

CONDICIONAMENTO ÁCIDO DE TECIDOS DENTAIS DUROS BOVINOS PARA OBTENÇÃO DE IMAGENS POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA

R. P. Sanches¹, A. J. Damião², W. Miyakawa³

¹Universidade do Vale do Paraíba – Faculdade de Engenharias, Urbanismo e Arquitetura, São José dos Campos – SP, beto_sanches@hotmail.com

²Instituto de Estudos Avançados – Divisão de Fotônica, São José dos Campos – SP, damiao@ieav.cta.br

³Instituto de Estudos Avançados – Divisão de Fotônica, São José dos Campos – SP, wmi@ieav.cta.br

Resumo - Em tecidos dentais duros, soluções ácidas, alcalinas ou uma combinação de ambas têm sido amplamente utilizados para a avaliação de superfícies por microscopia. Neste trabalho, foram testados três tempos de condicionamento de superfícies de esmalte e dentina bovinos com ácido láctico, à concentração de 113,8 mmol/L e pH 3,3, para avaliação por microscopia de força atômica. As amostras de esmalte e de dentina passaram por polimento e foram separadas em quatro grupos: as amostras do grupo controle não sofreram ataque químico e as dos grupos 1, 2 e 3 sofreram condicionamento durante os tempos de um, três e cinco minutos, respectivamente. Os resultados mostraram que, dentre os tempos testados, o de um minuto foi o mais adequado para a remoção de riscos e resíduos de polimento e revelar as estruturas tanto do esmalte quanto da dentina. A dentina intertubular foi mais atacada pelo ácido láctico do que a peritubular, sugerindo um possível mecanismo de desmineralização. A avaliação da rugosidade Ra e do período Sm revelou que o primeiro não se mostrou suficiente para avaliar quantitativamente a qualidade da superfície, e o segundo, que o ataque químico não afetou a periodicidade das estruturas nas superfícies tratadas.

Palavras-chave: esmalte, dentina, AFM, superfícies, ataque ácido.

Área do Conhecimento: ciências da saúde

Introdução

Anatomicamente, o dente (AVERY, 2001; CATE, 1998; KATCHBURIAN, 1998; MJÖR, 1990) é um órgão constituído de três partes: o esmalte, que é a estrutura que recobre a coroa dos dentes; a dentina, tecido conjuntivo duro menos mineralizado que o esmalte e mais resistente, e a polpa dentinária, um tecido conjuntivo mole.

O esmalte é o tecido inerte, acelular e mineralizado mais duro do corpo humano. No esmalte maduro, o conteúdo inorgânico representa 86% do seu volume e é constituído, principalmente, por cristais de fosfato de cálcio sob a forma de hidroxiapatita $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$. Estes cristais de hidroxiapatita, estreitamente reunidos e organizados, formam os bastões, microestruturas típicas deste tecido.

A dentina é um tecido mineralizado que constitui a maior parte da estrutura do dente, sendo recoberta pelo esmalte, na porção coronária. Seu componente inorgânico consiste, principalmente, em hidroxiapatita e a fase orgânica em colágeno. Este tecido caracteriza-se pela presença de múltiplos canáliculos (túbulos dentinários) dispostos muito próximos, que atravessam toda a sua espessura e contêm as extensões citoplasmáticas dos odontoblastos.

Já a microscopia de força atômica (AFM) (SPRINGER HANDBOOK, 2004; MEYER et. al.,

2004; ZANETTE, 1997) é uma técnica que fornece, além de imagens, informações quantitativas (dimensões, perfil, rugosidade, periodicidade, etc.) a respeito das estruturas de superfície, fazendo desta técnica, um importante instrumento para caracterização topográfica.

Para que se possa caracterizar as estruturas de hidroxiapatita (bastões de esmalte e túbulos dentinários) dos tecidos dentais duros no microscópio de força atômica, é conveniente que as superfícies estejam razoavelmente planas e sem riscos e resíduos de polimento. O condicionamento químico de superfícies polidas é um recurso amplamente utilizado na Odontologia, tanto em trabalhos científicos, envolvendo avaliações por microscopia (WATARI, 2005), como na prática clínica, não só para a remoção de fragmentos de desgaste mecânico (*smear layer*) do dente, mas, principalmente, para melhorar a aderência do material utilizado nas restaurações.

No presente trabalho, foram testados três tempos de condicionamento ácido (HANNING et. al., 2005) para a remoção dos resíduos de polimento e o realce das estruturas de hidroxiapatita (bastões e túbulos) em amostras polidas de esmalte e dentina bovinos, para a caracterização por microscopia de força atômica.

Metodologia

A preparação de amostras foi feita em três etapas:

- i. corte em máquina de baixa rotação: foram cortados 32 corpos de prova (16 de esmalte e 16 de dentina) a partir de 8 dentes incisivos bovinos;
- ii. polimento: os corpos de prova foram incluídos em resina acrílica e sofreram um processo de lixamento, que consistiu em desgaste com lixas de granulação 220, 320, 500, 12 μ m, 9 μ m. Para a dentina, o processo foi finalizado com discos de polimento de fibra óptica de 6 μ m, 3 μ m e 1 μ m. Para o esmalte, finalizou-se com polimento com pasta de diamante de 6 μ m, 3 μ m e 1 μ m. Após o polimento, as amostras foram limpas com água destilada em ultra-som por um minuto, e
- iii. ataque ácido: foram constituídos quatro grupos, denominados controle, 1, 2 e 3. As amostras do grupo controle não sofreram ataque químico. As dos grupos 1, 2 e 3 sofreram ataque químico com ácido láctico, na concentração de 113,8 mmol/L e pH 3,3, durante os tempos de um, três e cinco minutos, respectivamente. Após o ataque, as amostras foram avaliadas por AFM (*Shimadzu Corp. Inc., Japan*, modelo SPM 9500J3), em modo de contato intermitente.

Resultados

As

Figura 1 e 2 mostram, respectivamente, imagens representativas de esmalte e dentina, obtidas por microscopia de força atômica, com área de varredura de 50 μ m x 50 μ m.

Uma avaliação mais quantitativa da qualidade das superfícies foi feita medindo-se a rugosidade Ra (valor médio de todos os desvios do perfil de rugosidade da linha média) e o período Sm (período médio dos picos de perfil) ao longo de uma linha, utilizando o recurso de análise de perfil, do *software* do microscópio de força atômica (*Shimadzu Corp. Inc., Japan*, modelo SPM 9500J3). Em cada imagem, foram colocadas, aleatoriamente, quatro linhas verticais e quatro linhas horizontais, cujo comprimento foi arbitrariamente fixado em de 25 μ m. Para evitar que a profundidade e a periodicidade das aberturas dos túbulos dentinários interferisse na determinação da rugosidade, na dentina, as linhas foram colocadas de modo a não interceptar essas aberturas de túbulos dentinários. Dessa forma, foram obtidos oito valores de Ra e oito de Sm. Os dados foram tabulados e satisfizeram o teste de normalidade de Shapiro-Wilk ao nível de 5%. Os

valores médios dessas medidas são apresentados na Tabela 1.

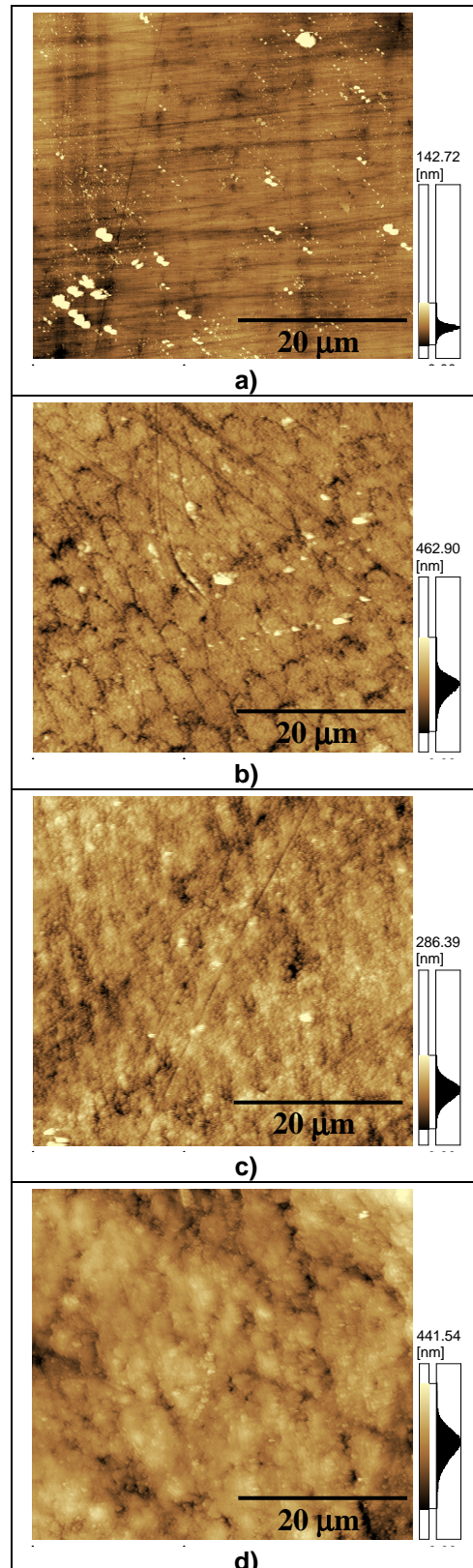


Figura 1: micrografias de esmalte por AFM, com área de varredura de 50 μ m x 50 μ m, de (a)

amostra controle, (b) amostra do grupo 1, (c) amostra do grupo 2 e (d) amostra do grupo 3.

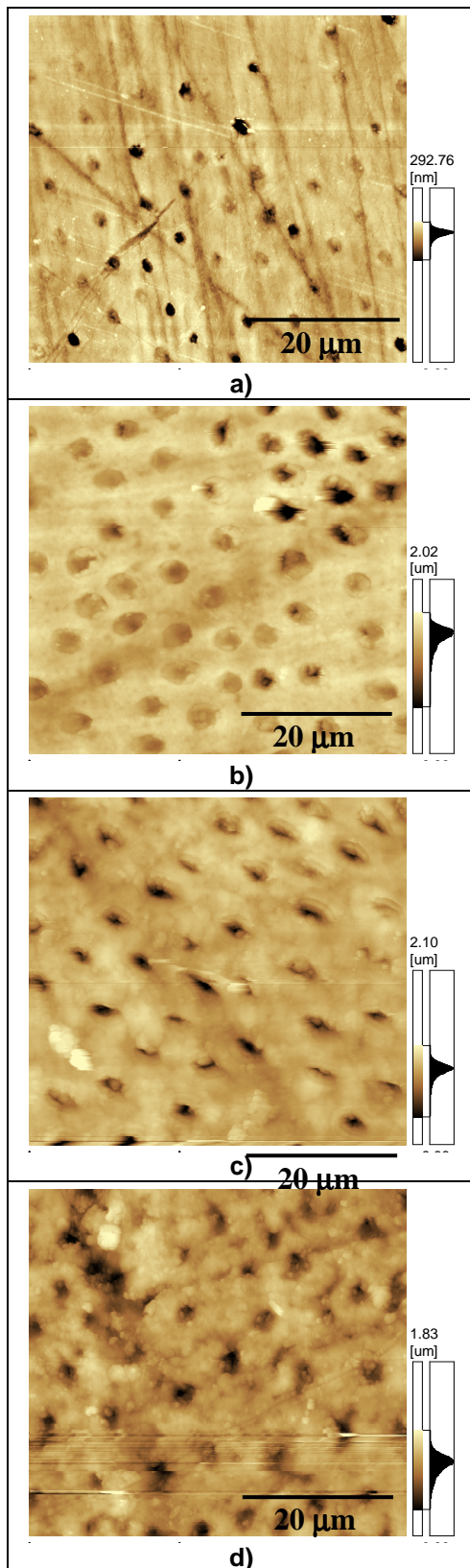


Figura 2: micrografias de dentina por AFM com área de varredura de 50 µm x 50 µm, de (a) amostra controle, (b) amostra do grupo 1, (c) amostra do grupo 2 e (d) amostra do grupo 3.

Tabela 1: valor médio de todos os desvios do perfil de rugosidade da linha média (Ra) e período médio dos picos de perfil (Sm) para esmalte e dentina bovinos.

	Esmalte		Dentina	
	Ra (nm)	Sm (µm)	Ra (nm)	Sm (µm)
Controle	13±3	1,6±0,3	15±3	1,6±0,4
Grupo 1	22±6	1,2±0,2	66±8	2,1±0,4
Grupo 2	26±4	1,2±0,5	(12±2)x10	3±1
Grupo 3	45±11	2±1	(10±2)x10	3±1

Discussão

Na

Figura 1 (a), que corresponde à amostra de esmalte do grupo controle, nota-se nitidamente a presença de riscos e resíduos de polimento, mas as microestruturas de hidroxiapatita (bastões) não são visualizadas. Já a

Figura 1 **Erro! Fonte de referência não encontrada.** (b) mostra que o tempo de ataque químico de um minuto permite a identificação da estrutura típica de corte transversal de bastões de esmalte, embora ligeiramente oblíquo, em, uma vez que a seção transversal está elíptica. Na Figura 1 (c) (três minutos), observa-se que o ataque químico começa a dissolver as estruturas e, na

Figura 1 (d) (cinco minutos), o ataque químico foi intenso a ponto de descaracterizar a superfície do esmalte e não mais permitir a visualização de estruturas.

Para a dentina, a imagem da amostra controle (Figura 2 (a)) também mostra muitos riscos e resíduos de polimento preenchendo o interior de alguns túbulos dentinários, não sendo possível a distinção entre dentina peritubular e intertubular. A micrografia para o tempo de um minuto (Figura 2 (b)) mostra que tanto os riscos quanto os resíduos de polimento foram removidos, desobstruindo alguns túbulos dentinários. Já para o tempo de três minutos (Figura 2 (c)), embora quase todos os túbulos estejam desobstruídos, nota-se que há um início de dissolução das estruturas na superfície da dentina. Para o tempo de cinco minutos (

Figura 2 (d)), a dissolução foi excessiva, a ponto de descaracterizar a superfície. É

interessante observar que, neste caso, a dentina intertubular foi mais atacada pelo ácido láctico do que a dentina peritubular, sugerindo, assim, um possível mecanismo de desmineralização dos túbulos dentinários.

Os resultados das medidas de rugosidade mostraram que, tanto para o esmalte quanto para a dentina, observa-se uma tendência de aumento de Ra com o tempo de ataque químico.

Porém, a análise de variância simples (*one-way* ANOVA) indicou que os valores médios de Ra dos grupos 1 e 2 de esmalte não são significativamente diferentes ao nível de 1%, embora claramente observa-se a diferença nas características das estruturas de superfície da Figura 1 (b) em relação às da Figura 1 (c). Os valores médios de Ra dos grupos 2 e 3 de dentina também não são significativamente diferentes ao nível de 1%, apesar da perceptível dissolução da dentina intertubular que se nota na Figura 2 (d), mas não na Figura 2 (c). Estes fatos sugerem que somente o parâmetro Ra não é o mais indicado para quantificar o ataque químico na superfície das amostras.

Optou-se, então, por avaliar o período médio dos picos de perfil Sm. Porém, tanto para o esmalte quanto para a dentina, a análise de variância revelou não haver diferença significativa ao nível de 1% entre os valores médios de Sm para todos os grupos. Este fato sugere que o ataque ácido removeu os resíduos dos sulcos e dissolveu os picos das estruturas formadas pelo lixamento e polimento, sem alterar a sua periodicidade.

Conclusão

Dentre os tempos testados de ataque químico com ácido láctico, na concentração de 113,8 mmol/L e pH 3,3, o tempo de um minuto foi o mais adequado para a identificação das estruturas tanto do esmalte quanto da dentina. A avaliação da rugosidade Ra e do período Sm revelou que o primeiro não se mostrou suficiente para avaliar quantitativamente a qualidade da superfície, e o segundo, que o ataque químico não afetou a periodicidade das estruturas nas superfícies tratadas.

Agradecimentos

Ao CNPq, pelo auxílio financeiro, ao IEAv pela oportunidade desta Iniciação Científica e ao Instituto Tecnológico de Aeronáutica e ao Laboratório de Espectroscopia Vibracional Biomédica da Univap, pela utilização de suas instalações e equipamentos.

Referências

- AVERY, J. K. **Fundamentos de Histologia e Embriologia Bucal: Uma Abordagem Clínica**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.
- CATE, R. T. **Histologia Bucal: Desenvolvimento, Estrutura e Função**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998.
- HANNING, C; HAMKENS, A; BECKER, K; ATTIN, R; ATTIN, T., Erosive effects of different acids on bovine enamel: release of calcium and phosphate in vitro. **Arch. of Oral Biol.**, V.50, p.541-552, 2005.
- KATCHBURIAN, E. e ARANA, V. **Histologia e Embriologia Oral**. São Paulo: Panamericana, 1999.
- MEYER, E.; HUG, H. J.; BENNEWITZ, R., Scanning probe microscopy: the lab on a tip, Springer-Verlag, Germany, 2004.
- MJÖR, I. A. e FEJERSKOV, O. **Embriologia e Histologia Oral Humana**. São Paulo: Panamericana, 1990.
- Springer Handbook of nanotechnology, BHUSHAN, B. ed., Springer-Verlag, Germany, 2004.
- WATARI, F. *In situ* quantitative analysis of etching process of human teeth by atomic force microscopy. **J. of Electron Microsc.**, V.54, n.2, p.299-308, 2005.
- ZANETTE, S. I. Apostila: Funcionamento de um Microscópio de Força Atômica. Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas, 1997