

4 Materiais e Métodos

4.1 Seleção dos dentes

Vinte molares humanos extraídos, apresentando ápices radiculares intactos, ausência de cáries e com tamanho, comprimento e diâmetro semelhantes, foram obtidos do estoque do banco de dentes da Disciplina de Endodontia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Esses dentes selecionados foram limpos utilizando cureta periodontal, pontas ultra-sônicas e através de 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%, refrigerados a 9°C e, antes do experimento, foram lavados em água corrente por 24hs, para eliminação de qualquer traço de timol remanescente.

4.2 Preparação das amostras

Os dentes selecionados foram individualmente embutidos em resina epóxi (Arazyn 1.0 – Ara Química, SP, Brasil), utilizando moldes de silicone, com o objetivo de melhorar e facilitar todo o processo de preparação das amostras. Cada dente foi seccionado transversalmente com auxílio de um disco de diamante (KG Sorensen, Zenith Dental ApS, Agerskov, Dinamarca) removendo suas coroas na altura da junção cimento-esmalte, expondo a superfície dentinária do terço cervical das raízes. Esse processo encontra-se ilustrado na Figura 4.

A superfície de dentina radicular de cada amostra foi então cuidadosamente preparada, com o auxílio de uma politriz (Prazis – PL – São Paulo, SP, Brasil), utilizando lixas de carbetto de silício #220, #320, #400, #600 e #1200 (Norton, São Paulo, Brasil) e, em seguida, pano de feltro e pastas de diamante de 3 µm e de 1 µm. O objetivo dessa preparação metalográfica foi obter uma superfície plana, lisa, sem arranhões ou deformações e produzir o *smear layer*. Apesar desse procedimento criar um *smear layer* padronizado na superfície dentinária a ser analisada, essa camada apresenta estrutura diferente daquela produzida durante a instrumentação do canal radicular.

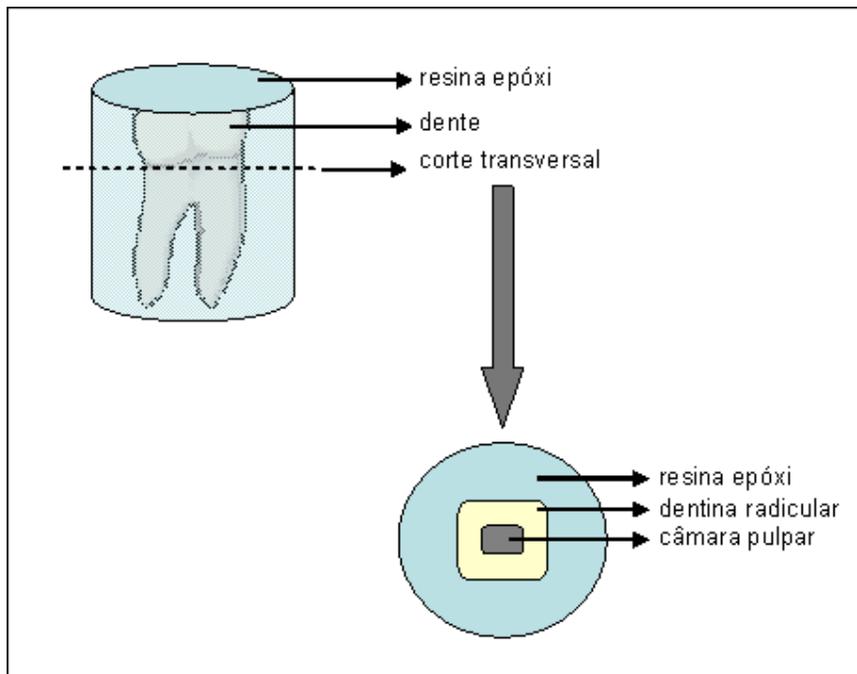


Figura 4 Ilustração do corte das amostras embutidas em resina epóxi com exposição da dentina do terço cervical das raízes.

4.3 Divisão das amostras

O ataque ácido da dentina humana foi realizado com 3 diferentes substâncias quelantes comumente utilizadas na endodontia: o ácido etileno-diamino-tetracético (EDTA), o EDTAC (associação do EDTA com o detergente Cetavlon[®]) e o ácido cítrico (AC) em três concentrações (1%, 5% e 10%). Depois de preparadas, as amostras foram divididas aleatoriamente em 5 grupos. O critério de uso das substâncias quelantes acompanhou os seguintes parâmetros, onde “n” corresponde ao número de amostras em cada grupo:

- Grupo 1: Solução de EDTA (n=4)
- Grupo 2: Solução de EDTAC (n=4)
- Grupo 3: Solução de AC 10% (n=4)
- Grupo 4: Solução de AC 5% (n=4)
- Grupo 5: Solução de AC 1% (n=4)

A Tabela 2 lista os grupos experimentais com as respectivas soluções quelantes e seus princípios ativos. Os valores das respectivas concentrações e dos pH's foram fornecidos pelo fabricante.

Tabela 2 – Grupos experimentais com as respectivas soluções quelantes, princípios ativos, pH's e fabricante.

Grupo	Quelante	Princípio Ativo, Concentração e pH	Fabricante
1	EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético 17% (pH=7,5)	<i>Fórmula & Ação Laboratório Farmacêutico</i>
2	EDTAC	Ácido etilenodiamino tetracético 17% (pH=7,5) + brometo de hexadeciltrimetamônio (Cetavlon®)	
3	AC 10%	Ácido Cítrico Anidro 1% (pH=1,8)	
4	AC 5%	Ácido Cítrico Anidro 5% (pH=2,0)	
5	AC 1%	Ácido Cítrico Anidro 10% (pH=2,3)	

Nesse estudo, 3 amostras de cada grupo foram analisadas através de microscopia óptica digital co-localizada (n=3). Uma complementação do estudo foi realizada através da observação de 1 amostra de cada grupo em um Microscópio Eletrônico de Varredura Ambiental (n=1). Como esse tipo de microscopia permite a observação de amostras biológicas sem metalização, a preparação metalográfica das amostras foi idêntica nas duas técnicas de microscopia utilizadas.

4.4 Microscopia Óptica Digital Co-Localizada

Os experimentos foram realizados em um microscópio óptico motorizado Axioplan 2 Imaging (Carl Zeiss, Hallbergmoos, Germany). Uma lente objetiva Epiplan 100X HD (Carl Zeiss) foi utilizada acoplada a uma câmera digital (Axiocam HR, Carl Zeiss Vision) de 1300 x 1030 pixels, resultando em uma magnificação total de aproximadamente 1000X, e uma resolução de 0,1 μm /pixel.



Figura 5: Laboratório de Microscopia Digital (DCMM PUC-Rio)

Uma amostra de dentina foi inserida em um recipiente desenvolvido para permitir a aplicação das soluções quelantes, sem necessidade de remover a amostra do microscópio (Figura 6).

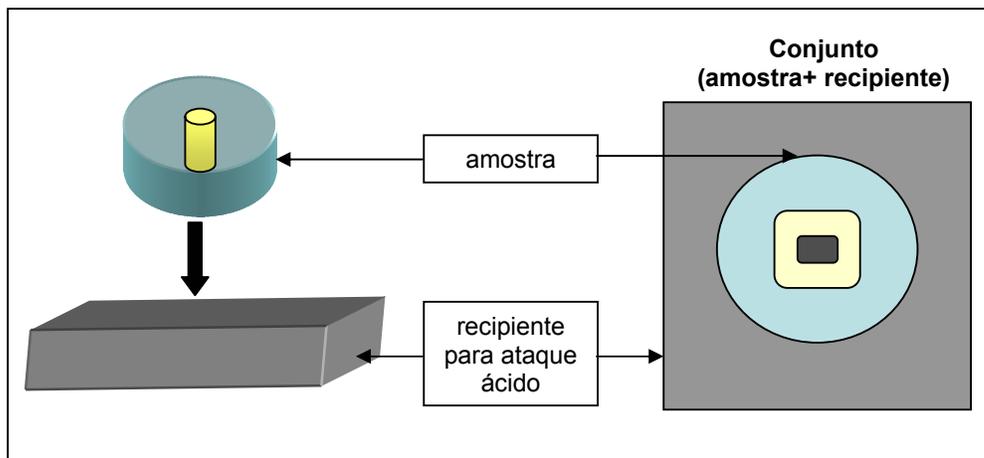


Figura 6: Ilustração do recipiente utilizado para o ataque ácido sem remover a amostra do microscópio.

O conjunto foi posicionado no estágio motorizado do microscópio, o que permitiu a realização da seguinte seqüência, controlada por uma rotina especial implementada no software Axiovision (Version 4.5, Carl Zeiss):

a) Uma amostra de referência de dentina (tempo = 0 s) coberta com *smear layer* e inserida no recipiente, foi posicionada no microscópio e colocada em foco. Um procedimento de automação interativo permitiu ao operador selecionar uma área de interesse na amostra e ao sistema capturar automaticamente uma coleção de aproximadamente 15 imagens de campos, em diferentes posições dos eixos x-y, cobrindo toda a região (Figura 7).

b) O eixo motorizado z do microscópio foi utilizado para abaixar o conjunto para uma posição de segurança, longe das lentes objetivas, minimizando o risco de dano aos componentes do microscópio.

c) 0,5 ml da solução quelante selecionada foi aplicada, com auxílio de uma pipeta, e permaneceu em contato com a superfície da amostra por **15 s** quando o processo foi interrompido com 5 ml de água destilada. A amostra foi seca com jatos de ar e, através do eixo motorizado z, retornou automaticamente para o foco.

d) Os mesmos campos capturados no passo (a) foram novamente capturados, com reprodutibilidade das posições x-y e autofocus, permitindo a observação do efeito desmineralizante através de toda a região de análise.

e) Para cada campo, uma rotina de análise de imagens discriminou automaticamente os túbulos dentinários abertos e mediu diversos parâmetros de forma e tamanho, permitindo assim a quantificação do processo de desmineralização (detalhes na seção seguinte).

f) Os passos (b) até (e) foram repetidos para diversos tempos cumulativos de desmineralização (**30, 60, 180 e 300 s**) revelando a completa evolução através do tempo, do efeito da solução quelante na superfície dentinária (Figura 8).

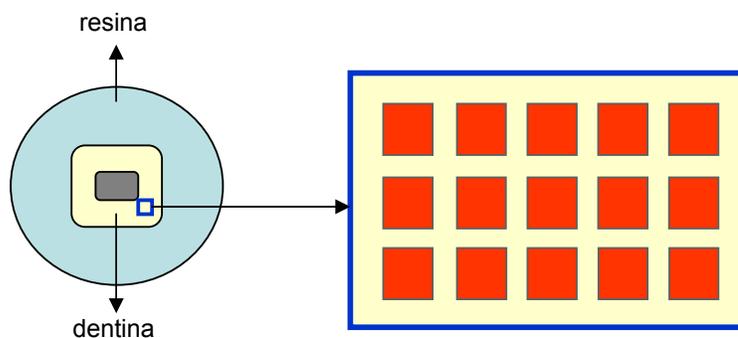


Figura 7: Desenho esquemático ilustrando a região de análise da amostra de dentina (amarelo) e os campos capturados automaticamente pelo sistema (vermelho).

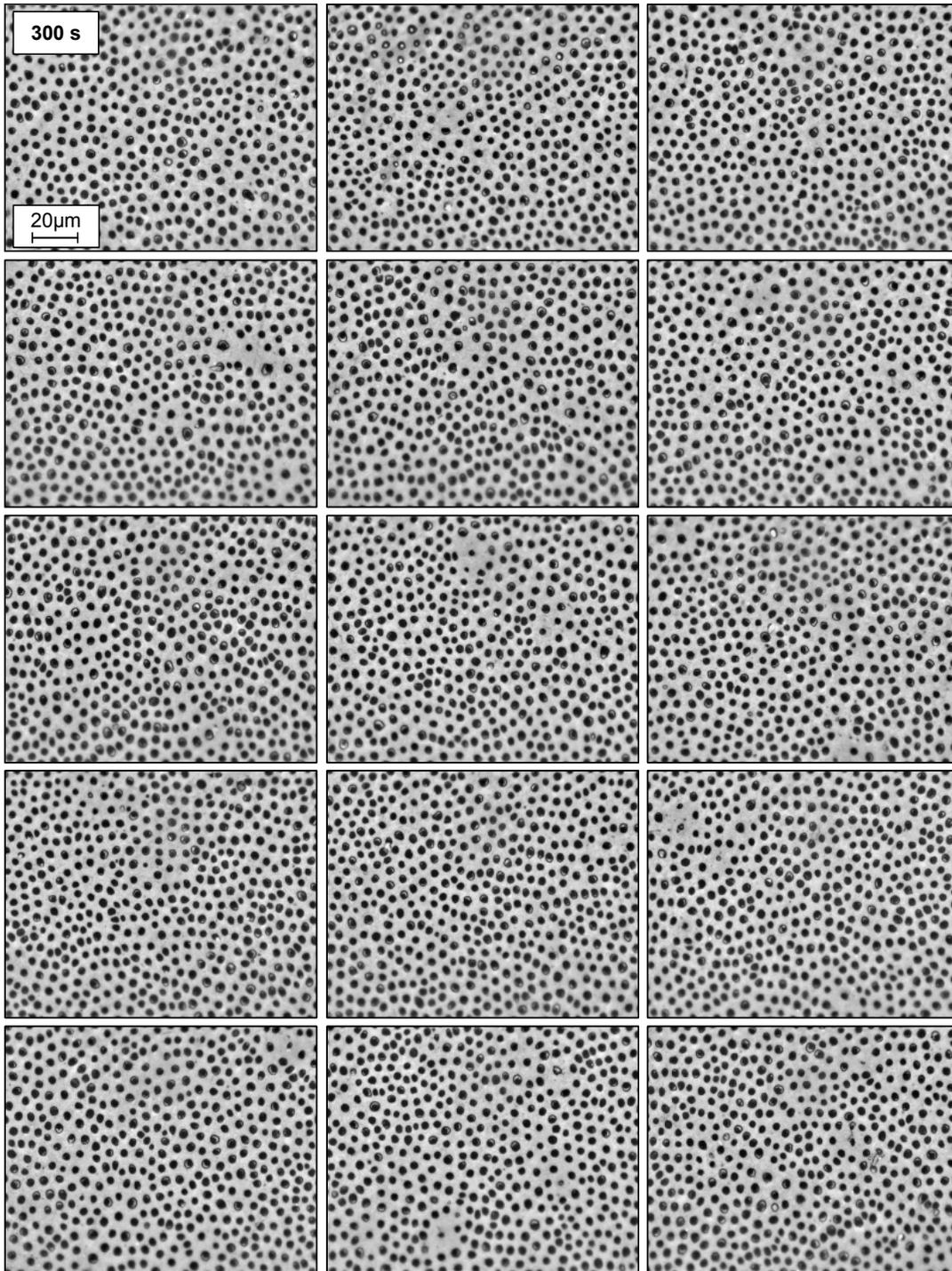


Figura 8: Coleção de imagens capturadas da AM2 após 300 segundos de aplicação do AC1%.

4.5 Processamento e Análise Digital de Imagens (PADI)

As imagens iniciais, apresentando os orifícios dos túbulos dentinários cobertos com o *smear layer* padronizado, não foram analisadas e serviram para demonstrar a formação dessa camada com o procedimento utilizado. A seqüência típica de processamento e análise de imagem envolve as etapas de *pré-processamento*, *segmentação*, *pós-processamento* e *extração de atributos* (Paciornik *et al.* 2003), e encontra-se sintetizada na Figura 9. Todas as etapas foram implementadas em uma rotina macro no software KS400 (versão 3.0, Carl Zeiss).

A etapa de *pré-processamento* envolve operações que visam a correção de defeitos básicos da aquisição de imagem, como iluminação irregular, contraste insuficiente, ruído etc. No presente experimento, foi necessária a aplicação de um procedimento bem conhecido de correção, baseado na utilização de filtro passa-alta (Russ, 1992) para corrigir a iluminação irregular, seguida por uma expansão de contraste padrão (Paciornik & Mauricio, 2004). A imagem original pode ser observada na Figura 9a e o resultado do *pré-processamento* na Figura 9b.

A etapa de *segmentação* visa discriminar os objetos desejados do fundo. Diversos métodos de segmentação são descritos na literatura (Cocquerez & Philipp, 1995), mas não existe uma regra geral que determine o melhor método para uma certa coleção de imagens. No presente experimento, como o contraste entre os túbulos e a dentina é bom (exceto para as imagens $t = 0$ s, com o *smear layer* padronizado), a segmentação foi realizada com o método automático de Otsu (Otsu, 1979), que não requer nenhum parâmetro definido pelo operador. A Figura 9c demonstra um resultado típico da etapa de segmentação. Nessa imagem binária os túbulos aparecem como objetos brancos em um fundo preto.

O *pós-processamento* dessas imagens binárias foi necessário para tratar alguns artefatos típicos da etapa de segmentação. Inicialmente, regiões brancas muito pequenas, que não correspondem realmente a túbulos, foram descartadas. Outro problema foi a união de túbulos vizinhos, um efeito que aumenta conforme a evolução do processo de desmineralização. Isso pode levar a uma medição incorreta de número de túbulos, tamanho e forma. A correção requer a utilização de um operador morfológico divisor de águas bem conhecido que localiza as fronteiras entre os objetos que se tocam (Beucher, 1992). Esse método requer

etapas prévias para evitar a criação de falsas fronteiras (Russ, 1992). Primeiramente, o comando *close* realiza uma expansão dos pixels brancos em forma e extensão pré-determinados, criando túbulos com contornos mais uniformes. Em seguida, os espaços vazios (preto) dentro dos túbulos são preenchidos pelo comando *fill*. Depois desses passos, as fronteiras são criadas, e a combinação dessa imagem com a imagem original segmentada, é realizada. Assim, é possível observar na Figura 9d a imagem gráfica das fronteiras dos túbulos corretamente detectadas caso eles se encostassem.

O resultado final está ilustrado na Figura 9e, onde os orifícios dos túbulos expostos estão mostrados em cor, sobreposta na imagem em tons de cinza. A região demarcada é mostrada em alta magnificação na Figura 9f. A seqüência empregada foi robusta e confiável e foi aplicada sem alterações para a grande maioria das imagens capturadas para as diferentes amostras.

Uma vez que as imagens tenham sido corretamente segmentadas e pós-processadas para a discriminação de túbulos com seus verdadeiros números, tamanho e forma, segue-se para etapa de *extração de atributos*, na qual diversos parâmetros microestruturais são medidos.

Parâmetros de campo se referem a cada imagem como um todo. Para esse tipo de análise, dois parâmetros foram medidos. O *número de túbulos* representa a quantidade de túbulos detectados em cada campo. A *fração de área tubular (%)* se refere ao percentual da área de cada campo ocupada pelos túbulos dentinários.

Parâmetros de região se referem aos dados de cada túbulo, individualmente, em cada imagem. O *diâmetro tubular mínimo* (μm) pode ser usado como uma estimativa razoável para o diâmetro tubular, já que ele não é afetado pela inclinação do túbulo em relação à superfície dentinária. A *área tubular* (μm^2) é uma caracterização básica do tamanho do túbulo, facilmente medida digitalmente contando o número de pixels em cada objeto, mas é afetada pela inclinação dos túbulos.

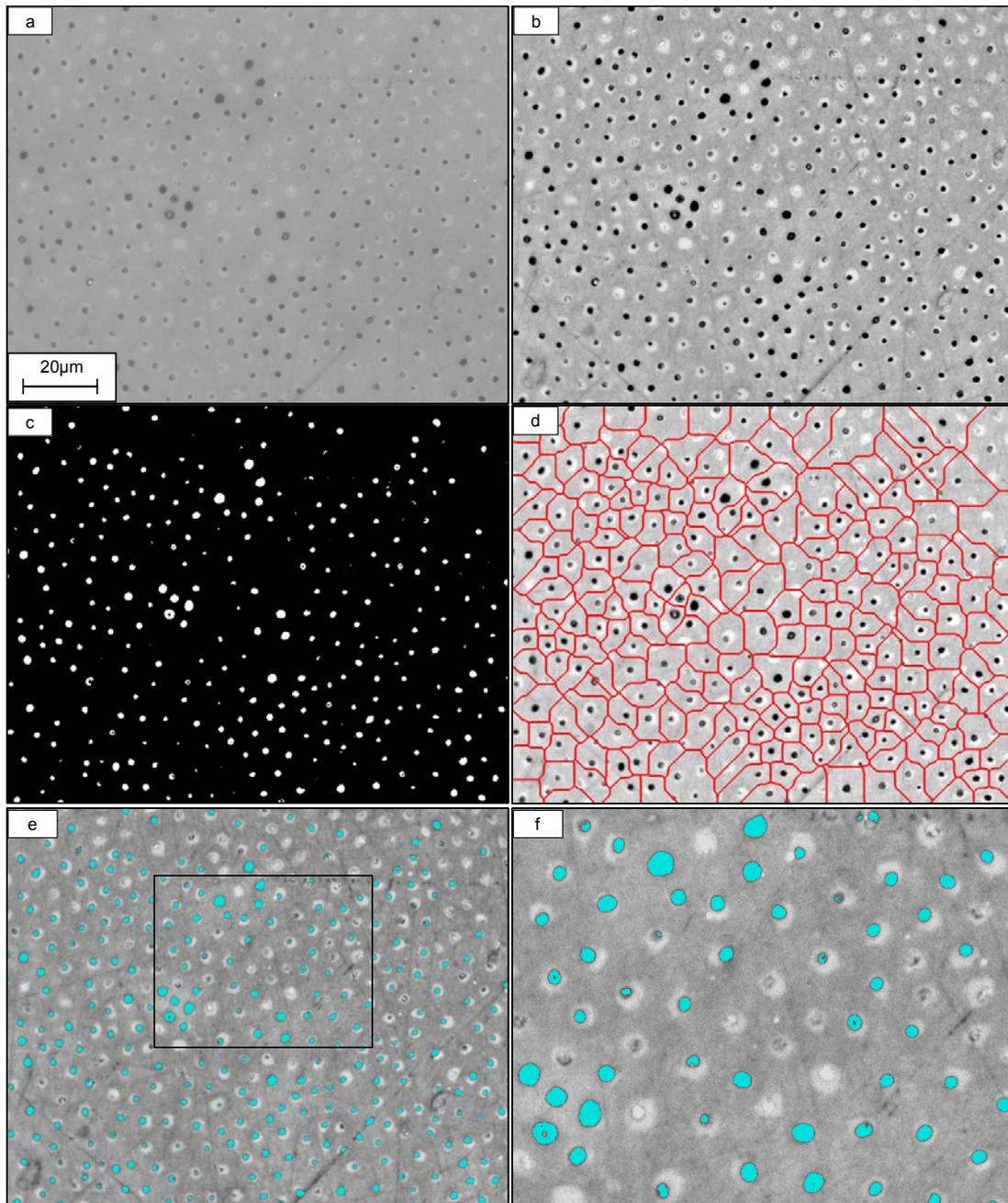


Figura 9: Seqüência de PADI: a) imagem inicial; b) pré-processamento - correção de contraste e iluminação; c) segmentação – imagem binária discriminando túbulos dentinários expostos; d) pós-processamento – delimitação de fronteiras entre túbulos; e) resultado final – túbulos detectados marcados em azul; f) ampliação da região demarcada na figura e.

4.6 Análise Estatística

A Figura 10 demonstra o espaço de parâmetros para análise desse experimento. Em cada grupo (solução quelante) foram utilizadas 3 amostras (AM1, AM2 e AM3). Em cada amostra foram realizados 5 tempos de ataque ácido (15 s, 30s , 60 s, 180 s e 300 s). Para cada tempo de ataque, imagens de aproximadamente 15 campos foram capturadas. De cada campo foram medidos 2 parâmetros (*fração de área tubular e número de túbulos*). Além disso, cada campo apresenta aproximadamente 400 túbulos, o que representa uma amostragem total de quase 20.000 túbulos por tempo de ataque para as 3 amostras. De cada túbulo também são medidos 2 parâmetros (*menor diâmetro tubular e área tubular*).

Dada a diversidade de parâmetros, diferentes enfoques estatísticos podem ser utilizados. Para cada ácido, em cada tempo, a resposta de uma dada amostra é avaliada a partir de parâmetros de campo e de região. Assim, para obter a resposta média de uma amostra, optou-se por realizar médias dos parâmetros medidos, da seguinte maneira:

- Parâmetros de campo: média dos resultados de cada um dos 15 campos ($n=15$).
- Parâmetros de região: média dos resultados de todos os túbulos de todos os campos ($n \approx 6000$).

No entanto, se o objetivo é obter uma resposta de cada ácido que possa apontar para uma aplicação clínica, a resposta de uma dada amostra não seria representativa, razão pela qual utilizou-se 3 amostras distintas. Neste caso, o valor mais representativo de um dado ácido, para um dado tempo, deve ser obtido a partir de uma média dos resultados das 3 amostras. Esta média pode ser obtida como a “média das médias” de cada amostra ou como a média de todos os resultados concatenados das 3 amostras. Neste último caso, cada amostra perde sua individualidade mas o resultado final deve ser mais próximo do de uma “dentina média”, servindo como um indicativo mais geral para a aplicação clínica.

Assim, optou-se por apresentar, além dos resultados médios por amostra listados acima, o resultado médio das 3 amostras com a seguinte estatística:

- Parâmetros de campo: média dos resultados de todos os campos das 3 amostras ($n = 3*15 = 45$ campos).

- Parâmetros de região: média dos resultados de todos os túbulos de todos os campos das 3 amostras ($n \approx 6000 \cdot 3 = 18000$ túbulos)

O dados obtidos com o PADI, foram submetidos à análise estatística com o *test-t* de Student de duas populações independentes, e o índice de significância foi fixado em $p < 0,05$. O software Origin 6.0 (Microcal Software, Inc., Northampton, MA, USA) também foi utilizado como ferramenta para análise dos dados.

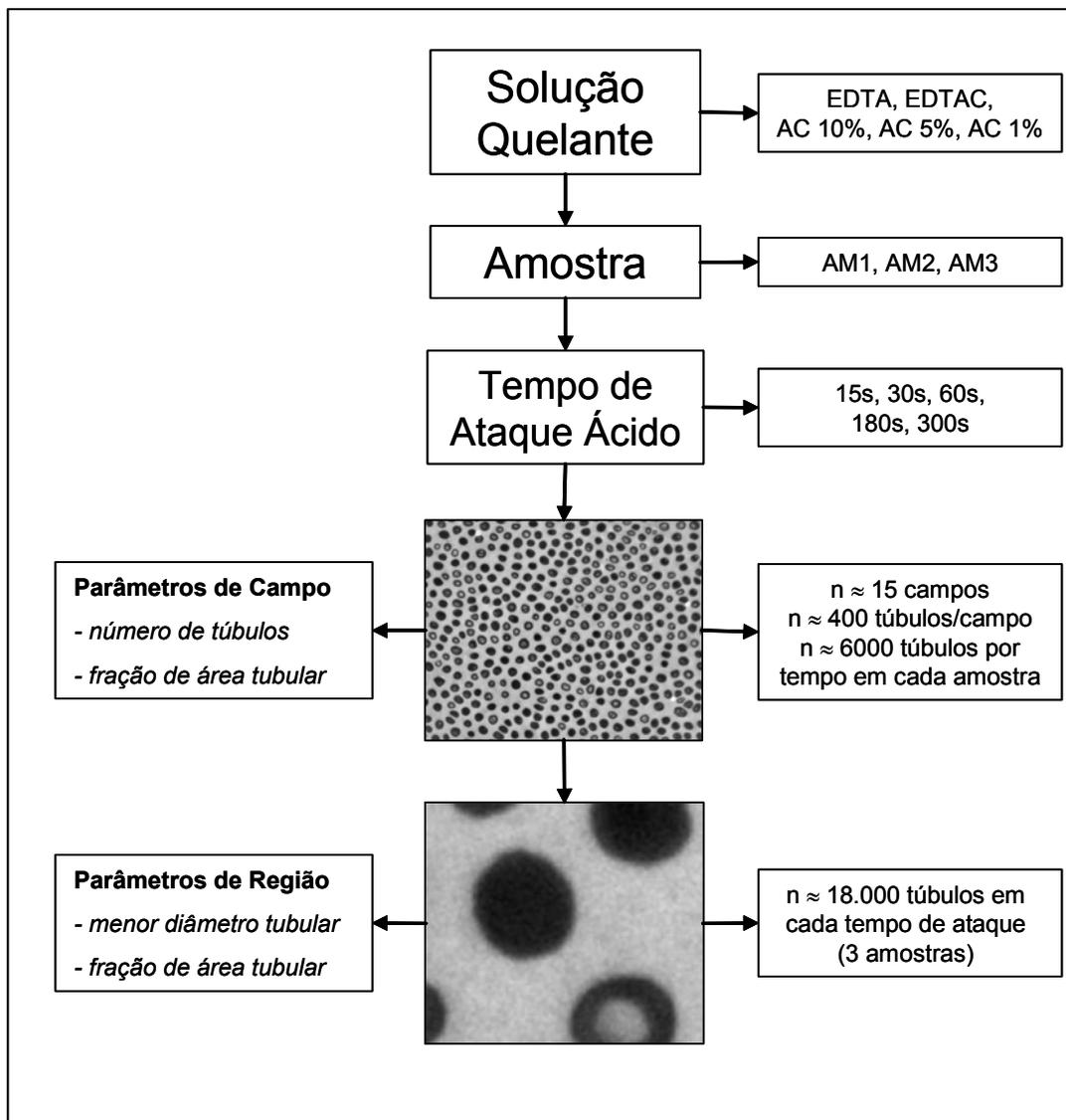


Figura 10: Fluxograma ilustrativo do espaço de parâmetros envolvidos no experimento para a análise estatística.

As análises estatísticas foram separadas da seguinte forma:

- a) em cada grupo: análise dos parâmetros medidos entre os diferentes tempos de ataque (15, 30, 60, 180 e 300 s);
- b) entre grupos: análise entre as diferentes soluções em cada tempo de ataque.

4.7 Microscopia Eletrônica de Varredura Ambiental

Os experimentos foram realizados em um Microscópio Eletrônico de Varredura Ambiental (MEVA) FEI Quanta 200 (FEI CompanyTM, Oregon, USA) (Figura 11). A observação das amostras foi realizada em baixo vácuo (120 Pa) utilizando o modo de elétrons secundários para a captura das imagens. Foram utilizadas magnificações de 1000X com uma resolução de 0,062 $\mu\text{m}/\text{pixel}$ e 2000X com uma resolução de 0,031 $\mu\text{m}/\text{pixel}$.

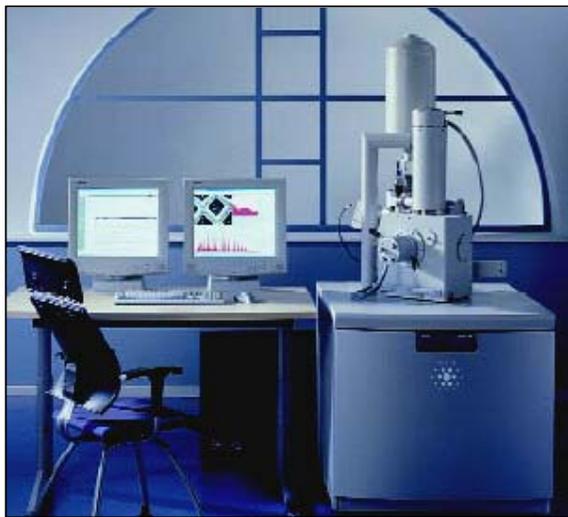


Figura 11: MEVA - FEI Quanta 200.

O mesmo recipiente utilizado para inserção da amostra no microscópio óptico, foi aproveitado para a microscopia eletrônica de varredura, permitindo a aplicação das soluções quelantes, sem necessidade de remover a amostra do microscópio. Cinco amostras, 1 de cada grupo, foram inseridas nesse dispositivo (Figura 12). A seguinte seqüência será explicada para uma amostra, mas os procedimentos realizados foram aplicados igualmente para as 5 amostras:

a) A amostra foi inserida no recipiente, e esse conjunto foi posicionado no microscópio. A câmara foi fechada para proceder então a realização de vácuo. Um procedimento de automação interativo permitiu ao operador selecionar uma área de interesse e capturar uma imagem de referência (tempo = 0 s) coberta com *smear layer* em uma determinada posição nos eixos x-y-z.

b) O eixo motorizado do microscópio foi utilizado para retornar o conjunto à posição inicial. O vácuo foi desfeito e a câmara aberta para a realização do ataque ácido das amostras.

c) 0,5 ml da solução quelante foi aplicado na amostra com auxílio de uma pipeta. A solução permaneceu em contato com a superfície da amostra por um determinado tempo, após o qual o processo foi interrompido com 5 ml de água destilada e as amostras secas com jatos de ar. A câmara do microscópio foi fechada e o vácuo foi novamente realizado.

d) Em um procedimento automático, o estágio motorizado retornava à mesma posição da etapa (a) e a imagem do mesmo campo foi novamente capturada. A reprodutibilidade da posição não foi perfeita, mas permitiu a observação do efeito desmineralizante em uma região próxima à inicial.

e) Os passos (b) até (d) foram repetidos para diversos tempos cumulativos de desmineralização (15, 30, 60, 180 e 300 s) revelando a completa evolução através do tempo do efeito do quelante na superfície dentinária.

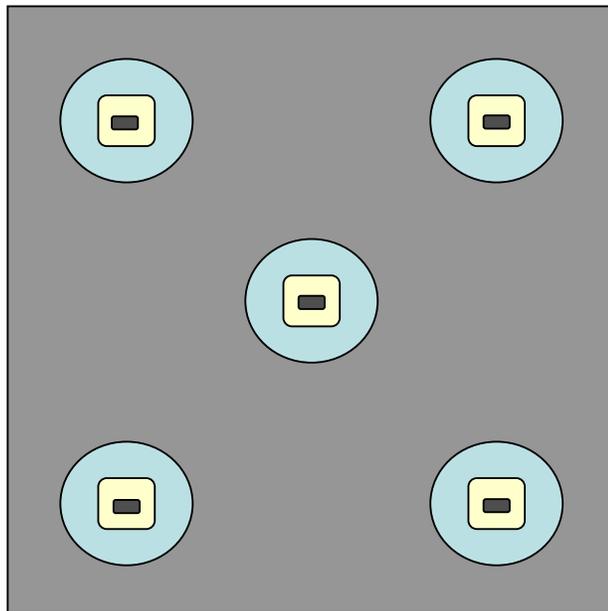


Figura 12: Recipiente com as 5 amostras inseridas para o experimento no MEVA.