

Estudo morfológico através de microscopia eletrônica de varredura do esmalte dental humano irradiado com laser de Nd:YAG utilizando o verniz fluoretado e o carvão vegetal como fotoabsorvedores*

SEM morphological study of human tooth enamel irradiated by Nd:YAG laser using fluoride varnish and powdered charcoal as photo-absorbers

Luiz Felipe Scabar**
Paschoal Laércio Armonia ***
Cintia Helena Coury Saraceni ****
Nicolau Tortamano *****

Resumo

Introdução – O objetivo deste trabalho de pesquisa laboratorial foi analisar morfológicamente, através da microscopia eletrônica de varredura, os efeitos do laser de Nd:YAG sobre o esmalte dental humano, utilizando-se dois tipos de fotoabsorvedores, o verniz fluoretado e o carvão vegetal. **Métodos** – Avaliou-se a alteração morfológica estrutural do esmalte irradiado com laser de Nd:YAG empregando os fotoabsorvedores carvão vegetal e verniz fluoretado. Os parâmetros durante a irradiação do laser de Nd:YAG foram: energia de 80 mJ, frequência de 10 Hz, potência de 0,8 W e fibra com diâmetro de 300 µm, modo contato, para todos os grupos (densidade de energia 113,2 J/cm²) empregando o laser de Nd:YAG – Pulse Master 1000 (American Dental Technology – ADT, USA) do Centro de Odontologia Laser da Universidade Paulista – UNIP. Os grupos experimentais foram constituídos individualmente por quatro amostras. A seqüência experimental foi a seguinte: Grupo A – Não recebeu irradiação (controle); Grupo B - irradiações na ausência do fotoabsorvedor; Grupo C – irradiações na presença do fotoabsorvedor carvão vegetal; Grupo D – irradiações na presença do fotoabsorvedor verniz fluoretado. Após as irradiações as amostras foram preparadas para análise em microscopia eletrônica de varredura, marca Philips modelo XL 30 EDAX do IPEN. **Resultados e Conclusões** – As micrografias evidenciaram que ocorreram alterações morfológicas do esmalte caracterizadas por áreas de fusão e ressolidificação, quando o mesmo foi irradiado com laser de Nd:YAG, utilizando-se o verniz fluoretado e o carvão vegetal como fotoabsorvedores. Essas alterações, com a aplicação do carvão vegetal como fotoabsorvedor, foram aparentemente mais significativas e uniformes.

Palavras-chave: Flúor – Lasers – Esmalte dentário – Cárie dentária, prevenção e controle

Abstract

Introduction – This in vitro study aimed to perform a morphological analysis, by means electron scanning microscopy, on the effects of Nd:YAG laser irradiation on human tooth enamel protected by two photo-absorbers: fluoride varnish and powdered charcoal. **Methods** – The structural changes after laser irradiation of enamel covered with the photo-absorbers were assessed. The Nd:YAG laser parameters for irradiation were: energy level at 80 mJ, frequency at 10 Hz, 0.8 mW power and fiber diameter of 300 micrometers, contact mode, for all experimental groups (energy density of 113.2 J/cm²); the laser device was a Nd:YAG, Pulse Master 1000 (American Dental Technology, ADT, USA) from the Centro de Odontologia Laser da Universidade Paulista, UNIP. Experimental groups had four specimens each, and experimental sequence was: Group A – No irradiation (control group). Group B – Irradiated without photo-absorbers. Group C – Irradiated in association with powdered charcoal. Group D – irradiated in association with fluoride varnish. After irradiation, the specimens were processed in order to undergo microscopic analysis with a scanning electron microscope Philips XL 30 EDAX, from IPEN. **Results and Conclusions** – Micrographs showed morphological changes on enamel, which were characterized by areas of melting and re-solidification when under irradiation with the Nd:YAG laser and fluoride varnish and powdered charcoal as photo-absorbers. Apparently, these changes showed to be more uniform and significant with the charcoal.

Key words: Fluorine – Lasers – Dental enamel – Dental caries, prevention and control

* Resumo da Dissertação de Mestrado apresentada na Universidade Paulista (UNIP).

** Professor Assistente de Odontologia em Saúde Coletiva da UNIP. E-mail: luizfelipescabar@yahoo.com.br.

*** Coordenador do Programa de Pós Graduação, nível de Mestrado em Odontologia da UNIP.

**** Professora Titular de Dentística Operatória e Restauradora da UNIP.

***** Professor Titular de Clínica Integrada e Diagnóstico Bucal da UNIP.

Introdução

O laser aumenta a resistência do esmalte dental e diminui a solubilidade frente à desmineralização¹⁶, e a resistência observada do esmalte irradiado à desmineralização subsuperficial é devida mais a alterações físicas na permeabilidade do esmalte do que a alterações químicas¹⁷.

O laser de Nd:YAG com diferentes parâmetros tem sido muito utilizado para essa finalidade, pois aumenta a resistência do esmalte à desmineralização com menor risco de danos aos tecidos adjacentes, além de apresentar grande facilidade em sua utilização. Devido ao fato de não ser bem absorvida pela água, a irradiação do laser de Nd:YAG não age na superfície de tecidos biológicos, sendo portanto mais utilizada para a homeostasia e a coagulação de vasos profundos. No entanto, esse laser é bem absorvido pela melanina e pela hemoglobina, que são substâncias escuras. Em tecidos duros, como o esmalte dental, pode ser usado na prevenção de cáries, principalmente quando associado a pigmentos fotoabsorvedores e ao flúor^{1,2,3,8,10,12,18,20}.

A deposição de pigmentos fotoabsorvedores sobre o esmalte dental, precedendo a aplicação do laser, aumenta consideravelmente a absorção da energia pelo esmalte. Essa técnica concentra o depósito de energia evitando que a irradiação penetre excessivamente para o interior da estrutura dental⁵.

Utilizado como fotoabsorvedor, o carvão vegetal dissolvido em água e etanol assegura a fusão e a ressolidificação do esmalte irradiado^{2,4}, modificações estruturais essas que resultam no aumento da resistência do esmalte à ação de substâncias ácidas descalcificantes². As modificações ocorridas no esmalte dental após irradiação com laser, em geral, proporcionam uma penetração do flúor maior e mais profunda, o que torna o esmalte mais resistente à desmineralização¹.

Entre as muitas formas de se utilizar o flúor, a aplicação do verniz fluoretado têm-se mostrado um dos mais promissores métodos de prevenção da cárie dentária, não só por sua grande eficiência, mas também pela segurança, facilidade e rapidez de aplicação^{4,15}. Os vernizes possibilitam a adição de elevadas concentrações de fluoreto em uma limitada quantidade de material^{13,19}.

Considerando-se essas possibilidades o objetivo deste trabalho foi analisar morfológicamente, através de microscopia eletrônica de varredura, os efeitos do laser de Nd:YAG sobre o esmalte dental, utilizando-se o verniz fluoretado e o carvão vegetal como fotoabsorvedores.

Métodos

Foram utilizados oito terceiros molares humanos erupcionados e com superfícies proximais íntegras, recém-extraídos por indicação ortodôntica, obtidos no Banco de Dentes da Universidade Paulista – UNIP. Realizou-se a limpeza dos elementos dentais com o auxílio de escova de Robinson e taça de borracha embebidos

com pedra pomes e água, previamente à estocagem. Os dentes foram armazenados em soro fisiológico (trocado a cada 24 horas) à temperatura ambiente.

Os dentes foram seccionados com discos de diamante no seu longo eixo no sentido vestibulo-lingual, ou seja, foram separadas as faces proximais. Foi delimitada uma área de 4 x 4 mm em esmalte na superfície proximal com uma ponta esférica 1011 (em alta rotação com refrigeração), área essa preparada para receber a irradiação.

Na seqüência foi realizada a limpeza das faces dos elementos dentais com o auxílio de escova de Robinson e taça de borracha embebidos com pedra pomes e água.

O laser utilizado foi o de Nd:YAG pulsado (Pulse Master 1000 – American Dental Technology – ADT, USA) do Centro de Odontologia Laser da Universidade Paulista – UNIP. Os parâmetros utilizados durante a irradiação do laser de Nd:YAG foram: energia de 80 mJ, frequência de 10 Hz, potência de 0,8 W e fibra com diâmetro de 300 µm, modo contato, para todos os grupos (densidade de energia 113,2 J/cm²)^{2,5}.

Os grupos experimentais foram constituídos individualmente por quatro amostras. A seqüência experimental foi a seguinte:

Grupo A – Não recebeu irradiação (controle) (Figuras 1 e 2).

Grupo B – Recebeu três irradiações de 30 segundos na ausência do fotoabsorvedor (Figuras 3 e 4).

Grupo C – Aplicou-se o carvão vegetal (corante a base de pó de carvão, misturado com água destilada e álcool etílico em partes iguais)² e a superfície do esmalte foi irradiada por 30 segundos. Na seqüência, foi realizada nova aplicação de carvão vegetal e mais uma irradiação de 30 segundos. E uma terceira e última irradiação de 30 segundos foi executada após a aplicação do carvão vegetal (Figuras 5 e 6).

Grupo D – Aplicou-se o verniz fluoretado (fluoreto de sódio 5%) e a superfície do esmalte foi irradiada por 30 segundos. Na seqüência, foi realizada nova aplicação de verniz fluoretado e mais uma irradiação de 30 segundos. E uma terceira e última irradiação de 30 segundos foi executada após a aplicação do verniz fluoretado (Figuras 7, 8, 9 e 10).

O intervalo entre as irradiações, para todos os grupos, foi de 30 segundos, para que houvesse tempo de resfriamento do esmalte. As amostras foram irradiadas sempre em movimento de varredura com a ponta ativa do laser perpendicular à superfície do esmalte.

Após as irradiações as amostras foram acondicionadas em um pote de vidro com água destilada e submetidas à limpeza por ultra-som em 2 ciclos de 20 minutos. Na seqüência foram secas com jato de ar, através de uma seringa tríplice e acondicionadas em caixa metálica forrada com papel absorvente.

As amostras foram, então, desidratadas através de quatro banhos consecutivos, em quatro soluções de álcool absoluto diluídas com água destilada em diferentes concentrações (50%, 70%, 90% e 100%) permanecendo durante uma hora em cada diluição.

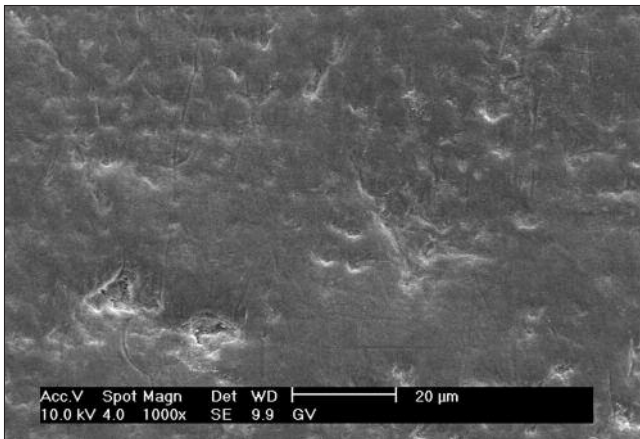


Figura 1. (1000X) Grupo A – Não recebeu irradiação (controle)

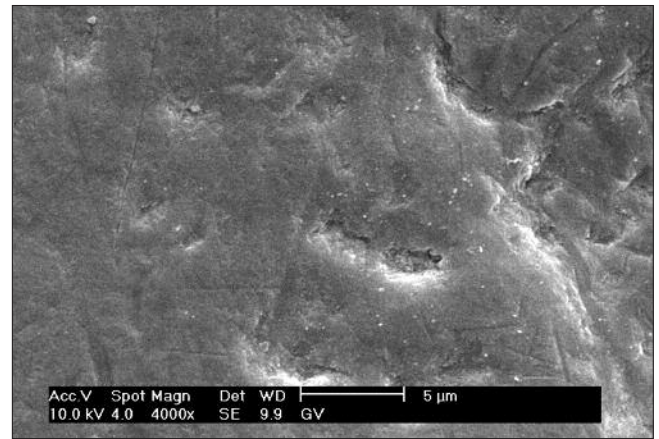


Figura 2. (4000X) Grupo A – Não recebeu irradiação (controle)



Figura 3. (1000X) Grupo B – Irradiação sem fotoabsorvedor

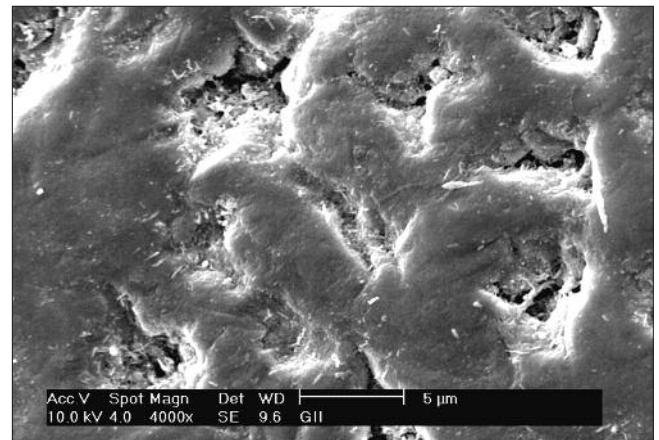


Figura 4. (4000X) Grupo B – Irradiação sem fotoabsorvedor

No Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), as amostras foram colocadas em um aparelho desumidificador contendo sílica gel. A seguir, foram metalizadas em ouro e acondicionadas no microscópio eletrônico de varredura (MEV) para análise estrutural das amostras estudadas.

Resultados e Discussão

O esmalte é um material altamente poroso, composto de minerais à base de apatita. Os elementos da apatita formam cristais de hidroxiapatita, os quais, embora unidos, apresentam espaços entre si denominados inter-cristalinos. Tais espaços são preenchidos por água e material orgânico, que permitem a difusão, entre outras substâncias, de ácidos, minerais e flúor durante os eventos de desmineralização ou de remineralização. Suas propriedades físicas e químicas se dão em função da sua composição orgânica e mineral e de seu arranjo estrutural. Os cristais se encontram arranjados em estruturas prismáticas, cuja disposição estrutural concede ao dente considerável resistência mecânica^{7,14}.

Trabalhos realizados irradiando-se laser sobre o

esmalte dental, com associação de flúor, mostram que ocorre um aumento na resistência do esmalte dental frente à desmineralização^{1,2,3,7,9,11,18,20}. O mecanismo pelo qual os lasers são capazes de aumentar a resistência do esmalte ainda não está totalmente esclarecido. Apesar de Stern *et al.*¹⁷ (1996) comentarem que a resistência do esmalte à desmineralização, quando irradiado com alguns tipos de laser, estar mais relacionada às alterações físicas da permeabilidade do esmalte do que às químicas, ainda não se sabe se o efeito protetor da irradiação com laser é realmente físico e/ou químico. Esses fatos mostram a necessidade de mais estudos que apresentem avaliações físicas e análises químicas.

A hipótese mais aceita, segundo Oho e Morioka¹² (1990), é a de que a irradiação do tecido dental com laser causa redução da água, de substâncias orgânicas e carbonato, deixando pequenos espaços dentro e entre os cristais. Íons como cálcio, fosfato e flúor, oferecidos após a irradiação, seriam incorporados e depositados nesses pequenos nichos produzidos pelo laser.

A deposição de pigmentos fotoabsorvedores sobre o esmalte dental, precedendo a aplicação de lasers

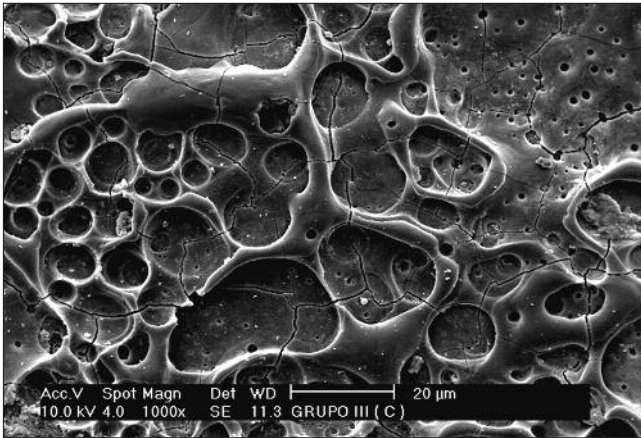


Figura 5. (1000X) Grupo C – Irradiação após a aplicação do fotoabsorvedor – carvão vegetal

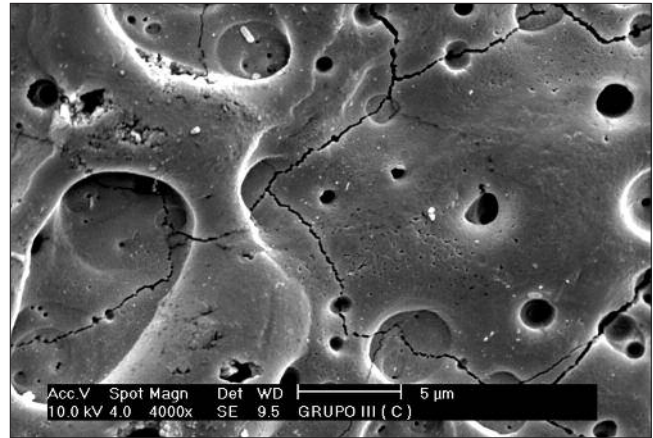


Figura 6. (4000X) Grupo C – Irradiação após a aplicação do fotoabsorvedor – carvão vegetal

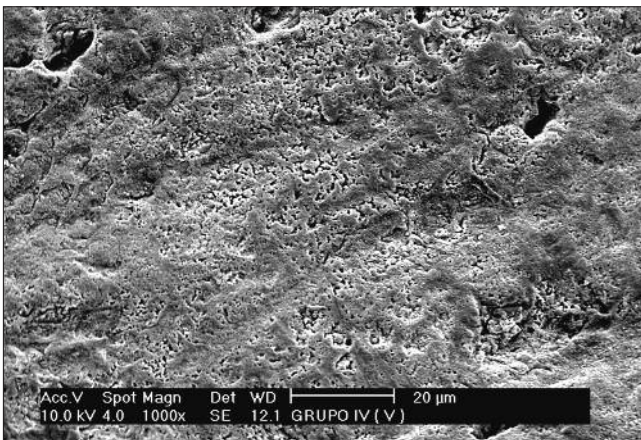


Figura 7 (1000X) Grupo D – Irradiação após a aplicação do fotoabsorvedor – verniz fluoretado

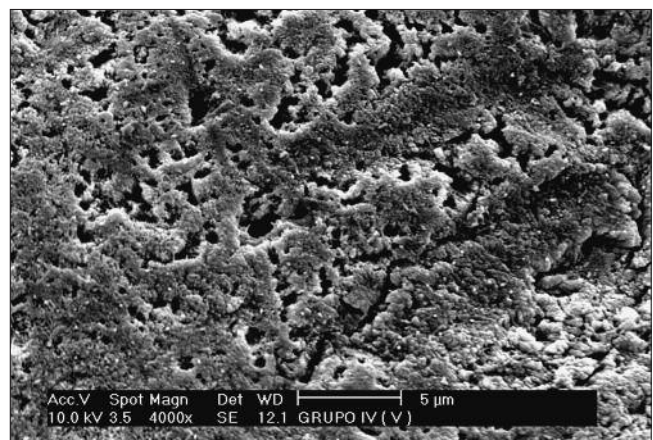


Figura 8. (4000X) Grupo D – Irradiação após a aplicação do fotoabsorvedor – verniz fluoretado

pulsados, aumenta consideravelmente a absorção local da energia liberada pelo laser⁵. Esta técnica concentra o depósito de energia evitando que a irradiação penetre excessivamente para o interior da estrutura dental. O menor aumento de temperatura nos tecidos ao redor do tecido irradiado, quando se utilizam os fotoabsorvedores, evidentemente identifica um método mais eficiente e seguro de aplicação de lasers de emissão pulsada e logicamente implicaria em menores riscos de danos à polpa^{5,8}.

Neste experimento utilizou-se o verniz fluoretado, pois dentre as muitas formas de se utilizar o flúor, a aplicação do verniz fluoretado têm-se mostrado um dos mais promissores métodos de prevenção da cárie dentária, não só por sua grande eficácia, mas também pela segurança, facilidade e rapidez de aplicação^{14,15}. Além da oferta de flúor, que é muito grande nessa substância, em 1 ml de verniz encontramos 50 mg de fluoreto de sódio (5% de fluoreto de sódio), o que corresponde a 22,6 mg de flúor ou 2,26% – 22600 ppm^{13,19}. O verniz fluoretado também foi escolhido como fotoabsorvedor por ser uma substância acastanhada, levemente escura. Nesta pesquisa, além do verniz

fluoretado, foi utilizado também o carvão vegetal como fotoabsorvedor, substância escura já utilizada por outros autores²⁴.

Boari², em 2000, através de uma pesquisa *in vitro*, utilizando o laser de Nd:YAG pulsado, concluiu que o carvão vegetal, dissolvido em água e etanol, é a melhor opção quando se utilizam pigmentos absorvedores. A autora constatou, através do microscópio eletrônico de varredura, que essa técnica assegura a fusão e a ressolidificação do esmalte irradiado, provocando modificações estruturais que resultam no aumento da resistência do esmalte à ação de substâncias ácidas descalcificantes. O carvão vegetal também mostrou ser mais facilmente removido do esmalte quando comparado à tinta nanquim, igualmente utilizada como fotoabsorvedor. Segundo a autora, a utilização dessa substância no esquema terapêutico proposto mostrou resultados superiores aos obtidos com o uso da tinta nanquim, inclusive, já utilizada por outros autores^{1,3,5,8,10}.

Deve-se esclarecer que os parâmetros desta pesquisa estão baseados em parâmetros já utilizados e aplicados por outros autores²⁴, que levaram o esmalte a

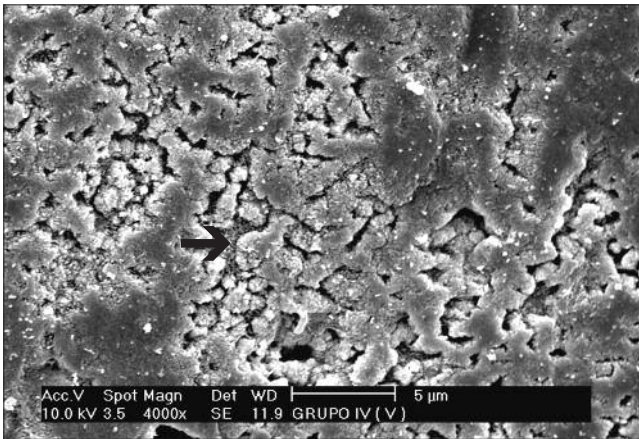


Figura 9. (4000X) Grupo D – Irradiação após a aplicação do fotoabsorvedor – verniz fluoretado (seta – exposição de prismas)

alterações morfológicas características utilizando o carvão vegetal como fotoabsorvedor e a irradiação realizada por três vezes varrendo-se toda a superfície do esmalte, com intervalos de 30 segundos entre as irradiações².

Nesta pesquisa os resultados experimentais com o carvão vegetal confirmaram alterações do esmalte encontradas por Ferreira⁴ (2000) e Boari² (2000), assim como as alterações morfológicas do esmalte encontradas por outros autores^{1,3,5,8,11}, quando aplicaram a tinta nanquim como fotoabsorvedor. As alterações morfológicas do esmalte caracterizadas por áreas de fusão e ressolidificação, quando se aplicou o carvão vegetal (Grupo C) como agente fotoabsorvedor do laser de Nd:YAG, podem ser evidenciadas através das micrografias apresentadas nas Figuras 5 e 6, e comparadas ao Grupo B (Figuras 3 e 4) irradiado com laser sem o fotoabsorvedor.

Quando se pesquisa o verniz fluoretado como fotoabsorvedor (Grupo D), constata-se que o produto também atuou, embora de forma não tão evidenciada para os parâmetro utilizados, como agente fotoabsorvedor do laser de Nd:YAG. As micrografias mostram as alterações morfológicas do esmalte caracterizadas por áreas de fusão e ressolidificação (Figuras 7 e 8). As alterações morfológicas da estrutura do esmalte com o carvão vegetal como fotoabsorvedor foram aparentemente mais significativas e uniformes (Figuras 5 e 6). Por sua vez, as alterações morfológicas do esmalte irradiado com o verniz fluoretado foram mais significativas do que quando o esmalte foi irradiado com laser sem o fotoabsorvedor Grupo B (Figuras 3 e 4).

Observa-se nas micrografias das amostras nas quais se utilizou o verniz fluoretado como fotoabsorvedor, que a irradiação com o laser provocou uma pequena exposição de prismas (Figuras 9 e 10 – setas). Apoiados em Oho e Morioka¹² (1990), pode-se inferir que essas alterações poderiam, talvez, propiciar uma melhor penetração do flúor presente no

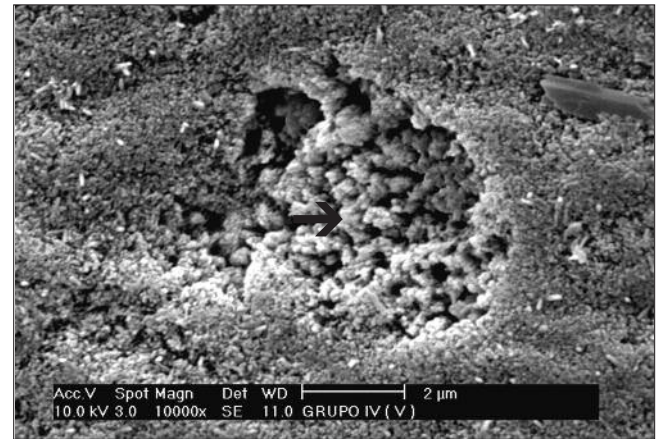


Figura 10. (10.000X) Grupo D – Irradiação após a aplicação do fotoabsorvedor – verniz fluoretado (seta – exposição de prismas)

fotoabsorvedor (verniz fluoretado), que possui uma grande e imediata oferta desse composto, tornando o esmalte mais resistente à desmineralização frente a substâncias ácidas.

Para provocar alterações morfológicas estruturais do esmalte, empregando-se o verniz fluoretado como fotoabsorvedor, similares às encontradas com o uso do carvão vegetal (densidade de energia 113,2 J/cm²), novos parâmetros deveriam ser utilizados.

No momento, acredita-se que novas pesquisas laboratoriais envolvendo aplicação de novos parâmetros, avaliação de temperatura, profundidade de penetração do flúor no esmalte e resistência do esmalte, devem ser realizadas, precedendo o uso clínico da associação laser e verniz fluoretado. Entretanto, parece lícito admitir que, provavelmente, as alterações encontradas neste estudo utilizando o verniz fluoretado poderiam, salvo melhor juízo, facilitar a difusão do flúor para o interior do esmalte durante e após a irradiação, pois as modificações estruturais identificadas em nosso estudo (Grupo D), pela microscopia eletrônica de varredura, são modificações estruturais parciais, que interferem mais efetivamente com os elementos orgânicos aprismáticos e interprismáticos, e não provocam, talvez, maiores prejuízos ao metabolismo do esmalte, essencial para a manutenção das características químicas, físicas e biológicas do esmalte dental.

Conclusões

1. Ocorreram alterações morfológicas do esmalte caracterizadas por áreas de fusão e ressolidificação quando utilizamos o verniz fluoretado e o carvão vegetal como fotoabsorvedores.

2. As alterações morfológicas do esmalte caracterizadas por áreas de fusão e ressolidificação, empregando-se o carvão vegetal como fotoabsorvedor, foram aparentemente mais significativas e uniformes.

Referências

1. Bahar A, Tagomori S. The effect of normal Pulsed Nd:YAG laser irradiation on pits and fissures in human teeth. *Caries Res* 1994; 29: 460-7.
2. Boari HGD. *Avaliação clínica da eficiência do laser de Nd:YAG associado ao flúor fosfato acidulado na prevenção de cáries de sulcos e fissuras de crianças e adolescentes*. [dissertação de mestrado] São Paulo: Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo; 2000.
3. Cecchini RCM. *Estudo in vitro do efeito do laser de Nd:YAG em esmalte dental: análise de fluorescência de raios-x e microscopia eletrônica de varredura*. [dissertação de mestrado] São Paulo: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo; 1997.
4. Ferreira MVL. *Estudo in vitro da fusão de hidroxiapatita e esmalte em superfícies de esmalte humano pelo laser de Nd:YAG*. [dissertação de mestrado] São Paulo: Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo; 2000.
5. Jennet E, Motomedi M, Rastegar R, Frederickson C, Arcoria C, Powers JM. Dye enhanced ablation of enamel by pulsed laser. *J Dent Res* 1994; 73: 1841-7.
6. Katchburian E, Arana V. *Histologia e embriologia oral*. São Paulo: Panamericana, 1999. p. 239-78.
7. Lanstein DK. *Esmalte irradiado ou não com laser de Nd:YAG. Análise microbiológica do biofilme dental, mensuração de dureza Knoop em seção transversal e observação ao microscópio de luz polarizada. Estudo in situ*. [tese de doutorado] São Paulo: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo; 2002.
8. Morioka T, Suzuki K, Tagomori S. Effects of absorption mediators and resistance of surface enamel by Nd:YAG laser irradiation. *J Dent Health* 1984; 34:1.
9. Morioka T, Tagomori S. Combined effect of Nd:YAG laser irradiation and fluoride application on the acid resistance of dental enamel. In: *3rd International Nd:YAG Laser Symposium* 1981; 487-90.
10. Myaki SI. *Efeitos da irradiação da luz de laser Nd:YAG nos sulcos e fissuras de pré-molares humanos: estudo in vitro, empregando o MEV*. [dissertação de mestrado] São Paulo: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo; 1995.
11. Nagai N, Fukuda M, Ishikawa K, Minoura S, Yamada Y, Niimi T *et al*. New method for the prevention of dental caries using Nd:YAG laser and fluoride combinations. In: *6th International Congress on Laser in Dentistry*. Aichi-Gakun Univ Nagoya Japan 1998; 70.
12. Oho T, Morioka T. A possible mechanism of acquired acid resistance of human dental enamel by laser irradiation. *Caries Res* 1990; 24: 86-92.
13. Pereira AC. *Odontologia em saúde coletiva*. São Paulo: Artmed; 2003. p. 280-1.
14. Pinto VG. *Saúde bucal coletiva*. São Paulo: Santos; 2000. p. 381.
15. São Paulo. Secretaria de Estado da Saúde. Resolução 55 nº 95 de 27 de junho de 2000. Recomendações sobre o uso de produtos fluoretados no âmbito do SUS/SP em função do risco de cárie dentária. Grupo de trabalho: Jayme Aparecido Cury, Paulo Capel Narvai, Roberto Augusto Castellanos, Tania Izabel Bighetti Forni, Simone Rennó Junqueira e Maria Candelária Soares. *Diário Oficial do Estado de São Paulo*, 28 de jun. 2000
16. Soggnares RF, Stern RH. Laser effect on resistance of human dental enamel to desmineralization *in vitro*. *J South Calif State Dent Assoc* 1965; 33: 328-9.
17. Stern H, Soggnares RH, Goodman F. Laser effect on *in vitro* enamel permeability and solubility. *J Am Dent Assoc* 1966; 73: 838-43.
18. Tagomori S, Inai Y, Numata Y, Morioka T. The effect of laser irradiation on remineralization of artificial enamel lesion. In: *Proceedings of the 3rd World Congress on Preventive Dentistry*; 1991; Furuoka, Japan. p. 132-4.
19. Tortamano N, Armonia PL. *Guia terapêutico odontológico*. São Paulo: Santos; 2001. p. 153.
20. Yamamoto H, Sato K. Prevention of dental caries by acoustic-optically Q-Switched Nd:YAG laser irradiation. *J Dent Res* 1980; 59: 137.

Recebido em 07/4/2005

Aceito em 03/6/2005

SEM morphological study of human tooth enamel irradiated by Nd:YAG laser using fluoride varnish and powdered charcoal as photo-absorbers*

Luiz Felipe Scabar**
Paschoal Laércio Armonia***
Cintia Helena Coury Saraceni****
Nicolau Tortamano*****

Abstract

Introduction – This in vitro study aimed to perform a morphological analysis, by means of electron scanning microscopy, on the effects of Nd:YAG laser irradiation on human tooth enamel protected by two photo-absorbers: fluoride varnish and powdered charcoal. **Methods** – The structural changes after laser irradiation of enamel covered with the photo-absorbers were assessed. The Nd:YAG laser parameters for irradiation were: energy level at 80 mJ, frequency at 10 Hz, 0.8 mW power and fiber diameter of 300 micrometers, contact mode, for all experimental groups (energy density of 113.2 J/cm²); the laser device was a Nd:YAG, Pulse Master 1000 (American Dental Technology, ADT, USA) from the Centro de Odontologia Laser da Universidade Paulista, UNIP. Experimental groups had four specimens each, and experimental sequence was: Group A – No irradiation (control group). Group B – Irradiated without photo-absorbers. Group C – Irradiated in association with powdered charcoal. Group D – irradiated in association with fluoride varnish. After irradiation, the specimens were processed in order to undergo microscopic analysis with a scanning electron microscope Philips XL 30 EDAX, from IPEN. **Results and Conclusions** – Micrographs showed morphological changes on enamel, which were characterized by areas of melting and re-solidification when under irradiation with the Nd:YAG laser and fluoride varnish and powdered charcoal as photo-absorbers. Apparently, these changes showed to be more uniform and significant with the charcoal.

Key words: Fluorine – Lasers – Dental enamel – Dental caries, prevention and control

Introduction

Laser improves tooth enamel resistance and decreases its solubility to demineralization¹⁶, and the resistance against demineralization observed in irradiated enamel is mainly due to physical alterations on enamel permeability, rather than chemical alterations¹⁷.

Nd:YAG laser with different parameters have been frequently used with this objective, because it improves enamel resistance against demineralization, results in little hazard to adjacent tissues, and is easy and simple to handle. Since it is not absorbed by water, Nd:YAG does not react with biological tissues, thus its the commonest usage is hemostasis and coagulation of deep blood vessels. However, this laser is well absorbed by melanin and hemoglobin, which are dark-colored pigments. In hard tissues, such as tooth enamel, Nd:YAG laser can be used as a caries-prevention tool, especially in association with photo-absorbent dyes and fluoride^{1,2,3,7,9,11,18,20}.

Coating the tooth enamel with photo-absorbent dyes before laser irradiation can considerably enhance energy absorption. This procedure allows a concentration of energy delivery, thus avoiding the excessive irradiation of deeper dental structures⁶.

As a photo-absorber, charcoal in water and ethanol solution ensures the melting and re-solidification of the irradiated enamel²⁴; such structural changes result in an improved enamel resistance to decalcifying acidic substances². Usually, tooth enamel alterations after laser irradiation allow a greater and deeper fluoride penetration, thus enhancing resistance to demineralization¹.

Among the several techniques of fluoride application, the fluoride varnish has been shown to be one of the most promising means of caries prevention, not only due to its great efficacy, but also for safety, and easy and time-saving application method^{14,15}. Varnishes also allow application of very high concentrations of fluoride in small volumes^{13,19}.

Regarding of all these possibilities, the purpose of this study was to perform a morphological analysis, by a scanning electron microscopy, on the effects of Nd:YAG laser irradiation on tooth enamel, with fluoride varnish and charcoal as photo-absorbers.

Methods

Eight erupted human third molars, with sound proximal surfaces, which were recently extracted for ortho-

* Part of Dissertation for the obtainment of Master's Degree, Course of Dentistry, Universidade Paulista (UNIP).

** Assistant Professor, Dentistry in Public Health, UNIP. E-mail: luizfelipescabar@yahoo.com.br.

*** Coordinator, Master's Course in Dentistry, UNIP.

**** Chairman, Professor, Operative and Restorative Dentistry, UNIP.

***** Chairman, Professor, Dental Clinics and Oral Diagnosis, UNIP.

dontic reasons, were obtained from the Tooth Bank of the Universidade Paulista – UNIP. Before storage, the teeth were cleaned up by Robinson bristle brusher and prophylaxis rubber cup associated to water and pumice. They were stored in saline (changed at every 24 hours) at room temperature.

All teeth were longitudinally sectioned with diamond disks, from buccal to lingual surface, that is, their proximal surfaces were separated. An area of 4 x 4mm on the enamel was delimited on all proximal surfaces by means of a round bur no. 1011 (at high speed and refrigerated), in order to undergo irradiation procedures.

After delimitation, the specimens were cleaned up again with bristle brusher and prophylaxis rubber cup with pumice and water.

The chosen laser device was the Nd:YAG (Pulse Master 1000 – American Dental Technology – ADT, USA) from the Centro de Odontologia Laser of the Universidade Paulista – UNIP. Operational parameters for the procedure were set as: energy level at 80 mJ, frequency at 10 Hz, power at 0.8 mW and fiber diameter of 300 µm, contact mode, for all specimens (energy density of 113.2 J/cm²)^{2,4}.

Experimental groups had four specimens each, and experimental sequence was:

Group A – Received no irradiation (control group) (Figures 1 and 2).

Group B – Irradiated three times during 30 seconds, without any photo-absorber (Figures 3 and 4).

Group C – Charcoal (charcoal-based dye, mixed to equal parts of deionized water and ethanol)² was lined on the enamel surface and then irradiated for 30 seconds. Following, charcoal was lined on again and the specimen was irradiated for other 30 seconds. A third application of charcoal was followed by a third laser irradiation (Figures 5 and 6).

Group D – Fluoride varnish (sodium fluoride at 5%) was lined on the enamel surface to be irradiated for 30 seconds. Following, a new layer of varnish was added and than irradiated for 30 seconds. A third and last varnish application was performed after the last 30 seconds laser irradiation (Figures 7, 8, 9 and 10).

The time interval between laser irradiations was 30 seconds, in order to allow the enamel to cool. All specimens were irradiated in a scanning mode and the laser pointer was kept perpendicular to the enamel surface.

After the irradiation procedure, the specimens were stored in deionized water and cleaned by an ultrasonic cleaner for three cycles of 20 minutes. They were then air dried with a 3-ways syringe and placed onto absorbent paper inside a metallic box.

Specimens were then dehydrated in alcoholic solutions of four different concentrations (50%, 70%, 90%, 100%), where they remained for one hour bathed in every solution.

In the Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), the specimens were placed inside a silica gel dryer. All specimens were then metallized in gold and taken to the scanning electron microscope (SEM) for structural analysis.

Results and Discussion

Tooth enamel is a highly porous substance, and consists of apatite-based minerals. Apatite elements form the hydroxyapatite crystals, and although in tight formations, they present spaces amidst themselves, named inter-crystalline spaces. Such spaces are filled by water and organic substance, which allow the diffusion of acids, minerals and fluoride, among other substances, during demineralization or remineralization processes. The physical and chemical characteristics of the enamel vary according to its organic and inorganic composition and crystalline structure. Crystals are disposed in prismatic structures of which spatial distribution grants substantial mechanical properties to the tooth^{6,13}.

Studies on enamel laser-irradiated, associated to fluoride, showed an enhanced resistance of the tooth enamel to demineralization^{1,2,3,7,9,11,18,20}. The mechanism by which lasers can augment the resistance of the enamel is not completely clear. In despite of Stern *et al.*¹⁷ (1966) commented that when enamel is irradiated by some lasers, its resistance to demineralization should be much more probably related to physical alterations of enamel permeability, than to chemical alterations, it is not clear if the protective effect of laser irradiation is really physical and/or chemical. These facts, in our opinion, show that more studies of physical evaluations and chemical analyses are necessary.

According to Oho and Morioka¹² (1990), the most accepted hypothesis is that irradiating the dental tissue decreases water content, organic compounds and carbonate, leaving small spaces inside and among crystals. Ions such as calcium, phosphate and fluoride, supplied after irradiation, would be deposited and integrated on these niches created by the laser.

The application of photo-absorbent dyes considerably increases the local energy absorption delivered by pulsed lasers⁵. Such procedure concentrates the energy, thus preventing excessive energy penetration to the underlying dental tissues. When photo-absorbers are used, this small temperature increase in tissues next to the irradiated area clearly points to a more efficient and safe method for applying pulsed lasers and would logically imply in less risk of damaging the dental pulp^{5,8}.

In this study, among the many fluoride vehicles, fluoride varnish was chosen because it has been shown to be one of the most promising methods for dental caries prevention, not only due to its efficacy, but also for its safety, easy and time-saving application procedure^{14,15}. Besides the very high fluoride concentration in this product, in 1 ml of varnish there are 50 mg of sodium fluoride (5% sodium fluoride), which corresponds to 22,6 mg of fluoride or 2.26% – 22600 ppm^{13,19}. In addition, it was also chosen because the fluoride varnish is a brownish material. Besides the fluoride varnish, the powdered charcoal was also used

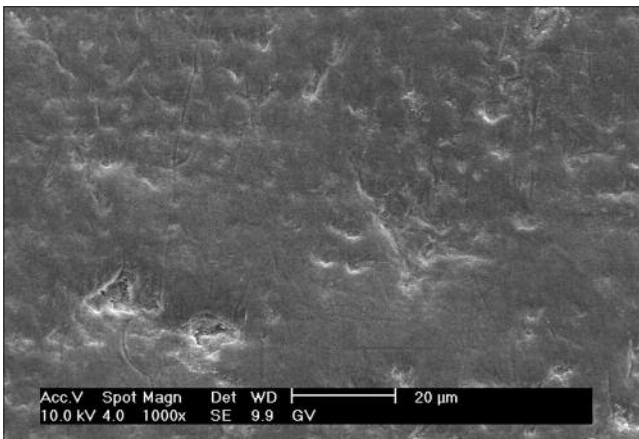


Figure 1. (1000X) Group A – No irradiation (control group)

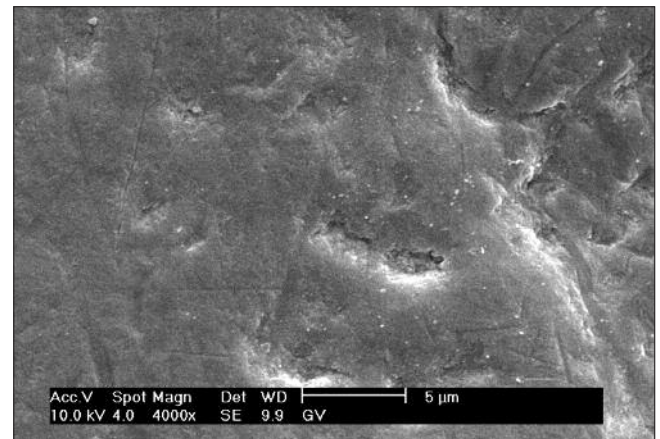


Figure 2. (4000X) Group A – No irradiation (control group)

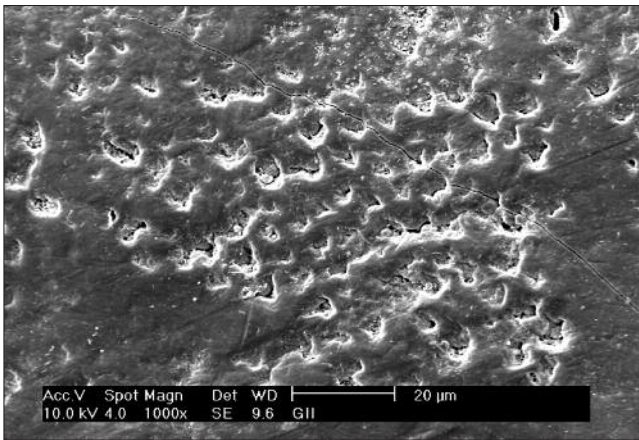


Figure 3. (1000X) Group B – Irradiated without photo-absorbers

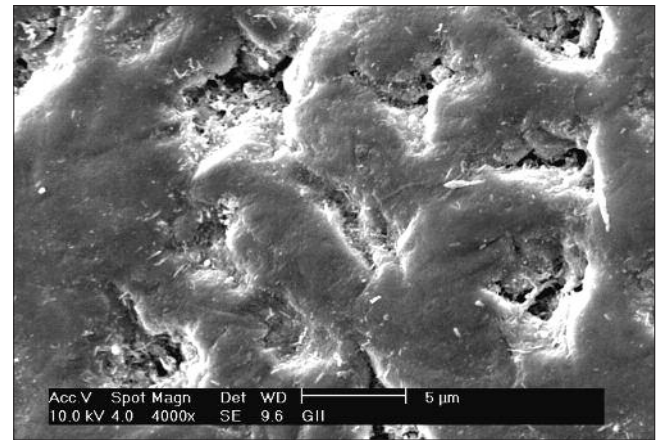


Figure 4. (4000X) Group B – Irradiated without photo-absorbers

in this study as a photo-absorber, for it has already been used in other studies^{2,4}.

In an *in vitro* study, Boari² (2000), used a pulsed Nd:YAG laser and concluded the powdered charcoal, dissolved in water and ethanol, was the best option among photo-absorbent dyes. The author observed, by scanning electron microscopy, that this procedure ensures melting and re-solidification of the irradiated enamel, causing structural changes, which result in an enhancement of enamel resistance to acidic and decalcifying substances. Charcoal also was more easily removed from enamel than India ink, which is also used as photo-absorber. According to the author, the use of powdered charcoal in the present therapeutic modality showed better results than India ink, which was already used in other studies^{1,3,5,8,10}.

It should be stated that all parameters of this study are based on parameters used in other studies^{2,4}, which resulted in characteristic morphological alterations of enamel by using charcoal as photo-absorber and three irradiation procedures interposed by 30s-intervals².

The present results for charcoal confirmed the enamel changes which were shown by Ferreira⁵ and Boari², as well as morphological alterations of enamel which were observed by other authors^{1,3,5,8,10}, who used India ink as photo-absorber. The morphological

alterations of enamel which are characterized as areas of melting and re-solidification that could be noticed when charcoal was used (Group C) as the photo-absorber for Nd:YAG laser are seen in microphotographs shown in Figures 5 and 6, and can be compared to Group B (Figures 3 and 4), irradiated by laser without photo-absorber.

When fluoride varnish was tested as a photo-absorber (Group D), some degree of effect could be noticed, but not as clearly for our parameters. Microphotographs showed morphological changes as areas of melting and re-solidification (Figures 7 and 8). Morphological changes in enamel structure when charcoal was used as a photo-absorber were apparently more significant and uniform (Figures 5 and 6). The morphological changes, which occurred in the enamel coated with fluoride varnish, were more significant than in the group that was irradiated without any photo-absorber Group B (Figures 3 and 4).

In the microphotographs of specimens that were covered with fluoride varnish one can observe that laser irradiation caused a slight exposition of prisms (Figures 9 and 10 – arrow). Referring to Oho and Morioka¹² (1990) we can infer that such alterations might afford a better fluoride penetration of the fluoride that exists in the photo-absorber (varnish), which greatly and promptly

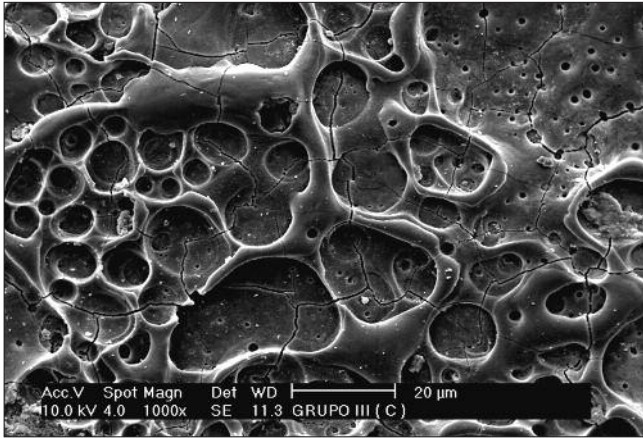


Figure 5. (1000X) Group C – Irradiated in association with powdered charcoal

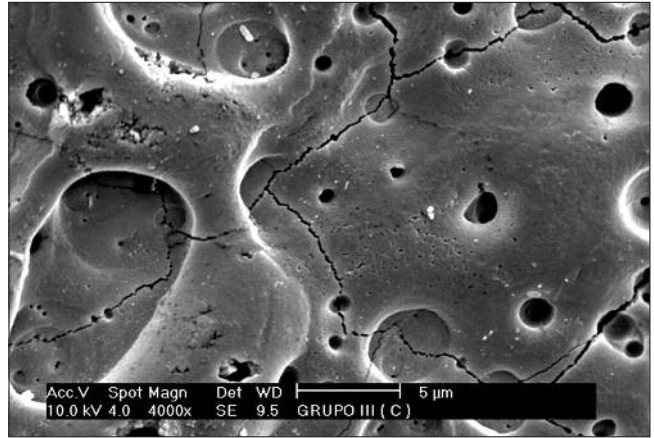


Figure 6. (4000X) Group C – Irradiated in association with powdered charcoal

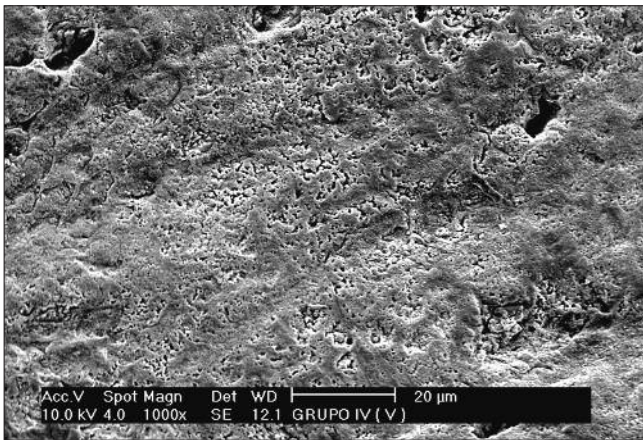


Figure 7. (1000X) Group D – Irradiated in association with fluoride varnish

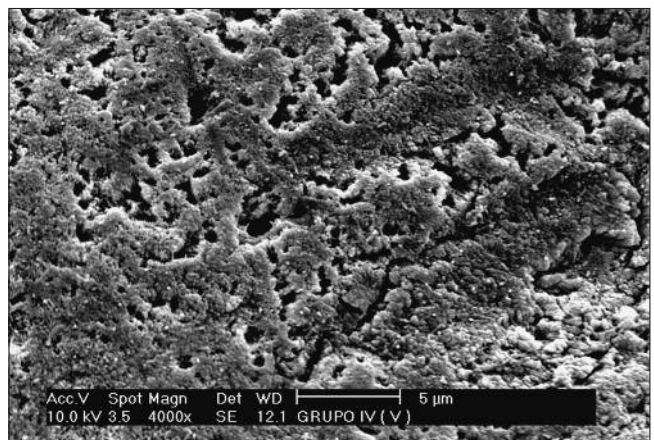


Figure 8. (4000X) Group D – Irradiated in association with fluoride varnish

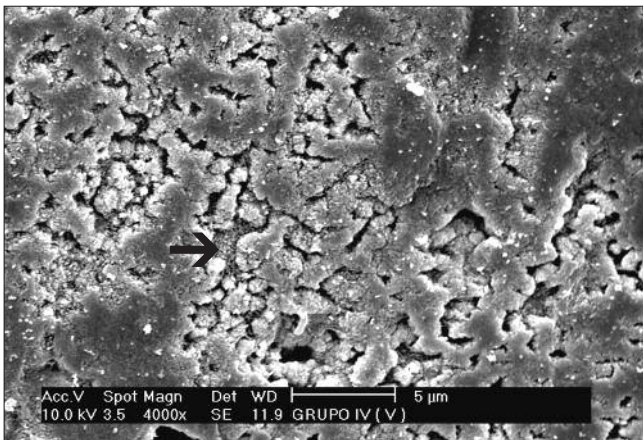


Figure 9. (4000X) Group D – Irradiated in association with fluoride varnish (arrow – exposition of prisms)

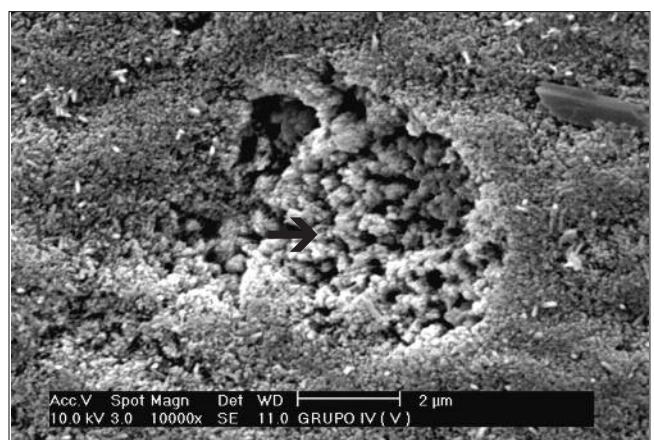


Figure 10. (10.000X) Group D – Irradiated in association with fluoride varnish (arrow – exposition of prisms)

offers this substance, thus making the enamel more resistant to demineralization from acids.

In order to cause morphological changes in the enamel structure, while using the fluoride varnish as a photo-absorber, similar to those observed while using powdered charcoal (energy density of 113.2 J/cm²), different parameters would be used.

At the present, we believe that new *in vitro* studies using different parameters, temperature evaluation, fluoride penetration degree and enamel resistance should be performed, preceding the laser associated to the fluoride varnish in clinical practice. However, it seems proper to accept that the alterations resultant from the varnish coating would probably, though not certainly, enhance fluoride diffusion to the enamel during and after irradiation, since the structural changes

that were observed by SEM in this study (Group D) are partial alterations, which would rather affect aprismatic and inter-prismatic organic elements, and may not cause greater harm to enamel metabolism, which is essential to maintaining chemical, physical and biological characteristics of tooth enamel.

Conclusions

1. When fluoride varnish and powdered charcoal were used as photo-absorbers, morphological changes of enamel were observed and characterized as areas of melting and re-solidification.

2. The morphological changes, characterized as areas of melting and re-solidification, were apparently more significant with charcoal.

References

1. Bahar A, Tagomori S. The effect of normal Pulsed Nd:YAG laser irradiation on pits and fissures in human teeth. *Caries Res* 1994; 29: 460-7.
2. Boari HGD. *Avaliação clínica da eficiência do laser de Nd:YAG associado ao flúor fosfato acidulado na prevenção de cáries de sulcos e fissuras de crianças e adolescentes*.143f. [dissertação de mestrado] São Paulo: Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo; 2000.
3. Cecchini RCM. *Estudo in vitro do efeito do laser de Nd:YAG em esmalte dental: análise de fluorescência de raios-x e microscopia eletrônica de varredura*. [dissertação de mestrado] São Paulo: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo; 1997.
4. Ferreira MVL. *Estudo in vitro da fusão de hidroxiapatita e esmalte em superfícies de esmalte humano pelo laser de Nd:YAG*. [dissertação de mestrado] São Paulo: Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo; 2000.
5. Jennet E, Motomedi M, Rastegar R, Frederickson C, Arcoria C, Powers JM. Dye enhanced ablation of enamel by pulsed laser. *J Dent Res* 1994; 73: 1841-7.
6. Katchburian E, Arana V. *Histologia e embriologia oral*. São Paulo: Panamericana; 1999. p. 239-78.
7. Lanstein DK. *Esmalte irradiado ou não com laser de Nd:YAG. Análise microbiológica do biofilme dental, mensuração de dureza Knoop em seção transversal e observação ao microscópio de luz polarizada. Estudo in situ*. [tese de doutorado] São Paulo: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo; 2002.
8. Morioka T, Suzuki K, Tagomori S. Effects of absorption mediators and resistance of surface enamel by Nd:YAG laser irradiation. *J Dent Health* 1984; 34:1.
9. Morioka T, Tagomori S. Combined effect of Nd:YAG laser irradiation and fluoride application on the acid resistance of dental enamel. In: *3rd International Nd:YAG Laser Symposium* 1981; 487-90.
10. Myaki SI. *Efeitos da irradiação da luz de laser Nd:YAG nos sulcos e fissuras de pré-molares humanos: estudo in vitro, empregando o MEV*. [dissertação de mestrado] São Paulo: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo; 1995.
11. Nagai N, Fukuda M, Ishikawa K, Minoura S, Yamada Y, Niimi T *et al*. New method for the prevention of dental caries using Nd:YAG laser and fluoride combinations. In: *6th International Congress on Laser in Dentistry*. Aichi-Gakun Univ Nagoya Japan 1998; 70.

12. Oho T, Morioka T. A possible mechanism of acquired acid resistance of human dental enamel by laser irradiation. *Caries Res* 1990; 24: 86-92.
13. Pereira AC. *Odontologia em saúde coletiva*. São Paulo: Artmed; 2003. p. 280-1.
14. Pinto VG. *Saúde bucal coletiva*. São Paulo: Santos; 2000. p. 381.
15. São Paulo. Secretaria de Estado da Saúde. Resolução 55 nº 95 de 27 de junho de 2000. Recomendações sobre o uso de produtos fluoretados no âmbito do SUS/SP em função do risco de cárie dentária. Grupo de trabalho: Jayme Aparecido Cury, Paulo Capel Narvai, Roberto Augusto Castellanos, Tania Izabel Bighetti Forni, Simone Rennó Junqueira e Maria Candelária Soares. *Diário Oficial do Estado de São Paulo*, 28 de jun. 2000
16. Sognnares RF, Stern RH. Laser effect on resistance of human dental enamel to desmineralization *in vitro*. *J South Calif State Dent Assoc* 1965; 33: 328-9.
17. Stern H, Sognnares RH, Goodman F. Laser effect on *in vitro* enamel permeability and solubility. *J Am Dent Assoc* 1966; 73: 838-43.
18. Tagomori S, Inai Y, Numata Y, Morioka T. The effect of laser irradiation on remineralization of artificial enamel lesion. In: *Proceedings of the 3rd World Congress on Preventive Dentistry*; 1991; Furuoka, Japan. p. 132-4.
19. Tortamano N, Armonia PL. *Guia terapêutico odontológico*. São Paulo: Santos; 2001. p. 153.
20. Yamamoto H, Sato K. Prevention of dental caries by acoustic-optically Q-Switched Nd:YAG laser irradiation. *J Dent Res* 1980; 59: 137.

Received in 07/4/2005

Accepted in 03/6/2005