4 Materiais e Métodos

4.1. Ensaio de Microdureza

4.1.1. Seleção dos Dentes

Quinze caninos superiores humanos extraídos foram obtidos do estoque de dentes da Disciplina de Endodontia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Os dentes apresentavam-se com os ápices radiculares intactos, livres de cáries e com características de tamanho, comprimento e diâmetro semelhantes. Depois de selecionados, foram limpos com cureta periodontal, pontas ultra-sônicas e profilaxia com escova e pedra pomes para a remoção de tecidos aderidos à superfície radicular. Os dentes foram mantidos em solução de timol a 0.1% em geladeira a 9ºC até o momento do experimento. Antes do experimento os dentes foram lavados em água corrente por 24hs para eliminação de qualquer traço de timol remanescente.

4.1.2. Preparação das Amostras

Os dentes tiveram suas coroas seccionadas a altura da junção amelo-dentinária com auxilio de um disco de diamante (KG Sorensen, Zenith Dental ApS, Agerskov, Dinamarca). Cada dente foi embutido em resina epóxi (Arazyn 1.0 – Ara Química, SP, Brasil) com o objetivo de melhorar e facilitar o lixamento e polimento das amostras. Para tal, foram empregados moldes individuais de silicone.

Foi então realizado o corte de uma fatia de dentina radicular de modo transversal ao longo eixo da raiz. Um disco diamantado (∅ 125mm x 0,35mm x 12,7mm – 330C – Buhler, Ltd. Lake Bluff, NY, USA) acoplado a uma cortadora de precisão ISOMET (Isomet, Buhler, Ltd. Lake Bluff, NY, USA) foi utilizado no corte das raízes. Duas fatias de dentina foram obtidas no terço médio de cada raiz. Esse processo encontra-se ilustrado na Figura 1 e a fotografia da amostra de dentina encontra-se na Figura 2.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0124927/CA

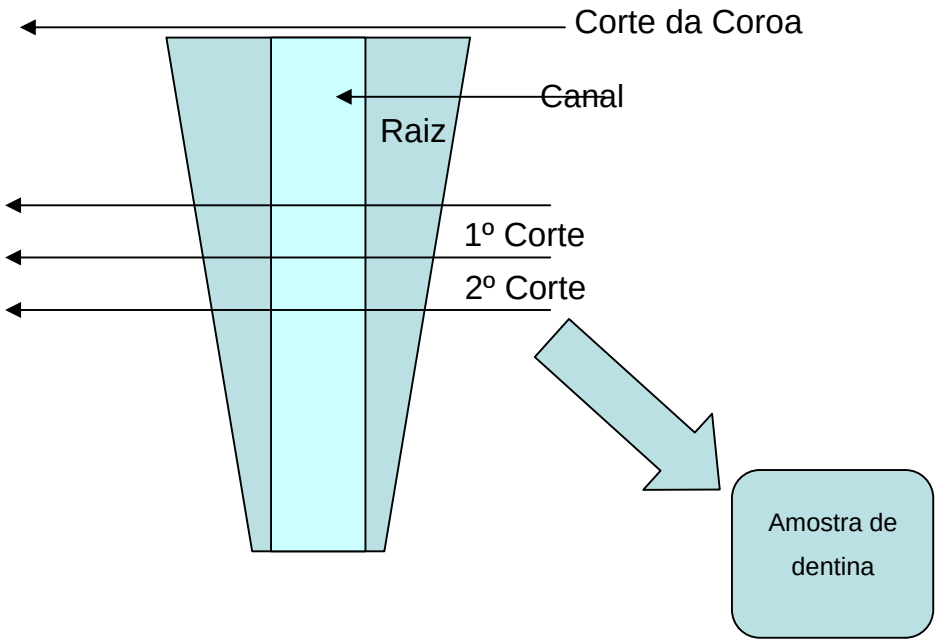

Figura 1 – Desenho esquemático ilustrando como foi realizado o corte das raízes dos dentes nos quais foram obtidos as fatias de dentina.

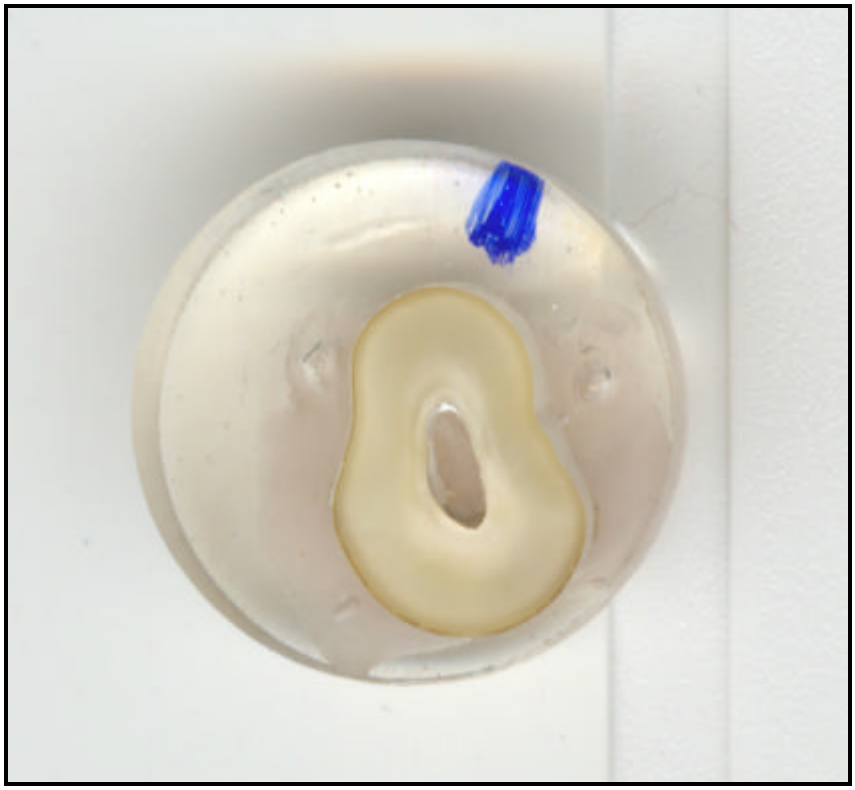

Figura 2 – Amostra de dentina, embutida, lixada e polida, para o ensaio de microdureza.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0124927/CA

As amostras foram então cuidadosamente lixadas com lixas de carbeto de silício nº 600 e 1200 (Norton, São Paulo, Brasil) sendo em seguida, polidas com pastas de Alumina 3µm e 1µm com o auxilio de uma politriz (Prazis – PL – São Paulo, SP, Brasil). Após o término do processo de preparação, as amostras foram observadas em um microscópio óptico de luz refletida (Axioskope – Carl Zeiss, Alemanha) com o objetivo de verificar a qualidade do polimento – Figura 2.

4.1.3. Divisão da Amostragem

As amostras foram divididas randomicamente em 3 grupos. O critério de uso das substâncias quelantes acompanhou os seguintes parâmetros:

- Grupo 1: Solução de EDTA (n=5)
- Grupo 2: Solução de EDTAC (n=5)
- Grupo 3: Solução de ácido cítrico (n=5)

A Tabela 1 lista os grupos experimentais com as respectivas soluções quelantes, bem como seu princípio ativo e o fabricante.

Tabela 1 – Grupos experimentais com as respectivas soluções quelantes, bem como seu principio ativo, o fabricante e o lote de fabricação.

Grupo	Solução Irrigadora	Principio Ativo	Fabricante
1	EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético a 17%	Fórmula & Ação Laboratório Farmacêutico
2	EDTAC	Ácido etilenodiamino tetra-acético a 17% + brometo de hexadeciltrimetamônio (Cetramide) a 0.1%	
3	Ácido Cítrico	Ácido Cítrico Anidro 10% ($C_6H_8O_7$)	

4.1.4. Ensaio de Microdureza Vickers

Para obter a microdureza foi utilizado um aparelho (Wolpert 121, Ludwigshafen, Alemanha) com carga de 50-g aplicada durante 15 s. Essa relação entre carga e tempo de aplicação foi baseada nos trabalhos de Saquy (1991) e no de Cruz Filho (2002). Primeiramente, foi realizada a leitura da

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0124927/CA

microdureza inicial de cada amostra. Para cada leitura, foram realizados três indentações seqüenciais localizadas na porção dentinária adjacente à luz do canal radicular.

Uma segunda leitura foi realizada após 1 minuto de aplicação de 50 µL da respectiva solução quelante. A terceira leitura foi realizada em cada amostra após mais 2 minutos de aplicação de 50 µL da solução quelante (total de 3 minutos de aplicação). A quarta leitura foi realizada em cada amostra após mais 2 minutos de aplicação de 50 µL da solução quelante (total de 5 minutos de aplicação). Entre uma leitura e outra as amostras eram lavadas com água bidestilada com objetivo de interromper o ataque à dentina. Foram feitas três marcas de microdureza por amostra. Da média aritmética das diagonais de cada indentação foi obtido um valor numérico que foi convertido no valor da microdureza Vickers (VHN) através de uma tabela de conversão convencional. A microdureza da amostra foi determinada pela média aritmética das três indentações.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0124927/CA

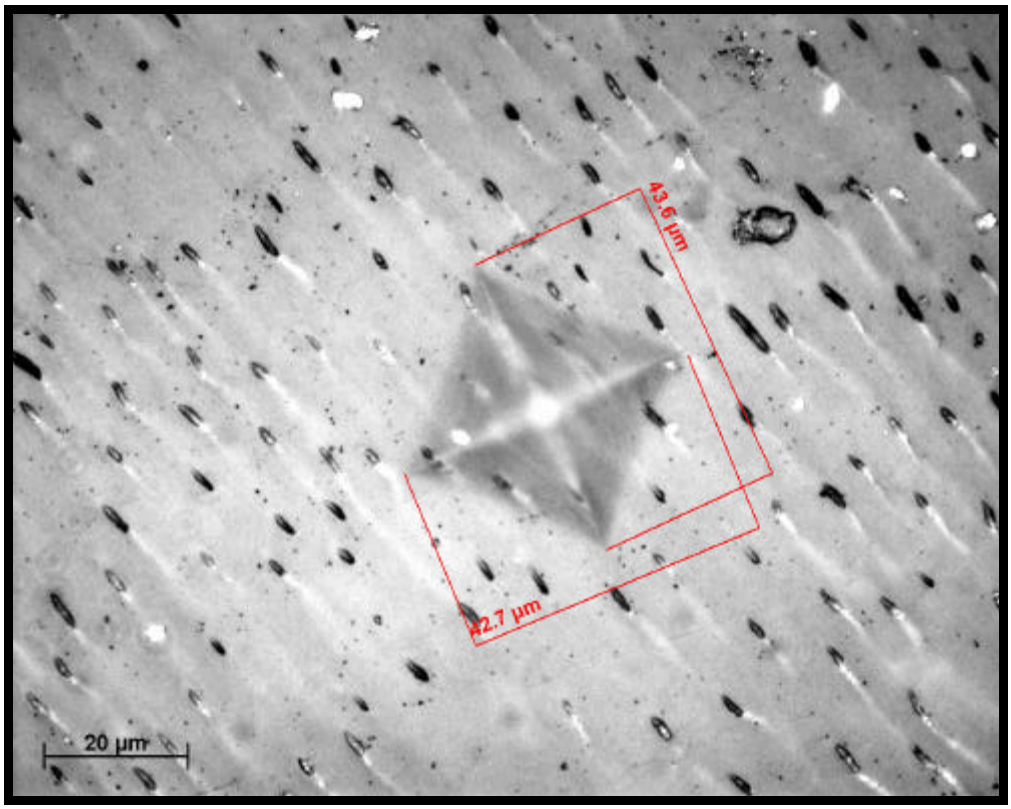

Figura 3 – Fotomicrografia de uma indentação realizada em uma amostra do grupo 1 (EDTA) após um minuto de aplicação do quelante. A foto tem o objetivo de ilustrar como foi realizada a medida das diagonais da indentação.

4.2. Microscopia de Força Atômica

4.2.1. Seleção do Dentes

Vinte e quatro incisivos centrais superiores humanos extraídos foram selecionados para o experimento sendo que o critério de seleção dos dentes foi realizada de modo semelhante ao descrito no tópico 0.

4.2.2. Preparação das Amostras

Os dentes tiveram suas coroas seccionadas a altura da junção amelo-dentinária com auxilio de um disco de diamante dupla face. Foi então realizado o corte de uma fatia de dentina radicular paralela ao longo eixo da raiz, de acordo com especificações de Pashley (1990). Um disco diamantado acoplado a uma cortadora de precisão ISOMET foi utilizado no corte das raízes. O processo de corte das raízes encontra-se esquematizado na Figura 4.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0124927/CA

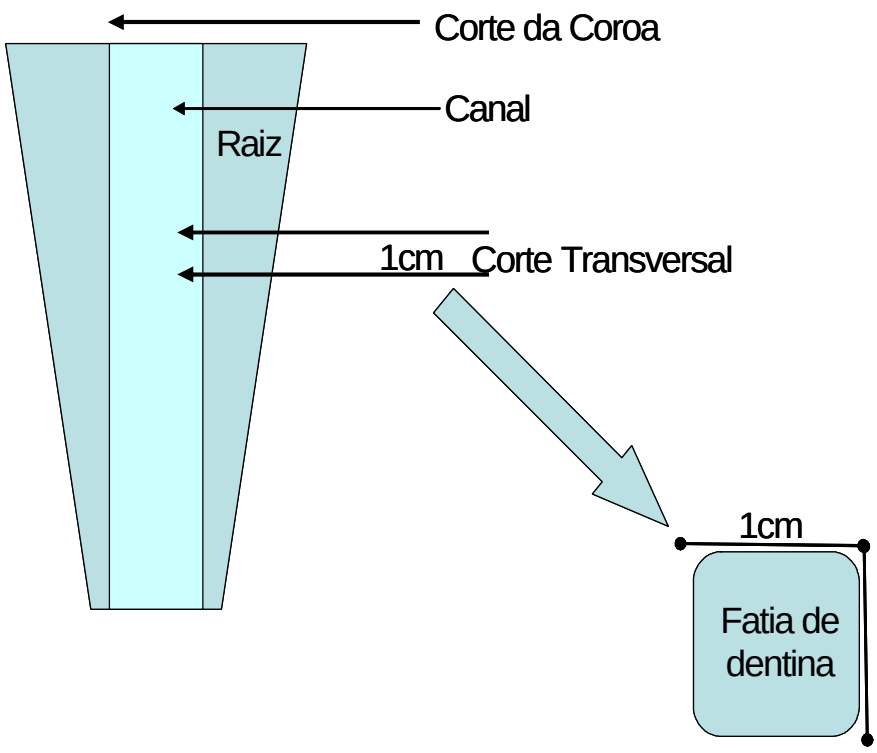

Figura 4 – Desenho esquemático ilustrando como foi realizado o corte das raízes dos dentes nos quais foram obtidos as fatias de dentina.

As fatias de dentina seccionadas das raízes foram embutidas em resina epóxi (Arazyn 1.0 – Ara Química, SP, Brasil) com o objetivo de melhorar e facilitar o lixamento e polimento das amostras. Para tal, foram empregados

moldes individuais de silicone. Esse processo encontra-se esquematizado na Figura 5

A amostras foram então cuidadosamente lixadas com lixas de carbureto de silício nº 600 e 1200 (Norton, São Paulo, SP, Brasil) sendo em seguida, polidas com pastas de alumina com o auxílio de uma politriz (Prazis – PL – São Paulo, SP, Brasil). Após o término do processo de preparação as amostras foram observadas em um microscópio óptico de luz refletida (Axioskope – Carl Zeiss) com o objetivo de verificar a qualidade do polimento. Na execução do projeto piloto desse experimento foi verificado que a grande variação de altura do *smear layer* impedia a sonda do AFM de realizar uma varredura satisfatória da superfície da amostra. Por isso fez-se necessário um polimento das amostras com o objetivo de aplainar a superfície dentinaária – diminuindo assim a variação de altura do eixo Z.

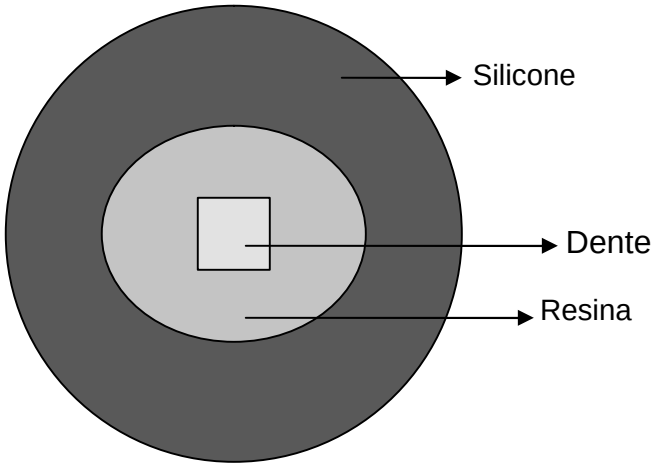

Figura 5 – Desenho esquemático da amostra embutida na resina e no silicone.

Objetivando a adaptação das amostras ao porta-amostras do AFM, cada amostra foi cortada novamente em um formato quadrado com 1cm x 1cm, tendo um limite máximo de altura de 1cm.

Após o processo de corte que possibilitou a adaptação das amostras ao porta-amostras, tivemos que providenciar uma margem redonda com cerca de 1,3cm de diâmetro para que fosse possível uma perfeita adaptação da amostra com a célula de líquido já acoplada ao porta-amostras. A fim de agilizar esse processo e evitar o reembutimento das amostras – o que poderia a vir danificar o polimento – as amostras foram submersas em silicone odontológico tipo base pesada com auxilio de uma prensa simples. Deste modo, a amostra de dentina

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0124927/CA

embutida na resina ficou com uma margem de silicone que pode ser cortada e facilmente adaptada ao porta-amostra com a célula (Figura 5).

4.2.3. Divisão da Amostragem

As amostras foram divididas aleatoriamente em 3 grupos com 8 amostras cada. O critério de uso das substâncias quelantes acompanhou os seguintes parâmetros:

- Grupo 1: Solução de EDTA (n=8)
- Grupo 2: Solução de EDTAC (n=8)
- Grupo 3: Solução de ácido cítrico (n=8)

4.2.4. Procedimento experimental

As amostras foram observadas através de um microscópio de forca atômica MultiMode (Veeco Instruments Inc., 112 Robin Hill Road, Santa Barbara, CA, USA), controlado pela controladora Nanoscope IIIa. A 7 mostra uma visão geral do aparato enquanto a Figura 8 mostram um detalhe do posicionamento da amostra.

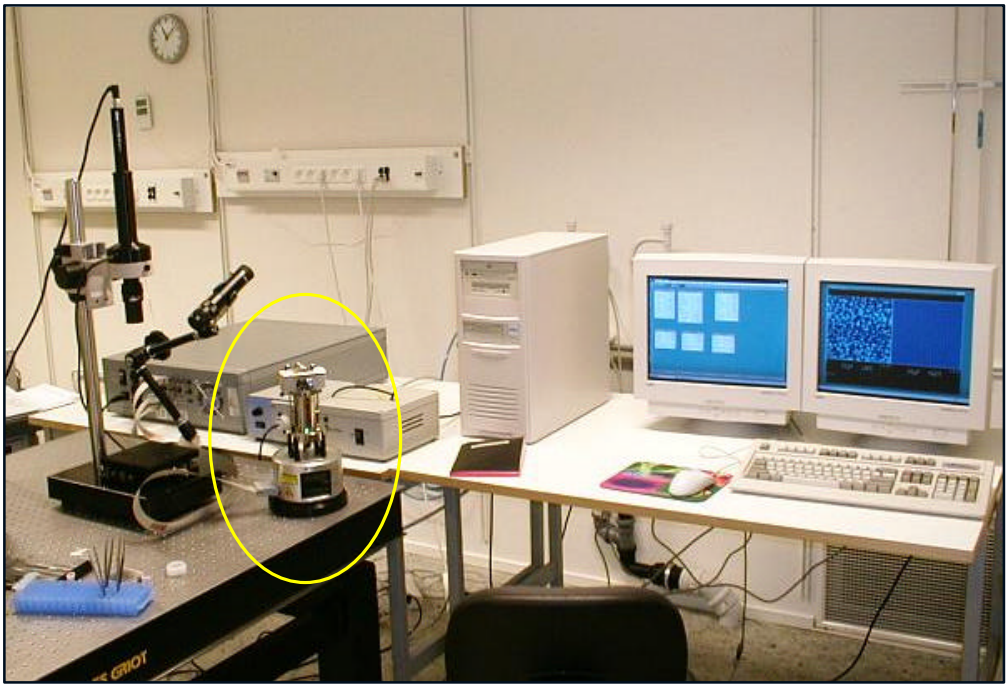

Figura 6 – Visão geral do laboratório de AFM.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0124927/CA

Figura 7 – AFM

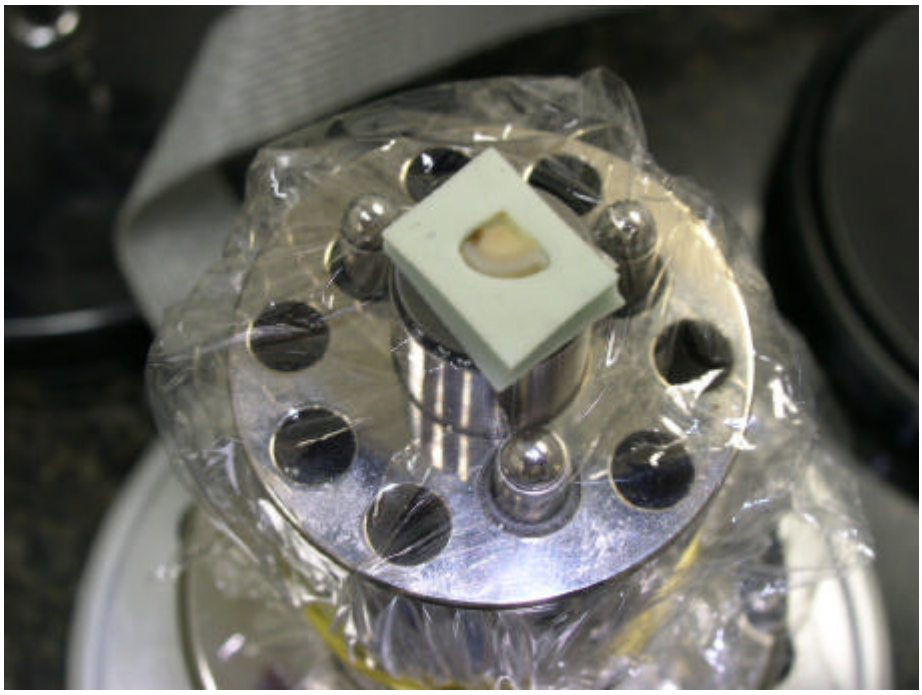

Figura 8 – Detalhe da amostra já posicionada no AFM

A aplicação de cada substância foi realizada *in loco* através da adaptação de uma célula de liquido (Figura 9). Isto permitiu a aplicação da substância e

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0124927/CA

observação da amostra durante o processo de ataque ácido. Foram aplicados 5ml de solução quelante por amostra com auxilio de uma seringa descartável que fica acoplada à célula.

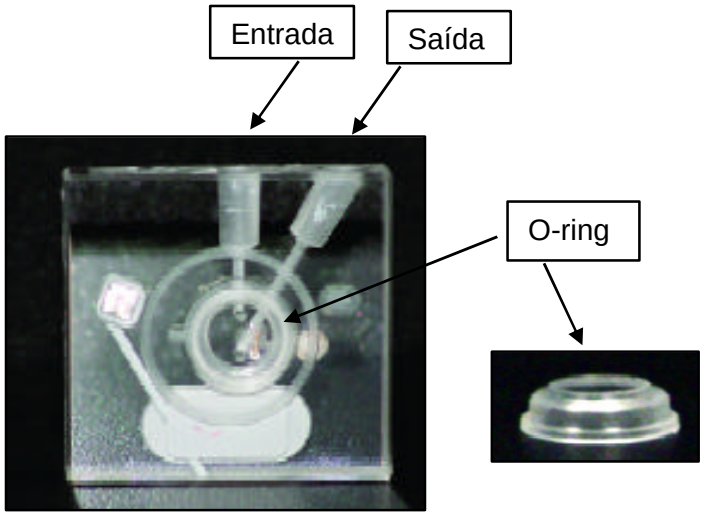

Figura 9 – Célula de líquido e detalhe do anel de vedação (O-ring).

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0124927/CA

4.2.5. Aquisição de Seqüências de Imagens

Como o objetivo do experimento é observar o efeito das substâncias quelantes sobre uma região da superfície dentinária durante um dado período de tempo, foram capturadas seqüências de imagens ao longo do processo. Em princípio, o ideal seria capturar imagens com a maior qualidade, resolução digital e o menor intervalo de tempo possível. No entanto, existe um compromisso entre qualidade, resolução digital e velocidade de formação de imagens no AFM. Nas condições do presente estudo, atingiu-se qualidade aceitável restringindo a resolução a 256x256 pixels e o tempo de formação de cada imagem a cerca de 25 s, cobrindo uma região de 50 x 50 μm^2.

O uso da célula de líquido, no entanto, traz outras dificuldades. A primeira imagem de cada seqüência, referente à amostra apenas polida, é capturada com a célula vazia. Após a injeção de líquido ocorre uma mudança nas condições formação da imagem e é necessário um realinhamento do microscópio. Isto implica em um intervalo de tempo maior entre a primeira e a segunda imagem da seqüência. Além disso, este tempo variou de amostra para amostra, dificultando uma medida precisa da duração do ataque ácido. Em geral conseguia-se realinhar o microscópio em aproximadamente 60 s, mas este tempo variou entre 30 e 90 s.

A Figura 10 mostra uma seqüência típica de imagens obtida.

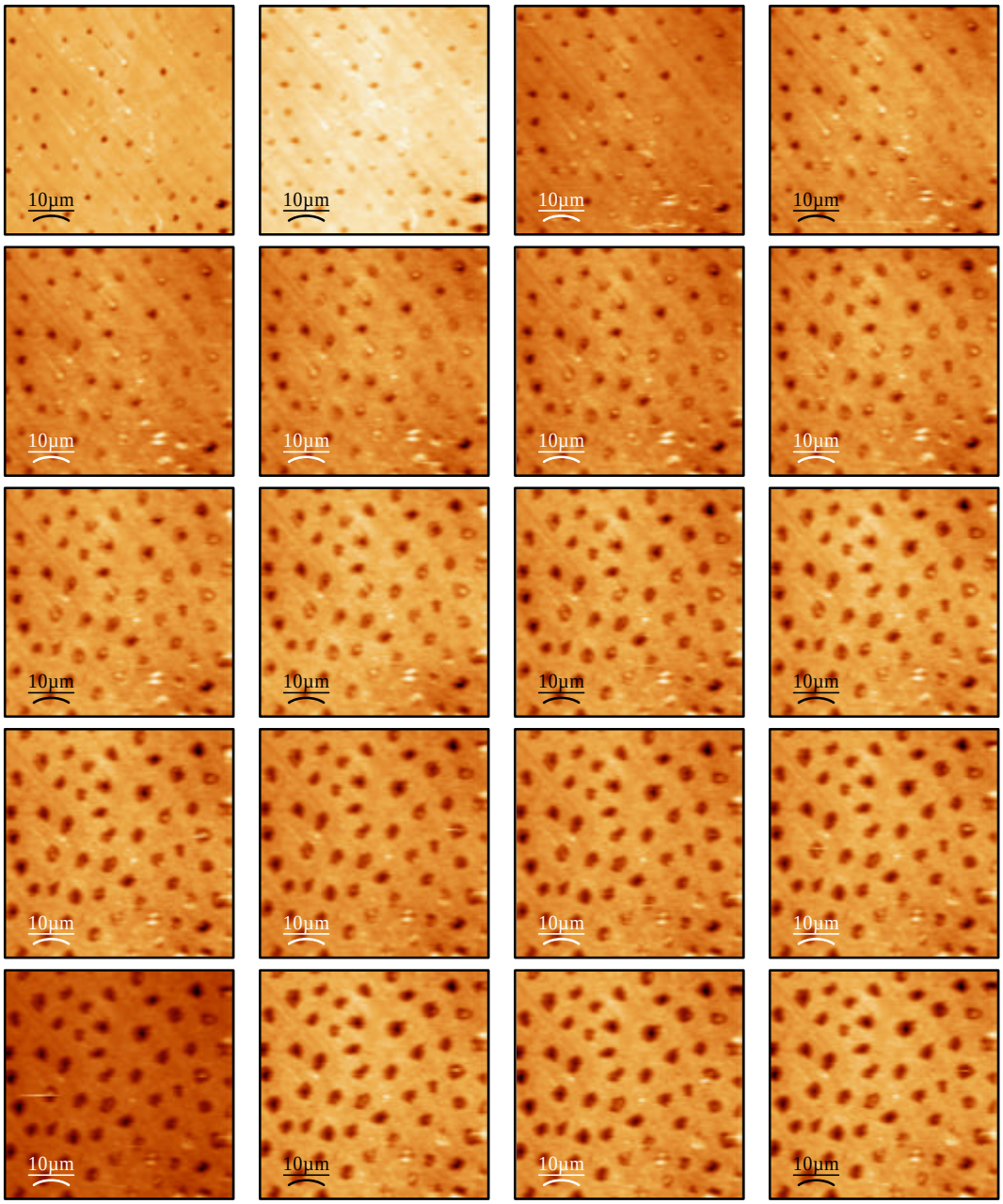

Figura 10 – Seqüência típica de imagens

De um total de 24 amostras, somente foi possível considerar para o experimento as imagens obtidas em 9 amostras, sendo 3 seqüências de imagens de cada quelante.

4.2.6. Processamento Digital de Imagens (PDI)

As imagens foram processadas e analisadas pelo programa KS 400 (Carl Zeiss Vision Gmbh, Hallbergmoos, Alemanha) e uma rotina de trabalho (macro) foi desenvolvida objetivando a segmentação e quantificação dos túbulos dentinários.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0124927/CA

A Figura 11 mostra a seqüência típica de operações de processamento de imagens utilizada. A imagem original muitas vezes apresentava variações de brilho ao longo do campo (Figura 11a) que dificultavam a discriminação posterior de túbulos. Estas variações foram compensadas através de um filtro passa-altas com grande tamanho de kernel (ASM Handbook, 2004). O resultado, Figura 11b, é uma imagem mais uniforme. Em seguida, como as imagens capturadas pelo software de controle do AFM eram tratadas como coloridas, foi necessário convertê-las para tons de cinza, de forma a permitir o uso das funções de segmentação (ASM Handbook, 2004) baseadas em intensidade (limiarização) disponíveis no software. Vide Figura 11c. A Figura 11d mostra as regiões escuras da imagem identificadas como partículas brancas em uma imagem binária. Estas partículas correspondem, em princípio, às partes desobstruídas dos túbulos dentinários. A Figura 11e mostra as regiões identificadas pela macro sobrepostas à imagem original. Pode-se comprovar a boa sensibilidade para identificação dos túbulos.

A partir da imagem segmentada (Figura 11d) é possível extrair diversas medidas tais como contagem de túbulos, fração de área ocupada por túbulos em relação à área total do campo e diâmetro de cada túbulo. Aplicando-se o mesmo procedimento a todas as imagens de cada seqüência de ataque ácido, é possível avaliar quantitativamente o efeito de cada quelante sobre a superfície dentinária.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0124927/CA

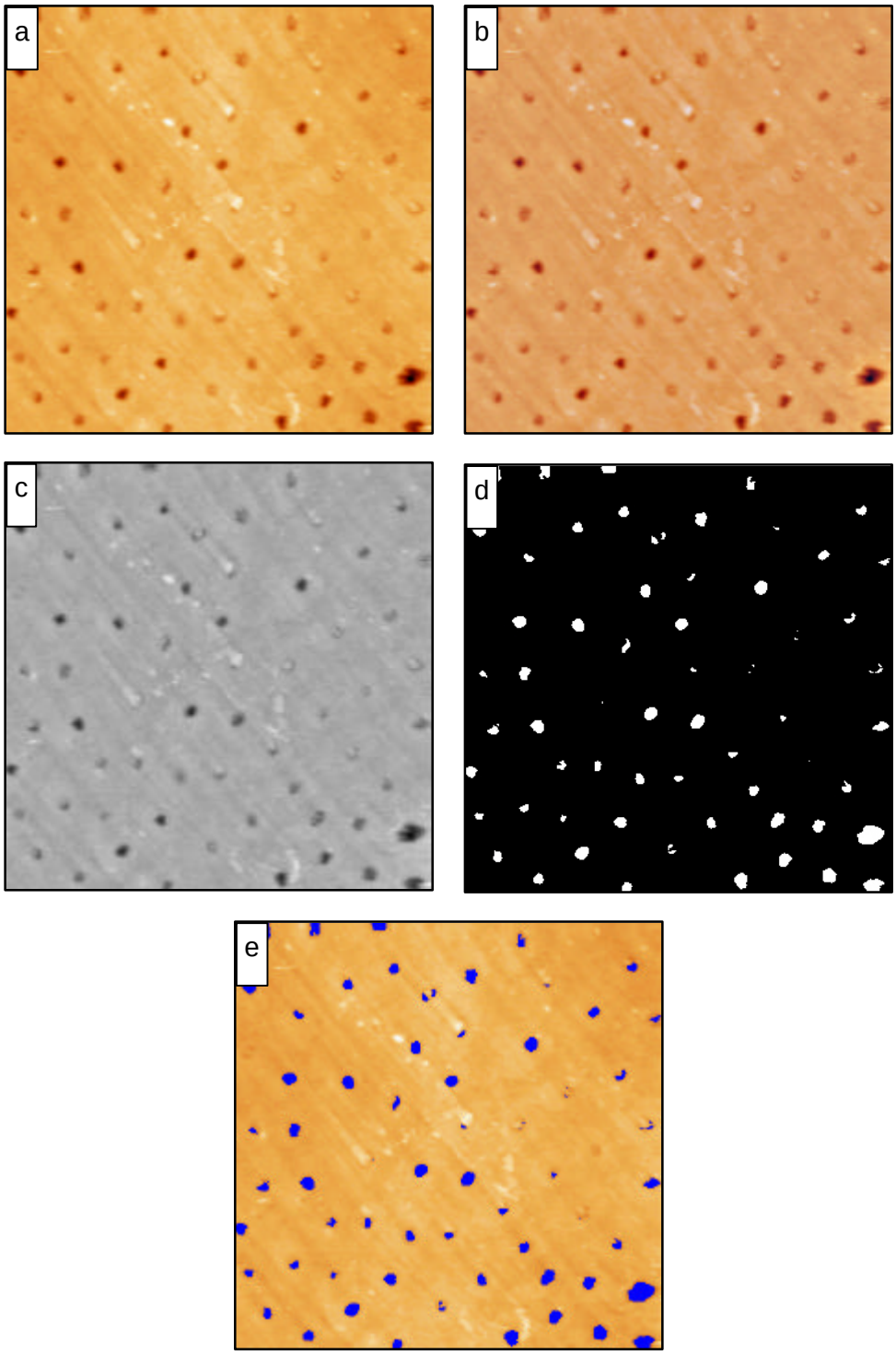

Figura 11 – Seqüência típica de processamento de imagens

A seqüência completa da macro utilizada no KS 400 encontra-se nos **Error! Reference source not found.**

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0124927/CA