

## 5 Resultados & Discussão

### 5.1 Microdureza

Os valores referentes aos resultados da microdureza dentinária inicial (MD) encontram-se descritos na Tabela 1 e plotados no gráfico da Figura 1. Após o tratamento estatístico com o teste t de Student para amostras independentes foi verificado não haver diferença estatisticamente significativa entre os valores da microdureza inicial ( $P > .05$ ) para todos os grupos.

Tabela 1 – Dados referentes a média, valor mínimo e máximo encontrados na microdureza inicial.

Quelantes	MD Média	MD mínima	MD Máxima
Todas as amostras	47.88 ± 6.38	27.2	65.6
AC	47.5 ± 13.17	30.1	59.5
EDTA	46.39 ± 7.59	35.8	57.1
EDTAC	50.01 ± 5.29	39.1	56.5

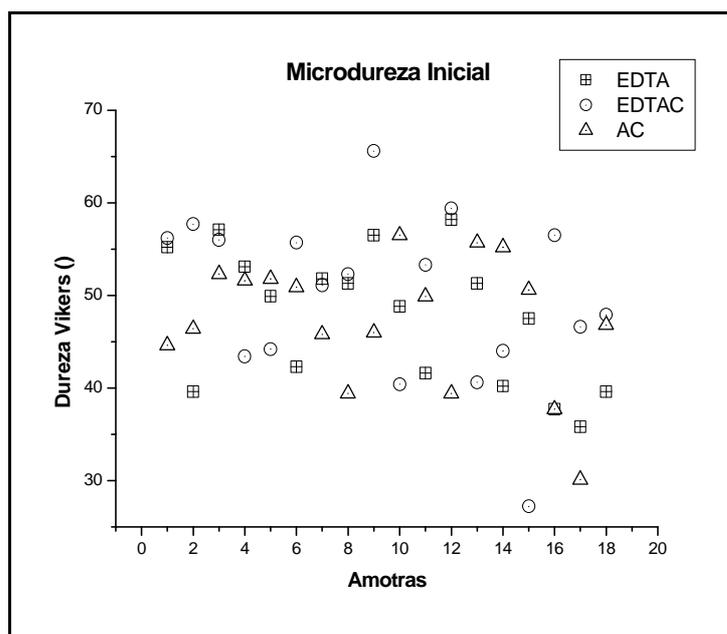


Figura 1 – Resultados da microdureza dentinária inicial.

Os dados referentes aos resultados encontrados após um minuto de ação das substâncias quelantes encontram-se descritos na Tabela 2. Após o tratamento estatístico com o teste t de Student para amostras independentes pode-se verificar que uma diferença estatisticamente significativa foi encontrada em relação aos valores da MD inicial ( $P < .05$ ). Já nesse momento, pode-se constatar que o EDTA foi à substância que mais reduziu a MD, embora do ponto de vista do teste estatístico, os 3 grupos não tenham sido considerados distintos.

Tabela 2 – Dados referentes a média, valor mínimo e máximo encontrados na microdureza dentinária após 1 minuto de ataque ácido.

<b>Quelantes</b>	<b>MD Média</b>	<b>MD mínima</b>	<b>MD Máxima</b>
AC	47,5 ± 6.23	38.1	52.2
EDTA	45,42 ± 7.89	32.4	60.1
EDTAC	49,1 ± 6.89	35.21	57.1

Os dados referentes aos resultados encontrados após três minutos de ação das substâncias quelantes encontram-se descritos na Tabela 3. Pode-se verificar, novamente, que o EDTA apresentou os menores valores de MD. Após o tratamento estatístico com o teste t de Student para amostras independentes, sintetizado na Tabela 4, verificou-se que as três substâncias apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre si.

Tabela 3 – Dados referentes a média, valor mínimo e máximo encontrados na microdureza dentinária após 3 minutos de ataque ácido.

<b>Quelantes</b>	<b>MD Média</b>	<b>MD mínima</b>	<b>MD Máxima</b>
AC	47,26 ± 7.01	30.1	56.5
EDTA	34,1 ± 5.42	26.4	46.6
EDTAC	49,1 ± 6.89	35.21	57.1

Tabela 4 – Diferenças estatisticamente significativas entre os grupos em 3 minutos de condicionamento ácido.

	AC	EDTA	EDTAC
AC			
EDTA			
EDTAC			

Os dados referentes aos resultados encontrados após cinco minutos de ação das substâncias quelantes encontram-se descritos na Tabela 5. Pode-se verificar, novamente, que o EDTA apresentou os menores valores de MD. Após o tratamento estatístico com o teste t de Student para amostras independentes, sintetizado na Tabela 6, verificou-se que os resultados para AC são estatisticamente distintos dos resultados para EDTA e EDTAC mas estes dois últimos não apresentaram diferença entre si.

Tabela 5 – Dados referentes a média, valor mínimo e máximo encontrados na microdureza dentinária após 5 minutos de ataque ácido.

Quelantes	MD Média	MD mínima	MD Máxima
AC	41,76 ± 3.77	31.2	42.5
EDTA	34,69 ± 5.32	27.9	51.1
EDTAC	36,62 ± 5.89	32.1	53.1

Tabela 6 – Diferenças estatisticamente significativas entre os grupos em 5 minutos de condicionamento ácido.

	AC	EDTA	EDTAC
AC			
EDTA			
EDTAC			

A Tabela 7 aponta as diferenças estatisticamente significativas entre os momentos experimentais, indicando que todos os tempos são relevantemente distintos.

Tabela 7 – Diferenças estatisticamente significativas entre os momentos experimentais.

	0 min	1 min	3 min	5 min
0 min				
1 min				
3 min				
5 min				

De modo geral, o EDTA foi a substância que mais afetou a microdureza, principalmente nos 3 primeiros minutos. Esse comportamento pode ser observado no gráfico da Figura 2, que plota os dados referentes as médias da MD em todos os momentos experimentais.

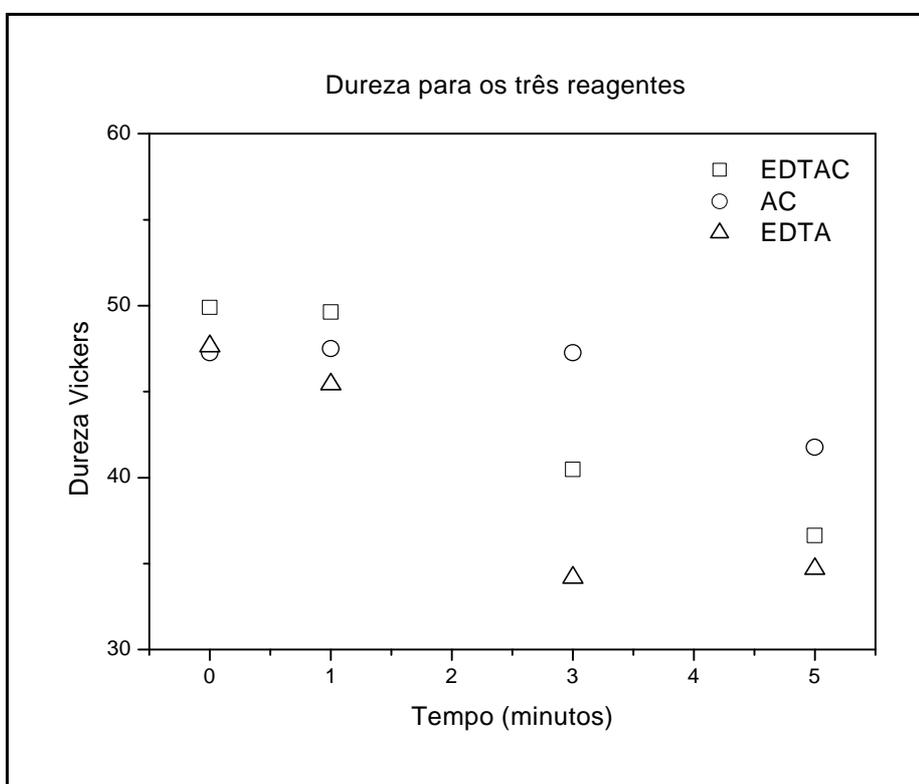


Figura 2 – Dados referentes as medias da MD encontradas em todos os momentos experimentais.

A evolução dos dados relativos a MD em cada momento experimental discriminado por substância quelante encontra-se nos gráficos da Figura 3, Figura 4 e da Figura 5.

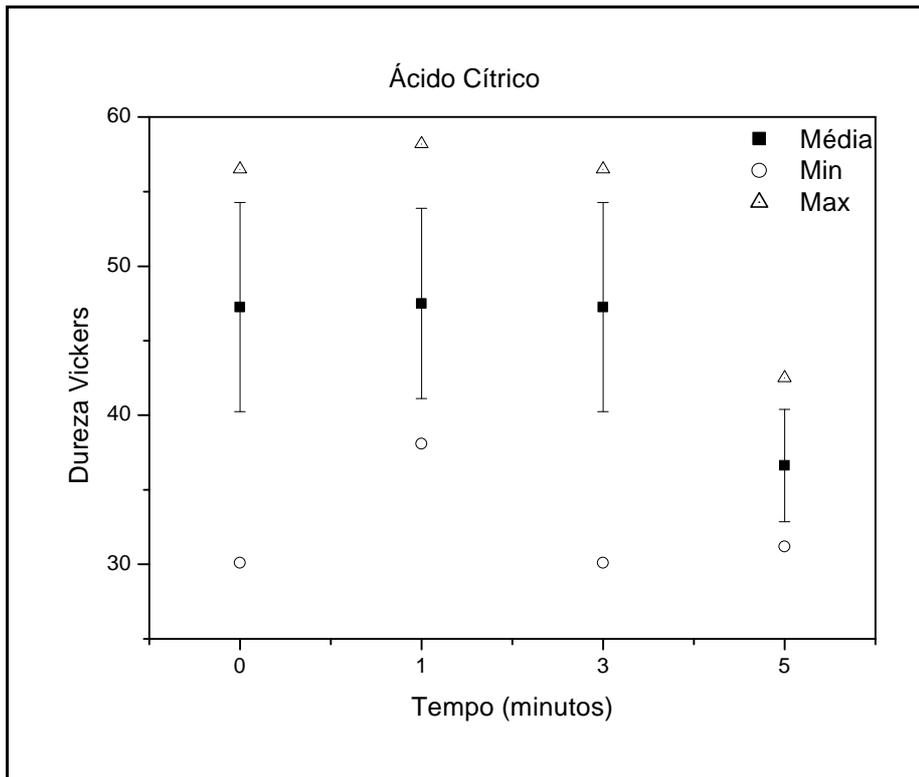


Figura 3 – Evolução da MD nas amostras atacadas com AC

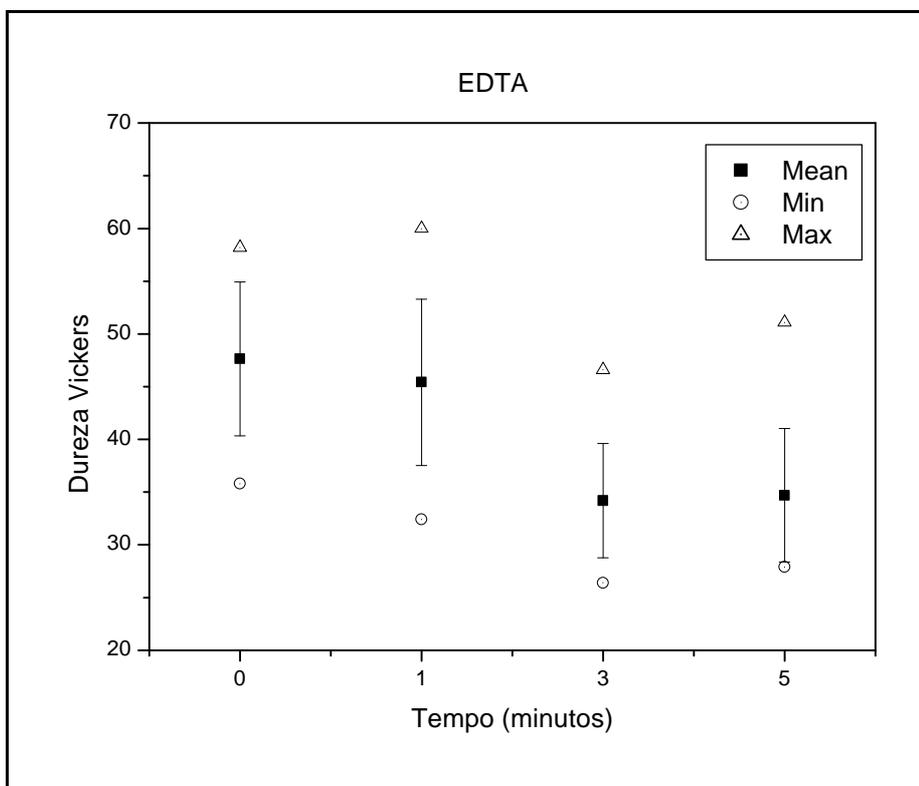


Figura 4 – Evolução da MD nas amostras atacadas com EDTA

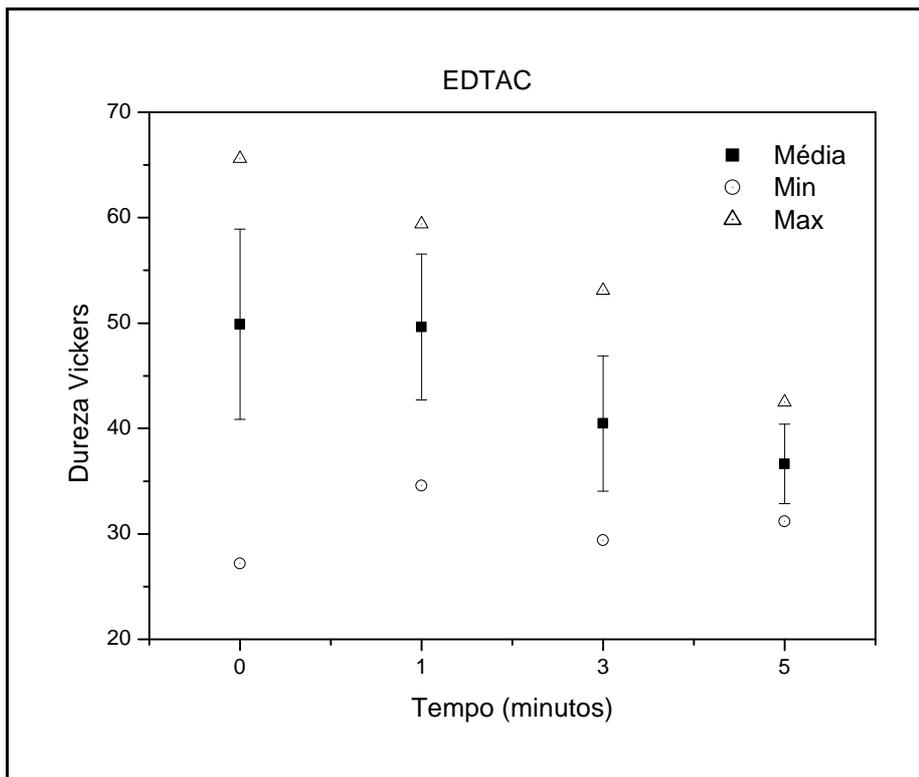


Figura 5 – Evolução da MD nas amostras atacadas com EDTA

No trabalho de Fairbanks *et al.* (1997), o EDTA e EDTAT foram menos efetivos que o EDTAC na capacidade de redução da MD. Hulsmann *et al.* (2003) não encontraram diferenças significativas entre as três pastas quelantes testadas em um tempo experimental de 10 minutos. Este resultado talvez possa ser justificado porque utilizou-se somente 10 segundos de carga ou devido à natureza física dos quelantes (sob a forma de pasta).

Podemos perceber algum conflito entre os resultados obtidos para o AC e resultados existentes na literatura. Nos testes realizados, o AC demonstrou a menor capacidade de afetar a dureza dentinária dentre as três substâncias analisadas. Diferentemente dos nossos resultados, Scelza, Texeira & Scelza (2003), utilizando espectrometria de absorção atômica, não encontraram diferenças na capacidade de remoção de íons cálcio entre o ácido cítrico 10% e o EDTA 17%. Os autores relataram que a solução de EDTA associada a um agente tensoativo foi o menos eficaz na remoção de íons cálcio o que se afasta de nossos resultados.

Um ponto negativo dos testes de dureza em amostras biológicas diz respeito a própria natureza desse tipo de ensaio. Os ensaios de dureza foram primordialmente desenvolvidos objetivando analisar amostras que apresentassem uma certa homogeneidade morfológica entre as regiões a serem

medidas, como amostras metálicas por exemplo. Essa situação não corresponde à situação encontrada em muitos tipos de amostras biológicas tal como o substrato dentinário.

Essa adaptação metodológica pode resultar em diversos desvios dos resultados dada a diferença morfológica existente entre as regiões adjacentes do tecido dentinário. Pashley *et al.* (1985) demonstraram a existência de uma correlação negativa estatisticamente significativa entre a microdureza dentinária e densidade dos túbulos. Esse tipo de situação pode ser claramente evidenciada em nosso experimento piloto. Regiões adjacentes quando visualizadas em microscopia óptica podem revelar uma densidade, distribuição e disposição geométrica dos túbulos dentinários totalmente distintas. Vide as imagens da Figura 6 e da Figura 7.

A primeira indentação foi realizada na região próxima à luz do canal radicular (C) aonde pode-se verificar que os túbulos dentinários encontram-se dispostos de modo mais longitudinal (D1). Já na segunda indentação (D2), a disposição dos túbulos começa a mudar significativamente. Na terceira (D3), pode-se notar que a morfologia dentinária mudou por completo, tendo os túbulos assumido uma disposição mais regular e uniforme.

Por esse motivo, as indentações nesse experimento não foram realizadas na região mais próxima à luz do canal radicular e sim na porção central da dentina – entre a luz do canal e o cimento radicular – aonde foi possível constatar, no estudo piloto, uma maior uniformidade na densidade, disposição e distribuição dos túbulos dentinários.

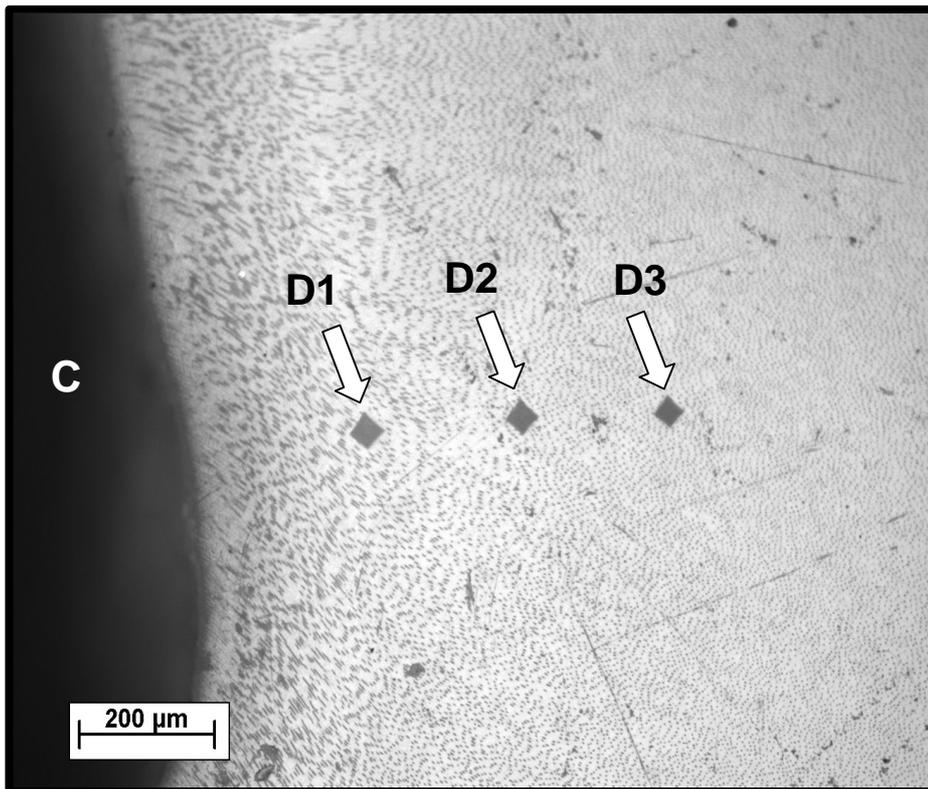


Figura 6 – Fotomicrografia de uma amostra do experimento piloto na qual foram realizadas 3 indentações para dureza Vickers na dentina.

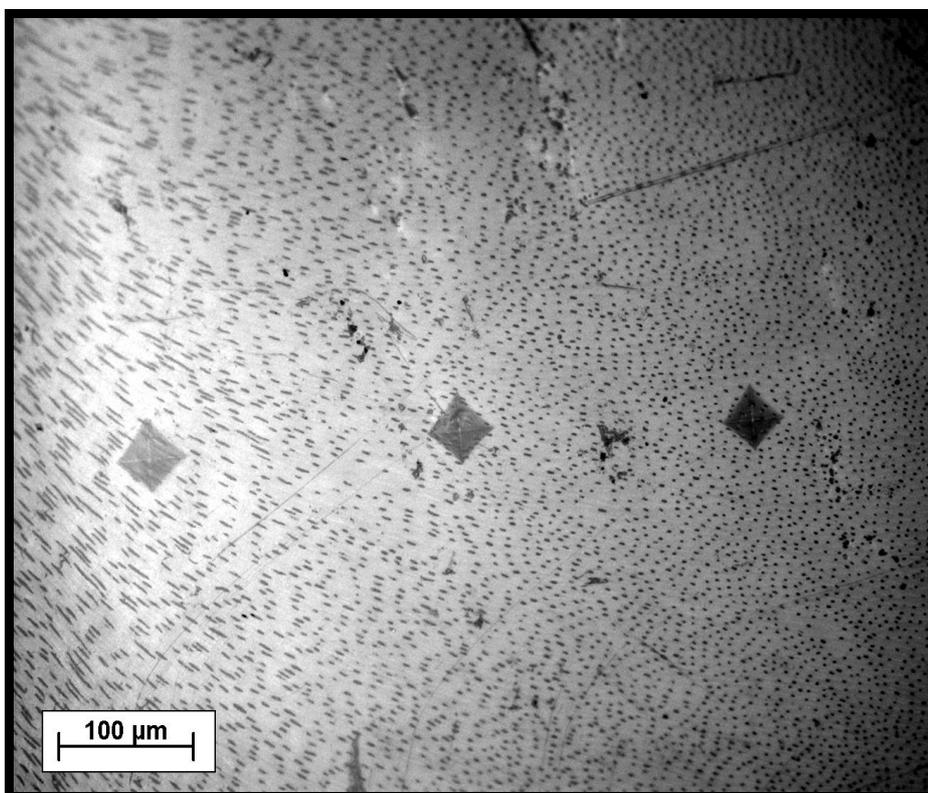


Figura 7 – Fotomicrografia de maior aumento das três indentações da Figura 6, na qual é possível perceber de modo mais detalhado a mudança na morfologia dentinária.

No nosso estudo procuramos avaliar o efeito do EDTA, EDTAC e do AC na microdureza dentinária em função do tempo de aplicação – 1, 3 ou 5 minutos de aplicação. Paterson (1963) descreveu uma desmineralização máxima depois de 5 minutos de aplicação do quelante. Já Hülsmann *et al.* (2002) estenderam o tempo experimental para 10 minutos. Resolvemos optar pelo tempo que mais se aproximava da prática clínica e por isso nos limitamos a 5 minutos de aplicação.

Diferentemente de outros trabalhos, nesse experimento todas as leituras foram feitas em uma mesma amostra. No experimento piloto, foi verificado que era possível realizar as indentações na mesma amostra com tempos de condicionamento ácido distintos. É importante citar que no extenso levantamento bibliográfico realizado para a preparação do presente trabalho, não foram encontradas referências nas quais este tipo de enfoque tenha sido utilizado. Realizando as medidas de dureza em uma mesma amostra, acreditamos que estamos contribuindo para a obtenção de resultados mais robustos e portanto mais confiáveis estatisticamente. Podemos acompanhar em grupo ou até mesmo individualmente o comportamento da microdureza dentinária de uma determinada amostra em função do tempo de condicionamento – Figura 8. Outra vantagem encontra-se relacionada ao conhecimento prévio da dureza inicial de cada amostra.

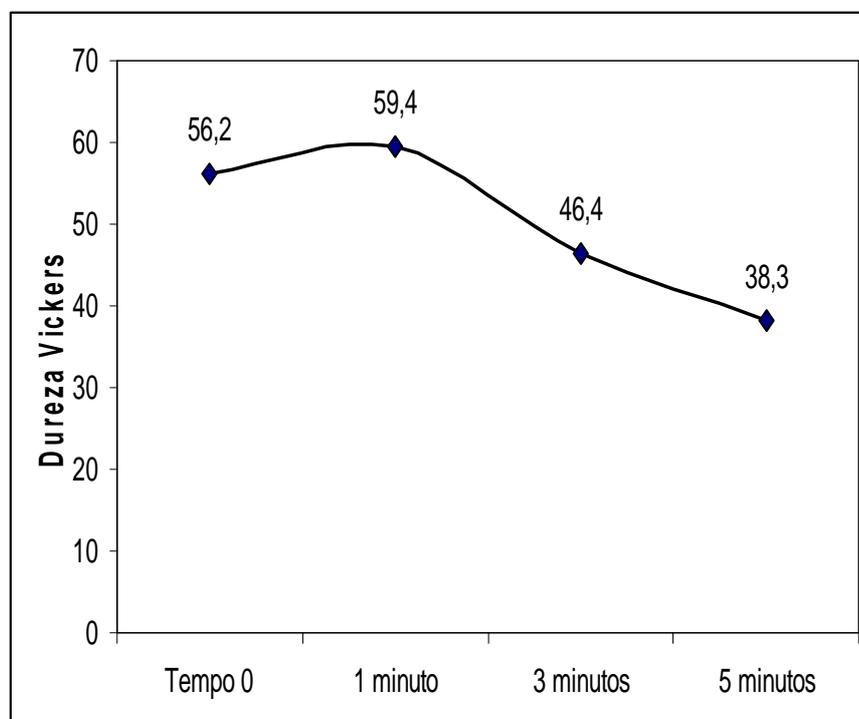


Figura 8 – Evolução da MD em função do tempo de aplicação do EDTAC na amostra 1. Pode-se acompanhar os resultados obtidos na mesma amostra.

## 5.2 Microscopia de Força Atômica

Das vinte e quatro amostras disponíveis para a análise, somente em cinco amostras foi possível a observação de uma seqüência de imagens com um mínimo de qualidade. Das cinco seqüências, em somente duas foi possível uma análise quantitativa através do processamento digital de imagens. Os resultados são apresentados a seguir, separados por ácido, e posteriormente comparados e discutidos.

### 5.2.1 EDTA

Na Figura 9 encontra-se a seqüência de imagens obtidas na amostra 1 do grupo do EDTA. A Figura 10 ilustra algumas imagens 3D da mesma seqüência, ficando qualitativamente ilustrada a capacidade do EDTA em promover a abertura dos túbulos dentinários. Em (a), temos a 1ª imagem ainda sem nenhum condicionamento ácido. A imagem (b) foi realizada após aproximadamente 50 segundos de ataque ácido. Em (c), já com cerca de 200 segundos de ataque ácido, pode-se observar um aumento gradual da fração tubular. Em (d), (e) e (f) observamos a evolução da desmineralização até o final da seqüência com cerca de 500s.

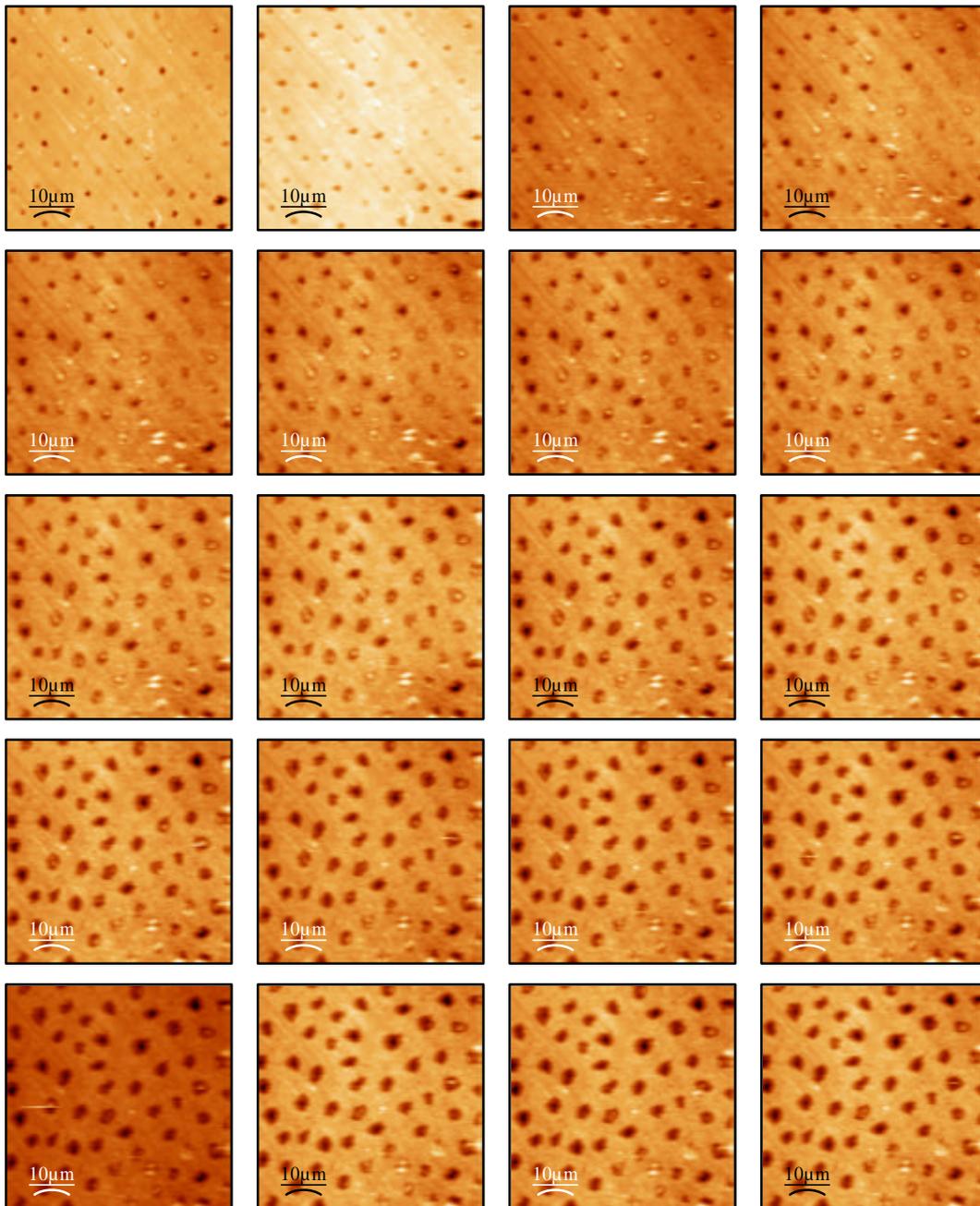


Figura 9 – Seqüência completa de imagens obtidas na amostra 1 do grupo do EDTA.

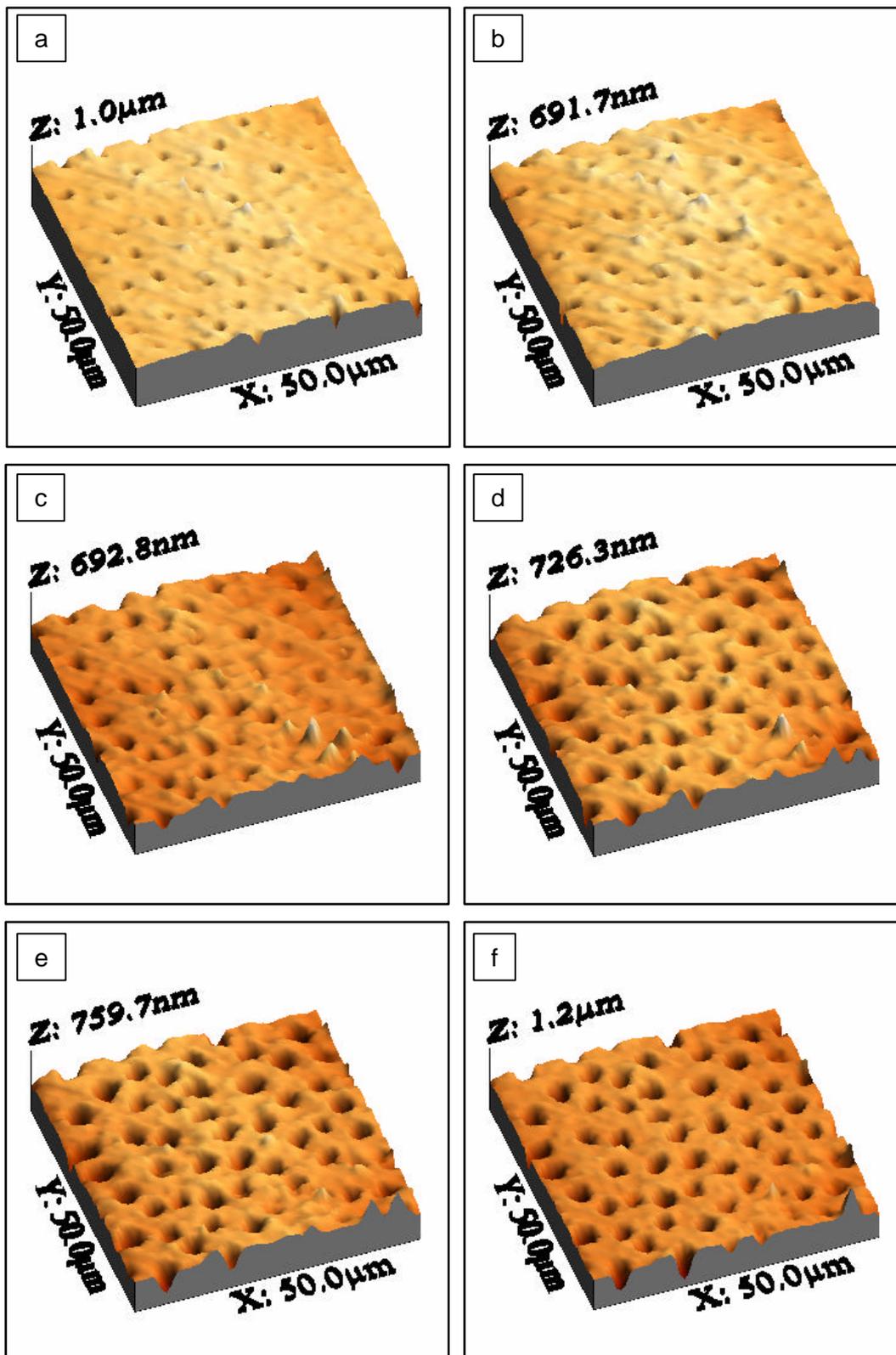


Figura 10 – Seqüência de imagens 3D obtidas na amostra 1 do EDTA.

Nessa seqüência, com o processamento e análise digital de imagens (PADI) obteve-se dados quantitativos relativos à área percentual dos túbulos dentinários em cada imagem. Deste modo, a partir do aumento da área

percentual dos túbulos dentinários, foi possível quantificar a dinâmica de desmineralização ocorrida durante o condicionamento ácido. Esses dados são apresentados no gráfico da Figura 11. Nesta figura, a linha relativa ao traço se refere aos valores obtidos quando a ponta da sonda realiza a varredura da esquerda para a direita, sobre a superfície da amostra. A linha relativa ao retraço se refere à varredura no sentido contrário.

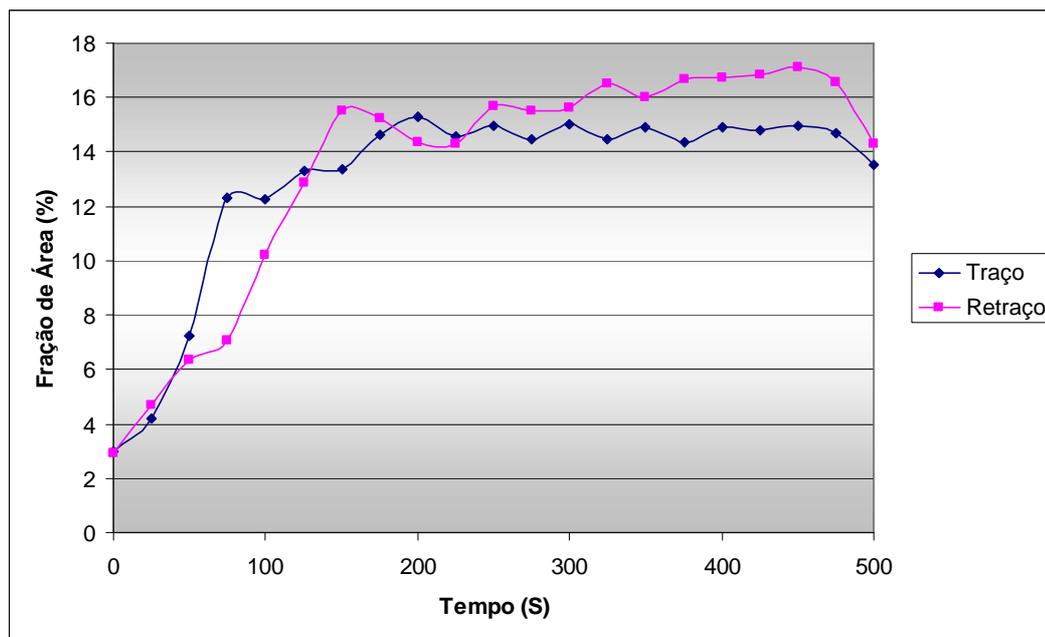


Figura 11 – Evolução da fração percentual da área relativa aos túbulos dentinários que foram quantificados por PADI.

### 5.2.2 EDTAC

Na Figura 12 encontra-se a seqüência de imagens obtidas na amostra 1 do grupo do EDTAC. A Figura 13 ilustra algumas imagens 3D da mesma seqüência. Nessa seqüência fica qualitativamente ilustrada a capacidade do EDTA em promover a abertura dos túbulos dentinários. Em (a) temos a 1ª imagem ainda sem nenhum condicionamento ácido. A imagem (b) foi realizada após aproximadamente 50 segundos de ataque ácido. Em (c), já com cerca de 200 segundos de ataque ácido, pode-se observar um aumento gradual da fração tubular. Em (d), (e) e (f) as imagens para 300, 400 e 550 segundos respectivamente. Nessa seqüência, com o PADI foi possível medir a área percentual dos túbulos dentinários em cada imagem. Deste modo, a partir do aumento da área percentual dos túbulos dentinários, foi possível quantificar a

dinâmica de desmineralização ocorrida durante o condicionamento ácido. Esses dados são apresentados na Figura 14.

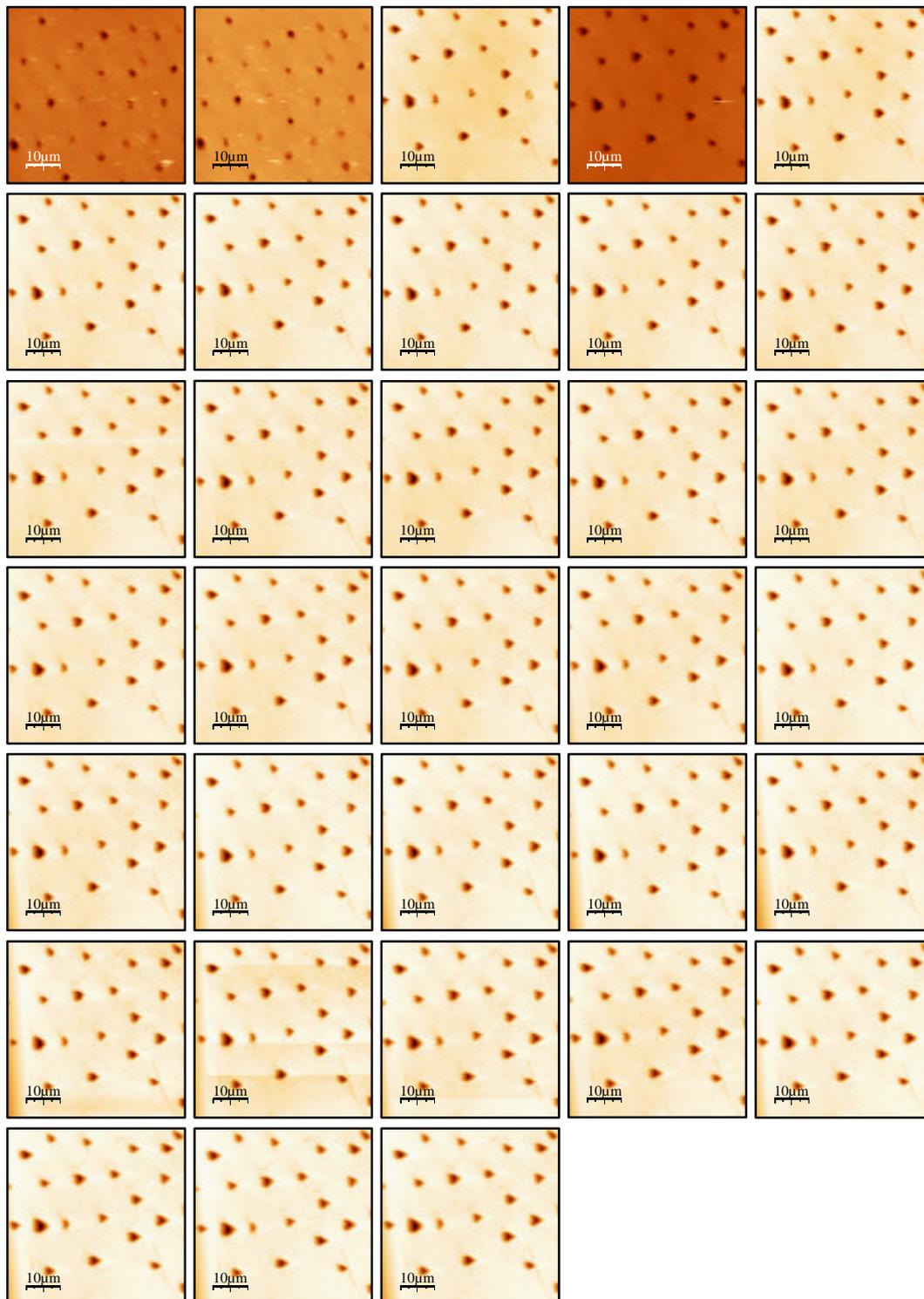


Figura 12 – Seqüência completa de imagens obtidas na amostra 1 do grupo do EDTAC

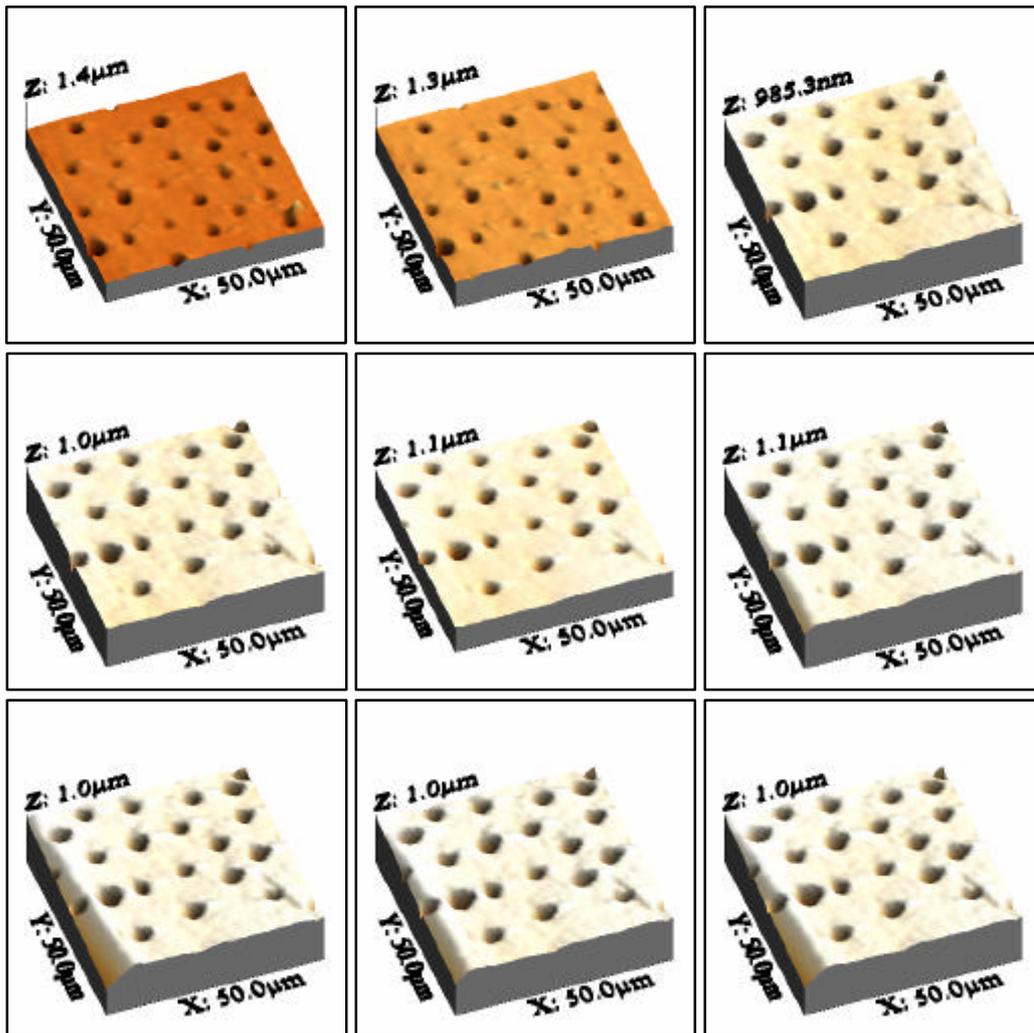


Figura 13 – Sequência de imagens 3D obtidas na amostra 1 do EDTAC.

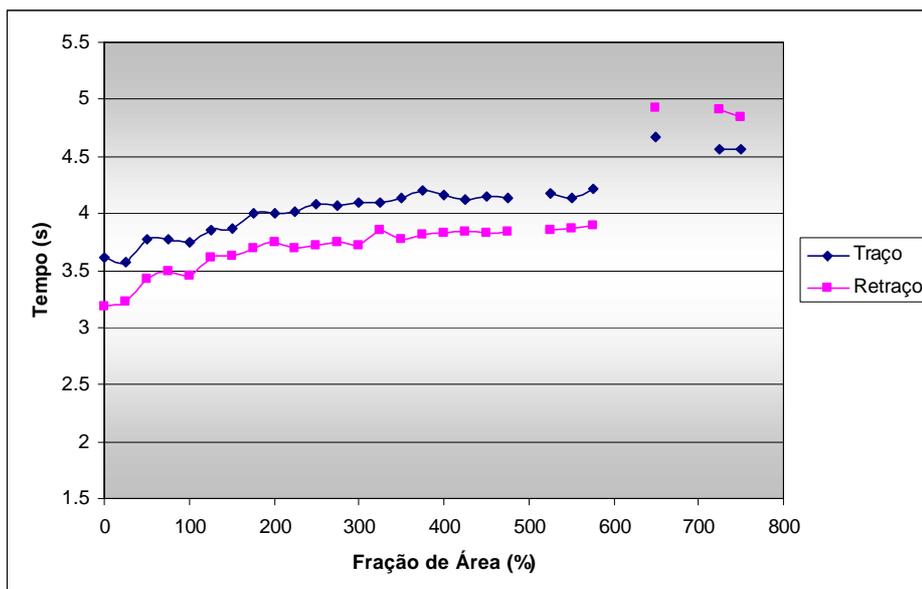


Figura 14 – Evolução da fração percentual da área relativa aos túbulos dentinários que foram quantificados por PADI.

### 5.2.3 AC

Na Figura 15, encontra-se a seqüência de imagens obtidas na amostra 1 do grupo do AC. A Figura 16 ilustra algumas imagens 3D da mesma seqüência. Fica qualitativamente ilustrada a capacidade do AC em promover a abertura dos túbulos dentinários. Em (a) temos a 1ª imagem ainda sem nenhum condicionamento ácido. A imagem (b) foi realizada após aproximadamente 50 segundos de ataque ácido. Em (c), já com cerca de 200 segundos de ataque ácido, pode-se observar um aumento gradual do fração tubular. Em (d), a imagem com cerca de 300s.

Pode-se observar a intensa desmineralização ocorrida logo nos primeiros 50s de condicionamento ácido analisando as duas primeiras imagens da Figura 15 e da Figura 16. Já na 5ª imagem da Figura 15 pode-se observar uma mudança na qualidade da imagem muito provavelmente ocasionada pela saturação da solução quelante na célula de líquido. Somente na 18ª imagem volta a melhorar a qualidade das imagens.

Infelizmente, devido a complicações no processo de formação da imagem, o PADI ficou comprometido nesse seqüência e somente podemos analisar qualitativamente o condicionamento ácido.

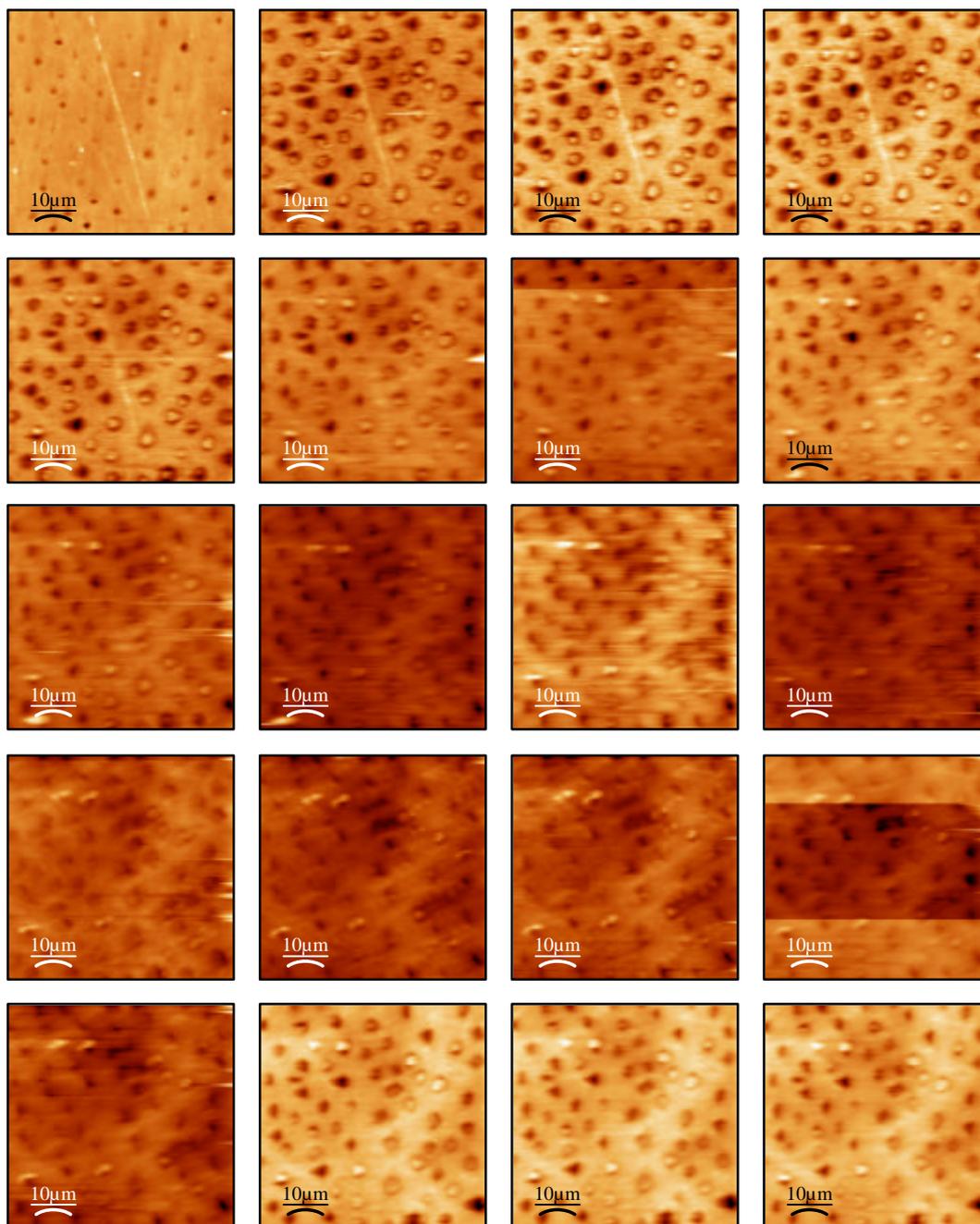


Figura 15 – Seqüência completa de imagens obtidas na amostra 1 do ácido cítrico.

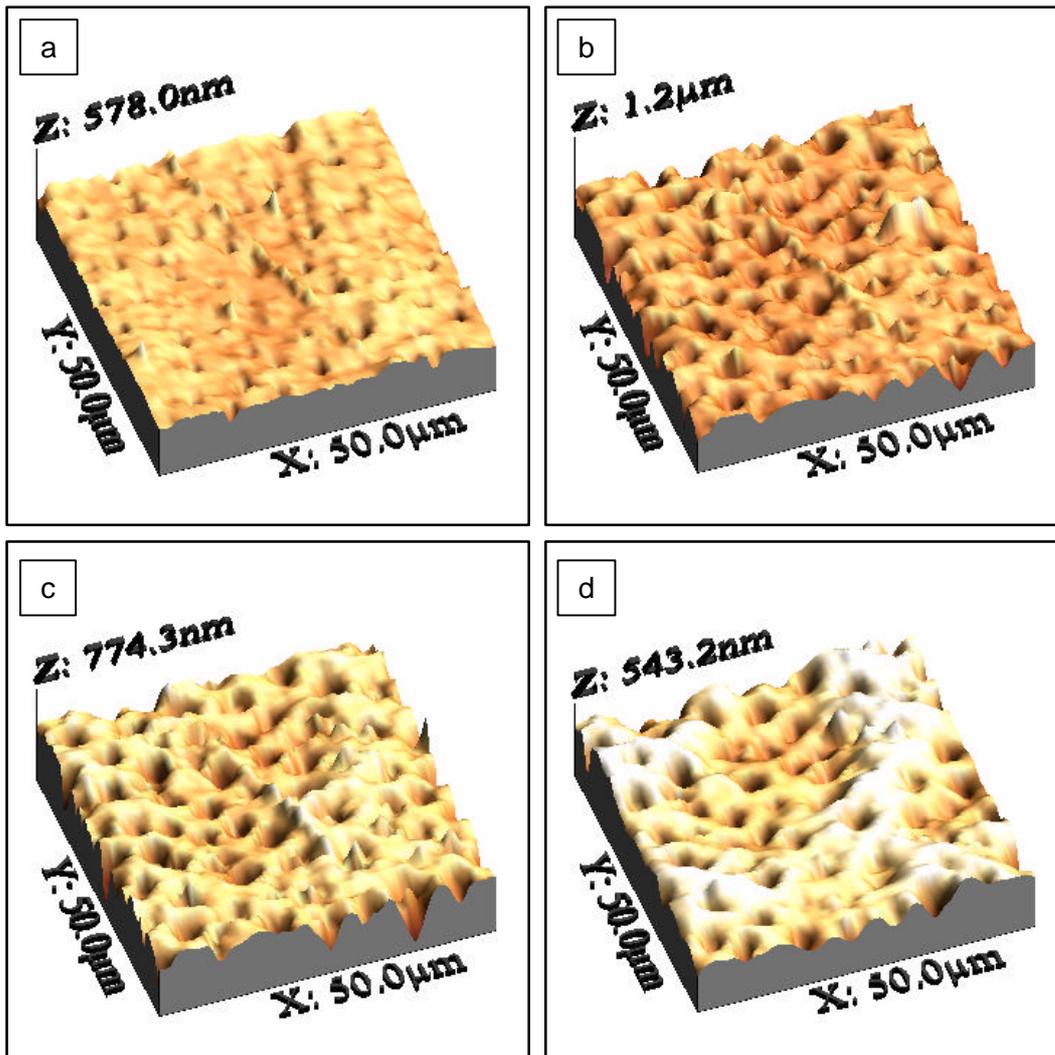


Figura 16 – Seqüência de imagens 3D obtidas na amostra 1 do ácido cítrico

Na Figura 17 encontra-se a seqüência de imagens obtidas na amostra 2 do grupo do AC. A Figura 18 ilustra algumas imagens 3D da mesma seqüência. Nessa seqüência fica qualitativamente ilustrado a capacidade do AC em promover a abertura dos túbulos dentinários. Da imagem (a) para a imagem (b), pode-se confirmar a brusca desmineralização ocorrida nos 50 primeiros segundos. Em (d), observa-se a saturação do meio e conseqüente perda da amostra nesse momento.

O brusco processo de desmineralização promovido pelo AC encontrado na amostra 1 foi confirmado pela seqüência de imagens obtidas da amostra 2.

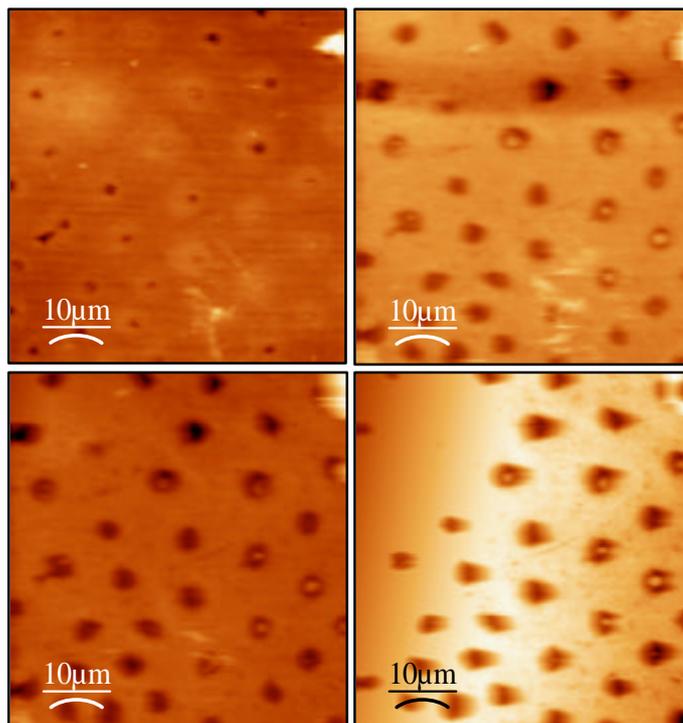


Figura 17 – Seqüência completa de imagens obtidas na amostra 2 do ácido cítrico.

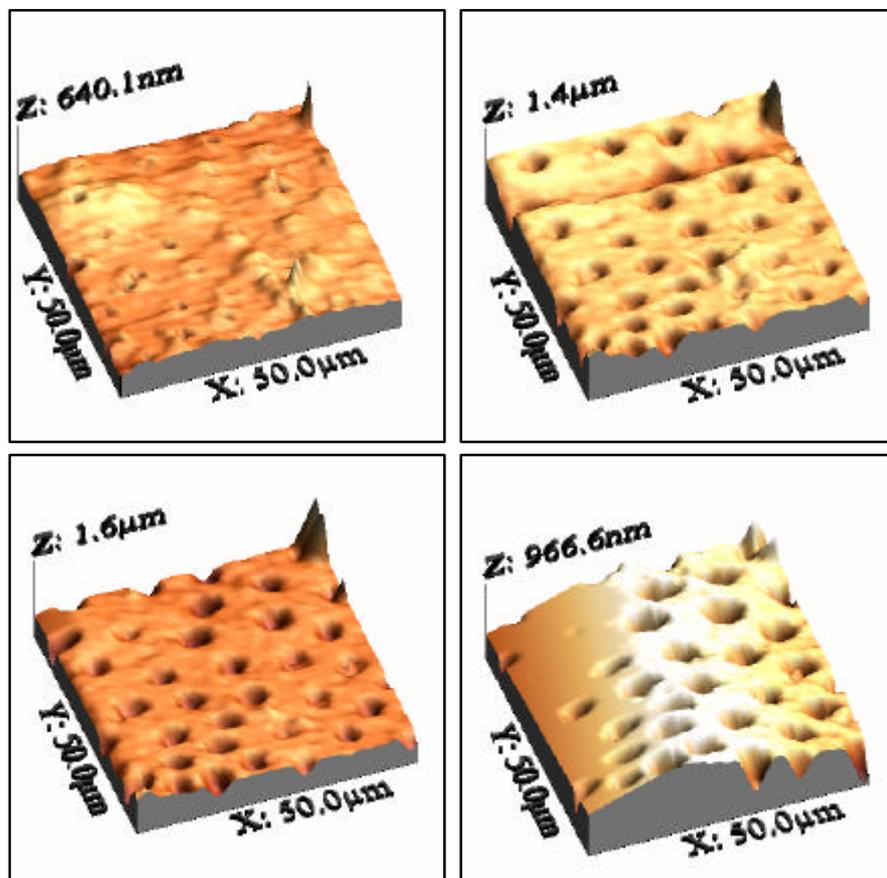


Figura 18 – Seqüência de imagens 3D obtidas na amostra 2 do ácido cítrico

#### 5.2.4 Avaliação Geral dos Resultados de AFM

Após o PADI pode-se confirmar quantitativamente a tendência do aumento da área percentual relativa aos túbulos dentinários. Esses resultados encontram-se plotados nos gráficos das Figura 11 e Figura 14. Qualitativamente essa tendência pode ser claramente observada nas cinco seqüências de imagens obtidas.

A dificuldade na execução do procedimento experimental está relacionada a diversos fatores, sendo que o principal é o pioneirismo do estudo. A falta de uma descrição detalhada da parte experimental nos trabalhos anteriores também contribuiu para diversos problemas experimentais, tais como: o tamanho e a espessura da amostra, o meio de armazenamento das amostras, o tempo experimental e o tipo de célula. Apesar de existir uma literatura odontológica sobre o AFM, poucos detalhes são discutidos e demonstrados. Esses trabalhos são em sua grande maioria estudos de alterações dentinárias como tecido cariado (Marshall *et al.*, 2001), formação de camada híbrida (Eliades *et al.*, 1999), estudos de rugosidade dentinária (Silikas *et al.*, 1999).

Um dos poucos trabalhos *in situ* descritos na literatura é o de Eliades *et al.* (1999). No entanto, nenhum detalhe do uso da célula de líquido é relatado. Em 2001, Silikas *et al.* descreveram as vantagens da utilização do AFM para a realização de mapeamento dentinário. Os autores exaltam a capacidade de observação da superfície dentinária com um mínimo de preparação, assim como o fato da amostra não ser destruída e da possibilidade da realização de estudos observacionais e de manipulação a nível atômico.

Em nossa revisão bibliográfica, o único estudo em que o AFM foi utilizado na Endodontia foi publicado por autores brasileiros. Valera *et al* (2000) analisaram a rugosidade de alguns cimentos por meio deste tipo de microscopia.

O principal problema experimental encontrado no presente trabalho refere-se à dificuldade de calibração do AFM quando a célula de líquido é usada. Após a injeção de líquido ocorre uma mudança nas condições de formação da imagem e é necessário um realinhamento do microscópio. Esse ponto já foi discutido no tópico **Error! Reference source not found.**

A grande variação de altura em certas regiões da superfície dentinária veio a ocasionar a perda de várias amostras durante o experimento. A saturação observada nessas imagens ocorre em decorrência da varredura ter ultrapassado

o limite vertical de compensação do eixo Z do AFM. Em outras palavras, para realizar a varredura completa de uma área relativamente grande para os padrões do AFM (50 $\mu$ m X 50 $\mu$ m), a sonda deve encontrar certa estabilidade na altura (eixo Z) sobre a superfície da amostra. Quando ocorrem variações no eixo Z, o AFM possui um mecanismo eletrônico que compensa essa variação. O problema ocorre quando as variações são tão grandes que ultrapassam o limite de compensação do AFM. Neste caso, a ponta se perde e não consegue realizar a varredura em determinados pontos da superfície da amostra. Essa situação pode ser facilmente observada na Figura 18d.

As grandes variações de altura podem ocorrer devido à inclinação da amostra, à deformação, às características morfológicas do próprio relevo e ao excesso de partículas em suspensão dentro da célula de líquido. Deste modo, torna-se vital para experimentos futuros uma determinação prévia e precisa do tamanho exato que a amostra deva possuir para ficar completamente adaptada ao porta-amostra do AFM. Supõe-se que a inclusão da amostra dentinária em resina e logo depois em silicone, apesar de mostrar-se extremamente prática, não impediu o deslocamento da amostra em algumas situações. Por outro lado, o uso do silicone permitiu um excelente vedamento marginal da amostra pelo O-ring. Em experimentos futuros, as vantagens e desvantagens do uso do silicone devem ser criteriosamente avaliados.

Em relação ao processamento digital de imagens podemos citar alguns detalhes para estudos futuros. Temos que ressaltar que imagem formada pelo AFM é uma convolução da forma da ponta com a superfície da amostra. Assim, dependendo das condições de formação da imagem, pode ocorrer uma distorção de forma nos objetos visualizados. Esse fenômeno pode ser observado na Figura 19. Neste caso, trata-se da varredura da esquerda para a direita (traço) e a extremidade direita de cada túbulo encontra-se alongada. Numa imagem com varredura no sentido oposto (retraço) ocorreria uma distorção simétrica.

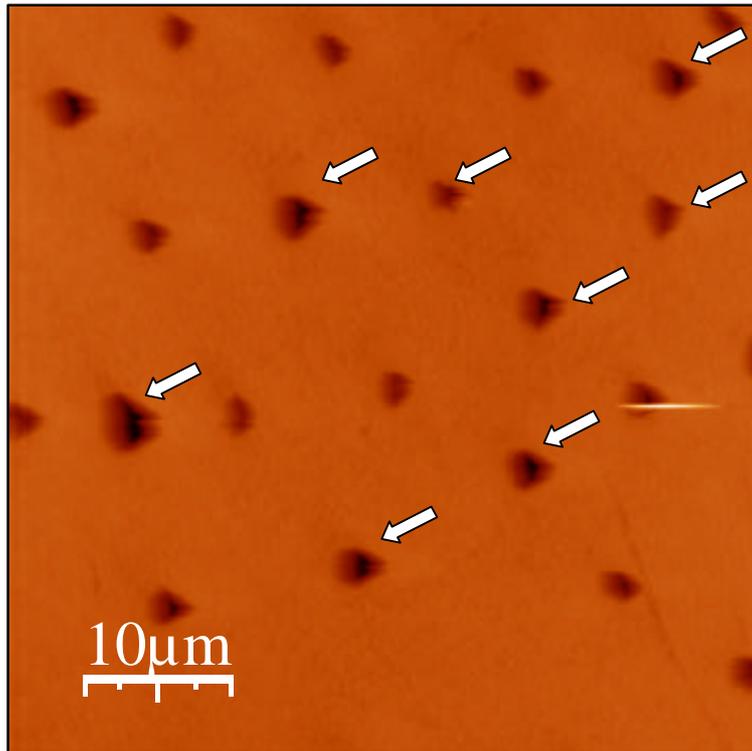


Figura 19 – Imagem demonstrando a distorção que ocorre em algumas imagens devido ao próprio processo de formação das imagens.

Deste modo, realizou-se a análise quantitativa por PADI nas duas imagens (traço e retraço). Podemos perceber pelos gráficos plotados na Figura 11 e na Figura 14 que as medidas referentes ao traço e ao retraço são afetadas pelo condicionamento ácido da mesma forma. Deste modo, podemos supor que a curva de tendência não é fortemente afetada pela distorção das imagens. Porém certamente a fração de área percentual relativa aos túbulos dentinários está superestimada, pois as imagens encontram-se sempre com algum grau de distorção.

Para atenuar esse problema e gerar medidas mais precisas pensou-se em realizar uma intersecção entre as imagens de traço e retraço, obtendo deste modo uma nova imagem que apresentaria somente a área comum presente nas duas imagens. Deste modo, a segmentação da nova imagem forneceria medidas mais acuradas das dimensões dos túbulos dentinários. Veja Figura 20.

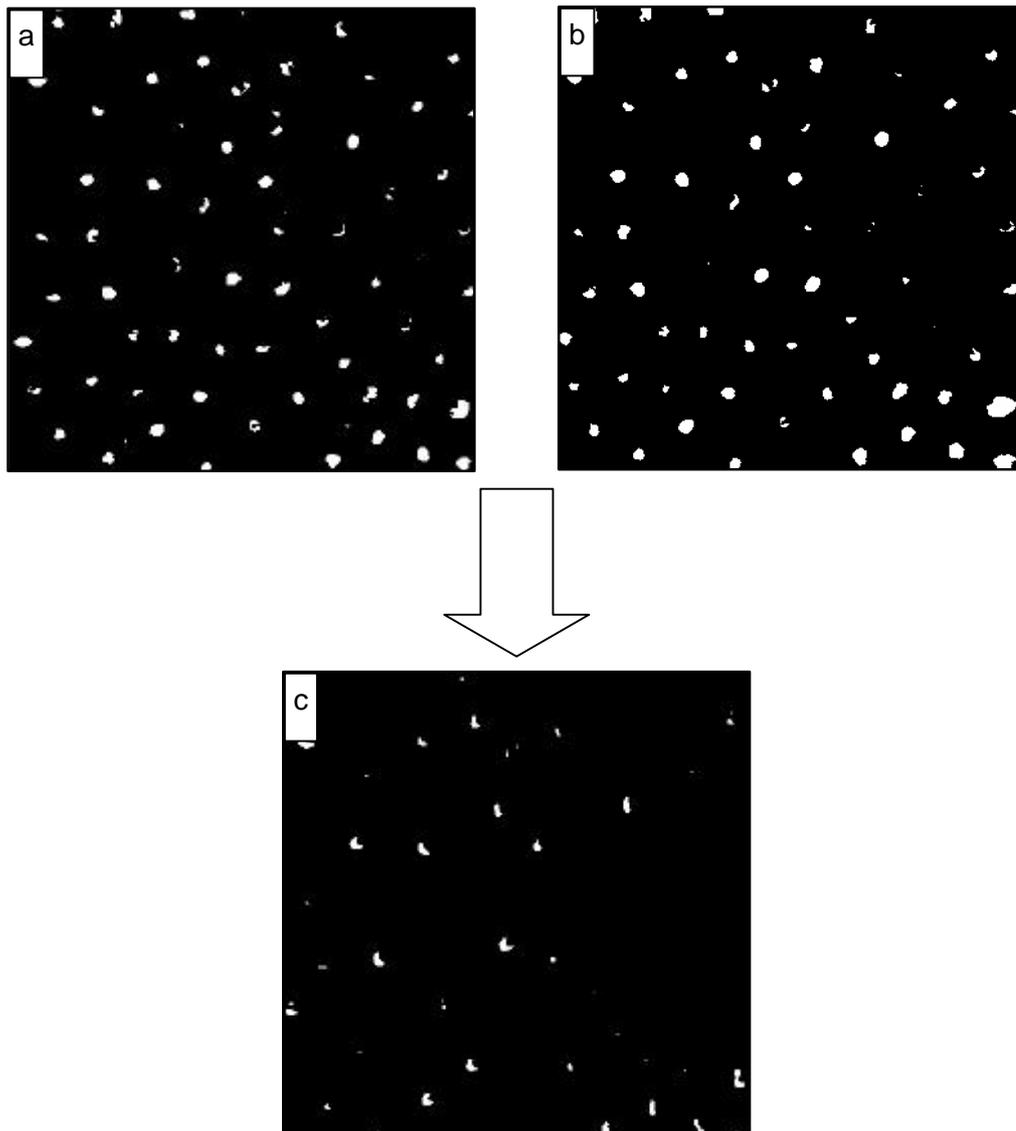


Figura 20 – Ilustração da análise através de intersecção entre traço e retraço. (a) Imagem segmentada do traço. (b) Imagem segmentada do retraço. (c) Intersecção entre (a) e (b)

No entanto, devido a deslocamentos entre as imagens de traço e retraço, o processo de intersecção não se mostrou confiável, levando a subestimar fortemente a área de túbulos. Uma possível solução para este problema seria colocar em registro as imagens de traço e retraço, através de um procedimento de correlação, por exemplo, para então obter a intersecção. Este procedimento não foi tentado no presente trabalho porque considerou-se que não traria grande melhora na exatidão dos resultados.

### 5.3 Microdureza vs. AFM

Os resultados obtidos pelo ensaio de MD mostram-se diferentes dos resultados qualitativos encontrados no AFM, sendo que esta diferença encontra-se relacionada ao AC. Enquanto que no AFM, o AC mostrou-se o mais eficaz, exercendo sua ação total em praticamente 50 s, no ensaio de MD ele mostrou ser o ácido que menos foi capaz de reduzir a MD a partir de 3 minutos de ação.

Assim sendo, temos um conflito de resultados experimentais. O ensaio de MD refere-se a uma medida quantitativa de um parâmetro físico. A AFM nos mostra o que está acontecendo em tempo real com a microestrutura dentinária. Deste modo, uma técnica deveria complementar a outra e não revelar resultados conflitantes. Por isso, podemos crer que algum desvio metodológico, ou mesmo fatores que ainda nos são desconhecidos podem ter afetado os resultados da MD. Acreditamos que seja mais fácil esse possível problema ter ocorrido com o ensaio de MD que com a observação pelo AFM, visto que esta é realizada em tempo real, de uma mesma área de uma mesma amostra. Podemos especular que a MD também pode ser afetada por outros fatores e não somente pelo processo de descalcificação. Estudos futuros são necessários para elucidar a validade dos ensaios de MD para esse tipo de análise.