--an in vitro study. *J Clin Pediatr Dent.* 2011;35(4):377–82.
19. Uysal T, Ulker M, Ramoglu SI, Ertas H. Microleakage under metallic and ceramic brackets bonded with orthodontic self-etching primer systems. *Angle Orthod.* 2008;78(6):1089–94.
20. Heymann GC, Grauer D. A contemporary review of white spot lesions in orthodontics. *J Esthet Restor Dent.* 2013;25(2):85–95.
21. James JW, Miller BH, English JD, Tadlock LP, Buschang PH. Effects of high-speed curing devices on shear bond strength and microleakage of orthodontic brackets. *Am J Orthod Dentofac Orthop.* 2003;123(5):555–61.
22. Velusamy P, Shimada Y, Kanno Z, Ono T, Tagami J. Optical evaluation of enamel white spot lesions around orthodontic brackets using swept-source optical coherence tomography (SS-OCT): An in vitro study. *Dent Mater J.* 2018;1–6.
23. Mota CCBO, Gueiros LA, Maia AMA, Santos-Silva AR, Gomes ASL, Alves F de A, *et al.* Optical Coherence Tomography as an Auxiliary Tool for the Screening of Radiation-Related Caries. *Photomed Laser Surg.* 2013;31(7):301–6.
24. Maia AMA, Freitas AZ, Campello SL, Gomes ASL, Karlsson L. Evaluation of dental enamel caries assessment using Quantitative Light Induced Fluorescence and Optical Coherence Tomography. *J Biophotonics.* 2016;9(6):596–602.
25. Austin RS, Haji Taha M, Festy F, Cook R, Andiappan M, Gomez J, *et al.* Quantitative swept-source optical coherence tomography of early enamel erosion in vivo. *Caries Res.* 2017;51(4):410–8.
26. Cara ACB, Zezell DM, Ana PA, Maldonado EP, Freitas AZ. Evaluation of two quantitative analysis methods of optical coherence tomography for detection of enamel demineralization and comparison with microhardness. *Lasers Surg Med.* 2014;46(9):666–71.
27. Bakhsh TA, Bakry AS, Mandurah MM, Abbassy MA. Novel evaluation and treatment techniques for white spot lesions. An in vitro study. *Orthod Craniofac Res.* 2017;20(3):170–6.
28. Eng J. Sample Size Estimation: How Many Individuals Should Be Studied? *Radiology.* 2003;227(2):309–13.
29. Delbem ACB, Cury JA. Effect of application time of APF and NaF gels on microhardness and fluoride uptake of in vitro enamel caries. *Am J Dent.* 2002;15(3):169–72.
30. Omid Khoda M, Heravi F, Shafae H, Mollahassani H. The effect of different soft drinks on the shear bond strength of orthodontic brackets. *J Dent (Tehran).* 2012;9(2):145–9.
31. Fried WA, Fried D, Chan KH, Darling CL. High contrast reflectance imaging of simulated lesions on tooth occlusal surfaces at near-IR wavelengths. *Lasers Surg Med.* 2013;45(8):533–41.
32. Ana PA, Tabchoury CPM, Cury JA, Zezell DM. Effect of Er,Cr:YSGG laser and professional fluoride application on enamel demineralization and on fluoride retention. *Caries Res.* 2012;46(5):441–51.

33. Walker MP, White RJ, Kula KS. Effect of fluoride prophylactic agents on the mechanical properties of nickel-titanium-based orthodontic wires. *Am J Orthod Dentofac Orthop.* 2005;127(6):662–9.
34. Larry J. Oesterle LJ, Shellhart WC, Gary K, Belanger G. The use of bovine enamel in bonding studies Larry. 2013;126(20):3860–4.
35. Wen X, Zhang L, Liu R, Deng M, Wang Y, Liu L, *et al.* Effects of Pulsed Nd:YAG Laser on Tensile Bond Strength and Caries Resistance of Human Enamel. *Oper Dent.* 2014;39(3):273–82.
36. 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 Phys.* 2009;19(7):1463–9.
37. Ariyaratnam MT, Wilson MA, Mackie C, Blinkhorn AS. A comparison of surface roughness and compositel enamel bond strength of human enamel following the application of the Nd : YAG laser and etching with phosphoric acid. 1997;51–5.
38. Reynolds IR. A Review of Direct Orthodontic Bonding. *Br J Orthod.* 1975;2(3):171–8.
39. Castellan CS, Luiz AC, Bezinelli LM, Lopes RMG, Mendes FM, Eduardo CDP, *et al.* In vitro Evaluation of Enamel Demineralization after Er:YAG and Nd:YAG Laser Irradiation on Primary Teeth. *Photomed Laser Surg.* 2007;25(2):85–90.
40. Korytnicki D, Mayer MPA, Daronch M, Singer J da M, Grande RHM. Effects of Nd:YAG Laser on Enamel Microhardness and Dental Plaque Composition: An *in Situ* Study. *Photomed Laser Surg.* 2006;24(1):59–63.
41. Elnafar AAS, Alam MK, Hassan R, Purmal K. Enamel surface preparations and shear bond strength of orthodontic brackets: A review. *Int Med J.* 2015;22(3):194–8.
42. Fejerskov O. Changing Paradigms in Concepts on Dental Caries : Consequences for Oral Health Care. 2004;182–91.
43. Øgaard B, Rølla G, Arends J. Orthodontic appliances and enamel demineralization. Part 1. Lesion development. *Am J Orthod Dentofac Orthop.* 1988;94(1):68–73.
44. Zezell DM, Ana PA, Benetti C, Goulart VP, Bachmann L, Tabchoury CPM, *et al.* Compositional and crystallographic changes on enamel when irradiated by Nd:YAG or Er,Cr:YSGG lasers and its resistance to demineralization when associated with fluoride. 2010;7549:75490G.

6 CONCLUSÕES

6.1 CONCLUSÕES ESTUDO 1

Todos os protocolos apresentaram valores de cisalhamento dentro do recomendado clinicamente na literatura. Não há prejuízo na resistência adesiva em incluir a irradiação do laser, com o objetivo de prevenir a desmineralização no esmalte adjacente aos braquetes ortodônticos, antes do condicionamento ácido no protocolo de colagem tradicional. A irradiação com laser de Nd:YAG e / ou jateamento com óxido de alumínio apresentaram modificações estruturais no esmalte que mantêm o desempenho clínico do adesivo. O pré-condicionamento com jateamento tem uma tendência a aumentar os valores de cisalhamento, mas não houve diferenças entre os protocolos testados. O jateamento com óxido de alumínio pode ser desconsiderado como o protocolo de colagem de braquetes linguais e se associado ao laser, reduz mecanicamente as alterações superficiais provocadas pelo laser.

6.2 CONCLUSÕES ESTUDO 2

A irradiação com laser de Nd:YAG associado ao flúor preveniu a formação de lesões de mancha branca em torno dos braquetes ortodônticos linguais de forma mais eficiente que o tratamento isolado com flúor ou nenhum tratamento. A associação do condicionamento ácido com o laser de Nd: YAG + flúor mostrou resultados para cisalhamento tão bons quanto o protocolo clássico de colagem, com apenas condicionamento ácido. As análises óticas (imagens em MEV e TCO) mostraram a formação de fusão superficial do esmalte após a irradiação com laser de Nd:YAG, e a sua associação com o flúor foi mais eficaz no surgimento e na redução das profundidades das desmineralizações; que foi confirmado por um maior coeficiente de atenuação óptica, representando uma superfície mais densa. Não houve diferenças estatísticas entre as medidas de microdureza, entretanto, foi observada uma tendência de Nd:YAG + flúor em diminuir as desmineralizações nas camadas superficiais das áreas expostas ao desafio.

REFERÊNCIAS

- ABUFARWA, M. *et al.* White spot lesions: Does etching really matter? **Journal of investigative and clinical dentistry**, v. 9, n. 1, p. 1–6, 2018.
- AL MAAITAH, E. F. *et al.* Factors affecting demineralization during orthodontic treatment: A post-hoc analysis of RCT recruits. **American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics**, v. 139, n. 2, p. 181–191, 2011.
- ALHAIJA, E. S. J. A.; AL-WAHADNI, A. M. S. Evaluation of shear bond strength with different enamel. v. 26, n. 2, p. 179–184, 2004.
- ANA, P. A. *et al.* Effect of Er,Cr:YSGG laser and professional fluoride application on enamel demineralization and on fluoride retention. **Caries Research**, v. 46, n. 5, p. 441–451, 2012.
- ANA, P. A. *et al.* FT-Raman spectroscopic analysis of Nd:YAG and Er,Cr:YSGG laser irradiated enamel for preventive purposes. **Laser Physics**, v. 24, n. 3, p. 035603, 2014.
- ANA, P. A.; BACHMANN, L.; ZECELL, D. M. Lasers effects on enamel for caries prevention. **Laser Physics**, v. 16, n. 5, p. 865–875, 2006.
- ARAÚJO, J. J. **Efeito da irradiação laser associada à aplicação tópica de fluoreto sobre o esmalte submetido à erosão e/ou abrasão.** [s.l.] Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo, 2012.
- ATA-ALI, F. *et al.* Adverse effects of lingual and buccal orthodontic techniques: A systematic review and meta-analysis. **American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics**, v. 149, n. 6, p. 820–829, 2016.
- AULUCK, A. Lingual orthodontic treatment: what is the current evidence base? **Journal of Orthodontics**, v. 40, n. s1, p. s27–s33, 2013.
- AUSTIN, R. S. *et al.* Quantitative swept-source optical coherence tomography of early enamel erosion in vivo. **Caries Research**, v. 51, n. 4, p. 410–418, 2017.
- BACHMANN, L. **Estrutura e Composição do Esmalte e da Dentina Tratados Termicamente ou Irradiados com Lasers Emissores no Infravermelho.** [s.l.] USP, 2004.
- BAKSH, T. A. *et al.* Novel evaluation and treatment techniques for white spot lesions. An in vitro study. **Orthodontics and Craniofacial Research**, v. 20, n. 3, p. 170–176, 2017.
- BANDA, N. R.; VANAJA REDDY, G.; SHASHIKIRAN, N. D. Evaluation of primary tooth enamel surface morphology and microhardness after Nd:YAG laser irradiation and APF gel treatment--an in vitro study. **The Journal of clinical pediatric dentistry**, v. 35, n. 4, p. 377–82, 2011.

BARCELLOS, D. *et al.* Longitudinal Evaluation of Bond Strength to Enamel of Dental Adhesive Systems Associated with Nd:YAG Laser. **Operative Dentistry**, v. 40, n. 3, p. E122–E131, 2015.

BEDINI, R. *et al.* Microhardness and morphological changes induced by Nd : Yag laser on dental enamel : an in vitro study. v. 46, n. 2, p. 168–172, 2010.

BOARI, H. G. D. *et al.* Absorption and thermal study of dental enamel when irradiated with Nd:YAG laser with the aim of caries prevention. **Laser Physics**, v. 19, n. 7, p. 1463–1469, 2009.

BOERSMA, J. G. *et al.* Caries prevalence measured with QLF after treatment with fixed orthodontic appliances: Influencing factors. **Caries Research**, v. 39, n. 1, p. 41–47, 2005.

BORSATTO, M. C. *et al.* Shear bond strength of enamel surface treated with air-abrasive system. **Brazilian dental journal**, v. 13, n. 3, p. 175–178, 2002.

BRAGA, S. R. M.; DE OLIVEIRA, E.; SOBRAL, M. A. P. Effect of neodymium:yttrium-aluminum-garnet laser and fluoride on the acid demineralization of enamel. **Journal of investigative and clinical dentistry**, v. 8, n. 1, p. 1–6, 2017.

CAL-NETO, J. P. *et al.* Influence of enamel sandblasting prior to etching on shear bond strength of indirectly bonded lingual appliances. **Angle Orthodontist**, v. 81, n. 1, p. 151–154, 2011.

CARA, A. C. B. *et al.* Evaluation of two quantitative analysis methods of optical coherence tomography for detection of enamel demineralization and comparison with microhardness. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 46, n. 9, p. 666–671, 2014.

CASTELLAN, C. S. *et al.* In vitro Evaluation of Enamel Demineralization after Er:YAG and Nd:YAG Laser Irradiation on Primary Teeth. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 25, n. 2, p. 85–90, 2007.

CHAN, K. H.; TOM, H.; FRIED, D. Monitoring the inhibition of erosion by a CO 2 laser with OCT. **Lasers in Dentistry XX**, v. 8929, p. 89290F1-5, 2014a.

CHINELATTI, M. A. *et al.* Analysis of surfaces and adhesive interfaces of enamel and dentin after different treatments. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 18, n. 7, p. 1465–1470, 2007.

CORRÊA-AFONSO, A. M. *et al.* Loss of structural water and carbonate of Nd:YAG laser-irradiated human enamel. **Lasers in Medical Science**, v. 30, n. 4, p. 1183–1187, 2015.

DELBEM, A. C. B.; CURY, J. A. Effect of application time of APF and NaF gels on microhardness and fluoride uptake of in vitro enamel caries. **American Journal of Dentistry**, v. 15, n. 3, p. 169–172, 2002.

DEMLING, A. *et al.* Short-term influence of lingual orthodontic therapy on microbial parameters and periodontal status a preliminary study. **Angle Orthodontist**, v. 80, n. 3, p. 480–484, 2010.

DERECH, C. D. A. *et al.* O efeito do jateamento do esmalte na força de adesao na colagem de

braquetes. v. 13, n. 3, p. 43–49, 2008.

DIAS-MORAES, M. C. *et al.* Using Optical Attenuation Coefficient to Monitor the Efficacy of Fluoride and Nd : YAG Laser to Control Dentine Erosion. **Applied Sciences**, v. 1485, n. 9, p. 1–7, 2019.

DIAS, T. R. **Lesão de mancha branca associada ao tratamento ortodôntico fixo. Revisão de literatura.** [s.l.] Faculdade de Ciencias da Saúde da Universidade de Brasília, 2015.

ELNAFAR, A. A. S. *et al.* Enamel surface preparations and shear bond strength of orthodontic brackets: A review. **International Medical Journal**, v. 22, n. 3, p. 194–198, 2015.

ENG, J. Sample Size Estimation: How Many Individuals Should Be Studied? **Radiology**, v. 227, n. 2, p. 309–313, 2003.

FEATHERSTONE, J. D. B. Prevention and reversal of dental caries: Role of low level fluoride. **Community Dentistry and Oral Epidemiology**, v. 27, n. 1, p. 31–40, 1999.

FEATHERSTONE, J. D. B. Dental caries: A dynamic disease process. **Australian Dental Journal**, v. 53, n. 3, p. 286–291, 2008.

FEATHERSTONE, J. D. B. . *et al.* Comparision of artificial caries-like lesions by quantitative microradiography and microhardness profiles. **Caries Research**, v. 17, p. 385–391, 1983.

FERNANDES, L. O. *et al.* In vivo assessment of periodontal structures and measurement of gingival sulcus with Optical Coherence Tomography: a pilot study. **Journal of Biophotonics**, v. 10, n. 6, p. 862–869, 2017.

FINNEMA, K. J. *et al.* In-vitro orthodontic bond strength testing: A systematic review and meta-analysis. **American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics**, v. 137, n. 5, p. 615–622, 2010.

FOX, J. L. *et al.* Combined effects of laser irradiation and chemical inhibitors on the dissolution of dental enamel. **Caries Research**, v. 26, p. 333–339, 1992.

FRIED, W. A. *et al.* High contrast reflectance imaging of simulated lesions on tooth occlusal surfaces at near-IR wavelengths. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 45, n. 8, p. 533–541, 2013.

GABARRONE, L. R. **Avaliação da superfície do esmalte após diferentes tempos de jateamento de óxido de alumínio indicados para a colagem de braquetes.** [s.l.] Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, 2016.

GHADIRIAN, H. *et al.* Effect of quaternary Ammonium salt on Shear bond strength of orthodontic brackets to enamel. **Journal of Dentistry of Tehran University of Medical Sciences**, v. 14, n. 3, p. 154–158, 2017.

GIANNINI, M.; SOARES, C. J.; DE CARVALHO, R. M. Ultimate tensile strength of tooth structures. **Dental Materials**, v. 20, n. 4, p. 322–329, 2004.

GORTON, J.; FEATHERSTONE, J. D. B. In vivo inhibition of demineralization around orthodontic brackets. **American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics**, v. 123, n. 1, p. 10–14, 2003.

GRABER, T. M.; ELIADES, T.; ATHANASIOU, A. Risk management in orthodontics: experts' guide to malpractice. **British Dental Journal**, v. 198, n. 2, p. 114–114, 2005.

HADLER-OLSEN, S. *et al.* The incidence of caries and white spot lesions in orthodontically treated adolescents with a comprehensive caries prophylactic regimen - A prospective study. **European Journal of Orthodontics**, v. 34, n. 5, p. 633–639, 2012.

HALPERN, R. M.; ROULEAU, T. The effect of air abrasion preparation on the shear bond strength of an orthodontic bracket bonded to enamel. **European Journal of Orthodontics**, v. 32, n. 2, p. 224–227, 2010.

HAMDAN, W. A.; BADRI, S.; EL SAYED, A. The effect of fluoride varnish in preventing enamel demineralization around and under orthodontic bracket. **International Orthodontics**, v. 16, n. 1, p. 1–11, 2018.

HARAZAKI, M. *et al.* The Nd-YAG laser is useful in prevention of dental caries during orthodontic treatment. **The Bulletin of Tokyo Dental College**, v. 42, n. 2, p. 79–86, 2001.

HEYMANN, G. C.; GRAUER, D. A contemporary review of white spot lesions in orthodontics. **Journal of Esthetic and Restorative Dentistry**, v. 25, n. 2, p. 85–95, 2013.

HUANG, D. *et al.* Optical Coherence Tomography. **Science**, v. 254, n. 5035, p. 1178–1181, 1991.

JORDÃO, M. C. **Efeito da irradiação dos lasers de CO 2 e Nd : YAG associados ou não ao fluoreto sobre dentina e esmalte hígidos e erodidos quando submetidos a erosão in vitro.** [s.l.] Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo – Ribeirão Preto – SP, 2011.

KARANDISH, M. The efficiency of laser application on the enamel surface: a systematic review. **Journal of lasers in medical sciences**, v. 5, n. 3, p. 108–14, 2014.

KNÖSEL, M. *et al.* Occurrence and severity of enamel decalcification adjacent to bracket bases and sub-bracket lesions during orthodontic treatment with two different lingual appliances. **European Journal of Orthodontics**, v. 38, n. 5, p. 485–492, 2016.

KO, C. C. *et al.* Optical Scattering Power for Characterization of Mineral Loss. **Journal of Dental Research**, v. 79, n. 8, p. 1584–1589, 2000.

KURAMOTO JÚNIOR, M. *et al.* Microhardness of Nd:YAG laser irradiated enamel surfaces. **Brazilian dental journal**, v. 12, n. 1, p. 31–33, 2001.

LEÃO FILHO, J. *et al.* Enamel Quality after Debonding: Evaluation by Optical Coherence Tomography. **Braz Dent J.**, v. 26, n. 4, p. 384–389, 2015.

LENTON, P. *et al.* Imaging in vivo secondary caries and ex vivo dental biofilms using cross-polarization optical coherence tomography. **Dental Materials**, v. 28, n. 7, p. 792–800, 2012.

LISTL, S. *et al.* Global economic impact of dental diseases. **Journal of Dental Research**, v. 94, n. 10, p. 1355–1361, 2015.

LOMBARDO, L. *et al.* A comparative study of lingual bracket bond strength. **Orthodontics (Chic.)**, v. 12, n. 3, p. 178–187, 2011.

LOMBARDO, L. *et al.* Changes in the oral environment after placement of lingual and labial orthodontic appliances. **Progress in Orthodontics**, v. 14, n. 1, 2013.

MAIA, A. M. A. *et al.* Evaluation of dental enamel caries assessment using Quantitative Light Induced Fluorescence and Optical Coherence Tomography. **Journal of Biophotonics**, v. 602, n. 6, p. 596–602, 2016.

MARIMOTO, A. *et al.* Influence of Nd:YAG Laser on the Bond Strength of Self-etching and Conventional Adhesive Systems to Dental Hard Tissues. **Operative Dentistry**, v. 38, n. 4, p. 447–455, 2013.

MARSILLAC, M. DE W. DE S. DE. **Lesão ativa de cárie em esmalte e perda mineral após o uso de fluoretos em superfície oclusal: Estudo “in vitro”**. [s.l.] Universidade Federal de Santa Catarina, 2007.

MATI, M. *et al.* Effet du microsablage de l'émail vestibulaire et lingual sur la résistance au cisaillement d'attaches orthodontiques collées avec un primaire automordant. **International Orthodontics**, v. 10, n. 4, p. 422–431, 2012.

MATOS, A. B. *et al.* Nd:YAG laser influence on tensile bond strength of self-etching adhesive systems. **Journal of clinical laser medicine & surgery**, v. 18, n. 5, p. 253–257, 2000.

MAVREAS, D. *et al.* The effect of various adhesives, enamel etching, and base treatment on the failure frequency of customized lingual brackets: A randomized clinical trial. **European Journal of Orthodontics**, v. 40, n. 3, p. 249–253, 2018.

MIETHKE, R. R.; BRAUNER, K. Vergleich der Parodontalbefunde zwischen Invisalign®-Patienten und Patienten mit festsitzenden Lingualapparaturen. **Journal of Orofacial Orthopedics**, v. 68, n. 3, p. 223–231, 2007.

MIRESMAEILI, A. *et al.* Effect of carbon dioxide laser irradiation on enamel surface microhardness around orthodontic brackets. **American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics**, v. 146, n. 2, p. 161–165, 2014.

MOTA, C. C. B. O. *et al.* Application of optical coherence tomography to detect failures at the

enamel dental restoration interface - An in vivo study. **CLEO/Europe - EQEC 2009 - European Conference on Lasers and Electro-Optics and the European Quantum Electronics Conference**, n. January 2017, 2009.

MOTA, C. C. B. O. *et al.* Optical Coherence Tomography as an Auxiliary Tool for the Screening of Radiation-Related Caries. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 31, n. 7, p. 301–306, 2013.

NASCIMENTO, P. L. DE M. M. *et al.* Fluoride-releasing materials to prevent white spot lesions around orthodontic brackets: A systematic review. **Brazilian Dental Journal**, v. 27, n. 1, p. 101–107, 2016.

PATCAS, R. *et al.* Surface and interfacial analysis of sandblasted and acid-etched enamel for bonding orthodontic adhesives. **American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics**, v. 147, n. 4, p. S64–S75, 2015.

PEREIRA, D. L. *et al.* Variation on molecular structure, crystallinity, and optical properties of dentin due to Nd:YAG laser and fluoride aimed at tooth erosion prevention. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 2, p. 1–14, 2018.

PEREIRA, L. *et al.* Nd:YAG laser irradiation associated with fluoridated gels containing photo absorbers in the prevention of enamel erosion. **Lasers in Medical Science**, v. 32, n. 7, p. 1–7, 2017.

PICKETT, K. L. *et al.* Orthodontic in Vivo Bond Strength: Comparison with in Vitro Results. **Angle Orthodontist**, v. 71, n. 2, p. 141–148, 2001.

POPESCU, D. P. *et al.* Assessment of early demineralization in teeth using the signal attenuation in optical coherence tomography images. **J Biomed Opt**, v. 13, n. 5, p. 054053-1–17, 2008.

RESTREPO, M. R. **Remineralização de lesões de mancha branca adjacentes aos bráquetes ortodônticos**. [s.l.] Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista, 2013.

REYNOLDS, I. R. A Review of Direct Orthodontic Bonding. **British Journal of Orthodontics**, v. 2, n. 3, p. 171–178, 1975.

ROBLES-RUÍZ, J. J. *et al.* Effect of lingual enamel sandblasting with aluminum oxide of different particle sizes in combination with phosphoric acid etching on indirect bonding of lingual brackets. **The Angle orthodontist**, v. 84, n. 6, p. 1068–73, 2014.

ROBLES-RUÍZ, J. J. *et al.* Effects of sandblasting before orthophosphoric acid etching on lingual enamel: In-vitro roughness assessment. **American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics**, v. 147, n. 4, p. S76–S81, 2015.

SAGARIKA, N. *et al.* Prevalence of white spot lesion in a section of Indian population undergoing fixed orthodontic treatment: An in vivo assessment using the visual International Caries Detection and Assessment System II criteria. **Journal of Conservative Dentistry**, v. 15, n. 2, p. 104, 2012.

SAUNDERS, K. G. *et al.* The Orthodontic Blogosphere. **APOS Trends Orthod**, v. 8, p. 200–3, 2018.

SEINO, P. Y. *et al.* Influence of CO₂ (10.6 µm) and Nd:YAG laser irradiation on the prevention of enamel caries around orthodontic brackets. **Lasers in Medical Science**, v. 30, n. 2, p. 611–616, 2015.

ŞEN, S. *et al.* Assessing abrasion of orthodontic surface sealants using a modified ophthalmic optical coherence tomography device. **Clinical Oral Investigations**, v. 22, n. 9, p. 3143–3157, 2018.

SFONDRINI, M. F. *et al.* Orthodontic Metallic Lingual Brackets: The Dark Side of the Moon of Bond Failures? **Journal of Functional Biomaterials**, v. 8, n. 3, p. 27, 2017.

SHAHEEN, A.; ILYAS, M.; UL HAMID, W. Micro-leakage around orthodontic brackets with direct and indirect bonding. **POJ**, v. 8, n. 2, p. 98–103, 2016.

SILVA, A. R. S. *et al.* Patterns of demineralization and dentin reactions in radiation-related caries. **Caries Research**, v. 43, n. 1, p. 43–49, 2009.

SINGH, P.; COX, S. Lingual Orthodontics- an Overview. **Dental update**, v. 38, n. 6, p. 390–395, 2011.

SOWA, M. G. *et al.* A comparison of methods using optical coherence tomography to detect demineralized regions in teeth. **Journal of Biophotonics**, v. 4, n. 11–12, p. 814–823, 2011.

STRÖMBERG, N. *et al.* Genetic- and Lifestyle-dependent Dental Caries Defined by the Acidic Proline-rich Protein Genes PRH1 and PRH2. **EBioMedicine**, v. 26, p. 38–46, 2017.

TENUTA, L. M. A. *et al.* Mechanism of fluoride dentifrice effect on enamel demineralization. **Caries Research**, v. 43, n. 4, p. 278–285, 2009.

THURLER, R. C. S. B. *et al.* Influência do óxido de alumínio na colagem dos bráquetes linguais The influence of the aluminum oxide on lingual brackets bonding Material e métodos. v. 7, n. 28, p. 470–477, 2014.

TUFEKCI, E. *et al.* Prevalence of white spot lesions during orthodontic treatment with fixed appliances. **Angle Orthodontist**, v. 81, n. 2, p. 206–210, 2011.

UNDE, M. P.; PATIL, R. U.; DASTOOR, P. P. 05/03/2019 The untold story of fluoridation: Revisiting the changing perspectives Maitreyee P Unde, Raju Umaji Patil, Persis P Dastoor - Indian J Occup Environ Med. **Indian Journal of Occupational & Environmental Medicine**, v. 22, n. 3, p. 121–127, 2018.

UYSAL, T. *et al.* Microleakage under metallic and ceramic brackets bonded with orthodontic self-etching primer systems. **Angle Orthodontist**, v. 78, n. 6, p. 1089–1094, 2008.

VALÉRIO, R. A. *et al.* Influence of the Nd : YAG Laser Pulse Duration on the Temperature of Primary Enamel. **The Scientific World Journal**, v. 396962, p. 1–6, 2015.

VAN DER VEEN, M. H. *et al.* Caries outcomes after orthodontic treatment with fixed appliances: Do lingual brackets make a difference? **European Journal of Oral Sciences**, v. 118, n. 3, p. 298–303, 2010.

VELUSAMY, P. *et al.* Optical evaluation of enamel white spot lesions around orthodontic brackets using swept-source optical coherence tomography (SS-OCT): An in vitro study. **Dental Materials Journal**, p. 1–6, 2018.

VIEIRA, K. A. *et al.* In vitro evaluation of enamel demineralization after several overlapping CO2 laser applications. **Lasers in Medical Science**, v. 30, n. 2, p. 901–907, 2015.

WARD, P. Bonding techniques in lingual orthodontics. **Journal of Orthodontics**, v. 40, n. sup1, p. s20–s26, 2013.

WEN, X. *et al.* Effects of Pulsed Nd:YAG Laser on Tensile Bond Strength and Caries Resistance of Human Enamel. **Operative Dentistry**, v. 39, n. 3, p. 273–282, 2014.

WIECHMANN, D. *et al.* Customized brackets and archwires for lingual orthodontic treatment. **American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics**, v. 124, n. 5, p. 593–599, 2003.

WIECHMANN, D. *et al.* Lingual appliances reduce the incidence of white spot lesions during orthodontic multibracket treatment. **American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics**, v. 148, n. 3, p. 414–422, 2015.

YAGCI, A. *et al.* Microleakage under orthodontic brackets bonded with the custom base indirect bonding technique. **European Journal of Orthodontics**, v. 32, n. 3, p. 259–263, 2010.

YAMADA, M. K. *et al.* Three-dimensional topographic scanning electron microscope and Raman spectroscopic analyses of the irradiation effect on teeth by Nd:YAG, Er:YAG, and CO2 lasers. **Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials**, v. 71, n. 1, p. 7–15, 2004.

ZAIN, E.; ZAKIAN, C. M.; CHEW, H. P. Influence of the loci of non-cavitated fissure caries on its detection with optical coherence tomography. **Journal of Dentistry**, v. 71, p. 31–37, 2018.

ZAMATARO, C. B. **Efeito da irradiação laser associada à aplicação tópica de fluoreto sobre o esmalte submetido à erosão e/ ou abrasão.** [s.l.] Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares- IPEN-USP, 2013.

ZARIF NAJAFI, H. *et al.* The Effect of Four Surface Treatment Methods on the Shear Bond Strength of Metallic Brackets to the Fluorosed Enamel. **J Dent (Shiraz)**, v. 16, n. 3 Suppl, p. 251–9, 2015.

ZERO, D.; FONTANA, M.; LENNON, A. M. Clinical applications and outcomes of using indicators of risk in caries management. **Journal of Dental Education**, v. 65, n. 10, p. 1126–1132, 2001.

ZEZELL, D. M. *et al.* Nd:YAG laser in caries prevention: A clinical trial. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 41, n. 1, p. 31–35, 2009.

Zezell DM, Ana PA, Benetti C, Goulart VP, Bachmann L, Tabchoury CPM, et al. Compositional and crystallographic changes on enamel when irradiated by Nd:YAG or Er,Cr:YSGG lasers and its resistance to demineralization when associated with fluoride. v.7549, p.75490G, 2010.

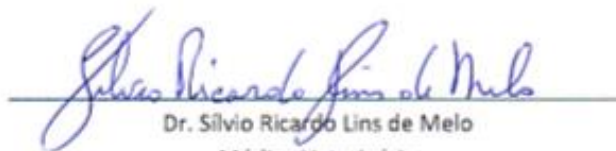
ZIEBURA, T. *et al.* Accidental debondings: Buccal vs fully individualized lingual multibracket appliances. **American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics**, v. 145, n. 5, p. 649–654, 2014.

ZIMMER, B. W.; ROTTWINKEL, Y. Assessing patient-specific decalcification risk in fixed orthodontic treatment and its impact on prophylactic procedures. **American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics**, v. 126, n. 3, p. 318–324, 2004.

ANEXO A- DECLARAÇÃO DO MATADOURO DE DOAÇÃO DOS DENTES**DECLARAÇÃO**

Declaro para os devidos fins, que serão doados 450 dentes bovinos do Matadouro de Paulista Frigorífico Bandeira – PE, sob o CNPJ n. 040.068.203/0001-70, sob a supervisão do médico veterinário Dr. Sílvio Ricardo Lins de Melo CRMV-PE n. 1180. Os dentes serão doados e utilizados para a finalidade de pesquisa científica a ser realizada na Universidade Federal de Pernambuco sob a responsabilidade da cirurgiã-dentista Mônica Schäffer Lopes.

Paulista, 20 de Novembro de 2016.



Dr. Sílvio Ricardo Lins de Melo

Médico Veterinário

CRMV-PE n. 1180

Sílvio Ricardo Lins de Melo
Médico Veterinário
Nº de Controle Adm. CrS/E 001
CRMV/PE 1180

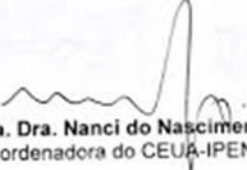
ANEXO B- APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Comitê de Ética no Uso de Animais

Parecer - Projeto N° 107/12 - CEUA-IPEN/SP

Com base nos pareceres apresentados pelos relatores, o protocolo de pesquisa **"AVALIAÇÃO DOS EFEITOS ESTRUTURAIS E QUÍMICOS DA IRRADIAÇÃO COM LASER DE Nd:YAG QUANDO UTILIZADO PARA PREVENÇÃO DA CÁRIE"** de responsabilidade da pesquisadora **DENISE MARIA ZECELL** utilizará dentes bovinos coletados em frigorífico credenciado e portanto está **ISENTO** da avaliação pela CEUA.

São Paulo, 11 de outubro de 2012.


Prof. Dra. Nanci do Nascimento
Coordenadora do CEUA-IPEN

IPEN-CNEN/SP
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ANIMAL
Av Prof Lineu Prestes, 2242 - Cidade Universitária - CEP 05508-000 - São Paulo - SP
Telefone: (011) 3133-9698 - Fax (011) 3133-9709
E-mail: nnascimento@ipen.br