

## ESTUDO *IN VITRO* DOS EFEITOS A IRRADIAÇÃO COM O LASER DE Er,Cr:YSGG EM TECIDO ÓSSEO POR ATR-FTIR

Carolina Benetti, Marcelo Noronha Veloso, Denise Maria Zezell  
Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN - CNEN/ SP  
Av. Lineu Prestes 2242 - Cidade Universitária - CEP: 05508-000 - São Paulo - SP BRASIL  
E-mail: carolina.benetti@gmail.com

### RESUMO

O laser tem se mostrado eficaz no auxílio ao profissional de saúde. Em particular, os lasers de alta intensidade emissores no infravermelho possuem grande potencial para corte de tecidos biológicos mineralizados, visto que são bastante absorvidos pela hidroxiapatita e água, principais componentes desses tecidos. Em comparação aos instrumentos mecânicos, o laser apresenta uma série de vantagens no corte de tecidos, com possibilidade de menor dano ao tecido remanescente e melhor hemostasia. Entretanto, para uma aplicação eficiente e segura é necessário conhecer os efeitos que a irradiação laser causa ao tecido. Este trabalho teve como objetivos estabelecer a técnica de ATR-FTIR para a caracterização do tecido ósseo natural e irradiado, e verificar as eventuais mudanças químicas e estruturais causadas pela irradiação laser. Foram analisadas as amostras de osso natural e irradiado com o laser de Er,Cr:YSGG (2,78  $\mu\text{m}$ ) com seis diferentes densidades de energia. Verificou-se que a técnica foi eficaz na caracterização do tecido ósseo, sendo possível observar as alterações químicas promovidas pelo aumento de temperatura ocasionado pela irradiação laser. Foi observada a perda gradativa de material orgânico em função do aumento da densidade de energia utilizada. Os resultados obtidos são importantes para garantir a segurança nos procedimentos cirúrgicos realizados com o laser de Er,Cr:YSGG como ferramenta de corte.

**Descritores:** FTIR, osso, Er,Cr:YSGG

### ABSTRACT

Laser proves to be more and more, an effective tool for helping health professionals, being intensively used in Ophthalmological and Dental procedures. In particular high-density infrared emitting lasers have great potential in cutting mineralized biological hard tissues. In comparison to mechanical instruments, laser presents a series of advantages, namely, smaller damage to the remaining tissue and promotion of homeostatic effect, apart from making it possible to perform procedures in areas with difficult access. However, for an efficient and safe use of this technique, it is necessary to know the physical and chemical effects of the laser irradiation on the tissue. This work aims to establish the ATR-FTIR technique for the characterization of natural and irradiated osseous tissue, and to verify the possible chemical and structural changes caused by irradiation. Bone samples, irradiated with the Er,Cr:YSGG (2.78  $\mu\text{m}$ ) infrared emitting laser (adjusted with five different energy densities) were analyzed alongside with natural bone samples. It has been verified that the technique is effective in bone tissue characterization, and that it is possible to observe the chemical changes caused by the temperature rise due to laser irradiation. It has been observed a gradual organic material loss as the energy density increases. These results are important to assure the Er,Cr:YSGG laser safeties in surgical procedure as cutting tool.

**Key words:** FTIR, bone, Er,Cr:YSGG

## INTRODUÇÃO

O corte ósseo é frequentemente realizado durante os procedimentos cirúrgicos, seja para permitir o acesso a regiões subjacentes ou por motivos terapêuticos inerentes ao próprio tecido. Entretanto, as ferramentas de corte tradicionais e ainda amplamente utilizadas, tais como os instrumentos rotatórios em alta e baixa rotação, muitas vezes acabam por retardar o período pós-operatório do paciente, por muitas vezes causar traumas mecânicos, aumento excessivo de temperatura local, e também hemorragias excessivas que dificultam a visualização do profissional [1,2]. Sendo uma das alternativas para o corte de tecidos duros e moles é a irradiação laser.

O potencial dos lasers emissores no infravermelho na ablação de tecidos biológicos mineralizados já é amplamente estabelecido e reconhecido na literatura. O laser de Er,Cr:YSGG com comprimento de onda de 2,78  $\mu\text{m}$  é fortemente absorvido pela água e hidroxiapatita [3], os principais componentes da dentina e dos ossos [4]. Entre as vantagens que o laser oferece em relação aos instrumentos de corte tradicionais destacam-se a maior precisão de corte, maior hemostasia, além de minimizar danos mecânicos e térmicos [5].

Este trabalho tem como objetivo avaliar as mudanças composicionais por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier, ocorridas em amostras de tecido ósseo quando irradiados com laser de Er,Cr:YSGG. A caracterização do tecido ósseo após sua irradiação com o laser com diferentes densidades de energia é de grande importância, uma vez que não há um protocolo específico para o emprego deste laser no corte ósseo.

A técnica de ATR-FTIR é sugerida para esta análise uma vez que os estudos sobre os efeitos da irradiação do laser de Er,Cr:YSGG com os tecidos biológicos duros normalmente são focados nas mudanças morfológicas e histológicas promovidas pelas irradiações [2,6,7], havendo a necessidade de melhor analisar os efeitos da irradiação laser no tecido ósseo do ponto de vista químico e estrutural.

A espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) vem

sendo extensivamente utilizada na análise de materiais orgânicos. Essa técnica permite identificar os componentes da amostra analisada, possibilitando uma análise semiquantitativa, além de fornecer informações químicas e estruturais do material [8,9,10]. Essa técnica já se mostrou capaz de detectar as mudanças composicionais causadas pela irradiação laser em tecido dentário, o que reforça seu potencial na caracterização de tecido ósseo irradiado [8,9].

## MATERIAL E MÉTODOS DE ANÁLISE

Este trabalho foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa animal do IPEN – CNEN/SP (no. 6/CEPA-IPEN/SP).

As amostras foram obtidas da tibia de dois coelhos adultos, machos, da raça New Zealand, adquiridos do Biotério da Faculdade de Medicina da USP. Após o sacrifício por dose letal de anestésicos, os ossos foram seccionados ao meio, a medula óssea retirada, e as partes cortadas em pedaços utilizando-se o motor odontológico de alta rotação com uma ponta diamantada.

Foram obtidos 18 pedaços de osso, que foram lixados em ambos os lados até atingirem a espessura de aproximadamente 100 $\mu\text{m}$  utilizando-se lixas d'água de diferentes numerações. Ao final do processo, as amostras tinham a dimensão de 8x5 mm, com espessura de 100  $\mu\text{m}$  (tolerância de 10%). As amostras foram mantidas em ambiente refrigerado em meio úmido para não perderem suas características naturais.

As amostras foram divididas em cinco grupos com três amostras conforme apresentado na Tabela 1. Os grupos foram definidos conforme a densidade de energia utilizada na irradiação, sendo Grupo 1 o controle, formado pelas três amostras de osso não irradiado.

O laser utilizado na irradiação das amostras foi o Er,Cr:YSGG (*Waterlase, Biolaser*–USA). Um laser pulsado (frequência de 20 Hz) emitindo comprimento de onda de 2,78 $\mu\text{m}$ . A ponta de saída utilizada no experimento foi a S75 com diâmetro de 750 $\mu\text{m}$ , e comprimento de 6 mm, segundo especificações do fabricante. Para que a irradiação fosse homogênea em toda sua

superfície, durante a irradiação a amostra foi deslocada por um translador motorizado com precisão de 0,5  $\mu\text{m}$  (ESP300, Newport Corporation, Irvine, CA, EUA). A ponta do laser foi posicionada a aproximadamente 1 mm das amostras. A velocidade e a distância entre as linhas de irradiação utilizadas foram selecionadas para evitar a sobreposição de pulsos.

TABELA 1 – Grupos de estudo divididos conforme a densidade de energia com a qual as amostras foram irradiadas.

Grupo	Fluência ( $\text{J}/\text{cm}^2$ )
1	0
2	2,7
3	5,7
4	8,1
5	12,2
6	14,7

A análise das amostras foi realizada com um acessório de Reflexão Total Atenuada - ATR (*Smart Orbit, Thermo*, EUA) acoplado a um espectrômetro no infravermelho por transformada de Fourier - FTIR (*Nicolet 6700, Thermo Inc.*, EUA). A resolução utilizada foi de  $4\text{ cm}^{-1}$ , sendo os espectros finais obtido com 80 varreduras por amostra.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para comparar os espectros dos diferentes grupos quanto a forma e posição das bandas, foram sobrepostos em mesmo gráfico espectros de uma amostra de cada grupo escolhidas aleatoriamente (Figura 1A). Foi possível identificar todas as bandas pretendidas em todos os grupos estudados, não sendo encontrada nenhuma nova banda, que indicaria a formação de compostos ou mudanças bruscas nos modos de vibração.

Para podermos realizar uma análise semi-quantitativa, a área de cada banda foi calculada em cada espectro. A área sob a banda corresponde a quantidade na amostra do componente ao qual ela se refere. Cada banda teve sua área calculada normalizada. Como foram estudados os efeitos a irradiação com o laser de Er,Cr:YSGG (que promove aumento de temperatura na amostra), a normalização foi feita utilizando-se a área sob

a banda do fosfato ( $1100\text{ cm}^{-1}$ ), pois este é o componente do osso mais estável quando ocorre aumento de temperatura. As áreas foram calculadas utilizando-se o programa Origin 8.0, e a análise estatística dos resultados realizada com o teste ANOVA/Tukey.

As principais alterações foram observadas nas bandas correspondentes aos compostos orgânicos. Observando-se as razões entre a área sob a banda da amida I e água e da área sob a banda do fosfato (Figura 1B), verifica-se uma tendência da diminuição do conteúdo de amida I e água nas amostras com o aumento da densidade de energia utilizada na irradiação. Entretanto, estatisticamente, está diferença só é significativa nas amostras não irradiadas em relação às irradiadas. É importante ressaltar que nesta região do espectro ocorre sobreposição da banda da água e da banda da Amida I, portanto é impossível dizer se a diferença encontrada nas amostras irradiadas deve-se à perda de água ou perda de amida I, ou perda de ambos.

Na Figura 1C são apresentadas as áreas sob a banda referente a amida II e carbonato para os diferentes grupos. Novamente é observada uma tendência da diminuição do componente com o aumento da densidade de energia. Entretanto, agora existe diferença estatística significativa entre o grupo das amostras não irradiadas em relação aos grupos irradiados com densidade de energia igual ou maior que  $5,7\text{ J}/\text{cm}^2$ , não sendo encontrada diferença estatística significativa entre as amostras não irradiadas e irradiadas com  $2,7\text{ J}/\text{cm}^2$ , indicando que está densidade de energia não é suficientemente grande para causar diminuição no conteúdo de Amida II. Esse mesmo comportamento foi observado para a banda de Amida II como pode ser observado na Figura 1D e para o colágeno (banda  $1203\text{ cm}^{-1}$ ) cujo gráfico é apresentado na Figura 1E.

A comparação entre as áreas de bandas de amostras ósseas irradiadas e não irradiadas com diferentes densidades de energia evidencia uma redução significativa na área da banda da amida I e água ( $1642\text{ cm}^{-1}$ ) após as irradiações, como pode ser visto na Figura 1B, o que indica a diminuição da quantidade destes componentes promovida

pela irradiação laser. Resultados semelhantes foram obtidos na irradiação do esmalte e dentina com laser de Er:YAG, materiais estruturalmente semelhantes ao tecido ósseo. Na dentina foi constatada a perda de água e amidas, e no esmalte a irradiação afetou a matriz inorgânica [11], presente em maior proporção neste material. Em tecido ósseo foi relatado a diminuição no conteúdo de amidas e OH- após irradiação com o laser de Er:YAG com densidade de energia maior que o limiar de ablação [12]. No mesmo estudo, foi constatado que a ablação com o laser de CO<sub>2</sub> promove um maior decréscimo no conteúdo de amidas e OH-, o que indica que a perda de material orgânico está relacionada com o aumento de temperatura no tecido, maior com o laser de CO<sub>2</sub> que com o Er:YAG [12].

Nos resultados não foi encontrada diferença significava entre os grupos irradiados, mas é possível notar uma tendência de diminuição gradativa das áreas com o aumento da densidade de energia. Variação semelhante foi reportada na irradiação com diferentes densidade de energia do esmalte e dentina com o laser de Er:YAG [11].

Na banda 1642 cm<sup>-1</sup> ocorre a sobreposição das bandas de absorção da amida I e da água e, por isso, não é possível estabelecer se a diminuição de área observada é devido apenas à perda de água, amida I, ou ambos. Entretanto, para os demais componentes orgânicos do tecido ósseo (amida II e amida III), não foram observadas diferenças significativas entre as amostras não irradiadas e as irradiadas com 2,7 J/cm<sup>2</sup> (menor densidade de energia utilizada na irradiação); o que indica que, para o grupo irradiado com 2,7 J/cm<sup>2</sup>, a diferença de água observada provavelmente se deve exclusivamente à desidratação, e a partir dos grupos irradiados com densidades de energia superiores a 5,7 J/cm<sup>2</sup>, pode ter ocorrido tanto perda de água quanto de amida I.

Para as bandas de amida II e carbonato (1555 cm<sup>-1</sup>), amida III (1240 cm<sup>-1</sup>), e colágeno (1203 cm<sup>-1</sup>) os resultados mostram diferença significava entre as amostras não irradiadas e irradiadas com densidade de energia iguais ou maiores que

5,7 J/cm<sup>2</sup>, não sendo encontradas diferenças entre as amostras não irradiadas e irradiadas com densidade de energia de 2,7 J/cm<sup>2</sup> (Grupo 2), nem entre as amostras do Grupo 2 e as amostras irradiadas com densidade de energia maiores. Como ocorreu anteriormente na banda da água e amida I, é possível notar uma diminuição das áreas sob as bandas analisadas com o aumento da densidade de energia. Além disso, considerando-se o fato das amostras do Grupo 2 (2,7 J/cm<sup>2</sup>) não apresentarem diferença estatística quando comparadas às amostras não irradiadas e irradiadas com densidade de energia maiores, isto reforça a hipótese da perda gradativa dos componentes com o aumento da irradiação, o que já foi mencionado anteriormente na literatura [11,13].

Assim como o ocorrido para a sobreposição das bandas de amida I e água reportado acima, no caso da sobreposição das bandas de amida II e carbonato não podemos afirmar qual dos componentes teve o seu conteúdo reduzido. Entretanto, é mais provável que tenha ocorrido perda de amida II nas amostras, uma vez que o carbonato é termicamente mais estável que os compostos orgânicos [11].

No Grupo 2, diferente dos demais grupos irradiados, as amostras foram irradiadas com densidade de energia de 2,7 J/cm<sup>2</sup>, inferior ao limiar de ablação para o tecido ósseo que é aproximadamente 5 J/cm<sup>2</sup> [14]. Conforme pode ser observado nos resultados deste trabalho, as amostras do Grupo 2 não apresentaram perda de componentes orgânicos estatisticamente significantes quando comparadas às amostras não irradiadas, sendo observada apenas uma indicação da alteração quantidade de água. Desta maneira, infere-se que a densidade de energia utilizada promove apenas o aquecimento da amostra, insuficiente para causar ablação ou alterações químicas significativas, mas capaz de provocar redução no conteúdo de água.

Os resultados encontrados indicam que a irradiação laser em densidades de energias superiores ao limiar de ablação do tecido

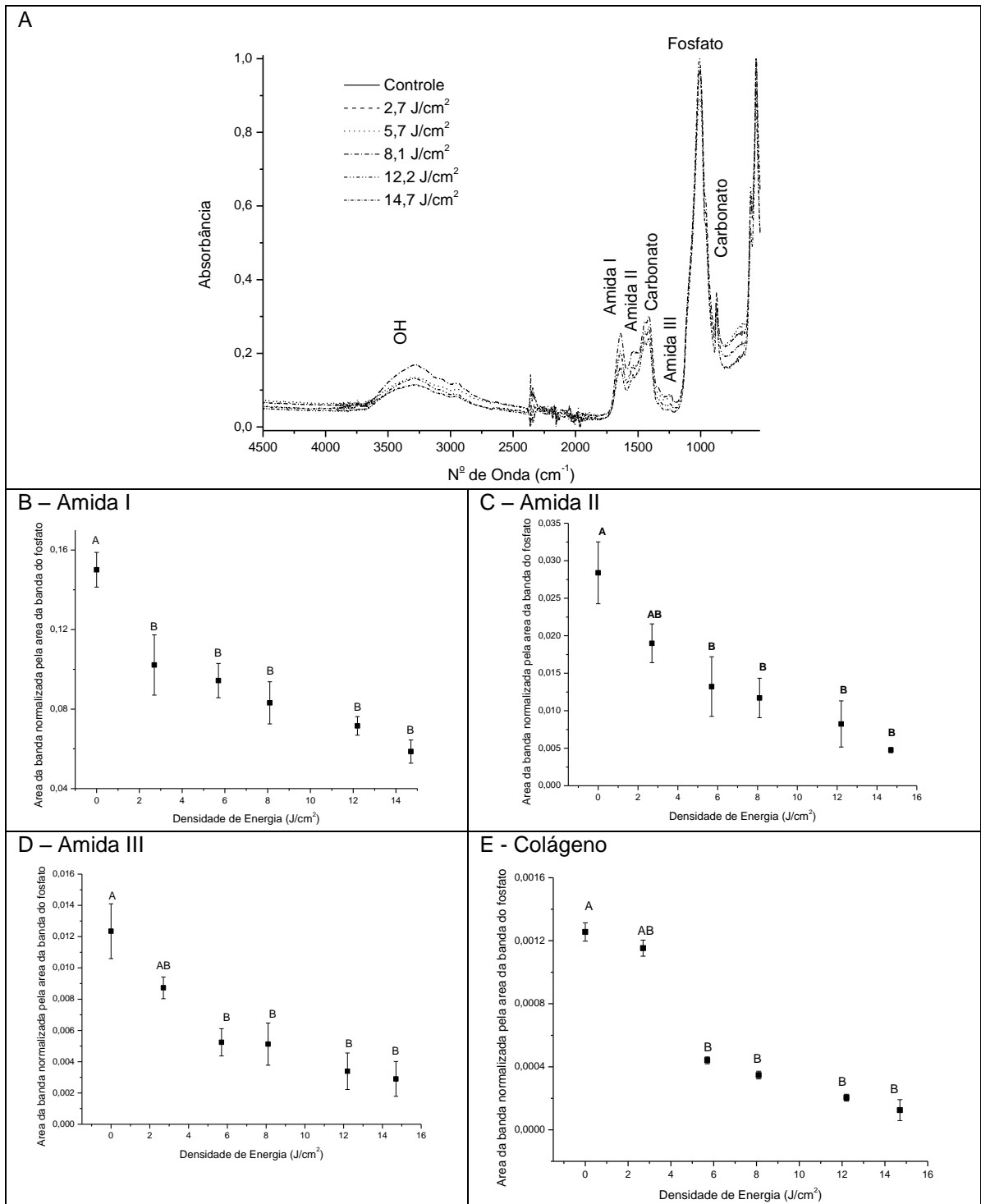


Figura 1: (A) Espectros obtidos no FTIR-ATR para amostras de osso irradiadas com diferentes densidades de energia; Razão da área sob a banda da amida I (B), amida II (C), amida III (D) e Colágeno (E) pela área da banda do fosfato em função da densidade de energia utilizada na irradiação. Letras diferentes representam dados significativamente diferentes; e letras iguais dados que não apresentam diferença estatística.

ósseo promoveram mudanças composicionais ao tecido remanescente. Essas mudanças indicam que o tecido foi exposto a uma temperatura suficiente para causar a desnaturação do colágeno, indicada pela perda do conteúdo de amidas e colágeno, e a desidratação do tecido (evaporação da água). Estes resultados concordam com resultados relatados na literatura para o esmalte e dentina [8,15] Estas perdas sugerem que a superfície remanescente após a ablação provavelmente atingiu temperaturas iguais ou maiores que 100 °C ou mais, uma vez que tanto a ebulição da água quanto a desnaturação do colágeno ocorrem em temperaturas superiores a 100 °C [13].

Na avaliação semiquantitativa das bandas da amida I e água, apesar de não terem sido constatadas diferenças estatísticas entre as amostras irradiadas com diferentes densidades de energia, há indicativos que as mudanças estruturais são maiores quanto maior a densidade de energia utilizada. O mesmo se aplica as bandas de amida II, amida III e colágeno ( $1203\text{cm}^{-1}$ ), que não apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre os grupos irradiado com densidade de energia maior ou igual a  $5,7\text{ J/cm}^2$ . Estes resultados corroboram os achados de estudos prévios da literatura que utilizaram o laser de Er,Cr:YSGG na irradiação de outros tecidos calcificados, como esmalte ou dentina, também constataram que as mudanças químicas induzidas nos tecidos irradiados aumentam com o aumento da densidade de energia [11,13].

Considerando os resultados deste estudo, podemos concluir que quando tecido ósseo é cortado por irradiação com o laser de Er,Cr:YSGG esta causa alterações na composição química do tecido ósseo remanescente. As mudanças químicas induzidas pela irradiação com o laser podem modificar o processo de regeneração dependendo da temperatura atingida, conforme reportado na literatura [14, 16], devido principalmente à diminuição de material orgânico no tecido remanescente. Essas mudanças poderiam causar um retardo no processo de regeneração após o corte a laser. Por outro lado, as mudanças promovidas são apenas devido à geração de

calor pelo laser no tecido, fenômeno também provocado por instrumentos rotatórios mecânicos, como discos ou brocas diamantadas. Portanto, ainda se faz necessária a avaliação do processo de cicatrização de tecidos cortados a laser de forma padronizada e comparando-se com métodos tradicionais, de forma a se estabelecer as vantagens de cada método e, com isso, sugerir um protocolo clínico seguro para a utilização da irradiação laser para o corte de tecido ósseo.

Os resultados encontrados auxiliam no entendimento da interação da radiação laser com o tecido ósseo. As alterações causadas pela irradiação não descredenciam o uso do laser de Er,Cr:YSGG, uma vez que as irradiações foram realizadas sem a refrigeração das amostras e mesmo assim, não prejudicam a capacidade regenerativa do tecido, pois todos os componentes ainda foram identificados e não observou-se aumento de temperatura suficiente para ter afetado a matriz inorgânica do tecido ósseo.

## CONCLUSÃO

Foi possível avaliar os efeitos na composição do tecido ósseo causados pela irradiação com o laser de Er,Cr:YSGG. Verificando-se perda gradativa das amidas, colágeno, e água conforme o aumento da densidade de energia empregada, consequência do aumento de temperatura que a irradiação laser causa ao tecido.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio financeiro das agências de fomento: FAPESP - CEPID (05/51689-2) e CNPq - Instituto Nacional de Fotônica – INFO/CNPq (573916/2008-0).

## REFERÊNCIAS

---

[1] SPENCER, P.; PAYNE, J.M.; COBB, C.M.; REINISCH, J.; PEAVY, G.M.; DRUMMER, D.D.; SUCHMAN, D.L.; SWAFFORD, J.R. Effective Laser Ablation of Bone Based on the Absorption Characteristics of Water and

---

Proteins. J. Periodontol. v. 70, n.1, p.68-74, 1999.

[2] WANG, W.; ZHANG, C.; MATSUMOTO, K. In vivo study on the healing processes that occur in the jaws of rabbits following perforation by an Er,Cr:YSGG laser. Lasers in Medical Science, v. 20, p. 21-27, 2005.

[3] ANA, P.A.; BACHMANN, L.; ZEZELE, DM. Lasers Effects on Enamel for Caries Prevention. Laser Physics, v. 16, n. 5, p.865-875, 2006.

[4] STOCK, K.; HIBST, R.; KELLER, U. Comparison of Er:YAG and Er:YSGG ablation of dental hard tissues. SPIE Proceedings, v. 3192, p. 88-95, 1997.

[5] IVANOV, B.; HAKIMIAN, A.M.; PEAVY, G.M.; HAGLUND JR, R.F. Mid-infrared laser ablation of hard biocomposite material: mechanistic studies of pulse duration of interface effects. Applied Surface Science, v. 208-209, p. 77-84, 2003.

[6] PEAVY, G.M.; REINISCH, L.; PAYNE, J.T.; VENUGOPALAN, V. Comparison of Cortical Bone Ablation by Using Infrared laser Wavelengths 2.9 to 9.2  $\mu\text{m}$ . Laser in Surgery and Medicine, v. 26, p. 421-434, 1999.

[7] WANG, X.; ISHIZAKI, N.T.; SUZUKI, N., KIMURA, Y; MATSUMOTO, K. Morphological Changes of Bovine Mandibular Bone Irradiated by Er,Cr:YSGG Laser: An in Vitro Study. J. of Clinical Laser Medicine & Surgery, v. 20, n.5, p. 245-250, 2002.

[8] RABELO, J.S.; BENETTI, C; ANA, P.A; VALÉRIO, M.E.G.; ZEZELE, D.M. Changes in Dental Enamel oven Heated or Irradiation with Er,Cr:YSGG Laser. Analysis by FTIR. Laser Physics, v.20, n. 4, p. 871-875, 2010.

[9] BACHMANN, L.; DIEBOLDER, R.; HIBST, R.; ZEZELE, D.M. Infrared Absorption Bands of Enamel and Dentin Tissues from Human and Bovine Teeth. Applied Spectroscopy Reviews, v. 38, n. 1, p. 1-14, 2007

[10] BOSKEY, A.; CAMACHO, N.P. FT-IR imaging of native and tissue-engineered bone and cartilage. Biomaterials, v.28, p. 2465-2478, 2007.

---

[11] BACHMANN, L.; ZEZELE, D.M. Estrutura e Composição do Esmalte e da Dentina, Tratamento térmico e Irradiação Laser. 1.ed. São Paulo, Ed. Livraria da Física, 2005.

[12] SASAKI, S.K.; AOKI, K.M.; MASUMO, A.; ISHINOSE, S.; YAMADA, S.; ISHIKAWA I. Compositional analysis of root cementum and dentin after Er,YAG laser irradiation compared with CO<sub>2</sub> lased and intact root using Fourier transformed infrared spectroscopy. J. Periodontal Research, v. 37, p. 50-59, 2002.

[13] BACHMANN, L.; DIEBOLDER, R.; HIBST, R.; ZEZELE, D.M. Changes in Chemical Composition and Collagen Structure of Dentine tissue after erbium laser irradiation. Spectrochimica Acta Part A, v. 61, p. 2634-2639, 2005.

[14] LEWANDROWSKI, K.U.; LORENTE, C.; SCHOMACKER, K.T.; FLOTTE, T.J; WILKES, J.W.; DEUTSCH, T.F. Use of the Er:YAG laser for improved plating in maxillofacial surgery: Comparison of bone healing in laser and drill osteotomies. Lasers Surg. Med., v. 19, p. 40-45, 1996.

[15] KURODA, S.; FOWLER, B.O. Compositional, structural, and phase changes in *in vitro* laser-irradiated human tooth enamel. J. Calcified Tissue International, v. 36, p. 361:369, 1983.

[16] NELSON, J.S., ORENSTEIN, A.; LIAW, L.H.; BERNIS, M.W. Mid-infrared erbium:YAG laser ablation of bone: The effect of laser osteotomy on bone healing. Lasers Surg. Med., v. 9, p. 362-374, 1989.