

5 Resultados e Discussão

Os procedimentos de análise digital de imagens, desenvolvidos para esse experimento, foram capazes de medir diretamente parâmetros relacionados aos túbulos dentinários, utilizados para a análise da dentina (*fração de área tubular, número de túbulos, menor diâmetro tubular e área tubular*). Apesar deles representarem características microestruturais importantes, raramente são mencionados na literatura. As causas mais prováveis para essa carência de dados são a complexidade e a incerteza desse tipo de medição realizada pelo operador humano. Essas restrições levam à prevalência de avaliações por métodos de *scores*.

A seqüência de processamento e análise foi totalmente automática e permitiu a medição de todos os campos sem a influência do operador. A rotina macro criada, inicialmente, abria automaticamente uma seqüência de imagens de um tempo de ataque de uma amostra e, em seguida, aplicava todas as etapas de processamento e análise, exatamente da mesma forma, para cada imagem. Utilizando um computador típico, o tempo médio para a realização da seqüência completa de processamento de cada imagem foi de aproximadamente 3 segundos. Assim a análise de uma amostra de dentina em um determinado tempo de ataque, com 15 campos, durava menos que 40 segundos. Para cada tempo de ataque ácido aproximadamente 6000 túbulos foram medidos, fornecendo assim uma excelente amostragem.

Inicialmente, os resultados e a discussão serão apresentados, separados por grupos, da seguinte forma:

- a) seqüência de imagens de microscopia óptica co-localizada;
- b) tabela das médias dos parâmetros medidos (*número de túbulos, fração de área tubular; menor diâmetro tubular e área tubular*);
- c) gráficos da evolução temporal desses parâmetros;
- d) análise estatística entre os diferentes tempos de ataque;

Em seguida serão realizadas análises comparativas entre os grupos experimentais: análise quantitativa dos dados obtidos com o PADI das imagens de microscopia óptica; análise qualitativa das imagens obtidas pelo MEVA.

5.1 Grupo 1 - EDTA

5.1.1 Microscopia Óptica Co-localizada

Foram capturadas imagens de 16 campos de cada amostra do Grupo 1, após cada tempo experimental. A evolução do ataque ácido com EDTA pode ser observada nas Figuras 13, 14 e 15. Em cada uma delas está apresentada a seqüência de imagens capturadas de um mesmo campo, em cada tempo de ataque, representativa de cada amostra.

Após a primeira aplicação do EDTA (15 s), a porção superficial do *smear layer* foi removida, expondo praticamente todos os orifícios dos túbulos dentinários da superfície. Contudo, é possível notar que alguns túbulos não foram completamente limpos, apresentando resquícios de *smear layer* no seu interior. Em alguns casos o quelante não foi capaz de remover essas impurezas até o final do experimento.

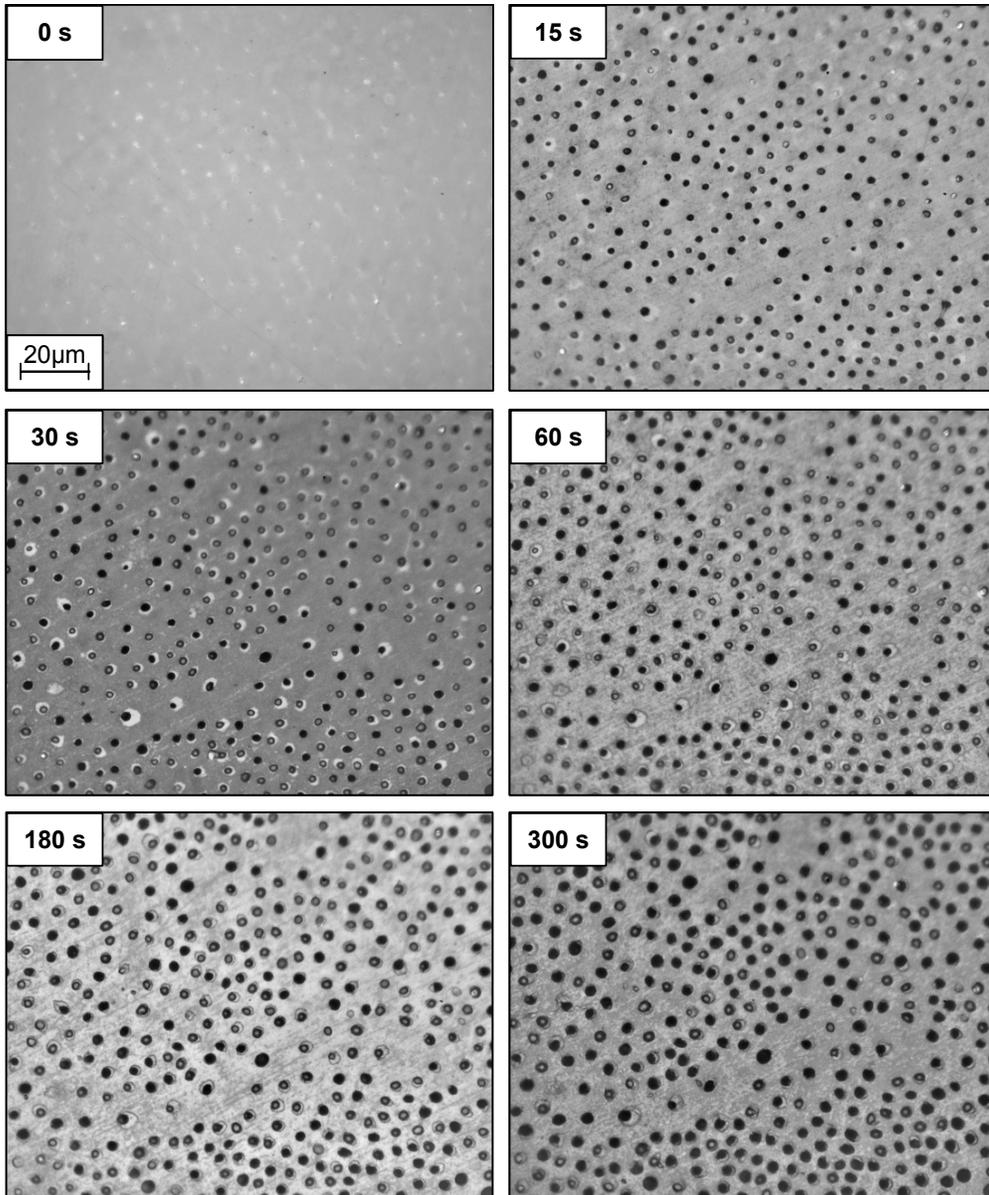


Figura 13: EDTA - Imagens de um campo representativo da AM1, capturadas após os respectivos tempos de ataque.

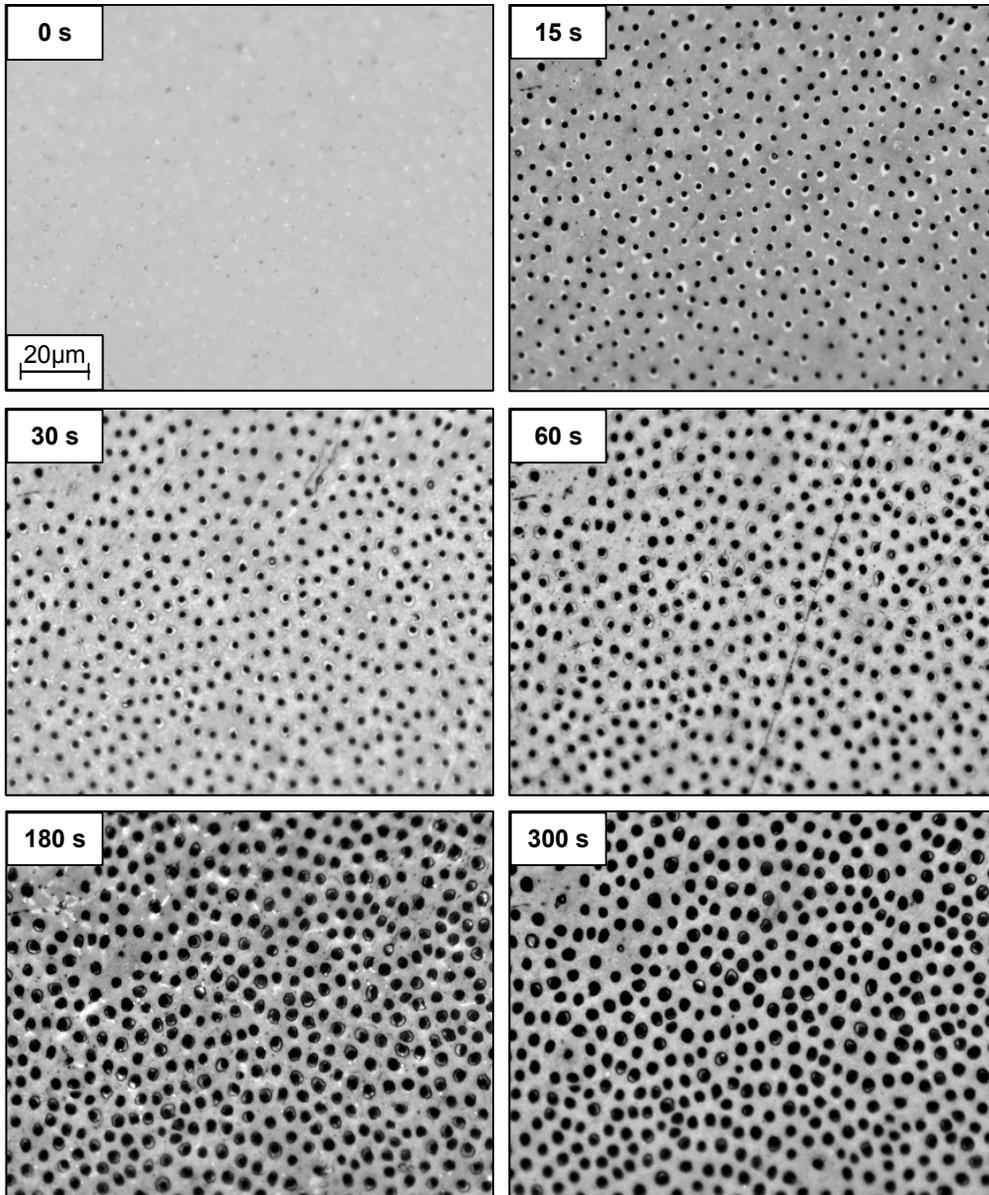


Figura 14: EDTA - Imagens de um campo representativo da AM2, capturadas após os respectivos tempos de ataque.

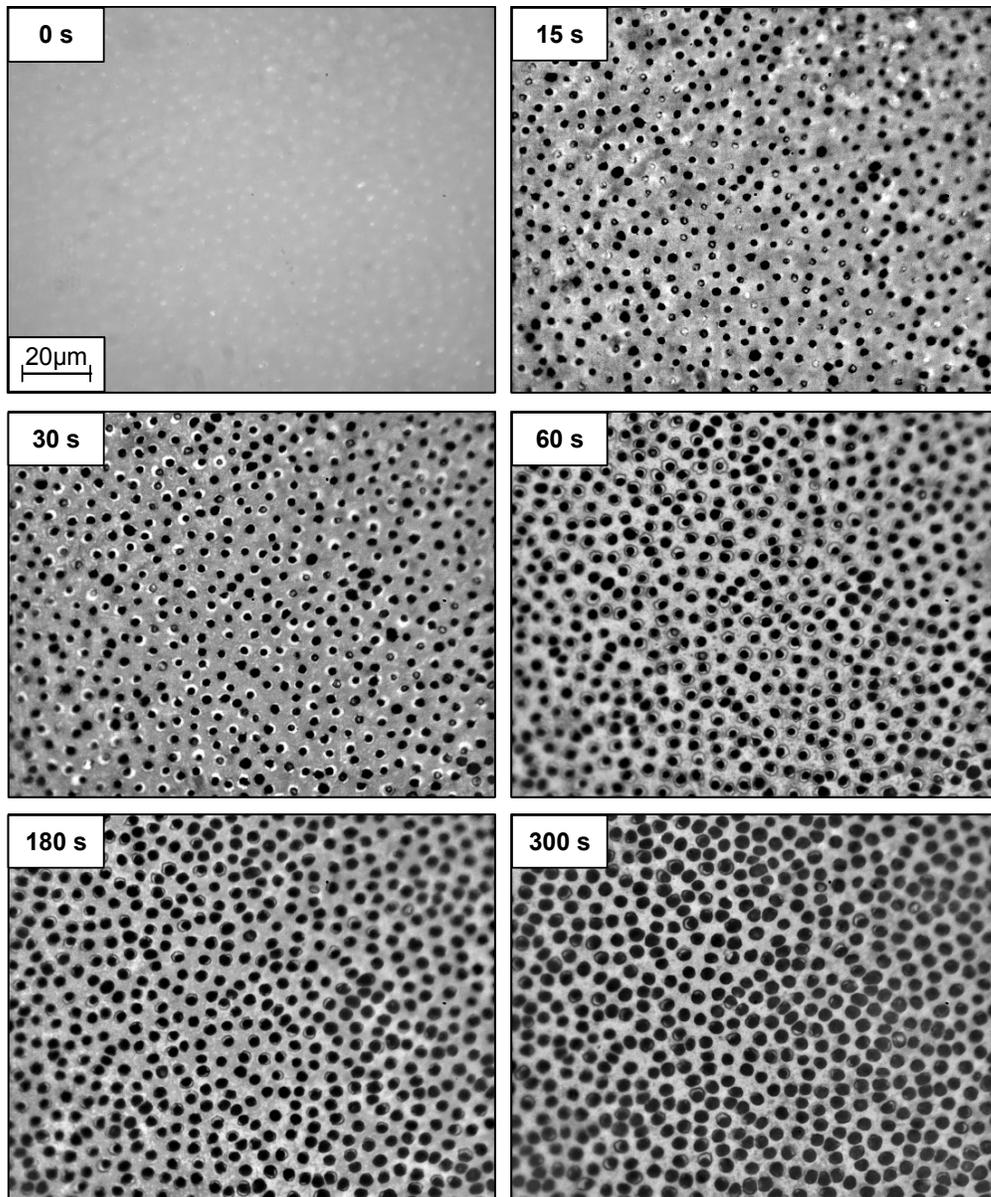


Figura 15: EDTA - Imagens de um campo representativo da AM3, capturadas após os respectivos tempos de ataque.

5.1.2 Resultados gráficos e estatísticos

A Tabela 3 apresenta a média de cada parâmetro medido. Os valores apresentados para os parâmetros de campo são referentes à média dos valores de todos os campos, das 3 amostras em cada tempo, obtendo $n = 48$ campos. Os valores dos parâmetros de região se referem às médias de todos os túbulos, em todos os campos, das 3 amostras em cada tempo. Como o número de túbulos identificados pode variar para cada tempo de ataque, o valor de “n” para os parâmetros de região está situado em uma faixa que varia de *25468 a 28187* túbulos, dependendo do tempo analisado.

Esses valores médios também estão apresentados graficamente nas Figuras 16B e 17B, e a comparação estatística entre os tempos experimentais, na Tabela 4.

Tabela 3: Valores médios de EDTA após tempos experimentais.

t (s)	Fração de Área Tubular (%) <i>n = 48</i>	Número de Túbulos (#) <i>n = 48</i>	Menor Diâmetro Tubular (μm) <i>n = 25468 a 28187</i>	Área Tubular (μm^2) <i>n = 25468 a 28187</i>
0	0	0	0	0
15	9,36	558,5	1,59	2,57
30	12,33	564,4	1,85	3,37
60	18,45	628,8	2,06	4,53
180	27,09	596,1	2,67	7,11
300	32,83	592,5	2,91	8,67

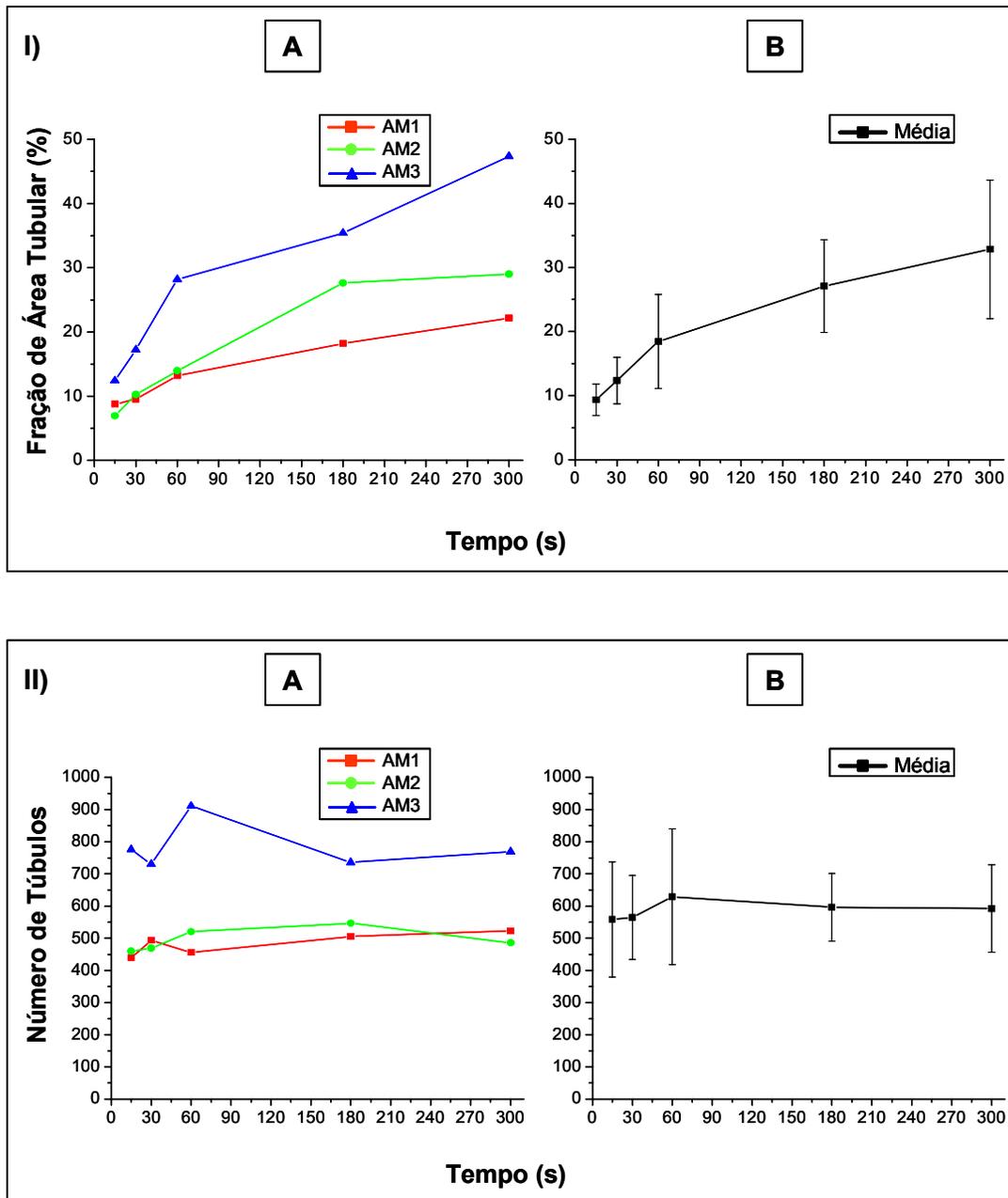


Figura 16: EDTA - Evolução dos parâmetros de *campo*: I) Fração de Área Tubular (%); II) Número de Túbulos. Para cada parâmetro temos: A) médias de cada amostra através do tempo; B) média e desvio padrão de todas as amostras através do tempo.

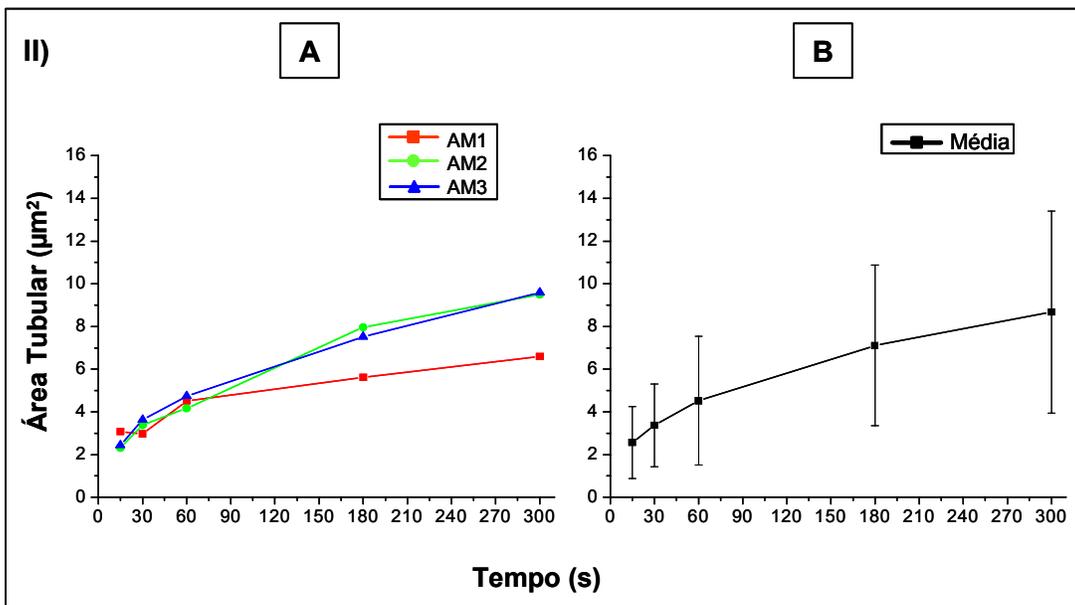
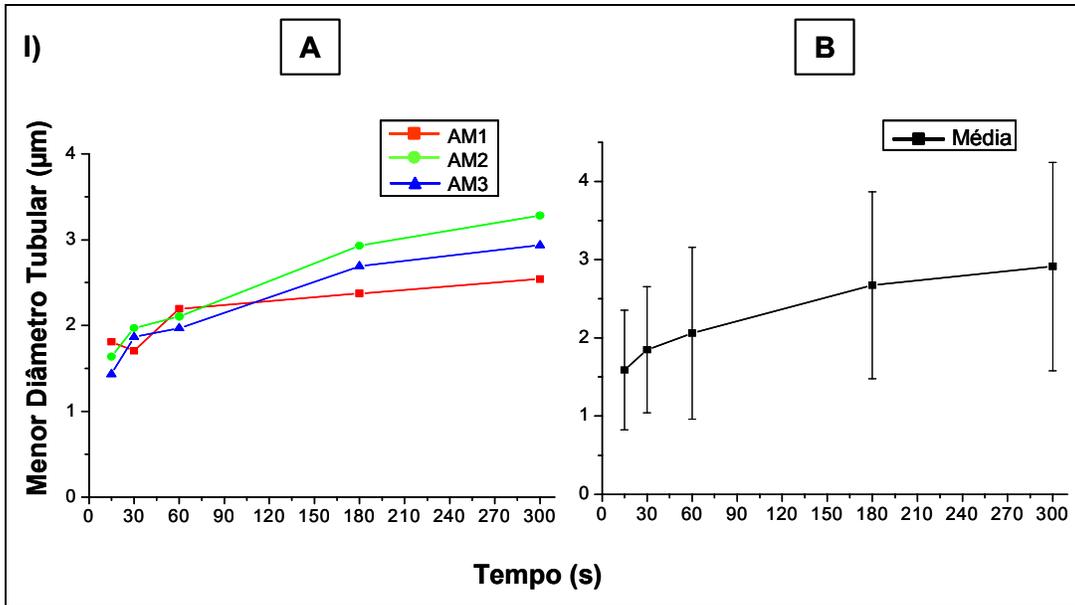


Figura 17: EDTA - Evolução dos parâmetros de região: I) Menor Diâmetro Tubular (μm); II) Área Tubular (μm^2). Para cada parâmetro temos: A) médias de cada amostra através do tempo; B) média e desvio padrão de todas as amostras através do tempo.

Tabela 4: Comparação estatística entre os tempos experimentais (t-test, $p < 0,05$).

EDTA	t (s)	15	30	60	180	300
Fração de Área Tubular	15		0,00001	≈ 0	≈ 0	≈ 0
	30			0,000001	≈ 0	≈ 0
	60				≈ 0	≈ 0
	180					0,0029
	300					
Número de Túbulos	15		N	N	N	N
	30			N	N	N
	60				N	N
	180					N
	300					
Menor Diâmetro Tubular	15		0	0	0	0
	30			≈ 0	0	0
	60				0	0
	180					0
	300					
Área Tubular	15		0	0	0	0
	30			0	0	0
	60				0	0
	180					0
	300					

“N” significa que não há diferença estatisticamente significativa. O valor de p é apresentado quando há diferença significativa.

O parâmetro *número de túbulos* apresenta valores semelhantes com a evolução do ataque ácido (Tabela 3). Como comentado anteriormente, praticamente todos os túbulos são expostos após 15 s, o que explica o fato de não haver diferenças significativas entre os tempos experimentais (Tabela 4).

O *número de túbulos* é um parâmetro que pode apresentar algumas inconsistências. Elas podem ser causadas por propriedades relacionadas à cada amostra ou por características do processo de desmineralização que não puderam ser solucionadas pelo PADI. Observando o gráfico desse parâmetro (Figura 16-II), nota-se que a AM3 apresenta uma redução acentuada do número de túbulos no intervalo 60-180 s.

A Figura 18 apresenta imagens ampliadas de uma região de um campo da AM3, após o ataque ácido por 60 s (A e B) e por 180 s (C e D). É possível notar que o comando *watershed*, utilizado para a separação de túbulos que se tocam (linhas vermelhas), pode também criar fronteiras dentro de um mesmo túbulo.

Essas fronteiras falsas podem ter duas origens: presença de remanescentes do *smear layer* no túbulo dentinário já exposto (setas azuis); ou padrão de desmineralização da dentina peritubular (setas verdes). Outras operações de pós-processamento (*close* e *fill*), que foram realizadas antes do *watershed*, conseguiram resolver o problema dessas falsas fronteiras em alguns túbulos, mas não isto foi suficiente para todos os casos. Com o avanço do processo de desmineralização (C e D) é possível notar que esse problema é solucionado, o que causa a redução no valor final do *número de túbulos*. Assim, o parâmetro *número de túbulos* não pode ser considerado relevante para a caracterização da evolução do ataque ácido através do tempo.

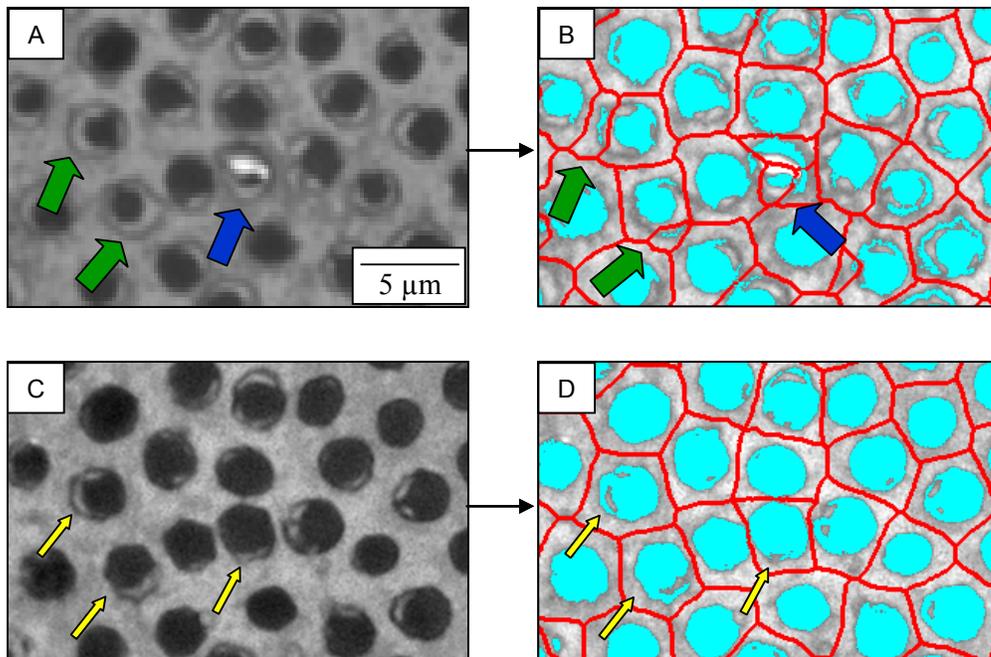


Figura 18: Região ampliada das imagens originais e após PADI demonstrando criação e correção de falsas fronteiras. **A e B (60 s)**: seta azul (impureza no interior do túbulo); setas verdes (dentina peritubular). **C e D (180 s)**: setas amarelas indicam os túbulos que apresentavam fronteiras falsas, agora corretamente segmentados.

A *fração de área tubular* aumenta progressivamente para todas as amostras, como pode ser demonstrado, graficamente, na Figura 16-I. Isso também foi observado no estudo de De-Deus (2004) que realizou uma metodologia semelhante para medição desse parâmetro, porém em imagens obtidas com AFM. O valor médio encontrado pelo autor após 300 segundos de exposição foi de aproximadamente 15%, enquanto que no presente estudo essa média atingiu

32,83% após o mesmo tempo de exposição. Essa diferença dos dados obtidos entre os estudos pode ser relacionada ao efeito auto-limitante do EDTA, já que durante o experimento com o AFM a solução não é renovada.

Observando os parâmetros de região (Figura 17), nota-se, na AM1, uma diminuição desses valores no intervalo 15-30 s. Analisando a imagem de um campo representativo dessa amostra (Figura 13) pode-se constatar que alguns túbulos que estavam completamente desobstruídos (15 s), foram parcialmente cobertos (30 s), provavelmente, devido à sedimentação de resíduos provenientes da própria desmineralização. Porém, essa redução no valor é pequena e não influencia a média final das 3 amostras que aumenta progressivamente para *menor diâmetro tubular e área tubular*, como pode ser observado na Figura 17.

Niu *et al.* (2002) mediram em imagens de microscopia eletrônica de varredura as médias do diâmetro dos túbulos dentinários. Os valores encontrados foram de $\pm 2,5 \mu\text{m}$ após aplicação da solução de EDTA 17% por 1 ou 3 minutos. Utilizando a combinação de EDTA com o hipoclorito de sódio 6%, as médias foram de $3,43 \pm 0,23 \mu\text{m}$ e de $3,93 \pm 0,44 \mu\text{m}$ (respectivamente, 1 e 3 minutos de ataque ácido com EDTA). Esses resultados diferem do presente estudo, onde as médias do *menor diâmetro tubular* foram $2,06 \mu\text{m}$ e $2,67 \mu\text{m}$ (respectivamente 1 e 3 minutos). Além disso, foram encontradas diferenças significativas entre todos os tempos experimentais analisados. Vale ressaltar que os autores do estudo não mencionam o método de medição utilizado, o que pode explicar as diferenças nos valores médios e na análise estatística encontradas.

O efeito do EDTA na dentina depende de diversos fatores, mas o pH, a concentração do sal de EDTA e o tempo de exposição, são os mais importantes (Sen *et al.*, 1995; Torabinejad *et al.*, 2002; Gulabivala *et al.*, 2005). O presente estudo analisou o EDTA 17% e pH 7,3, por essa ser a formulação comercial mais comum, portanto a mais utilizada pelos profissionais na prática clínica (Serper & Çalt, 2002; Hülsmann *et al.*, 2003). Cury *et al.* (1961), Verdelis *et al.* (1999) e Serper & Çalt (2002) demonstraram que, para a solução do EDTA atingir eficiência máxima, o pH deve ser mantido neutro ($\approx 7,5$). Diversos estudos demonstraram que as soluções de EDTA 15-17% são efetivas para remoção do smear layer e desmineralização dentinária (Bechelli *et al.*, 1999; Çalt & Serper, 2002; De-Deus, 2004; De-Deus *et al.*, 2006a; De-Deus *et al.* 2006b; Grawher *et al.*, 2003; Menezes *et al.*, 2003; Teixeira *et al.*, 2005).

Os estudos que investigam os efeitos do EDTA demonstram variações em relação ao tempo de ataque ácido utilizado, à região de dentina em que a solução é analisada e à combinação com outras substâncias. Assim, não existe na literatura um consenso, principalmente sobre o tempo em que essa substância deve permanecer no interior do canal radicular, que já foi relatado variando de 30 segundos a 15 minutos (Goldman *et al.*, 1981; Abbott *et al.*, 1991; Lloyd *et al.*, 1995; Zehnder *et al.*, 2006). Contudo, o tempo considerado ser o mais próximo das condições clínicas de trabalho, é de 5 minutos (De-Deus, 2004; De-Deus *et al.*, 2006).

Serper & Çalt (2002), analisaram a quantidade de íons fósforo extraída da dentina pela ação do EDTA, e observaram rápida elevação após 1 minuto e a duplicação desse valor somente após 15 minutos. Isso foi relacionado à capacidade de remoção do smear layer nos primeiros minutos e à desmineralização da superfície dentinária com a evolução do tempo. Resultados semelhantes foram relatados por Scelza *et al.* (2003), que não constataram diferença significativa entre 3 tempos experimentais (3, 10 e 15 minutos), assim como Sampaio *et al.* (2003), analisando por scores imagens de microscopia eletrônica de varredura após 1, 2 e 3 minutos. Esse experimento revelou resultados diferentes, pois ficou comprovado estatisticamente, diferença significativa entre todos os tempos experimentais testados (15, 30, 60, 180 e 300 s) (Tabela 4).

Nas imagens de microscopia óptica foi possível observar que após 15 s, praticamente todo o smear layer foi removido, e o alargamento dos túbulos dentinários continuou até 300 s. Essas observações são semelhantes a de outros autores. De-Deus (2004), analisando o efeito *in situ* do EDTA através de microscopia de força atômica, observou a exposição dos túbulos dentinários após 50 segundos e o alargamento deles até 500 segundos. Yamada *et al.* (1983) e Teixeira *et al.* (2005) relataram que o smear layer pode ser removido em 1 minuto, contudo no terço apical do canal radicular, a eficácia foi reduzida. Perez & Rouqueyrol-Pourcel (2005) só observaram a abertura completa dos túbulos dentinários após 3 minutos. Contudo, Paterson (1963) descreveu que a eficiência máxima de desmineralização acontecia após 5 minutos de aplicação do quelante.

Apesar da remoção do smear layer pelo EDTA ter sido comprovada, outros estudos relatam que essa solução só remove a porção inorgânica do *smear layer*,

deixando a porção orgânica sobre a dentina (Bechelli *et al.*, 1999; Spencer *et al.*, 2001; Yamashita *et al.*, 2003). Esses autores sugerem a combinação com o hipoclorito de sódio, uma substância auxiliar do tratamento endodôntico que facilita o preparo do canal radicular. Porém, algumas considerações devem ser feitas em relação aos efeitos na superfície dentinária. Niu *et al.* (2002) observaram, através de imagens de microscopia eletrônica de varredura, que a irrigação com EDTA por 1 ou 3 minutos, era capaz de remover o smear layer deixando a superfície dentinária lisa, sem erosão, com os orifícios dos túbulos dentinários expostos (livres do smear layer) e regularmente afastados. Contudo, quando a irrigação com EDTA 15% era sucedida de irrigação com hipoclorito de sódio 6%, foi observada a erosão da dentina intertubular e peritubular, que apresentava-se rugosa e com túbulos dentinários irregularmente alargados. Esse efeito foi associado à descalcificação dos componentes inorgânicos pelo EDTA e da dissolução da matriz orgânica pelo hipoclorito de sódio. Grawher *et al.* (2003) observaram que a capacidade de desmineralização dentinária do EDTA é aumentada após a combinação com hipoclorito de sódio. Apesar da irrigação final com hipoclorito de sódio também ser sugerida para interromper o efeito do EDTA no canal radicular, Grande *et al.* (2006) observaram, através de ressonância nuclear magnética, que o hipoclorito de sódio não causa a reação de oxidação do EDTA que deveria interromper a sua ação.

Nesse estudo, com o objetivo de observar apenas o efeito do EDTA no smear layer e na superfície dentinária, o ataque ácido foi interrompido com água destilada. Contudo, Ari *et al.* (2004) relataram que EDTA 17% afetou os componentes estruturais da dentina, pois aumentou substancialmente a rugosidade e diminuiu a microdureza na superfície. Outros autores sugeriram alternativas na composição da solução de EDTA (menor concentração, alteração do pH e alteração do sal de EDTA) para minimizar esses efeitos adversos (Serper & Çalt, 2002; Nakashima & Terata, 2004; O'Connell *et al.*, 2000; Perez & Rouqueyrol-Pourcel; 2005).

Os experimentos foram realizados com a magnificação máxima disponível no microscópio óptico. Isto implica que detalhes mais finos da superfície, como a erosão de dentina peritubular em túbulos individuais, estavam além da resolução da técnica. Além disso, nestas condições, a profundidade de foco obtida era muito pequena, dificultando a observação de eventual erosão da superfície intertubular.

5.2 Grupo 2 - EDTAC

5.2.1 Microscopia Óptica Co-localizada

Foram capturadas imagens de 15 campos de cada amostra do Grupo 2, após cada tempo experimental. A evolução do ataque ácido com EDTAC pode ser observada nas Figuras 19, 20 e 21. Em cada uma delas está apresentada a seqüência de imagens capturadas de um mesmo campo, em cada tempo de ataque, representativa de cada amostra.

Após 300 s, a porção superficial do *smear layer* foi removida, expondo praticamente todos os orifícios dos túbulos dentinários da superfície. Contudo, é possível notar que alguns túbulos não foram completamente limpos, apresentando resquícios de *smear layer* no seu interior.

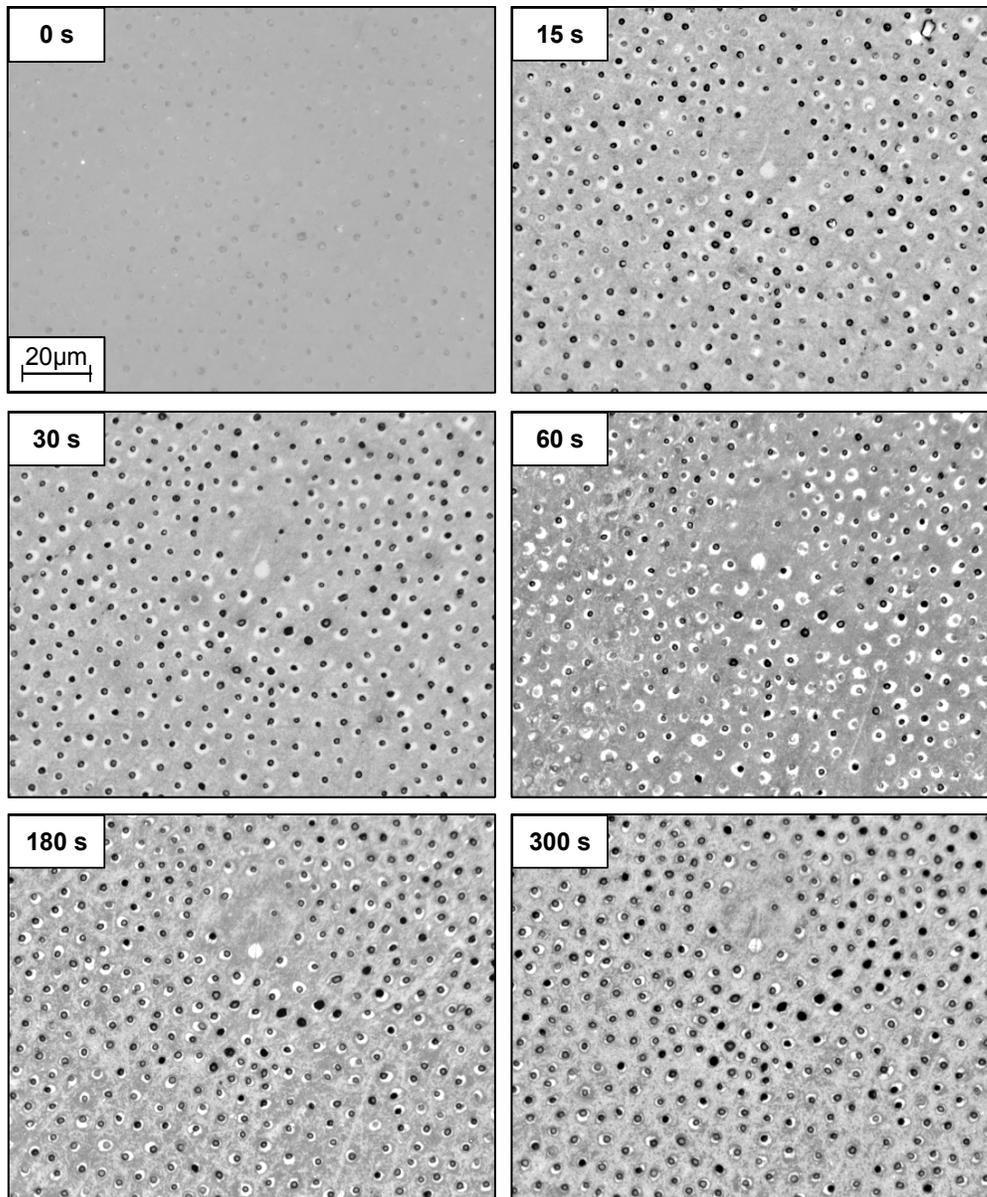


Figura 19: EDTAC - Imagens de um campo representativo da AM1, capturadas após os respectivos tempos de ataque.

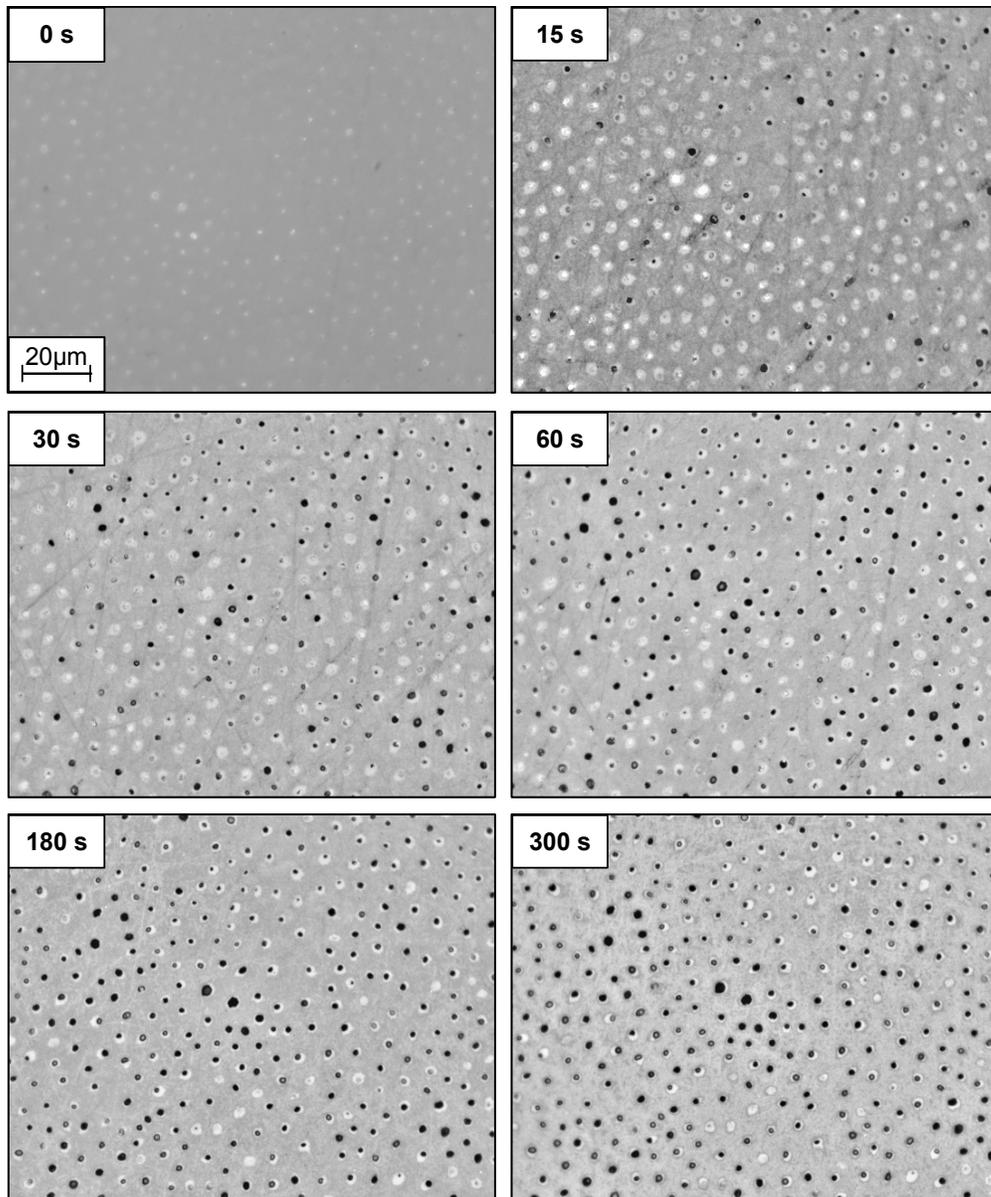


Figura 20: EDTAC - Imagens de um campo representativo da AM2, capturadas após os respectivos tempos de ataque.

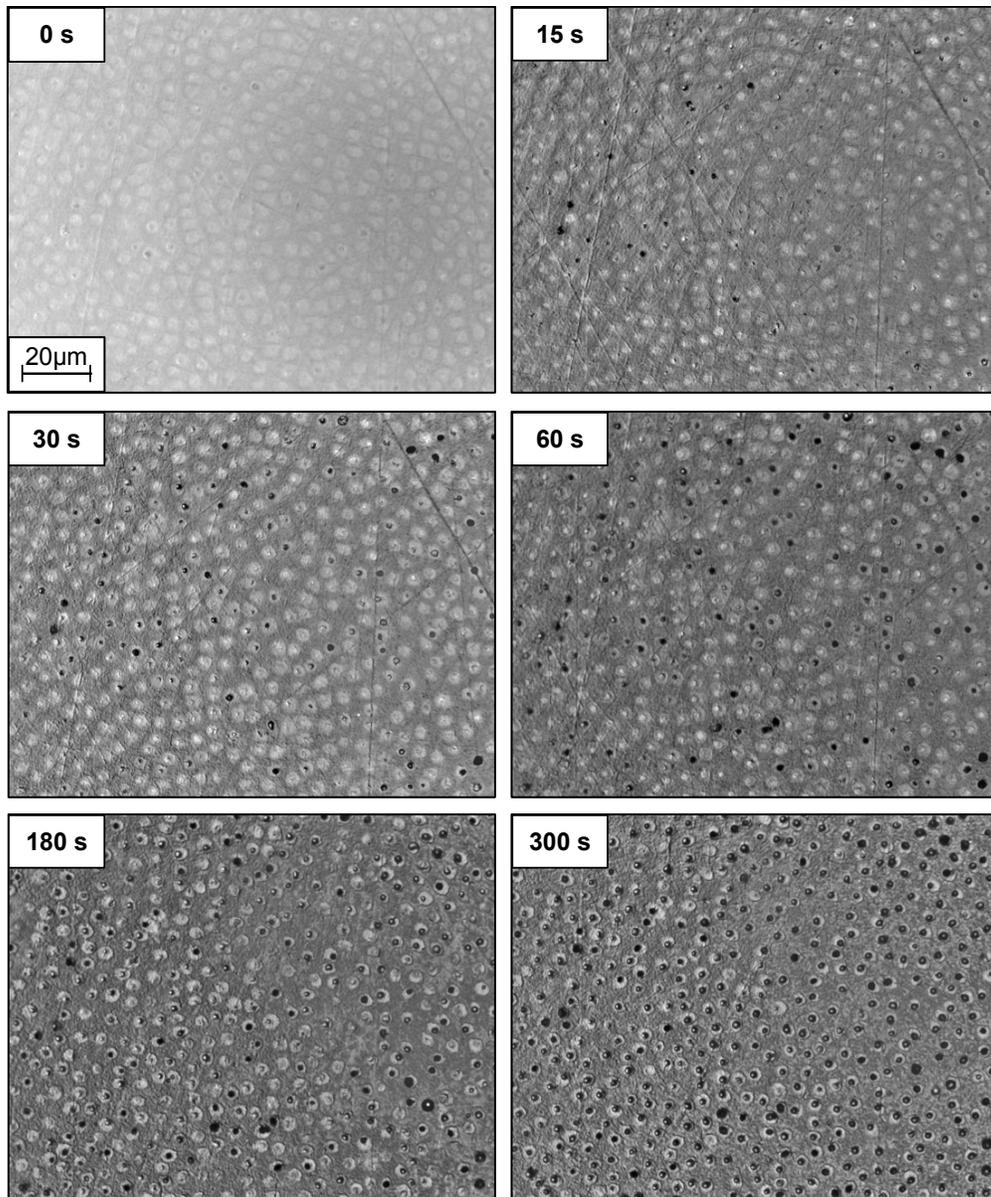


Figura 21: EDTAC - Imagens de um campo representativo da AM3, capturadas após os respectivos tempos de ataque.

5.2.2 Resultados gráficos e estatísticos

A Tabela 5 apresenta a média de cada parâmetro medido. Os valores apresentados para os parâmetros de campo são referentes à média dos valores de todos os campos, das 3 amostras em cada tempo, obtendo $n = 45$ campos. Como o número de túbulos identificados pode variar para cada tempo de ataque, o valor de “n” para os parâmetros de região está situado em uma faixa que varia de 7683 a 18382 túbulos, dependendo do tempo analisado.

Esses valores médios também estão apresentados graficamente nas Figuras 22B e 23B, e a comparação estatística entre os tempos experimentais, na Tabela 6.

Tabela 5: Valores médios de EDTAC após tempos experimentais.

t (s)	Fração de Área Tubular (%) <i>n = 45</i>	Número de Túbulos (#) <i>n = 45</i>	Menor Diâmetro Tubular (μm) <i>n = 7683 a 18382</i>	Área Tubular (μm^2) <i>n = 7683 a 18382</i>
0	0	0	0	0
15	0,98	175,2	0,90	0,85
30	1,92	192,5	1,33	1,53
60	2,27	220,8	1,29	1,57
180	4,78	427,4	1,37	1,72
300	7,41	427,8	1,73	2,67

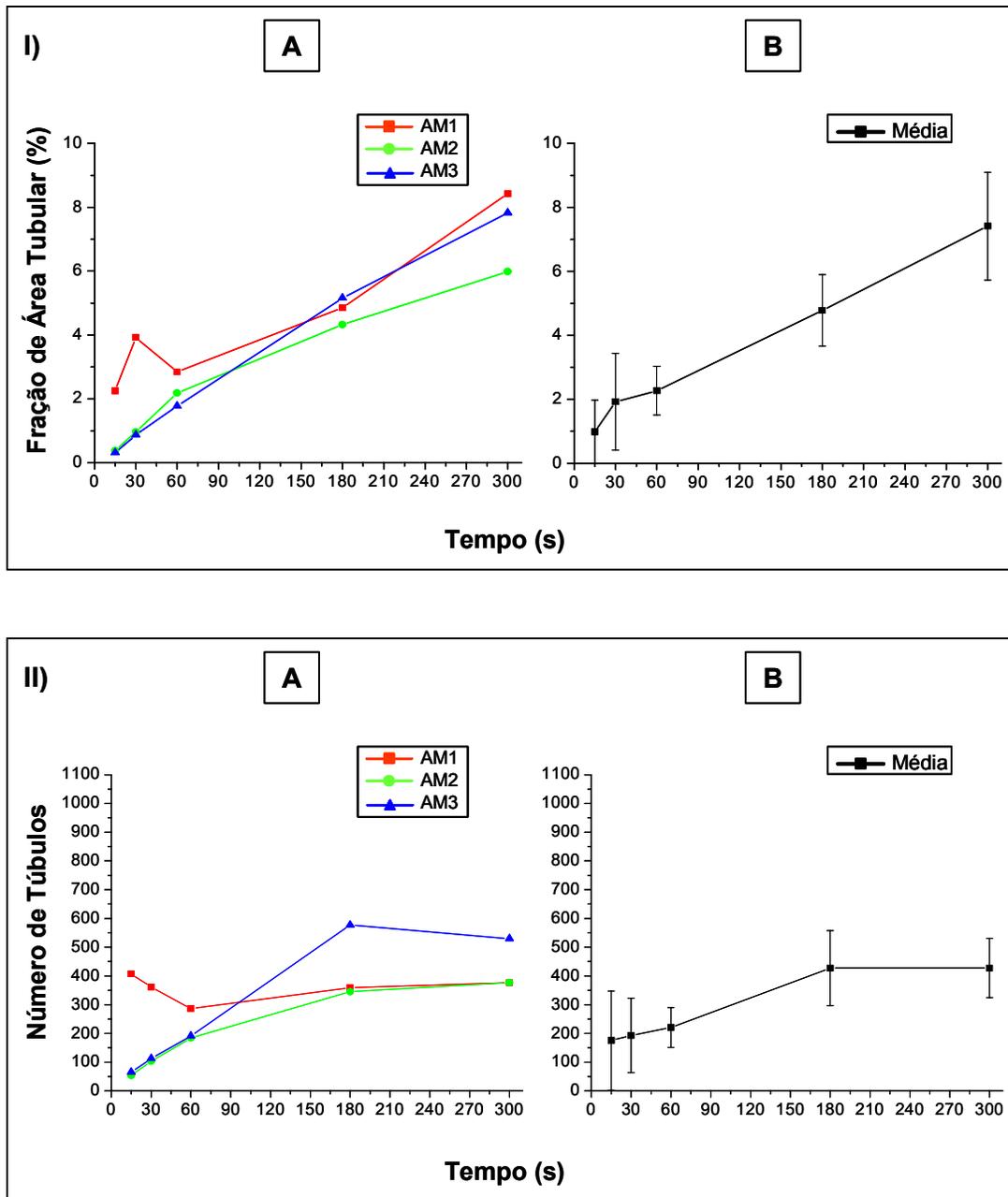


Figura 22: EDTAC - Evolução dos parâmetros de *campo*: I) Fração de Área Tubular (%); II) Número de Túbulos. Para cada parâmetro temos: A) médias de cada amostra através do tempo; B) média e desvio padrão de todas as amostras através do tempo.

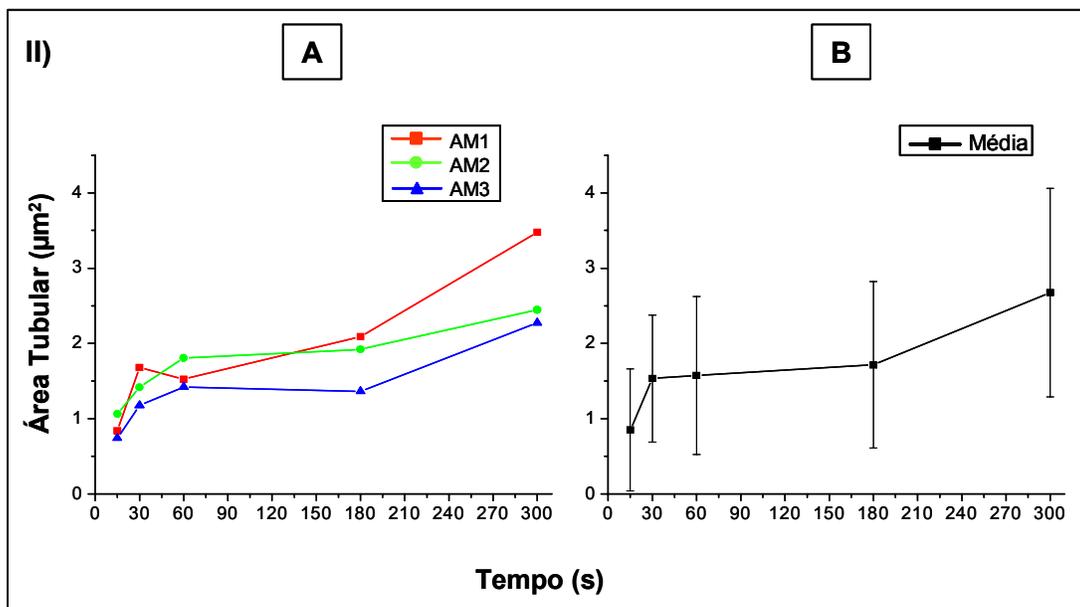
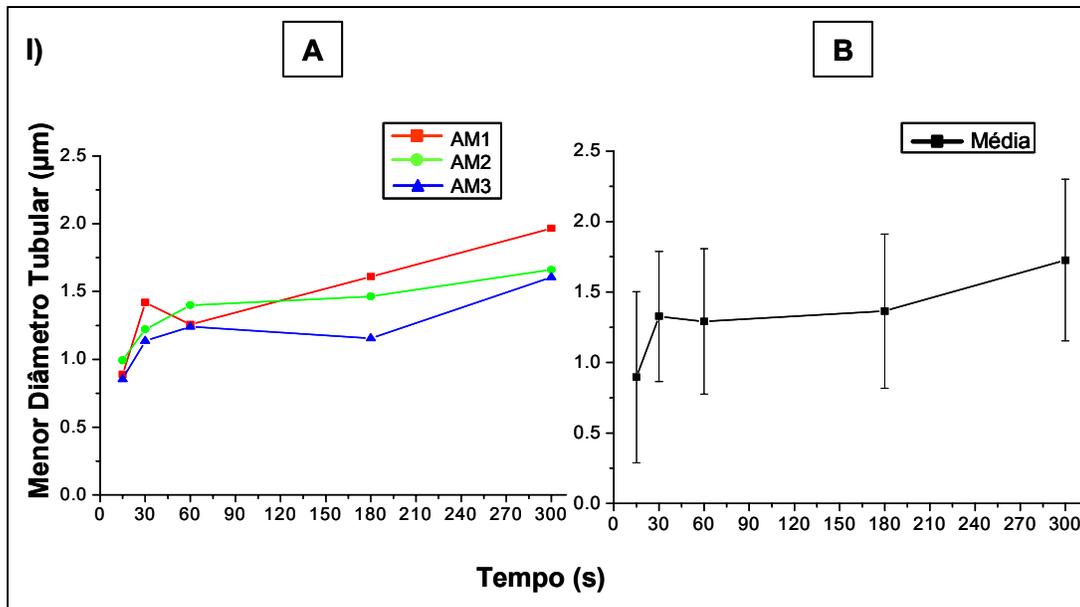


Figura 23: EDTAC - Evolução dos parâmetros de região: I) Menor Diâmetro Tubular (μm); II) Área Tubular (μm^2). Para cada parâmetro temos: A) médias de cada amostra através do tempo; B) média e desvio padrão de todas as amostras através do tempo.

Tabela 6: Comparação estatística entre os tempos experimentais (t-test, $p < 0,05$).

EDTAC	t (s)	15	30	60	180	300
Fração de Área Tubular	15		0,0007	≈ 0	≈ 0	≈ 0
	30			N	≈ 0	≈ 0
	60				≈ 0	≈ 0
	180					≈ 0
	300					
Número de Túbulos	15		N	N	≈ 0	≈ 0
	30			N	≈ 0	≈ 0
	60				≈ 0	≈ 0
	180					N
	300					
Menor Diâmetro Tubular	15		0	0	0	0
	30			0,000001	≈ 0	0
	60				≈ 0	0
	180					0
	300					
Área Tubular	15		0	0	0	0
	30			0,0053	≈ 0	0
	60				≈ 0	0
	180					0
	300					

“N” significa que não há diferença estatisticamente significativa. O valor de p é apresentado quando há diferença significativa.

Da mesma forma que para o EDTA, não existe na literatura um consenso em relação ao tempo de trabalho ideal para o EDTAC. Os gráficos (Figuras 22 e 23), e as Tabelas 5 e 6, demonstram que o maior efeito do EDTAC ocorre no intervalo de 180-300 segundos. De-Deus (2004) também observou maior redução da microdureza dentinária no intervalo 3-5 minutos dos tempos experimentais utilizados.

A análise de uma região em maior ampliação (Figura 24) revela túbulos pouco alargados devido à remoção incompleta da dentina peritubular pelo EDTAC e a presença de resquílios do *smear layer* no interior dos túbulos parcialmente expostos. Assim, para garantir a remoção do *smear layer* do canal radicular, o tempo de trabalho do EDTAC não deve ser inferior a 300 segundos.

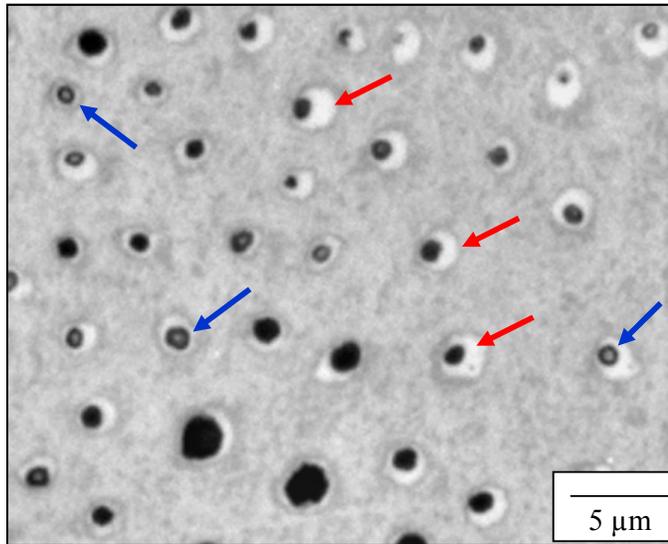


Figura 24: Presença de dentina peritubular (setas vermelhas) e resquícios do *smear layer* (setas azuis) após 300 s.

Resultados semelhantes foram observados por Goldberg *et al.* (1982) que, utilizando microscopia eletrônica de varredura, observaram muitos orifícios de túbulos dentinários expostos após 5 minutos de ataque ácido com EDTAC, mas alguns permaneciam obstruídos. Somente após 15 ou 30 minutos é que praticamente todos os túbulos podiam ser vistos desobstruídos e levemente alargados. Nygaard-Otsby (1957) recomendaram tempo de trabalho de no mínimo 10 a 15 minutos.

Guerisoli *et al.* (2002) relataram que a utilização de hipoclorito de sódio 1% com EDTAC por 30 segundos e agitação ultra-sônica após a instrumentação do canal radicular são eficientes para a remoção do *smear layer*. Cameron (1995) também encontrou melhores resultados utilizando a mesma combinação, mas o regime de irrigação proposto (1 ml de EDTAC após cada instrumento + 2 aplicações de ultra-som por 30 segundos + hipoclorito de sódio) é trabalhoso e pouco prático para o tratamento clínico.

A média da *fração de área tubular* aumenta com a evolução do tempo, como pode ser observado na Figura 22 (I-B) e na Tabela 5. Porém, a AM1 demonstra ligeira queda no valor desse parâmetro no intervalo 30-60 s (Figura 22 I-A). Analisando a imagem de um campo representativo dessa amostra (Figura 19) pode-se constatar que alguns túbulos que estavam desobstruídos (30 s), foram novamente cobertos. A causa provável é a sedimentação de resíduos provenientes da própria desmineralização da amostra causada pelo quelante. Porém, como essa

redução no valor é pequena, não há influência na média final, como pode ser observado na Tabela 5. Essa obstrução também pode explicar a diminuição do *número de túbulos* nesse mesmo intervalo de tempo (Figura 22 II-B). A diminuição dos valores do *número de túbulos* também pode ser causada por fatores relacionados ao PADI já explicados para o EDTA (Figura 18).

De-Deus (2004) também observou através de microscopia de força atômica, um crescimento gradual do valor de fração de área tubular causada pela ação do EDTAC com a evolução do tempo. O valor encontrado com o PADI foi de aproximadamente 4% em um campo de 50x50 μm , após 300 segundos de ataque ácido. O presente experimento obteve um valor médio de 7,41% para esse mesmo parâmetro. Esses resultados podem estar influenciados por diferenças metodológicas entre os estudos, discutidos previamente para o EDTA, já que o EDTAC apresenta o mesmo princípio ativo.

No intervalo 30-60 s, o *parâmetro menor diâmetro tubular* apresenta diminuição de suas médias (Tabela 5). Apesar dos valores serem muito próximos (apenas 0,04 μm de diferença), foi encontrada diferença significativa. Os parâmetros de Região podem ser influenciados por características do processo de desmineralização. No início do ataque ácido, alguns túbulos são imediatamente expostos e alargados. Se, em um tempo experimental subsequente, outros túbulos que apresentavam-se obstruídos passam a ser detectados (apresentando menor diâmetro), os valores relativos a esses “novos túbulos” podem causar a diminuição do valor final da média de *menor diâmetro tubular*.

5.3 Grupo 3 - AC 10%

5.3.1 Microscopia Óptica Co-localizada

Durante o procedimento de captura de imagens, pôde ser observado um efeito marcante dessa solução logo após o primeiro tempo experimental (15 s): as imagens apresentam praticamente todos os orifícios dos túbulos dentinários expostos e bastante alargados. A evolução do ataque ácido revelou problemas na qualidade das imagens capturadas em alguns campos, que estavam sem nitidez. A imagem sem nitidez, ou “fora de foco”, não apresenta os contornos dos objetos, nesse caso, dos túbulos, bem definidos. A Figura 25 demonstra uma imagem capturada após 60 segundos com esse problema de focalização, que pode ter duas origens: desorganização do colágeno ou alterações de relevo causada pela desmineralização da superfície dentinária. O microscópio óptico de luz refletida utiliza um sistema de lentes para a ampliação da imagem. Cada lente tem uma distância focal definida, que é a distância que a superfície da amostra analisada deve estar para que o foco seja estabelecido. No microscópio óptico a profundidade de foco é pequena, principalmente em grandes aumentos como no presente estudo, e a rugosidade ou defeitos da superfície podem levar à formação de uma imagem “fora de foco”. Efeitos semelhantes foram observados nas três amostras, principalmente após 60 segundos.

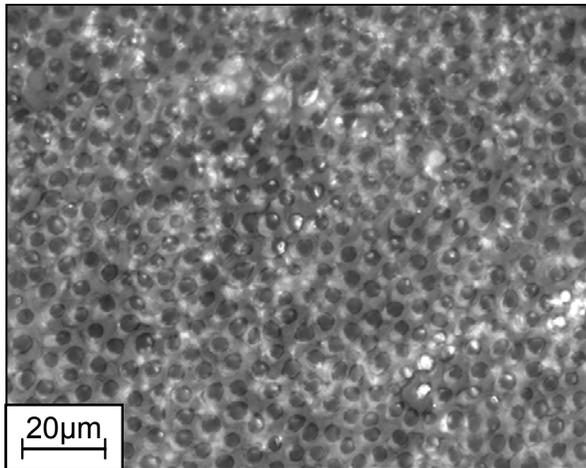


Figura 25: Imagem sem nitidez após 60 s.

Assim, como a qualidade insuficiente das imagens impediu a correta medição de todos os campos, o procedimento adotado foi a captura de imagens apenas até 60 s e utilização de substâncias menos concentradas (AC5% e AC1%) para avaliação do efeito do ácido cítrico.

Foram capturadas imagens de 15 campos de cada amostra do Grupo 3, após cada tempo experimental. A evolução do ataque ácido com AC 10% pode ser observada nas Figuras 26, 27 e 28. Em cada uma delas está apresentada a seqüência de imagens capturadas de um mesmo campo, em cada tempo de ataque. Foram selecionados campos nos quais as imagens tinham qualidade, no mínimo, razoável para serem apresentadas.

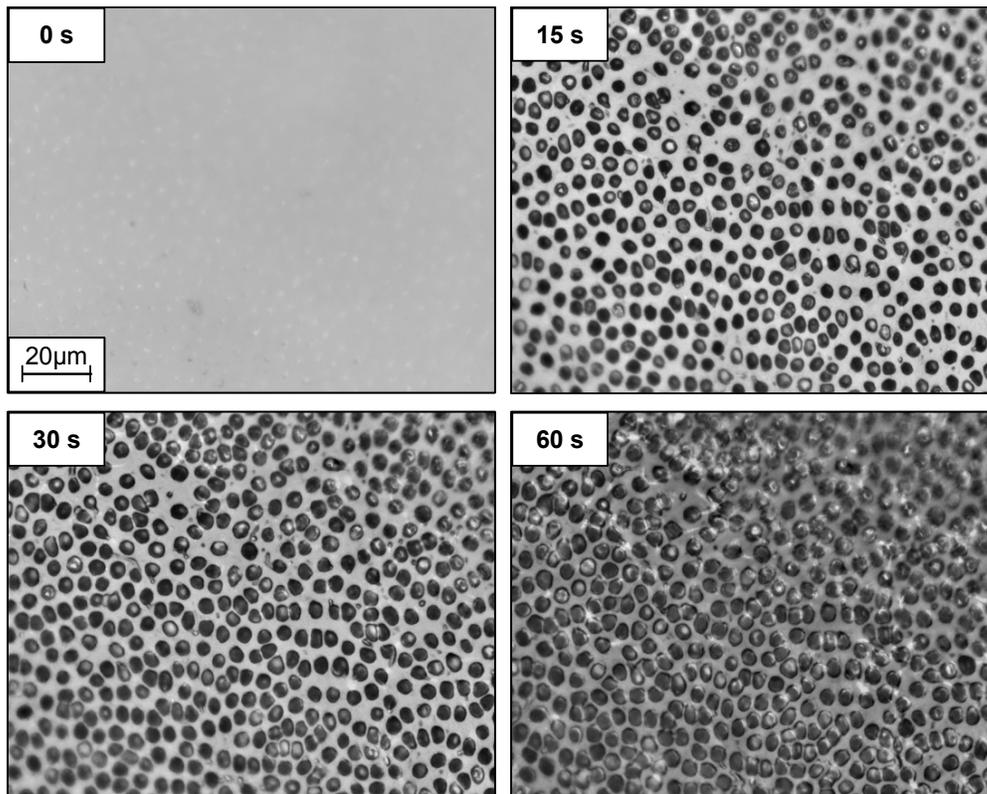


Figura 26: AC10% - Imagens de um campo da AM1, capturadas após os respectivos tempos de ataque.

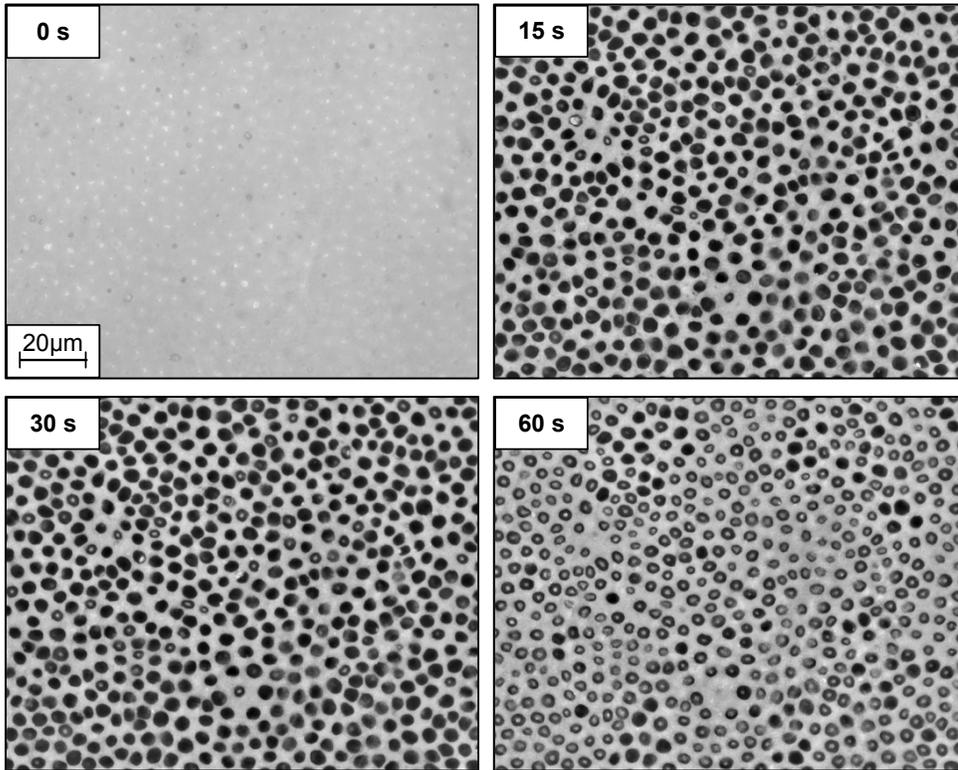


Figura 27: AC10% - Imagens de um campo da AM2, capturadas após respectivos tempos de ataque.

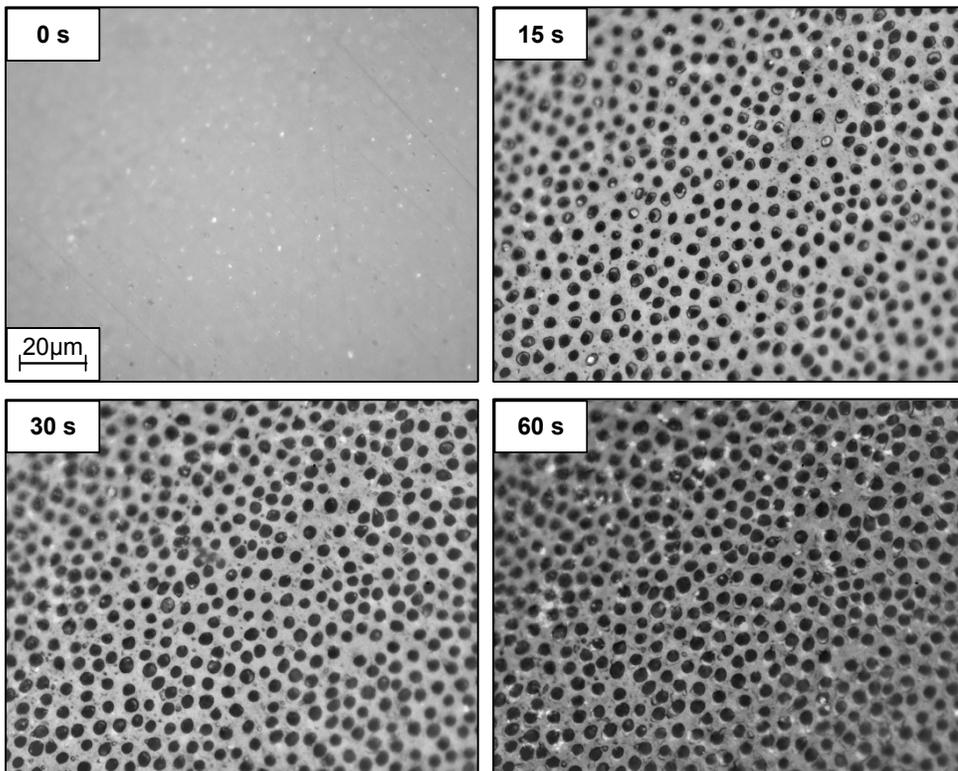


Figura 28: AC10% - Imagens de um campo da AM3, capturadas após respectivos tempos de ataque.

5.3.2 Resultados gráficos e estatísticos

Apesar de realizar o procedimento de captura de imagens em 15, 30 e 60 s, não foi possível realizar o PADI em todas as imagens relativas a 60 s. Por isso, optou-se por apresentar os resultados até 30 s.

A Tabela 7 apresenta a média de cada parâmetro medido. Os valores apresentados para os parâmetros de campo são referentes à média dos valores de todos os campos, das 3 amostras em cada tempo, obtendo $n = 45$ campos. Como o número de túbulos identificados pode variar para cada tempo de ataque, o valor de “n” para os parâmetros de região está situado em uma faixa que varia de 26032 a 30908 túbulos, dependendo do tempo analisado.

Esses valores médios também estão apresentados graficamente nas Figuras 29B e 30B, e a comparação estatística entre os tempos experimentais, na Tabela 8.

Tabela 7: Valores médios de AC 10% após tempos experimentais

t (s)	Fração de Área Tubular (%) <i>n = 45</i>	Número de Túbulos (#) <i>n = 45</i>	Menor Diâmetro Tubular (μm) <i>n = 26032 a 30908</i>	Área Tubular (μm^2) <i>n = 26032 a 30908</i>
0	0	0	0	0
15	35,08	635,5	2,88	8,61
30	39,45	749,8	2,61	8,11

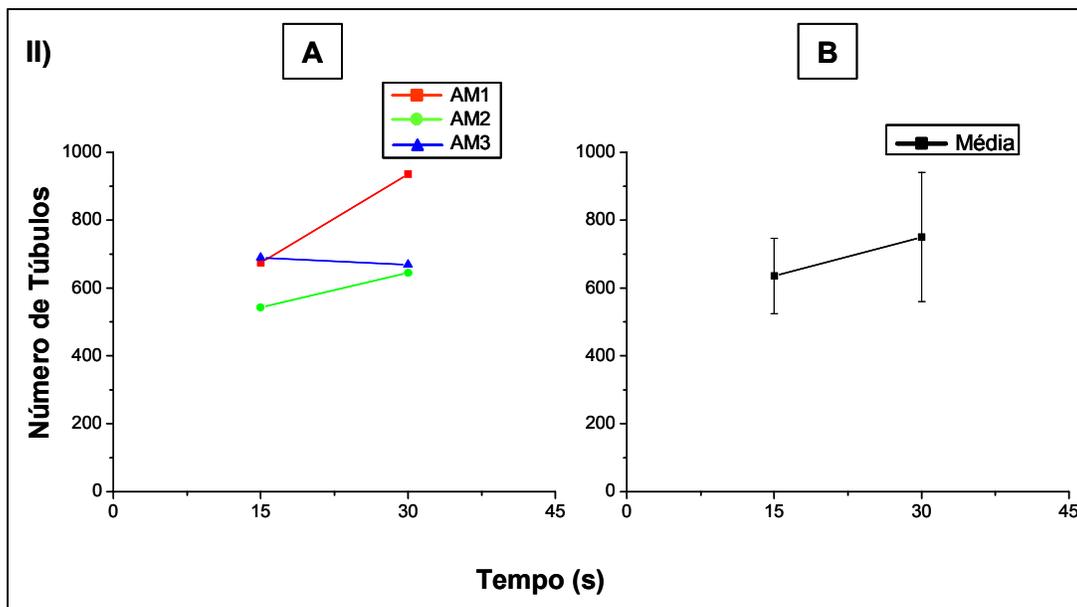
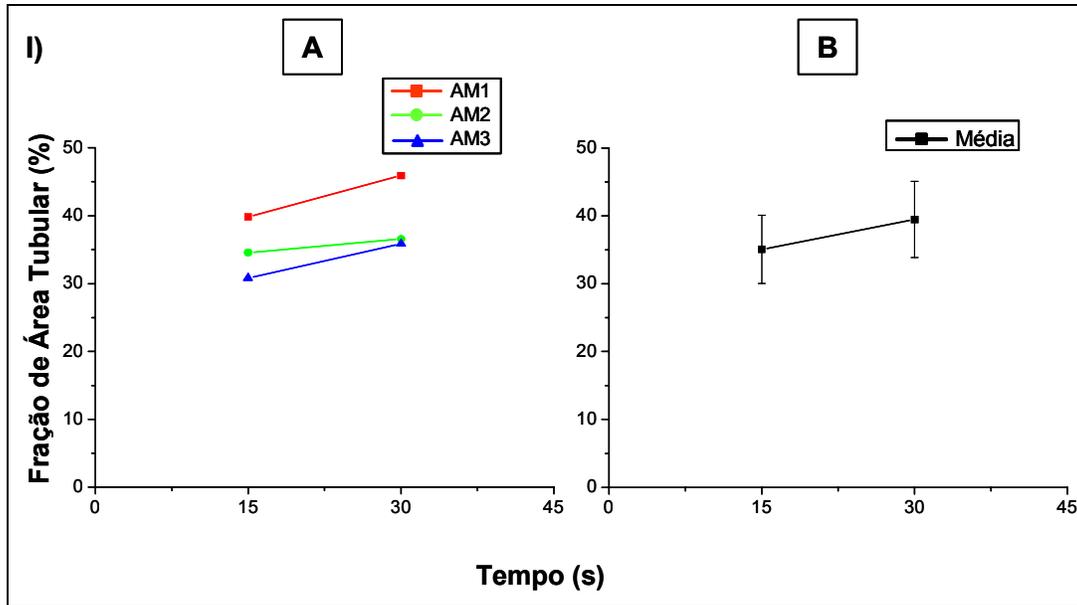


Figura 29: AC10% - Evolução dos parâmetros de *campo*: I) Fração de Área Tubular (%); II) Número de Túbulos. Para cada parâmetro temos: A) médias de cada amostra através do tempo; B) média e desvio padrão de todas as amostras através do tempo.

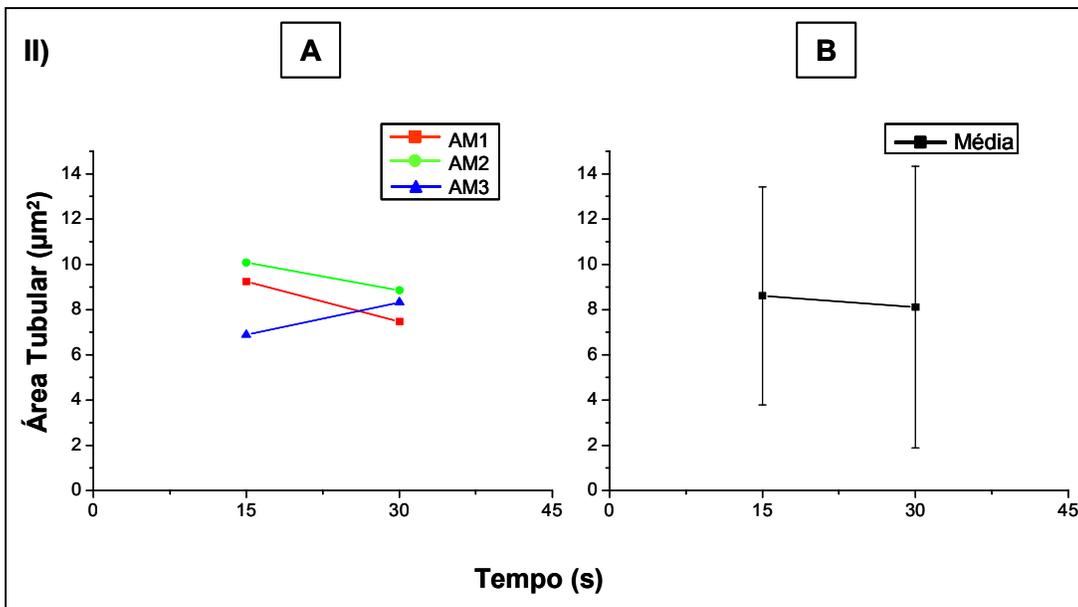
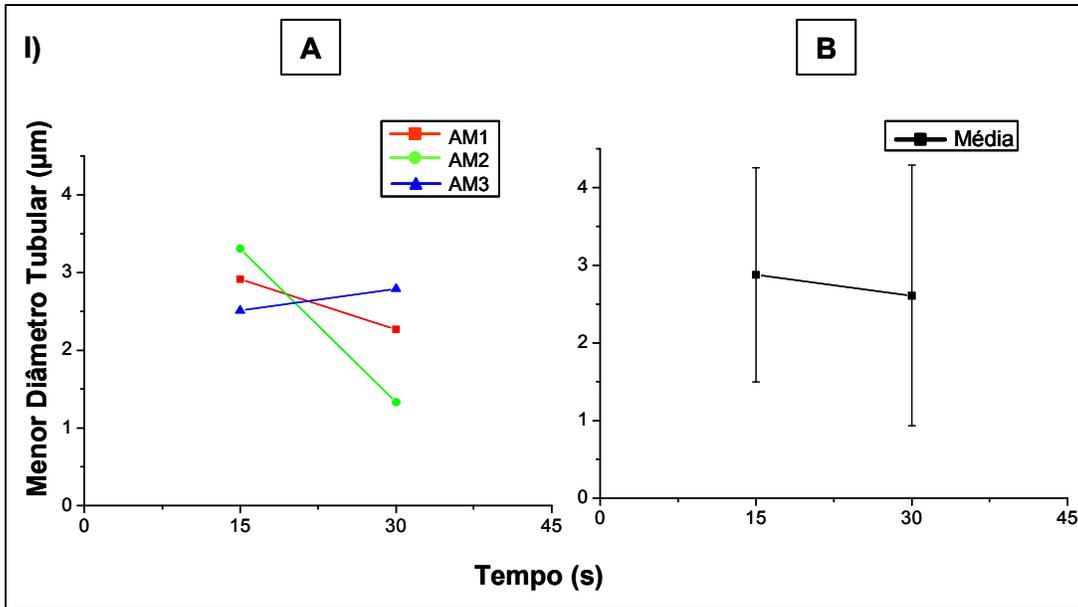


Figura 30: AC10% - Evolução dos parâmetros de região: I) Menor Diâmetro Tubular (μm); II) Área Tubular (μm^2). Para cada parâmetro temos: A) médias de cada amostra através do tempo; B) média e desvio padrão de todas as amostras através do tempo.

Tabela 8: Comparação estatística entre os tempos experimentais (t-test, $p < 0,05$).

AC10%	t (s)	15	30
Fração de Área Tubular	15		0,0002
	30		
Número de Túbulos	15		0,0008
	30		
Menor Diâmetro Tubular	15		≈ 0
	30		
Área Tubular	15		≈ 0
	30		

“N” significa que não há diferença estatisticamente significativa. O valor de p é apresentado quando há diferença significativa.

De-Deus (2004) também teve problemas para a captura de imagens de amostras de dentina sob ação do AC 10% utilizando o microscópio de força atômica. Assim, não foi capaz de analisar quantitativamente a desmineralização, mas, qualitativamente, observou intensa desmineralização após 50 s e aumento gradual da fração de área tubular até 200 s. A dificuldade para formação de imagem nesse caso foi relacionada à: (1) inclinação da superfície causada pelo preparo metalográfico; ou (2) rugosidade dentinária causada pelo processo de desmineralização; ou (3) excesso de partículas em suspensão dentro do dispositivo utilizado para o ataque ácido. Observando a Tabela 7 e a Figura 29 (I) é possível observar aumento da *fração de área tubular* com a evolução temporal, demonstrando que o processo de desmineralização aumenta com a evolução do tempo.

Inversamente, *menor diâmetro tubular* e *área tubular* diminuem com a evolução do tempo (Figura 30 e Tabela 7). Com o objetivo de analisar mais detalhadamente esses resultados aparentemente contraditórios, foram feitos histogramas desses dois parâmetros de região.

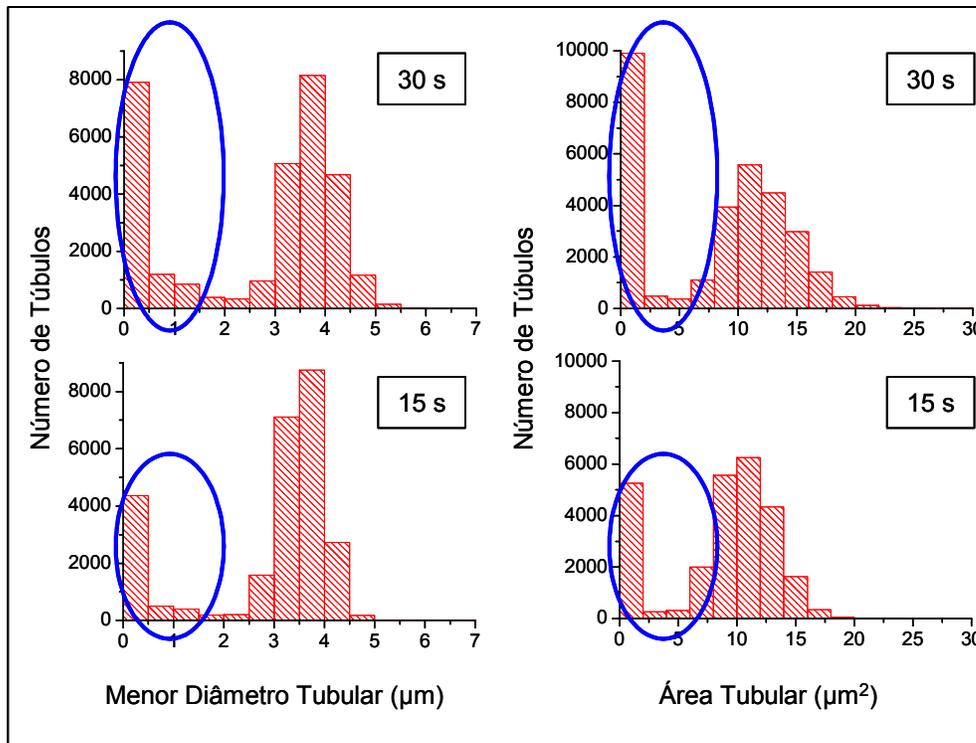


Figura 31: AC 10% - Histogramas dos parâmetros de Região

Todos os histogramas apresentam 2 picos bem definidos, o que demonstra 2 distribuições de tamanho médio dos túbulos. O pico relacionado aos túbulos com menores valores (demarcado em azul) aumenta com a evolução do tempo e os de maiores valores permanecem praticamente inalterados. Isso representa novos túbulos, de menor tamanho, detectados pelo PADI com a evolução do tempo (Figura 32). Esses pequenos túbulos devem ser os responsáveis pela redução da média final dos parâmetros de região. Coli *et al.* (1999) observaram, através de microscopia eletrônica de varredura, estruturas semelhantes a esses pequenos túbulos na dentina. Eles foram denominados canais secundários ou anastomoses, e foram observados apenas nos grupos em que o *smear layer* e o colágeno da matriz dentinária eram removidos, através do tratamento da superfície com ácido fosfórico e colagenase.

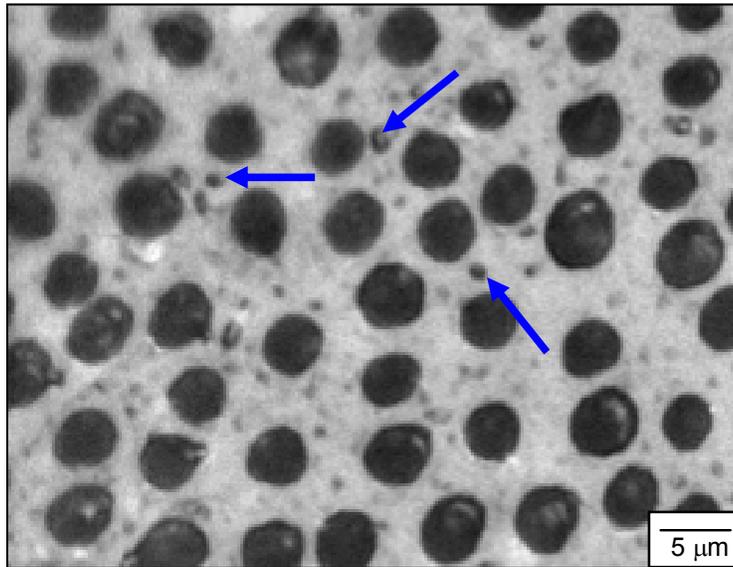


Figura 32: Túbulos pequenos expostos (setas azuis) com AC 10% após 30 s.

Scelza *et al.* (2000) observaram através de microscopia eletrônica de varredura que a utilização de AC 10% por 4 minutos era eficiente para remoção do *smear layer*, mas não relataram alterações na superfície dentinária. Breschi *et al.* (2002) também observaram remoção do *smear layer* e abertura dos túbulos dentinários utilizando solução de AC 10% por 30 s, mas constataram remanescentes no interior dos túbulos dentinários. Scelza *et al.* (2003) e Sterrett *et al.* (1993) observaram que a capacidade de remoção de cálcio pelo AC 10% é proporcional ao tempo de ataque ácido.

5.4 Grupo 4 - AC 5%

5.4.1 Microscopia Óptica Digital Co-localizada

Foram capturadas imagens de 15 campos de cada amostra do Grupo 4, após cada tempo experimental. A evolução do ataque ácido com AC 5% pode ser observada nas Figuras 33, 34 e 35. Em cada uma delas está apresentada uma seqüência de imagens capturadas de um mesmo campo, em cada tempo de ataque, representativa de cada amostra.

Após a primeira aplicação do AC 5% (15 s), a porção superficial do *smear layer* foi removida, expondo e alargando todos os orifícios dos túbulos dentinários da superfície. Contudo, é possível notar que alguns túbulos não foram completamente limpos, apresentando resquícios de *smear layer* no seu interior. Em alguns casos o quelante não foi capaz de remover essas impurezas até o final do experimento.

As imagens dos tempos experimentais de 180 s e 300 s da AM1 (Figura 33) não ficaram nítidas. As causas desse efeito devem ser as mesmas já explicadas no caso do AC 10%. Nas imagens de 30 s e 60 s é possível observar o aparecimento dos mesmos “túbulos” de menor diâmetro, também detectados no AC 10% e denominados de canais secundários, ou anastomoses por Coli *et al.* (1999)

A AM2 (Figura 34) também apresentou imagens sem nitidez após 60s, mas esse efeito desapareceu com a evolução do ataque ácido, como pode ser observado em 180 s e 300 s. Observando as imagens capturadas após esses tempos experimentais, parece que a solução não foi capaz de continuar a desmineralização, já que as duas imagens são muito semelhantes. Isso deve estar relacionado à características intrínsecas dessa amostra

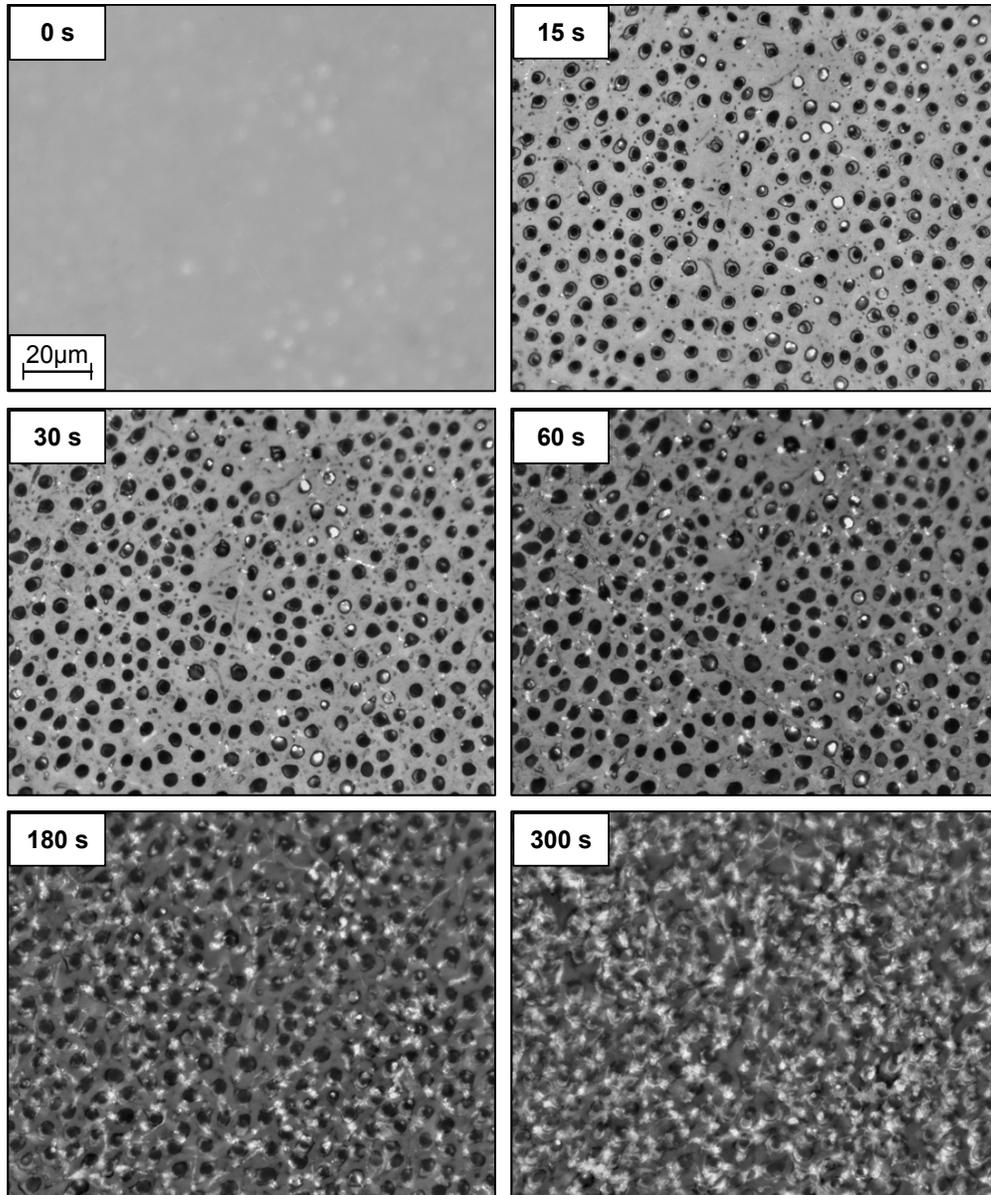


Figura 33: AC 5% - Imagens de um campo representativo da AM1 capturadas após os respectivos tempos de ataque.

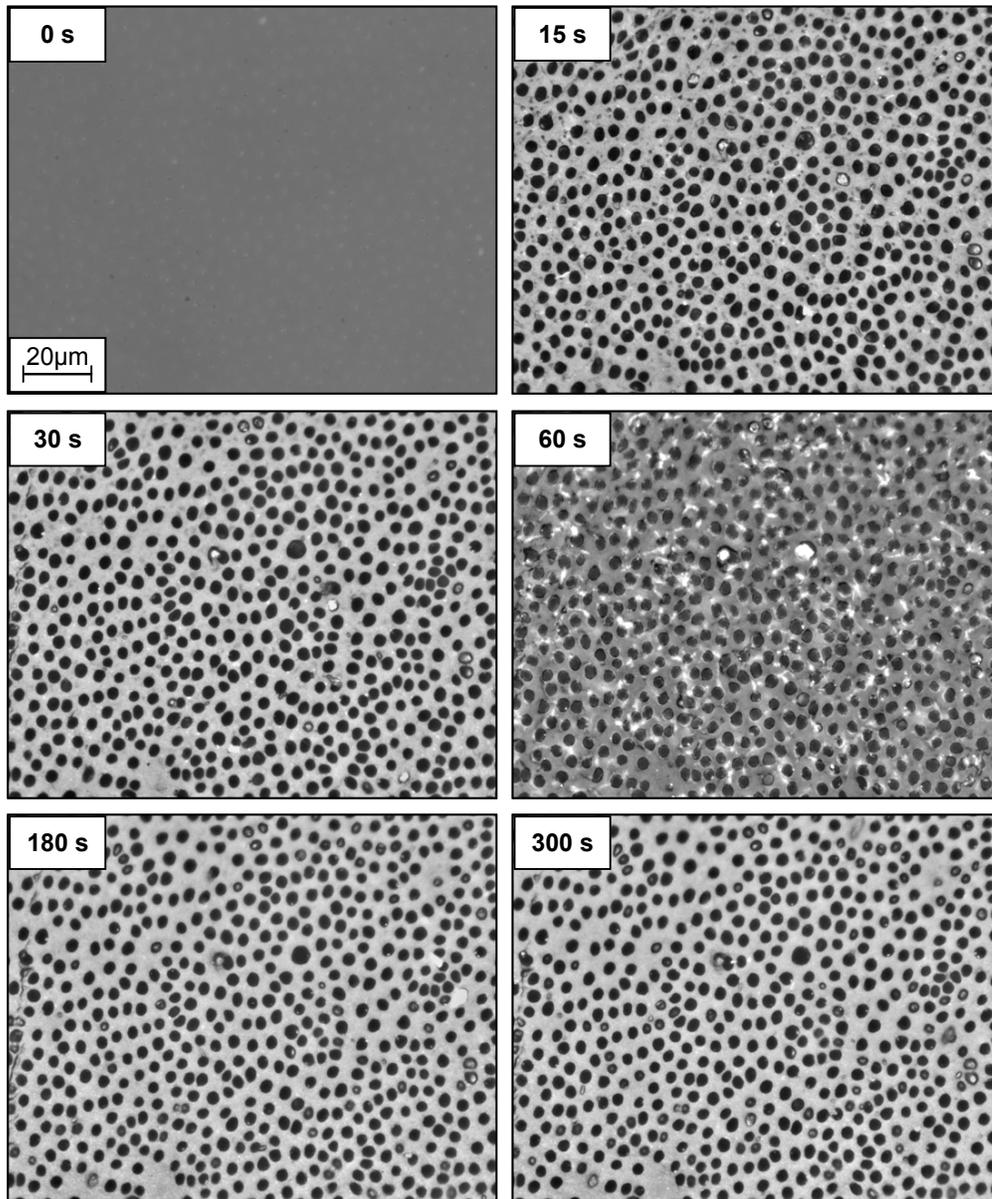


Figura 34: AC 5% - Imagens de um campo representativo da AM2, capturadas após os respectivos tempos de ataque.

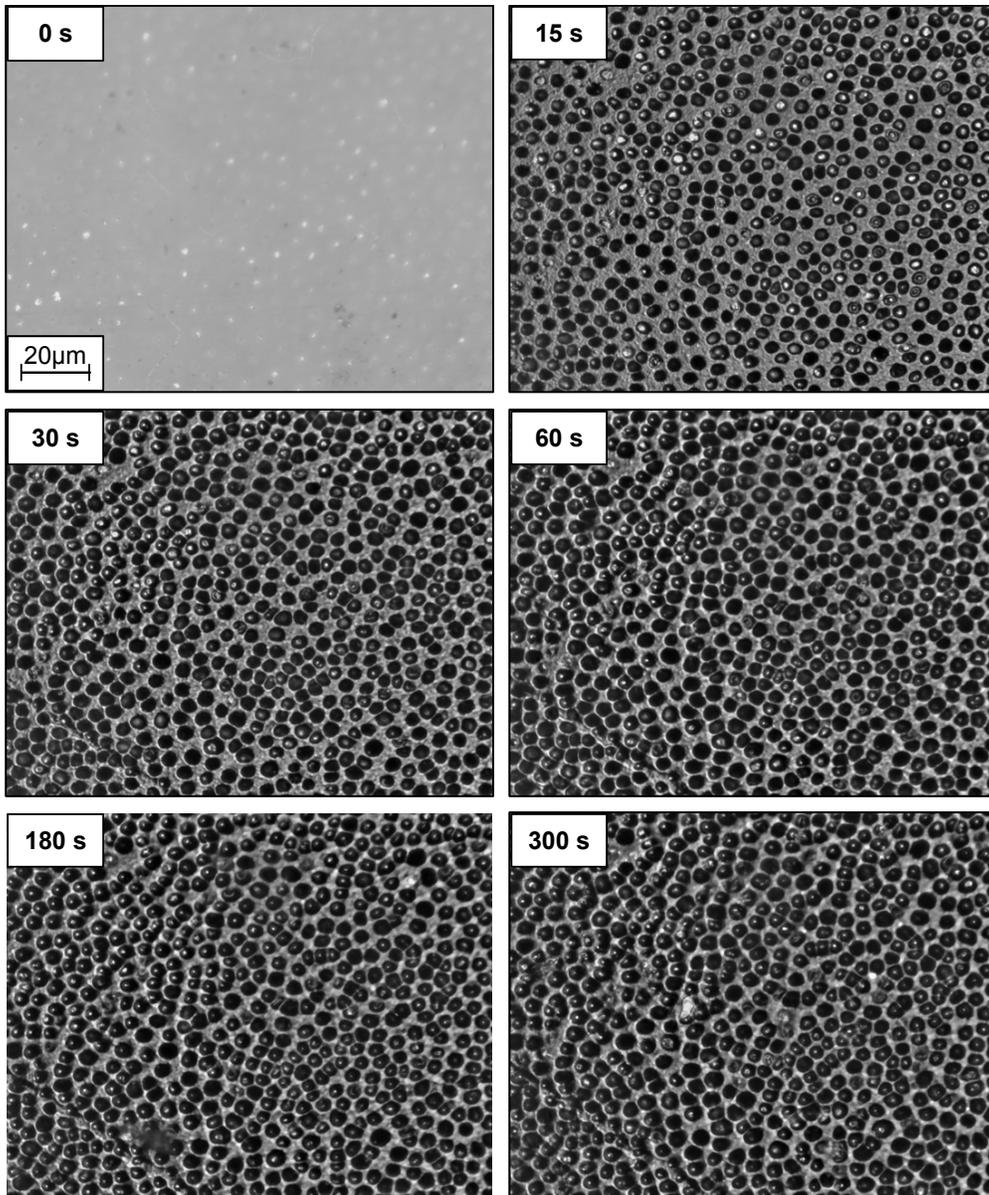


Figura 35: AC 5% - Imagens de um campo representativo da AM3, capturadas após os respectivos tempos de ataque.

5.4.2 Resultados gráficos e estatísticos

A Tabela 9 apresenta a média de cada parâmetro medido. Os valores apresentados para os parâmetros de campo são referentes à média dos valores de todos os campos, das 3 amostras em cada tempo. Devido à nitidez inadequada de algumas imagens, não foi possível realizar o PADI dos tempos experimentais 180 s e 300 s da AM1. Assim, “n” varia de 30 a 45 campos de acordo com o tempo experimental. Da mesma forma, o número de túbulos identificados pode variar para cada tempo de ataque, e o valor de “n” para os parâmetros de região está situado em uma faixa que varia de 17290 a 31984 túbulos.

Esses valores médios também estão apresentados graficamente nas Figuras 36B e 37B, e a comparação estatística entre os tempos experimentais, na Tabela 10.

Tabela 9: Valores médios de AC 5% após tempos experimentais.

t (s)	Fração de Área Tubular (%) <i>n = 30 a 45</i>	Número de Túbulos (#) <i>n = 30 a 45</i>	Menor Diâmetro Tubular (µm) <i>n = 17290 a 31984</i>	Área Tubular (µm ²) <i>n = 17290 a 31984</i>
0	0	0	0	0
15	33,42	602,5	3,00	8,70
30	36,94	631,8	2,96	9,14
60	38,22	776,4	2,52	7,58
180	42,82	637,9	3,21	10,47
300	43,13	642,2	3,20	10,48

Como pode ser observado na Figura 36, a média da *fração de área tubular* demonstra evolução do processo de desmineralização, apesar de AM2 apresentar um comportamento diferente, inclusive com diminuição dos valores desse mesmo parâmetro após 60 s. Não foram encontradas diferenças significativas entre tempos experimentais consecutivos. Após 30 s de ataque só foi observada diferença significativa entre 30-300 s. Além disso, após 60 s de ataque, também não há diferença significativa entre os tempos experimentais.

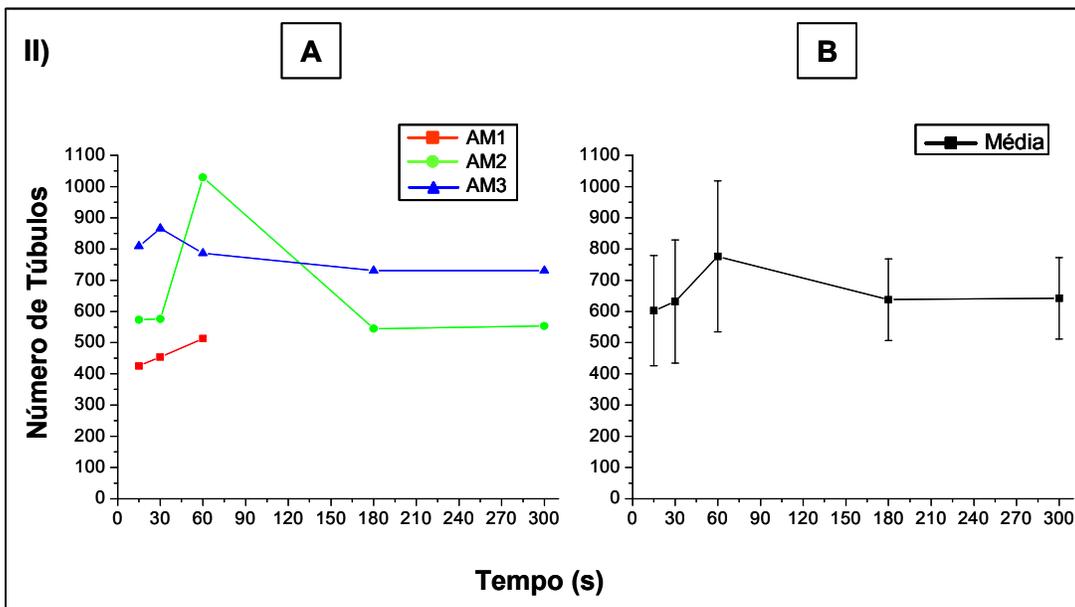
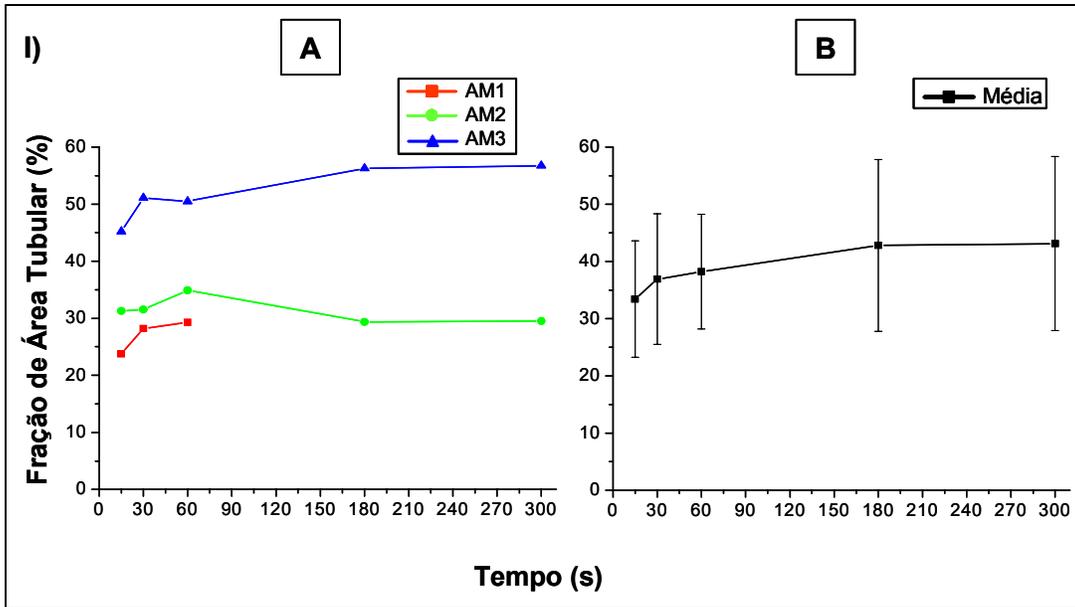


Figura 36: AC 5% - Evolução dos parâmetros de *campo*: I) Fração de Área Tubular (%); II) Número de Túbulos. Para cada parâmetro temos: A) médias de cada amostra através do tempo; B) média e desvio padrão de todas as amostras através do tempo.

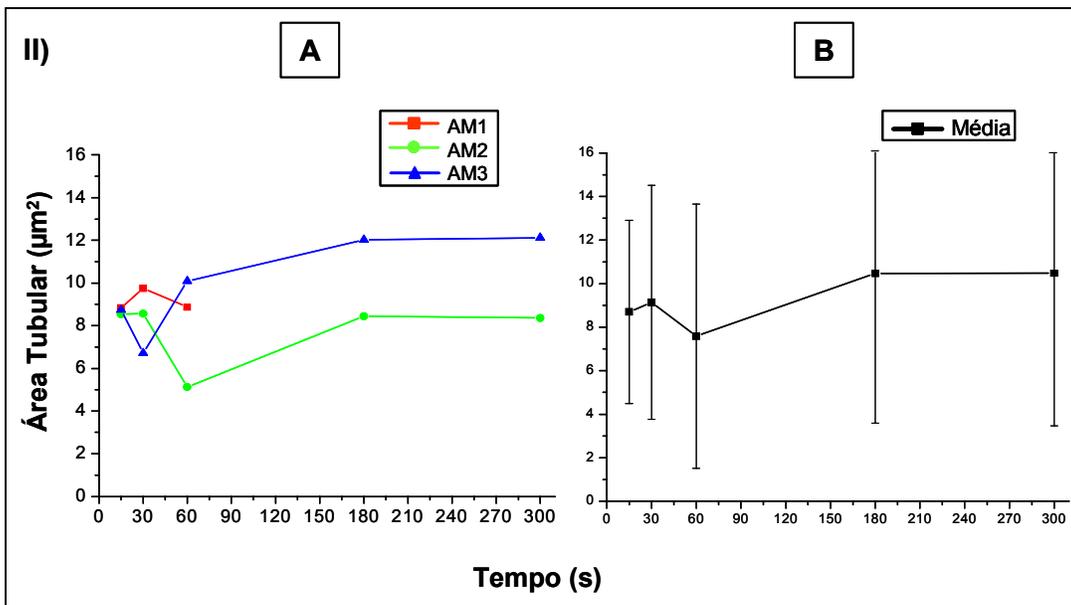
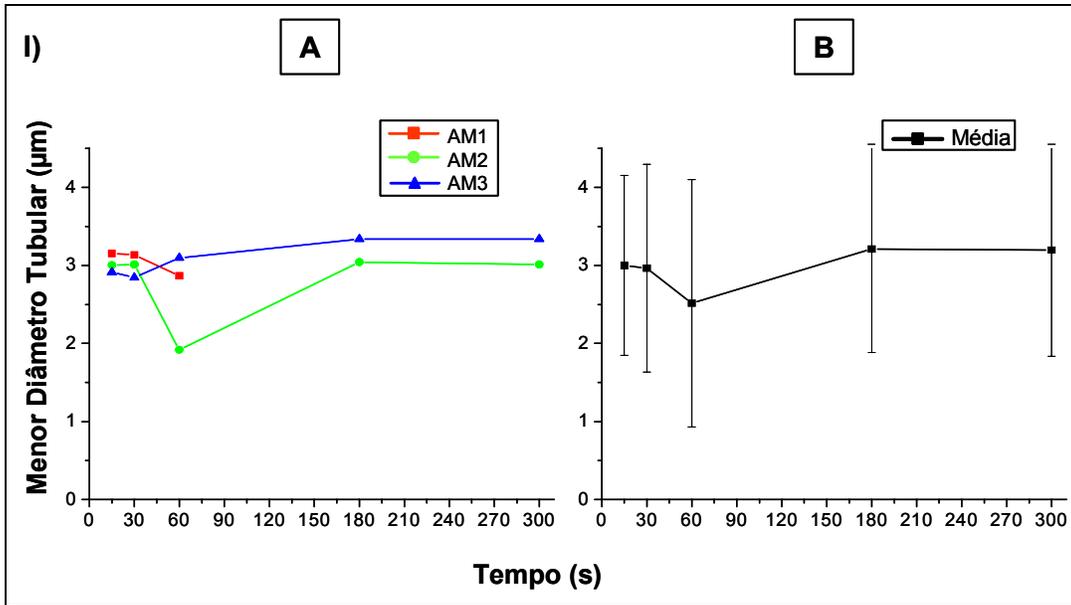


Figura 37: AC 5% - Evolução dos parâmetros de região: I) Menor Diâmetro Tubular (μm); II) Área Tubular (μm^2). Para cada parâmetro temos: A) médias de cada amostra através do tempo; B) média e desvio padrão de todas as amostras através do tempo.

Tabela 10: Comparação estatística entre os tempos experimentais (t-test, $p < 0,05$).

AC 5%	t (s)	15	30	60	180	300
Fração de Área Tubular	15		N	0,026	0,001	0,001
	30			N	N	0,048
	60				N	N
	180					N
	300					
Número de Túbulos	15		N	0,0002	N	N
	30			0,0025	N	N
	60				0,0054	0,0069
	180					N
	300					
Menor Diâmetro Tubular	15		= 0,0019	0	≈ 0	≈ 0
	30			≈ 0	≈ 0	≈ 0
	60				0	0
	180					N
	300					
Área Tubular	15		≈ 0	≈ 0	≈ 0	≈ 0
	30			≈ 0	≈ 0	≈ 0
	60				0	0
	180					N
	300					

“N” significa que não há diferença estatisticamente significativa. O valor de p é apresentado quando há diferença significativa.

Na AM2 o *número de túbulos* aumenta drasticamente no intervalo 30-60 s. Inversamente, os parâmetros de região apresentam redução acentuada de seus valores. É justamente no tempo experimental de 60 s que a qualidade da imagem não é boa, o que pode ter resultado na formação de falsas fronteiras dentro dos túbulos e, conseqüentemente, aumento do *número de túbulos* e diminuição dos valores de *menor diâmetro tubular* e *área tubular* (ver explicação na página 72). Esse mesmo efeito pode ser observado, de forma mais amena, em determinados intervalos de tempo das outras amostras.

Assim, nesse caso, a fração de área tubular se mostrou o parâmetro mais consistente para avaliação do efeito do AC 5%. Como já foi comentado anteriormente, a solução é capaz de alargar os túbulos dentinários, após somente 15 s. O processo evolui com menor intensidade até 60 s e depois praticamente se estabiliza até 300 s de ataque ácido. Haznedaroglu (2003) observou efeito semelhante do AC 5% com pH 1,9, que foi capaz de remover o *smear layer* e alargar os orifícios dos túbulos dentinários após 2 minutos de exposição.

5.5 Grupo 5 - AC 1%

5.5.1 Microscopia Óptica Digital Co-localizada

Foram capturadas imagens de 15 campos de cada amostra do Grupo 5, após cada tempo experimental. A evolução do ataque ácido com AC 1% pode ser observada nas Figuras 38, 39 e 40. Em cada uma delas está apresentada uma seqüência de imagens capturadas de um mesmo campo, em cada tempo de ataque, representativa de cada amostra.

Após a primeira aplicação do AC 1% (15 s), a porção superficial do *smear layer* foi removida, expondo e alargando todos os orifícios dos túbulos dentinários da superfície. Contudo, é possível notar que alguns túbulos não foram completamente limpos, apresentando resquícios de *smear layer* no seu interior. Em alguns casos o quelante não foi capaz de remover essas impurezas até o final do experimento.

Observando a AM1 também é possível notar o aparecimento dos “canais secundários”, ou “anastomoses” observados em amostras dos grupos das soluções de AC 10% e AC 5%.

Ao contrário das outras soluções mais concentradas de AC analisadas nesse estudo, apenas na AM1, após 300 s, pode ser notada uma pequena falta de nitidez da imagem.

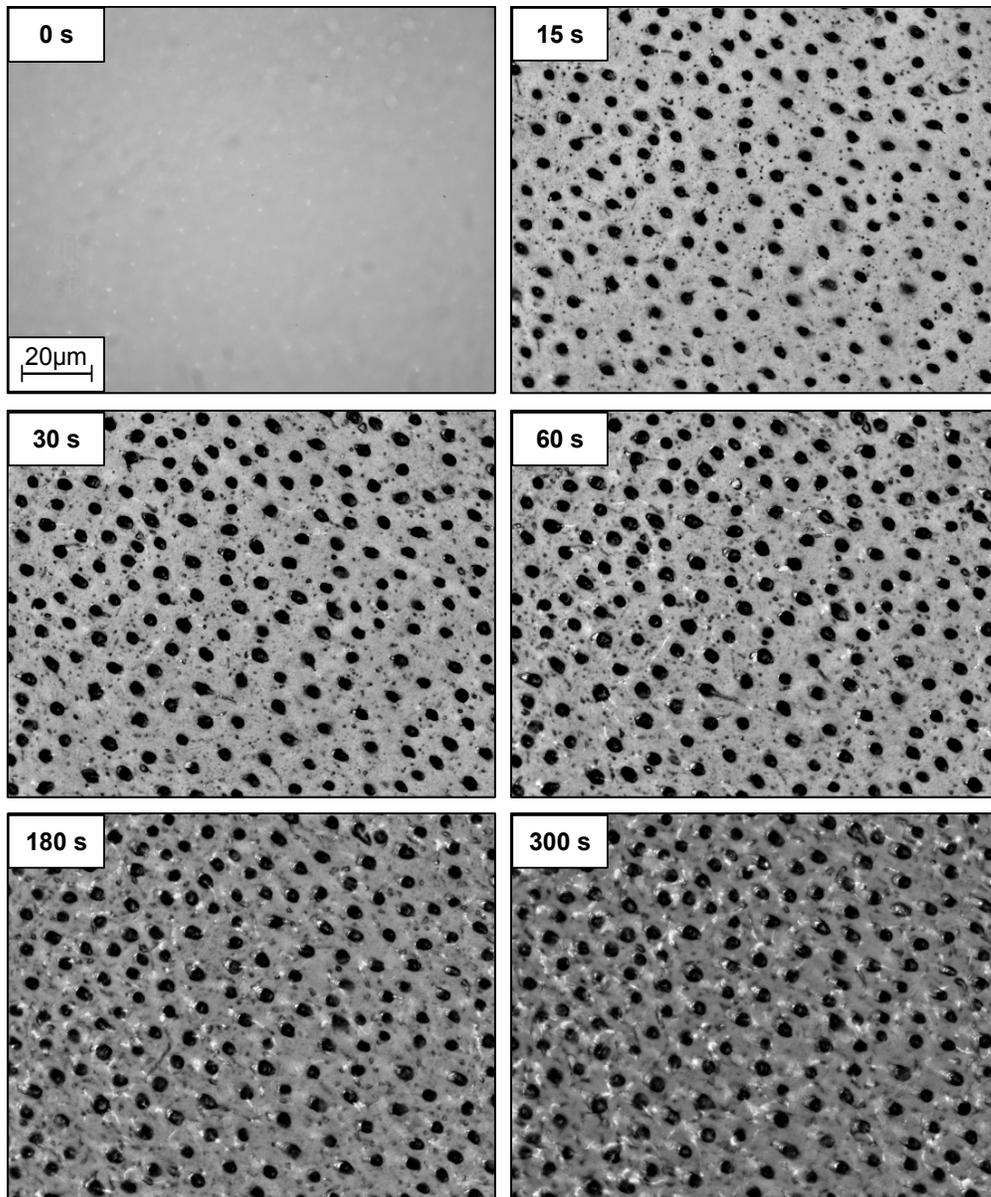


Figura 38: AC 1% - Imagens de um campo representativo da AM1 capturadas após os respectivos tempos de ataque.

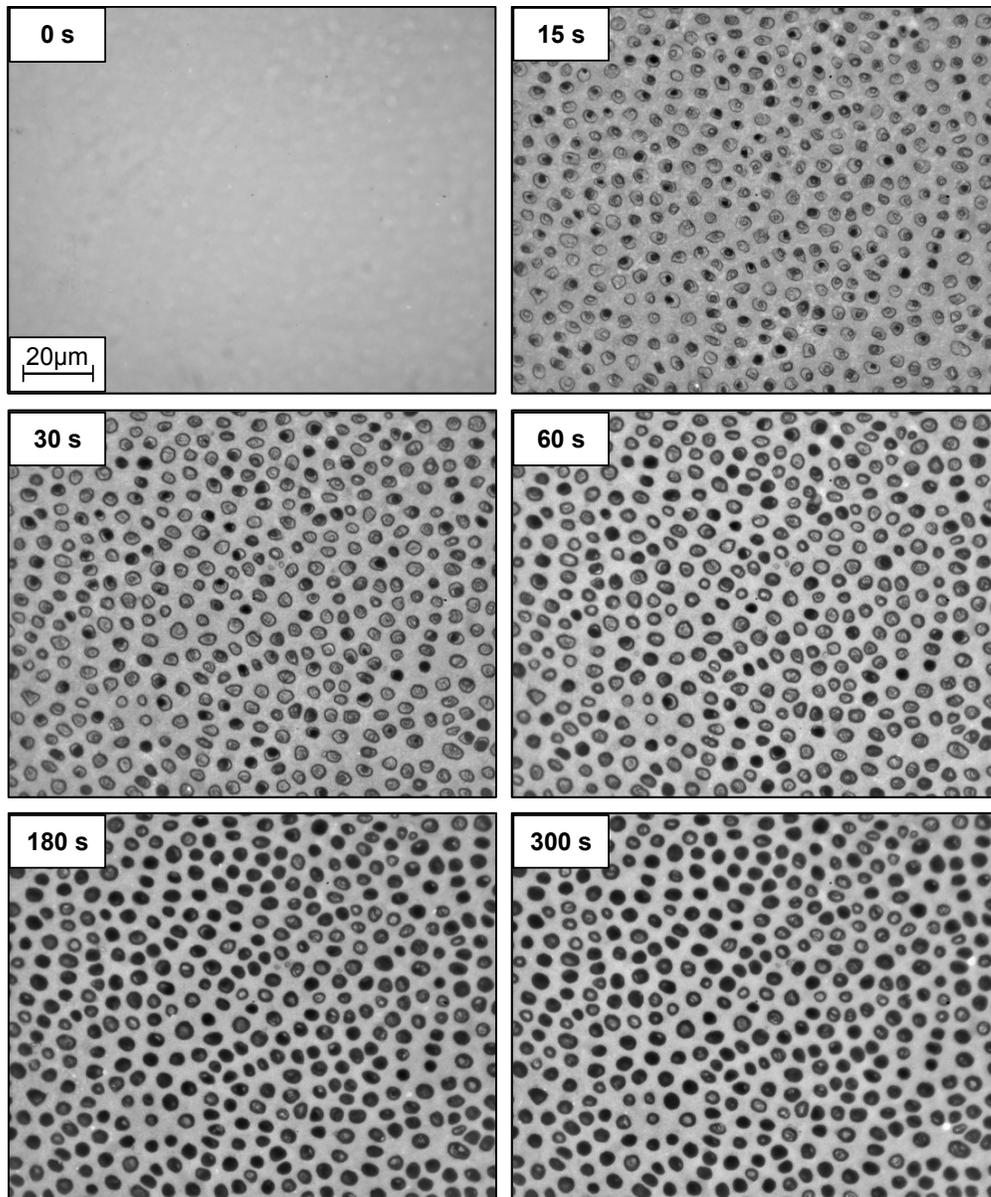


Figura 39: AC 1% - Imagens de um campo representativo da AM2 capturadas após os respectivos tempos de ataque.

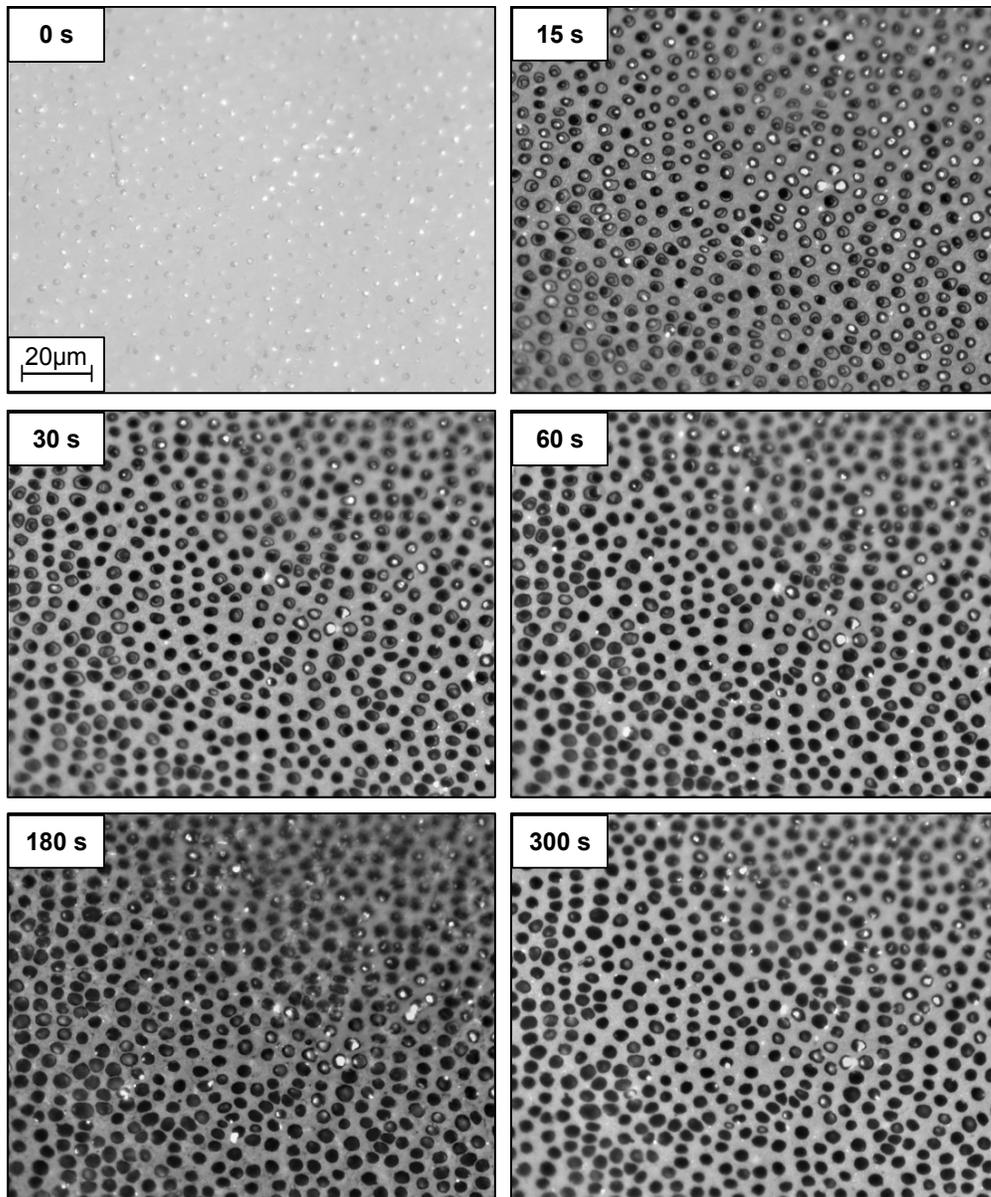


Figura 40: AC 1% - Imagens de um campo representativo da AM3 capturadas após os respectivos tempos de ataque.

5.5.2 Resultados gráficos e estatísticos

A Tabela 11 apresenta a média de cada parâmetro medido. Os valores apresentados para os parâmetros de campo são referentes à média dos valores de todos os campos, das 3 amostras em cada tempo, obtendo $n = 45$ campos. Os valores dos parâmetros de região se referem às médias de todos os túbulos, em todos os campos, das 3 amostras em cada tempo. Como o número de túbulos identificados pode variar para cada tempo de ataque, o valor de “n” para os parâmetros de região está situado em uma faixa que varia de 25395 a 29905 túbulos, dependendo do tempo analisado.

Esses valores médios também estão apresentados graficamente nas Figuras 41B e 42B, e a comparação estatística entre os tempos experimentais, na Tabela 12.

Tabela 11: Valores médios de AC 1% após tempos experimentais.

t (s)	Fração de Área Tubular (%) <i>n = 45</i>	Número de Túbulos (#) <i>n = 45</i>	Menor Diâmetro Tubular (μm) <i>n = 25395 a 29905</i>	Área Tubular (μm^2) <i>n = 25395 a 29905</i>
0	0	0	0	0
15	21,05	715,5	1,98	4,56
30	25,25	628,6	2,40	6,28
60	27,29	653,1	2,41	6,52
180	32,12	620,5	2,69	8,08
300	33,24	573,9	2,74	8,27

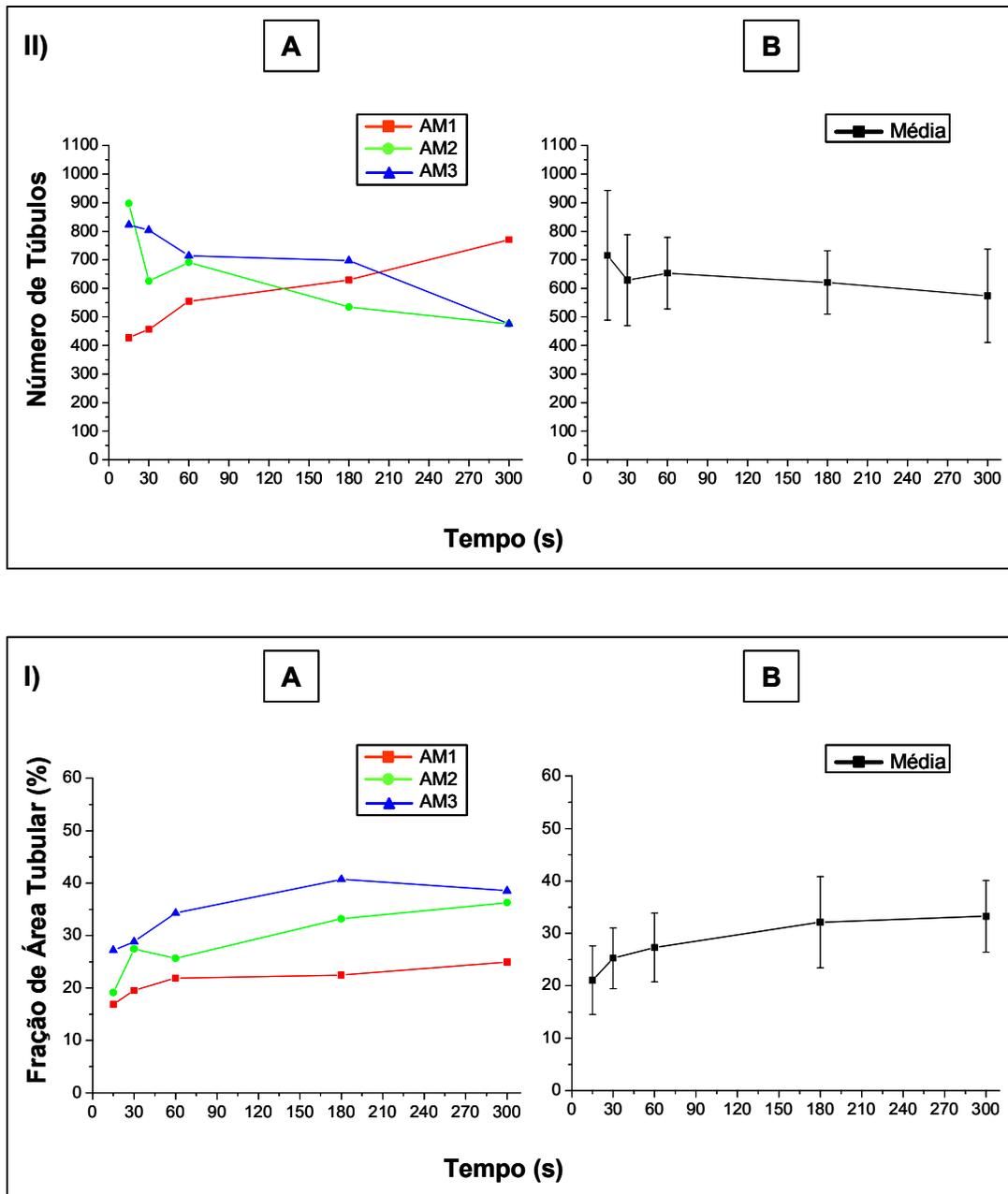


Figura 41: AC 1% - Evolução dos parâmetros de *campo*: I) Fração de Área Tubular (%); II) Número de Túbulos. Para cada parâmetro temos: A) médias de cada amostra através do tempo; B) média e desvio padrão de todas as amostras através do tempo.

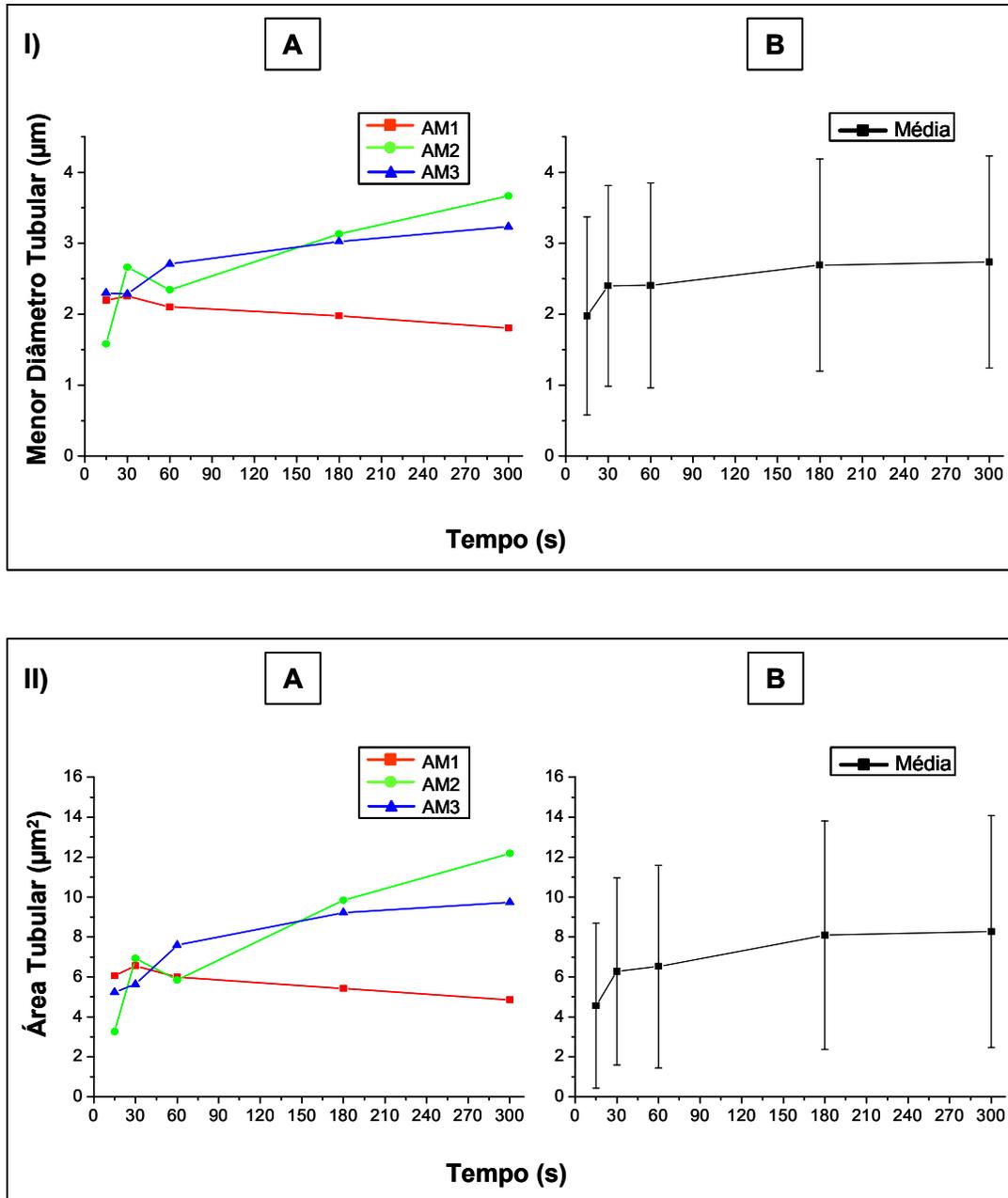


Figura 42: AC 1% - Evolução dos parâmetros de região I: I) Menor Diâmetro Tubular (μm); II) Área Tubular (μm^2). Para cada parâmetro temos: A) médias de cada amostra através do tempo; B) média e desvio padrão de todas as amostras através do tempo.

Tabela 12: Comparação estatística entre os tempos experimentais (t-test, $p < 0,05$).

AC 1%	t (s)	15	30	60	180	300
Fração de Área Tubular	15		0,001	0,00001	≈ 0	≈ 0
	30			N	0,00002	≈ 0
	60				0,003	0,00005
	180					N
	300					
Número de Túbulos	15		0,03	N	0,01	0,001
	30			N	N	N
	60				N	0,01
	180					N
	300					
Menor Diâmetro Tubular	15		≈ 0	≈ 0	0	0
	30			N	≈ 0	≈ 0
	60				≈ 0	≈ 0
	180					0,001
	300					
Área Tubular	15		0	0	0	0
	30			≈ 0	0	0
	60				≈ 0	0
	180					0,0001
	300					

“N” significa que não há diferença estatisticamente significativa. O valor de p é apresentado quando há diferença significativa.

Todos os parâmetros, com exceção do *número de túbulos*, aumentam com a evolução do ataque ácido. Em AM1 e AM2 os parâmetros de região diminuem no intervalo 30-60 s, justamente no intervalo no qual o *número de túbulos* aumenta, o que justifica a redução do *menor diâmetro tubular* e da *área tubular* (explicação detalhada na página 93).

Existem poucos relatos na literatura da análise de soluções de AC 1%. Machado-Silveiro *et al.* (2004) observaram a descalcificação na dentina através da imersão em AC 1% em 5, 10 e 15 minutos. Os resultados revelaram que a capacidade de desmineralização diminuiu com o tempo.

5.6 Análise Quantitativa entre os Grupos Experimentais

Todas as soluções demonstraram a remoção da camada superficial do *smear layer* expondo os orifícios dos túbulos após 15 s para as soluções de AC e EDTA e após 300 s para o EDTAC. Contudo, em algumas amostras ainda era possível notar a presença de resquícios de *smear layer* no interior dos túbulos dentinários. A evolução do ataque ácido para as soluções de AC e para o EDTA causaram o alargamento desses túbulos, mas muitas vezes, mesmo após 300 s de ataque ácido, as soluções não foram capazes de limpá-los completamente.

Os dados quantitativos obtidos e já apresentados para cada grupo, permite também uma análise comparativa entre as diferentes soluções utilizadas.

O *número de túbulos*, como já foi discutido anteriormente, não se apresentou como um parâmetro apropriado para a caracterização da evolução do ataque ácido através do tempo. A *área tubular* e o *menor diâmetro tubular* apresentaram comportamentos similares ao longo do experimento.

Assim, foram escolhidos dois parâmetros, um de campo e um de região, para esse tipo de análise: *fração de área tubular* e *menor diâmetro tubular*, respectivamente. As médias desses parâmetros, já apresentadas em seus respectivos grupos, foram reunidas nas Figuras 43 e 44.

A análise estatística de cada parâmetro, entre as substâncias, em cada tempo de ataque, está apresentada nas Tabelas 13 e 14.

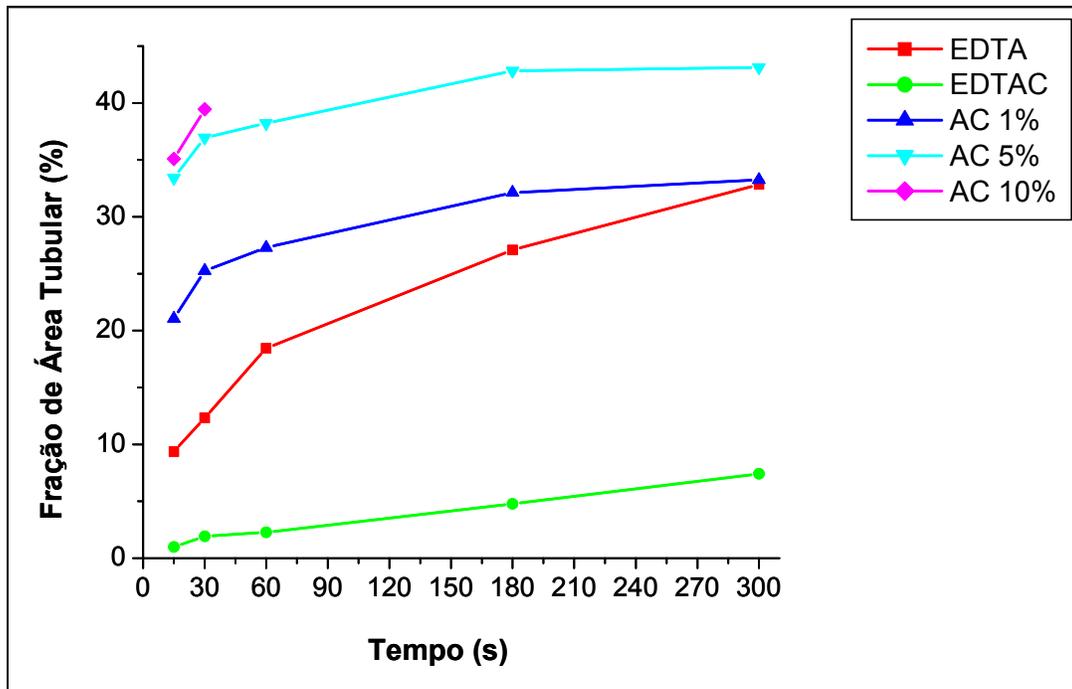


Figura 43: Evolução da *fração de área tubular* através do tempo em todas as soluções.

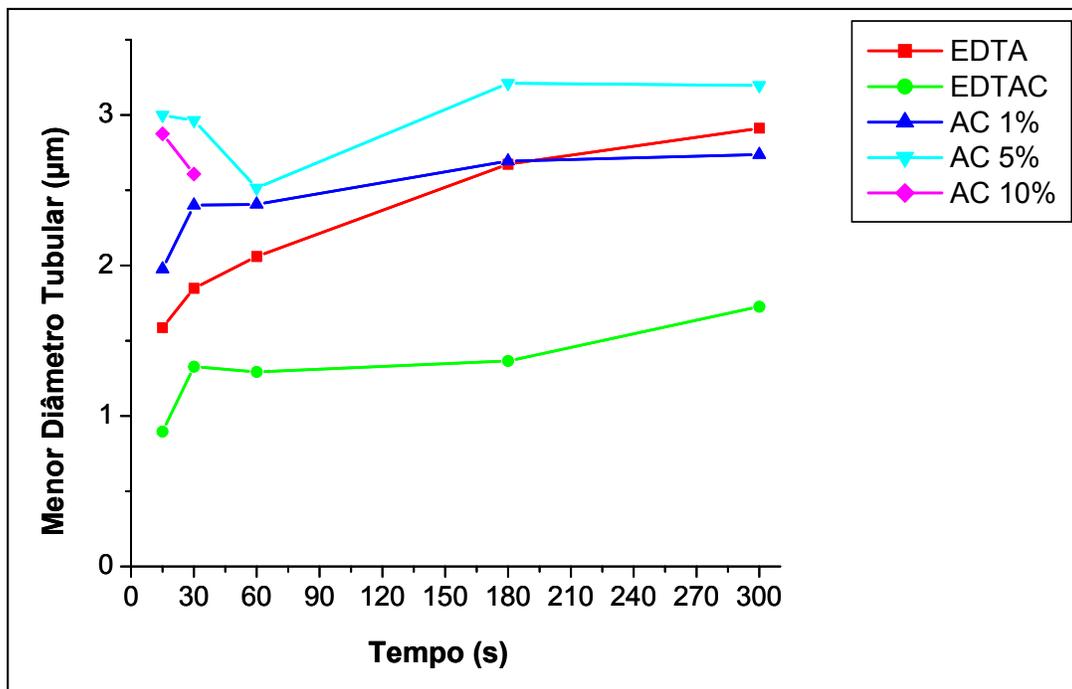


Figura 44: Evolução do *menor diâmetro tubular* através do tempo em todas as soluções.

Tabela 13: **Fração de área tubular** - Comparação estatística entre as soluções (grupos) em cada tempo experimental (t-test, $p < 0,05$).

t (s)	t (s)	EDTAC	EDTA	AC 1%	AC 5%	AC 10%
15	EDTAC		≈ 0	≈ 0	≈ 0	≈ 0
	EDTA			≈ 0	≈ 0	≈ 0
	AC 1%				≈ 0	≈ 0
	AC 5%					N
	AC 10%					
30	EDTAC		≈ 0	≈ 0	≈ 0	≈ 0
	EDTA			≈ 0	≈ 0	≈ 0
	AC 1%				≈ 0	≈ 0
	AC 5%					N
	AC 10%					
60	EDTAC		≈ 0	≈ 0	≈ 0	
	EDTA			≈ 0	≈ 0	
	AC 1%				≈ 0	
	AC 5%					
	AC 10%					
180	EDTAC		≈ 0	≈ 0	≈ 0	
	EDTA			0,003	≈ 0	
	AC 1%				0,0002	
	AC 5%					
	AC 10%					
300	EDTAC		≈ 0	≈ 0	≈ 0	
	EDTA			N	0,02	
	AC 1%				0,0002	
	AC 5%					
	AC 10%					

“N” significa que não há diferença estatisticamente significativa. O valor de p é apresentado quando há diferença significativa.

Tabela 14: **Menor diâmetro tubular** - Comparação estatística entre as soluções (grupos) em cada tempo experimental (t-test, $p < 0,05$).

t (s)	t (s)	EDTAC	EDTA	AC 1%	AC 5%	AC 10%
15	EDTAC		0	0	0	0
	EDTA			0	0	0
	AC 1%				0	0
	AC 5%					0
	AC 10%					
30	EDTAC		0	0	0	0
	EDTA			0	0	0
	AC 1%				0	0
	AC 5%					0
	AC 10%					
60	EDTAC		0	0	0	
	EDTA			≈ 0	0	
	AC 1%				≈ 0	
	AC 5%					
	AC 10%					
180	EDTAC		0	0	0	
	EDTA			0,01	0	
	AC 1%				≈ 0	
	AC 5%					
	AC 10%					
300	EDTAC		0	0	0	
	EDTA			≈ 0	≈ 0	
	AC 1%				≈ 0	
	AC 5%					
	AC 10%					

“N” significa que não há diferença estatisticamente significativa. O valor de p é apresentado quando há diferença significativa.

O *menor diâmetro tubular* apresenta reduções de valores em determinados intervalos de tempo, referentes às soluções de AC, como pode ser observado graficamente. Essas inconsistências nas médias são relacionadas principalmente ao aparecimento dos canais acessórios, ou anastomoses, da estrutura da matriz dentinária. Na literatura, apenas Coli *et al.* (1999) cita a presença desses canais secundários, sem fornecer maiores detalhes sobre o que são, para que servem, quais as possíveis causas de seu aparecimento e os seus efeitos na estrutura da dentina. No presente estudo, a presença dos canais secundários pode estar relacionada a um processo diferenciado de desmineralização da dentina, sob o efeito do AC em relação a outras soluções, ou então uma simples coincidência. Os

efeitos dos agentes quelantes, nos diferentes componentes da dentina durante o processo de desmineralização, ainda não foram completamente elucidados (Verdelis *et al.*, 1999). Outros estudos são necessários para melhores esclarecimentos sobre este comportamento.

A análise da *fração de área tubular* (Figura 43 e Tabela 13) revela que o EDTAC apresentou-se como a solução quelante menos potente, e as soluções de AC, em todas as concentrações utilizadas, apresentaram maior poder de quelação. As soluções de AC 1% e EDTA apresentaram efeitos similares após 300 s de ataque ácido, não sendo encontrada diferença significativa entre essas soluções (Tabela 13).

Resultados semelhantes foram encontrados por Machado-Silveiro *et al.* (2004), que, utilizando o método de espectrofotometria, observaram que as soluções de AC 1% e 10% causaram maior descalcificação da dentina que o EDTA 17%. De-Deus (2004) e De-Deus *et al.* (2006b), através de microscopia de força atômica, também observaram que a *fração de área tubular* era maior para o AC 10%, seguida pelo EDTA e pelo EDTAC, nessa ordem.

O EDTA geralmente é utilizado em uma concentração de 17% (O'Connell *et al.*, 2000), mas diferentes concentrações de AC são recomendadas. Nesse estudo, todas as concentrações de AC utilizadas (1%, 5% e 10%) foram eficientes para remover o *smear layer* e realizar a desmineralização da superfície dentinária. Os resultados encontrados foram os esperados, pois são proporcionais às respectivas concentrações de cada solução. Outros estudos comprovam a capacidade do AC, em diferentes concentrações, de remover o *smear layer* e realizar a desmineralização dentinária (Sterrett *et al.*, 1983; Yamada *et al.*, 1983; Hennequin *et al.*, 1994; Scelza *et al.*, 2003).

Novamente, analisando a *fração de área tubular* (Tabela 13), não foram encontradas diferenças significativas entre AC 5% e AC 10% após 15 s e 30 s. Esses resultados confirmam dados semelhantes encontrados por Haznedaroglu (2003) e Götze *et al.* (2005) que, através de *scores* de imagens de microscopia eletrônica de varredura, não encontraram diferenças significativas entre os efeitos causados por soluções de AC em diferentes concentrações (de 4% a 10%). O resultado obtido por Machado-Silveiro (2004) contradizem parcialmente esse estudo, pois o autor constatou que o AC 10% foi capaz de promover mais que o dobro da descalcificação do AC 1% após 15 minutos de ataque ácido. No presente

estudo, a *fração de área tubular* atingiu 39,45% para o AC 10% após 30 s. Isso representa apenas 14,20% a mais que o AC 1% no mesmo tempo experimental.

Von der Fehr & Nygaard-Øtsby (1963), sugeriram a utilização do EDTAC, com o objetivo de melhorar a qualidade de limpeza do canal radicular. O objetivo do detergente é reduzir a tensão superficial da solução permitindo o melhor molhamento da superfície dentinária. Fairbanks *et al.* (1995) relataram que a solução de EDTAC promoveu a maior redução da microdureza dentinária em relação ao EDTA. Ao contrário, o presente estudo demonstrou que para qualquer parâmetro medido, em qualquer tempo experimental, o EDTAC foi a solução que apresentou menor efeito. Zehnder *et al.* (2005) demonstraram que a redução da tensão superficial de substâncias quelantes não aumenta a remoção de íons cálcio da dentina, provavelmente porque esses detergentes diminuem a capacidade de quelação das soluções. Isso deve explicar resultados semelhantes ao do presente estudo, obtidos em outras investigações, utilizando associações de quelantes com detergentes. (Sampaio *et al.*, 2003; Scelza *et al.*, 2004; De-Deus 2004 ; De-Deus *et al.*, 2006a; De-Deus *et al.*, 2006b).

5.7 Microscopia Eletrônica de Varredura Ambiental

O Microscópio Eletrônico de Varredura Ambiental (MEVA) permitiu a análise longitudinal do processo de desmineralização, já que esse tipo de microscopia, ao contrário da técnica tradicional, permite a observação de amostras biológicas sem a metalização da superfície. Apesar do software, que controla mecanicamente o MEVA, guardar as posições iniciais x-y de cada amostra, não foi possível reproduzir com exatidão essas mesmas posições ao longo do experimento. Entretanto, essa também é uma metodologia inovadora que trouxe informações relevantes para o estudo.

Inicialmente, utilizando magnificação de 2000X, a imagem de um campo da AM4 de cada grupo foi capturada, demonstrando a presença de *smear layer* cobrindo os túbulos dentinários (Figura 45).

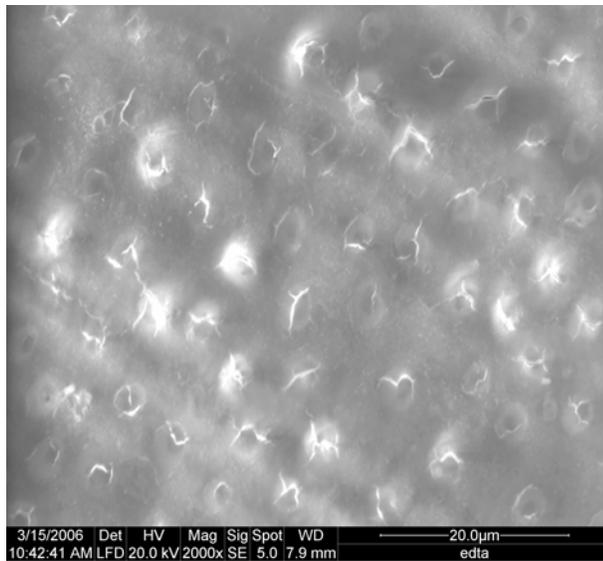


Figura 45: Exemplo de uma imagem em $t = 0$ s do MEVA.

Após os procedimentos descritos na seção de Materiais e Métodos (Capítulo 4.7), imagens de campos próximos aos iniciais foram capturadas em magnificações de 1000X e 2000X. A seguir serão apresentadas imagens após 180 s de ataque ácido, nas duas magnificações, com o objetivo de demonstrar os efeitos dessas soluções.

Ao contrário do que foi observado na microscopia óptica, o EDTA só foi capaz de remover o *smear layer* após 60 s, com exposição de todos os túbulos dentinários, que se tornaram levemente alargados após 180 s e 300 s (Figura 46-

A e B). Esses resultados estão de acordo com os apresentados em outros estudos que utilizaram a microscopia eletrônica de varredura tradicional (Menezes *et al.*, 2003; Perez & Rouqueyrol-Pourcel, 2005). Teixeira *et al.* (2005) relataram a capacidade de remoção do *smear layer* pelo EDTA após 60 s nos terços cervical, médio e apical, e alargamento dos túbulos dentinários após 3 e 5 minutos de ataque ácido. Çalt & Serper (2002) realizaram um estudo com o objetivo de avaliar a relação tempo/efeito da solução de EDTA 17%: 1 minuto de aplicação do EDTA foi suficiente para remoção do *smear layer*, enquanto 10 minutos resultaram em erosão da dentina peritubular e intertubular. No presente estudo, até 5 minutos, não foram observados esses efeitos erosivos na superfície da amostra amostra.

O EDTAC apresentou capacidade de remoção de *smear layer* após 180s. Os túbulos dentinários não foram alargados e a presença de dentina peritubular pôde ser observada em praticamente todos os túbulos da superfície analisada, mesmo após 300 s (Figura 46 - C e D).

A captura de imagens através do MEVA é um processo complexo, principalmente em amostras biológicas. Nesse caso em especial, a formação da imagem é ainda mais delicada, pois o contraste entre a dentina e os túbulos é muito baixo nos tempos iniciais de ataque. Assim, algumas imagens capturadas apresentaram qualidade apenas razoável. Além disso, outro fator que parece influenciar muito a qualidade da imagem é a inclinação dos túbulos dentinários na superfície da amostra. Esses dois fatores podem ser responsáveis pelos diferentes resultados observados na microscopia óptica e a na microscopia eletrônica de varredura.

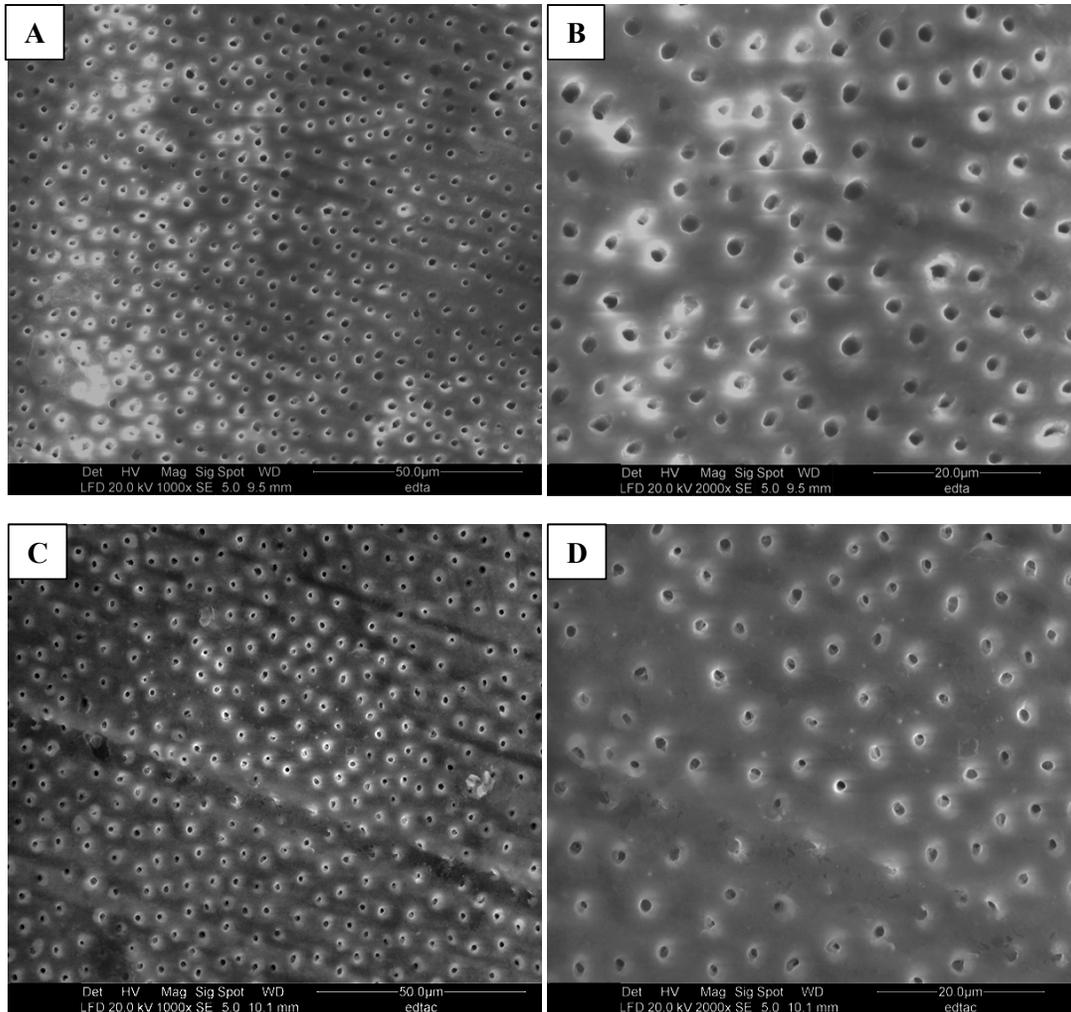


Figura 46: Imagens de MEVA (1000X e 2000X) após 180 s de ataque ácido. **EDTA** (A e B); **EDTAC** (C e D).

O AC 1% foi capaz de remover completamente o *smear layer* após 30 s. Nas imagens relativas a 300 s foi constatada erosão na dentina peritubular de alguns túbulos (Figura 47– A e B). Também não foi observada a permanência de resquícios de *smear layer* dentro dos túbulos, após a remoção da camada superficial, como sugeria as imagens de microscopia óptica.

A amostra do grupo do AC 5% apresentou inclinação dos túbulos da superfície dentinária, o que dificultou a análise. Contudo, foi possível observar que essa solução causou aumento da rugosidade da superfície dentinária (Figura 47– C e D). Após 180 s, não apenas a rugosidade, mas a destruição em algumas áreas da dentina peritubular e intertubular pôde ser constatada.

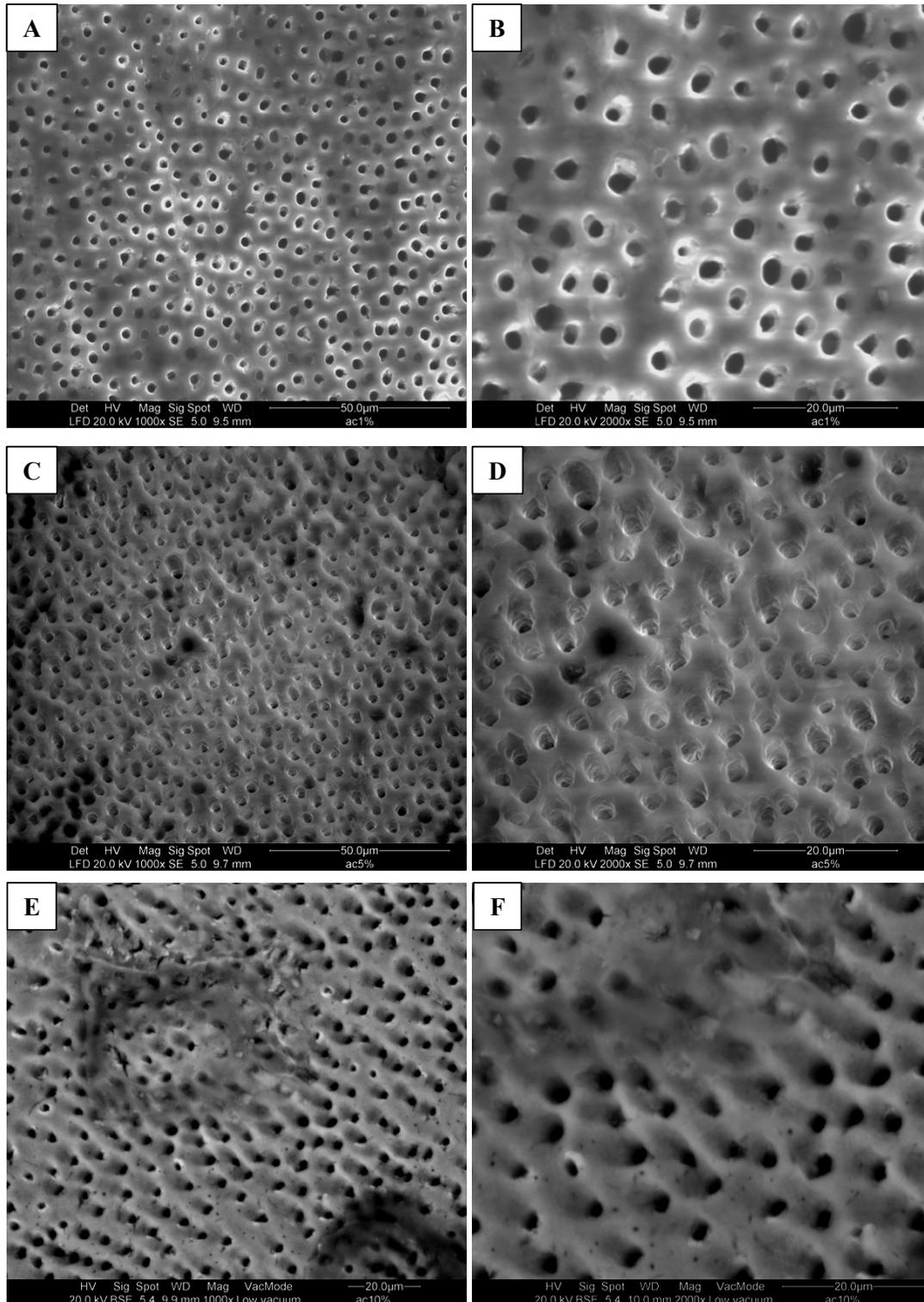


Figura 47: Imagens de MEVA (1000X e 2000X) após 180 s de ataque ácido. **AC 1%** (A e B); **AC 5%** (C e D); **AC 10%** (E e F).

No caso do AC 10%, as imagens demonstraram depressões profundas na superfície dentinária, indicando severa erosão peritubular e intertubular, que se iniciaram após 60 s. Isso deve explicar a falta de nitidez das imagens das amostras na microscopia óptica nesse mesmo tempo. Da mesma forma que na microscopia óptica também foi observada a presença dos canais secundários na superfície dentinária (Figura 47– E e F).

Haznedaroglu (2003) também observou extensa desmineralização da superfície dentinária, com alargamento excessivo dos túbulos, eliminando quase completamente a dentina peri e intertubular, após a utilização da solução de AC 50%.

Os resultados apresentados por Götze *et al.* (2005) corroboram, parcialmente, com os desse estudo. Eles observaram que a utilização de AC 8% e 10%, em dentes decíduos, também resultou em erosão da dentina tubular. Contrariando o presente estudo, no qual efeitos similares foram apresentados pelo AC 5%, os autores não relataram qualquer erosão dentinária após a utilização soluções de AC 6%. Além disso, a solução de AC 4% não foi capaz de remover completamente o *smear layer*.

Alguns autores sugerem concentrações mais elevadas de soluções de AC, com base nos resultados de suas investigações. Sterrett *et al.* (1983) relataram que a melhor concentração para a desmineralização dentinária estava em torno de 25%-30% em 1, 2 ou 3 minutos de aplicação. Haznedaroglu (2003) também relatou que soluções de AC 25% e 50% são igualmente eficientes para a remoção do *smear layer*.

Apesar de soluções de menor concentração terem sido utilizadas no presente estudo, foram constatados efeitos erosivos na superfície dentinária através de microscopia eletrônica de varredura ambiental. Alguns estudos indicam que não apenas as concentrações, mas o pH das soluções de AC têm influência no processo de desmineralização. Haznedaroglu (2003) observou que as soluções de AC 5% e 10% com pH 6 (tamponadas com hidróxido de sódio) foram menos eficientes na remoção do *smear layer*, que as com pH 1,8 e 1,9, respectivamente. Hennequin *et al.* (1994) investigaram o efeito do AC na dissolução de cálcio e fósforo da dentina radicular e observaram que o efeito também era influenciado pelo pH da solução.

A diferença nos valores de pH das soluções de AC utilizadas nos diferentes experimentos realizados por De-Deus (2004), pode explicar os resultados contraditórios encontrados. Utilizando microscopia de força atômica, a autor observou efeitos erosivos na dentina causados pelo AC 10%. Contudo, os resultados dos ensaios de microdureza dentinária desse mesmo estudo, revelaram, que o AC 10% foi a solução que apresentou a menor redução da microdureza, seguida pelo EDTAC e EDTA.

Apesar do presente estudo ter utilizado soluções de AC em concentrações menores, o pH ácido (1,8 a 2,0) pode explicar os efeitos erosivos causados na superfície dentinária. Da mesma forma, o pH alcalino utilizado em outros estudos pode resultar em efeitos similares entre soluções de EDTA e de AC em diferentes concentrações (Yamada *et al.*, 1983; Scelza *et al.*, 2003).

Existem poucos relatos na literatura sobre a influência da rugosidade da superfície dentinária para a adaptação da obturação do canal radicular (Garberoglio & Becce, 1994). O trabalho de Coli *et al.* 1999, apesar de avaliar a superfície dentinária para restaurações coronárias de resina composta, explica um pouco o efeito da rugosidade na adaptação de um material restaurador. O aumento da rugosidade, aumenta a área de superfície de contato, o que contribui para o aumento da resistência ao cisalhamento de restaurações dentais. Além disso, a penetração do material restaurador nos túbulos dentinários também aumenta a resistência ao cisalhamento. Assim, uma rugosidade uniforme, parece ser favorável, principalmente, por aumentar a superfície de contato da restauração com a superfície dentinária. Contudo, a desmineralização excessiva pode prejudicar esse íntimo contato material/superfície.

A análise qualitativa das imagens obtidas através do MEVA revela que todas as soluções apresentam capacidade de remoção do *smear layer* após 300 s. As soluções de AC demonstraram maior poder quelante e o EDTAC o menor. As soluções podem ser assim classificadas, de forma decrescente do potencial de quelação: AC 10% > AC 5% > AC 1% > EDTA > EDTAC.

Não foram encontrados outros relatos na literatura dos efeitos erosivos severos, que foram observados na superfície dentinária causados pelo AC 10%.

5.8 Modelo Experimental

O processo de desmineralização dentinária é objeto de muita pesquisa e discussão científica (Pashley *et al.*, 1981). Gulabivala *et al.* (2005) relataram que a maioria das pesquisas científicas relacionadas à remoção do *smear layer* são estudos laboratoriais, infelizmente, difíceis de comparar por causa da falta de padronização das metodologias. De-Deus (2004) indicou que o principal fator para a falta de conclusões sobre esse assunto é o caráter qualitativo e não reprodutível da maioria dos estudos. Por isso, esse autor utilizou o microscópio de força atômica (AFM) para observar o processo de desmineralização. O método demonstrou algumas vantagens relevantes como a possibilidade da observação do processo em tempo próximo ao real, pois a captura de imagens é realizada durante a imersão das amostras na solução quelante. Contudo, algumas limitações da técnica do AFM impediram a obtenção de resultados quantitativos relevantes.

No presente estudo, a metodologia descrita provou ser rápida, robusta, e reprodutível. As figuras que apresentam as seqüências de imagens representativas de cada amostra demonstram o seu caráter longitudinal. A possibilidade de observar alterações microscópicas na morfologia dentinária durante a desmineralização é crucial para o entendimento do fenômeno e pode ajudar no estabelecimento de uma relação tempo/efeito ideal para aplicação de substâncias quelantes. Isso representa uma evolução sobre os tradicionais estudos qualitativos de MEV para a caracterização da superfície dentinária. Contudo, é importante ressaltar que nesse experimento as soluções são renovadas em cada tempo experimental, ao contrário da prática clínica, que geralmente utiliza uma única aplicação. Alguns autores demonstraram o efeito auto-limitante, principalmente do EDTA, o que reduz seu poder de quelação com a evolução temporal do ataque ácido (Nygaard-Øtsby, 1957; Lopes & Siqueira, 1999; Hüllsman *et al.*, 2003). Assim os valores relacionados à desmineralização nesse estudo podem estar superestimados em relação aos obtidos clinicamente.

As principais vantagens do Processamento e Análise Digital de Imagens (PADI) são: excelente representatividade estatística, já que um grande número de campos ou objetos pode ser considerado para análise, geralmente sem influência de um operador humano; aquisição muito mais rápida de dados do que a contagem manual, especialmente quando combinado com automação do

microscópio e métodos de aquisição digital de imagens; a possibilidade de avaliação de parâmetros complexos que não podem ser obtidos através de inspeção visual, como medições sofisticadas de área, forma e textura (Paciornik & Mauricio, 2004).

Em uma extensa busca bibliográfica não foram encontrados na literatura relatos consistentes de análises longitudinais e quantitativas no MEV. Di Lenarda *et al.* (2000) mencionam a utilização de um procedimento de análise de imagens de MEV para avaliar o efeito de AC e EDTA após 2 minutos de ataque ácido, mas nenhum detalhe, do método utilizado ou dos valores obtidos, foi apresentado. Análises de espectroscopia de absorção atômica (Serper & Calt, 2002) e ensaios de microdureza (De-Deus *et al.*, 2006) fornecem dados quantitativos do processo de desmineralização, mas não oferecem a possibilidade de observar o processo acontecendo.

O presente estudo mostra que a microscopia óptica co-localizada associada com análise de imagens fornece dados quantitativos relacionados aos aspectos microestruturais visualizados durante o processo de desmineralização. Outro ponto relevante está relacionado à excelente amostragem alcançada pelo PADI, permitindo que milhares de túbulos fossem medidos automaticamente, gerando estatísticas muito confiáveis.

Uma das limitações da microscopia óptica está relacionada à restrita profundidade de foco. Essa condição é particularmente crítica para a observação do processo de desmineralização em amostras em que o *smear layer* não é uniforme. Assim, é necessária a preparação da amostra através de lixamento e polimento com o objetivo de obter uma superfície praticamente plana antes da realização do experimento. Logicamente esse tipo de preparação não reproduz um *smear layer* real obtido em condições clínicas, mas permite a padronização dessa camada em todas as amostras (Verdelis *et al.*, 1999). Além disso, os procedimentos foram aplicados a uma superfície horizontal plana, eliminando parte das variáveis presentes na situação clínica, no qual o contato entre a substância quelante e a dentina é afetado pela posição vertical do dente e características anatômicas próprias de cada sistema de canais radiculares.

O MEVA foi utilizado com o objetivo de observar detalhes que não podiam ser identificados na microscopia óptica, e relacionar as imagens obtidas entre esses tipos de microscopia. Apesar de não ter fornecido dados quantitativos, esse

experimento excluiu a interferência do operador na seleção de áreas para análise. Não existe na literatura nenhum estudo que tenha utilizado a técnica de microscopia digital co-localizada em microscopia eletrônica de varredura. A utilização do MEVA foi importante principalmente porque foi possível demonstrar que a falta de nitidez das imagens das amostras de AC 10% e AC 5% estava relacionada a alterações profundas de relevo da superfície dentinária. Além disso também pôde ser constatada a erosão da dentina peritubular e intertubular causada por esses agentes quelantes.