**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO**

**Alteração química e morfológica da dentina radicular
tratada com diferentes lasers de alta potência**

FABIANE CARNEIRO LOPES

**Ribeirão Preto
2014**

FABIANE CARNEIRO LOPES

**Alteração química e morfológica da dentina radicular
tratada com diferentes lasers de alta potência**

*Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de
Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências – Programa:
Odontologia Restauradora – Área de concentração:
Odontologia Restauradora (Opção: Endodontia)*

Versão corrigida

Orientador: Prof. Dr. Manoel D. de Sousa Neto

Ribeirão Preto

2014

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Assinatura do autor: _____ Data: ____/____/2014

Ficha Catalográfica

Lopes, Fabiane Carneiro

Alteração química e morfológica da dentina radicular tratada com diferentes lasers de alta potência. Ribeirão Preto, 2014.

88p.: il.; 30 cm

Dissertação de mestrado, apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FORP-USP), área de concentração: Odontologia Restauradora-Endodontia.

Versão corrigida da Dissertação. A versão original se encontra disponível na Unidade que aloja o Programa.

Orientador: Prof. Dr. *Manoel D. de Sousa Neto*

1. Laser 2. Tratamento endodôntico 3. Espectroscopia Raman

LOPES, F. C. **Alteração química e morfológica da dentina radicular tratada com diferentes lasers de alta potência**. 2014, 88p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. Manoel D. de Sousa Neto (Orientador)

Instituição: Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Este trabalho de pesquisa foi realizado nas seguintes instituições:

Laboratório de Pesquisa em Endodontia do Departamento de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo;

Laboratório de Bioengenharia Ortopédica do Departamento de Engenharia Mecânica e Aeroespacial da Universidade Case Western Reserve;

Departamento de Atendimento Integrado da Faculdade de Medicina Dentária da Universidade Case Western Reserve.

This research was conducted at the following institutions:

Endodontics Research Laboratory, Department of Restorative Dentistry of Ribeirão Preto Dental School at University of São Paulo;

Orthopaedic Bioengineering Laboratories at Department of Mechanical and Aerospace Engineering at Case Western Reserve University;

Department of Comprehensive Care at Case Western Reserve School of Dental Medicine.

*A síntese da dissertação em inglês encontra-se disponível no Anexo 2.

Attachment 2 is the abbreviated version of the study in English.

*D*EDICATÓRIA

A **Deus**, que ao colocar desafios, permite que eu possa evoluir, guiando e iluminando meu caminho e me ensinando a ser perseverante.

Ao meu pai, **Marcelo Araújo Silva Lopes**, grande homem e meu maior exemplo, pela paciência, pelos ensinamentos diários, por todo carinho e incentivo, e pela dedicação pela minha felicidade e bem estar.

À minha mãe, **Myrian Aparecida Carneiro Steinbaugh**, que apesar de estar longe sempre me acolhe com palavras de carinho, pelo incentivo constante às minhas escolhas e pelo orgulho que sente por mim que sempre me fortalece.

Ao meu irmão, **Henrique Carneiro Lopes**, amigo para todos os momentos, pelo incentivo e confiança sempre depositados em mim, e por sempre me fazer lembrar que apesar da distância, nunca se está só, sempre tendo um ao outro.

À minha avó, **Maria Ignez Mattos de Freitas Carneiro**, por estar presente em todos os momentos importantes da minha vida, acompanhando todas as etapas da minha caminhada até aqui, sempre me incentivando e oferecendo suporte emocional nos momentos difíceis.

Ao meu padrasto, **Eric Nelson Steinbaugh**, pelo apoio e carinho a mim dedicado, e por sempre acreditar na minha capacidade, me incentivando e oferecendo seus sábios conselhos nos momentos importantes.

Amo muito vocês!

*A*GRADECIMENTOS

I would like to express my deepest appreciation to the following people, without whose guidance and support this project would not have been possible:

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Manoel Damião de Sousa Neto**, exemplo de dedicação e perseverança, pelos ensinamentos, elogios e críticas que me fazem crescer constantemente. Meu reconhecimento e gratidão pela orientação, compreensão e pelas oportunidades oferecidas à mim que contribuíram para a minha formação intelectual, científica e profissional.

*To my advisor, **Prof. Dr. Manoel D. de Sousa Neto**, who provided me with an example of dedication and perseverance through his instruction, praise, and criticism. I am indebted to him for his guidance, his patience, and the opportunities he created for me to grow intellectually, professionally, and personally during the course of this project.*

À **Prof^a. Dr^a. Lisa Lang**, por ter me dado oportunidade de trabalhar na Universidade Case Western Reserve, instituição de altíssimo nível com tecnologia e pesquisa de ponta, e de conviver com profissionais extremamente capacitados enriquecendo minha experiência acadêmica.

*To **Prof. Dr. Lisa Lang**, for providing me with the opportunity to work at Case Western Reserve University, where my academic experience was enriched by being exposed to the highest level of technology and cutting-edge research while working with highly trained professionals.*

Ao **Prof. Dr. Renato Roperto**, por ter me acolhido e proporcionado uma experiência única na Universidade Case Western Reserve que foi essencial para realização deste trabalho. Agradeço a importante contribuição na realização deste trabalho e para o meu crescimento não apenas profissional como também pessoal.

*To **Prof. Dr. Renato Roperto** for being such a warm host and providing me with a unique experience at Case Western Reserve University that was essential for the successful completion of this study. I will always be grateful to him for his*

encouragement, his continuous support, and for convincing me that the weather in Cleveland wasn't really unbearably cold.

Ao **Prof. Dr. Ozan Akkus** e **Prof^a. Dr^a. Anna Akkus**, exemplos de profissionais e pesquisadores, pelo conhecimento transmitido, pela colaboração neste trabalho e gentileza com que me receberam na Universidade Case Western Reserve.

*To **Prof. Dr. Ozan Akkus and Prof. Dr. Anna Akkus**, sterling examples of practitioners and researchers, who generously shared their expertise and valuable insights while making me feel at home at Case Western Reserve University.*

À **Prof^a. Dr^a. Aline Evangelista de Souza Gabriel**, pela sua prontidão, paciência e importante auxílio neste trabalho, contribuindo para meu crescimento científico.

*To **Prof. Dr. Aline Evangelista de Souza Gabriel**, for always finding time in her schedule for me, and for patiently helping me find solutions to the problems I encountered.*

Ao **Prof. Dr. Jesus Djalma Pécora**, pelos ensinamentos de amor pela pesquisa e ética em sua execução. Exemplo de pesquisador, visionário da ciência e da vida. Admiração por sua sabedoria e cultura.

À **Prof^a. Dr^a. Yara Teresinha Corrêa Silva Sousa** pela ajuda, aprendizado e disponibilidade.

Ao **Prof. Dr. Antônio Miranda da Cruz Filho**, pela agradável convivência, e pelo constante aprendizado em endodontia a mim proporcionado, que contribuiu para minha escolha por esta especialidade.

Aos **Docentes do Departamento de Odontologia Restauradora** da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, pelos conhecimentos transmitidos e acolhimento.

Ao técnico **Rodrigo Ferreira Silva**, da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pelo auxílio na realização nas análises de microscopia eletrônica de varredura e energia dispersiva de raios-x.

À **Prof^a. Dr^a. Débora Fernandes Costa Guedes**, técnica do Laboratório de Gerenciamento de Resíduos Químicos da FORP/USP, pela ajuda e pelos momentos de aprendizado.

Ao funcionário **Carlos Feitosa dos Santos**, exemplo de eficiência e dedicação, pelas inúmeras ajudas e lembretes.

Ao funcionário **Reginaldo Santana da Silva**, pelo incentivo, disponibilidade e boa vontade em ajudar.

Aos funcionários **Fred Augusto Batista Farias, Luiza Godoi Pitol, Maria Amália Viesti de Oliveira, Maria Izabel Miguel, Ronivaldo Zonfrilli e Rosângela Angelini**, pelo convívio diário, apoio e solicitude.

Às secretárias da pós graduação **Regiane Moi Sacilotto, Isabel Cristina Sola e Mary Possani Carmessano**, pela atenção e disponibilidade quando solicitados.

Aos alunos da pós-graduação do Departamento de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, em especial a **Jardel Francisco Mazzi Chaves, Graziela Bianchi Leoni, Cecília Martins, Vanessa Lessa, Rodrigo Dantas, Pedro Bastos Cruvinel, Luis Eduardo Souza Flamini, Bruno Crozeta, Fernanda Ploteger, Amanda Buosi Biagi, Keila de Almeida Franceschini, Emanuele Boschetti, Abraão Rombe, Alessandro Lamira, Polliana Vilaça da Silva, Isabela Lima e, Reinaldo Dias Neto**, pela convivência agradável, estímulo, ajuda e troca de experiências.

À **CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior**, pela bolsa de estudos outorgada.

À **Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo**, que me concedeu o privilégio e honra de realizar toda minha formação acadêmica, desde a graduação até o presente momento.

À **Universidade Case Western Reserve**, pela oportunidade de poder usufruir da estrutura impecável e de altíssimo nível que foi essencial para a realização deste trabalho, além de muito contribuir para o meu crescimento profissional.

*Finally, to all the people at the **School of Dentistry of Ribeirão Preto - University of São Paulo** and **Case Western Reserve University** who actively or passively contributed to this research study, a heartfelt thank you.*

Às minhas queridas amigas **Carolina Noronha Ferraz de Arruda, Camila Quaioti, Elisa Gomes, Diana Ferreira Paulo, Nayara Trinca, Isabela Maluta, Paulina Coradelli, Fabiana Butti Abichabki, Juliana Sampaio, Lígia Mendonça Megale, Jéssica Blanco, Talita Colucio Luders, Aliny Gallico, Cristina Valente**, que fazem parte da minha vida e torcem pelo meu sucesso, pelas amizades sinceras e por todos os momentos vividos juntos e intensas alegrias compartilhadas.

À toda **minha família**, por sempre acreditarem no meu potencial. Obrigada pelo eterno carinho, amor e incentivo.

A **Deus**, por mais esta graça alcançada.

*"A tarefa não é tanto ver aquilo que
ninguém viu, mas pensar o que
ninguém ainda pensou sobre aquilo
que todo mundo vê."*

Arthur Schopenhauer

*R*ESUMO

LOPES, F. C. Alteração química e morfológica da dentina radicular tratada com diferentes lasers de alta potência. 2014, 88p. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

O objetivo deste estudo *ex vivo* foi avaliar as alterações químicas e morfológicas na dentina radicular tratada com diferentes lasers de alta potência. Foram selecionados cinquenta caninos superiores que tiveram suas coroas seccionadas transversalmente e os canais radiculares preparados com instrumentos rotatórios de NiTi até o instrumento #50.02. Após o preparo biomecânico, os dentes foram distribuídos em cinco grupos ($n = 10$) de acordo com o tratamento de superfície: GI - água, GII - NaOCl + EDTA, GIII - NaOCl + EDTA + laser Diodo (980nm), GIV - NaOCl + EDTA + laser Nd:YAG (1064nm) e GV - NaOCl + EDTA + laser Er,Cr:YSGG (2780nm). Os grupos submetidos ao tratamento com laser (GIII, GIV e GV) foram irradiados por 20 segundos em movimento helicoidal com velocidade aproximada de 1,5 mm/s. Em seguida, os dentes foram clivados e então submetidos à análise da composição orgânica e inorgânica por espectroscopia Raman (cts), quantificação de elementos químicos por espectroscopia de raios X por dispersão em energia (EDS) (wt%), e avaliação da morfologia por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística (ANOVA, $p < 0,05$), considerando as *variáveis tratamento* de superfície e *terço radicular*. Nenhum dos tratamentos de superfície avaliados alterou a intensidade do pico de mineral (cts) ($p = 0,183$). O grupo irradiado com Er,Cr:YSGG diminuiu significativamente a intensidade do pico de colágeno (cts) ($290,7 \pm 41,7$) quando comparado ao grupo tratado com água ($328,3 \pm 63,5$) e ao grupo tratado com NaOCl e EDTA ($333,9 \pm 55,8$) ($p < 0,05$). O grupo irradiado com Er,Cr:YSGG também apresentou maior razão mineral/colágeno ($9,5 \pm 1,1$) quando comparado aos grupos tratados com água ($7,7 \pm 1,5$), NaOCl + EDTA ($8,0 \pm 1,4$) e Diodo ($8,2 \pm 1,6$). Em relação aos terços radiculares, as intensidades do pico mineral e do pico de colágeno apresentaram aumento crescente de cervical para apical ($p < 0,05$) em todos os grupos avaliados, resultando em razão mineral/colágeno menor para o terço cervical, quando comparado aos terços médio e apical. A análise por EDS não apresentou diferença entre os grupos estudados tanto para os elementos químicos avaliados individualmente, assim como para a razão Ca/P ($p < 0,05$). A MEV mostrou que o grupo irradiado com Diodo apresentou superfície de matriz orgânica amorfa, enquanto que o laser Er,Cr:YSGG proporcionou maior remoção de dentina intertubular com formação de crateras, e o grupo irradiado com Nd:YAG promoveu fusão da dentina com selamento dos túbulos dentinários. Conclui-se que nenhum dos tratamentos de superfície avaliados foi capaz de promover alterações no conteúdo inorgânico da dentina radicular; o tratamento com NaOCl, EDTA, e irradiação Er,Cr:YSGG alterou a estrutura de colágeno. O uso do laser promoveu alterações morfológicas, independentemente do tipo de laser utilizado, quando comparado aos grupos não irradiados.

*A*bstract

LOPES, F. C. **Chemical and morphological effect of laser treatment on radicular dentin**.2014, 88p. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

The aim of this *ex vivo* study was to evaluate the chemical and morphological changes in root dentin treated with different high power lasers. Fifty maxillary canines were selected and had their crowns sectioned transversely and the root canals prepared with NiTi rotary instruments to the instrument # 50.02. After biomechanical preparation, the teeth were distributed into five groups (n=10) according to the surface treatment: GI - water, GII - NaOCl + EDTA, GIII - NaOCl + EDTA + Diode (980nm), GIV - NaOCl + EDTA + Nd:YAG (1064nm) and GV - NaOCl + EDTA + Er,Cr:YSGG (2780nm). The groups subjected to laser treatment were irradiated for 20 seconds by performing helical motion along the root with a speed of approximately 1.5 mm/s. Samples were bisected, exposing the treated surface and were subjected to the analysis of organic and inorganic composition by Raman spectroscopy (cts), elements quantification by energy-dispersive x-ray spectroscopy (EDS) (%), and had the morphology evaluated by scanning electron microscope (SEM). Data were submitted to statistical analysis (ANOVA, $p < 0.05$), considering the variables surface treatment and root third. None of the evaluated surface treatments alter the mineral peak intensity (cts) ($p = 0.183$). The group irradiated with Er,Cr:YSGG significantly reduced the intensity of collagen peak (cts) (290.7 ± 41.7) compared with the water treated group (328.3 ± 63.5) and the group treated with NaOCl and EDTA (333.9 ± 55.8) ($p < 0.05$). The group irradiated with Er,Cr:YSGG also showed higher mineral/collagen ratio (9.5 ± 1.1) compared to the group treated with water (7.7 ± 1.5), NaOCl and EDTA (8.0 ± 1.4) and diode 980 nm (8.2 ± 1.6). Both collagen and mineral peak intensities increased from cervical to apical root thirds ($p < 0.05$) in all groups evaluated, resulting in lower mineral/collagen ratio to the cervical third when compared to middle and apical thirds. EDS analysis found no difference between the chemical elements as well as the Ca/P ratio between the studied groups ($p < 0.05$). SEM showed that the group irradiated with 980 nm diode had an amorphous organic matrix surface, while the Er,Cr:YSGG provided greater removal of intertubular dentin forming craters, and the group irradiated with Nd:YAG promoted fusion of dentin, sealing the dentinal tubules. It is concluded that none of the surface treatments evaluated were able to promote changes in the inorganic content of the root dentin; treatment with NaOCl, EDTA, and irradiated with Er,Cr:YSGG alter the collagen structure. The use of laser promoted morphological changes, regardless the type of laser used, when compared to non-irradiated roots.

SUMÁRIO

Introdução.....	01
Proposição.....	09
Materiais e Métodos.....	13
Resultados.....	27
Discussão.....	41
Conclusões.....	51
Referências Bibliográficas.....	55
Anexos.....	69
Anexo 1 – Parecer do Comitê de Ética	71
Anexo 2 – Síntese da Dissertação em inglês.....	74
<i>Attachment 2 – Abbreviated version of the study in English.....</i>	<i>74</i>

Os avanços tecnológicos têm possibilitado novas perspectivas à terapia endodôntica, com diminuição do tempo operatório e maior segurança e eficácia do tratamento. Evidência dessa evolução é o uso cada vez mais frequente de localizadores apicais, ultrassom, instrumentos de diferentes cinemáticas e microscópios operatórios como parte dos protocolos clínicos do tratamento endodôntico (TASCHIERI et al., 2010; BERUTTI et al., 2012; MARTINS et al., 2014; PLOTINO et al., 2014; METZGER et al. 2014; DE ALMEIDA et al. 2014).

A tecnologia laser é um desses avanços que passou a ser incorporada como importante aliada na terapêutica endodôntica, com capacidade de agir no sistema de canais radiculares promovendo redução microbiana (DEWSNUP et al., 2010; YASUDA et al., 2010; MEIRE et al., 2012; SADIK et al., 2013), remoção da camada de *smear* (ALTUNDASAR et al., 2006; ALFREDO et al., 2009; MOURA-NETTO et al., 2011; SAMIEI et al., 2014), alteração da permeabilidade e morfologia da parede dentinária (SANTOS et al., 2005; ESTEVES-OLIVEIRA et al., 2010; SILVA et al. 2010) favorecendo a adesão dos cimentos endodônticos às paredes do canal (SOUSA-NETO et al. 2005, AYRANCI; KOSEOGLU, 2014), além de promover selamento do forame apical (NEIBURGER, 1992).

Os lasers se dividem em dois grupos: ablasivos (alta potência), e não ablasivos (baixa potência), sendo a principal diferença entre eles, respectivamente, a capacidade ou não de remover tecido (COLUZZI, 2000). Cada tipo de laser tem sua especificidade, pois são produzidos em meios ativos diferentes e cada um interage de forma diferente com os tecidos dentais duros (SCHOOP et al., 2006; DELMÉ; DE MOOR, 2007; ESTEVES-OLIVEIRA et al., 2010; FARIA et al., 2013).

Diversos fatores podem interferir na absorção do laser pelo tecido, tais como, densidade de potência e energia, comprimento de onda, além da duração da

aplicação, modo de operação do equipamento e composição do tecido irradiado (SCHOOP et al., 2006).

Em Endodontia, a literatura tem demonstrado a utilização de diferentes tipos de lasers ablativos tais como Er,Cr:YSGG (érbio cromo dopado com ítrio, escândio, gálio e granada), Nd:YAG (neodímio dopado com ítrio, alumínio e granada) e Diodo (GUTKNECHT et al., 2004; STABHOLZ; SAHAR-HELFT; MOSHONOV, 2004; SCHOOP et al., 2006; GURBUZ et al., 2008; ALFREDO et al., 2009; ESTEVES-OLIVEIRA et al., 2010; YASUDA et al., 2010; YAVARI et al., 2010; MOURA-NETTO et al., 2011; BAGO et al., 2014; TOPÇUOĞLU; KOSEOĞLU, 2015).

O laser Er,Cr:YSGG possui comprimento de onda 2780 nm, situando-se na porção inicial do infravermelho médio e é altamente absorvido pelos componentes dos tecidos dentais devido à afinidade pela água e hidroxiapatita. Essa interação denomina-se ablação, fenômeno de manifestação do efeito fototérmico promovido pelo laser (HOSSAIN et al., 1999; PÉCORA et al. 2000). Alguns trabalhos relatam que o laser Er,Cr:YSGG possui capacidade de promover redução microbiana (YAVARI et al., 2010; OZKAN; CETINER; SANLIDAG, 2014; BAGO et al., 2014; LICATA et al., 2015), remoção da camada de *smear* e debris quando aplicado nas paredes de canais radiculares (YAMAZAKI et al., 2001; ISHIZAKI et al., 2004; ALTUNDASAR et al., 2006; SILVA et al., 2010), além de promover aumento da permeabilidade dentinária (KIMURA et al., 2001; YAMAZAKI et al., 2001).

Em contrapartida, os lasers pertencentes à região do infravermelho do espectro eletromagnético (Diodo 980 nm e Nd:YAG 1064 nm), possuem pequeno comprimento de onda, e dessa forma possuem baixo coeficiente de absorção na hidroxiapatita e água (CHANTHABOURY; IRINAKIS, 2005), além de alto poder de penetração e alto coeficiente de absorção em meio escuro resultando em absorção

elevada pela hemoglobina e melanina (BORNSTEIN, 2004).

O laser Nd:YAG, com comprimento de onda 1064 nm, apresenta capacidade de promover redução microbiana (FRANZEN et al., 2011; MADEN et al., 2013), remoção da camada de *smear*, fusão e recristalização do tecido dentinário (TAKEDA et al., 1998; SANTOS et al., 2005). A irradiação do laser Nd:YAG é absorvida pelas estruturas minerais, como os fosfatos e carbonatos da hidroxiapatita, desarranjando a grade cristalina, promovendo assim o derretimento e recristalização da estrutura dentinária (ANIĆ et al., 1998), com consequente redução da permeabilidade (ANIĆ et al., 1998; TAKEDA et al., 1998; AL-AZZAWI; DAYEM, 2006; HE et al., 2009; ESTEVES-OLIVEIRA et al., 2010; FRANZEN et al., 2011; MOURA-NETTO et al., 2011).

A irradiação da superfície dentinária com laser Diodo, comprimento de onda 980 nm, é capaz de promover redução microbiana em áreas de difícil acesso por apresentar maior capacidade de penetração quando comparada a outros lasers (GUTKNECK et al., 2004; BORNSTEIN, 2004; LEE et al., 2006; SCHOOP et al., 2006; KAIWAR et al., 2013; ROMEO et al., 2014). Além disso, este laser promove efeitos morfológicos como remoção da camada de *smear*, exposição dos túbulos dentinários e modificação da camada superficial de matriz orgânica, além de reduzir a infiltração apical quando aplicado na dentina radicular (WANG et al., 2005; ALFREDO et al., 2008; MARCHESAN et al., 2008; ALFREDO et al., 2009; FARIA et al., 2011). Vale destacar que o laser Diodo 980 nm apresenta menor custo e ocupa um menor espaço físico no consultório odontológico quando comparado aos demais lasers (BORRAJO et al., 2004; SCHOOP et al., 2006; DA COSTA RIBEIRO et al., 2007; ALFREDO et al., 2009).

Alterações na morfologia, permeabilidade, microdureza e solubilidade da dentina radicular promovidas por soluções químicas e pelos lasers de alta potência podem ser ocasionadas por alterações nos elementos químicos presentes na superfície e na composição orgânica e inorgânica do tecido dental (PÉCORA et al., 2000; MARCHESAN et al., 2008; HE et al., 2009; SILVA et al., 2010; ESTEVES-OLIVEIRA et al., 2010; MOURA-NETTO et al., 2011; VIAPIANA et al., 2012; PASCON et al., 2012, MARTINS JUSTO et al., 2014; KALYONCUOGLU; DEMIRYÜREK, 2013; ULUSOY; GORGUL, 2013; WATANABE et al., 2013; POGGIO et al. 2014).

Entre os métodos que podem ser utilizados para obter informações químicas e estruturais de tecidos dentais duros estão as espectroscopias (AKKUS et al., 2003; LIU; HSU, 2007; SOARES et al., 2009; PASCON et al., 2012). Na espectroscopia Raman um feixe de luz laser é focalizado na amostra por meio de um microscópio óptico. Após a interação, o feixe de luz espalhado inelásticamente passa por espectrômetro, que permite a separação em vários feixes de energias diferentes que são contabilizados em um dispositivo de carga acoplado acionado (CCD – *charge coupled device*). A diferença (Δ) de energia dos fótons espalhados e dos incidentes no material é a energia de espalhamento Raman, dada em um gráfico de energia (intensidade Raman por número de onda). Na análise do espectro os picos de grande intensidade significam número elevado de moléculas vibrando com a mesma energia (LEUNG; MORRIS, 1995; TSUDA; ARENDS, 1997; AKKUS et al., 2003).

Já a espectroscopia por energia dispersiva de raios x permite a caracterização elementar dos materiais. Nesta, um feixe de elétrons incide sobre um material e os elétrons mais externos dos átomos constituintes são excitados para dado nível energético quântico, e ao retornarem a sua posição liberam energia. O

detector instalado na câmara de vácuo do microscópio eletrônico de varredura mede essa energia, sendo possível determinar os elementos químicos presentes, sendo uma ferramenta indispensável na caracterização e identificação dos elementos químicos presentes na superfície (SOARES, et al., 2009; PASCON et al., 2012).

Dessa forma, é possível observar que os métodos descritos são complementares, uma vez que a espectroscopia Raman é uma análise química estrutural enquanto a espectroscopia por energia dispersiva de raios x complementa esta análise mostrando íons e átomos (PASCON et al., 2012). Neste contexto a microscopia eletrônica de varredura, método mais utilizado para análise morfológica da superfície, permite interpretar as alterações químicas observadas (MARCHESAN et al., 2008; ALFREDO et al., 2009; FARIA et al., 2011). Dessa forma, sabendo que alterações na composição química estão relacionadas com características mecânicas e morfológicas do tecido dental duro, torna-se importante investigar alterações nos componentes químicos da dentina radicular causadas pela irradiação dos lasers Diodo, Nd:YAG e Er,Cr:YSGG após o preparo biomecânico dos canais radiculares.

*P*ROPOSIÇÃO

A proposta do presente estudo foi avaliar *ex vivo* as alterações químicas e morfológicas na dentina radicular de dentes tratados com os lasers de alta potência Diodo 980 nm (1,5W/CW), Nd:YAG 1064 nm (1,5W/25Hz) e Er,Cr:YSGG 2780 nm (1,5W/25Hz) associados ao uso hipoclorito de sódio (NaOCl) 1% e ácido etileno diamino tetra-acético (EDTA) 17%, por meio da espectroscopia Raman (Raman), espectroscopia por energia dispersiva de raios X (EDS) e microscopia eletrônica de varredura (MEV).

*M*ATERIAIS E *M*ÉTODOS

Após revisão e aprovação do presente estudo pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (CEP/FORP-USP), pelo parecer nº 557.943 e CAAE nº 24449713.6.0000.5419 (Anexo 1) e aprovação pelo *Institutional Review Board* da Universidade Case Western Reserve, *exemption file #* EM-13-17, foram obtidos, do Biobanco de Dentes Humanos da FORP-USP, caninos superiores unirradiculares humanos hígidos, mantidos em solução de timol a 0,1%.

Os dentes foram lavados em água corrente por 24 horas e, em seguida, tiveram sua superfície radicular externa limpa por meio de raspagem com ultrassom (Profi II Ceramic, Dabi Atlante Ltda, Ribeirão Preto, SP, Brasil).

Os dentes foram examinados com auxílio de lupa (aumento de 10 x) e radiografados individualmente, nos sentidos orto e méso-radial com filme Ektaspeed EP (Kodak Brasileira Comércio e Indústria Ltda, São José dos Campos, SP, Brasil), tempo de exposição de 0,5 segundo e distância foco-filme de 10 cm. As radiografias foram avaliadas com auxílio de negatoscópio (Konex, Konex Ind. e Com. de Metais LTDA, São Paulo, SP, Brasil) e de aparato visualizador magnificador (X- Produkter, Malmö, Suécia).

Após exame macroscópico e radiográfico foram selecionados dentes unirradiculares, com raízes completamente formadas, com ausência de calcificações, reabsorções, trincas e fraturas, apresentando comprimento mínimo de 17 mm de raiz, sem achatamentos e curvatura acentuados. Foram selecionados 50 caninos superiores que apresentavam diâmetro anatômico determinado clinicamente de 250 µm, correspondente a uma lima 25.

Os espécimes foram inseridos individualmente em tubos de polipropileno tipo Eppendorf (Eppendorf do Brasil Ltda, São Paulo, SP, Brasil), contendo 1 mL de

água destilada e foram armazenados em estufa (37°C, 100% umidade) por 72 horas visando sua reidratação.

Preparo dos espécimes

Os dentes tiveram suas raízes seccionadas perpendicularmente ao seu longo eixo no sentido mésio-distal com disco diamantado dupla face (KG Sorensen, Barueri, SP, Brasil) em baixa rotação (Dabi Atlante, Ribeirão Preto, SP, Brasil), sob refrigeração, próximo a junção cimento-esmalte padronizando o comprimento das raízes em 17 milímetros de comprimento por meio de paquímetro digital (Digimess, Shiko Precision Gaging Ltd, China) (Figura 1).

Figura 1. A- Canino superior hígido; B- Secção da amostra com disco diamantado dupla face. C- Raiz seccionada padronizando o comprimento em 17 mm com auxílio de um paquímetro digital; C- Instrumento rotatório de níquel titânio do sistema K3 (#50.02), correspondente ao diâmetro final, acoplado no contra ângulo redutor durante preparo biomecânico do canal radicular.

Inicialmente 40 raízes tiveram o canal radicular irrigado e inundado com 2 mL de NaOCl 1%, usando-se seringa plástica descartável (Ultradent Products Inc., South Jordan, UT, EUA) e agulha NaviTip (Ultradent Products Inc., South Jordan, UT, EUA). A exploração do canal foi realizada com lima manual # 10 tipo K de aço inóx (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Suíça) seguida do preparo com brocas LA Axxess 35.06, 45.06 (Sybron Endo, Orange, CA, EUA) montadas em micromotor, em baixa rotação e sem irrigação. Estas brocas foram introduzidas uma única vez no

sentido do longo eixo do canal até a profundidade correspondente a um terço do comprimento do dente para remoção do ombro palatino e preparo da região cervical.

O canal radicular foi novamente irrigado com 2 mL de NaOCl 1% e uma lima manual # 10 tipo K de aço inóx (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Suíça) foi cuidadosamente introduzida no interior do canal até que sua ponta coincidisse com o forame apical, alcançando o comprimento real do dente (CRD). Foi subtraído 1 mm do CRD, estabelecendo o comprimento de trabalho (CT).

O preparo biomecânico dos canais radiculares foi realizado com instrumentos do sistema rotatório K3 (Sybron Endo, Orange, CA, EUA), acionados por motor pneumático (Dentflex, Ribeirão Preto, SP, Brasil) com velocidade aproximada de 350 rpm, seguindo a seguinte sequência: 25/.02, 25/.04, 30/.02, 30/.04, 35/.02, 40/.02, 45/.02, e por fim 50/.02. Os instrumentos com taper .02 e .04 foram introduzidos até o CT, e utilizou-se o instrumento 25.06 apenas no terço médio/cervical do canal quando foi necessário remover alguma interferência cervical que impedisse que os demais instrumentos percorressem todo o CT.

Os canais radiculares foram irrigados com 2 mL de NaOCl 1% a cada troca de instrumento e ao final do preparo utilizou-se 5 mL de EDTA 17%, durante 5 minutos. Em seguida, os canais foram irrigados com 2 mL de NaOCl 1% e, finalmente, com 10 mL de água destilada para neutralização de resíduos do NaOCl e do EDTA (NAGAS, ALTUNDASAR e SERPER, 2009). Vale ressaltar que o tempo do preparo biomecânico foi cronometrado em 20 minutos, com a finalidade de padronizar o tempo de ação das soluções sobre a dentina radicular. A água destilada e deionizada e as soluções de NaOCl 1% e EDTA 17% foram aviadas no Laboratório de Gerenciamento de Resíduos Odontológicos da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto.

Outras 10 raízes foram submetidas ao mesmo preparo biomecânico descrito, entretanto, em todos os momentos em que se fez uso de soluções irrigantes foi utilizado água destilada e deionizada, totalizando 50 raízes utilizadas neste estudo.

Os espécimes foram distribuídos aleatoriamente em cinco grupos, de acordo com o tratamento de superfície a que foram submetidas: GI – irrigação com água destilada; GII – irrigação com NaOCl 1% e final com EDTA 17% ; GIII - irrigação com NaOCl 1%, EDTA 17% seguido da irradiação com laser Diodo 980 nm (Sirona Dental, Bensheim, HE, Alemanha); GIV - irrigação com NaOCl 1%, EDTA 17% seguido da irradiação com Nd:YAG 1064 nm (Deka, Florença, Toscana, Itália); GV - irrigação com NaOCl 1%, EDTA 17% seguido da irradiação com Er,Cr:YSGG 2780 nm Waterlase MD Turbo Laser (Biolase, San Clemente, CA, EUA), conforme exposto na Figura 2.

Figura 2. Fluxograma representativo da distribuição dos grupos em estudo, divididos de acordo com o tratamento de superfície realizado.

Os espécimes dos grupos III, IV e V foram irradiados utilizando os lasers Diodo, Nd:YAG e Er,Cr:YSGG, respectivamente, todas elas irradiadas paralelamente e com a mesma cinemática. A irradiação do laser foi aplicada por 20 segundos em cada raiz, iniciando com a ponta no comprimento de trabalho e realizando movimento helicoidal ao longo do mesmo até a cervical, retornando, em seguida, ao ápice com velocidade aproximada de 1,5 mm/s. As potências dos lasers foram

aferidas, a cada subgrupo estudado, por meio do sistema de calibração do próprio aparelho.

Os espécimes do GIII (n=10) foram irradiados com laser Diodo 980 nm por meio de fibra ótica flexível de 200 μ m de diâmetro, 1,5 W de potência e com o aparelho calibrado no modo contínuo (CW) (Figura 3).

Figura 3. A- Laser Diodo 980 nm Sirona; B- Fibra ótica flexível de 200 μ m de diâmetro utilizada para irradiação.

No grupo GIV (n=10), os espécimes foram irradiados com laser Nd:YAG, comprimento de onda de 1064nm, por meio de fibra ótica de quartzo com 250 μ m de diâmetro, potência de 1,5W com taxa de repetição de 25Hz (Figura 4).

Figura 4. A- Laser Nd:YAG1064 nm Deka; B- Fibra ótica de quartzo de 250 μ m de diâmetro utilizada para irradiação.

Previamente à irradiação os canais radiculares dos espécimes dos grupos GIII e GIV foram inundados por água destilada e deionizada, aspirando o excesso com o objetivo de manter os canais radiculares umedecidos durante a irradiação. Após a irradiação de cada espécime, foram cortados 2 mm da extremidade da fibra do laser para garantir que ao iniciar uma nova aplicação, o seu revestimento não apresentasse pequenas áreas queimadas.

Os espécimes do GV (n=10) foram irradiados com o laser Er,Cr:YSGG, comprimento de onda de 2780 nm, utilizando-se uma fibra ótica coberta com safira (ponta RFT2) com 275 µm de diâmetro e 25 mm de comprimento, com 25 Hz de frequência, potência de 1,5 W, utilizando uma porcentagem de ar de 10% e água de 10% do sistema de refrigeração do equipamento. Após cada aplicação, a ponta utilizada para a irradiação foi analisada, com auxílio de lupa, antes da próxima aplicação, a fim de observar a presença de áreas queimadas na sua superfície. Quando a superfície apresentou-se irregular ou queimada, a ponta foi descartada (Figura 5).

Figura 5. A- Laser Er,Cr:YSGG Water Lase MD Turbo Laser 2780 nm; B - Ponta RFT2 de 275 µm de diâmetro e 25 mm de comprimento.

Após a aplicação dos lasers, foi realizada a secagem dos canais com pontas de papel absorvente padronizadas 50.02 (Dentsply Maillefer, Petrópolis, RJ, Brasil),

e os espécimes foram armazenados em estufa a 37 °C com 95% de umidade relativa por 48 horas.

Um disco diamantado (KG Sorensen, Barueri, SP, Brasil), em baixa rotação (Dabi Atlante, Ribeirão Preto, SP, Brasil), foi então utilizado para confecção de sulco longitudinal ao longo de superfícies vestibular e palatina da raiz, tomando cuidado para não atingir o canal radicular. Os espécimes foram então clivados longitudinalmente com espátula Lecron, permitindo as análises das alterações químicas e ultraestruturais geradas na dentina radicular após os tratamentos de superfície a que foram submetidos (Figura 6).

Figura 6. A- Marcação realizada no centro das faces vestibular e palatina da raiz; B- Confecção de sulco com disco diamantado dupla face; C- Fratura da raiz com espátula Lecron; D- Raiz bipartida.

Análise da composição orgânica e inorgânica por meio da espectroscopia Raman (Raman)

Os dentes foram submetidos à análise da composição orgânica e inorgânica da superfície dentinária do canal radicular por meio de microscópio Raman (Horiba Jobin Yvon, Edison, NJ, EUA) do Departamento de Engenharia Aeroespacial da Universidade Case Western Reserve em Cleveland, Ohio.

Inicialmente o sistema foi calibrado utilizando o conhecido pico de $520,7\text{ cm}^{-1}$ de uma bolacha de silício. Uma objetiva 10x (Olympus) foi utilizada para focalizar a luz gerada por uma fonte de laser com comprimento de onda de 785 nm. O ponto de

excitação resultante foi de cerca de 10 μm de diâmetro e a penetração do laser foi cerca de 100 μm . A diferença de energia dos fótons incidentes e dos fótons espalhados inelasticamente é a energia Raman.

As duas hemissecções de todos os espécimes foram analisadas. O microscópio foi equipado com guias de 3 eixos controlados pelo computador permitindo localizar o posicionamento específico do laser na amostra, dessa forma a raiz foi medida e dividida em três terços ao longo do eixo y: cervical, médio e apical. Três medidas foram realizadas dentro de cada terço, em cada hemissecção, totalizando 6 espectros por terço, a fim de obter a mineralização média dentro de cada região (Figura 7).

Figura 7. A- Divisão esquemática dos terços radiculares e demarcação dos pontos avaliados nas duas hemissecções da raiz, totalizando 6 análises por terço; B- Microscópio Raman (Horiba Jobin Yvon, Edison, NJ, EUA) utilizado.

As medidas foram obtidas utilizando grade de 1200 linhas/mm, que forneceu uma resolução de número de onda de $1,25 \text{ pixels.cm}^{-1}$. Cada espectro foi obtido como a média de 20 espectros consecutivos, cada um deles recolhido durante 4 segundos.

A intensidade dos picos PO_4^{3-} e CH_2 no espectro de Raman são proporcionais à quantidade de conteúdo mineral e colágeno, respectivamente, que dispersam sinais Raman muito fortemente (Figura 8). Além disso, a análise da razão entre compostos inorgânicos e orgânicos também foi realizada. A figura 8 apresenta um espectro típico da dentina do canal radicular representado em gráfico de intensidade (unidade arbitrária –cts) por unidade de energia expressa em número de onda (cm^{-1}). O número de onda é medido no inverso do comprimento de onda e se refere a quantidade de energia, dessa forma onde aparecem os picos intensos é onde existem muitas moléculas vibrando, onde há ressonância de estruturas moleculares.

Figura 8. Espectro Raman típico da dentina radicular – pico PO_4^{3-} referente ao conteúdo mineral e pico CH_2 referente ao colágeno.

Quantificação dos elementos químicos por meio de espectroscopia por energia dispersiva de raios X (EDS)

Para a quantificação de elementos químicos sobre as superfícies tratadas, foram selecionadas aleatoriamente 5 hemissecções de 5 amostras distintas ($n=5$) para cada grupo experimental. Estes espécimes foram deixados em cuba ultrassônica contendo água destilada por 20 minutos. Em seguida as amostras foram

secas com jato de ar suavemente e armazenadas a 37°C durante 24 horas. Passado este período as amostras foram sequencialmente desidratadas em bateria alcoólica em crescentes concentrações (25°, 50°, 60°, 70°, 80° e 96° GL) deixadas por 20 minutos em cada uma delas, e posteriormente em solução de 100° GL por 1 hora, seguido de imersão em hexametildisilizano (HMDS, Ted Pella, Redding, CA, EUA) por 10 minutos para fixar o colágeno. Após este processo, as amostras foram mantidas em estufa a 37°C durante 24 horas, sendo então retiradas para análise.

Os espécimes foram então fixados em estruturas cilíndricas de alumínio utilizando-se fita adesiva de dupla face (Electron Microscopy Sciences, Washington, EUA). Vale ressaltar que para a análise por EDS não foi realizado recobrimento da amostra a fim de evitar contaminação ou interferência da liga metálica na detecção dos elementos químicos presentes na superfície.

Foram obtidos espectros dos terços cervical, médio e apical e quantificado a porcentagem em peso (wt%) dos elementos químicos presentes na superfície por meio espectrômetro (500 Digital Processing, IXRF Systems, Houston, EUA) acoplado ao microscópio eletrônico de varredura (EVO 50, Carls nZeiss, Cambridge, Inglaterra) e avaliada a razão entre os elementos químicos cálcio e fósforo (Ca/P) (Figura 9).

Figura 9. Espectrômetro (A) acoplado ao microscópio eletrônico de varredura (B) utilizados para as análises por MEV e EDS.

Figura 10. Espectro de raios x por dispersão em energia.

Avaliação ultraestrutural da dentina por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Foram selecionadas aleatoriamente 3 hemisecções correspondentes a 3 amostras distintas para cada grupo experimental (n=3). O preparo e desidratação das amostras foram realizados pelo mesmo método descrito anteriormente. Os espécimes foram fixados em cilindros metálicos, e então metalizadas com uma fina camada de ouro de ~ 300 Å (Bal-Tec SCD, Balzers, Bal-TecCo.,EUA) sob vácuo, em aparelho (Denton Vacuum Desk II, Moorestown, New Jersey, NJ, EUA).

Foi realizada a varredura de toda a superfície para verificar as alterações causadas no tecido dentinário por meio de microscópio eletrônico de varredura, operando a 20 kV em diferentes ampliações, e então capturadas fotomicrografias das áreas representativas para avaliação qualitativa dos terços cervical, médio e apical.

Análise estatística

Uma vez que os dados de composição inorgânica, composição orgânica, razão composição inorgânica/orgânica e elementos químicos (oxigênio, cálcio, fósforo, carbono e razão cálcio/fósforo) apresentaram distribuição normal (Shapiro-Wilk, $p > 0,05$) e homogeneidade de variância (teste de Levene, $p > 0,05$), foram utilizados testes paramétricos para a análise estatística destes dados. A análise de variância (ANOVA um fator) com parcela subdividida foi utilizada para avaliar a influência do tratamento de superfície (água, NaOCl + EDTA, NaOCl + EDTA + Diodo, NaOCl + EDTA + Nd:YAG, NaOCl + EDTA + Er,Cr:YSGG) e terços radiculares (cervical, médio e apical) nos valores de composição inorgânica, composição orgânica, razão composição inorgânica/orgânica e elementos químicos. Foi utilizado o teste de Tukey para comparações múltiplas entre os grupos e o nível de probabilidade foi de 95% para todas as análises.

*R*ESULTADOS

Espectroscopia Raman

Análise do componente inorgânico – pico de hidroxiapatita.

Os valores das médias e desvios-padrão e os dados originais indicando o componente inorgânico estão demonstrados na Tabela I.

Tabela I. Valores originais, médias e desvio padrão, em unidade arbitrária (cts), do componente inorgânico para cada tratamento de superfície testado nos terços cervical, médio e apical.

Terço radicular	Tratamento de Superfície					$\bar{X}$
	Água	NaOCl + EDTA	NaOCl + EDTA + Diodo	NaOCl + EDTA + Nd:YAG	NaOCl + EDTA + Er,Cr:YSGG	
Cervical	2690,33	2497,67	1863,67	2560,00	2097,00	2262.0 ± 395.6
	1944,33	2589,00	1546,00	2480,33	2197,50	
	1932,83	2178,67	2142,83	3363,17	2424,17	
	1771,00	2588,33	2006,17	2225,00	2493,67	
	2351,00	2231,17	1617,33	2322,17	3854,50	
	2257,50	2119,33	2425,50	2017,83	2090,83	
	2077,33	2177,83	1710,50	2689,50	2657,00	
	2469,17	1892,83	2208,17	2025,67	2238,50	
	1949,67	2275,50	1965,33	2110,17	2632,83	
	2141,17	2135,00	2049,83	2577,67	2240,83	
	2158,4 ± 283,6	2268,5 ± 225,2	1953,5 ± 275,3	2437,2 ± 403,9	2492,7 ± 520,6	
Médio	2137,67	3202,67	2665,33	2297,50	2989,83	2681.3 ± 691.6
	2228,83	2593,67	2001,67	4291,33	2973,83	
	1991,17	2504,83	1805,33	2841,50	2813,17	
	3653,50	2462,50	1910,17	3863,17	2878,83	
	2460,00	3840,33	1904,50	2534,17	2732,33	
	2010,50	1908,50	4595,83	2977,67	1830,83	
	2609,50	2443,83	2595,33	2411,67	3926,00	
	2072,50	2298,50	2908,17	2343,17	3524,83	
	3609,50	2343,33	1874,83	2554,50	2365,83	
	1631,33	2020,83	3512,67	2900,17	3217,17	
	2440,5 ± 681,5	2561,9 ± 568,6	2577,4 ± 905,9	2901,5 ± 669,8	2925,3 ± 578,8	
Apical	2901,50	2937,00	2027,67	3337,33	2911,50	3047.3 ± 677.3
	2385,33	2645,00	2387,17	3706,67	2249,17	
	2771,00	3292,17	2467,50	3688,83	3211,50	
	4279,00	3314,67	2848,00	2463,00	2451,83	
	2822,33	4222,33	3208,33	2560,33	3029,83	
	3551,67	3822,33	4393,50	4899,00	3611,33	
	2578,67	3915,17	2493,50	2500,17	3007,50	
	2963,00	1956,50	3819,33	3019,33	2855,00	
	2812,33	2265,33	2727,00	2554,50	2184,83	
	2062,50	3569,67	4206,50	3129,00	3348,83	
	2912,7 ± 617,2	3194,0 ± 737,8	3057,8 ± 819,0	3185,9 ± 767,0	2886,1 ± 467,7	
$\bar{X}$	2503.9 ± 622.5	2674.8 ± 662.8	2529.6 ± 835.4	2841.5 ± 686.3	2768.0 ± 543.6	

A análise de variância evidenciou não haver diferença na intensidade do pico de hidroxiapatita entre os diferentes tratamentos de superfície avaliados ($P=0,183$), assim como para a interação do tratamento de superfície e terço radicular ($P=0,256$). Entretanto observa-se que houve diferença no componente inorgânico, ou seja, na hidroxiapatita, entre os terços radiculares ($P<0,001$) (Tabela II).

Tabela II. Resultados da análise de variância para comparação entre tratamento de superfície e terço radicular.

Fonte de variação	DF	Soma dos Quadrados	Quadrados médios	F	P
Tratamento de superfície	3	0,063	0,021	1,709	0,183
Terço radicular	2	0,316	0,158	25,23	<0,001
Tratamento/Terço	6	0,050	0,008	1,328	0,256
Resíduo	72	0,450	0,006		
Total	119	1,321			

Quanto aos terços radiculares o teste de Tukey evidenciou que no terço cervical a intensidade do pico de hidroxiapatita foi menor que o terço médio, que por sua vez foi menor que o terço apical ($P<0,05$) (Tabela III).

Tabela III. Médias $\pm$ desvios-padrão do conteúdo inorgânico (cts) nos diferentes terços radiculares.

Terço radicular	Componente inorgânico
Cervical	2262,0 $\pm$ 395,6 A
Médio	2681,3 $\pm$ 691,6 B
Apical	3047,3 $\pm$ 677,3 C

* Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos experimentais ao teste de Tukey ($p < 0,05$).

Análise do componente orgânico - pico de colágeno

Os valores das médias e desvios-padrão e os dados originais indicando o componente orgânico estão demonstrados na Tabela IV.

Tabela IV. Valores originais, médias e desvio padrão, em unidade arbitrária (cts), do componente orgânico para cada tratamento de superfície testado nos terços cervical, médio e apical.

Terço radicular	Tratamento de Superfície					$\bar{X}$
	Água	NaOCl + EDTA	NaOCl + EDTA + Diodo	NaOCl + EDTA + Nd:YAG	NaOCl + EDTA + Er,Cr:YSGG	
Cervical	304,00	289,17	282,50	286,50	262,00	289.1 ± 28.5
	283,67	306,50	279,17	273,33	247,00	
	313,67	336,33	272,00	359,17	286,00	
	275,67	293,00	283,33	339,50	263,33	
	298,33	326,33	277,33	299,00	341,17	
	334,33	273,33	283,17	271,83	220,50	
	266,17	300,00	261,83	299,67	284,67	
	313,17	278,33	271,50	270,83	270,50	
	251,67	307,50	273,17	311,50	307,50	
	305,00	266,50	288,83	339,33	227,00	
	294,6 ± 25,0	297,7 ± 22,4	277,3 ± 7,8	305,1 ± 31,7	271,0 ± 36,3	
Médio	313,33	320,00	307,83	284,00	267,50	308.9 ± 41.0
	327,83	323,00	244,00	348,67	311,50	
	316,17	308,17	232,00	324,67	300,50	
	332,17	299,17	246,67	368,67	280,83	
	346,17	332,83	247,00	320,67	337,00	
	299,50	259,50	379,17	302,83	191,17	
	380,17	352,33	292,17	295,00	357,33	
	279,00	302,83	378,00	295,83	321,67	
	371,33	356,50	265,33	308,67	273,33	
	301,00	261,83	351,17	336,33	294,17	
	326,7 ± 32,0	311,6 ± 32,9	294,3 ± 57,1	318,5 ± 26,6	293,5 ± 45,8	
Apical	594,00	481,83	268,50	341,00	302,83	347.9 ± 62.1
	356,67	408,50	283,17	343,83	240,67	
	425,83	437,00	284,17	350,83	333,83	
	396,83	345,67	322,83	322,33	265,50	
	308,00	387,33	316,00	344,50	346,67	
	340,33	349,50	391,00	395,33	314,17	
	281,17	438,67	414,67	296,00	303,67	
	334,00	317,67	345,17	322,50	367,50	
	314,17	351,83	352,33	308,67	282,33	
	284,33	405,67	419,83	336,00	319,33	
	363,5 ± 93,2	392,4 ± 51,5	339,8 ± 54,8	336,1 ± 27,1	307,6 ± 37,9	
$\bar{X}$	328.3 ± 63.5	333.9 ± 55.8	303.8 ± 51.8	319.9 ± 30.4	290.7 ± 41.7	

A análise de variância evidenciou que houve diferença na intensidade de pico de colágeno (composição orgânica) entre os diferentes tratamentos de superfície

avaliados ($P=0,006$) e entre os terços radiculares ($P<0,001$). No entanto, a interação do tratamento de superfície e terço radicular não influenciou a intensidade de colágeno ($P=0,207$) (Tabela V).

Tabela V. Resultados da análise de variância para comparação entre tratamento de superfície e terço radicular.

Fonte de variação	DF	Soma dos Quadrados	Quadrados médios	F	P
Tratamento de superfície	3	31875,2	10625,1	4,62	0,006
Terço radicular	2	66652,1	33326,1	30,73	<0,001
Tratamento/Terço	6	18155,0	3025,8	2,79	0,207
Resíduo	72	78071,4	1084,3		
Total	119	277465,9	2331,6		

O teste de Tukey evidenciou que o laser Er,Cr:YSGG promoveu a maior alteração na estrutura de colágeno (componente orgânico) quando comparado aos grupos tratados com água e NaOCl + EDTA ($P<0,05$). Os grupos tratados com os lasers Diodo e Nd:YAG apresentaram valores intermediários, ora semelhantes ao laser Er,Cr:YSGG e ora semelhantes aos grupos tratados com água e NaOCl e EDTA, sem irradiação ($P>0,05$) (Tabela VI).

Tabela VI. Médias $\pm$ desvios-padrão do conteúdo orgânico (cts) nos diferentes tratamentos de superfície.

Tratamento de Superfície	Componente orgânico
Água	328,3 $\pm$ 63,5 A
NaOCl + EDTA	333,9 $\pm$ 55,8 A
NaOCl + EDTA + Diodo	303,8 $\pm$ 51,8 AB
NaOCl + EDTA + Nd:YAG	319,9 $\pm$ 30,4 AB
NaOCl + EDTA + Er,Cr:YSGG	290,7 $\pm$ 41,7 B

• Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos experimentais ao teste de Tukey ($p < 0,05$).

Quanto aos terços radiculares o teste de Tukey evidenciou menor quantidade de estrutura de colágeno no terço cervical que o terço médio, que por sua vez foi menor que o terço apical ($P<0,05$) (Tabela VII).

Tabela VII. Médias $\pm$ desvios-padrão do conteúdo orgânico (cts) nos diferentes terços radiculares.

Terço radicular	Componente orgânico
Cervical	289,1 $\pm$ 28,5 A
Médio	308,9 $\pm$ 41,0 B
Apical	347,9 $\pm$ 62,1 C

- Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos experimentais ao teste de Tukey ($p < 0,05$).

Análise da razão componente inorgânico/componente orgânico

Os valores das médias e desvios-padrão e os dados originais constam na Tabela VIII.

Tabela VIII. Valores originais, médias e desvio padrão da razão mineral/colágeno para cada tratamento de superfície testado.

Terço radicular	Tratamento de superfície					$\bar{X}$
	Água	NaOCl + EDTA	NaOCl + EDTA + Diodo	NaOCl + EDTA + Nd:YAG	NaOCl + EDTA + Er,Cr:YSGG	
Cervical	8,85	8,64	6,60	8,94	8,00	7.7 $\pm$ 1.1
	6,85	8,45	5,54	9,07	8,90	
	6,16	6,48	7,88	9,36	8,48	
	6,42	8,83	7,08	6,55	9,47	
	7,88	6,84	5,83	7,77	11,30	
	6,75	7,75	8,57	7,42	9,48	
	7,80	7,26	6,53	8,97	9,33	
	7,88	6,80	8,13	7,48	8,28	
	7,75	7,40	7,19	6,77	8,56	
	7,02	8,01	7,10	7,60	9,87	
	7,3 $\pm$ 0,8	7,6 $\pm$ 0,8	7,0 $\pm$ 1,0	8,0 $\pm$ 1,0	9,2 $\pm$ 1,0	
Médio	6,82	10,01	8,66	8,09	11,18	8.6 $\pm$ 1.6
	6,80	8,03	8,20	12,31	9,55	
	6,30	8,13	7,78	8,75	9,36	
	11,00	8,23	7,74	10,48	10,25	
	7,11	11,54	7,71	7,90	8,11	
	6,71	7,35	12,12	9,83	9,58	
	6,86	6,94	8,88	8,18	10,99	
	7,43	7,59	7,69	7,92	10,96	
	9,72	6,57	7,07	8,28	8,66	
	5,42	7,72	10,00	8,62	10,94	
	7,4 $\pm$ 1,7	8,2 $\pm$ 1,5	8,6 $\pm$ 1,5	9,0 $\pm$ 1,4	10,0 $\pm$ 1,1	
Apical	4,88	6,10	7,55	9,79	9,61	8.8 $\pm$ 1.5
	6,69	6,47	8,43	10,78	9,35	
	6,51	7,53	8,68	10,51	9,62	
	10,78	9,59	8,82	7,64	9,23	
	9,16	10,90	10,15	7,43	8,74	
	10,44	10,94	11,24	12,39	11,49	
	9,17	8,93	6,01	8,45	9,90	
	8,87	6,16	11,07	9,36	7,77	
	8,95	6,44	7,74	8,28	7,74	
	7,25	8,80	10,02	9,31	10,49	
	8,3 $\pm$ 1,2	8,2 $\pm$ 1,9	9,0 $\pm$ 1,7	9,4 $\pm$ 1,5	9,4 $\pm$ 1,1	
$\bar{X}$	7.7 $\pm$ 1.4	8.0 $\pm$ 1.3	8.2 $\pm$ 1.6	8.8 $\pm$ 1.4	9.5 $\pm$ 1.1	

A análise de variância evidenciou que os diferentes tipos de tratamentos de superfície estudados alterou a razão componente inorgânico/orgânico ($P < 0,001$). Da mesma forma, houve diferença na razão componente inorgânico/orgânico entre os terços radiculares ($P < 0,001$). No entanto a interação dos fatores tratamento de superfície e terço radicular não afetou a razão componente inorgânico/orgânico ($P = 0,346$) (Tabela IX).

Tabela IX. Resultados da análise de variância para a comparação entre tratamento de superfície e terço radicular.

Fonte de variação	DF	Soma dos Quadrados	Quadrados médios	F	P
Tratamento de superfície	4	62,8	15,71	5,99	<0,001
Terço radicular	2	28,3	14,14	9,35	<0,001
Tratamento/Terço	8	13,8	1,72	1,14	0,346
Resíduo	90	136,1	1,51		
Total	149	359,1	2,41		

O teste de Tukey evidenciou que as raízes tratadas com NaOCl + EDTA + Er,Cr:YSGG apresentou maiores valores de razão componente inorgânico/orgânico comparado aos grupos tratados com água, NaOCl + EDTA e NaOCl + EDTA + Diodo ($P < 0,05$). Já o laser Nd:YAG apresentou valores intermediários de razão componente inorgânico/orgânico, sendo ora semelhante aos grupos tratados com água, NaOCl + EDTA e NaOCl + EDTA + Diodo, e ora semelhante ao grupo tratado com laser NaOCl + EDTA + Er,Cr:YSGG (Tabela X).

Tabela X. Médias $\pm$ desvios-padrão da razão mineral/colágeno nos tratamentos de superfície.

Tratamento de Superfície	Razão componente inorgânico/orgânico
Água	7,7 $\pm$ 1,4A
NaOCL + EDTA	8,0 $\pm$ 1,3A
NaOCl + EDTA + Diodo	8,2 $\pm$ 1,6A
NaOCl + EDTA + Nd:YAG	8,8 $\pm$ 1,4 AB
NaOCl + EDTA + Er,Cr:YSGG	9,5 $\pm$ 1,1B

* Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos experimentais ao teste de Tukey ($p < 0,05$).

Quanto aos terços radiculares o teste de Tukey evidenciou que a razão componente inorgânico/orgânico foi menor para o terço cervical comparado ao terço médio e apical ($P < 0,05$), não havendo diferenças entre estes ($P > 0,05$) (Tabela XI).

Tabela XI. Médias $\pm$ desvios-padrão da razão mineral/colágeno nos diferentes terços radiculares.

Terço radicular	Razão componente inorgânico/orgânico
Cervical	$7,7 \pm 1,1$ A
Médio	$8,6 \pm 1,6$ B
Apical	$8,8 \pm 1,5$ B

* Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos experimentais ao teste de Tukey ($p < 0,05$).

Espectroscopia por energia dispersiva de raios-X

A tabela XII apresenta os dados obtidos nas análises de EDS relativos aos elementos químicos O – oxigênio, Ca – cálcio, P – fósforo, C – carbono. Os elementos químicos Na – sódio e Mg - magnésio, apresentaram valores menores que 2% em massa (wt%) em todas as amostras avaliadas.

Tabela XII. Porcentagem de cada elemento analisado nos diferentes grupos experimentais.

Concentração do elemento químico em wt.%						
Elemento químico	Terço radicular	Água	NaOCl+EDTA	NaOCl + EDTA+ Diodo	NaOCl + EDTA+ Nd:YAG	NaOCl + EDTA+ Er,Cr:YSGG
O	C	$42,2 \pm 4,5$	$44,5 \pm 4,3$	$41,3 \pm 8,7$	$40,2 \pm 3,5$	$43,0 \pm 5,8$
	M	$42,3 \pm 5,3$	$43,7 \pm 4,7$	$41,0 \pm 5,2$	$40,2 \pm 3,9$	$45,3 \pm 6,2$
	A	$38,7 \pm 7,2$	$42,9 \pm 4,4$	$39,3 \pm 8,8$	$39,6 \pm 7,0$	$45,5 \pm 4,5$
Ca	C	$22,9 \pm 5,4$	$20,0 \pm 7,2$	$23,8 \pm 11,9$	$28,4 \pm 8,2$	$23,8 \pm 7,3$
	M	$22,5 \pm 12,0$	$21,7 \pm 7,9$	$22,7 \pm 12,9$	$26,5 \pm 11,4$	$16,6 \pm 11,4$
	A	$33,4 \pm 8,2$	$17,4 \pm 10,8$	$29,6 \pm 12,7$	$26,1 \pm 12,5$	$15,2 \pm 13,6$
P	C	$15,2 \pm 4,2$	$14,0 \pm 3,2$	$14,5 \pm 4,0$	$16,7 \pm 2,8$	$15,1 \pm 1,8$
	M	$14,2 \pm 6,7$	$15,0 \pm 4,3$	$13,5 \pm 6,1$	$15,8 \pm 4,5$	$11,7 \pm 4,7$
	A	$18,0 \pm 1,9$	$10,5 \pm 4,7$	$16,3 \pm 3,6$	$14,9 \pm 4,6$	$10,3 \pm 7,1$
C	C	$17,4 \pm 13,2$	$19,7 \pm 9,0$	$18,5 \pm 8,3$	$12,9 \pm 7,4$	$16,2 \pm 4,4$
	M	$18,9 \pm 14,6$	$17,7 \pm 9,7$	$21,2 \pm 16,2$	$15,6 \pm 12,0$	$24,7 \pm 12,8$
	A	$8,4 \pm 2,6$	$27,5 \pm 12,6$	$13,1 \pm 7,8$	$18,1 \pm 10,0$	$27,2 \pm 16,6$

A tabela XIII apresenta os dados obtidos dos valores da razão entre os elementos químicos cálcio e fósforo (Ca/P).

Tabela XIII. Valores da razão entre os elementos químicos cálcio e fósforo nos diferentes grupos experimentais.

Razão entre os elementos químicos Ca/P						
Razão	Terço	Água	NaOCl+EDTA	NaOCl + EDTA+ Diodo 980 nm	NaOCl + EDTA+ Nd:YAG	NaOCl + EDTA+ Er,Cr:YSGG
Ca/P	C	1,54± 0,8	1,40 ± 0,2	1,55 ± 0,5	1,68 ± 0,3	1,55 ± 0,4
	M	1,46 ± 0,3	1,43 ± 0,2	1,55 ± 0,4	1,60 ± 0,3	1,31 ± 0,4
	A	1,83± 0,3	1,55 ± 0,4	1,74 ± 0,5	1,66 ± 0,4	1,27 ± 0,4

A análise de variância para os elementos químicos oxigênio, cálcio, fósforo, carbono e razão cálcio/fósforo não evidenciou diferença estatística para os tratamentos de superfície, terço radicular e interação dos fatores ($P>0,05$).

Figura 11. Porcentagem de cada elemento analisado nos diferentes grupos experimentais.

Microscopia eletrônica de varredura

As imagens de microscopia eletrônica de varredura estão apresentadas nas Figuras 11 e 12. Qualitativamente observou-se que no grupo tratado com água (GI) a superfície do canal radicular encontra-se coberta por densa camada de *smear*, em todos os terços avaliados. No grupo tratado com soluções irrigantes (NaOCl + EDTA) sem o uso de laser (GII), observou-se superfície plana, com exposição de túbulos decrescente de cervical para apical, neste último a superfície se encontra coberta por densa camada de *smear*, semelhante ao que ocorre no GI (Figura 12).

Figura 12. Fotomicrografia da superfície dentinária do canal radicular dos grupos I e II nos terços cervical (A), médio (B) e apical (C) (2000x): **A1** – Água destilada - terço cervical: superfície coberta por uma densa e homogênea camada de *smear* com poucos túbulos dentinários expostos (setas). **B1 e C1** – Água destilada - terço médio e apical respectivamente: superfície coberta por uma densa e homogênea camada de *smear*. **A2** – NaOCl + EDTA terço cervical: túbulos dentinários expostos (setas), com alguns túbulos parcialmente obliterados. **B2** – NaOCl + EDTA - terço médio: túbulos dentinários expostos (setas), em menor quantidade do que no terço cervical, e túbulos parcialmente obliterados (quadrado). **C2** – NaOCl + EDTA terço apical: superfície coberta por densa e homogênea camada de *smear*.

Nos espécimes tratados com NaOCl 1%, EDTA 17% e laser Diodo (GIII), é possível observar maior quantidade de túbulos dentinários expostos no terço cervical quando comparado ao terço cervical do grupo tratado apenas com soluções. Já os terços médio e apical apresentam túbulos dentinários parcialmente obliterados, com

presença de camada de *smear* modificada, sendo que o terço apical apresenta menor quantidade de túbulos expostos quando comparado ao terço médio.

A superfície dentinária dos espécimes tratados com NaOCl 1%, EDTA 17% e laser Nd:YAG (GIV) apresentam-se livres de camada de *smear*, em todos os terços. No terço cervical e médio nota-se áreas de túbulos expostos, e áreas de fusão e resolidificação da superfície. No terço apical, é possível notar superfície uniforme, com fusão e resolidificação da dentina cobrindo toda a superfície.

As raízes tratadas com NaOCl 1%, EDTA 17% e laser Er,Cr:YSGG (GV) apresentam ausência de camada de *smear* para todos os terços. No terço cervical e médio nota-se túbulos expostos com intensa ablação da dentina intertubular e ligeira ablação da dentina peritubular, formando uma superfície áspera ablacionada e irregular, com formação de crateras, principalmente no terço cervical. No terço apical verifica-se túbulos dentinários expostos (Figura 13).

Figura 13. Fotomicrografia da superfície dentinária do canal radicular dos grupos III, IV e V, nos terços cervical (A), médio (B) e apical (C) (2000x): **A1** – NaOCl + EDTA + Diodo terço cervical: túbulos dentinários expostos (setas). **B1** – NaOCl + EDTA + Diodo, terço médio: túbulos dentinários expostos (setas) e presença de *smear* modificada (asterisco). **C1** – NaOCl + EDTA + Diodo, terço apical: camada de *smear* modificada (asterisco) com poucos túbulos expostos (setas) e túbulos parcialmente obliterados (quadrado). **A2, B2** - NaOCl + EDTA + Nd:YAG terço cervical e médio: áreas de túbulos dentinários expostos (setas) e áreas de fusão e resolidificação da dentina radicular (asterisco). **C2** – NaOCl + EDTA + Nd:YAG terço apical: superfície uniforme coberta por fusão e resolidificação. **A3** - NaOCl + EDTA + Er,Cr:YSGG terço cervical: túbulos expostos (setas) com áreas erosivas ao redor dos mesmos formando crateras (triângulos). **B3** - NaOCl + EDTA + Er,Cr:YSGG terço médio: ausência de camada de *smear*, túbulos dentinários expostos (setas) com áreas erosivas ao redor dos mesmos formando superfície irregular, porém menos intenso do que no terço médio. **C3** - NaOCl + EDTA + Er,Cr:YSGG terço apical: túbulos dentinários expostos (setas).

DISCUSSÃO

Os efeitos da irradiação dos diferentes lasers vêm sendo estudados na Endodontia (TAKEDA et al., 1998; ALFREDO et al., 2009; HE et al., 2009; DEWSNUP et al., 2010; YASUDA et al., 2010; MOURA-NETTO et al., 2011; FARIA et al., 2013; SADIK et al., 2013; AYRANCI; KOSEOGLU, 2014) com o objetivo de comprovar sua efetividade e viabilidade quando utilizados como recursos na terapêutica endodôntica.

Devido ao potencial de ação e aos inúmeros efeitos gerados pelos lasers de alta intensidade, é preciso cuidar para obter o efeito desejado sem causar alterações prejudiciais ao tecido dental e estruturas adjacentes. Neste sentido, estudos prévios avaliaram os efeitos térmicos e alterações morfológicas da dentina radicular irradiada com lasers de alta potência, a fim de determinar parâmetros seguros para aplicação dos diferentes lasers (YAMAZAKI et al., 2001; ISHIZAKI et al., 2004; ALFREDO et al., 2008; MARCHESAN et al., 2008; ABAD-GALLEGOS et al., 2009; HE et al., 2009; HMUD et al., 2010), sendo utilizados como referência para escolha dos parâmetros empregados neste estudo.

O presente estudo buscou, por meio dos três experimentos realizados, determinar as alterações químicas e morfológicas na dentina do canal radicular tratados com os lasers Diodo, Nd:YAG e Er,Cr:YSGG.

O uso da espectroscopia Raman possibilita a identificação de estruturas moleculares, uma vez que identifica modos vibracionais das moléculas como um todo, permitindo a identificação dos compostos orgânicos e inorgânicos presentes na dentina radicular, de forma não destrutiva e altamente precisa. Os espectros obtidos através deste método caracterizam a composição e concentração de substâncias minerais e orgânicas das superfícies analisadas criando parâmetros de comparação entre elas (LEUNG; MORRIS, 1995; TSUDA; ARENDS, 1997; AKKUS et al., 2003;

LIU; HSU, 2007; SOARES et al., 2009; PASCON et al., 2012). A espectroscopia por energia dispersiva de raios X (EDS) por sua vez permite quantificar pontualmente a porcentagem em peso de elementos químicos presentes na superfície, apresentando utilidade complementar neste estudo (SOARES, et al., 2009; PASCON et al. 2012).

A análise das características morfológicas da superfície por meio da microscopia eletrônica de varredura (MEV) nos permite interpretar os efeitos químicos dos tratamentos de superfície estudados, sendo de importante conhecimento para que se possa indicar corretamente o tratamento de superfície desejado para cada caso (MARCHESAN et al., 2008; ALFREDO et al., 2009; FARIA et al., 2011).

Os resultados obtidos no presente estudo por meio da espectroscopia Raman mostrou que o tratamento com laser Er,Cr:YSGG, diminuiu significativamente a estrutura de colágeno quando comparado aos demais tratamentos testados. Provavelmente a diferença encontrada entre os lasers é dada devido a maior absorbância do laser Er,Cr:YSGG pela água quando comparado aos demais lasers utilizados. O Er,Cr:YSGG provoca a vaporização da água e de outros componentes orgânicos hidratados como o colágeno (CEBALLOS et al., 2001, PÉCORA et al., 2000).

Já os lasers Nd:YAG 1064 nm e Diodo 980 nm, possuem pequeno comprimento de onda, e dessa forma possuem baixo coeficiente de absorção pela hidroxiapatita e pela água (CHANTHABOURY; IRINAKIS, 2005), assim o tratamento da superfície com laser Nd:YAG e Diodo apresentaram valores intermediários quanto a redução do conteúdo orgânico, ora semelhante aos grupos não irradiados, ora semelhante ao grupo irradiado com Er,Cr:YSGG.

Porém, a razão mineral/colágeno, que permite avaliar a proporção entre componentes orgânicos e inorgânicos, mostrou que o laser Diodo não foi capaz de promover grandes alterações, igualando-se ao grupo tratado com água, e ao grupo tratado com NaOCl 1% e EDTA 17%. Estudos comparativos das alterações morfológicas geradas pela irradiação com diferentes tipos de laser e tratamentos com soluções irrigantes na dentina, evidenciam que as alterações morfológicas geradas pelo laser Diodo é bastante semelhante às alterações obtidas pela associação NaOCl e EDTA, apresentando alterações menos intensas quando comparado a outros tipos de lasers (ESTEVES-OLIVEIRA et al., 2010; FARIA et al. 2011). Estudos sobre os efeitos químicos gerados na superfície dentinária dos canais radiculares após irradiação com laser Diodo 980 nm não foram encontrados na literatura, tornando importante salientar que não foram verificadas alterações químicas significativas quando utilizado nos parâmetros avaliados neste estudo.

A análise da razão mineral/colágeno confirma a redução significativa de compostos orgânicos no grupo irradiado com Er,Cr:YSGG quando comparado aos demais grupos avaliados, e mantém o grupo tratado com Nd:YAG em situação intermediária entre o grupo irradiado com Er,Cr:YSGG e os demais grupos.

Com relação aos compostos inorgânicos da dentina radicular, os resultados obtidos no presente estudo demonstraram que os lasers testados não foram capazes de alterá-los. Os resultados obtidos pela análise por espectroscopia por energia dispersiva de raios X, que identificou os elementos químicos O, Ca, P e C, permitindo a análise da razão Ca/P mostrou não haver diferença entre os diferentes tipos de tratamento de superfície avaliados. Isso ocorre provavelmente pela presença de água no interior do canal radicular no momento da irradiação, diminuindo a geração de calor por excesso de absorção de energia (ALTUNDASAR

et al., 2006). Vale salientar que estudos prévios utilizando o método de EDS ou outros métodos semelhantes, afirmam que mudanças na razão Ca/P podem alterar a proporção original entre compostos orgânicos e inorgânicos (ROTSTEIN et al., 1996; DOGAN e QALT, 2001).

O aumento de temperatura da dentina durante a irradiação dos lasers de alta potência pode promover vaporização da água, decomposição de proteínas, e os cristais de apatita podem derreter e recrystalizar rapidamente, gerando defeitos na estrutura dos mesmos, alterando a relação de Ca/P, ou seja, agindo no conteúdo mineral da dentina (HOSSAIN et al., 2002). Dessa forma, o que provavelmente preservou os compostos inorgânicos da estrutura dentinária no presente estudo foi a irradiação sobre superfície umedecida evitando o aumento excessivo da temperatura, o que provavelmente justifica a ausência de alterações significativas na composição inorgânica da dentina.

Alguns autores investigaram alterações na composição mineral da dentina após aplicação de lasers de alta potência e também não foram capazes de identificar diferenças. TOPÇUOGLU e KOSEOGLU (2015) estudaram o efeito dos lasers Er:YAG (1W) e Nd:YAG (1W) associado ao uso de NaOCl 1% na composição mineral da dentina por meio de espectrometria de emissão atômica (ICP- AES), e determinaram que estes lasers não afetam o conteúdo mineral. Estes resultados são compatíveis com os resultados de estudo publicado por GURBUZ et al.(2008) que demonstrou que o conteúdo mineral da dentina radicular não foi afetado significativamente após irradiação do laser Nd:YAG (1,5W). De modo semelhante, o trabalho de DILBER et al. (2013) mostrou que a irradiação da dentina com os lasers Er:YAG, Nd:YAG e KTP não alteraram a concentração de Ca, K, Mg, Na, P, ou a relação mineral Ca/P da superfície dentinária.

Em contraste, SECILMIS et al. (2008), relataram que a irradiação do laser Er,Cr:YSGG (1 W) aumentou as médias percentuais de peso dos elementos Ca, Mg, Na, e P, bem como a razão Ca/P dos seus grupos experimentais, porém este estudo foi realizado em dentina coronária e em um número reduzido de amostras, comprometendo a comparação entre os resultados. ALTUNDASAR et al.(2006) verificaram alterações moleculares nos níveis de Ca, P e Mg após irradiação do laser Er,Cr:YSGG (3W) na superfície dentinária previamente tratada com NaOCl 5,25%, porém a razão Ca/P não apresentou alterações significativas quando comparado aos demais grupos, sugerindo que as mudanças estão restritas ao nível molecular. Vale ressaltar que as diferenças no método de avaliação, na potência dos lasers utilizados, na concentração e no tempo de ação das soluções dificultam a comparação entre os estudos.

Os resultados deste estudo indicam que o uso NaOCl associado a irrigação final com EDTA não agiu na composição química da dentina radicular, uma vez que não houve diferença estatística quando comparado ao grupo tratado com água destilada. Em contraste, estudos avaliando o efeito de soluções irrigantes na composição mineral da dentina verificaram que tanto o EDTA quanto o NaOCl são capazes de alterar a estrutura mineral (SAYIN et al., 2007; BALLAL; MALA; BHAT, 2011; PASCON et al. 2012), provavelmente em função das diferentes metodologias utilizadas. Deve-se destacar que as análises empregadas nestes estudos são destrutivas, ao contrário da espectroscopia Raman que permite a análise química da superfície preservando a estrutura intacta (PASCON et al., 2012).

Os resultados deste trabalho mostraram também que existe uma variação na proporção de compostos orgânicos e inorgânicos entre os terços radiculares em todos os grupos avaliados, inclusive no grupo controle. A razão mineral/colágeno é

menor no terço cervical quando comparado aos demais terços, evidenciando menor grau de mineralização desse terço quando comparado aos demais, o que provavelmente é consequência da maior quantidade e diâmetro dos túbulos neste terço (PAQUÉ et al., 2006; LOTTANTI et al., 2009). Essa diferença de composição química característica do elemento dental entre os terços radiculares merece destaque, uma vez que interfere diretamente nos procedimentos adesivos e restauradores. Segundo NEELAKANTAN et al. (2012), a adesão de cimentos obturadores a base de resina epóxi é menor na região apical.

Os resultados qualitativos obtidos por meio da análise das alterações ultraestruturais em MEV mostraram que a aplicação do laser, independente do tipo de laser utilizado, resultou em alteração da morfologia quando comparados aos grupos tratados apenas com as soluções, sem irradiação.

A análise das alterações morfológicas após irradiação de laser Diodo verificou modificação da camada superficial de matriz orgânica, principalmente no terço médio e apical, e túbulos dentinários expostos. Morfologicamente as alterações geradas pelo laser Diodo foi a que mais se assemelhou às alterações verificadas no grupo tratado com NaOCl 1% e EDTA 17%, sem irradiação. Estes resultados são condizentes com as alterações morfológicas descritas em estudos prévios (MARCHESAN et al., 2008; ALFREDO et al., 2009; FARIA et al., 2011).

A irradiação da dentina radicular com os lasers Nd:YAG e Er,Cr:YSGG nos parâmetros utilizados mostrou remoção completa da camada de *smear* (SCHOOP et al., 2009). No grupo tratado com Er,Cr:YSGG observa-se áreas de ablação intensa de dentina intertubular com ligeira ablação peritubular. Já o laser Nd:YAG, proporcionou áreas de selamento de túbulos dentinários, por meio de fusão nos terços cervical e médio.

A dentina intertubular é rica em colágeno, enquanto que a dentina peritubular é mais mineralizada (LEVINE, 1971; PASHLEY et al. 1991). Sendo assim, as alterações morfológicas verificadas em MEV são condizentes com as alterações químicas observadas, nos permitindo concluir que o laser Er,Cr:YSGG alterou significativamente o colágeno intertubular, formando crateras. Já o laser Nd:YAG promoveu selamento dos túbulos sem alterar significativamente a composição química da dentina.

Deve-se destacar que os lasers utilizados apresentam fibras ópticas finas e flexíveis que permite atuar no interior do canal radicular e acompanhar as curvaturas do canal radicular (RAMSKOLD; FONG; STROMBERG, 1997), por meio de movimentos circulares/helicoidais, uma vez que a transmissão da luz ocorre apenas na ponta da fibra e de forma unidirecional (RAMSKOLD; FONG; STROMBERG, 1997; BRUGNERA et al., 2003).

O grupo tratado apenas com água destilada apresentou homogênea camada de *smear* cobrindo a superfície. No grupo tratado com NaOCl 1% e EDTA 17%, observa-se a exposição dos túbulos no terço cervical, o que também ocorre no terço médio, porém em menor quantidade, enquanto o terço apical encontra-se coberto por camada de *smear*, indicando a menor ação dessa solução neste terço, que é condizente com estudos prévios (MCCOMB; SMITH; BEAGRIE, 1976; KIRCHHOFF et al., 2014).

As modificações dentinárias observadas no presente estudo são importantes para que a indicação do tratamento de superfície seja feito corretamente. Áreas de derretimento encontradas na dentina irradiada com Nd:YAG podem alterar a permeabilidade dentinária e aumentar a força de adesão de cimentos obturadores, enquanto a remoção da camada de *smear* e exposição dos túbulos dentinários

obtidos por meio da irradiação com Er,Cr:YSGG podem facilitar a ação antimicrobiana das soluções irrigantes. Sendo assim, uma conduta terapêutica ideal, principalmente em casos refratários, seria aplicar do laser Er,Cr:YSGG após a instrumentação do canal radicular, para remoção da camada de *smear* e abertura dos túbulos dentinários, o que facilitaria a difusão não apenas da solução irrigante, como também da medicação intracanal, e aplicação do laser Nd:YAG com parâmetros específicos no sentido de selar os canalículos previamente a obturação do canal radicular.

Dessa forma, é importante que o cirurgião dentista entenda as alterações químicas e morfológicas que ocorrem na dentina radicular decorrentes dos diferentes tratamentos de superfície empregados na terapia endodôntica, a fim de indicar corretamente o tratamento de superfície desejado para cada situação clínica. Novos estudos devem ser conduzidos na intenção de avaliar as vantagens reais do uso das associações dos lasers de alta potência com soluções irrigantes, com o objetivo de estabelecer o protocolo ideal para cada caso.

CONCLUSÕES

Assim, com base na metodologia empregada e nos resultados obtidos neste estudo, é lícito concluir que:

- 1- Nenhum dos tratamentos de superfície estudados resultou em alterações no conteúdo inorgânico da dentina radicular.
- 2- O laser Er,Cr:YSGG 2780 nm (1,5W) associado ao uso prévio de NaOCl e EDTA apresentou capacidade de alterar a estrutura de colágeno.
- 3- Houve diferença entre os terços na intensidade dos picos de mineral e colágeno da dentina do canal radicular, onde o terço cervical apresenta razão mineral/colágeno menor quando comparada aos terços médio e apical.
- 4- O uso do laser, independente do tipo utilizado, resultou em alteração da morfologia quando comparados aos grupos tratados apenas com as soluções, sem irradiação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAD-GALLEGOS M., ARNABAT-DOMÍNGUEZ J., ESPAÑA-TOST A., BERINI-AYTÉS L., GAY-ESCODA C. In vitro evaluation of the temperature increment at the external root surface after Er,Cr:YSGG laser irradiation of the root canal. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, v. 14, n. 12, p. e658-62, 2009.

AKKUS O., POLYAKOVA-AKKUS A., ADAR F., SCHAFFLER M. B. Aging of microstructural compartments in human compact bone. **J Bone Miner Res**, v. 18, n. 6, p. 1012-9, 2003.

AL-AZZAWI, L. M.; DAYEM, R. N. A comparison between the occluding effects of the Nd:YAG laser and the desensitising agent sensodyne on permeation through exposed dentinal tubules of endodontically treated teeth: an in vitro study. **Arch Oral Biol**, v. 51, n. 7, p. 535-40, 2006.

ALFREDO E., MARCHESAN M. A., SOUSA-NETO M. D., BRUGNERA-JÚNIOR A., SILVA-SOUSA Y. T. Temperature variation at the external root surface during 980-nm diode laser irradiation in the root canal. **J Dent**, v. 36, n. 7, p. 529-34, 2008.

ALFREDO E., SOUZA-GABRIEL A. E., SILVA S. R., SOUSA-NETO M. D., BRUGNERA-JUNIOR A., SILVA-SOUSA Y. T. Morphological alterations of radicular dentine pretreated with different irrigating solutions and irradiated with 980-nm diode laser. **Microsc Res Tech**, v. 72, n. 1, p. 22-7, 2009.

ALTUNDASAR E., OZÇELIK B., CEHRELI Z. C., MATSUMOTO K. Ultramorphological and histochemical changes after ER,Cr:YSGG laser irradiation and two different irrigation regimes. **J Endod**, v. 32, n. 5, p. 465-8, 2006.

ANIĆ I., SEGOVIĆ S., KATANEC D., PRSKALO K., NAJZAR-FLEGER D. Scanning electron microscopic study of dentin lased with argon, CO₂, and Nd:YAG laser. **J Endod**, v. 24, n. 2, p. 77-81, 1998.

AYRANCI, L. B.; KOSEOGLU, M. The evaluation of the effects of different irrigating solutions and laser systems on adhesion of resin-based root canal sealers. **Photomed Laser Surg**, v. 32, n. 3, p. 152-9, 2014.

BAGO JURIČ I, PLEČKO V, ANIĆ I. Antimicrobial Efficacy of Er,Cr:YSGG Laser-Activated Irrigation Compared with Passive Ultrasonic Irrigation and RinsEndo(®) Against Intracanal Enterococcus faecalis. **Photomed Laser Surg**, v. 32, n. 11, p. 600-5, 2014.

BALLAL, N. V.; MALA, K.; BHAT, K. S. Evaluation of decalcifying effect of maleic acid and EDTA on root canal dentin using energy dispersive spectrometer. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 112, n. 2, p. e78-84, 2011.

BERUTTI E., CHIANDUSSI G., PAOLINO D. S., SCOTTI N., CANTATORE G., CASTELLUCCI A., PASQUALINI D. Canal shaping with WaveOne Primary reciprocating files and ProTaper system: a comparative study. **J Endod**, v. 38, n. 4, p. 505-9, 2012.

BORNSTEIN, E. Near-infrared dental diode lasers. Scientific and photobiologic principles and applications. **Dent Today**, v. 23, n. 3, p. 102-8, 2004.

BORRAJO J. L., VARELA L. G., CASTRO G. L., RODRÍGUEZ-NUÑEZ I., TORREIRA M. G. Diode laser (980 nm) as adjunct to scaling and root planing. **Photomed Laser Surg**, v. 22, n. 6, p. 509-12, 2004.

BRUGNERA A. JR., ZANIN F., BARBIN E. L., SPANÓ J. C., SANTANA R., PÉCORA J. D. Effects of Er:YAG and Nd:YAG laser irradiation on radicular dentine permeability using different irrigating solutions. **Lasers Surg Med**, v. 33, n. 4, p. 256-9, 2003.

CEBALLOS L., OSORIO R., TOLEDANO M., MARSHALL G. W. Microleakage of composite restorations after acid or Er-YAG laser cavity treatments. **Dent Mater**, v. 17, n. 4, p. 340-6, 2001.

CHANTHABOURY, R.; IRINAKIS, T. The use of lasers for periodontal debridement: marketing tool or proven therapy? **J Can Dent Assoc**, v. 71, n. 9, p. 653-8, 2005.

COLUZZI, D. J. An overview of laser wavelengths used in dentistry. **Dent Clin North Am**, v. 44, n. 4, p. 753-65, 2000.

DA COSTA RIBEIRO A., NOGUEIRA G. E., ANTONIAZZI J. H., MORITZ A., ZEZELE D. M. Effects of diode laser (810 nm) irradiation on root canal walls: thermographic and morphological studies. **J Endod**, v. 33, n. 3, p. 252-5, 2007.

DE ALMEIDA A. P., SOUZA M. A., MIYAGAKI D. C., BELLO Y. D., CECCHIN D., FARINA A. P. Comparative Evaluation of Calcium Hypochlorite and Sodium Hypochlorite Associated with Passive Ultrasonic Irrigation on Antimicrobial Activity of a Root Canal System Infected with *Enterococcus faecalis*: An In Vitro Study. **J Endod**, v. 40, n. 12, p. 1953–1957, 2014.

DELMÉ, K. I.; DE MOOR, R. J. Scanning electron microscopic evaluation of enamel and dentin surfaces after Er:YAG laser preparation and laser conditioning. **Photomed Laser Surg**, v. 25, n. 5, p. 393-401, 2007.

DEWSNUP N., PILEGGI R., HADDIX J., NAIR U., WALKER C., VARELLA C. H. Comparison of bacterial reduction in straight and curved canals using erbium, chromium:yttrium-scandium-gallium-garnet laser treatment versus a traditional irrigation technique with sodium hypochlorite. **J Endod**, v. 36, n. 4, p. 725-8, 2010.

DILBER E., MALKOC M. A., OZTURK A. N., OZTURK F. Effect of various laser irradiations on the mineral content of dentin. **Eur J Dent**, v. 7, n. 1, p. 74-80, 2013.

DOGAN, H.; QALT, S. Effects of chelating agents and sodium hypochlorite on mineral content of root dentin. **J Endod**, v. 27, n. 9, p. 578-80, 2001.

ESTEVEZ-OLIVEIRA M., DE GUGLIELMI C. A., RAMALHO K. M., ARANA-CHAVEZ V. E., DE EDUARDO C. P. Comparison of dentin root canal permeability and morphology after irradiation with Nd:YAG, Er:YAG, and diode lasers. **Lasers Med Sci**, v. 25, n. 5, p. 755-60, 2010.

FARIA M. I., SOUSA-NETO M. D., SOUZA-GABRIEL A. E., ALFREDO E., ROMEO U., SILVA-SOUSA Y. T. Effects of 980-nm diode laser on the ultrastructure and fracture resistance of dentine. **Lasers Med Sci**, v. 28, n. 1, p. 275-80, 2013.

FARIA M. I., SOUZA-GABRIEL A. E., ALFREDO E., MESSIAS D. C., SILVA-SOUSA Y. T. Apical microleakage and SEM analysis of dentin surface after 980 nm diode laser irradiation. **Braz Dent J**, v. 22, n. 5, p. 382-7, 2011.

FRANZEN R., GUTKNECHT N., FALKEN S., HEUSSEN N., MEISTER J. Bactericidal effect of a Nd:YAG laser on *Enterococcus faecalis* at pulse durations of 15 and 25 ms in dentine depths of 500 and 1,000 μm . **Lasers Med Sci**, v. 26, n. 1, p. 95-101, 2011.

GURBUZ T., OZDEMIR Y., KARA N., ZEHIR C., KURUDIREK M. Evaluation of root canal dentin after Nd:YAG laser irradiation and treatment with five different irrigation solutions: a preliminary study. **J Endod**, v. 34, n. 3, p. 318-21, 2008.

GUTKNECHT N., FRANZEN R., SCHIPPERS M., LAMPERT F. Bactericidal effect of a 980-nm diode laser in the root canal wall dentin of bovine teeth. **J Clin Laser Med Surg**, v. 22, n. 1, p. 9-13, 2004.

HE H., YU J., SONG Y., LU S., LIU H., LIU L. Thermal and morphological effects of the pulsed Nd:YAG laser on root canal surfaces. **Photomed Laser Surg**, v. 27, n. 2, p. 235-40, 2009.

HMUD R., KAHLER W. A., WALSH L. J. Temperature changes accompanying near infrared diode laser endodontic treatment of wet canals. **J Endod**, v. 36, n. 5, p. 908-11, 2010.

HOSSAIN M., NAKAMURA Y., YAMADA Y., KIMURA Y., MATSUMOTO N., MATSUMOTO K. Effects of Er,Cr:YSGG laser irradiation in human enamel and dentin: ablation and morphological studies. **J Clin Laser Med Surg**, v. 17, n. 4, p. 155-9, 1999.

HOSSAIN M., NAKAMURA Y., YAMADA Y., MURAKAMI Y., MATSUMOTO K. Compositional and structural changes of human dentin following caries removal by Er,Cr:YSGG laser irradiation in primary teeth. **J Clin Pediatr Dent**, v. 26, n. 4, p. 377-82, 2002.

ISHIZAKI N. T., MATSUMOTO K., KIMURA Y., WANG X., KINOSHITA J., OKANO S. M., JAYAWARDENA J. A. Thermographical and morphological studies of Er,Cr:YSGG laser irradiation on root canal walls. **Photomed Laser Surg**, v. 22, n. 4, p. 291-7, 2004.

KAIWAR A., USHA H. L., MEENA N., ASHWINI P., MURTHY C. S. The efficiency of root canal disinfection using a diode laser: in vitro study. **Indian J Dent Res**, v. 24, n. 1, p. 14-8, 2013.

KALYONCUOGLU E., DEMIRYÜREK E. Ö. A comparative scanning electron microscopy evaluation of smear layer removal from teeth with different irrigation solutions and lasers. **Microsc Microanal**, v. 19, n. 6, p. 1465-9, 2013.

KIMURA Y., YU D. G., KINOSHITA J., HOSSAIN M., YOKOYAMA K., MURAKAMI Y., NOMURA K., TAKAMURA R., MATSUMOTO K. Effects of erbium, chromium:YSGG laser irradiation on root surface: morphological and atomic analytical studies. **J Clin Laser Med Surg**, v. 19, n. 2, p. 69-72, 2001.

KIRCHHOFF A. L., VIAPIANA R., MIRANDA C. E., SOUSA NETO M. D., CRUZ FILHO A. M. Comparison of the apple vinegar with other chelating solutions on smear layer and calcium ions removal from the root canal. **Indian J Dent Res**, v. 25, n. 3, p. 370-4, 2014.

LEE B. S., LIN Y. W., CHIA J. S., HSIEH T. T., CHEN M. H., LIN C. P., LAN W. H. Bactericidal effects of diode laser on *Streptococcus mutans* after irradiation through different thickness of dentin. **Lasers Surg Med**, v. 38, n. 1, p. 62-9, 2006.

LEUNG, Y.; MORRIS, M. D. Characterization of the chemical interactions between 4-MET and enamel by Raman spectroscopy. **Dent Mater**, v. 11, n. 3, p. 191-5, 1995.

LEVINE R. S. The distribution of hydroxyproline in sound human coronal dentine. **Arch Oral Biol**, v.16, n. 5, p. 473-8, 1971.

LICATA ME, ALBANESE A, CAMPISI G, GERACI DM, RUSSO R, GALLINA G. Effectiveness of a new method of disinfecting the root canal, using Er,Cr:YSGG laser to kill *Enterococcus faecalis* in an infected tooth model. **Lasers MedSci**, v.30, n. 2, p. 707-12, 2015.

LIU, Y.; HSU, C. Y. Laser-induced compositional changes on enamel: a FT-Raman study. **J Dent**, v. 35, n. 3, p. 226-30, 2007.

LOTTANTI S., GAUTSCHI H., SENER B., ZEHNDER M. Effects of ethylenediaminetetraacetic, etidronic and peracetic acid irrigation on human root dentine and the smear layer. **Int Endod J**, v. 42, n. 4, p.335-43, 2009.

MADEN M., GÖRGÜL G., SULTAN M. N., AKÇA G., ER O. Determination of the effect of Nd:YAG laser irradiation through dentinal tubules on several oral pathogens. **Lasers Med Sci**, v. 28, n. 1, p. 281-6, 2013.

MARCHESAN M. A., BRUGNERA-JUNIOR A., SOUZA-GABRIEL A. E., CORREA-SILVA S. R., SOUSA-NETO M. D. Ultrastructural analysis of root canal dentine irradiated with 980-nm diode laser energy at different parameters. **Photomed Laser Surg**, v. 26, n. 3, p. 235-40, 2008.

MARTINS J. N., MARQUES D., MATA A., CARAMÊS J. Clinical efficacy of electronic apex locators: systematic review. **J Endod**, v. 40, n. 6, p. 759-77, 2014.

MARTINS JUSTO A., ABREU DA ROSA R., SANTINI M. F., CARDOSO FERREIRA M. B., PEREIRA J. R., HÚNGARO DUARTE M. A., REIS SÓ M. V. Effectiveness of Final Irrigant Protocols for Debris Removal from Simulated Canal Irregularities. **J Endod**, v. 40, n. 12, p. 2009–2014, 2014.

MCCOMB, D.; SMITH, D. C.; BEAGRIE, G. S. The results of in vivo endodontic chemomechanical instrumentation--a scanning electron microscopic study. **J Br Endod Soc**, v. 9, n. 1, p. 11-8,1976.

MEIRE M. A., COENYE T., NELIS H. J., DE MOOR R. J. Evaluation of Nd:YAG and Er:YAG irradiation, antibacterial photodynamic therapy and sodium hypochlorite treatment on *Enterococcus faecalis* biofilms. **Int Endod J**, v. 45, n. 5, p. 482-91, 2012.

METZGER, Z. The self-adjusting file (SAF) system: An evidence-based update. **J Conserv Dent**, v. 17, n. 5, p. 401-19, 2014.

MOURA-NETTO C., GUGLIELMI CDE A., MELLO-MOURA A. C., PALO R. M., RAGGIO D. P., CALDEIRA C. L. Nd:YAG laser irradiation effect on apical intracanal dentin - a microleakage and SEM evaluation. **Braz Dent J**, v. 22, n. 5, p. 377-81, 2011.

NEELAKANTAN P., VARUGHESE A. A., SHARMA S., SUBBARAO C. V., ZEHNDER M., DE-DEUS G. Continuous chelation irrigation improves the adhesion of epoxy resin-based root canal sealer to root dentine. **Int Endod J**, v. 42, n. 12, p. 1097–1102, 2012.

NEIBURGER, E. J. Evaluation of the CO2 laser for endodontic root apex welding. **J Mass Dent Soc**, v. 41, n. 2, p. 77-9, 1992.

OZKAN, L.; CETINER, S.; SANLIDAG, T. Effect of Er,Cr:YSGG laser irradiation with radial firing tips on *Candida albicans* in experimentally infected root canals. **Biomed Res Int**, v. 2014, p. 938245, 2014.

PASCON F. M., KANTOVITZ K. R., CAVALLARO F. D., PUPPIN-RONTANI R. M. Permeability and smear layer removal: effects of different chemical agents on the primary root dentin. **Pediatr Dent**, v. 34, n. 4, p. e81-5, 2012.

PASCON F. M., KANTOVITZ K. R., SOARES L. E., SANTO A. M., MARTIN A. A., PUPPIN-RONTANI R. M. Morphological and chemical changes in dentin after using endodontic agents: fourier transform Raman spectroscopy, energy-dispersive x-ray fluorescence spectrometry, and scanning electron microscopy study. **J Biomed Opt**, v. 17, n. 7, p. 075008, 2012.

PASHLEY D. H. Clinical correlations of dentin structure and function. **J Prosthet Dent**, v. 66, n. 6, p.777-81, 1991.

PAQUÉ F., LUDER H. U., SENER B., ZEHNDER M. Tubular sclerosis rather than the smear layer impedes dye penetration into the dentine of endodontically instrumented root canals. **Int Endod J**, v. 39, n. 1, p. 18-25, 2006.

PECORA J. D., BRUGNERA-JÚNIOR A., CUSSIOLI A. L., ZANIN F., SILVA R. Evaluation of dentin root canal permeability after instrumentation and Er:YAG laser application. **Lasers Surg Med**, v. 26, n. 3, p. 277-81, 2000.

PLOTINO G., GIANIRACUSA RUBINI A., GRANDE N. M., TESTARELLI L., GAMBARINI G. Cutting efficiency of Reciproc and waveOne reciprocating instruments. **J Endod**, v. 40, n. 8, p. 1228-30, 2014.

POGGIO C., DAGNA A., COLOMBO M., SCRIBANTE A., CHIESA M. Decalcifying efficacy of different irrigating solutions: effect of cetrimide addition. **Braz Oral Res**, v. 28, n. 1, p. 1-6, 2014.

RAMSKOLD L. O., FONG C. D., STROMBERG T. Thermal effects and antibacterial properties of energy levels required to sterilize stained root canals with an Nd:YAG laser. **J Endod**, v. 23, n. 2, p. 96-100, 1997.

ROMEO U., PALAIA G., NARDO A., TENORE G., TELESKA V., KORNBLIT R., DEL VECCHIO A., FRIONI A., VALENTI P., BERLUTTI F. Effectiveness of KTP laser versus 980 nm diode laser to kill *Enterococcus faecalis* in biofilms developed in experimentally infected root canals. **Aust Endod**, 2014,doi: 10.1111/aej.12057 (*in press*).

ROTSTEIN I., DANKNER E., GOLDMAN A., HELING I., STABHOLZ A., ZALKIND M. Histochemical analysis of dental hard tissues following bleaching. **J Endod**, v. 22, n. 1, p. 23-5, 1996.

SADIK B., ARIKAN S., BELDUZ N., YASA Y., KARASOY D., CEHRELI M. Effects of laser treatment on endodontic pathogen *Enterococcus faecalis*: a systematic review. **Photomed Laser Surg**, v. 31, n. 5, p. 192-200, 2013.

SAMIEI M., PAKDEL S. M., RIKHTEGARAN S., SHAKOEI S., EBRAHIMPOUR D., TAGHAVI P. Scanning Electron Microscopy Comparison of the Cleaning Efficacy of a Root Canal System by Nd:YAG Laser and Rotary Instruments. **Microsc Microanal**, v. 20, n. 4, p. 1240-5, 2014.

SAYIN T. C., SERPER A., CEHRELI Z. C., KALAYCI S. Calcium loss from root canal dentin following EDTA, EGTA, EDTAC, and tetracycline-HCl treatment with or without subsequent NaOCl irrigation. **J Endod**, v. 33, n. 5, p. 581-4, 2007.

SANTOS C., SOUSA-NETO M. D., ALFREDO E., GUERISOLI D. M., PECORA J. D., COMELLI LIA R. F. Morphologic evaluation of the radicular dentine irradiated with Nd:YAG laser under different parameters and angles of incidence. **Photomed Laser Surg**, v. 23, n. 6, p. 590-5, 2005.

SCHOOP U., BARYLYAK A., GOHARKHAY K., BEER F., WERNISCH J., GEORGOPOULOS A., SPERR W., MORITZ A. The impact of an erbium, chromium:yttrium-scandium-gallium-garnet laser with radial-firing tips on endodontic treatment. **Lasers Med Sci**, v. 24, n. 1, p. 59-65, 2009.

SCHOOP U., KLUGER W., DERVISBEGOVIC S., GOHARKHAY K., WERNISCH J., GEORGOPOULOS A., SPERR W., MORITZ A. Innovative wavelengths in endodontic treatment. **Lasers Surg Med**, v. 38, n. 6, p. 624-30, 2006.

SECILMIS A., ALTINTAS S., USUMEZ A., BERK G. Evaluation of mineral content of dentin prepared by erbium, chromium:yttrium scandium gallium garnet laser. **Lasers Med Sci**, v. 23, n. 4, p. 421-5, 2008.

SILVA A.C., GUGLIELMI C., MENEGUZZO D. T., ARANHA A. C., BOMBANA A. C., DE PAULA EDUARDO C. Analysis of permeability and morphology of root canal dentin after Er,Cr:YSGG laser irradiation. **Photomed Laser Surg**, v. 28, n. 1, p. 103-8, 2010.

SOARES L. E., DO ESPÍRITO SANTO A. M., BRUGNERA A., ZANIN F. A., MARTIN A. A. Effects of Er:YAG laser irradiation and manipulation treatments on dentin components, part 2: energy-dispersive X-ray fluorescence spectrometry study. **J Biomed Opt**, v. 14, n. 2, p. 024002, 2009.

SOARES L. E., DO ESPÍRITO SANTO A. M., JUNIOR A. B., ZANIN F. A., DA SILVA CARVALHO C., DE OLIVEIRA R., MARTIN A. A. Effects of Er:YAG laser irradiation and manipulation treatments on dentin components, part 1: Fourier transform-Raman study. **J Biomed Opt**, v. 14, n. 2, p. 024001, 2009.

SOUSA-NETO M. D., SILVA COELHO F. I., MARCHESAN M. A., ALFREDO E., SILVA-SOUSA Y. T. Ex vivo study of the adhesion of an epoxy-based sealer to human dentine submitted to irradiation with Er : YAG and Nd : YAG lasers. **Int Endod J**, v. 38, n. 12, p. 866-70, 2005.

STABHOLZ, A.; SAHAR-HELFT, S.; MOSHONOV, J. Lasers in endodontics. **Dent Clin North Am**, v. 48, n. 4, p. 809-32, 2004.

TAKEDA F. H., HARASHIMA T., KIMURA Y., MATSUMOTO K. Comparative study about the removal of smear layer by three types of laser devices. **J Clin Laser Med Surg**, v. 16, n. 2, p. 117-22, 1998.

TASCHIERI S, DEL FABBRO M., WEINSTEIN T., ROSEN E., TSESIS I. Magnification in modern endodontic practice. **Refuat Hapeh Vehashinayim**, v. 27, n. 3, p. 18-22, 2010.

TOPÇUOĞLU, H. S.; KOSEOĞLU, M. Effect of Er:YAG and Nd:YAG lasers on the mineral content of root canal dentin. **Lasers Med Sci**, v. 30, n. 2, p. 809-13, 2015.

TSUDA H., ARENDS J. Raman spectroscopy in dental research: a short review of recent studies. **Adv Dent Res**, v. 11, n. 4, p. 539-47, 1997.

ULUSOY O. I., GORGUL G. Effects of different irrigation solutions on root dentine microhardness, smear layer removal and erosion. **Aust Endod J**, v. 39, n. 2, p. 66-72, 2013.

VIAPIANA R., SOUSA-NETO M. D., SOUZA-GABRIEL A. E., ALFREDO E., SILVA-SOUSA Y. T. Microhardness of radicular dentin treated with 980-nm diode laser and different irrigant solutions. **Photomed Laser Surg**, v. 30, n. 2, p. 102-6, 2012.

WANG X., SUN Y., KIMURA Y., KINOSHITA J., ISHIZAKI N. T., MATSUMOTO K. Effects of diode laser irradiation on smear layer removal from root canal walls and apical leakage after obturation. **Photomed Laser Surg**, v. 23, n. 6, p. 575-81, 2005.

WATANABE T., FUKUDA M., MITANI A., TING C. C., OSAWA K., NAGAHARA A., SATOH S., FUJIMURA T., TAKAHASHI S., IWAMURA Y., MURAKAMI T., NOGUCHI T. Nd:YAG laser irradiation of the tooth root surface inhibits demineralization and root surface softening caused by minocycline application. **Photomed Laser Surg**, v. 31, n. 12, p. 571-7, 2013.

YAMAZAKI R., GOYA C., YU D. G., KIMURA Y., MATSUMOTO K. Effects of erbium,chromium:YSGG laser irradiation on root canal walls: a scanning electron microscopic and thermographic study. **J Endod**, v. 27, n. 1, p. 9-12, 2001.

YASUDA Y., KAWAMORITA T., YAMAGUCHI H., SAITO T. Bactericidal effect of Nd:YAG and Er:YAG lasers in experimentally infected curved root canals. **Photomed Laser Surg**, v. 28 Suppl 2, p. S75-8, 2010.

YAVARI H. R., RAHIMI S., SHAHI S., LOTFI M., BARHAGHI M. H., FATEMI A., ABDOLRAHIMI M. Effect of Er,Cr:YSGG laser irradiation on Enterococcus faecalis in infected root canals. **Photomed Laser Surg**, v. 28 Suppl 1, p. S91-6, 2010.

Anexo1 - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO
PRETO/ FORP/ USP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Alteração química e ultra estrutural da dentina radicular tratada com laser de alta potência e da dentina intracoronária submetida ao clareamento com peróxido de hidrogênio ativado pelo sistema LED/laser

Pesquisador: Manoel Damião de Sousa Neto

Área Temática:

Versão: 5

CAAE: 24449713.6.0000.5419

Instituição Proponente: Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DA NOTIFICAÇÃO

Tipo de Notificação: Envio de Relatório Parcial

Detalhe:

Justificativa:

Data do Envio: 25/09/2014

Situação da Notificação: Parecer Consubstanciado Emitido

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 837.403

Data da Relatoria: 06/10/2014

Apresentação da Notificação:

Adequada.

Objetivo da Notificação:

Apresentação do Relatório Parcial.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Em conformidade com o descrito no projeto.

Comentários e Considerações sobre a Notificação:

O projeto foi dividido em duas partes, sendo a parte 1 a avaliação química e ultra estrutural da dentina radicular tratada com laser de alta potência e a parte 2 a avaliação da dentina

Endereço: Avenida do Café s/nº

Bairro: Monte Alegre

CEP: 14.040-904

UF: SP

Município: RIBEIRÃO PRETO

Telefone: (16)3602-0251

Fax: (16)3602-4102

E-mail: cep@forp.usp.br

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO
PRETO/ FORP/ USP

Continuação do Parecer: 837.403

intracoronária submetida ao clareamento. A parte 1 encontra-se em etapa de finalização de avaliação por EDS, análise estatística e interpretação dos resultados; já a parte 2 está em processo de consolidação. As atividades realizadas até o presente momento ocorreram como planejado e proposto pelo cronograma de execução do projeto de pesquisa. Sendo que a segunda parte do projeto, avaliação da dentina intracoronária submetida ao clareamento, encontra-se em processo de consolidação e decisão do protocolo de clareamento a ser testado. Os pesquisadores indicam a necessidade de uma nova visita a Case Western Reserve University para análise das amostras, que está prevista para Março/Abril de 2015, por isso a necessidade de prorrogação do prazo por mais 6 meses.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

De acordo.

Recomendações:

O pesquisador deverá submeter Emenda ao Projeto, contemplando a adição de 6 meses no cronograma de execução da pesquisa.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovados o relatório e as alterações solicitadas. O Pesquisador deverá submeter Emenda, contemplando as alterações (conforme descrito no Manual “Submeter Emenda ao Projeto”, disponível na Central de Suporte – canto superior direito do portal www.saude.gov.br/plataformabrasil).

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Conforme deliberado na 173ª R.O. do CEP.

Endereço: Avenida do Café s/nº

Bairro: Monte Alegre

CEP: 14.040-904

UF: SP

Município: RIBEIRÃO PRETO

Telefone: (16)3602-0251

Fax: (16)3602-4102

E-mail: cep@forp.usp.br

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO
PRETO/ FORP/ USP

Continuação do Parecer: 837.403

RIBEIRAO PRETO, 20 de Outubro de 2014

Assinado por:
Simone Cecilio Hallak Regalo
(Coordenador)

Endereço: Avenida do Café s/nº

Bairro: Monte Alegre

CEP: 14.040-904

UF: SP

Município: RIBEIRAO PRETO

Telefone: (16)3602-0251

Fax: (16)3602-4102

E-mail: cep@forp.usp.br

Anexo 2 - Síntese da Dissertação em inglês
Abbreviated version of the study in English

Original Scientific Articles

Chemical and morphological effect of laser treatment on radicular dentin

FC Lopes¹, R Roperto², A Akkus², O Akkus³, AE Souza-Gabriel¹, MD Sousa-Neto¹

¹Department of Restorative Dentistry, School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil;

²Department of Comprehensive Care, School of Dental Medicine, Case Western Reserve University, CWRU – Cleveland, OH, USA;

³Department of Mechanical and Aerospace Engineering, Case Western Reserve University, CWRU – Cleveland, OH, USA.

Key Words: Laser, Raman spectroscopy, Root canal treatment

Corresponding address

Prof. Dr. Manoel D. Sousa-Neto

Rua Célia de Oliveira Meirelles 350, 14024-070

Ribeirão Preto, SP, Brasil.

Phone/Fax: +55-16-3603-6783

E-mail: sousanet@forp.usp.br

Abstract

Aim: To evaluate chemical and morphological changes in root dentin treated with different high power lasers. **Methodology:** Fifty maxillary canines were selected and roots were biomechanically prepared using K3 rotary instruments. Teeth were randomly distributed into five groups (n=10) according to the surface treatment: GI – water, GII – 1% NaOCl + 17% EDTA, GIII – 1% NaOCl + 17% EDTA + Diode laser (980nm), GIV – 1% NaOCl + 17% EDTA + Nd:YAG laser (1064nm) and GV – 1% NaOCl + 17% EDTA + Er,Cr:YSGG laser (2780nm). Lasers were applied with helicoidal movements for 20 s. Samples were bisected and the organic and inorganic content of dentin was analysed by Raman spectroscopy (cts), elements were quantified by energy-dispersive x-ray spectroscopy (EDS) (%), and the morphology was assessed by scanning electron microscope (SEM). Data were submitted to ANOVA and Tukey tests ($p<0.05$). **Results:** None of the surface treatments alter the mineral peak intensity (cts) ($p=0.183$). Roots irradiated with Er,Cr:YSGG laser had a reduced collagen peak (GV-290.7 $\pm$ 41.7) compared with the water-treated roots (GI-328.3 $\pm$ 63.5) and those treated with 1% NaOCl + 17% EDTA (GII-333.9 $\pm$ 55.8) ($p<0.05$). Roots irradiated with Er,Cr:YSGG laser also showed a higher mineral/collagen ratio (GV-9.5 $\pm$ 1.1) than roots treated with water (GI-7.7 $\pm$ 1.5), 1% NaOCl + 17% EDTA (GII-8.0 $\pm$ 1.4) and 980 nm Diode laser (GIII-8.2 $\pm$ 1.6). Both collagen and mineral amounts increased from cervical to apical thirds ($p<0.05$) in all groups. EDS showed no difference between the chemical elements, or the Ca/P ratio ($p<0.05$). SEM showed that the group irradiated with 980 nm Diode laser had an amorphous organic matrix surface, while the Er,Cr:YSGG laser provided greater removal of intertubular dentin, forming craters, and the group irradiated with Nd:YAG laser promoted fusion of dentin, sealing the dentinal tubules. **Conclusions:** None of the surface treatments were able to promote changes in the inorganic content of the root dentin; treatment with 1% NaOCl + 17% EDTA combined with Er,Cr:YSGG laser irradiation altered the collagen.

Keywords Laser, Raman spectroscopy, Root canal treatment

Chemical and morphological effect of laser treatment on radicular dentin

Introduction

Technological advances have made possible new approaches for endodontic therapy with reduced operative time and greater safety and efficacy of treatment (1). Laser technology has become an important tool when incorporated with endodontic treatment, providing the ability to act in the root canal system. The literature describes different lasers used in Endodontics such as Erbium, Neodymium and Diode lasers (2-8).

The 2780 nm Er,Cr:YSGG laser beam is highly absorbed by the components of dental tissues because of its affinity for water and hydroxyapatite (9). This interaction is called ablation, a photothermal effect caused by the laser (10). It promotes microbial reduction (5), removes the smear layer debris when applied to root canal walls (5, 9, 11), and increases dentin permeability (12).

In contrast, the 980 nm Diode laser and 1064 nm Nd:YAG laser have a short wavelength and low absorption by hydroxyapatite and water (13), thus a high penetrating power and a high absorption coefficient in the dark (14), with a consequent reduction in permeability (2, 3, 14-16), besides removing the smear layer (17). The 980 nm Diode laser promotes exposure of dentinal tubules as well as surface modification, reducing the microleakage (7, 18-20). This laser also promotes microbial reduction in areas difficult to access, because it has a greater penetration capacity when compared to other lasers (8, 20).

Alterations in morphology, permeability, hardness, and solubility of root dentin promoted by chemical solutions and high power lasers may be caused by changes in the chemical elements present on the surface of the dental tissue (2, 21-25). The purpose of this study was to evaluate, *ex vivo*, the chemical and morphological changes in root dentin of teeth treated with high power lasers (980 nm Diode laser, Nd:YAG and Er,Cr:YSGG lasers) combined with 1% sodium hypochlorite (NaOCl) and 17% ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), followed by Raman spectroscopy (Raman) energy dispersive X-ray spectroscopy (EDS) and scanning electron microscopy (SEM).

Materials and Methods

The experimental protocol was approved by the local ethics committee on human research

(#24449713.6.0000.5419). Maxillary canines, stored in 0.1% thymol solution at 4 ° C, were washed with running water for 24 hours to remove thymol residues. The teeth were examined macroscopically and radiographed in a bucco-palatal orientation in order to select canines with fully formed roots and a single canal without calcifications or curvatures. Roots were sectioned with a diamond saw, standardizing the root length at 17 mm.

Initially, 40 samples were irrigated and flushed with 2 ml of 1% NaOCl. Exploration of the canal was performed with a hand file # 10 type K. The coronal third of the canals were preflared at low speed with LA Axxes drills (SybronEndo, Orange, CA, USA), following the sequence: 35.06, 45.06. A manual file # 10 K-type stainless steel (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Switzerland) was introduced into each canal until the tip was visible at the apical foramen. The working length was established by subtracting 1 mm from this length. Roots that had an anatomic diameter of 250 microns were selected.

Mechanical preparation of root canals was performed with K3[®] rotary instruments (SybronEndo, Orange, CA, USA) according to the following sequence: 25/.02, 25/.04, 30/.02, 30/.04, 35/.02, 40/.02, 45/.02, and finally 50/.02. The root canals were irrigated with 2 mL of 1% NaOCl at each change of file, and prepared finally with 5 mL of 17% EDTA for 5 minutes. The canals then were irrigated with 2 mL of 1% NaOCl, and finally with 10 ml of distilled water. Ten other samples (n = 10) underwent the same process of mechanical preparation, however, at all times, distilled deionized water was used as the irrigation solution.

The specimens were randomly distributed into five groups, according to surface treatment: GI -irrigation with distilled water; GII - irrigation with 1% NaOCl and 17% EDTA; GIII - irrigation with 1% NaOCl, 17% EDTA, followed by irradiation with 980 nm Diode laser (Sirona Dental Bensheim HE, Germany); GIV - irrigation with 1% NaOCl, 17 % EDTA followed by irradiation with 1064 nm Nd:YAG laser (Deka, Florence, Tuscany, Italy); GV - irrigation with 1% NaOCl, 17% EDTA followed by irradiation with 2780 nm Er,Cr:YSGG laser (Biolase Technology, San Clemente, CA, USA).

The laser-treated specimens were irradiated for 20 seconds beginning with the tip at the working length, and performing a helical motion along the same to the cervical, ultimately returning to

the apex. GIII specimens ($n = 10$) were irradiated with a 980 nm Diode laser through a flexible optical fiber of 200 μm diameter, 1.5 W of power and continuous mode. In GIV ($n = 10$), the specimens were irradiated with an Nd:YAG laser, wavelength of 1064 nm, using a quartz optical fiber having 0.25 mm diameter, with 1.5W power and a repetition rate of 25Hz. Before irradiation, the root canals of the specimens of the GIII and GIV were flooded with distilled deionized water, keeping them moist. GV ($n = 10$) were irradiated with the Er,Cr:YSGG laser, wavelength of 2780 nm, with a tip diameter of 275 microns and a length of 25 mm, 25 Hz frequency, power 1.5 W, and percentage of 10% air and 10% water of the cooling system equipment.

The samples were then bisected at low speed with the aid of diamond disc (KG Sorensen, Barueri, SP, Brazil), allowing the analysis of chemical and morphological changes generated in root dentin after surface treatments.

Analysis of the organic and inorganic composition by Raman spectroscopy (Raman)

The teeth were subjected to analysis of organic and inorganic composition of the dentin surface of the root canal by means of a Raman microscope (Horiba Jobin Yvon, Edison, NJ, USA). A 10x objective (Olympus) was used to concentrate the light generated by the laser source with a wavelength of 785 nm. The resulting excitation point was about 10 mm in diameter and the laser penetration was about 100 micrometers. Initially, the system was calibrated using the known peak 520.7 cm^{-1} of a Si wafer. Three measurements were performed in each root third in each hemisection, totaling six spectra in order to obtain the average mineralization within each region (Figure 1).

Measurements were obtained using 1200 lines/mm grating, which provided a wavenumber resolution of $1.25\text{ pixels/cm}^{-1}$. Each spectrum was obtained as the average of 20 consecutive spectra, each collected for 4 seconds. The intensity of PO_4^{3-} and CH_2 peaks in the Raman spectrum are proportional to the amount of mineral content and collagen, respectively, scattering Raman signals very strongly (Figure 1). Further analysis of the ratio between inorganic and organic compounds was also performed.

Figure 1.(A) Schematic division of root thirds and evaluated points by Raman spectroscopy (asterisk) in each of the two hemi-section. (B) Typical root dentin Raman spectrum - PO₄³⁻ peak related to the mineral content and CH₂ peak related to collagen.

Quantification of the chemical elements by energy dispersive X-ray spectroscopy (EDS)

Five hemi-sections of 5 different samples (n=5) were randomly selected for each experimental group. These specimens were left in an ultrasonic tank containing distilled water for 20 minutes, then dried and stored at 37°C for 24 hours. After this period, the samples were dehydrated in increasing ethanol concentrations (25 °, 50 °, 60 °, 70 °, 80 ° and 96 ° GL) for 20 minutes each, and a concentration of GL 100 ° for 1 hour followed by immersion in hexamethyldisilazane (HMDS, Ted Pella, Redding, CA, USA) for 10 minutes to fix the collagen. After this process, the samples were maintained at 37 ° C for 24 hours. The specimens were then fixed to aluminum cylindrical structures using double-sided adhesive tape (Electron Microscopy Sciences, Washington, USA).

Spectra were obtained from the cervical, middle, and apical and quantified by the percentage by weight (wt%) of the chemical elements present in the surface uncoated by means of a scanning electron microscope (SEM) (EVO 50, Carls Zeiss, Cambridge, UK) coupled to the spectrometer (500 Digital Processing, IXRF Systems, Houston, USA).

Previous studies using the EDS method or similar methods, reported that changes in the Ca/P ratio can change the default ratio of organic and inorganic compounds (26, 27). For this reason, an analysis of the Ca/P ratio was also analyzed in this study

Morphological evaluation of dentin by scanning electron microscopy (SEM)

Three hemi-sections of three different samples ($n=3$) were randomly selected for each experimental group. The preparation and dehydration of the samples was performed by the same method described above. The specimens were fixed in a metal cylinder and then sputter-coated with a thin ($\sim 300 \text{ \AA}$) gold layer (Bal-Tec SCD Balzers Bal-Tec Co., USA) under vacuum (Denton Vacuum Desk II Moorestown, New Jersey, NJ).

To scan the entire surface in order to check for changes in the dentin tissue, SEM was performed (EVO 50, Carls Zeiss, Cambridge, UK) operating at 20Kv, and photomicrographs of representative areas were taken for qualitative evaluation of cervical, middle, and apical thirds.

Statistical Analysis

Analysis of variance was used to evaluate the influence of surface treatment and root thirds, inorganic composition values, organic composition values, ratio inorganic/organic, and chemical elements. Tukey's test was used for multiple comparisons between groups and the level of probability was 95% for all analyses.

Results

Raman spectroscopy (Raman)

There was no statistical difference in hydroxyapatite intensity peaks between the various surface treatments evaluated ($P = 0.183$) as well as for the interaction of treatment root surface and third ($P = 0.256$). The Er,Cr:YSGG promoted the greatest change in structure of collagen compared to the groups treated with water and the group treated with 1% NaOCl combined with 17% EDTA ($P < 0.05$). The groups treated with Diode laser and Nd:YAG laser showed intermediate values ($P > 0.05$). Analysis of the inorganic/organic ratio showed that Er,Cr:YSGG laser irradiation exhibited higher values compared to the groups treated with water, or the 1% NaOCl + 17% EDTA group, or the Diode laser irradiated group ($P < 0.05$) with intermediate values only for the Nd:YAG laser treated group.

There was a statistical difference between the root thirds ($P < 0.001$). In the cervical third, hydroxyapatite and collagen intensity peaks were lower than in the middle third, which in turn were

lower than in the apical third ($P < 0.05$). Thus, the inorganic/organic ratio was lower for the cervical third compared to the middle and apical thirds ($P < 0.05$), which had no difference between them ($P > 0.05$). Figure 2 shows the typical Raman spectra of radicular dentin for the different surface treatment evaluated.

Figure 2. Typical Raman spectra of radicular dentin for the different surface treatment evaluated.

Energy dispersive X-ray spectroscopy (EDS)

The analysis of variance for the chemical elements oxygen, calcium, phosphorus, carbon, and Ca/P ratio was not statistically different for surface treatments, root third, and interaction of factors ($P > 0.05$).

Scanning electron microscopy (SEM)

Micrographs of root canal dentin surfaces subjected to different surface treatments evaluated the three root thirds and are shown in Figures 3 and 4. Overall, the group treated with distilled water showed surface covered with dense and homogeneous smear layer. The group treated with 1% NaOCl

and 17% EDTA showed exposed dentinal tubules in the cervical and middle third, while the apical third is covered by smear layer. The group treated with irrigating solutions associated with Diode laser irradiation showed similar morphologic characteristics to the group treated only with irrigating solutions, with the presence of modified smear layer in middle and apical thirds. The group treated with irrigating solutions associated with Nd:YAG laser promoted melted and resolidified areas the irradiated surface, sealing the dentinal tubules, while Er;Cr:YSGG laser promoted erosion of intertubular dentin forming craters and erosion of peritubular dentin in a lesser intensity, however both laser promoted surfaces free of smear layer.

Figure 3. Photomicrograph of root canal dentin surface from groups I and II in the cervical (A), medium (B) and apical (C) thirds (2000x): **1** - Distilled water: **A1**- Surface covered by a dense and homogeneous smear layer and few exposed dentinal tubules (arrows). **B1 and C1** - Surface covered by a dense and homogeneous smear layer. **2** - NaOCl + EDTA: **A2** - Exposed dentinal tubules (arrows). **B2** - Exposed dentinal tubules (arrows), and partially obliterated tubules (square). **C2** - Surface covered by dense and homogeneous smear layer.

Figure 4. Photomicrograph of root canal dentin surface from groups III, IV and V, in the cervical (A), medium (B) and apical thirds (C) (2000x): **1** - NaOCl + EDTA + Diode laser: **A1**- Exposed dentinal tubules (arrows). **B1 and C1**- Exposed dentinal tubules (arrows) and presence of modified smear layer (asterisk). **2**- NaOCl + EDTA + Nd:YAG laser: **A2, B2** - Areas of exposed dentinal tubules (arrows) and areas of melting and resolidification of the root dentin (asterisk). **C2** - Surface covered by melting and resolidification. **3** - NaOCl + EDTA + Er,Cr:YSGG laser: **A3**- Absence of smear layer, exposed tubules (arrows) with erosive areas around them forming craters (triangles). **B3** - No smear layer, exposed dentinal tubules (arrows) with erosive areas around it, forming an uneven surface, but less intense than in the middle third. **C3** - Absence of smear layer, with some exposed dentinal tubules (arrows).

Discussion

This study determined the chemical and morphological changes in root canal dentin treated with Diode, Nd:YAG and Er,Cr:YSGG lasers. The effects of irradiation by different lasers have been studied in order to prove its effectiveness and reliability in Endodontics, but the changes that we deal with were not considered (2, 4, 6, 28).

The results obtained by Raman spectroscopy showed that treatment with Er,Cr:YSGG laser significantly reduced the intensity of collagen peaks. The difference found between the lasers probably is due to the greater affinity of the Er,Cr:YSGG laser for water compared to other systems, causing

vaporization of water and other organic components such as hydrated collagen (11). Conversely, the Nd:YAG laser and Diode laser have short wavelengths, 1064 nm and 980 nm, respectively, and thus have a low absorption coefficient by hydroxyapatite and water (13); treating the surface with these systems showed intermediate values.

However, the mineral/collagen ratio designed to measure the ratio of organic and inorganic components, showed that the 980 nm Diode laser was not able to elicit significant changes, matching the water-treated group and the group treated with 1% NaOCl + 17% EDTA. Comparative studies of the morphological changes using laser irradiation and different irrigating solutions on dentin showed that the morphological changes generated by the 980 nm Diode laser are quite similar to the changes obtained by NaOCl combined with EDTA, and results in less intense changes when compared to other lasers (3, 18). It is noteworthy that studies on the chemical effects generated in the dentin surface of root canals irradiated with 980 nm Diode laser have not been reported, but there were no significant chemical changes in the present study. The analysis of the mineral/collagen ratio confirms the significant reduction of organic compounds in roots irradiated with Er,Cr:YSGG laser when compared to other groups.

This study showed that lasers did not change the inorganic compounds of the root dentin. EDS showed no difference evoked by the different surface treatments. This was probably due to the presence of water in the root canal at the time of irradiation, reducing heat generation due to excessive energy absorption, thus preserving the inorganic components (11). The temperature increase of the dentin during irradiation of high-power lasers promotes vaporization of water, decomposition of proteins, and apatite crystals may melt and recrystallize rapidly, causing defects in the structure changing the Ca/P ratio (29). Gurbuz *et al.* (2008) (30) showed that the mineral content of the root dentin was not affected after irradiation by Nd:YAG laser (1.5W). Topcuoglu and Koseoglu (2013) (31) studied the effect of Er:YAG (1W) and Nd:YAG (1W) lasers combined with 1% NaOCl by atomic emission spectrometry and determined that these lasers do not affect the mineral content. Dilber *et al.* (2013) (32) showed that irradiation of the dentin with the Er:YAG, Nd:YAG, and KTP lasers did not alter the concentration of Ca, K, Mg, Na, P, or mineral Ca/P ratio of the dentin surface.

In contrast, Altundasar *et al.* (2006) (11) and Secilmis *et al.* (2008) (33), using Er,Cr:YSGG laser at 3W and 1W, respectively, found no alterations in chemical elements (Ca, P, Mg and Na) and Ca/P ratio of dentin after irradiation, suggesting that the changes are confined to the molecular level. The differences in the evaluation method, the power of the lasers used, and the concentration and action time of the solutions make it difficult to compare these studies with our results.

The outcomes of our study indicated that irrigation with 1% NaOCl followed by 17% EDTA did not change the composition of the root dentin. However, there was a variation in the proportion of organic and inorganic compounds from the root thirds in all groups, including the control (water-treated group). The mineral/collagen ratio is lower in the cervical third compared to other portions, with a lower degree of mineralization. This was probably caused by the higher number of tubules in cervical this third (34). The difference in the chemical characteristic between root thirds interferes directly with restorative procedures. According to Neelakantan *et al.* (2012) (35), the adhesion of epoxy resin based sealers is smaller in the apical region.

The morphological changes generated by the 980 nm Diode laser resemble those in roots treated solely with NaOCl and EDTA (7, 18, 19).

Root dentin irradiated with Nd:YAG and Er,Cr:YSGG lasers led to complete removal of the smear layer. With Er,Cr:YSGG laser irradiation ablation areas were observed in intertubular dentin, mainly in the cervical third. The Nd:YAG laser provided areas with sealed dentinal tubules, probably by melting.

The 980 nm Diode laser and Nd:YAG laser have flexible optical fibers, enabling them to act within the root canal and to follow the curvature of the root canal (36), by helicoidal movements since the transmission of light occurs only at the tip of unidirectional fiber (36, 37), which helps explain the intense action of these lasers in the apical third.

The dentin changes observed in this study are an important indication that the surface treatment has been done correctly. Nd:YAG laser sealed the tubules without significantly altering the chemical composition of dentin. The melted areas found in dentin irradiated with Nd:YAG can change the dentin permeability and decrease the bond strength of filling materials. Removal of the smear layer and exposure of dentinal tubules obtained by irradiation with Er,Cr:YSGG laser can facilitate the

antimicrobial action of irrigants, improving the adaptation of endodontic materials for root canal walls. Therefore, an ideal therapeutic approach, especially in refractory cases, would be to apply the Er,Cr:YSGG laser after instrumentation of the root canal to remove the smear layer and open dentinal tubules, facilitating the spread of temporary dressing and the Nd:YAG laser with specific parameters, to seal the tubules before root canal filling.

In order to properly determine the desired surface treatment for each clinical situation, it is important to understand the chemical and morphological changes induced by different surface treatments used in Endodontic therapy. Further studies should be conducted to assess the real advantages of using associations of high-power laser systems with irrigating solutions in order to establish the optimal protocol for each case.

Conclusions

Based on the methodology used, none of the surface treatments resulted in changes in the inorganic content of the root dentin, however, radicular dentin treated with irrigating solutions combined with Er,Cr:YSGG laser undergoes chemical changes, with reduced amount of collagen, thus increasing the mineral/collagen ratio. Differences in the degree of mineralization between root thirds were observed in all groups with lower mineral/collagen ratio for the cervical third. Qualitative analysis by SEM showed that the application of lasers resulted in different changes in morphology: in roots treated with Diode laser, modified smear layer was observed whereas Nd:YAG and Er,Cr:YSGG laser treated roots lack a smear layer, with melting and resolidification; and intertubular and peritubular erosion, respectively. These findings are important because it can directly interfere in dentin permeability and with the quality of bond strength of the root canal filling materials, thus leading to overall better or worse longevity of endodontic treatment. Other studies should be carried out to confirm our findings and explore other endodontic treatment possibilities.

References

1. Plotino G, Giansiracusa Rubini A, Grande NM, Testarelli L, Gambarini G. Cutting efficiency of Reciproc and waveOne reciprocating instruments. *Journal of endodontics*. 2014;40(8):1228-30.

2. Moura-Netto C, Guglielmi Cde A, Mello-Moura AC, Palo RM, Raggio DP, Caldeira CL. Nd:YAG laser irradiation effect on apical intracanal dentin - a microleakage and SEM evaluation. *Brazilian dental journal*. 2011;22(5):377-81.
3. Esteves-Oliveira M, de Guglielmi CA, Ramalho KM, Arana-Chavez VE, de Eduardo CP. Comparison of dentin root canal permeability and morphology after irradiation with Nd:YAG, Er:YAG, and diode lasers. *Lasers in medical science*. 2010;25(5):755-60.
4. Yasuda Y, Kawamorita T, Yamaguchi H, Saito T. Bactericidal effect of Nd:YAG and Er:YAG lasers in experimentally infected curved root canals. *Photomedicine and laser surgery*. 2010;28 Suppl 2:S75-8.
5. Yavari HR, Rahimi S, Shahi S, Lotfi M, Barhaghi MH, Fatemi A, et al. Effect of Er, Cr:YSGG laser irradiation on *Enterococcus faecalis* in infected root canals. *Photomedicine and laser surgery*. 2010;28 Suppl 1:S91-6.
6. Faria MI, Sousa-Neto MD, Souza-Gabriel AE, Alfredo E, Romeo U, Silva-Sousa YT. Effects of 980-nm diode laser on the ultrastructure and fracture resistance of dentine. *Lasers in medical science*. 2013;28(1):275-80.
7. Alfredo E, Souza-Gabriel AE, Silva SR, Sousa-Neto MD, Brugnera-Junior A, Silva-Sousa YT. Morphological alterations of radicular dentine pretreated with different irrigating solutions and irradiated with 980-nm diode laser. *Microscopy research and technique*. 2009;72(1):22-7.
8. Schoop U, Kluger W, Dervishbegovic S, Goharkhay K, Wernisch J, Georgopoulos A, et al. Innovative wavelengths in endodontic treatment. *Lasers in surgery and medicine*. 2006;38(6):624-30.
9. Abad-Gallegos M, Arnabat-Dominguez J, Espana-Tost A, Berini-Aytes L, Gay-Escoda C. In vitro evaluation of the temperature increment at the external root surface after Er,Cr:YSGG laser irradiation of the root canal. *Medicina oral, patologia oral y cirugia bucal*. 2009;14(12):e658-62.
10. Hossain M, Nakamura Y, Yamada Y, Kimura Y, Matsumoto N, Matsumoto K. Effects of Er,Cr:YSGG laser irradiation in human enamel and dentin: ablation and morphological studies. *Journal of clinical laser medicine & surgery*. 1999;17(4):155-9.
11. Altundasar E, Ozelik B, Cehreli ZC, Matsumoto K. Ultramorphological and histochemical changes after ER,Cr:YSGG laser irradiation and two different irrigation regimes. *Journal of endodontics*. 2006;32(5):465-8.
12. Yamazaki R, Goya C, Yu DG, Kimura Y, Matsumoto K. Effects of erbium,chromium:YSGG laser irradiation on root canal walls: a scanning electron microscopic and thermographic study. *Journal of endodontics*. 2001;27(1):9-12.
13. Chanthaboury R, Irinakis T. The use of lasers for periodontal debridement: marketing tool or proven therapy? *J Can Dent Assoc*. 2005;71(9):653-8.
14. Anic I, Segovic S, Katanec D, Prskalo K, Najzar-Fleger D. Scanning electron microscopic study of dentin lased with argon, CO₂, and Nd:YAG laser. *Journal of endodontics*. 1998;24(2):77-81.
15. He H, Yu J, Song Y, Lu S, Liu H, Liu L. Thermal and morphological effects of the pulsed Nd:YAG laser on root canal surfaces. *Photomedicine and laser surgery*. 2009;27(2):235-40.
16. Franzen R, Gutknecht N, Falken S, Heussen N, Meister J. Bactericidal effect of a Nd:YAG laser on *Enterococcus faecalis* at pulse durations of 15 and 25 ms in dentine depths of 500 and 1,000 μ m. *Lasers in medical science*. 2011;26(1):95-101.
17. Takeda FH, Harashima T, Kimura Y, Matsumoto K. Comparative study about the removal of smear layer by three types of laser devices. *Journal of clinical laser medicine & surgery*. 1998;16(2):117-22.
18. Faria MI, Souza-Gabriel AE, Alfredo E, Messias DC, Silva-Sousa YT. Apical microleakage and SEM analysis of dentin surface after 980 nm diode laser irradiation. *Brazilian dental journal*. 2011;22(5):382-7.
19. Marchesan MA, Brugnera-Junior A, Souza-Gabriel AE, Correa-Silva SR, Sousa-Neto MD. Ultrastructural analysis of root canal dentine irradiated with 980-nm diode laser energy at different parameters. *Photomedicine and laser surgery*. 2008;26(3):235-40.
20. Alfredo E, Marchesan MA, Sousa-Neto MD, Brugnera-Junior A, Silva-Sousa YT. Temperature variation at the external root surface during 980-nm diode laser irradiation in the root canal. *Journal of dentistry*. 2008;36(7):529-34.

21. Pascon FM, Kantovitz KR, Cavallaro FD, Puppin-Rontani RM. Permeability and smear layer removal: effects of different chemical agents on the primary root dentin. *Pediatric dentistry*. 2012;34(4):e81-5.
22. Martins Justo A, Abreu da Rosa R, Santini MF, Cardoso Ferreira MB, Pereira JR, Hungaro Duarte MA, et al. Effectiveness of Final Irrigant Protocols for Debris Removal from Simulated Canal Irregularities. *Journal of endodontics*. 2014.
23. Ulusoy AT, Tunc ES, Cil F, Isci D, Lutfioglu M. Multidisciplinary treatment of a subgingivally fractured tooth with indirect composite restoration: a case report. *J Dent Child (Chic)*. 2012;79(2):79-83.
24. Watanabe T, Fukuda M, Mitani A, Ting CC, Osawa K, Nagahara A, et al. Nd:YAG laser irradiation of the tooth root surface inhibits demineralization and root surface softening caused by minocycline application. *Photomedicine and laser surgery*. 2013;31(12):571-7.
25. Poggio C, Dagna A, Colombo M, Scribante A, Chiesa M. Decalcifying efficacy of different irrigating solutions: effect of cetrimide addition. *Brazilian oral research*. 2014;28(1):1-6.
26. Dogan H, Qalt S. Effects of chelating agents and sodium hypochlorite on mineral content of root dentin. *Journal of endodontics*. 2001;27(9):578-80.
27. Rotstein I, Dankner E, Goldman A, Heling I, Stabholz A, Zalkind M. Histochemical analysis of dental hard tissues following bleaching. *Journal of endodontics*. 1996;22(1):23-5.
28. Sadik B, Arian S, Belduz N, Yasa Y, Karasoy D, Cehreli M. Effects of laser treatment on endodontic pathogen *Enterococcus faecalis*: a systematic review. *Photomedicine and laser surgery*. 2013;31(5):192-200.
29. Hossain M, Nakamura Y, Yamada Y, Murakami Y, Matsumoto K. Compositional and structural changes of human dentin following caries removal by Er,Cr:YSGG laser irradiation in primary teeth. *The Journal of clinical pediatric dentistry*. 2002;26(4):377-82.
30. Gurbuz T, Ozdemir Y, Kara N, Zehir C, Kurudirek M. Evaluation of root canal dentin after Nd:YAG laser irradiation and treatment with five different irrigation solutions: a preliminary study. *Journal of endodontics*. 2008;34(3):318-21.
31. Topcuoglu HS, Koseoglu M. Effect of Er:YAG and Nd:YAG lasers on the mineral content of root canal dentin. *Lasers in medical science*. 2013.
32. Dilber E, Malkoc MA, Ozturk AN, Ozturk F. Effect of various laser irradiations on the mineral content of dentin. *European journal of dentistry*. 2013;7(1):74-80.
33. Secilmis A, Altintas S, Usumez A, Berk G. Evaluation of mineral content of dentin prepared by erbium, chromium:yttrium scandium gallium garnet laser. *Lasers in medical science*. 2008;23(4):421-5.
34. Lottanti S, Gautschi H, Sener B, Zehnder M. Effects of ethylenediaminetetraacetic, etidronic and peracetic acid irrigation on human root dentine and the smear layer. *International endodontic journal*. 2009;42(4):335-43.
35. Neelakantan P, Varughese AA, Sharma S, Subbarao CV, Zehnder M, De-Deus G. Continuous chelation irrigation improves the adhesion of epoxy resin-based root canal sealer to root dentine. *International endodontic journal*. 2012;45(12):1097-102.
36. Ramskold LO, Fong CD, Stromberg T. Thermal effects and antibacterial properties of energy levels required to sterilize stained root canals with an Nd:YAG laser. *Journal of endodontics*. 1997;23(2):96-100.
37. Brugnera A, Jr., Zanin F, Barbin EL, Spano JC, Santana R, Pecora JD. Effects of Er:YAG and Nd:YAG laser irradiation on radicular dentine permeability using different irrigating solutions. *Lasers in surgery and medicine*. 2003;33(4):256-9.