

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. INTRODUÇÃO

Os resultados obtidos neste estudo serão apresentados em dois grandes grupos:

- Experimentos de calibração – nos quais apenas uma substância de referência, EDTA, foi utilizada. Nestes experimentos buscou-se otimizar os diversos parâmetros envolvidos, antes de passar para os experimentos de comparação entre quelantes diferentes.
- Experimentos comparativos – nos quais 3 quelantes diferentes são aplicados a regiões similares de cada dente, e uma comparação entre os efeitos das substâncias foi realizada.

Para cada experimento, tabelas e gráficos sintetizam as condições e os resultados:

- Análise por Microscopia Óptica Co-localizada – Obteve-se a fração de Área Tubular, que é a média da área ocupada por túbulos abertos de todos os campos, em cada tempo de ataque.
- Análise por Absorção Atômica – Obteve-se os resultados da Absorção Atômica, onde  $M(\text{Ca})$  é a massa de Cálcio fornecida pelo lab. de química;  $MN(\text{Ca})$  é a massa normalizada de Cálcio (razão entre a massa de Cálcio e a área do furo); e  $MNC(\text{Ca})$  é a massa normalizada de Cálcio cumulativa (somando as massas de todos os tempos de ataque).

## 5.2. ANÁLISE POR MICROSCOPIA

### 5.2.1.EXPERIMENTOS DE CALIBRAÇÃO

#### 5.2.1.1.DENTE CAL1

No Dente CAL1, foram utilizados furos maiores e afastados entre si. A substância utilizada foi o EDTA, e o volume não foi padronizado. Os tempos experimentais foram 60s, 180s e 300s

A **Figura 10** mostra a evolução das alterações morfológicas dentinárias em função do tempo, de cada furo atacado.

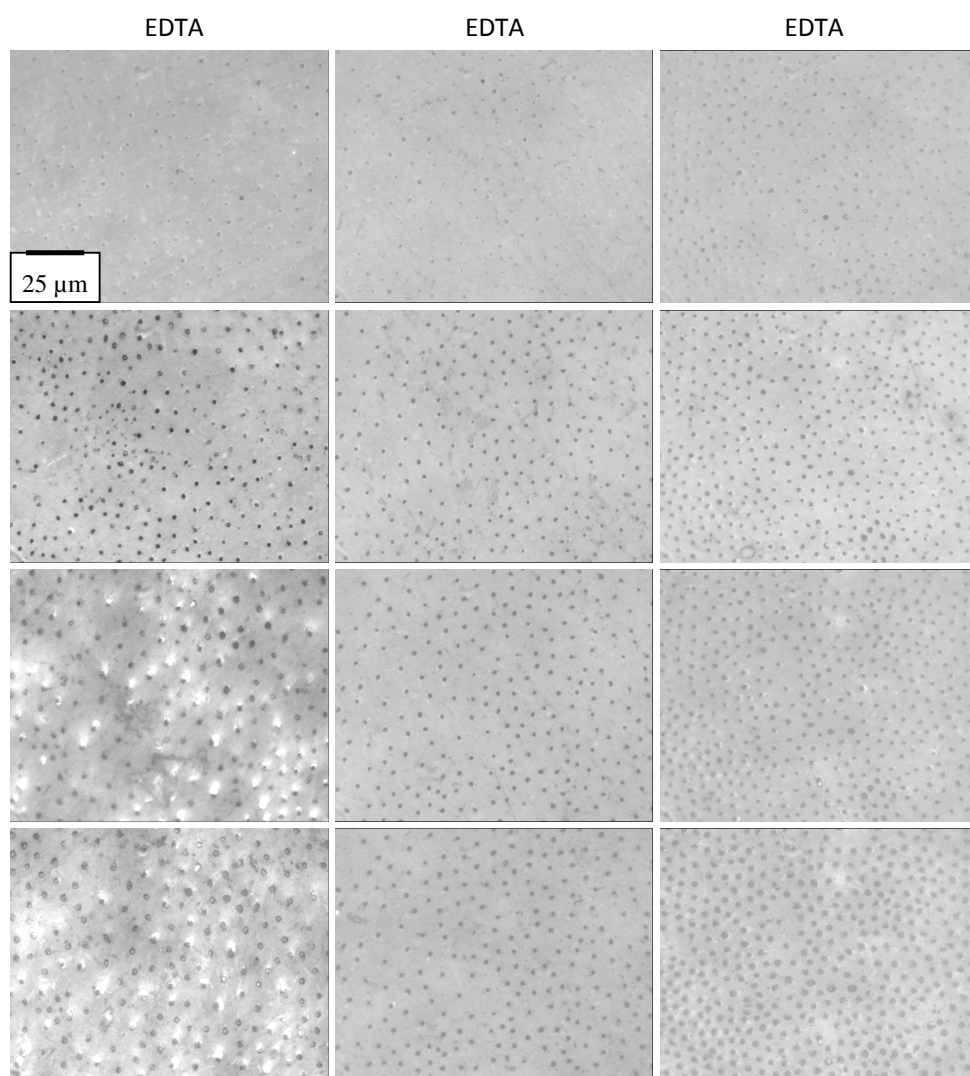


Figura 10: Dente CAL1 – Evolução microestrutural para EDTA. As linhas, de cima para baixo, correspondem aos tempos 0, 60, 180 e 300s.

Mediu-se a fração de área tubular (AreaP) em 16 campos para cada tempo (60s, 180s, 300s). Como no Dente CAL1 não houve remoção prévia de “smear layer”, não foi possível medir a fração de área ocupada por túbulos abertos em 0s. Obteve-se a média que é apresentada na tabela abaixo:

Tabela 2: Dente CAL1 – Fração de Área ocupada por túbulos abertos

|           | Furo 1    | Furo 2    | Furo 3    |
|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Tempo (s) | AreaP (%) | AreaP (%) | AreaP (%) |
| 60        | 3.23      | 1.93      | 4.56      |
| 180       | 3.95      | 2.25      | 6.76      |
| 300       | 4.64      | 3.33      | 11.45     |

No gráfico abaixo (**Figura 11**), são apresentadas as curvas de AreaP *versus* tempo, para cada furo:

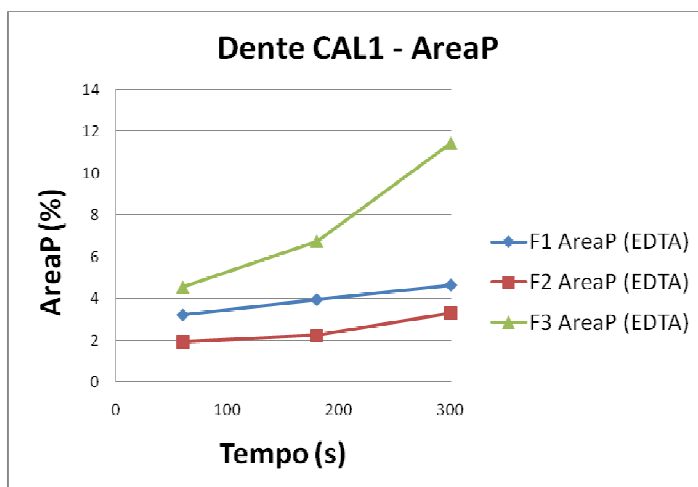


Figura 11: AreaP X Tempo para os 3 furos do Dente CAL1

Como era de se esperar, o valor de AreaP cresce com o tempo, indicando abertura dos túbulos dentinários. O gráfico mostra, mais uma vez, diferenças grandes entre os 3 furos, provavelmente associadas a diferenças de microestrutura entre as 3 regiões de dentina. O maior crescimento de AreaP para o Furo 3 pode ser visualizado na **Figura 11**.

### 5.2.1.2.DENTE CAL2

Visando reduzir a variabilidade entre regiões de dentina, no Dente CAL2 analisaram-se furos menores e mais próximos entre si.

A **Figura 12** mostra as imagens obtidas no Microscópio Óptico, de um dos campos, em cada tempo experimental:

Mediu-se a fração de área tubular (AreaP) em 12 campos para cada tempo (0s, 15s, 30s, 60s, 180s, 300s) e obteve-se a média que é apresentada na tabela abaixo:

Tabela 3: Dente CAL2 – Fração de Área ocupada por túbulos abertos

|                  | <b>Furo 1</b>    | <b>Furo 2</b>    | <b>Furo3</b>     |
|------------------|------------------|------------------|------------------|
| <b>Tempo (s)</b> | <b>AreaP (%)</b> | <b>AreaP (%)</b> | <b>AreaP (%)</b> |
| 0                | 2.20             | 3.04             | 1.35             |
| 15               | 2.14             | 2.80             | 1.23             |
| 30               | 2.09             | 2.45             | 1.30             |
| 60               | 2.18             | 3.25             | 1,59             |
| 180              | 2.73             | 3.94             | 2.21             |
| 300              | 3.48             | 6.00             | 2.60             |



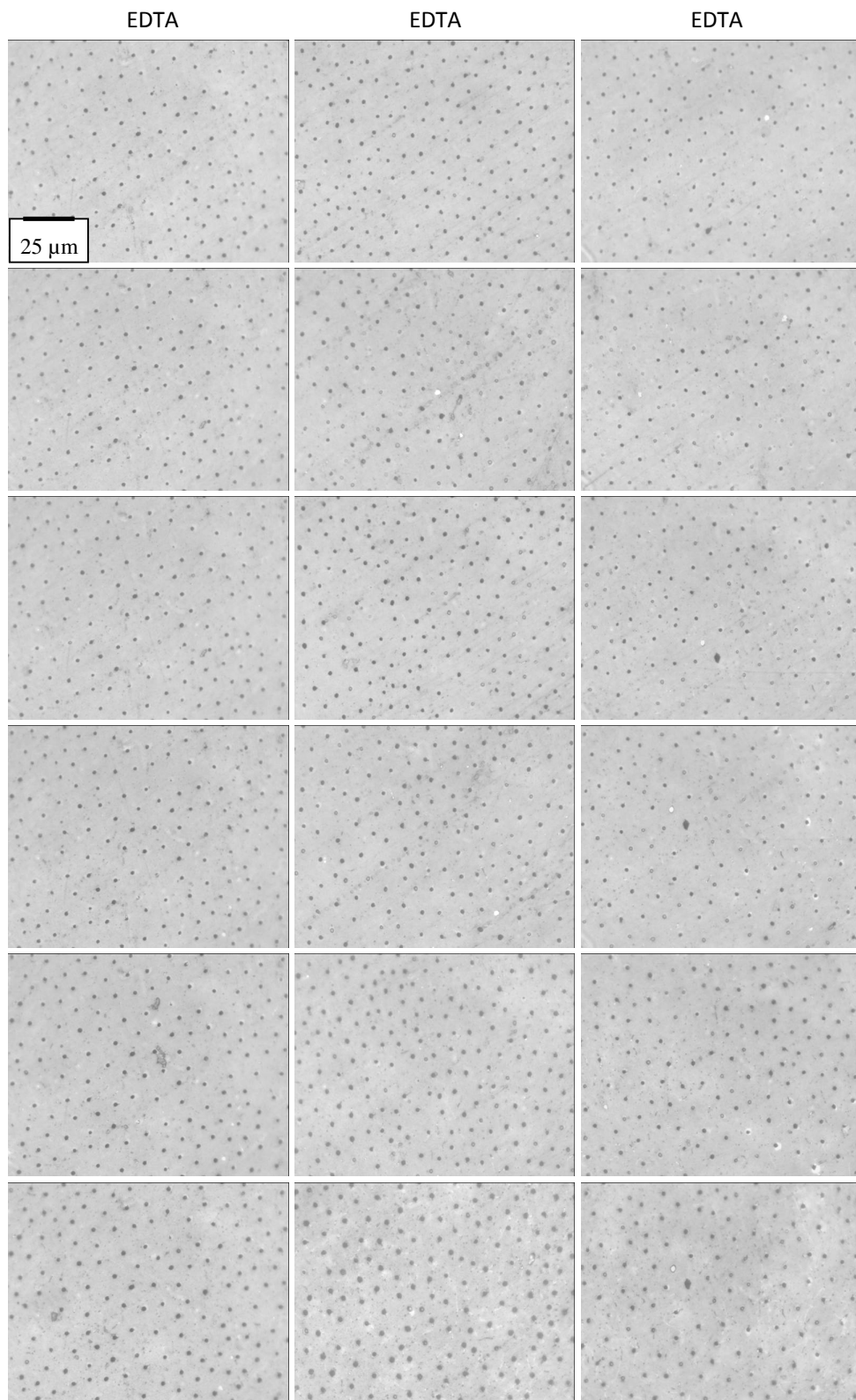


Figura 12: Dente CAL2 – Evolução microestrutural para EDTA. As linhas, de cima para baixo, correspondem aos tempos 0, 15, 30, 60, 180 e 300s.

No gráfico abaixo (**Figura 13**), são apresentadas as curvas de AreaP *versus* tempo, para cada furo:

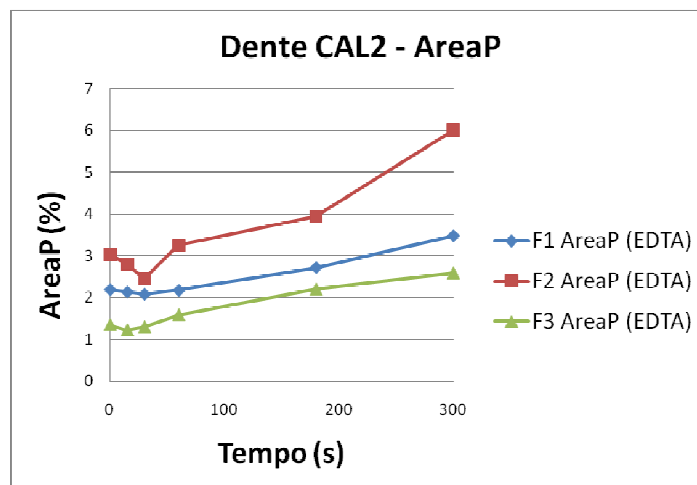


Figura 13: AreaP X Tempo

A tendência de crescimento de AreaP com o tempo de quelação fica evidente. Variações entre os furos ainda estão presentes mas em menor escala, quando comparado ao Dente CAL1. Isto pode ser explicado pela maior proximidade dos furos e com isso áreas com morfologias mais semelhantes foram selecionadas.

A **Figura 14** mostra as imagens obtidas no Microscópio Eletrônico de Varredura, em SE e BSE, de um determinado campo, após o ataque do quelante em 300s. Optou-se em mostrar apenas as imagens do furo 1 uma vez que as imagens dos furos 2 e 3 são similares:

- Em (a) observa-se a imagem em SE do furo completo, para mostrar o limite da área atacada.
- Em (b) observa-se a imagem em SE para visualizar o relevo - a imagem mostra um efeito de carga (acúmulo de elétrons) ao redor dos túbulos, mostrando contornos brilhantes
- Em (c) observa-se a imagem em BSE, mostrando a abertura tubular, a dentina peritubular e a dentina intertubular.

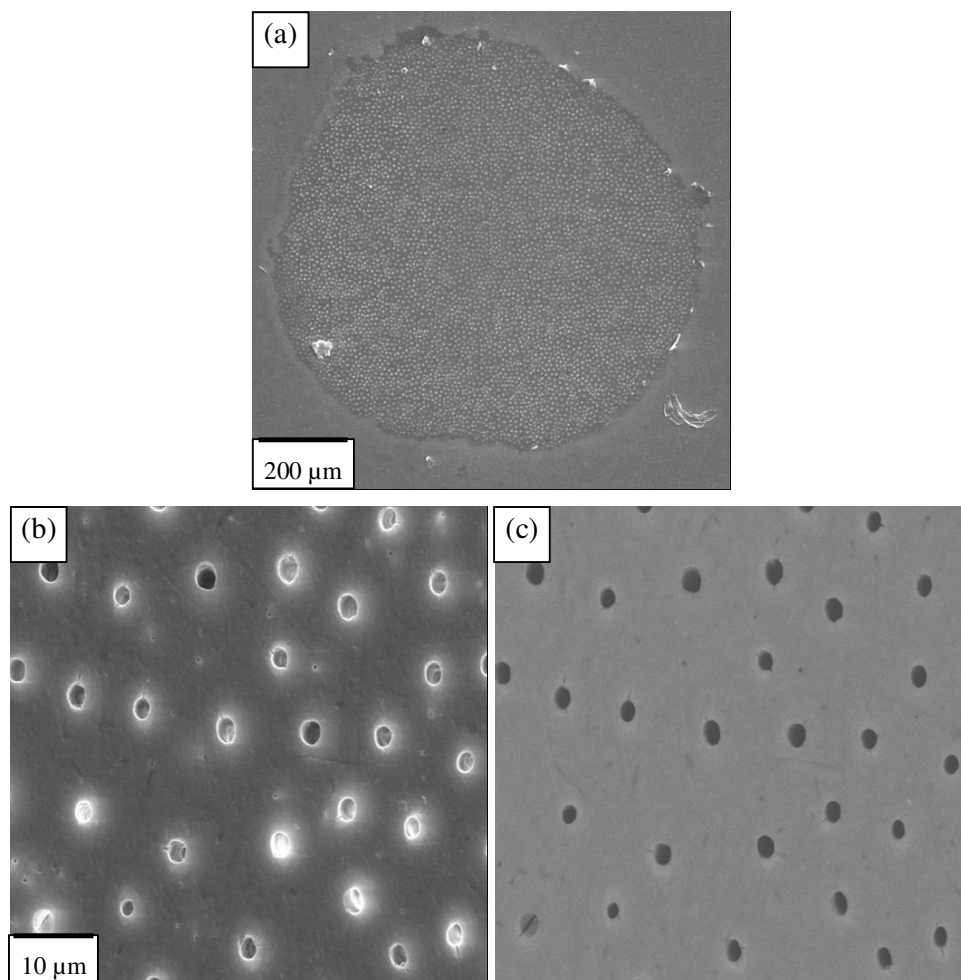


Figura 14: Dente CAL2 (FURO1=EDTA). (a) SE 84x; (b) SE 1500x; (c) BSE 1500x

### 5.2.1.3.DENTE CAL3

Os resultados dos Dentes CAL1 e CAL2 mostraram grande instabilidade. Parte destes problemas foi atribuída à falta de controle sobre o volume de quelante utilizado. Assim, a partir do Dente CAL3, passou-se a utilizar uma micro-pipeta para aplicar um volume fixo de quelante (10  $\mu$ l) em cada furo.

A **Figura 15** mostra as imagens obtidas no Microscópio Óptico, de um dos campos, em cada tempo experimental:

Mediu-se a fração de área tubular (AreaP) em 15 campos (furo 1), 20 campos (furo 2) e 15 campos (furo 3) para cada tempo (0s, 15s, 30s, 60s, 180s, 300s) e obteve-se a média que é apresentada na Tabela 4.:

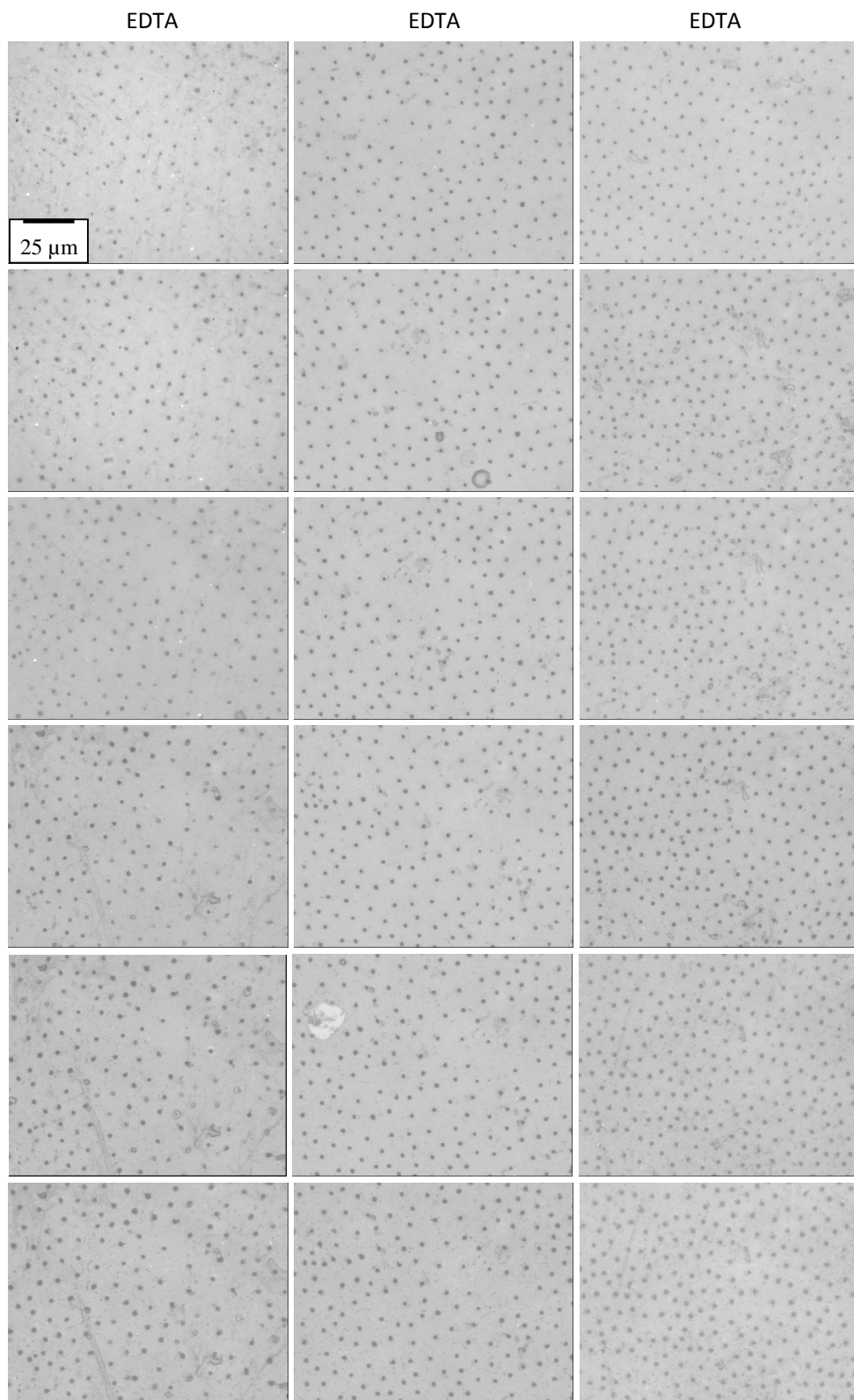


Figura 15: Dente CAL3 – Evolução microestrutural para EDTA. As linhas, de cima para baixo, correspondem aos tempos 0, 15, 30, 60, 180 e 300s.

Tabela 4: Dente CAL3 – Fração de Área ocupada por túbulos abertos

|           | Furo 1    | Furo 2    | Furo 3    |
|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Tempo (s) | AreaP (%) | AreaP (%) | AreaP (%) |
| 0         | 1.31      | 1.87      | 2.64      |
| 15        | 2.04      | 2.23      | 3.39      |
| 30        | 2.61      | 2.67      | 3.46      |
| 60        | 2.23      | 2.58      | 3.71      |
| 180       | 2.69      | 3.23      | 4.39      |
| 300       | 3.66      | 3.59      | 5.52      |

No gráfico abaixo (**Figura 16**), são apresentadas as curvas de AreaP *versus* tempo, para cada furo:

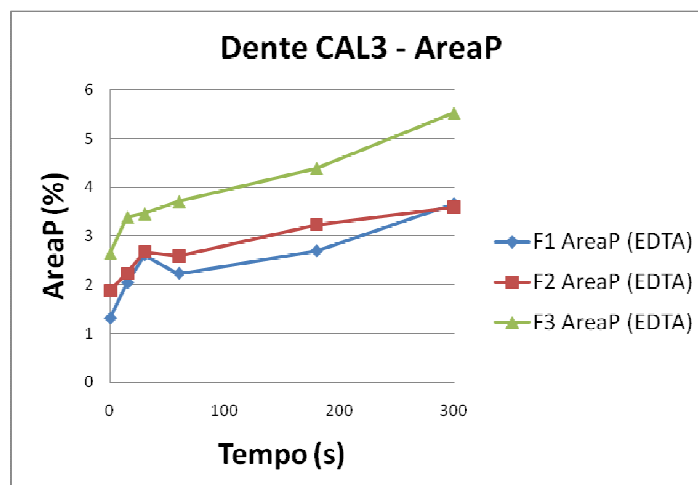


Figura 16: AreaP x tempo

A tendência de crescimento de AreaP com o tempo de quelação também fica evidente no Dente CAL3. Os valores de AreaP nos Dente CAL2 e CAL3 são similares. A pequena diferença na quantidade de túbulos abertos no Dente CAL3, se deve ao menor volume de quelante usado neste dente.

A **Figura 17** mostra as imagens obtidas no MEV, em SE e BSE. As imagens mostram um determinado campo, após o ataque em 300s.

Qualitativamente observa-se semelhança aos resultados quantificados na MOCL, onde o furo 3 mostrou uma fração de área tubular maior que os outros 2 furos. É possível observar também diferenças morfológicas entre as regiões dos 3 furos.

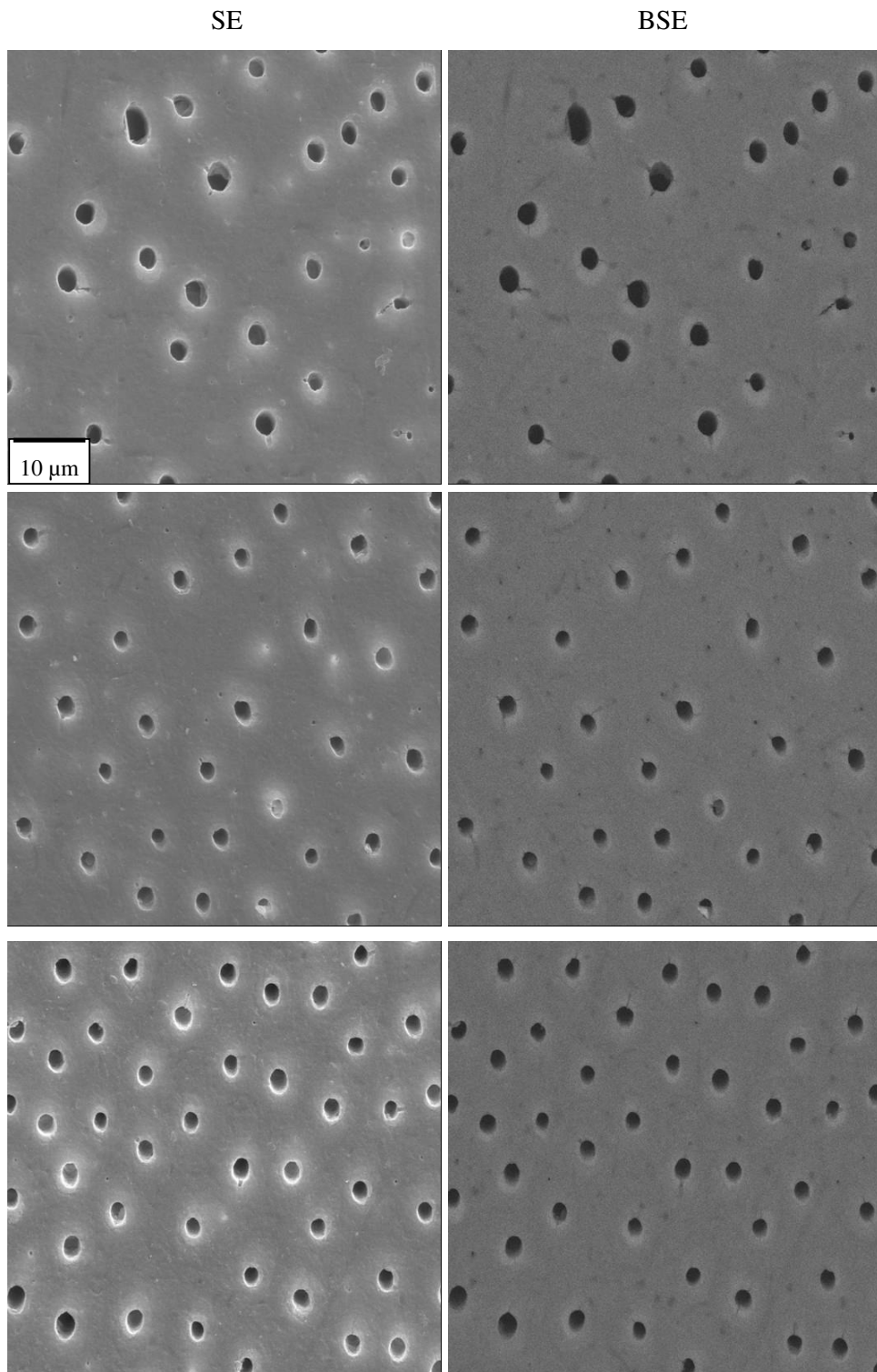


Figura 17: Dente CAL3 – EDTA. Microestrutura após 300s de ataque. MEV, 1500X, SE (esquerda) e BSE (direita). As linhas correspondem aos 3 furos.

## 5.2.2.EXPERIMENTOS COMPARATIVOS

### 5.2.2.1.DENTE COMP1

A seqüência experimental do Dente COMP1 é a mesma do Dente CAL3, porém utilizando 3 ácidos. A **Figura 18** mostra as imagens obtidas no Microscópio Óptico, de um dos campos, em cada tempo experimental, para cada ácido.

Mediu-se a fração de área tubular (AreaP) em 12 campos (nos 3 furos), para cada tempo (0s, 15s, 30s, 60s, 180s, 300s) e obteve-se a média que é apresentada na tabela abaixo:

Tabela 5: Dente COMP1 Fração de Área ocupada por túbulos abertos

|                  | <b>MTAD</b>     | <b>HEBP</b>     | <b>EDTA</b>     |
|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| <b>Tempo (s)</b> | <b>AreaP(%)</b> | <b>AreaP(%)</b> | <b>AreaP(%)</b> |
| 0                | 1.98            | 2.78            | 2.01            |
| 15               | 3.72            | 2.72            | 2.49            |
| 30               | 6.42            | 2.81            | 2.15            |
| 60               | 8.91            | 2.52            | 2.04            |
| 180              | 6.49            | 2.63            | 2.31            |
| 300              | 4.66            | 2.81            | 3.36            |

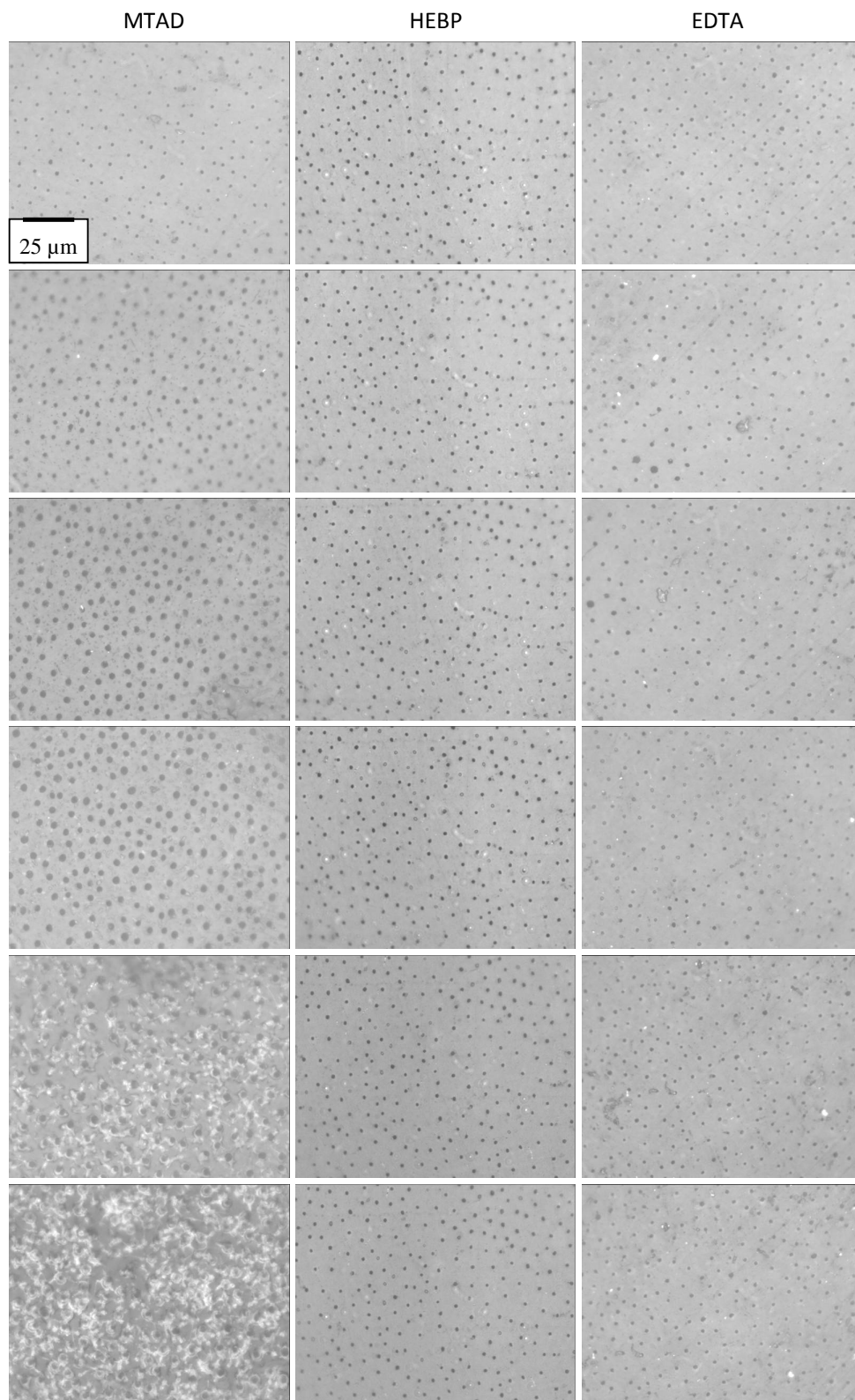


Figura 18: Dente COMP1– Evolução microestrutural para 3 ácidos. As linhas, de cima para baixo, correspondem aos tempos 0, 15, 30, 60, 180 e 300s.



No gráfico abaixo (**Figura 19**), são apresentadas as curvas de AreaP *versus* tempo, para cada furo. De acordo com a **Figura 18**, observa-se que nas imagens de MTAD em 180s e 300s perde-se a informação dos túbulos, não sendo possível processá-las. Por isso as medidas da MCL nesses tempos, foram descartadas e, em 300s a medida foi extraída através da imagem de MEV (ponto azul indicado por uma seta no gráfico). Embora a análise estatística no MEV seja restrita, porque se refere a um único campo, cujo aumento é maior que no MO e por isso a área analisada é menor, observa-se que a medida de AreaP em 300s foi bem superior aos outros 2 ácidos.

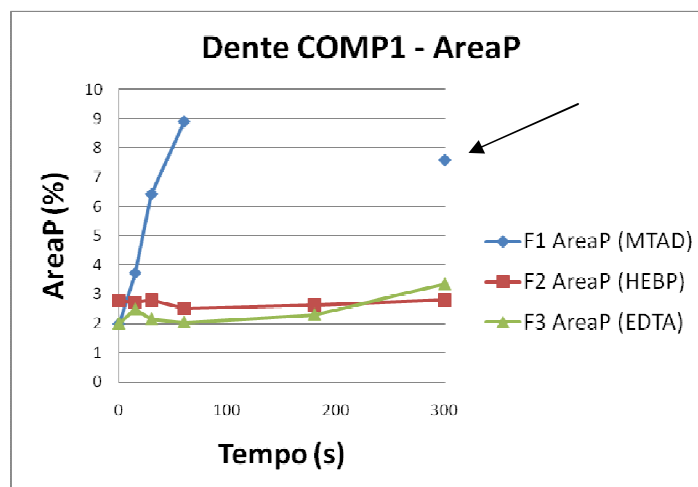


Figura 19: AreaP X Tempo

Em relação a Área de túbulos abertos no Dente COMP1, observa-se que as curvas do MTAD foi superior ao HEBP e EDTA.

A **Figura 20** mostra as imagens obtidas no Microscópio Eletrônico de Varredura, em SE e BSE, de um determinado campo, após o ataque em 300s:

Assim como na MCL, após 300s, observa-se que a fração de área tubular no MTAD foi maior que o EDTA, que por sua vez foi pouco maior que o HEBP.

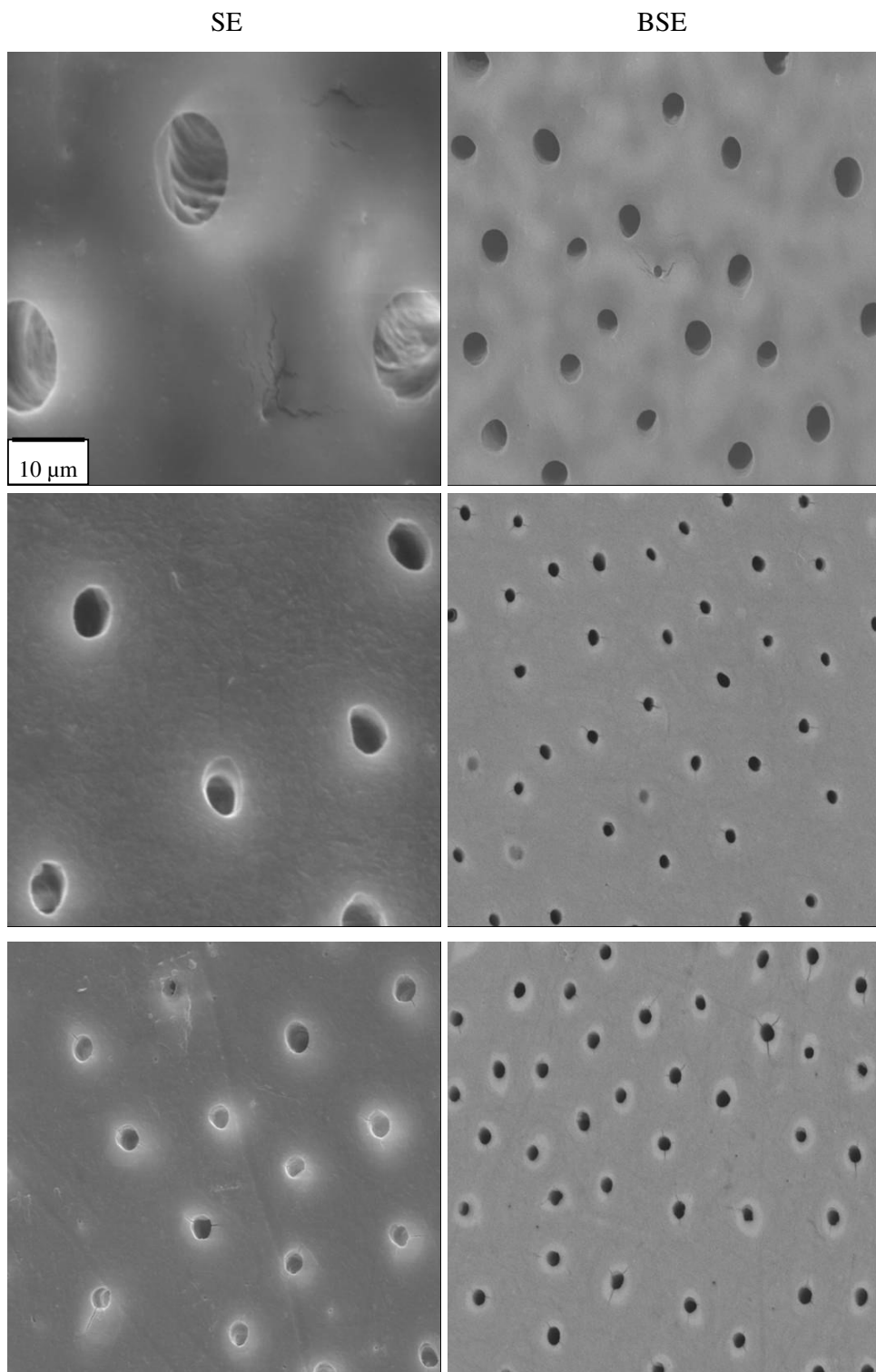


Figura 20: Dente COMP1. Microestrutura após 300s de ataque. MEV, 1500X, SE (esquerda) e BSE (direita). As linhas, de cima para baixo, correspondem aos ácidos MTAD, HEBP e EDTA.

### 5.2.2.2.DENTE COMP2

A sequência experimental do Dente COMP2 é a mesma do Dente COMP1. A **Figura 21** mostra as imagens obtidas no Microscópio Óptico, de um dos campos, em cada tempo experimental.

Mediu-se a fração de área tubular (AreaP) em 12 campos (furo 1=MTAD), 12 campos (furo 2=HEBP) e 16 campos (furo 3=EDTA), para cada tempo (0s, 15s, 30s, 60s, 180s, 300s) e obteve-se a média que é apresentada na tabela abaixo:

Tabela 6: Dente COMP2 – Fração de Área ocupada por túbulos abertos

|                  | <b>MTAD</b>      | <b>HEBP</b>      | <b>EDTA</b>      |
|------------------|------------------|------------------|------------------|
| <b>Tempo (s)</b> | <b>AreaP (%)</b> | <b>AreaP (%)</b> | <b>AreaP (%)</b> |
| 0                | 2.99             | 3.55             | 3.26             |
| 15               | 6.47             | 3.79             | 3.47             |
| 30               | 11.33            | 2.79             | 3.56             |
| 60               | 14               | 2.83             | 3.57             |
| 180              | 10.34            | 2.93             | 4.07             |
| 300              | 5.74             | 3.29             | 5.23             |

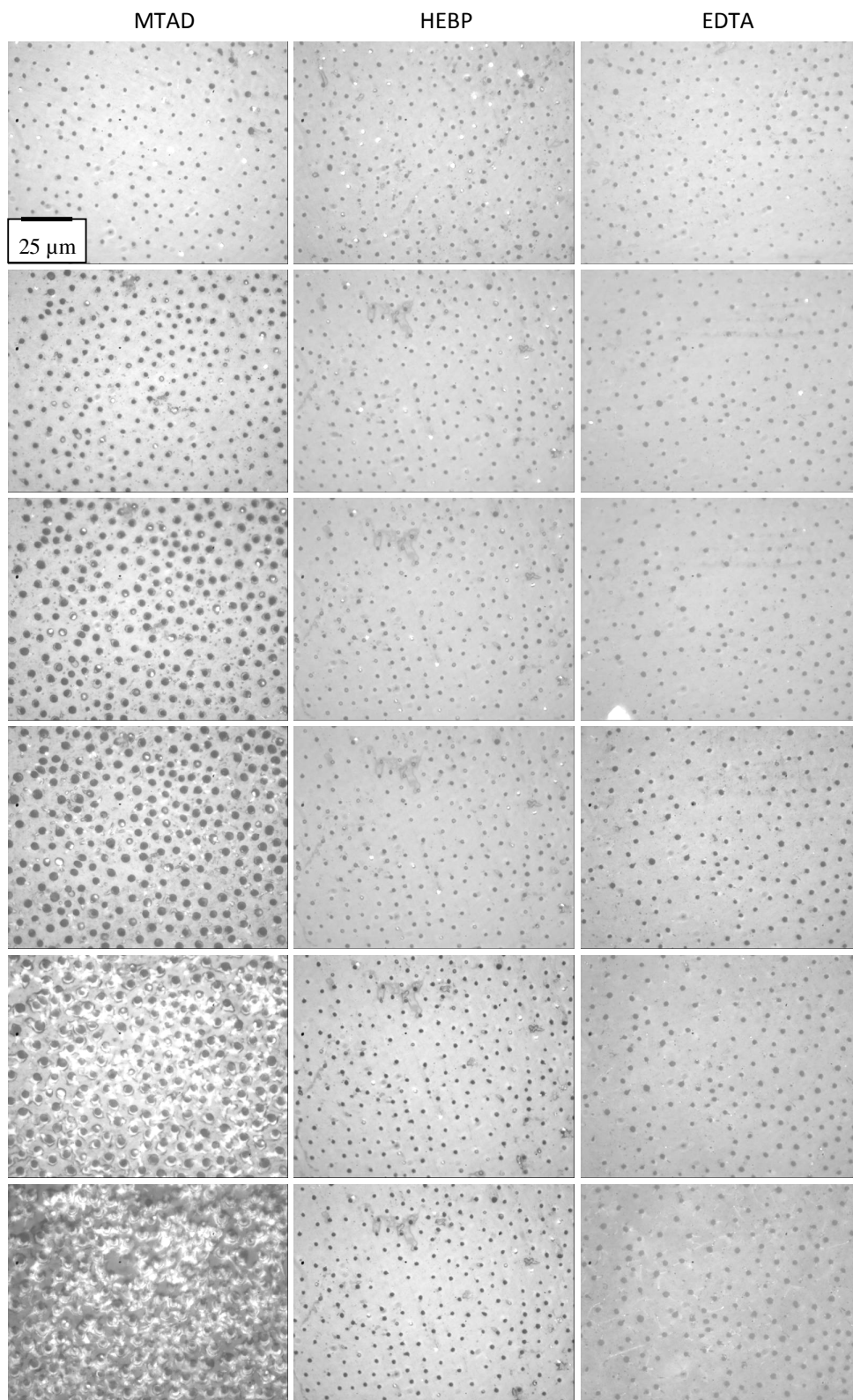


Figura 21: Dente COMP2 – Evolução microestrutural para 3 ácidos. As linhas, de cima para baixo, correspondem aos tempos 0, 15, 30, 60, 180 e 300s.

No gráfico abaixo (**Figura 22**), são apresentadas as curvas de AreaP *versus* tempo, para cada furo. Também foram descartadas as medidas de MTAD em 180s e 300s da MCL (pelos mesmos motivos do Dente COMP1), e a medida de MEV em 300s está representada pelo ponto azul (indicado pela seta) no gráfico abaixo:

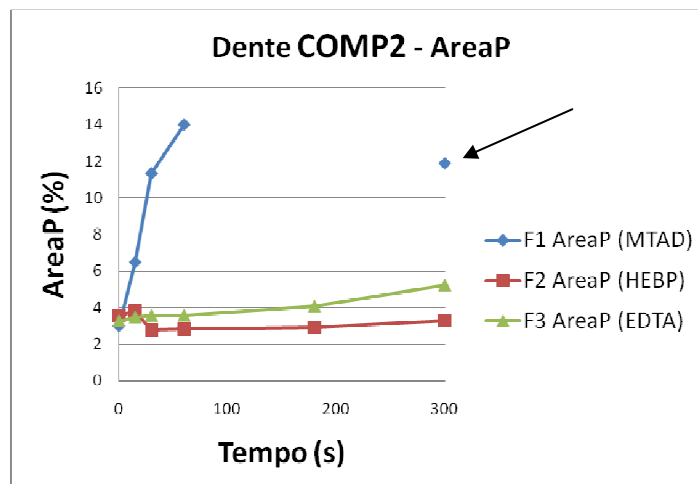


Figura 22: AreaP X Tempo

Em relação à Área de túbulos abertos, tanto os valores quanto o comportamento dos três ácidos, estão semelhantes nos Dentes COMP1 e COMP2.

A **Figura 23** mostra as imagens obtidas no Microscópio Eletrônico de Varredura, em SE e BSE, de um determinado campo, após o ataque em 300s.

Em 300s, observa-se que a fração de área tubular do MTAD foi superior que o EDTA, que por sua vez foram superiores ao HEBP. Os resultados são semelhantes a MCL.

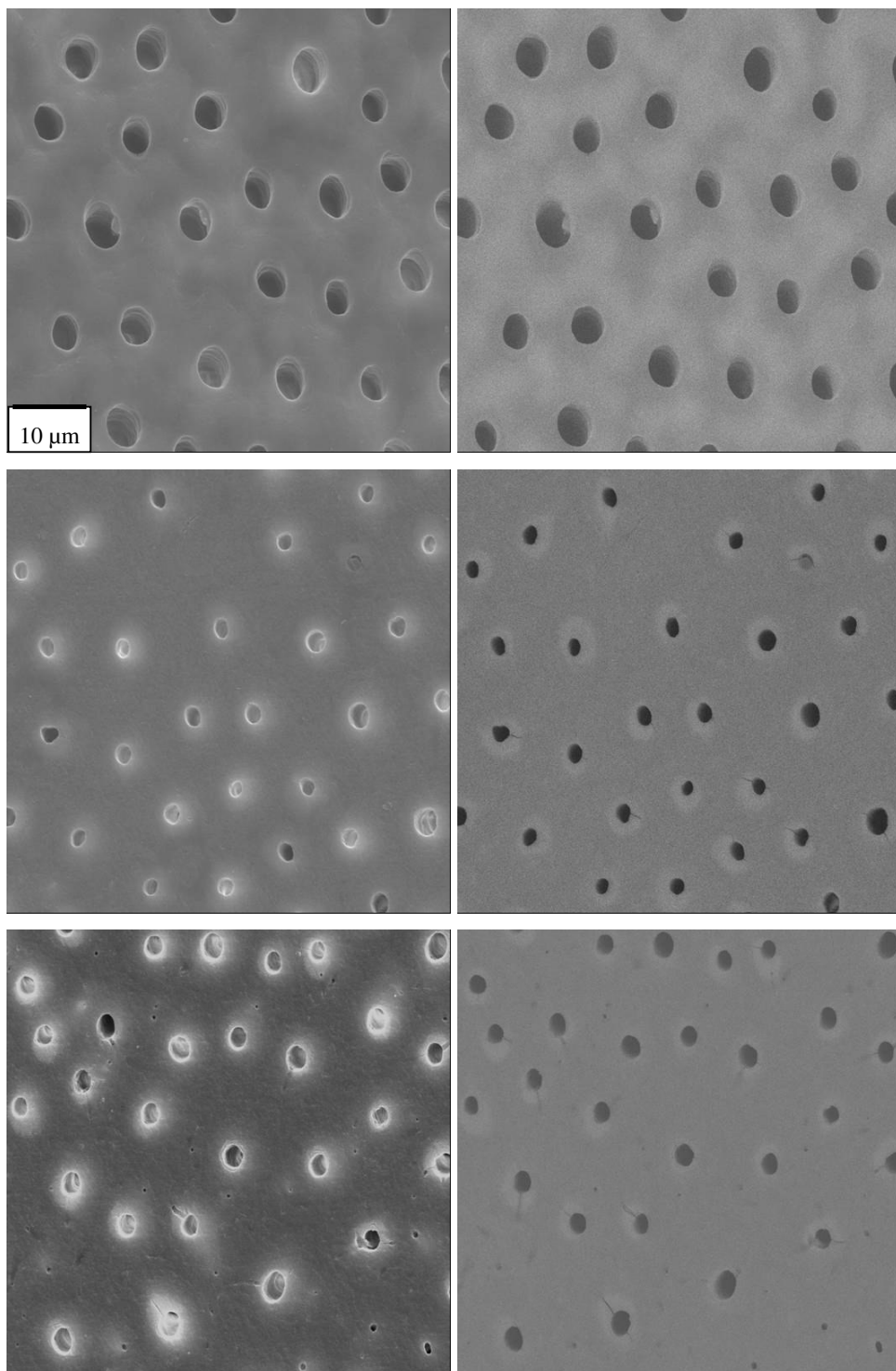


Figura 23: Dente COMP2. Microestrutura após 300s de ataque. MEV, 1500X, SE (esquerda) e BSE (direita). As linhas, de cima para baixo, correspondem aos ácidos MTAD, HEBP e EDTA.

### 5.2.3.DISCUSSÃO DOS RESULTADOS DE MICROSCOPIA

Baseado nos resultados apresentados, a Hipótese Nula 1 não foi confirmada. Os valores médios de Fração de Área Tubular em cada tempo e para cada ácido foram comparados através do teste t de Student, com intervalo de confiança de 95%. Os resultados estão representados nas tabelas a seguir (Tabela 7 e Tabela 8):

Tabela 7: Comparação estatística entre os ácidos nos diversos tempos – Dente COMP1

|      | t = 0 s  |      | t = 15 s  |      | t = 30 s  |      |
|------|----------|------|-----------|------|-----------|------|
|      | HEBP     | EDTA | HEBP      | EDTA | HEBP      | EDTA |
| MTAD | S        | N    | S         | S    | S         | S    |
| HEBP |          | S    |           | N    |           | S    |
|      | t = 60 s |      | t = 180 s |      | t = 300 s |      |
|      | HEBP     | EDTA | HEBP      | EDTA | HEBP      | EDTA |
| MTAD | S        | S    | S         | S    | S         | S    |
| HEBP |          | S    |           | N    |           | S    |

S – representa diferença significativa ( $P < 0.05$ )

N – representa que não há diferença significativa ( $P > 0.05$ )

Tabela 8: Comparação estatística entre os ácidos nos diversos tempos – Dente COMP2

|      | t = 0 s  |      | t = 15 s  |      | t = 30 s  |      |
|------|----------|------|-----------|------|-----------|------|
|      | HEBP     | EDTA | HEBP      | EDTA | HEBP      | EDTA |
| MTAD | S        | N    | S         | S    | S         | S    |
| HEBP |          | N    |           | N    |           | N    |
|      | t = 60 s |      | t = 180 s |      | t = 300 s |      |
|      | HEBP     | EDTA | HEBP      | EDTA | HEBP      | EDTA |
| MTAD | S        | S    | S         | S    | S         | S    |
| HEBP |          | N    |           | N    |           | S    |

S – representa diferença significativa ( $P < 0.05$ )

N – representa que não há diferença significativa ( $P > 0.05$ )

Observa-se nos experimentos com os Dentes COMP1 e COMP2, que o MTAD promoveu uma maior fração de área tubular aberta que os outros 2 ácidos, e estatisticamente houve diferença significativa entre ele e os outros dois ácidos em todos os tempos de ataque. No Dente COMP1, o HEBP e o EDTA não

mostraram diferença significativa em 15s e 180s, e no Dente COMP2 estes mesmos ácidos só mostraram diferença significativa em 300s.

Quanto aos dados obtidos, dois pontos interessantes podem ser destacados: (1) o rápido aumento da fração de área tubular promovido pelo MTAD, e (2) a saturação da capacidade desmineralizante do MTAD após 60s. Isto também foi verificado por De-Deus [41] em seu estudo.

O método utilizado no presente trabalho representa uma evolução sobre a maioria dos estudos tradicionais de microscopia na superfície dentinária, em que se utiliza como base a análise qualitativa através da Microscopia Eletrônica de Varredura.

Recentemente, alguns autores descreveram alguns dos principais problemas metodológicos encontrados em estudos tradicionais sobre “smear layer”. Uma certa tendência pode ocorrer no MEV quando trabalha com ampliações, uma vez que apenas uma pequena área da superfície dentinária pode ser observada. Esta área pode ser ajustada na tela ao acaso ou ser selecionada pelo operador. É uma constatação comum que a maioria dos operadores de MEV tende a selecionar áreas limpas com túbulos dentinários abertos, em vez de áreas com grande volume de detritos [9].

As vantagens desta metodologia são extrair informações quantitativas através da Microscopia Óptica Digital, que analisa os mesmos campos ao longo do tempo de ataque. De Deus *et al* [10,11,42,43] em seus estudos, descreveram as vantagens da MOCL e os resultados obtidos por esta técnica.

A Microscopia Digital é a integração entre um microscópio e um computador para captura digital de imagens, automação do microscópio e processamento e análise digital de imagens. Na MCL, uma coleção de imagens de uma amostra, é obtida em um grande número de posições nos eixos x-y, em diferentes tempos experimentais [43].

O Processamento e Análise Digital de Imagens (PADI) é realizado através de softwares especializados que realizam operações matemáticas com os pixels das imagens digitais, com o objetivo de melhorar a sua qualidade e extrair as informações quantitativas de interesse. Assim, medições complicadas podem ser realizadas com alta precisão e rapidez, o que representa um grande progresso nas análises quantitativas de imagens microscópicas [7].



A precisão e reprodutibilidade do método utilizado no presente trabalho foram verificadas anteriormente e provou ser rápido, fiável e reprodutível [7]. Além disso, o método fornece dados quantitativos ligados à observação longitudinal da amostra. Parece haver poucos relatos na literatura envolvendo análise quantitativa e longitudinal do processo de desmineralização dentinária. A metodologia de análise de cálcio por espectrometria de Absorção Atômica e testes de microdureza fornece dados quantitativos do processo de desmineralização, mas não oferecem a possibilidade de observar a evolução desta linha de ação. O processamento e análise da imagem usado aqui foi totalmente automático e permitiu um processo de medição, isento de influência de um operador.

Com objetivo de obter um melhor detalhamento do substrato dentinário após o tratamento quelante, a análise da superfície dentinária foi complementada por uma observação qualitativa através da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), visando obter especificamente alterações de relevo e rugosidade, após o ataque ácido. O MEV é um equipamento versátil, que permite a obtenção de informação estrutural e química das amostras. A interação de um feixe de elétrons com a amostra gera partículas e radiação que podem ser usadas para formar uma imagem ampliada em até  $10^5$  vezes. Outra propriedade importante do MEV é a profundidade de foco, que permite a observação de amostras com alterações de relevo na superfície [7].

Outro avanço experimental incorporado no presente estudo foi a utilização do modelo do dente único. Usar a mesma amostra parece vantajoso, porque foi possível um melhor controle de variações morfológicas da dentina e, portanto, a variação entre diferentes dentes foi reduzida. Este enfoque permite comparar melhor os resultados, uma vez que a comparação entre dentes não é confiável. De Deus *et al* também relatam esta vantagem em seu estudo [10].

Apesar da preparação metalográfica criar uma “smear layer” padronizada na superfície dentinária a ser analisada, essa camada apresenta estrutura diferente daquela produzida durante a instrumentação do canal radicular.

Exceto nos Dentes de Calibração1, optou-se em remover a “smear layer” previamente ao ataque ácido, pois assim haveria uma padronização das três áreas analisadas, e conseqüentemente uma melhor avaliação da morfologia dos túbulos dentinários originais.

### 5.3. ANÁLISE POR ABSORÇÃO ATÔMICA

#### 5.3.1. EXPERIMENTOS DE CALIBRAÇÃO

##### 5.3.1.1. DENTE CAL1

Os resultados da Absorção Atômica no Dente CAL1, para cada tempo experimental, são apresentados na tabela a seguir:

Tabela 9: Dente CAL1 – Resultados de Absorção Atômica

|           | FURO 1 (EDTA)                          | FURO 2 (EDTA)                         | FURO 3 (EDTA)                         |
|-----------|----------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| Tempo (s) | MNC (Ca) ( $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ ) | MNC(Ca) ( $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ ) | MNC(Ca) ( $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ ) |
| 60        | 1.14                                   | 2.16                                  | 32.69                                 |
| 180       | 4.73                                   | 37.17                                 | 67.50                                 |
| 300       | 10.17                                  | 58.23                                 | 90.43                                 |

O gráfico abaixo (**Figura 24**) apresenta as curvas de massa normalizada cumulativa de Cálcio *versus* tempo, para cada furo:

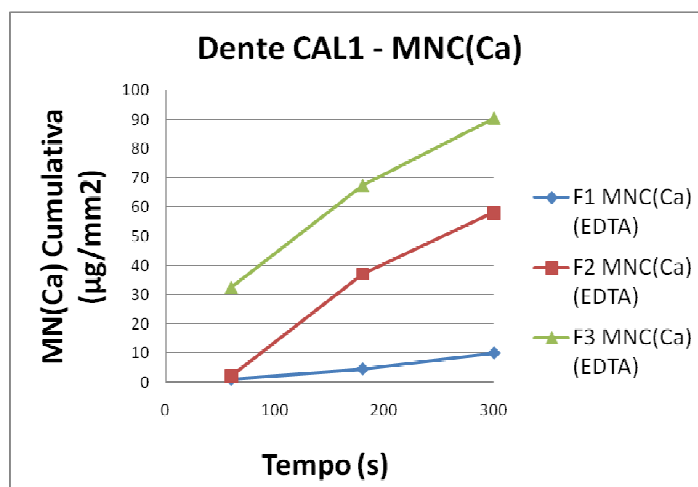


Figura 24: MNC(Ca) X Tempo

Observa-se curvas bastante diferentes para os 3 furos. Isto provavelmente está associado a diferenças entre as regiões de dentina analisadas, com diferentes graus de calcificação. Neste caso, como os furos eram maiores e se encontravam mais afastados, estas diferenças são mais prováveis.

### 5.3.1.2.DENTE CAL2

Visando reduzir a variabilidade entre regiões de dentina, no Dente CAL2 analisou-se furos menores e mais próximos entre si.

Os resultados da Absorção Atômica, para cada tempo experimental, no Dente CAL2, estão apresentados na tabela a seguir:

Tabela 10: Dente CAL2 – Resultados de Absorção Atômica

|           | FURO 1 (EDTA)                          | FURO 2 (EDTA)                         | FURO 3 (EDTA)                         |
|-----------|----------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| Tempo (s) | MNC (Ca) ( $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ ) | MNC(Ca) ( $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ ) | MNC(Ca) ( $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ ) |
| 15        | 97.61                                  | 97.08                                 | 4.64                                  |
| 30        | 209.71                                 | 125.68                                | 35.96                                 |
| 60        | 302.44                                 | 220.28                                | 113.50                                |
| 180       | 412.65                                 | 258.04                                | 207.28                                |
| 300       | 484.12                                 | 288.75                                | 228.16                                |

O gráfico abaixo (**Figura 25**) apresenta as curvas de Massa normalizada cumulativa de Cálcio *versus* tempo, para cada furo:

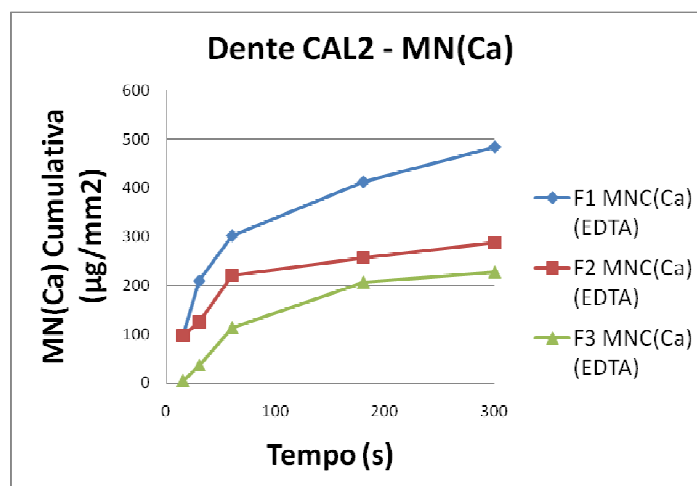


Figura 25: MNC(Ca) X Tempo

Observa-se maior quantidade de Cálcio quelado, quando comparado ao Dente CAL1. Este resultado parece ser contraditório, uma vez que a área exposta no Dente CAL2 é menor do que no Dente CAL1, o que deveria levar a uma redução da quantidade de cálcio quelado.

Para explicar esta inconsistência duas hipóteses podem ser aventadas: uma grande diferença de calcificação entre os dois dentes e/ou uma maior quantidade de quelante depositado nos furos do Dente CAL2. A variabilidade entre dentes é comum, mas difícil de confirmar. Por sua vez, o controle da quantidade de quelante certamente foi ruim nos Dentes CAL1 e CAL2, já que se usou um simples conta-gotas para depositar o líquido. Visando controlar melhor esta variável, nos experimentos subseqüentes utilizou-se uma micro-pipeta para controlar precisamente o volume de quelante utilizado.

### 5.3.1.3.DENTE CAL3

Os resultados dos Dentes CAL1 e CAL2 mostraram grande instabilidade. Parte destes problemas foi atribuída à falta de controle sobre o volume de quelante utilizado. Assim, a partir do Dente CAL3, passou-se a utilizar uma micro-pipeta para aplicar um volume fixo de quelante (10 µl) em cada furo.

Os resultados da Absorção Atômica no Dente CAL3, para cada tempo experimental, são mostrados na tabela a seguir:

Tabela 11: Dente CAL3 – Resultados de Absorção Atômica

|                  | <b>FURO 1(EDTA)</b>                 | <b>FURO 2 (EDTA)</b>               | <b>FURO 3 (EDTA)</b>               |
|------------------|-------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| <b>Tempo (s)</b> | <b>MNC (Ca) (µg/mm<sup>2</sup>)</b> | <b>MNC(Ca) (µg/mm<sup>2</sup>)</b> | <b>MNC(Ca) (µg/mm<sup>2</sup>)</b> |
| 15               | 4.48                                | 12.70                              | 12.00                              |
| 30               | 12.10                               | 26.10                              | 21.61                              |
| 60               | 33.51                               | 52.91                              | 35.68                              |
| 180              | 56.00                               | 75.91                              | 71.59                              |
| 300              | 85.06                               | 104.10                             | 116.80                             |

O gráfico abaixo (**Figura 26**) apresenta as curvas de Massa normalizada cumulativa de Cálcio *versus* tempo, para cada furo:

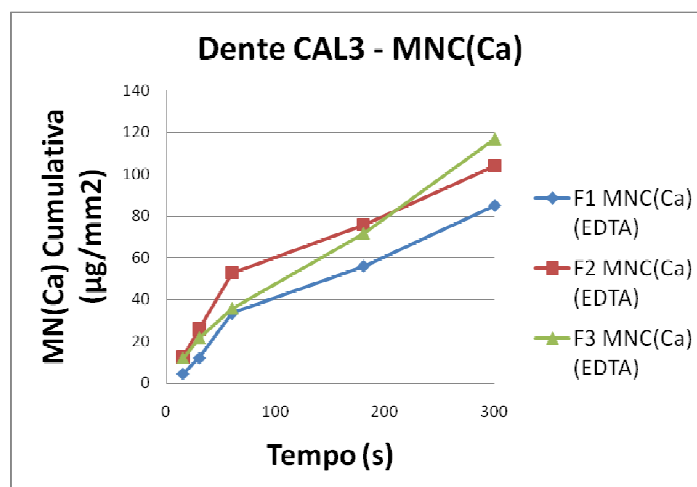


Figura 26: MNC(Ca) X Tempo

Observa-se que os valores de MNC(Ca) no Dente CAL3 são bem menores que no Dente CAL2. Isto pode estar associado com o uso da micro-pipeta utilizado no Dente CAL3, onde se utiliza um menor volume de quelante, quando comparado ao conta-gotas. É visível também, um melhor comportamento das curvas, o que se deve ao fato de ter sido usado o mesmo volume nos 3 furos.

### 5.3.2.EXPERIMENTOS COMPARATIVOS

#### 5.3.2.1.DENTE COMP1

A sequência experimental do Dente COMP1 é a mesma do Dente CAL3, porém utilizando 3 ácidos (MTAD, EDTA, HEBP).

Os resultados da Absorção Atômica no Dente COMP1, para cada tempo experimental, são apresentados na tabela a seguir:

Tabela 12: Dente COMP1 – Resultados de Absorção Atômica

|           | FURO 1 (MTAD)                          | FURO 2 (HEBP)                         | FURO 3 (EDTA)                         |
|-----------|----------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| Tempo (s) | MNC (Ca) ( $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ ) | MNC(Ca) ( $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ ) | MNC(Ca) ( $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ ) |
| 15        | 12.18                                  | 9.82                                  | 1.80                                  |
| 30        | 34.36                                  | 20.17                                 | 4.51                                  |
| 60        | 39.27                                  | 30.50                                 | 5.77                                  |
| 180       | 47.45                                  | 40.33                                 | 7.03                                  |
| 300       | 64.72                                  | 48.68                                 | 13.53                                 |

O gráfico abaixo (**Figura 27**) apresenta as curvas de Massa normalizada cumulativa de Cálcio *versus* ao tempo, para cada ácido:

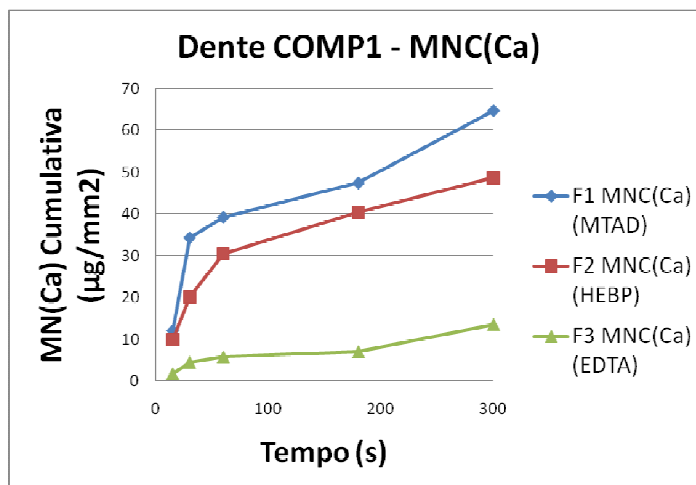


Figura 27: MNC(Ca) X Tempo

Em relação à Absorção Atômica, observa-se que o comportamento das curvas dos 3 ácidos são semelhantes, mostrando que houve um crescimento de cálcio quelado em relação ao tempo. Porém os valores de Massa de Cálcio são distintos entre os 3 ácidos.

### 5.3.2.2.DENTE COMP2

A sequência experimental do Dente COMP2 é a mesma do Dente COMP1.

Os resultados da Absorção Atômica no Dente COMP2, para cada tempo experimental, são apresentados na tabela a seguir:

Tabela 13: Dente COMP2 – Resultados de Absorção Atômica

|           | FURO 1 (MTAD)                  | FURO 2 (HEBP)                 | FURO 3 (EDTA)                 |
|-----------|--------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| Tempo (s) | MNC (Ca) (µg/mm <sup>2</sup> ) | MNC(Ca) (µg/mm <sup>2</sup> ) | MNC(Ca) (µg/mm <sup>2</sup> ) |
| 15        | 3.60                           | 2.71                          | 6.44                          |
| 30        | 8.66                           | 9.00                          | 12.82                         |
| 60        | 13.42                          | 14.79                         | 45.75                         |
| 180       | 22.70                          | 20.13                         | 86.24                         |
| 300       | 30.10                          | 30.18                         | 96.95                         |

O gráfico da **Figura 28** apresenta as curvas de Massa normalizada cumulativa de Cálcio *versus* tempo, para cada ácido:

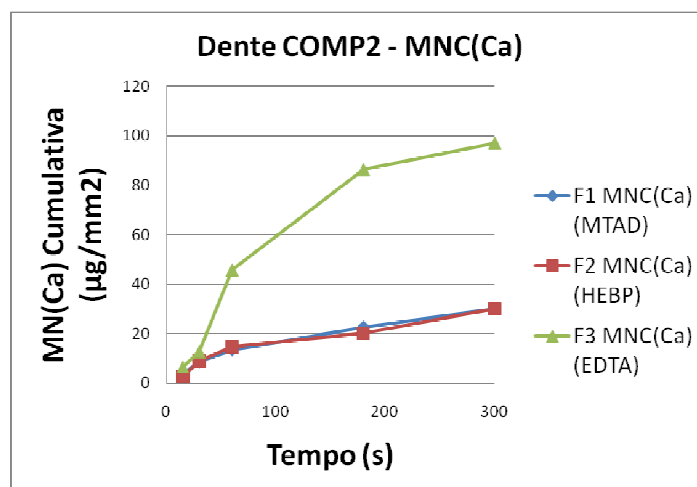


Figura 28: MNC(Ca) X Tempo

Os valores de Massa de Cálcio extraídas não diferem muito em relação ao Dente COMP1, embora os comportamentos dos 3 ácidos sejam distintos, onde no Dente COMP1 o EDTA foi o que menos descalcificou e no Dente COMP2 foi o que mais descalcificou.

### 5.3.3.DISSCUSSÃO DOS RESULTADOS DE ABSORÇÃO ATÔMICA

Baseado neste estudo, a hipótese Nula 2, também não foi confirmada.

Nos resultados de CAL1 observa-se uma grande dispersão das curvas nos três furos, talvez pelo fato dos furos serem maiores e distantes entre si. Nos resultados de CAL2 e CAL3, onde utilizamos furos menores e mais próximos, esta dispersão foi menor.

Em relação ao Dente CAL3, observa-se que existe uma menor dispersão das curvas nos três furos, quando comparadas ao Dente CAL2, e que os valores de Cálcio quelado no CAL3 são menores que no CAL2. Acredita-se que isto ocorra pelo fato de ter sido usada a micro-pipeta, que além de diminuir o volume da substância, padronizou a quantidade de substância utilizada.

Acredita-se que a variabilidade das medidas entre os dentes de calibração se deve à variação de calcificação da dentina entre os dentes.

Observa-se que os 3 ácidos reagiram diferente em relação à quelação do Cálcio, mas os resultados obtidos nos Dentes COMP1 e COMP2 são bem divergentes. Isto pode ser explicado pela distribuição irregular de íons Cálcio na dentina humana.

Embora Ostby [29] tenha relatado que o tempo de quelação do EDTA é de 10 a 15 minutos, Scelza [44] mostrou que a quantidade de Cálcio dissolvido da dentina do canal radicular, cresceu significativamente entre 3 e 10 minutos mas o crescimento observado entre 10 e 15 minutos não foi significativo. Isto também é confirmado no presente estudo, onde se verificou que até 3 minutos, houve um crescimento considerável na quantidade de Cálcio quelado, mas após este tempo o crescimento foi pequeno.

#### 5.4. ANÁLISE DE CORRELAÇÃO ENTRE MCL E AA

Visando testar a Hipótese 3, os parâmetros de MNC(Ca) e AreaP, nos Dentes COMP1 e COMP2, foram plotados nos gráficos abaixo:

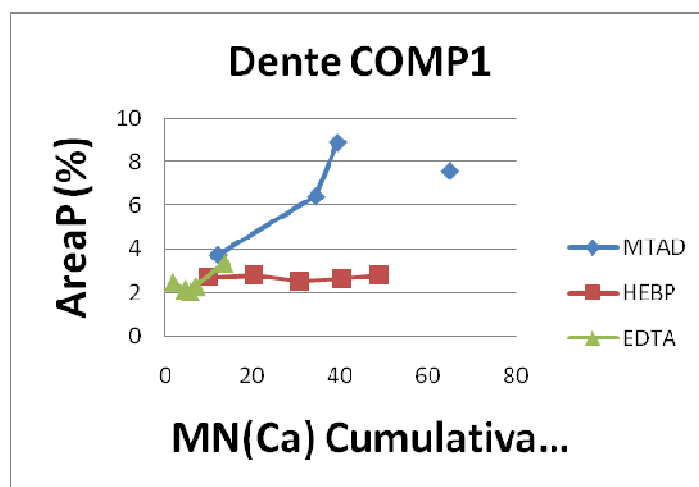


Figura 29: AreaP X MNC(Ca)

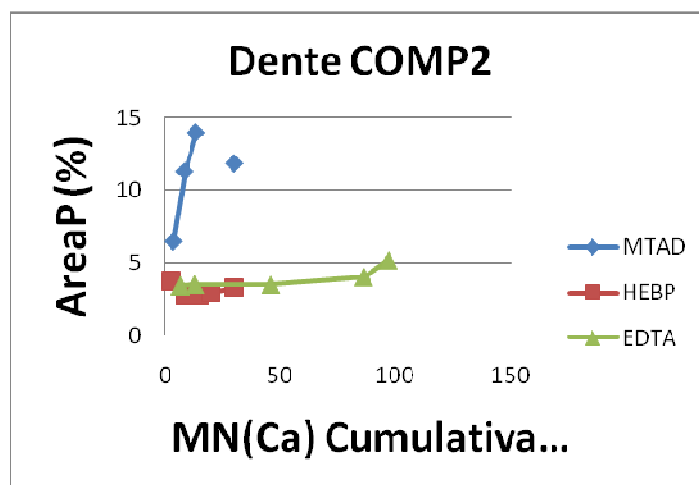


Figura 30: AreaP X MNC(Ca)



De acordo com os resultados dos Dentes COMP1 e COMP2, observa-se que não é possível correlacionar os resultados de MCL e AA.

Os gráficos mostram que, em relação ao MTAD, mesmo que o ponto correspondente a 300s esteja estimado, observa-se que quanto mais cálcio foi quelado da dentina, maior é a fração de área tubular. Porém, nos outros dois ácidos, vimos que não é possível correlacionar tais parâmetros.

De Deus *et al* [42] mostrou em seu estudo que, a fração de Área Tubular parece ser um parâmetro relevante para caracterizar a evolução da desmineralização. As diferenças entre os resultados parecem estar relacionadas com variações intrínsecas dos tecidos dentinários dentro de uma determinada amostra e entre amostras.

A aplicação destes resultados para a situação clínica não é simples. Uma das limitações do atual método é a de que a solução quelante foi aplicada a uma superfície plana horizontal de dentina, diferente da situação clínica, na qual o contato entre a substância quelante à superfície dentinária é afetada pela posição vertical dos dentes e intrínsecos a variabilidade anatômica do sistema de canais radiculares. Outra limitação é que, no presente estudo ocorre uma renovação mais freqüente da substância, diferente da situação clínica, gerando resultados superestimados.

## **5.5. DESCALCIFICAÇÃO COM QUELANTE NÃO SATURADO**

Observamos que, com a introdução da gota da solução sobre a superfície dentinária, poderia ocorrer a saturação da mesma, estabilizando a extração de Cálcio.

Com a finalidade de evitar essa saturação, foi proposto um experimento onde a amostra ficasse completamente imersa no ácido (EDTA), com volume de solução consideravelmente maior que em experimentos anteriores, nos quais o ácido não era renovado.

Com apenas um furo exposto de cada vez, um dente foi imerso em um Becher, que continha um agitador magnético. No tempo 0 introduziu-se 5 ml de EDTA. A partir daí, em intervalos de cerca de 30 s, uma pequena alíquota da solução era coletada com uma pipeta de 50  $\mu$ l, e levada ao acessório para micro injeção no espectrômetro de AA, para medida imediata da concentração de Cálcio quelado. Desta forma, a quantidade total de solução quelante era pouco afetada

pela retirada da alíquota, mantendo um volume suficiente para minimizar qualquer saturação da solução.

O experimento foi repetido para cada furo e os resultados são apresentados na **Figura 31**.

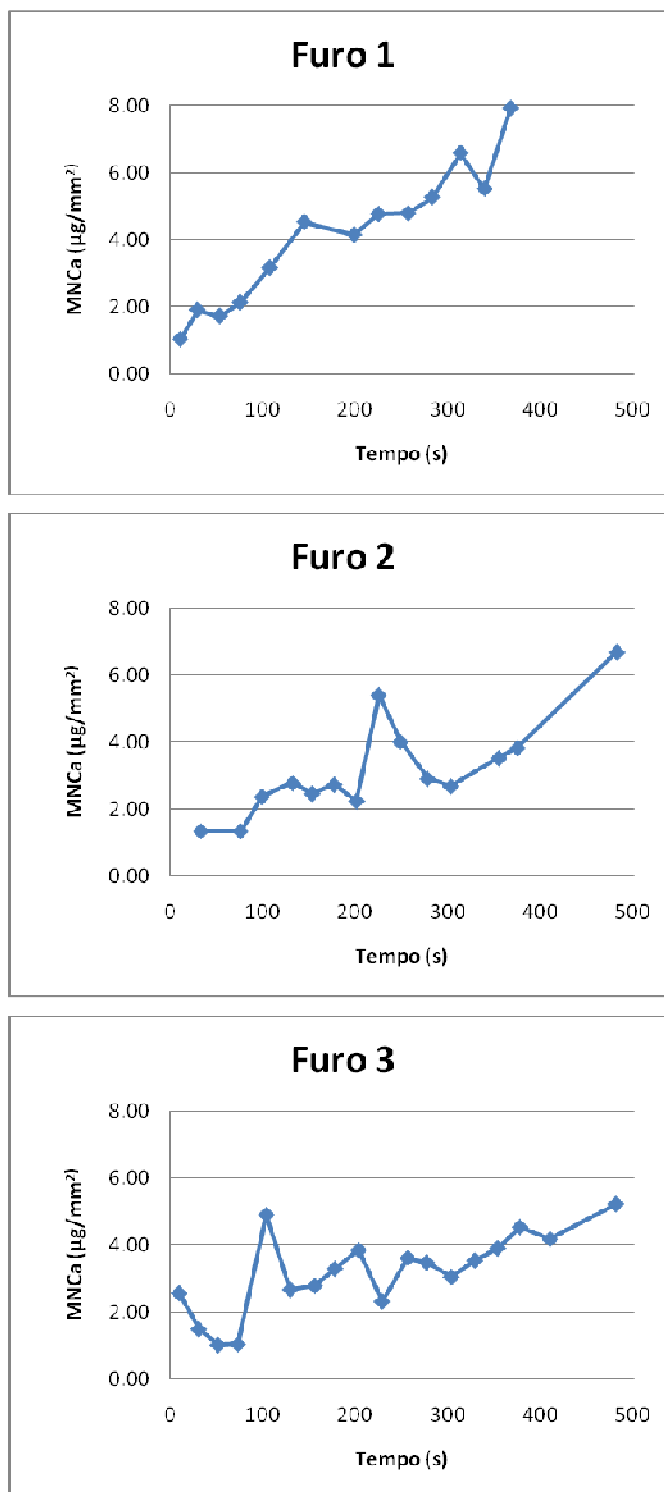


Figura 31: Quantidade de Cálcio quelado em função do tempo.

Apesar das grandes oscilações nos dados, o experimento indica uma tendência de crescimento monótono da massa de Cálcio quelado em função do tempo. Nos experimentos anteriores, em que uma pequena quantidade de quelante foi usada, parece haver uma tendência à saturação da solução, conforme já relatado na literatura [30]. Isto certamente contribui para dificultar as comparações quantitativas dos resultados de AA.