

EFEITOS ESTRUTURAIS PROMOVIDOS POR LASER DE Nd:YAG E FLUORETO PARA PREVENÇÃO DA CÁRIE RADICULAR

P.A. Ana*, A.M.M. Brito* e E.C.C.C. Lins*

*Universidade Federal do ABC, São Bernardo do Campo, Brasil

e-mail: patricia.ana@ufabc.edu.br

Resumo: Tendo em vista o aumento da incidência de lesões de cárie radiculares, este estudo *in vitro* cego avaliou os efeitos do laser de Nd:YAG, em associação ou não ao fluoreto, quando empregado para prevenção da progressão de lesões de cárie radicular. 60 blocos de dentina radicular bovina foram desmineralizados por 32h, visando-se simular lesões incipientes de cárie. Após, os blocos foram distribuídos em seis grupos experimentais: G1- não tratado e não submetido à ciclagem de pH; G2- não tratado mas submetido à ciclagem de pH; G3- aplicação de flúor fosfato acidulado (FFA, 1,23% F⁻ por 4 minutos); G4- irradiação com laser de Nd:YAG (84,9 J/cm², 60 mJ/pulso); G5- tratado com Nd:YAG + FFA; G6- tratado com FFA + Nd:YAG. A progressão das lesões de cárie foi simulada por meio de ciclagem de pH por 4 dias. As mudanças composicionais, de fluorescência e de dureza foram avaliadas, respectivamente, por espectroscopia de absorção no infravermelho por transformada de Fourier, sistema de imagens por fluorescência e microdureza seccional. A desmineralização promoveu redução de carbonato e fosfato da dentina, com exposição do conteúdo orgânico. A irradiação laser promoveu alterações químicas, de fluorescência e de microdureza, principalmente quando associado à aplicação de FFA. Conclui-se que a irradiação laser promove alterações químicas na dentina desmineralizada, principalmente se efetuada antes da aplicação de FFA. Assim, a associação de tratamentos parece ser a alternativa mais promissora para prevenir a progressão da cárie radicular.

Palavras-chave: Nd:YAG, dentina, cárie, espectroscopia.

Abstract: Considering the increasing incidence of root caries lesions, this blind *in vitro* study evaluated the effects of Nd:YAG laser when applied for prevention of progression of root caries, when associated or not with topical application of acidulated phosphate fluoride (APF). Sixty bovine dentin slabs were prepared and demineralized by 32h in order to create early caries lesions. After that, the slabs were distributed into six experimental groups: G1- untreated and not submitted to a pH-cycling model; G2- untreated and submitted to a pH-cycling model; G3- acidulated phosphate fluoride application (APF, 1.23% F⁻ for 4 minutes); G4- Nd:YAG irradiation (84.9 J/cm², 60 mJ/pulse); G5-

treated with Nd:YAG + APF; G6- treated with APF + Nd:YAG. The progression of caries lesions was simulated by a 4-day pH-cycling model. Changes in composition, fluorescence and hardness were determined by Fourier transformed infrared spectroscopy, fluorescence imaging system and microhardness analysis, respectively. Demineralization promoted reduction in carbonate and phosphate contents, exposing the organic matter. Nd:YAG laser irradiation promoted chemical, fluorescence and microhardness changes, mainly when associated with APF application. In conclusion, the Nd:YAG laser promotes compositional changes on demineralized dentin, mainly when performed before APF application. In this way, the association of treatments seems to be the most promissory alternative for preventing root dentin caries progression.

Keywords: Nd:YAG, dentin, caries, spectroscopy.

Introdução

O envelhecimento da população, decorrente da maior expectativa de vida, tem propiciado um aumento na incidência de lesões de cárie radicular, as quais decorrem de uma maior permanência dos dentes na cavidade oral, com conseqüente retração gengival e exposição radicular. O tecido dentinário radicular, quando exposto, é altamente susceptível à desmineralização, requerendo uma pequena queda no pH oral para que este fenômeno se inicie e progrida rapidamente [1].

Embora a aplicação de agentes tópicos à base de fluoreto seja uma medida eficiente para prevenção do surgimento das lesões, tal medida requer repetições constantes tendo em vista a solubilidade do produto tópico formado na saliva, o que pode ser uma dificuldade para pacientes idosos ou com dificuldades de locomoção. Assim, faz-se necessária a adoção de medidas que atuem no substrato exposto, tornando-o mais resistente ao desafio cariogênico.

A irradiação de tecidos duros com lasers de alta intensidade tem sido considerada como uma terapêutica promissora, considerando que a irradiação laser pode promover alterações químicas e cristalográficas nos tecidos duros, tornando-os mais resistentes à desmineralização [2]. O laser de Nd:YAG, de comprimento de onda de 1064 nm, tem sido aplicado

com sucesso para prevenção de lesões incipientes de esmalte [3]. Contudo, não há na literatura trabalhos que relatem seus efeitos sobre dentina radicular já desmineralizada, visando-se a prevenção ou paralisação da lesão de cárie já formada. Desta maneira, este estudo objetivou avaliar as modificações composicionais, de fluorescência e de microdureza promovidas pelo laser de Nd:YAG, em associação ou não à aplicação tópica de flúor, na prevenção da progressão de cárie radicular.

Materiais e métodos

Preparo das amostras– Após aprovação do projeto pela Comissão de Ética em Uso Animal da UFABC (protocolo 006/2013), foram obtidos 60 blocos planificados e polidos de dentina radicular bovina. Após preparo, as faces laterais e posteriores dos mesmos foram recobertas com duas camadas de verniz ácido-resistente, deixando uma área exposta de 8 mm². As amostras foram desmineralizadas por 32h, em estufa a 37° C, em solução desmineralizante [4] (2 mL de solução/mm²). Após, as amostras foram lavadas com água deionizada e mantidas sob refrigeração.

Tratamentos– As amostras foram aleatoriamente distribuídas em 6 grupos de tratamento (n = 10): G1- não tratado e não submetido à ciclagem de pH (grupo cárie incipiente); G2- não tratado mas submetido à ciclagem de pH (grupo controle negativo); G3- aplicação de flúor fosfato acidulado (FFA – grupo controle positivo); G4- irradiação com laser de Nd:YAG; G5- irradiado com laser de Nd:YAG e posterior aplicação de FFA; G6- tratado com FFA e posterior irradiação com laser de Nd:YAG. Nos grupos 3, 5 e 6, empregou-se gel de FFA (Flúor Gel, Dentsply, Brasil, 1,23% de flúor, pH 3,6 – 3,9) por 4 min, lavando-a posteriormente com água destilada por 30 s. Nos grupos 4, 5 e 6, as amostras foram irradiadas com *laser* de Nd:YAG (Pulse Master 1000, ADT, USA), com as seguintes características: $\lambda = 1,064 \mu\text{m}$, diâmetro de feixe = 300 μm , potência média = 0,6 W, energia por pulso = 60mJ, taxa de repetição = 10Hz e densidade de energia = 84,9 J/cm², com varredura manual. Antes das irradiações, foi aplicada uma película de fotoabsorvedor (pasta de pó de carvão, diluído em água e etanol 50%).

Progressão da cárie– Após os tratamentos, as amostras foram submetidas a um modelo de ciclagem de pH *in vitro* com duração de 4 dias [4], no qual as amostras foram submersas em solução desmineralizante (6,25 mL/mm²) por 4h, intercaladas pela imersão em solução remineralizante (3,12 mL/mm²) por 20 h.

Análise composicional– As amostras foram avaliadas composicionalmente por meio de espectroscopia de absorção no infravermelho por transformada de Fourier, empregando-se a técnica de micro-reflexão atenuada ($\mu\text{ATR-FTIR}$), em três momentos: após preparo, após a desmineralização inicial e após os tratamentos. A aquisição dos dados foi realizada com 80 *scans* por amostra, resolução de 4cm⁻¹, e *range* de 600 a 4000cm⁻¹. O software OriginPro 8.0 foi empregado para normalização e integração das áreas

sob as seguintes bandas de absorção: entre 800cm⁻¹ e 887cm⁻¹ para ν_2 carbonato, 887cm⁻¹ e 1181cm⁻¹ para ν_3 fosfato; 1181cm⁻¹ e 1296cm⁻¹ para amida III; 1300cm⁻¹ e 1510 cm⁻¹ igualmente para carbonato (ν_3 e ν_4); 1510 cm⁻¹ e 1580cm⁻¹ para amida II e 1593cm⁻¹ e 1720cm⁻¹ para amida I. A normalização foi efetuada dividindo-se a áreas destas bandas pela banda de fosfato.

Análise da fluorescência– As mudanças na fluorescência das amostras foram determinadas em três momentos: após a desmineralização inicial, após os tratamentos e após a ciclagem de pH. Para tal, empregou-se um sistema de imagens de fluorescência (SIF), baseado em uma roda mecânica com filtros ópticos banda-larga (λ de corte = 450nm), uma câmera CCD científica, uma lente objetiva e um sistema de iluminação composto por LEDs ($\lambda = 405 \pm 30 \text{ nm}$) controlados por computador. Em todas as medidas, uma amostra sadia foi mantida como amostra de referência, sendo posicionada lateralmente, em posição padronizada, à amostra submetida aos tratamentos. A análise da intensidade de fluorescência de cada amostra foi obtido empregando-se o componente G do sistema RGB, empregando-se rotina em MatLab. O valor da intensidade de fluorescência de cada amostra foi calculado empregando-se um índice, obtido pela razão entre o valor da amostra teste e da referência.

Análise de microdureza– Após a ciclagem de pH, foi realizado o teste de microdureza seccional. Para tal, as amostras foram seccionadas longitudinalmente, embutidas e polidas, de forma que a face seccionada ficasse exposta. No meio de cada amostra, foram realizadas três seqüências de 19 indentações, com carga estática de 10 gramas durante 5 segundos, partindo-se de 10 μm da borda da lesão até 300 μm de profundidade. Os valores médios de todos os pontos medidos a cada distância foram expressos em número de microdureza Knoop (kg/mm²), sendo a área de perda de microdureza ($\Delta S - \text{kg/mm}^2/\mu\text{m}$) calculada pela integração entre a diferença da área sob a curva da amostra sadia menos a área da amostra desmineralizada.

Análise estatística– A análise estatística foi realizada individualmente para cada variável resposta, considerando-se os blocos como unidade experimental e os tratamentos como fatores de variação. O teste estatístico foi selecionado de acordo com a homogeneidade e normalidade dos dados, sendo considerado o nível de significância de 5%.

Resultados

A Figura 1 ilustra os espectros obtidos por FTIR de amostras sadias em comparação com amostras submetidas à desmineralização inicial, em que se evidencia que, após o desenvolvimento da cárie incipiente, houve a manutenção das bandas de absorção. Porém, observa-se diminuição da intensidade das bandas de fosfato e carbonato, sendo mantidas as intensidades das bandas de material orgânico.

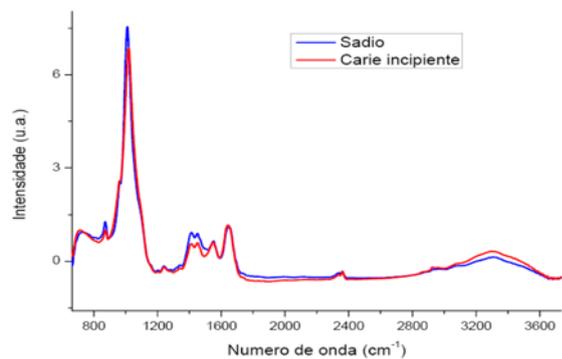


Figura 1: Espectros médios de μ ATR/FTIR de dentina radicular bovina sadia e submetida ao processo de desmineralização inicial.

Após os tratamentos, observou-se mudanças significativas na intensidade relativa das bandas de absorção, as quais podem ser evidenciadas na Tabela 1.

Tabela 1: Média \pm desvio padrão (em unidades arbitrárias) das áreas sob as bandas de absorção no infravermelho, normalizadas pela banda de fosfato, dos diferentes grupos experimentais.

Grupos	Carbonato	Amida 1	Amida 2	Amida 3
Sadio	0,013 $\pm 0,001^a$	0,105 $\pm 0,008^a$	0,017 $\pm 0,003^a$	0,007 $\pm 0,001^a$
Cárie incipiente	0,010 $\pm 0,001^{bc}$	0,128 $\pm 0,018^b$	0,023 $\pm 0,006^b$	0,011 $\pm 0,001^{bc}$
FFA	0,004 $\pm 0,002^b$	0,283 $\pm 0,166^c$	0,067 $\pm 0,045^c$	0,023 $\pm 0,001^{bc}$
Laser	0,010 $\pm 0,001^c$	0,128 $\pm 0,017^b$	0,025 $\pm 0,007^b$	0,010 $\pm 0,003^b$
Laser+	0,007 $\pm 0,004^{bc}$	0,247 $\pm 0,137^c$	0,049 $\pm 0,029^c$	0,023 $\pm 0,017^c$
FFA+	0,005 $\pm 0,001^{bc}$	0,219 $\pm 0,137^c$	0,037 $\pm 0,016^{bc}$	0,012 $\pm 0,010^{bc}$
Laser				

*Letras iguais indicam médias estatisticamente semelhantes de acordo com o teste de Student-Newman-Keuls; comparação entre as colunas.

Nota-se que a aplicação tópica de FFA, isoladamente ou em associação à irradiação laser, proporcionou aumento significativo na proporção material orgânico/fosfato, representado pelo conteúdo de amidas 1, 2 e 3, em comparação com o grupo cárie incipiente. A irradiação laser, isoladamente, não promoveu alterações significativas na dentina desmineralizada.

As análises de fluorescência evidenciaram que o processo de desmineralização inicial promoveu perda significativa da intensidade de fluorescência emitida em relação às amostras sadias (Tabela 2). A aplicação de FFA promoveu decréscimo ainda maior da fluorescência; contudo, a irradiação laser, em associação ou não ao FFA, não promoveu alterações adicionais na fluorescência das amostras desmineralizadas imediatamente após os tratamentos.

Tabela 2: Média dos índices de fluorescência (unidades arbitrárias) obtidos para todos os grupos experimentais do presente estudo, nos diferentes tempos de análise.

	Sadio	Cárie incipiente	FFA	Laser	Laser + FFA	FFA + Laser
Após tratamentos	0,98 $\pm 0,0^a$	0,76 $\pm 0,1^b$	0,54 $\pm 0,2^c$	0,76 $\pm 0,3^b$	0,80 $\pm 0,2^b$	0,90 $\pm 0,3^{a,b}$
Após ciclagem de pH	0,98 $\pm 0,0^d$	0,49 $\pm 0,2^e$	0,54 $\pm 0,2^c$	0,61 $\pm 0,2^{e,f}$	0,81 $\pm 0,2^{d,f}$	0,76 $\pm 0,2^f$

*Letras iguais indicam médias estatisticamente semelhantes de acordo com o teste de Student-Newman-Keuls.

Após a ciclagem de pH, contudo, observou-se que tanto a aplicação tópica de FFA quanto a irradiação laser não promoveram mudanças significativas na intensidade de fluorescência das amostras em relação ao grupo cárie incipiente (Tabela 2); contudo, o grupo Laser + FFA promoveu um aumento significativo na fluorescência, cujos valores foram similares ao das amostras sadias, isto é, que não foram submetidas à desmineralização.

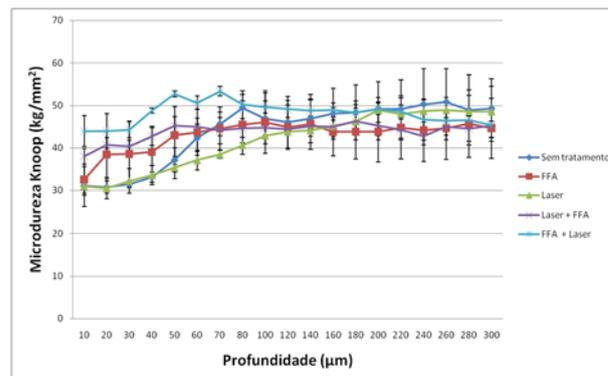


Figura 2: Média dos valores de microdureza Knoop (kg/mm^2) obtidos nos diferentes grupos experimentais, de acordo com a distância de superfície, após ciclagem de pH. As barras indicam erro padrão.

Ainda após a ciclagem de pH, observou-se que a aplicação de FFA promoveu redução na perda de microdureza, em até 60 μm de profundidade, em comparação com o grupo sem tratamento (Figura 2). Embora a irradiação laser isoladamente não tenha apresentado efeitos significativos, a associação de tratamentos possibilitou redução significativa nos valores de microdureza, nos primeiros micrometros, em relação ao grupo FFA.

Pela Tabela 3, evidencia-se que o grupo Laser+FFA foi o único que possibilitou significativa redução na perda de microdureza em comparação com o grupo FFA; a irradiação laser, isoladamente, não reduziu estes valores quando comparada ao grupo sem tratamento.

Tabela 3: Média \pm desvio padrão da área de perda de microdureza seccional ($\Delta S = \text{kg/mm}^2 \times \mu\text{m}$) para os diferentes grupos experimentais.

Sem tratamento	FFA	Laser	Laser + FFA	FFA + Laser
1283,82 $\pm 36,18^a$	346,39 $\pm 40,03^b$	1143,24 $\pm 702,41^{a,b}$	166,56 $\pm 87,23^c$	250,67 $\pm 106,86^{b,c}$

*Letras iguais indicam médias estatisticamente semelhantes de acordo com o teste de Student-Newman-Keuls.

Discussão

Embora o uso da irradiação laser de alta intensidade seja amplamente relatada para prevenção da cárie em esmalte, são escassos os estudos realizados com dentina radicular desmineralizada. Neste trabalho, foi observado que o laser de Nd:YAG isoladamente não promove alterações na estrutura da dentina desmineralizada, o que contradiz os achados da literatura, que reportam aumento da cristalinidade e redução do conteúdo de carbonato e material orgânico após irradiação em esmalte [2]. Contudo, ressalta-se que a dentina irradiada neste trabalho é pobre em conteúdo mineral e carbonato conforme reportado pela análise de FTIR; desta maneira, os efeitos do calor gerado pela irradiação podem ter sido pouco expressivos para alterar esta estrutura.

As análises por FTIR evidenciaram que a aplicação FFA aumentou a proporção de material orgânico em relação ao fosfato, o que pode ser explicado pela permanência de constituintes do gel na superfície da dentina, os quais apresentam bandas de absorção coincidentes com a do material orgânico deste tecido. A presença deste gel, assim como dos produtos formados após aplicação tópica (sob a forma de fluoreto de cálcio), são os responsáveis pelo efeito cariostático deste tratamento [1], confirmado nas análises posteriores.

A análise por SIF evidencia uma diminuição da fluorescência nas amostras cariadas, o que corrobora os estudos da literatura, realizados em esmalte, que reportam que lesões cariosas iniciais apresentam menor intensidade de fluorescência que o tecido sadio nesse comprimento de onda de excitação [5]. Assim, sugere-se que a perda de material inorgânico contribui para esse decréscimo e que a técnica detecte a progressão da cárie.

As análises de fluorescência e de microdureza seccional evidenciam que a associação de tratamentos é a forma mais indicada de se prevenir a progressão das lesões cariosas, considerando-se o aumento da fluorescência e a diminuição da perda de microdureza, respectivamente, após ciclagem de pH. Este achado sugere que a irradiação laser atue sinergicamente com o FFA, confirmando achados da literatura [6], os quais evidenciam que a irradiação laser aumenta a área de reação para que o FFA atue, potencializando a formação de fluoreto de cálcio, grande responsável pelo efeito cariostático do FFA. Assim, sugere-se que o tratamento seja mantido por mais tempo, atendendo à proposta do presente estudo.

Conclusão

Conclui-se que a irradiação da dentina radicular com laser de Nd:YAG previamente à aplicação de FFA apresenta-se como a forma mais eficiente de prevenção da progressão de lesões de cárie radicular em comparação com os efeitos isolados destes tratamentos.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao LELO-FOUSP e ao IPEN-CNEN/SP pelo empréstimo de equipamentos e à UFABC pela bolsa de mestrado concedida.

Referências

- [1] Cury JA. Uso do flúor e controle da cárie como doença. Em: L.N. Baratieri, editor. Odontologia Restauradora – Fundamentos e Possibilidades. São Paulo: Editora Santos; 2001, p. 33 - 68.
- [2] Zzell DM, Ana PA, Benetti C, Goulart VP, Bachmann L, Tabchoury CPM, Cury JA. 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. In: Proceedings of SPIE; 2010 Jan 17-21; San Francisco, USA. 2010. p. 75490G-1 - 75490G-12.
- [3] Zzell DM, Boari HG, Ana PA, Eduardo CP, Powell GL. Nd:YAG laser in caries prevention: a clinical trial. *Lasers in Surgery and Medicine*. 2009;41(1):31-5.
- [4] Queiroz C.S. Modelos de estudos in vitro para avaliar o efeito do fluoreto na desmineralização e remineralização do esmalte e dentina. [Tese] Campinas: Universidade Estadual de Campinas; 2004.
- [5] Angmar-Mansson B, Ten Bosh JJ. Quantitative light induced fluorescence (QLF): a method for assessment of incipient caries lesions. *Dentomaxillofacial Radiology*. 2001; 30(6): 298-307.
- [6] Ana PA, Tabchoury CP, Cury JA, Zzell DM. Effect of Er,Cr:YSGG laser and professional fluoride application on enamel demineralization and on fluoride retention. *Caries Research*. 2012; 46(5):441-51.