



Claudia Mendonça Reis

**Aplicação da Microscopia Digital na Quantificação do
Efeito de Quelantes em Dentina**

Dissertação de Mestrado

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Engenharia Metalúrgica e de Materiais pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica do Departamento de Ciência dos Materiais e Metalurgia da PUC-Rio.

Orientador: Sidnei Paciornik

Rio de Janeiro,
agosto de 2006



Claudia Mendonça Reis

**Aplicação da Microscopia Digital na Quantificação do
Efeito de Quelantes em Dentina**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Engenharia Metalúrgica e de Materiais 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

Dr. Marcos Henrique de Pinho Maurício

Departamento de Ciência dos Materiais e Metalurgia - PUC-Rio

Prof. Mauro Sayão de Miranda

Universidade do Estado do Rio de Janeiro - UERJ

Prof. Roberto Ribeiro de Avillez

Departamento de Ciência dos Materiais e Metalurgia - PUC-Rio

Prof. Tauby de Souza Coutinho Filho

Universidade do Estado do Rio de Janeiro - UERJ

Prof. José Eugenio Leal

Coordenador Setorial de Pós-Graduação do Centro Técnico Científico da
PUC-Rio

Rio de Janeiro, 11 de agosto de 2006

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

Claudia Mendonça Reis

Formação: Graduiu-se em Odontologia na UFRJ em 2001. Realizou sua Especialização em Endodontia na UERJ em 2003.

Ficha Catalográfica

Reis, Claudia Mendonça

Aplicação da microscopia digital na quantificação do efeito de quelantes em dentina / Claudia Mendonça Reis ; orientador: Sidnei Paciornik. – Rio de Janeiro : PUC, Departamento de Ciência dos Materiais e Metalurgia, 2006.

145 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Departamento de Ciência dos Materiais e Metalurgia.

Inclui referências bibliográficas.

CDD: 669

Para minha mãe **Moêma**, e meu irmão **Cassio**
pelo apoio e incentivo em todos os momentos.
Sem vocês eu não chegaria até aqui.

Para **Leo**, meu namorado
primeiro incentivador, fã número 1,
presente em todos os momentos que eu
precisei. Fico muito feliz de poder
compartilhar e dividir os sonhos e as
realizações com você.

Agradecimentos

Ao meu orientador, **Sidnei Paciornik**, certamente um dos melhores professores que eu já tive a oportunidade de conhecer. Obrigado por ser um orientador presente em TODOS os momentos e lutar por mim quando foi preciso. Obrigado pela cobrança e incentivo nos momentos certos e por compreender que também existe vida (e outras dificuldades) durante do curso de mestrado. Obrigado por transmitir com muita clareza (e paciência) alguns de seus conhecimentos.

Ao professor, grande incentivador **Gustavo De Deus**. O que poderia ter sido um breve contato professor/aluno durante o curso de especialização, se transformou em amizade. Nunca vou esquecer de todas as portas você abriu, contribuindo em muito para o meu crescimento profissional. Espero que você saiba o quanto sou grata por tudo que já fez e continua fazendo por mim. Pode contar comigo para tentar colocar em prática essas milhões de idéias que borbulham na sua cabeça.

Ao conselho Nacional de Pesquisa – CNPq – pela bolsa concedida durante a realização deste mestrado, o que contribuiu para a viabilização desta dissertação.

Às minhas amigas do DCMM, **Fabiana, Yoanka, Julia, Evelyn e Ana Christina**. Sem vocês nunca conseguiria finalizar as listas intermináveis de termodinâmica, cálculo, processamento... Obrigada por me ensinar, dezenas de vezes, como fazer derivadas e integrais... Obrigada acima de tudo pela paciência. A ajuda e o incentivo foram essenciais.

Aos amigos do DCMM, **Marcos Henrique, prof. Zé Roberto, Otávio, Zé Mauro, Amélia, Fred, Carlos Papani, Fabiana, Yoanka, Julia, Evelyn e Ana Christina**, pela ajuda nos momentos que eu precisei e pela agradável companhia em almoços, festas surpresas, bolos de chocolate e cuzcuz da Evelyn.

Ao Professor **Carlos Achete** por abrir as portas do **INMETRO (Xerém)**. Ao **Jorge Trota** e à **Lídia Sena** pela importante ajuda e boa vontade em todos os momentos na utilização do microscópio eletrônico de varredura ambiental.

Ao mestre **Tauby Coutinho Filho**, pelos ensinamentos, críticas e conselhos tão importantes para o meu crescimento pessoal e profissional.

Aos meus amigos da UERJ, **Karen, Patrícia, Claudia e Jansen**, pelo apoio, fundamental nos momentos finais desse mestrado. À **Fernanda Leal e Érica Azevedo** que auxiliaram os experimentos.

Ao professor **Carlos Augusto Barbosa** e **Paulo Garcia** da UFRJ que desde a graduação direcionaram e incentivaram o meu crescimento profissional.

Aos meus amigos de graduação de **odontologia** da **UFRJ** pelo carinho, amizade e incentivo através dos anos.

À minha amiga **Cristiana Murad** sempre presente em todos os momentos, bons ou ruins. Seus conselhos são sempre muito importantes para mim.

Aos funcionários e professores do **DCMM** que sempre me ajudaram, compreendendo as minhas dificuldades. Obrigada pela paciência.

Ao meu pai, **Ademir**, a minha inspiração. À minha avó, **Nini**, que infelizmente não pôde acompanhar, até o fim, essa conquista. Sei que vocês continuam torcendo por mim. À toda minha família pelo apoio por todos esses anos.

A todos os amigos e pessoas que contribuíram de alguma forma para esse trabalho.

Resumo

Reis, Claudia Mendonça. **Aplicação da Microscopia Digital na quantificação do efeito de quelantes em dentina**. Rio de Janeiro, 2006, 145p. Dissertação de Mestrado – Departamento de Ciência dos Materiais e Metalurgia, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

Após instrumentação do canal radicular, uma camada de material orgânico/inorgânico é formada sobre a dentina. Não existe um consenso sobre o método ideal para a remoção deste *smear layer* e exposição dos túbulos dentinários, necessários à adaptação da obturação ao canal radicular. Geralmente, soluções quelantes são utilizadas com essa finalidade, mas a substância e o tempo ideais permanecem desconhecidos. Nesse estudo, foi analisado o poder quelante de EDTA, EDTAC e ácido cítrico (AC) 1%, 5% e 10% sobre dentina radicular. Através de microscopia óptica co-localizada foram capturadas imagens de vários campos de cada amostra, em 5 diferentes tempos de ataque ácido (15 a 300 s). Uma sequência de processamento e análise de imagens foi utilizada para medir dezenas de imagens, obtendo dados relativos à fração de área ocupada e de tamanho de milhares de túbulos ao longo do tempo. Assim, foi possível acompanhar a evolução do processo e quantificar o efeito das substâncias. As soluções de AC apresentaram maior poder quelante. EDTA e AC 1% apresentaram efeitos similares após 300 s. O EDTAC teve o menor efeito. Experimentos análogos com microscopia eletrônica de varredura ambiental forneceram resultados similares, com maior informação sobre a rugosidade da superfície dentinária. AC 10% causou erosão severa após 60 s.

Palavras-chave

Quelantes; microestrutura dentinária; *smear layer*; microscopia óptica co-localizada; análise de imagens; microscopia eletrônica ambiental.

Abstract

Reis, Claudia Mendonça. **Digital Microscopy Applied to the Quantification of the Effect of Chelators on Dentine**. Rio de Janeiro, 2006, 145p. Masters Dissertation – Department of Materials Science and Metallurgy, Pontifical Catholic University of Rio de Janeiro.

Instrumentation methods currently used in endodontic therapy create a residual layer composed of organic and inorganic material. There is no universal consensus regarding the ideal method for removing this smear layer and exposing the dentinary tubules, necessary for the adaptation of root canal filling. In general, chelating solutions are used but the ideal solution and application time remain unknown. In the present study the chelating power of EDTA, EDTAC and 1, 5 and 10% citric acid (CA) on radicular dentine was analyzed. Co-site digital optical microscopy was used to capture images of several fields of each sample after acid etching for 5 experimental times (15–300 s). An image processing and analysis sequence measured tens of images, providing data of area fraction and size for thousands of tubules over time. Thus, it was possible to follow the phenomenon and quantitatively analyze the effect of the various substances. The CA solutions showed the greatest chelating power. EDTA and CA 1% showed similar effect after 300 s. EDTAC was the least effective. Equivalent experiments employing Environmental Scanning Electron Microscopy provided similar results, complemented by a better view of dentine surface roughness. CA 10% caused severe erosion of the surface after 60 s.

Keywords

Chelators; dentinary microstructure; smear layer; co-site optical microscopy; image analysis; environmental scanning electron microscopy.

Sumário

1	Introdução	16
2	Revisão bibliográfica	23
2.1	<i>Smear layer</i>	23
2.1.1	Remoção do <i>smear layer</i>	24
2.1.2	Métodos para Remoção do <i>Smear layer</i>	27
2.2	Substâncias Quelantes	28
2.2.1	EDTA	30
2.2.2	EDTA e suas Associações	36
2.2.3	Ácido Cítrico	41
2.2.4	Outras Substâncias	44
2.3	Resumo da Revisão de Literatura	47
3	Objetivos	49
4	Materiais e Métodos	50
4.1	Seleção dos dentes	50
4.2	Preparação das amostras	50
4.3	Divisão das amostras	51
4.4	Microscopia Óptica Digital Co-Localizada	52
4.5	Processamento e Análise Digital de Imagens (PADI)	56
4.6	Análise Estatística	59
4.7	Microscopia Eletrônica de Varredura Ambiental	61
5	Resultados e Discussão	63
5.1	Grupo 1 - EDTA	64
5.1.1	Microscopia Óptica Co-localizada	64
5.1.2	Resultados gráficos e estatísticos	68
5.2	Grupo 2 - EDTAC	76
5.2.1	Microscopia Óptica Co-localizada	76
5.2.2	Resultados gráficos e estatísticos	80

5.3	Grupo 3 - AC 10%	86
5.3.1	Microscopia Óptica Co-localizada	86
5.3.2	Resultados gráficos e estatísticos	89
5.4	Grupo 4 - AC 5%	95
5.4.1	Microscopia Óptica Digital Co-localizada	95
5.4.2	Resultados gráficos e estatísticos	99
5.5	Grupo 5 - AC 1%	103
5.5.1	Microscopia Óptica Digital Co-localizada	103
5.5.2	Resultados gráficos e estatísticos	107
5.6	Análise Quantitativa entre os Grupos Experimentais	111
5.7	Microscopia Eletrônica de Varredura Ambiental	117
5.8	Modelo Experimental	123
6	Conclusões	126
7	Apêndice I	128
7.1	Aprovação do Comitê de Ética	128
8	Apêndice II	129
8.1	Macro Desenvolvida (linguagem proprietária do KS400)	129
9	Referências Bibliográficas	132

Lista de figuras

Figura 1: Imagens de dentina humana através de microscopia eletrônica de varredura. A) túbulos dentinários; B) túbulos dentinários cobertos pelo <i>smear layer</i> .	16
Figura 2: Sequência típica de imagens obtidas pelo AFM	29
Figura 3: Estrutura química do EDTA e mecanismo de ligação com o íon cálcio.	31
Figura 4 Ilustração do corte das amostras embutidas em resina epóxi com exposição da dentina do terço cervical das raízes.	51
Figura 5: Laboratório de Microscopia Digital (DCMM PUC-Rio)	53
Figura 6: Ilustração do recipiente utilizado para o ataque ácido sem remover a amostra do microscópio.	53
Figura 7: Desenho esquemático ilustrando a região de análise da amostra de dentina (amarelo) e os campos capturados automaticamente pelo sistema (vermelho).	54
Figura 8: Coleção de imagens capturadas da AM2 após 300 segundos de aplicação do AC1%.	55
Figura 9: Sequência de PADI: a) imagem inicial; b) pré-processamento - correção de contraste e iluminação; c) segmentação – imagem binária discriminando túbulos dentinários expostos; d) pós-processamento – delimitação de fronteiras entre túbulos; e) resultado final – túbulos detectados marcados em azul; f) ampliação da região demarcada na figura e.	58
Figura 10: Fluxograma ilustrativo do espaço de parâmetros envolvidos no experimento para a análise estatística.	60
Figura 11: MEVA - FEI Quanta 200.	61
Figura 12: Recipiente com as 5 amostras inseridas para o experimento no MEVA.	62
Figura 13: EDTA - Imagens de um campo representativo da AM1, capturadas após os respectivos tempos de ataque.	65
Figura 14: EDTA - Imagens de um campo representativo da AM2, capturadas após os respectivos tempos de ataque.	66
Figura 15: EDTA - Imagens de um campo representativo da AM3, capturadas	

- após os respectivos tempos de ataque. 67
- Figura 16: EDTA - Evolução dos parâmetros de *campo*: I) Fração de Área Tubular (%); II) Número de Túbulos. Para cada parâmetro temos: A) médias de cada amostra através do tempo; B) média e desvio padrão de todas as amostras através do tempo. 69
- Figura 17: EDTA - Evolução dos parâmetros de *região*: I) Menor Diâmetro Tubular (μm); II) Área Tubular (μm^2). Para cada parâmetro temos: A) médias de cada amostra através do tempo; B) média e desvio padrão de todas as amostras através do tempo. 70
- Figura 18: Região ampliada das imagens originais e após PADI demonstrando criação e correção de falsas fronteiras. **A e B (60 s)**: seta azul (impureza no interior do túbulo); setas verdes (dentina peritubular). **C e D (180 s)**: setas amarelas indicam os túbulos que apresentavam fronteiras falsas, agora corretamente segmentados. 72
- Figura 19: EDTAC - Imagens de um campo representativo da AM1, capturadas após os respectivos tempos de ataque. 77
- Figura 20: EDTAC - Imagens de um campo representativo da AM2, capturadas após os respectivos tempos de ataque. 78
- Figura 21: EDTAC - Imagens de um campo representativo da AM3, capturadas após os respectivos tempos de ataque. 79
- Figura 22: EDTAC - Evolução dos parâmetros de *campo*: I) Fração de Área Tubular (%); II) Número de Túbulos. Para cada parâmetro temos: A) médias de cada amostra através do tempo; B) média e desvio padrão de todas as amostras através do tempo. 81
- Figura 23: EDTAC - Evolução dos parâmetros de *região*: I) Menor Diâmetro Tubular (μm); II) Área Tubular (μm^2). Para cada parâmetro temos: A) médias de cada amostra através do tempo; B) média e desvio padrão de todas as amostras através do tempo. 82
- Figura 24: Presença de dentina peritubular (setas vermelhas) e resquícios do *smear layer* (setas azuis) após 300 s. 84
- Figura 25: Imagem sem nitidez após 60 s. 86
- Figura 26: AC10% - Imagens de um campo da AM1, capturadas após os respectivos tempos de ataque. 87
- Figura 27: AC10% - Imagens de um campo da AM2, capturadas após respectivos tempos de ataque. 88

- Figura 28: AC10% - Imagens de um campo da AM3, capturadas após respectivos tempos de ataque. 88
- Figura 29: AC10% - Evolução dos parâmetros de *campo*: I) Fração de Área Tubular (%); II) Número de Túbulos. Para cada parâmetro temos: A) médias de cada amostra através do tempo; B) média e desvio padrão de todas as amostras através do tempo. 90
- Figura 30: AC10% - Evolução dos parâmetros de *região*: I) Menor Diâmetro Tubular (μm); II) Área Tubular (μm^2). Para cada parâmetro temos: A) médias de cada amostra através do tempo; B) média e desvio padrão de todas as amostras através do tempo. 91
- Figura 31: AC 10% - Histogramas dos parâmetros de Região 93
- Figura 32: Túbulos pequenos expostos (setas azuis) com AC 10% após 30 s. 94
- Figura 33: AC 5% - Imagens de um campo representativo da AM1 capturadas após os respectivos tempos de ataque. 96
- Figura 34: AC 5% - Imagens de um campo representativo da AM2, capturadas após os respectivos tempos de ataque. 97
- Figura 35: AC 5% - Imagens de um campo representativo da AM3, capturadas após os respectivos tempos de ataque. 98
- Figura 36: AC 5% - Evolução dos parâmetros de *campo*: I) Fração de Área Tubular (%); II) Número de Túbulos. Para cada parâmetro temos: A) médias de cada amostra através do tempo; B) média e desvio padrão de todas as amostras através do tempo. 100
- Figura 37: AC 5% - Evolução dos parâmetros de *região*: I) Menor Diâmetro Tubular (μm); II) Área Tubular (μm^2). Para cada parâmetro temos: A) médias de cada amostra através do tempo; B) média e desvio padrão de todas as amostras através do tempo. 101
- Figura 38: AC 1% - Imagens de um campo representativo da AM1 capturadas após os respectivos tempos de ataque. 104
- Figura 39: AC 1% - Imagens de um campo representativo da AM2 capturadas após os respectivos tempos de ataque. 105
- Figura 40: AC 1% - Imagens de um campo representativo da AM3 capturadas após os respectivos tempos de ataque. 106
- Figura 41: AC 1% - Evolução dos parâmetros de *campo*: I) Fração de Área Tubular (%); II) Número de Túbulos. Para cada parâmetro temos: A) médias de cada amostra através do tempo; B) média e desvio padrão de todas as

amostras através do tempo. 108

Figura 42: AC 1% - Evolução dos parâmetros de *região*: I) Menor Diâmetro Tubular (μm); II) Área Tubular (μm^2). Para cada parâmetro temos: A) médias de cada amostra através do tempo; B) média e desvio padrão de todas as amostras através do tempo. 109

Figura 43: Evolução da *fração de área tubular* através do tempo em todas as soluções. 112

Figura 44: Evolução do *menor diâmetro tubular* através do tempo em todas as soluções. 112

Figura 45: Exemplo de uma imagem em $t = 0$ s do MEVA. 117

Figura 46: Imagens de MEVA (1000X e 2000X) após 180 s de ataque ácido. **EDTA** (A e B); **EDTAC** (C e D). 119

Figura 47: Imagens de MEVA (1000X e 2000X) após 180 s de ataque ácido. **AC 1%** (A e B); **AC 5%** (C e D); **AC 10%** (E e F). 120

Lista de tabelas

Tabela 1: Associações do EDTA (Hülsmann <i>et al.</i> , 2003)	38
Tabela 2 – Grupos experimentais com as respectivas soluções quelantes, princípios ativos, pH's e fabricante.	52
Tabela 3: Valores médios de EDTA após tempos experimentais.	68
Tabela 4: Comparação estatística entre os tempos experimentais (t-test, $p < 0,05$).	71
Tabela 5: Valores médios de EDTAC após tempos experimentais.	80
Tabela 6: Comparação estatística entre os tempos experimentais (t-test, $p < 0,05$).	83
Tabela 7: Valores médios de AC 10% após tempos experimentais	89
Tabela 8: Comparação estatística entre os tempos experimentais (t-test, $p < 0,05$).	92
Tabela 9: Valores médios de AC 5% após tempos experimentais.	99
Tabela 10: Comparação estatística entre os tempos experimentais (t-test, $p < 0,05$).	102
Tabela 11: Valores médios de AC 1% após tempos experimentais.	107
Tabela 12: Comparação estatística entre os tempos experimentais (t-test, $p < 0,05$).	110
Tabela 13: <i>Fração de área tubular</i> - Comparação estatística entre as soluções (grupos) em cada tempo experimental (t-test, $p < 0,05$).	113
Tabela 14: <i>Menor diâmetro tubular</i> - Comparação estatística entre as soluções (grupos) em cada tempo experimental (t-test, $p < 0,05$).	114