

Avaliação dos componentes inorgânicos da dentina após condicionamento para procedimentos adesivos por fluorescência de raios-X

Rodrigo de Oliveira

Graduando em Engenharia Biomédica, Faculdade de Ciências da Saúde – Univap.
São José dos Campos, SP [Brasil]
rodrigo.engbio@bol.com.br

Ana Maria do Espírito Santo

Física, doutorada em Tecnologia Nuclear – Materiais; Professora pesquisadora – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, IP&D – Univap.
São José dos Campos, SP [Brasil]
amesanto@univap.br

Luís Eduardo Silva Soares

Odontólogo, doutorado em Engenharia Biomédica; Professor pesquisador – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, IP&D – Univap.
São José dos Campos, SP [Brasil]
lesoares@univap.br

Airton Abrahão Martins

Físico, doutorado em Ciências Físicas; Professor/pesquisador – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, IP&D – Univap
São José dos Campos, SP [Brasil]
amartin@univap.br

Neste trabalho, são estudadas, *in vitro*, as alterações no componente inorgânico da dentina, após utilização de tratamentos da superfície, para receber restauração: condicionamento ácido e irradiação com *laser* de Er:YAG 3Hz-12J. Quinze dentes bovinos hígidos foram seccionados paralelamente à face vestibular para exposição da dentina. A superfície exposta de cada amostra foi dividida, esquematicamente, em quatro regiões distintas: Grupo controle – condicionamento com ácido fosfórico a 37%; Grupo I – *laser* de Er:YAG 80mJ, 153 pulsos; Grupo II – *laser* de Er:YAG 120mJ, 103 pulsos; Grupo III – *laser* de Er:YAG 180mJ, 70 pulsos. Os grupos foram avaliados quanto aos teores de cálcio e fósforo da estrutura dentária, pré e pós-tratamento, por meio da técnica analítica de microfluorescência de raios-X por energia dispersiva (ED-XRF). O tratamento por ácido fosfórico apresentou desmineralização da dentina, favorecendo o procedimento restaurador, e o com *laser* de Er:YAG, maior variação estequiométrica do teor mineral.

Palavras-chave: Dentina. Desmineralização. Fluorescência de raios-X. Hidroxiapatita. Laser.



1 Introdução

O objetivo fundamental na maior parte dos procedimentos restauradores é unir duas superfícies não-similares: a estrutura dental mineralizada e o material restaurador (MACARI et al., 2002). Em 1955, Buonocore introduziu a técnica do condicionamento ácido, que promoveu a união mecânica entre restaurações de resina acrílica e superfícies de esmalte tratadas (BUONOCORE, 1955).

Em geral, os fosfatos de cálcio ocorrem em calcificações normais e patológicas. Costuma-se classificá-los pela razão molar Ca/P, pois a hidroxiapatita dos tecidos biológicos duros apresenta variação desse valor, dada pelo grau de mineralização de tais tecidos.

A dentina é caracterizada como composto biológico de uma matriz de colágeno preenchida com cristalitos de hidroxiapatita com tamanhos submicrométricos-nanométricos, cálcio-deficientes e ricos em carbonatos dispersos entre cilindros ociosos paralelos, hipermineralizados de tamanho micrométrico, pobre em colágeno (túbulos dentinários contendo dentina peritubular). A composição química da dentina tem aproximadamente 50% de volume mineral, 20% de água e 30% de matriz orgânica, embora possa mudar com a posição do dente e até mesmo dentro de um único dente (NAKABAYASHI, 1992).

Outra característica da dentina é a presença da camada de sujeira que se forma na superfície após instrumentação, que oclui a entrada dos túbulos dentinários e diminui a permeabilidade dentinária em até cerca de 90% (SOARES et al., 2007). A *smear layer* compõe-se de restos de matéria orgânica e inorgânica produzidos pela redução ou instrumentação da dentina, do esmalte ou do cimento. É composta de hidroxiapatita e colágeno alterado, sendo a superfície externa formada por colágeno desnaturado e geleificado.

Gordan et al. (1998) relatam que condicionadores usados com os atuais agentes adesivos são geralmente designados para remoção da camada de sujeira e desmineralização da superfície dentinária. Quando a dentina é condicionada, a superficial é desmineralizada, expondo rica área orgânica, primariamente o colágeno. Atualmente, um dos passos operatórios alternativos para o tratamento dentinário é o uso da irradiação com *laser* Er:YAG, que vem sendo estudado não somente para preparo cavitário e remoção de tecido cariado, mas também no condicionamento de esmalte e dentina (ODA; OLIVEIRA; LIBERTI., 2001).

O *laser* de Er:YAG apresenta banda de emissão centrada em $2.94\mu\text{m}$, que coincide com a maior banda de absorção da água. Essa energia emitida é eficientemente absorvida pela hidroxiapatita e tem demonstrado ser mais efetiva que outros sistemas para remoção de tecidos dentais duros (CEBALLOS et al., 2002; HOSSAIN et al., 2001). Pequenas alterações de temperatura têm sido relatadas (KELLER; HIBIST, 1990), especialmente quando o *laser* é utilizado em conjunto com um *spray* de água. Diversas características do tecido dentinário irradiado pelo *laser* de Er:YAG são consideradas vantajosas para adesão da resina à dentina, incluindo a formação de substrato com superfície microscopicamente rugosa sem desmineralização, túbulos dentinários abertos sem produção de camada de sujeira e esterilização da superfície dentinária (CEBALLOS et al., 2002). Estudos prévios da irradiação da dentina com *laser* de Er:YAG por Espectroscopia Raman revelaram que seu conteúdo mineral e orgânico foi mais alterado com o uso de altas energias de pulso ($22,9\text{ J/cm}^2$) (SOARES et al., 2007).

Diante dos fatores que interferem no processo de adesão e formação da camada híbrida na dentina, como uso de *lasers* para condicionamento, surge a necessidade da utilização de técnicas de microanálise não-destrutivas que permitam

obter dados mais precisos sobre as alterações na dentina. Desse modo, foi escolhida a técnica de análise química semiquantitativa de fluorescência de raios-X. Estudos recentes utilizaram a técnica de fluorescência de raios-X para estudar, por exemplo, a mineralização da dentina com novos compostos bioativos (NARHI et al., 2002), com o objetivo de avaliar o conteúdo químico de lesões de cárie na dentina (ARNOLD et al., 2003) e a nanoinfiltração da força de adesão resina-dentina (HASHIMOTO et al., 2004).

Neste estudo, analisaram-se, por espectrometria de fluorescência de raios-X, os efeitos do processo de condicionamento da dentina por ácido fosfórico e *laser* de Er:YAG para preparar a superfície para restauração. Em razão da crescente dificuldade de obter dentes humanos, optou-se pela utilização de dentes bovinos. Algumas vantagens dos espécimes bovinos são o tamanho da coroa dental, a maior espessura do esmalte e da dentina e, especialmente, a possibilidade de conseguir grande número de dentes em curto espaço de tempo, uma vez que estudos *in-vitro* requerem número significativo de dentes humanos extraídos.

2 Objetivos

Neste trabalho, tem-se como objetivo estudar, *in vitro*, as alterações químicas nos componentes inorgânicos (Ca e P) da dentina bovina, após tratamento por irradiação *laser* de Er:YAG com baixas densidades de energia. A técnica de microanálise utilizada é a Espectrometria de Fluorescência de Raios-X por Energia Dispersiva (ED-XRF).

3 Metodologia

Para realização deste estudo, foram utilizados quinze dentes incisivos bovinos hígidos, e sua

produção seguiu os princípios éticos das diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa envolvendo animais, conforme Resolução no 196/96, do Conselho Nacional de Saúde, sendo aprovada pela Comissão de Ética em Pesquisa da Universidade do Vale do Paraíba, sob o número A073/CEP/2007.

3.1 Preparação das amostras

Os dentes foram extraídos, manipulados e limpos no Laboratório de Espectroscopia Vibracional Biomédica do IP&D, sob adequada paramentação (luvas, máscara, gorro, avental e óculos de proteção), conforme as precauções universais e normas de biossegurança do Ministério da Saúde. A limpeza dos dentes foi realizada com curetas periodontais (7/8 Duflex®); também foram polidos com pedra-pomes e água, utilizando-se escovas de Robinson (Viking® – KG Sorensen) em baixa rotação, montadas em micromotor (LB100®-Beltec), e lavados, em seguida, com água destilada.

Para o processo de descontaminação, os dentes foram limpos e armazenados em solução aquosa contendo timol a 0,1%, em geladeira, a 9° C, por uma semana; em seguida, lavados em água corrente, por 24 horas, para remoção dos traços de timol. Quinze dentes incisivos bovinos hígidos foram seccionados paralelamente à face vestibular, com um disco de diamante, para expor a superfície da dentina. Após o corte, as secções dos dentes foram polidas e tratadas por ultra-som e imersas em água destilada, por cinco minutos, para remoção de detritos aderidos à superfície a ser analisada. A seqüência de tratamento da amostra está ilustrada na Figura 1.

A superfície de cada amostra foi separada em quatro regiões distintas (Figura 2a), as quais receberam quatro diferentes tratamentos para condicionamento da dentina: Grupo controle – condicionamento com ácido fosfórico a 37% por 15 seg.; Grupo I – *laser* de Er:YAG 80mJ, 3Hz, 12J, 153 pulsos; Grupo II – *laser* de Er:YAG



120mJ, 3Hz, 12J, 103 pulsos; Grupo III – *laser* de Er:YAG 180mJ, 3Hz, 12J, 70 pulsos (Figura 2b). As amostras foram avaliadas pela técnica de Espectrometria de Fluorescência de Raios-X por energia dispersiva (ED-XRF).

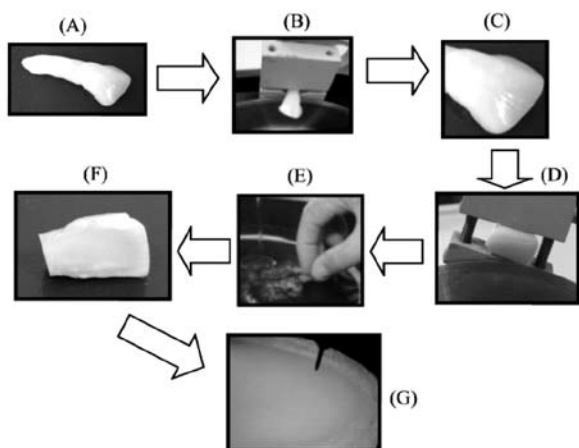
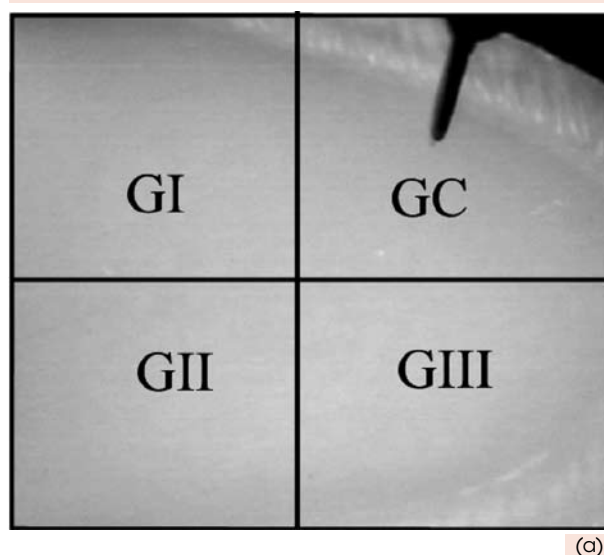


Figura 1: Seqüência da preparação das amostras dos dentes bovinos

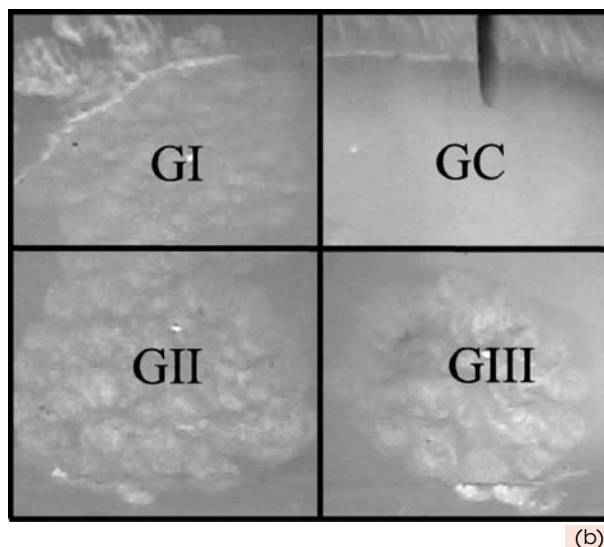
Fonte: Os autores.

3.2 Análise das amostras

As superfícies das amostras pré e pós-tratamentos de preparação da dentina por condicionamento com ácido fosfórico e por irradiação com *laser* de Er:YAG foram submetidas à análise por fluorescência de raios-X. A análise química por fluorescência de Raios-X por energia dispersiva (ED-XRF) foi realizada em espectrofotômetro da marca Shimadzu, modelo EDX-1300, e a superfície da amostra, analisada longitudinalmente por dispersão de energia da radiação proveniente de um tubo de Rh, posicionado a 90° e acoplado a um sistema computadorizado. A amostra foi irradiada com feixe de raios-X de raio de 50µm. Foram feitas varreduras em três pontos de cada região estudada, e o tempo de leitura, estipulado em 100s por ponto. A contagem da radiação foi feita por um detector semiconductor de Si (Li), refrigerado por nitrogênio líquido. A tensão e a



(a)



(b)

Figura 2: Fotografia digital da superfície de uma amostra de dentina bovina (a) antes e, (b) após os tratamentos de superfície

Fonte: Os autores.

corrente do tubo foram ajustadas em 15 kV, com ajuste automático da corrente.

A amostra foi colocada na câmara, e a superfície de corte, irradiada com raios X (esmalte e dentina exposta). A Figura 3 mostra o equipamento de ED-XRF utilizado.

Foi utilizado como referência de calibração o reagente de hidroxiapatita estequiométrica sintética, marca Sigma-Aldrich, grau de pureza 99.99% ($\text{Ca}_5\text{HO}_{13}\text{P}_3$). As condições analíticas foram baseadas no método dos parâmetros fundamentais, e



Figura 3: Espectrômetro de Fluorescência de Raios-X por Energia Dispersiva (micro EDX 1300 Shimadzu)

Fonte: Os autores.

as variáveis para o cálculo da fórmula química, estabelecidas para os pesos relativos de cálcio (Ca) e fósforo (P), tendo sido utilizado o elemento oxigênio (O) como balanço químico. O elemento hidrogênio (H) não foi considerado no balanço total de massa, uma vez que sua massa é equivalente a 0,1% do peso total da hidroxiapatita. A calibração de energia foi feita, utilizando-se os padrões internos do equipamento, e a correção, efetuada pelo cálculo da energia de transição eletrônica k_{α} do elemento Al (1,487 keV).

A proporção entre os elementos Ca e P (Ca/P) presentes nas amostras foi calculada pela razão dos pesos relativos, determinados por leitura direta no equipamento, cujo *software* fornece os dados a partir do cálculo de conversão da intensidade relativa das energias de transição dos raios-X, característicos dos elementos, para os respectivos teores de porcentagem de peso no tempo determinado de varredura. Como a varredura foi feita em três pontos distintos de cada área tratada, com dois espectros de fluorescência por ponto (1 para Ca e 1 para P), foram lidos 12 pontos por amostra, correspondentes a 24 espectros e totalizando 180 pontos medidos e 360 espectros.

Os dados foram transferidos para uma planilha, com a finalidade de efetuar os cálculos

estatísticos, utilizando-se o valor da média e desvio-padrão dos teores de Ca e P de cada área tratada. A análise estatística foi feita pelo método de ANOVA para verificar o grau de significância de 95%. Foram executados testes *post-hoc*, por Comparação Múltipla de Tukey-Kramer, para comparar as áreas tratadas. O teste de Kolmogorov e Smirnov constatou a distribuição normal dos dados.

4 Resultados e discussão

A Figura 4 mostra os espectros ED-XRF das regiões GC, GI e GII e GIII de uma amostra tratada. A energia de transição K_{α} experimental do elemento Ca de 3,689keV (Figura 4a), enquanto para o elemento P é 2,010keV (Figura 4b). Os valores teóricos para tais transições são 3,691keV e 2,013keV, para os elementos Ca e P, respectivamente.

A medida experimental média da proporção Ca/P do padrão utilizado foi 1,68, com desvio-padrão de 0,05. A relação Ca/P calculada (teórica) para estequiometria da hidroxiapatita utilizada é 1,67. A Tabela 1 apresenta os valores dos teores minerais médios de Ca e P de cada região tratada.

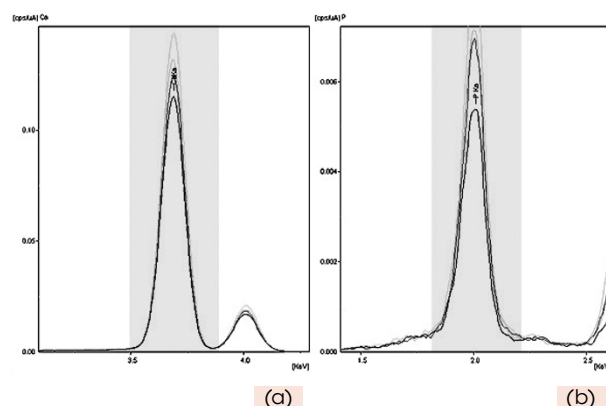


Figura 4: Espectro de fluorescência de raios-X por dispersão de energia para uma amostra de dente bovino: (a) Ca, (b) P; GC (azul escuro), GI (vermelho), GII (verde) e GIII (azul claro)

Fonte: Os autores.



Tabela 1: Média e desvio-padrão das porcentagens do componente Cálcio, Fósforo e da relação Ca/P obtidos por fluorescência de raios-X, antes (Normal) e após (Tratado) o tratamento da superfície da dentina

GRUPO	Cálcio (% peso)		Fósforo (% peso)		Proporção Ca/P	
	Normal	Tratado	Normal	Tratado	Normal	Tratado
GC	23,19 (±4,06)*	19,43 (±3,78)*	11,71 (±1,84)*	8,88 (±2,30)*	1,98 (±0,08)*	2,25 (±0,28)*
GI	24,04 (±3,54)	22,40 (±4,22)	12,28 (±1,42)	11,63 (±1,87)	1,95 (±0,07)	1,90 (±0,12)
GII	24,00 (±3,83)	25,61 (±5,15)	12,25 (±1,63)	12,80 (±2,16)	1,95 (±0,07)	1,98 (±0,13)
GIII	23,69 (±3,87)	24,01 (±5,87)	12,07 (±1,59)	12,10 (±2,82)	1,96 (±0,08)	1,96 (±0,17)

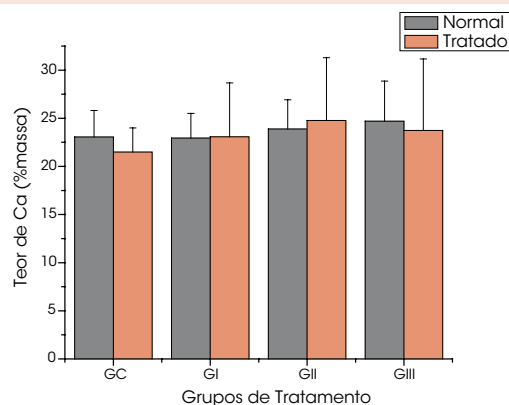
*Diferença estatisticamente significativa entre normal e tratado.

Fonte: Os autores.

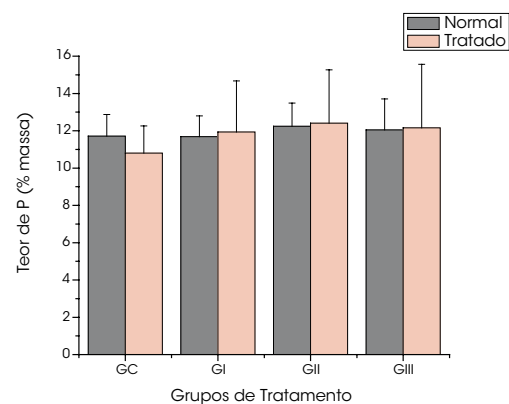
Por meio dos resultados da análise por fluorescência de raios-X, verificou-se que, após o tratamento da superfície, apenas as amostras do grupo de controle (GC) sofreram redução estatisticamente significativa dos componentes Cálcio ($P < 0,05$), Fósforo ($P < 0,05$) e da relação Ca/P ($P < 0,001$), como mostrado no gráfico da Figura 5.

Como esperado, nota-se decréscimo da relação mineral da região tratada com ácido fosfórico para os componentes cálcio e fósforo. Entretanto, para os grupos irradiados não ocorreu alteração significativa desses valores. Esse fato pode ser explicado pela energia utilizada do *laser* (12J). Soares e colaboradores (2007) avaliaram, por Espectroscopia FT Raman, as variações dos componentes orgânicos e inorgânicos da dentina humana e concluíram que as energias do *laser*, maiores (15J) que as utilizadas neste estudo, provocaram maior desmineralização que o condicionamento ácido. No entanto, os autores também verificaram significativa desnaturação da dentina (alteração do colágeno) para as densidades de energia mais altas (180mJ). Essa desnaturação é extremamente deletéria para o procedimento adesivo.

O mapeamento da superfície da amostra em cada grupo de tratamento apontou maior uniformidade química no grupo controle (GC), tanto



(a)



(b)

Figura 5: Teor médio de minerais nas regiões tratadas de dentina bovina: GC-Grupo controle; GI - tratamento *laser* Er:YAG 80mJ; GII - 120mJ; GIII - 180mJ; (a)Ca e (b) P

Fonte: Os autores.

para o cálcio (Figura 6) quanto para o fósforo (Figura 7). Na área referente aos grupos I e II, observaram-se pontos isolados com redução da concentração desses elementos. Para o grupo III, há regiões mais desmineralizadas que outras e menor uniformidade na distribuição dos componentes, quando comparado com os outros grupos.

5 Conclusões

O tratamento mais efetivo para condicionamento destinado a dentina para procedimentos adesivos é o ácido, pois provocou maior desmineralização (remoção dos minerais) e uniformidade da distribuição química dos componentes inorgâ-

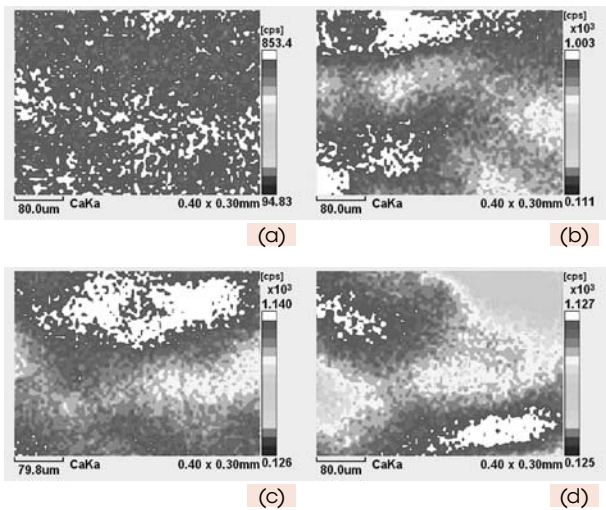


Figura 6: Resultado do mapeamento por fluorescência de raios-X de uma amostra do grupo A com os subgrupos de tratamento: GC (A), GI (B), GII (C), GIII (D) para o componente Cálcio

Fonte: Os autores.

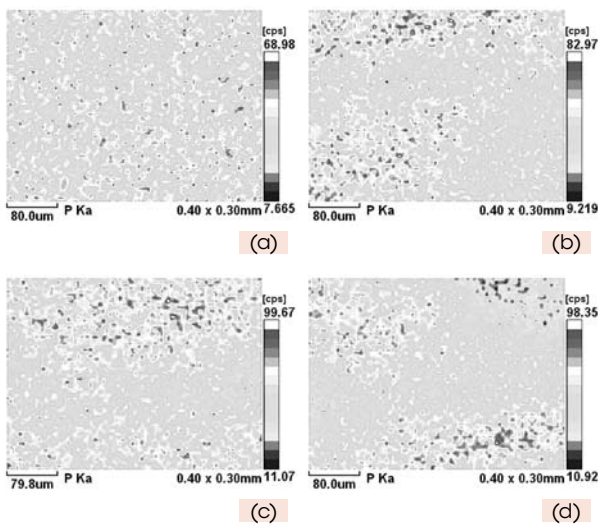


Figura 7: Resultado do mapeamento por fluorescência de Raios-X de uma amostra do grupo A, com os subgrupos de tratamento GC (A), GI (B), GII (C), GIII (D) para o componente Fósforo

Fonte: Os autores.

nicos da dentina do que as áreas irradiadas a *laser*. Uma proposta é utilizar o *laser* para remoção de lesões e, em seguida, o condicionamento ácido para preparar a superfície para melhor adesão do material de restauração.

Evaluation of changes on dentin mineral components after surface preparation for adhesive restoration by X-ray fluorescence

The main purpose of this study was to evaluate, *in-vitro*, the effects of acid etching and Er:YAG laser irradiation (120 mJ, 3 Hz) on dentin mineral component for restoration. Fifteen healthy bovine incisors teeth were sectioned and the surfaces were divided, schematically, in four different areas for treatment: etching with 37% phosphoric acid (Control group-CG); Er:YAG laser 80mJ, 153 pulses (Group I); Er:YAG laser 120mJ, 103 pulses (Group II), and Er:YAG 180mJ, 70 pulses (Group III). The samples were analyzed before and after the treatments by X-Ray fluorescence spectrometry. The acid etching treatment of the surfaces reduced significantly the mineral component of the dentin. The Er:YAG laser treatment of the surfaces with 180 mJ affected the hydroxyapatite stoichiometry.

Key words: Demineralization. Dentine. Hydroxyapatite. Laser. X-Ray Fluorescence.

Referências

- ARNOLD, W. H. et al. Morphological analysis and chemical content of natural dentin carious lesion zones. *Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger*, v. 185, n.5, p. 419-424, 2003.
- BUONOCORE, M. G. A simple method of increasing the adhesion of acrylic filling materials to enamel surfaces. *J. Dent. Res.*, v. 34, p. 849-853, 1955.
- CEBALLOS, L. et al. Bonding to Er-YAG-laser-treated dentin. *Journal of Dental Research*, v. 81, n. 2, p. 119-122, fev. 2002.
- GORDAN, V. V. et al. Evaluation of acidic primers in microleakage of class 5 composite resin restorations. *Oper. Dent.*, n. 23, p. 244-9, 1998.
- HASHIMOTO, M. et al. *In vitro* effect of nanoleakage expression on resin-dentin bond strengths analyzed by microtensile bond test, SEM/EDX and TEM. *Biomaterials*, v. 25, n. 25, p. 5565-5574, 2004.



HOSSAIN, M. et al. Effect of pulsed Nd:YAG laser irradiation on acid demineralization of enamel and dentin. *Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery*, v. 19, n. 2, p. 105-108, 2001.

KELLER, U.; HIBST, R. Ultrastructural changes of enamel and dentin following Er-YAG laser radiation on teeth. *Proc. SPIE 1200*, p. 408-415, 1990.

MACARI, S. et al. Scanning electron microscopy evaluation of the interface of three adhesive systems. *Braz. Dent. J.*, v. 13, n.1, p. 33-38, 2002.

NAKABAYASHI, N. The hibrid layer: a resin-dentin composite. *Proc. Finn. Den. Soc.*, v. 88, supp. 1, p. 322-329, 1992.

NARHI, T. et al. Dentin mineralization with a bioactive composite, *Bioceramics 14 Key Engineering Marterials*, v. 218, n. 2, p. 461-464, 2002.

ODA, M.; OLIVEIRA, D. C.; LIBERTI, E. A. Avaliação morfológica da união entre adesivo/resina composta e dentina irradiada com *laser Er:YAG e laser Nd:YAG*: estudo comparativo por microscopia eletrônica de varredura. *Pesqui. Odontol. Bras.*, v. 18, n. 4, p. 283-289, 2001.

SOARES, L. E. S. et al. Combined FT-Raman and SEM studies of the effects of Er:YAG laser irradiation on dentin. *Photomedicine and Laser Surgery*, v. 25, n. 4, p. 239-244, 2007.

Recebido em 3 dez. 2007 / aprovado em 31 mar. 2008

Para referenciar este texto

OLIVEIRA, R. de et al. Avaliação dos componentes inorgânicos da dentina após condicionamento para procedimentos adesivos por fluorescência de raios-X. *Exacta*, São Paulo, v. 6, n. 1, p. 139-146, jan./jun. 2008.