



Luciana Fernandes Pacheco

**Microscopia Digital Co-localizada e Espectroscopia de
Absorção Atômica na Análise do Efeito Quelante sobre a
Dentina Humana**

Dissertação de Mestrado

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Engenharia Metalúrgica e de Materiais da PUC-Rio como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Engenharia Metalúrgica e de Materiais

Orientador: Prof. Sidnei Paciornik

Rio de Janeiro
setembro de 2008



Luciana Fernandes Pacheco

**Microscopia Digital Co-localizada e Espectroscopia de
Absorção Atômica na Análise do Efeito Quelante sobre a
Dentina Humana**

Dissertação apresentada como requisito parcial para
obtenção do grau pelo Programa de Pós-graduação em
Engenharia Metalúrgica e de Materiais da PUC-Rio.
Aprovada pela Comissão Examinadora abaixo assinada.

Sidnei Paciornik
Orientador
PUC-Rio

Marcos Henrique de Pinho Mauricio
Departamento de Ciências dos Materiais e Metalurgia - PUC-Rio

Luciana Moura Sassone
Universidade do Estado do Rio de Janeiro - UERJ

Gustavo André de Deus Carneiro Vianna
Universidade Veiga de Almeida - UVA

José Eugenio Leal
Coordenador Setorial do Centro Técnico Científico - PUC-Rio

Rio de Janeiro, 5 de setembro de 2008

Todos os direitos reservados. É proibida a reprodução total ou parcial do trabalho sem autorização da universidade, da autora e do orientador.

Luciana Fernandes Pacheco

Formação: Graduou-se em Odontologia na UGF em 1997.
Especializou-se em Endodontia na UGF em 2001

Ficha Catalográfica

Pacheco, Luciana Fernandes

Microscopia digital co-localizada e espectroscopia de absorção atômica na análise do efeito quelante sobre a dentina humana / Luciana Fernandes Pacheco ; orientador: Sidnei Paciornik. – 2008.

84 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (Mestrado em Ciência dos Materiais e Metalurgia)–Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

Inclui bibliografia

1. Ciência dos Materiais e Metalurgia – Teses. 2. Descalcificação da dentina. 3. Microscopia digital co-localizada. 4. Análise de imagens. 5. Quelantes. 6. Espectroscopia de absorção atômica. 7. MTAD. 8. HEBP. 9. EDTA. I. Paciornik, Sidnei. II. Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro. Departamento de Ciência dos Materiais e Metalurgia. III. Título.

CDD: 669

Aos meus pais, **José e Ana Maria**, que
sempre me incentivaram e ajudaram na realização
deste sonho.
Para **Simone**, minha irmã: Obrigada por
estar ao meu lado nas horas difíceis,
e por compreender meus momentos de
impaciência.

Agradecimentos

Ao meu orientador, **Sidnei Paciornik**, pela grande dedicação nesses dois anos de convivência. Sempre esteve disposto a me ajudar, a qualquer hora, qualquer dia, e em qualquer lugar que estivesse. Obrigada por me ajudar a concluir essa importante etapa da minha vida, sempre lutando por mim e facilitando a minha trajetória. Obrigada por compreender que eu tinha outras obrigações durante o curso de mestrado, nunca exigindo total exclusividade. Obrigada por transmitir de forma clara seus conhecimentos nas disciplinas do curso e principalmente na área computacional, sempre com muita paciência.

Ao amigo e professor, **Gustavo De Deus**. Obrigada por me incentivar ao curso de mestrado no departamento de materiais e metalurgia da PUC. Sem seu empurrão não teria chegado aqui. Sempre com muita paciência me esclareceu as dúvidas clínicas e acadêmicas. Obrigada por ler e reler meus textos inúmeras vezes, fazendo as correções com muita clareza e disposição. Admiro muito seu amor pelo ensino.

A minha grande amiga e professora **Karla Baumotte**. Foi inspirada em você que dei esse rumo na minha vida. Sou grata por tudo que já fez e continua fazendo por mim. Nunca vou esquecer as portas que você me abriu. Admiro muito a sua garra, sua vontade de passar seus conhecimentos e dedicação com seus alunos. Obrigada

por ser minha AMIGA e confidente, e acima de tudo estar por perto nas horas que sempre preciso. Devo a você a vontade de fazer o mestrado.

A mais nova amiga, **Claudia Reis**, por toda dedicação, empenho, e principalmente paciência, que teve comigo durante esses dois anos. Sem você para me ajudar no preparo das amostras e na manipulação do microscópio óptico, não teria chegado até aqui. Saiba que gostaria de retribuir toda sua ajuda.

Aos professores do DCMM, **Marcos Henrique, Roberto Avillez, Zé Roberto** entre outros, que com muita clareza souberam passar seus conhecimentos e contribuir para a realização desta tese.

À equipe do laboratório de química da PUC, prof. **Reinaldo, Rodrigo e Willian**, que ajudaram muito nos experimentos da tese e tiveram rapidez e paciência, quando eu apressava os resultados.

À equipe do laboratório de metalografia, **Heitor, Marco Aurélio, Ana Cristina e Ana Rosa**, que foram muito eficientes e ágeis na preparação das amostras

Aos meus mestres, **Paulo Garcia e Marcelo Mangelli**, pelos ensinamentos que muito contribuíram para o meu crescimento profissional. Graças a vocês que aprendi a admirar a endodontia.

As minhas amigas endodontistas, **Eliane, Ana Claudia e Elisa**. Com vocês o curso de especialização foi prazeroso e divertido. Obrigada por estarem ao meu lado até hoje, e por contribuírem para minha formação pessoal e profissional.

As minhas amigas não endodontistas, **Roberta, Luciana e Alessandra**, por sempre estarem ao meu lado, sabendo compreender minha correria e nervosismo

Aos meus alunos do curso de atualização da Universidade Gama Filho, que são meu maior incentivo para continuar estudando.

Aos funcionários do **DCMM** que sempre me ajudaram e se mostraram dispostos sempre que precisei.

A toda minha família e amigos que contribuíram de alguma forma para esse trabalho.

Resumo

Pacheco, Luciana Fernandes; Paciornik, Sidnei. **Microscopia Digital Co-localizada e Espectroscopia de Absorção Atômica na Análise do Efeito Quelante sobre a Dentina Humana.** Rio de Janeiro, 2008. 84p. Dissertação de Mestrado - Departamento de Ciência dos Materiais e Metalurgia, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

A partir dos anos 70 constatou-se a formação de uma massa aderida às paredes do canal radicular, após a instrumentação, que foi denominada “smear layer”. Esta camada é composta de material orgânico e inorgânico, tecido pulpar e bactérias, e contribui para obliterar os túbulos dentinários. A remoção desta camada melhora a adaptação entre o material obturador e as paredes dentinárias, elimina bactérias, limpa e alarga os túbulos. Essa remoção é realizada por soluções quelantes, mas a substância e o tempo ideais permanecem desconhecidos. Os quelantes atuam removendo Cálcio da microestrutura dentinária. No presente estudo, foi analisado o poder quelante de MTAD, HEBP e EDTA sobre a dentina coronária, avaliando a fração de área tubular aberta (AreaP) e a massa de Cálcio quelado (MNC (Ca)). Três hipóteses foram propostas e testadas: Não existe diferença entre os quelantes quanto a AreaP (H1) e quanto a MNC(Ca) (H2); existe correlação entre AreaP e MNC(Ca) (H3). Através de Microscopia Óptica Co-localizada (MCL) foram capturadas imagens de vários campos de cada amostra, em diferentes tempos de ataque ácido. Uma seqüência de processamento e análise de imagens foi utilizada para medir AreaP *versus* tempo, para cada quelante. Esta análise foi complementada qualitativamente com Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). As medidas de MNC(Ca) foram realizadas por Espectroscopia de Absorção Atômica (AA) sobre as soluções quelantes utilizadas no experimento de MCL. H1 foi negada, com MTAD sendo o mais potente e HEBP o menos potente dos quelantes. Os resultados de MEV corroboram os resultados de MCL. Os resultados de AA apresentaram grande dispersão, mas indicam que H2 é falsa. H3 foi rejeitada.

Palavras-chave

Descalcificação da Dentina; Microscopia Digital Co-Localizada; Análise de Imagens; Quelantes; Espectroscopia de Absorção Atômica; MTAD; HEBP; EDTA

Abstract

Pacheco, Luciana Fernandes; Paciornik, Sidnei. **Co-Site Digital Microscopy and Atomic Absorption Spectroscopy in the Analysis of the Chelating Effect on Human Dentine.** Rio de Janeiro, 2008. 84p. Masters Dissertation - Departamento de Ciência dos Materiais e Metalurgia, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

In the 70's it was discovered that after instrumentation of the root canal there was the formation of a smear layer, attached to the walls of the canal. This layer is composed of organic and inorganic material, pulp tissue and bacteria, and contributes to the obliteration of the dentine tubules. The removal of this layer improves the adaptation of the filling material to the dentine walls, eliminates bacteria, cleans and enlarges the tubules. Smear layer removal is achieved through the use of chelators but the ideal substance and application time remain unknown. Chelators act through the removal of Calcium from the dentine microstructure. In the present study, the chelating power of MTAD, HEBP and EDTA on coronal dentine was analyzed through the measurement of the area fraction of open tubules (AreaP) and of the chelated Calcium mass (MNC(Ca)). Three hypotheses were proposed and tested: There is no difference between chelators regarding AreaP (H1) and regarding MNC(Ca) (H2); there is correlation between AreaP and MNC(Ca) (H3). Images of several fields of each sample, for different chelation times, were acquired through Co-Site Optical Microscopy (CSOM). An image processing and analysis sequence was employed to measure AreaP *versus* time, for each chelator. This analysis was qualitatively complemented by Scanning Electron Microscopy (SEM). Measurements of MNC(Ca) were obtained by Atomic Absorption Spectroscopy (AA) from the chelator solutions used during the CSOM experiments. H1 was denied, with MTAD found to be the most powerful chelator while HEBP was the weakest. SEM results corroborate these findings. AA results showed wide dispersion but indicate that H2 is false. H3 was rejected.

Keywords

Dentine Demineralization; Co-site Digital Microscopy; Image Analysis;
Chelators; Atomic Absorption Spectroscopy; MTAD; HEBP; EDTA

Sumário

1	INTRODUÇÃO	17
2	OBJETIVOS E HIPÓTESES	20
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
3.1.	Dentina	21
3.2.	Permeabilidade Dentinária	22
3.3.	Smear Layer	24
3.4.	Substâncias Quelantes	25
3.4.1.	EDTA	26
3.4.1.1.	A química do EDTA	27
3.4.1.2.	Modo de ação do EDTA	27
3.4.2.	EDTA e suas associações	28
3.4.3.	Ácido cítrico	29
3.4.4.	MTAD	30
3.4.5.	HEBP	31
4	MATERIAIS E MÉTODOS	33
4.1.	Seleção dos dentes	33
4.2.	Preparação Metalográfica	33
4.3.	Parâmetros Experimentais	34
4.3.1.	Remoção do Smear Layer	35
4.3.2.	Diâmetro dos Furos	35
4.3.3.	Uso da pipeta	37
4.3.4.	Aplicação dos Ácidos e Tempos Experimentais	37
4.3.5.	Número de Campos para Microscopia Co-Localizada	38
4.3.6.	Obtenção de Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura	38
4.4.	Microscopia Óptica Digital Co-Localizada	38
4.5.	Processamento e Análise Digital de Imagens (PADI)	40

4.6. Absorção Atômica de Cálcio	43
4.7. Microscopia Eletrônica de Varredura	43
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
5.1. Introdução	44
5.2. Análise por Microscopia	45
5.2.1.Experimentos de Calibração	45
5.2.1.1.Dente CAL1	45
5.2.1.2.Dente CAL2	47
5.2.1.3.Dente CAL3	50
5.2.2.Experimentos Comparativos	54
5.2.2.1.Dente COMP1	54
5.2.2.2.Dente COMP2	58
5.2.3.Discussão dos resultados de microscopia	62
5.3. Análise por Absorção Atômica	65
5.3.1.Experimentos de Calibração	65
5.3.1.1.Dente CAL1	65
5.3.1.2.Dente CAL2	66
5.3.1.3.Dente CAL3	67
5.3.2.Experimentos Comparativos	68
5.3.2.1.Dente COMP1	68
5.3.2.2.Dente COMP2	69
5.3.3.Discussão dos resultados de absorção atômica	70
5.4. análise de correlação entre mcl e aa	71
5.5. descalcificação com quelante não saturado	72
6 CONCLUSÕES	75
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76
8 APÊNDICE – Rotina de processamento de imagens	81

Lista de figuras

Figura 1: Estruturas que compõem o dente	21
Figura 2: Canalículos Dentinários	22
Figura 3: Ilustração do corte das amostras embutidas em resina epóxi com exposição da dentina do terço cervical das raízes.	34
Figura 4: Pinça perfuradora com diferentes diâmetros	36
Figura 5: Furos grandes e afastados	36
Figura 6: Furos pequenos e próximos	37
Figura 7: Laboratório de Microscopia Digital (DCMM PUC-Rio)	39
Figura 8: Ilustração do recipiente utilizado para o ataque ácido sem remover a amostra do microscópio.	39
Figura 9: Desenho esquemático ilustrando a região de análise da amostra de dentina e os campos capturados automaticamente pelo sistema.	42
Figura 10: Dente CAL1 – Evolução microestrutural para EDTA. As linhas, de cima para baixo, correspondem aos tempos 0, 60, 180 e 300s.	45
Figura 11: AreaP X Tempo para os 3 furos do Dente CAL1	46
Figura 12: Dente CAL2 – Evolução microestrutural para EDTA. As linhas, de cima para baixo, correspondem aos tempos 0, 15, 30, 60, 180 e 300s.	48
Figura 13: AreaP X Tempo	49
Figura 14: Dente CAL2 (FURO1=EDTA). (a) SE 84x; (b) SE 1500x; (c) BSE 1500x	50
Figura 15: Dente CAL3 – Evolução microestrutural para EDTA. As linhas, de cima para baixo, correspondem aos tempos 0, 15, 30, 60, 180 e 300s.	51
Figura 16: AreaP x tempo	52
Figura 17: Dente CAL3 – EDTA. Microestrutura após 300s de ataque. MEV, 1500X, SE (esquerda) e BSE (direita). As linhas correspondem aos 3 furos.	53
Figura 18: Dente COMP1– Evolução microestrutural para 3 ácidos. As linhas, de cima para baixo, correspondem aos tempos 0, 15, 30, 60, 180 e 300s.	55
Figura 19: AreaP X Tempo	56
Figura 20: Dente COMP1. Microestrutura após 300s de ataque. MEV, 1500X,	

SE (esquerda) e BSE (direita). As linhas, de cima para baixo, correspondem aos ácidos MTAD, HEBP e EDTA.	57
Figura 21: Dente COMP2 – Evolução microestrutural para 3 ácidos. As linhas, de cima para baixo, correspondem aos tempos 0, 15, 30, 60, 180 e 300s.	59
Figura 22: AreaP X Tempo	60
Figura 23: Dente COMP2. Microestrutura após 300s de ataque. MEV, 1500X, SE (esquerda) e BSE (direita). As linhas, de cima para baixo, correspondem aos ácidos MTAD, HEBP e EDTA.	61
Figura 24: MNC(Ca) X Tempo	65
Figura 25: MNC(Ca) X Tempo	66
Figura 26: MNC(Ca) X Tempo	68
Figura 27: MNC(Ca) X Tempo	69
Figura 28: MNC(Ca) X Tempo	70
Figura 29: AreaP X MNC(Ca)	71
Figura 30: AreaP X MNC(Ca)	71
Figura 31: Quantidade de Cálcio quelado em função do tempo.	74

Lista de tabelas

Tabela 1: Amostras e condições experimentais	34
Tabela 2: Dente CAL1 – Fração de Área ocupada por túbulos abertos	46
Tabela 3: Dente CAL2 – Fração de Área ocupada por túbulos abertos	47
Tabela 4: Dente CAL3 – Fração de Área ocupada por túbulos abertos	52
Tabela 5: Dente COMP1 Fração de Área ocupada por túbulos abertos	54
Tabela 6: Dente COMP2 – Fração de Área ocupada por túbulos abertos	58
Tabela 7: Comparação Estatística entre os ácidos nos diversos tempos – Dente COMP1	62
Tabela 8: Comparação Estatística entre os ácidos nos diversos tempos – Dente COMP2	62
Tabela 9: Dente CAL1 – Resultados de Absorção Atômica	65
Tabela 10: Dente CAL2 – Resultados de Absorção Atômica	66
Tabela 11: Dente CAL3 – Resultados de Absorção Atômica	67
Tabela 12: Dente COMP1 – Resultados de Absorção Atômica	68
Tabela 13: Dente COMP2 – Resultados de Absorção Atômica	69