



**Gustavo André de Deus Carneiro Vianna**

**MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA *IN SITU* E  
MICRODUREZA DE DENTINA SUBMETIDA A  
SUBSTÂNCIAS QUELANTES**

**Dissertação de Mestrado**

Dissertação apresentada ao Departamento de Ciência dos Materiais e Metalurgia da PUC-Rio como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia Metalúrgica.

Orientadores:

Sidnei Paciornik

Marcos Henrique de Pinho Mauricio



**Gustavo André de Deus Carneiro Vianna**

**MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA *IN SITU*  
E MICRODUREZA DE DENTINA SUBMETIDA  
A SUBSTÂNCIAS QUELANTES**

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

**Prof. Sidnei Paciornik**

Orientador

Departamento de Ciência dos Materiais e Metalurgia PUC-Rio

**Prof. Marcos Henrique de Pinho Mauricio**

Co-orientador

Departamento de Ciência dos Materiais e Metalurgia PUC-Rio

**Prof. Francisco José de Souza Filho**

Faculdade de Odontologia de Piracicaba -UNICAMP

**Prof. Tauby de Souza Coutinho**

Faculdade de Odontologia -UERJ

**Prof. Rodrigo Prioli Menezes**

Departamento de Física PUC-Rio

**José Eugênio Leal**

Coordenador Setorial do Centro Técnico Científico - PUC-Rio

Rio de Janeiro, 31 de agosto de 2004

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

## **Gustavo André de Deus Carneiro Vianna**

Graduou-se em Odontologia na UERJ em 1996. Realizou sua Especialização em Endodontia na UERJ em 1997. Concluiu o seu curso de Mestrado na PUC-Rio em 2004.

### Ficha Catalográfica

Vianna, Gustavo André de Deus Carneiro

Microscopia de força atômica *in situ* e microdureza de dentina submetida a substâncias quelantes / Gustavo André de Deus Carneiro Vianna ; orientadores: Sidnei Paciornik, Marcos Henrique de Pinho Mauricio. – Rio de Janeiro : PUC, Departamento de Engenharia Metalúrgica, 2004.

93 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Departamento de Engenharia Metalúrgica.

CDD: 669

“Digo: o real não está na saída nem na chegada:  
Ele se dispõe para a gente é no meio da travessia”

**João Guimarães Rosa**

Aos meus pais, **João Paulo e Ligia**, não encontro às palavras certas para agradecer. Sem vocês essa trajetória seria impossível.

Tenho consciência que estou em débito.  
Seus ensinamentos sempre encontrarão lugar no meu coração.

A minha princesa, **Isabela**:

Obrigado por deixar eu dividir e viver meus sonhos com você.

Obrigado pelo incentivo nas horas incertas,  
por estar ao meu lado nos momentos difíceis  
e por sempre mostrar seu lindo sorriso quando preciso.

Sem sua racionalidade e inteligência meu caminho  
ficaria mais fragilizado.

## **Agradecimentos**

– Ao meu orientador, Professor **Sidnei Paciornik**, o meu muito obrigado pela chance de conhecer e conviver um pouco com a rotina de um cientista e professor do mais alto patamar. Você me mostrou que é possível equilibrar essas difíceis tarefas. Agradeço pelo exemplo de conduta, organização, disciplina e seriedade – seja com as grandes coisas ou mesmo com os pequenos detalhes. Nunca me esquecerei da experiência desses 3 anos de convívio. Não sei se eu aprendi, mas que você ensinou – eu tenho certeza.

– Ao meu Co-Orientador **Marcos Henrique de Pinho Mauricio** meu muito obrigado por toda a ajuda, boa vontade e paciência dedicadas à confecção deste trabalho.

– Ao Professor **Rodrigo Prioli Menezes**, agradeço a todo o empenho, profissionalismo e dedicação destinados à realização deste experimento. Sem a sua capacidade científica e boa vontade, não chegaríamos ao final deste trabalho.

– Ao Professor, Mestre, Chefe, Amigo e Pai-profissional, **Tauby de Souza Coutinho**. Há alguns anos, quando fiz especialização com você, encontrei o Endodontista & Formador de Opinião que me ajudou a entender as dificuldades anatômicas que cercam uma das especialidades mais difíceis da Odontologia. Algum tempo mais tarde, já como seu colega de equipe, conheci o ser humano – que me falou da vida. Hoje, ao vê-lo, encontro um Amigo, que me pergunta o que penso. Sinto muito orgulho desse processo. Obrigado pelo exemplo de conduta profissional, exemplo de bom humor e alegria (seja na Faculdade, no consultório ou nas horas livres) e exemplo de como se tratar um canal. Obrigado por me ensinar a importância da simplicidade. Obrigado por me ensinar (ou pelo menos tentar) a filosofia e o método que um professor deve possuir para entrar na mente dos alunos em uma sala de aula. Poucas pessoas possuem o seu dom de ensinar. Obrigado por me ensinar que cada coisa tem seu papel na vida e somente isso, nada mais! Espero que toda a energia que sua personalidade contagiante espalha volte para você e continue iluminando seu caminho. Obrigado meu RÁMIGO especial!

– Ao Mestre e Amigo **Eduardo Diogo Gurgel-Filho**: exemplo de Professor, Clínico e Cientista. Exemplo de ser humano, de equilíbrio e bom senso. O maior entusiasta da Endodontia que eu já conheci!!! Agradeço por todos os ensinamentos, todas as noites de discussão científica e acadêmica, todas as dicas, macetes e conselhos que me foram passados nesses agradáveis

anos de trabalho e amizade (tenho consciência que tudo o que sabe e dividiu comigo nesses anos lhe custou caro, e por isso valorizo ainda mais). Espero que na nossa velhice possamos morar mais perto ..... para podermos ficar tagarelando & resmungando sobre as coisas que estamos fazendo hoje e pretendemos fazer no futuro.

– Ao Amigo & Mestre **Antonio Canabarro**. Obrigado por dividir seus pensamentos, questionamentos, conflitos e angústias sobre a nossa profissão, sobre o meio acadêmico e sobre a profundidade da vida. Tudo isso muitas vezes me tirou o sono, mas sem dúvida sempre me fizeram crescer. Todo o turbilhão de emoções que gira em torno de você foi essencial na minha formação. Espero que você provoque essas mesmas emoções em seus alunos, pois tenho a certeza que a grande maioria não vai entender e que alguns vão achar que entenderam. Mas, para uns poucos, você será inesquecível!

– Ao Amigo e Professor **Renato Krebs**. Agradeço pelos ensinamentos endodônticos sem os quais eu não estaria nessa estrada. Agradeço pelo apoio durante a minha iniciação no mundo acadêmico. Agradeço por todos os momentos singulares e extremamente engraçados. Caro Prof. Schultz, você é sem dúvida um personagem único da nossa história *uerjiana*.

– Ao Professor, Mestre e Amigo **Nelson Lopes Siqueira**, agradeço pelo exemplo criado por anos de dedicação à frente da disciplina de Endodontia da UERJ.

– A Professora **Teresa Cristina Ávila Berlinck**, agradeço, pois ainda no curso de graduação, foi a primeira pessoa a me incentivar no campo científico.

– Ao Professor e Amigo, **Paulo Garcia Filho**. Agradeço por sua confiança no meu trabalho e pela oportunidade de poder conhecer e trabalhar em outra instituição de ensino.

– Aos meus grandes amigos da UERJ, **Claudia Brandão, Ana Carolina Rocha, Patrícia Reis, Bruno Gomes, Karen Magalhães e Jansen Alves**. Algumas amizades transcendem o comum, ultrapassam o raro e tocam o sublime. Obrigado pela paciência de me aturar toda a semana, durante o ano inteiro!

– A **Martha Amarante**, obrigado pela amizade demonstrada durante o curso de Mestrado.

– Aos meus amigos **Luciana Pacheco, Karla Baumotte e Júlio Carvalhal** que tão bem me receberam na UGF.

– Aos Professores **Paulo Egreja, Gilberto Leal de Campos, Carlos**

**Augusto Barbosa, Kátia Dias Cervantes, Hélio Sampaio, Mauro Sayão, Ricardo Herzog, Ricardo Fisher.** Vocês foram fundamentais na minha formação profissional e pessoal.

– Ao Professor **Cláudio Maniglia**, meu amigo distante, obrigado pela constante colaboração e troca.

– A **Maria de Fátima Silva Lopes**, *in memoriam*, por ter sido a primeira pessoa a me abrir às portas do DCMM e a me incentivar a fazer o curso de mestrado na PUC-Rio.

– Ao técnico **Marcelo Malheiros** por toda a ajuda durante quase 4 anos de trabalho;

– Aos professores e funcionários do **DCMM-PUC-Rio**

– A **CAPES, CNPq** e a **PUC-Rio**, pelos auxílios concedidos.



## RESUMO

De Deus, Gustavo André Carneiro Vianna; Paciornik, Sidnei; Mauricio, Marcos Henrique de Pinho. **Microscopia de força atômica *in situ* e microdureza de dentina submetida a substâncias quelantes**. Rio de Janeiro, 2004, 93p. Dissertação de Mestrado – Departamento de Ciência dos Materiais e Metalurgia, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

Com os métodos de instrumentação usados atualmente na terapia endodôntica ocorre a formação de uma camada residual composta de matéria orgânica e inorgânica que freqüentemente pode reter bactérias e seus subprodutos. Os métodos disponíveis para a remoção do *smear layer* incluem o ataque químico, técnicas ultra-sônicas e a laser, sendo que nenhum desses métodos se mostra totalmente eficaz, não existindo um consenso universal a respeito. A ação do EDTA, do EDTAC e do ácido cítrico sobre a dentina radicular foi analisada neste estudo por dois métodos. Primeiramente, foi realizada uma análise da microdureza radicular antes e depois da aplicação dos quelantes. Em seguida, utilizou-se microscopia de força atômica (AFM) para mapear e caracterizar as alterações microestruturais ocorridas na dentina durante o processo de quelação dos íons de cálcio. No caso da microscopia, realizou-se experimentos em que a ação quelante foi observada em tempo real, *in situ*, através do uso de um porta-amostras especial – uma célula de líquido – que permitiu observar a superfície das amostras durante o condicionamento ácido. Seqüências de imagens foram capturadas durante o processo e uma rotina de processamento e análise digital de imagens (PADI) foi criada para avaliar qualitativa e quantitativamente o efeito das substâncias quelantes. O desenvolvimento desta metodologia de microscopia *in situ* e análise digital é uma das principais contribuições da presente dissertação.

### Palavras-chave:

Quelantes; microestrutura dentinária, *smear layer*, AFM, microscopia *in situ*, análise de imagens

## ABSTRACT

De Deus, Gustavo André Carneiro Vianna; Paciornik, Sidnei; Mauricio, Marcos Henrique de Pinho. ***In situ* atomic force microscopy and microhardness of dentin throughout the chelation process**. Rio de Janeiro, 2004, 93p. Masters Dissertation – Department of Materials Science and Metallurgy, Catholic University of Rio de Janeiro.

Instrumentation methods currently used in endodontic therapy create a residual layer composed of organic and inorganic material that frequently retains bacteria and their subproducts. The available methods to remove this *smear layer* include chemical etching, ultrasonic and laser techniques but none of these is completely efficient and there is no universal consensus regarding this subject. In the present study the effect of EDTA, EDTAC and citric acid upon radicular dentin was analyzed by two methods. Dentin microhardness was measured before and after etching. Atomic force microscopy was used to map and characterize dentinary microstructural changes throughout the chelation process. Real time, *in situ*, observations of the process were performed through the use of a special sample holder – a liquid cell – that allowed the observation of the samples surfaces during etching. Image sequences were acquired and an image processing and analysis procedure was developed to evaluate, both qualitatively and quantitatively, the effect of the 3 chelators. The development of this methodology employing *in situ* microscopy and digital image analysis is one of the main contributions of the present dissertation.

### Keywords:

Chelators, dentinary microstructure, smear layer, AFM, *in situ* microscopy, image analysis.

# Sumário

RESUMO	6
ABSTRACT	7
1 Introdução	16
2 Objetivo e Hipóteses	22
3 Revisão da Literatura	23
3.1. Considerações Iniciais	23
3.2. Substâncias Quelantes	23
3.2.1. EDTA	23
3.2.2. EDTA e suas associações	32
3.2.3. Os ácidos fracos	36
3.2.4. Síntese da Revisão	38
3.3. Microdureza	39
3.4. Técnicas de Microscopia	40
3.4.1. Trabalhos Anteriores	40
3.4.2. Microscopia de Força Atômica	42
4 Material & Métodos	44
4.1. Ensaio de Microdureza	44
4.1.1. Seleção dos Dentes	44
4.1.2. Preparação das Amostras	44
4.1.3. Divisão da Amostragem	46
4.1.4. Ensaio de Microdureza Vickers	46
4.2. Microscopia de Força Atômica	48
4.2.1. Seleção do Dentes	48
4.2.2. Preparação das Amostras	48
4.2.3. Divisão da Amostragem	50
4.2.4. Procedimento experimental	50
4.2.5. Aquisição de Sequências de Imagens	52

4.2.6. Processamento Digital de Imagens (PDI)	53
5 Resultados & Discussão	56
5.1. Microdureza	56
5.2. Microscopia de Força Atômica	65
5.2.1. EDTA	65
5.2.2. EDTAC	68
5.2.3. AC	71
5.2.4. Avaliação Geral dos Resultados de AFM	75
5.3. Microdureza vs. AFM	79
6 Conclusões	80
7 Sugestões para Trabalhos Futuros	81
8 Referências Bibliográficas	82
9 Anexos	92
9.1. Macro KS400	92

## Lista de Figuras

Figura 1 – Parede dentinária instrumentada com limas Flexofile®, onde pode-se observar o <i>smear layer</i> sob uma vista frontal - 500X.	17
Figura 2 – Desenho esquemático ilustrando como foi realizado o corte das raízes dos dentes nos quais foram obtidos as fatias de dentina	45
Figura 3 – Amostra de dentina, embutida, lixada e polida, para o ensaio de microdureza.	45
Figura 4 – Fotomicrografia de uma indentação realizada em uma amostra do grupo 1 (EDTA) após um minuto de aplicação do quelante. A foto tem o objetivo de ilustrar como foi realizada a medida das diagonais da indentação.	47
Figura 5 – Desenho esquemático ilustrando como foi realizado o corte das raízes dos dentes nos quais foram obtidos as fatias de dentina.	48
Figura 6 – Desenho esquemático da amostra embutida na resina e no silicone.	49
Figura 7 – Visão geral do laboratório de AFM.	50
Figura 8 – AFM	51
Figura 9 – Detalhe da amostra já posicionada no AFM	51
Figura 10 – Célula de líquido e detalhe do anel de vedação (O-ring).	52
Figura 11 – Seqüência típica de imagens	53
Figura 12 – Seqüência típica de processamento de imagens	55
Figura 13 – Resultados da microdureza dentinária inicial.	56
Figura 14 – Dados referentes as medias da MD encontradas em todos os momentos experimentais.	59
Figura 15 – Evolução da MD nas amostras atacadas com AC	60
Figura 16 – Evolução da MD nas amostras atacadas com EDTA	60
Figura 17 – Evolução da MD nas amostras atacadas com EDTA	61
Figura 18 – Fotomicrografia de uma amostra do experimento piloto na qual foram realizadas 3 indentações para dureza Vickers na dentina.	63
Figura 19 – Fotomicrografia de maior aumento das três indentações da Figura 18, na qual é possível perceber de modo mais detalhado a mudança na morfologia dentinária.	63
Figura 20 – Evolução da MD em função do tempo de aplicação do EDTAC na amostra 1. Pode-se acompanhar os resultados obtidos na mesma amostra.	64

Figura 21 – Seqüência completa de imagens obtidas na amostra 1 do grupo do EDTA.	66
Figura 22 – Seqüência de imagens 3D obtidas na amostra 1 do EDTA.	67
Figura 23 – Evolução da fração percentual da área relativa aos túbulos dentinários que foram quantificados por PADI.	68
Figura 24 – Seqüência completa de imagens obtidas na amostra 1 do grupo do EDTAC	69
Figura 25 – Seqüência de imagens 3D obtidas na amostra 1 do EDTAC.	70
Figura 26 – Evolução da fração percentual da área relativa aos túbulos dentinários que foram quantificados por PADI.	70
Figura 27 – Seqüência completa de imagens obtidas na amostra 1 do ácido cítrico.	72
Figura 28 – Seqüência de imagens 3D obtidas na amostra 1 do ácido cítrico	73
Figura 29 – Seqüência completa de imagens obtidas na amostra 2 do ácido cítrico.	74
Figura 30 – Seqüência de imagens 3D obtidas na amostra 2 do ácido cítrico	74
Figura 31 – Imagem demonstrando a distorção que ocorre em algumas imagens devido ao próprio processo de formação das imagens.	77
Figura 32 – Ilustração da análise através de intersecção entre traço retraço. (a) Imagem segmentada do traço. (b) Imagem segmentada do retraço. (c) Intersecção entre (a) e (b)	78

## Lista de tabelas

Tabela 1 – Grupos experimentais com as respectivas soluções quelantes, bem como seu princípio ativo, o fabricante e o lote de fabricação.	46
Tabela 2 – Dados referentes a média, valor mínimo e máximo encontrados na microdureza inicial.	56
Tabela 3 – Dados referentes a média, valor mínimo e máximo encontrados na microdureza dentinária após 1 minuto de ataque ácido.	57
Tabela 4 – Dados referentes a média, valor mínimo e máximo encontrados na microdureza dentinária após 3 minutos de ataque ácido.	57
Tabela 5 – Diferenças estatisticamente significativas entre os grupos em 3 minutos de condicionamento ácido.	58
Tabela 6 – Dados referentes a média, valor mínimo e máximo encontrados na microdureza dentinária após 5 minutos de ataque ácido.	58
Tabela 7 – Diferenças estatisticamente significativas entre os grupos em 5 minutos de condicionamento ácido.	58
Tabela 8 – Diferenças estatisticamente significativas entre os momentos experimentais.	59